วิธีปฏิบัติ (Work instruction)

ชื่อเอกสาร .....การตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์..G-6-PD..โดยเครื่อง..SD..Biosensor.....

รหัสเอกสาร .....WI-LAB-H005.....

ผู้จัดทำ..... (.....นายกฤษเวท.....แซ่ท้าว.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่จัดทำ**.....5..มกราคม..2569.....
ผู้ทบทวน..... (.....น.ส..จิราพร.....ใจชื่น.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่ทบทวน**.....5..มกราคม..2569.....
ผู้อนุมัติ..... (.....น.ส..จิราพร.....ใจชื่น.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่อนุมัติ**.....6..มกราคม..2569.....
สำเนาฉบับที่.....01.....	**ผู้ถือครอง**.....เทคนิคการแพทย์.....
แก้ไขครั้งที่.....00.....	**วันที่เริ่มใช้**.....2..ตุลาคม..2558.....
แก้ไขครั้งที่.....01.....	**วันที่เริ่มใช้**.....2..มกราคม..2566.....
แก้ไขครั้งที่.....02.....	**วันที่เริ่มใช้**.....6..มกราคม..2569.....
แก้ไขครั้งที่.....	**วันที่เริ่มใช้**.....
แก้ไขครั้งที่.....	**วันที่เริ่มใช้**.....

	วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 2 ของ 10
	เรื่อง : การตรวจวิเคราะห์ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยเครื่อง SD Biosensor	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-H005	แก้ไขครั้งที่ : 02
ผู้จัดทำ : นายกฤษเวท แซ่ท้าว ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์		วันที่ 5 มกราคม 2569	
ผู้รับรอง : นางสาวจิราพร ใจชื่น ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์		วันที่ 5 มกราคม 2569	
ผู้อนุมัติ : นางสาวจิราพร ใจชื่น ตำแหน่ง หัวหน้างานเทคนิคการแพทย์		วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569	

รายการทบทวนและแก้ไข

แก้ไขครั้งที่	วันที่	รายละเอียดการแก้ไข
00	1 ตุลาคม 2558	- เริ่มจัดทำ
00	2 ตุลาคม 2558	- ประกาศใช้
01	1 มกราคม 2566	- ทบทวนเอกสาร
01	2 มกราคม 2566	- ประกาศใช้
02	5 มกราคม 2569	- ทบทวนเอกสาร
02	6 มกราคม 2569	- ประกาศใช้

1.ความมุ่งหมาย (Purpose)

เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานในการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยเครื่อง SD Biosensor ให้ปฏิบัติงานให้มีคุณภาพและมาตรฐานเดียวกัน ได้อย่างถูกต้อง

2.การนำไปใช้ (Application)

2.1 ใช้สำหรับตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยตรวจจากสิ่งส่งตรวจ EDTA blood หรือ Capillary blood

2.2 ใช้ตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในคนไข้ที่เป็นมาลาเรียในการให้ยาฆ่าเชื้อ

2.3 ใช้ตรวจวินิจฉัยภาวะคนไข้ที่มีเม็ดเลือดแดงแตกง่าย

3.เอกสารอ้างอิง (Reference)

3.1 คู่มือการใช้งานเครื่อง SD Biosensor โดยบริษัท SD Biosensor, Inc.

3.2 เอกสารใบแนบชุดตรวจ G6PD test โดยบริษัท SD Biosensor, Inc.

3.3 อังคณา แซ่เจ็ง, พัชริดา บุญเดช, ววรรณา ศรีสัจจารักษ์, ธุวาพร สุวรรณ สุวรรณลา, พลวัชร์ เรืองศิรรักษ์, สาริณี ศรีเทพ, วรเชษฐ์ คันธวังอินทร์, รุ่งนิรันดร์ สุขอร่าม และจันทร์พร จินา.(2564).คู่มือการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD สำหรับผู้ป่วยมาลาเรีย และการควบคุมคุณภาพ. กรุงเทพมหานคร: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

3.4 อำพร ไตรภัทร (2546) การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD. ใน กุลนภา ฟูเจริญกนกวรรณ แสนไชยสุริยา บรรณาธิการ การทดสอบห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. พิมพ์ครั้งที่ 3 โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2546 หน้า 105-113

