

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION COUPLED WITH DNA STRIP FOR IDENTIFICATION OF G6PD GENE MUTATIONS

Kittiphit AUSIT¹, Theerarak SRINULGRAY², Nantanat KANTARATANAKUL², Kaewkanha KIJPRASONG³ and
Suttipat SRISUTHAM⁴

- 1 Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Thailand; plu_k1@hotmail.com
(Corresponding Author)
- 2 Talenome DNA Professional Ltd, Bangkok, Thailand
- 3 Satan Prabaramee Hospital, Naung Proe, Kanchanaburi, Thailand
- 4 Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 7 April 2025

Revised: 21 April 2025

Published: 6 May 2025

ABSTRACT

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a common genetic disorder affecting populations worldwide, especially in Southeast Asia, where the Viangchan variant is prevalent. Most individuals with this condition live normal lives but are at risk of red blood cell destruction when exposed to certain triggers, such as fava beans or antimalarial drugs like primaquine. Current screening methods have limitations, particularly in heterozygous females, who may present with normal test results and remain undiagnosed. This study aimed to develop DNA strip test kits as an alternative screening method prior primaquine administration. The test was performed on 15 malaria patients in Kanchanaburi Province, Thailand. Among them, one case of G6PD Viangchan (heterozygous) and one case of G6PD Mahidol (hemizygous) were identified. However, when compared with DNA sequencing results, the DNA strip test produced false-negative outcomes, indicating that the current version requires further development. Despite this limitation, the DNA strip test shows promise as a new screening approach, particularly for identifying heterozygous females at risk before receiving primaquine. With further refinement, it could become a valuable tool for improving patient safety in malaria treatment.

Keywords: G6PD Deficiency, Strip Test Kits, DNA Sequencing

CITATION INFORMATION: Ausit, K., Srinulgray, T., Kantaratanakul, N., Kijprasong, K., & Srisutham, S. (2025). Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction Coupled with DNA Strip for Identification of G6PD Gene Mutations. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(5), 7

การพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ร่วมกับแถบดีเอ็นเอเพื่อระบุการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี

กิตติพิชญ์ อุลธิ¹, ชีระรักษ์ ศรีนวลกราย², นันทนัช คันธรัตน์กุล², แก้วกัณหา กิจประสงค์³ และ สุทธิภัทร ศรีสุธรรม⁴

1 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; plu_k1@hotmail.com (ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

2 บริษัท ทาเลโนเมะ ดีเอ็นเอ โปรเฟสชันนัล จำกัด, กรุงเทพฯ

3 โรงพยาบาลสถานพระบารมี, นนทบุรี, กาญจนบุรี

4 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

โรคพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (G6PD deficiency) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประชากรโลก โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ที่มีการรายงานการพบเชื้อสายเวียงจันทน์ (Viangchan) และมหิดล (Mahidol) เป็นหลัก ผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถใช้ชีวิตได้ปกติ แต่มีความเสี่ยงต่อภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันเมื่อได้รับสารกระตุ้น เช่น ถั่วปากอ้า หรือยาต้านมาลาเรียชนิดไพราควิน (primaquine) ปัญหาสำคัญของการตรวจคัดกรองในปัจจุบันคือความแม่นยำต่ำในผู้หญิงที่มีภาวะเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) เนื่องจากวิธีการตรวจวัดระดับเอนไซม์แบบเดิมอาจให้ผลปกติแม้มีพันธุกรรมผิดปกติ เพื่อแก้ไขข้อจำกัดนี้ มีการพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอ (DNA Strip test kits) ที่สามารถตรวจจับการกลายพันธุ์ของยีน G6PD โดยตรง จากการทดลองในผู้ป่วยมาลาเรีย 15 รายที่จังหวัดกาญจนบุรี พบผู้มีภาวะพร่องเอนไซม์ชนิดเวียงจันทน์และมหิดลอย่างละ 1 ราย อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีหาลำดับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA sequencing) พบว่าชุดทดสอบยังให้ผลลบปลอม บ่งชี้ถึงความจำเป็นในการปรับปรุงความไวของการทดสอบ แม้มีข้อจำกัดในปัจจุบัน ชุดทดสอบดีเอ็นเอถือเป็นนวัตกรรมที่มีศักยภาพสำหรับการคัดกรองกลุ่มเสี่ยง โดยเฉพาะผู้หญิงเฮเทอโรไซกัสที่ติดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งต้องการการให้ยาต้านมาลาเรียชนิดไพราควินอย่างปลอดภัย การพัฒนาต่อยอดนวัตกรรมนี้จะช่วยลดความเสี่ยงจากการเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกได้อย่างมีนัยสำคัญในอนาคต