3.5 คู่มือการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD สำหรับผู้ป่วยมาลาเรีย และการควบคุมคุณภาพ. กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2564

4.นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

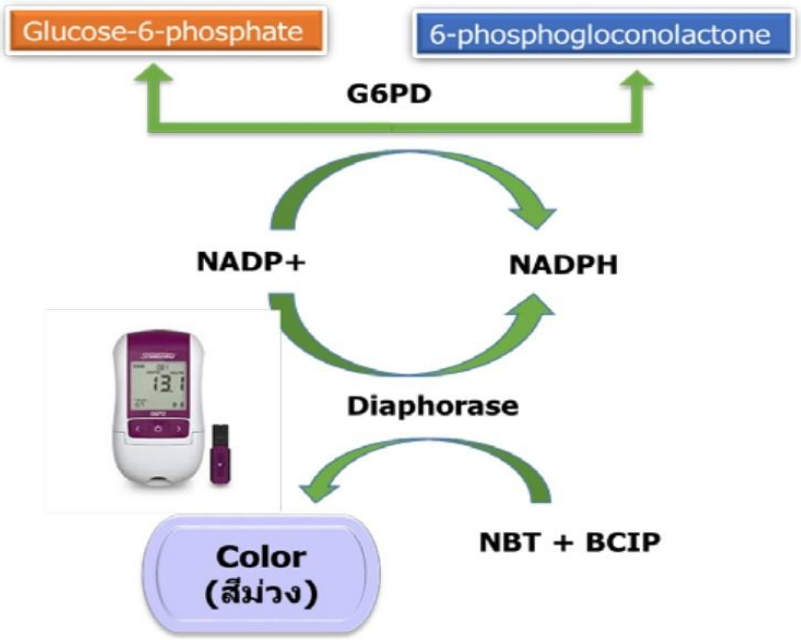
กลูโคส 6 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose -6 - phosphate dehydrogenase; G-6-PD) เป็นเอนไซม์ ที่อยู่ในเซลล์ต่างๆ ของร่างกายและเม็ดเลือดแดงมีหน้าที่สำคัญใน Hexose monophosphate shut

หรืออีกชื่อ หนึ่งคือ Pentose phosphate pathway (PPP) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน glucose-6-phosephate (G-6-P) ให้เป็น 6-phosphogluconolactone และเปลี่ยน nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) ให้เป็น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ซึ่ง NADPH จะเปลี่ยนลูตาไธโอน (glutathione) ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (glutathione disulfide, GSSG) ให้เป็น glutathione ในรูป รีดิวซ์ (GSH) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระต่างๆ ที่เป็นพิษต่อเซลล์และป้องกันเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ให้ถูกทำลาย เนื่องจากเม็ด เลือดแดงสร้าง NADPH ได้จาก PPP เพียงแหล่งเดียว ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD จึงมีผลต่อเม็ดเลือดแดงเด่นชัด กว่าเซลล์ในระบบอื่น ๆ ในภาวะปกติ เอนไซม์ G-6-PD ในเม็ดเลือดแดงจะทำหน้าที่อยู่ในระดับต่ำกว่าที่สามารถทำได้จริงเมื่อมี oxidative stress เพิ่มขึ้นเช่น ได้รับสารที่มีอนุมูลอิสระเอนไซม์ G-6-PD จะเพิ่มการทำงานมากขึ้น ดังนั้น ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD แม้จะมีเอนไซม์อยู่ในระดับต่ำกว่าคนทั่วไปในภาวะปกติจึงมักไม่แสดงอาการและจะแสดงอาการซีดจากเม็ดเลือดแดงแตกเมื่อมี oxidative stress มากกว่าปกติ ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เมื่อได้รับสารอนุมูลอิสระพบว่า เม็ดเลือดแดงไม่สามารถสร้างโคเอนไซม์ชนิด NADPH ได้จึงทำให้อนุมูลอิสระเกิดการออกซิไดซ์ free-sulfhydryl group ที่อยู่ในฮีโมโกลบิน เป็นพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bridge) ทำให้ฮีโมโกลบินมีความสามารถในการละลายน้ำลดลง และตกตะกอนเป็นไฮน์บอดีย์ (heinz body) อยู่ภายในเม็ดเลือดแดงส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบเฉียบพลันและเกิดภาวะซีด ซึ่งนำไปสู่ภาวะไตวายเฉียบพลันและมีภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เป็นสาเหตุทำให้เสียชีวิตได้ ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เป็นความผิดปกติที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ X-linked ซึ่งมักพบบ่อยในประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีมาลาเรียเป็นโรคประจำถิ่น เช่น แอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีข้อสันนิษฐานว่าเชื้อมาลาเรียเป็นตัวกระตุ้นทำให้จีโนมของมนุษย์เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้ร่างกายสามารถป้องกันหรือลดความรุนแรงของการติดเชื้อ ซึ่งการกลายพันธุ์นี้สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยผ่านทางโครโมโซมเพศ (X โครโมโซม) ในผู้ชายมีโครโมโซม X เพียงโครโมโซมเดียว ต่างจากเพศหญิงที่มี 2X โครโมโซม ถ้าความผิดปกติเกิดที่โครโมโซม X เพียงโครโมโซมเดียวจะไม่แสดงอาการผิดปกติ การแสดงอาการผิดปกติมักเกิดจากมีความผิดปกติของ X ทั้ง 2 ตัว ดังนั้นจึงพบภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในเพศชายมากกว่า เพศหญิง

Glucose -6 - Phosphate Dehydrogenase คำย่อ G-6-PD

5.หลักการ (Principle)

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-chlro-3-indolyl-phosphate (BCIP) และ nitro blue tetrazolium (NBT) โดยปฏิกิริยา diaphorase reaction จะเกิดสีม่วง ความเข้มข้นเป็นสัดส่วน
โดยตรงกับ G-6-PD activity



6.เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated documents)

6.1 QP-LAB-001

6.2 QP-LAB-002

7.ความปลอดภัย (Safety)

7.1 ปฏิบัติงานโดยนักเทคนิคการแพทย์

7.2 สวมถุงมือ เสื้อกาวน์ (gown) แว่นตา และหน้ากากอนามัย ป้องกันการปนเปื้อนขณะปฏิบัติงาน

7.3 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอาจยังมีความสามารถในการก่อโรค ดังนั้น จึงควรจัดการทิ้งลงในถังขยะติดเชื้อ

7.4 ชุดตรวจ G-6-PD test kit ใช้สำหรับตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ทางโลหิตวิทยาเท่านั้น

8.เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and Supplies)

8.1 เครื่องตรวจ (G6PD analyzer instrument)

8.2 ชุดตรวจ G6PD test kit ภายใน 1 กล่อง ของชุดตรวจประกอบด้วย

8.2.1 แถบทดสอบ (strip) STANDARD G6PD test device จำนวน 25 อันบรรจุแยกอยู่ในซองจะเปิดเมื่อจะใช้งานเท่านั้น

8.2.2 บัฟเฟอร์สำหรับการสกัด (extraction buffer) จำนวน 25 หลอด

8.2.3 หลอดสำหรับดูดเลือดปริมาตร 10 µL (STANDARD Ezi tube) จำนวน 50 อัน

8.2.3 code chip จำนวน 1 อัน

8.3 อุปกรณ์เจาะเลือด เช่น เข็มเจาะเลือด สำลี และแอลกอฮอล์ เป็นต้น

9.สารมาตรฐาน (Standard)

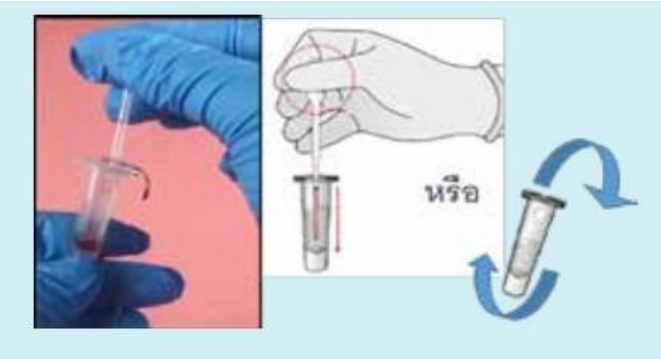
9.1 G-6-PD Control level 1 พร่องเอนไซม์

9.2 G-6-PD Control level 2 ปกติ

10.วิธีดำเนินการ (Procedure)

10.1 ใช้หลอดเก็บเลือด (Ezi tube+) แตะปลายหลอดที่หยดเลือดให้เลือดไหลเข้าสู่หลอดหยดจนถึงขีดสีดำ ซึ่งเท่ากับ 10 µL โดยให้จับที่ก้านหลอด เลือดจะไหลเข้าโดยอัตโนมัติจนถึงขีดสีดำ

10.2 บีบเลือดจากหลอด Ezi Tube+ ลงในหลอดบัฟเฟอร์ แล้วบีบหลอดหยดดูดขึ้นลง 8-10 ครั้ง เพื่อผสมสารละลาย แล้วทิ้งหลอดหยดในภาชนะ ทิ้งขยะติดเชื้อโดยการผสมอาจใช้วิธีปิดฝาฟรอยด์ให้สนิทแล้วพลิกหลอดเบาผสมเลือดกับบัฟเฟอร์ให้เข้ากันดี



10.3 เสียบแถบทดสอบสำหรับตรวจตรงช่องเสียบแถบจับส่วนที่เป็นสีเทาหันด้านมีรูกลมขาวขึ้น

10.4 ใช้หลอด Ezi Tube+ อันใหม่ แตะลงบนส่วนผสมของเลือดกับบัฟเฟอร์ในหลอด โดยเอียงหลอด ส่วนผสมของเลือดกับบัฟเฟอร์จะไหลเข้าหลอดจนถึงสีดำ โดยอัตโนมัติห้ามปิดรูและห้ามใช้วิธีบีบหลอด Ezi Tube+ เพื่อดูด

10.5 เปิดฝาเครื่องตรวจ (G6PD analyzer instrument)

10.6 บีบสารละลายส่วนผสมของเลือดกับบัฟเฟอร์ลงไปในช่องที่มีแสงไฟกระพริบสีเขียว

10.7 เมื่อมีสัญญาลักษณ์ “Clo” ให้ปิดฝาเครื่องลงเครื่องจะเริ่มทำการตรวจวิเคราะห์ โดยนับเวลา ถอยหลัง 2 นาที

10.8 เมื่อครบเวลา 2 นาที เครื่องจะรายงานผล Hb และ G6PD (U/gHb)

11.การคำนวณ (Calculation)

ผลที่ได้เป็นค่าคำนวณอัตโนมัติจากเครื่อง SD Biosensor

12.การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

การควบคุมคุณภาพภายใน

- ทำ IQC ใช้สารควบคุมภาพที่มีค่า G-6-PD ซึ่งแนะนำให้ใช้
  G-6-PD Control level 1 พร่องเอนไซม์
  G-6-PD Control level 2 ปกติ

การควบคุมคุณภาพภายนอก

-

13.การบันทึกข้อมูลและเอกสารที่ใช้ (Data record and documentation)

บันทึกลง F-LAB-02.CH010 และลงในระบบ LIS ของห้องปฏิบัติการ โดยระบบจะเชื่อมต่อเข้าสู่ระบบ HIS อัตโนมัติ

14. การรายงานผล (Report of analysis)

เพศ	ค่า G-6-PD (U/g Hb)		
	< 4.0 U/g Hb	4.0-6.0 U/g Hb	> 6.0 U/g Hb
เพศชาย	มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD	ปกติ (normal G6PD)	ปกติ (normal G-6-PD)
เพศหญิง	มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD	มีภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD บางส่วน (partial หรือ intermediate G6PD deficiency)	ปกติ (normal G6PD)

15.รายละเอียดอื่น (Supplementary note)

15.1 สิ่งส่งตรวจ EDTA blood หรือ Capillary blood

15.2 การรักษาคงสภาพของสิ่งส่งตรวจ นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชั่วโมง หลังเก็บตัวอย่าง หรือถ้าหากส่งตรวจไม่ได้ทันทีให้นำหลอดเลือดแช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C

15.3 สิ่งรบกวน

15.3.1 สิ่งส่งตรวจที่ Clot / Partial Clot

15.3.2 สิ่งส่งตรวจที่เจาะข้างให้น้ำเกลือ จะทำให้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

15.3.3 สิ่งส่งตรวจที่ Hemolysis อาจมีผลรบกวนการตรวจได้