คำสำคัญ: จีซิกพีดี, ชุดทดสอบดีเอ็นเอ, การหาลำดับดีเอ็นเอ

ข้อมูลการอ้างอิง: กิตติพิชญ์ อุลธิ¹, ชีระรักษ์ ศรีนวลกราย, นันทนัช คันธรัตน์กุล, แก้วกัณหา กิจประสงค์ และ สุทธิภัทร ศรีสุธรรม. (2568). การพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ร่วมกับแถบดีเอ็นเอเพื่อระบุการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(5), 7

บทนำ

โรคพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีสามารถพบได้ 400 ล้านคนทั่วโลก (Garcia et al., 2021) โดยในไทยจะพบจีซิกพีดีเวียงจันทน์และจีซิกพีดีมิดิตลเป็นหลัก โรคพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างเอนไซม์จีซิกพีดีทำให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการทำงานน้อยกว่าปกติ ซึ่งจะพบในเพศชายได้มากกว่าเพศหญิง ซึ่งจีซิกพีดีมีความสำคัญในการช่วยรักษาเสถียรภาพของเม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระ (Kruger & von Schaewen, 2003) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีสามารถเกิดเม็ดเลือดแดงแตกได้ โดยปัจจัยกระตุ้นการแตกของเม็ดเลือดแดง คือ ถั่วปากอ้าและได้รับยาต้านมาลาเรียเช่น ยาไพราเมควิน ซึ่งไพราเมควินจึงมีคุณสมบัติทั้งในด้านการรักษาและการป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำของโรคได้ (Lalloo et al., 2016) เนื่องด้วยยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์จีซิกพีดีอยู่บนโครโมโซมเอ็กซ์ และความผิดปกติทางพันธุกรรมของภาวะพร่องเอนไซม์ชนิดนี้มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยทางโครโมโซมเอ็กซ์ ดังนั้นผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในเพศชายจึงแสดงความผิดปกติของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีเมื่อได้รับโครโมโซมข้างที่ผิดปกติแบบเฮมิไซกัส (Hemizygote) ในขณะที่เพศหญิงซึ่งมีโครโมโซมเอ็กซ์ 2 ข้างจะแสดงอาการผิดปกติเมื่อได้รับการถ่ายทอดจีซิกพีดีที่ผิดปกติมาทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมแบบโฮโมไซกัส (Homozygote) ซึ่งจะมีการแสดงออกของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่ชัดเจน ส่วนในเพศหญิงที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบเฮเทอโรไซกัส (Heterozygote) ซึ่งมีความผิดปกติของโครโมโซมเอ็กซ์เพียงข้างเดียวจึงอาจมีการแสดงออกของเอนไซม์เป็นปกติหรือต่ำกว่าได้ โดยภาวะปกติของผู้หญิงที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน จีซิกพีดีชนิดเฮเทอโรไซกัสจะไม่แสดงอาการผิดปกติจนกว่าจะได้รับยาไพราเมควินหรือสารเคมีที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น แต่จะสามารถถ่ายทอดยีนจีซิกพีดีที่ผิดปกติต่อไปได้ (Chu et al., 2017) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีได้อย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญต่อการรักษาและการป้องกันการเกิดการทำลายของเม็ดเลือดแดงอย่างฉับพลันและภาวะแทรกซ้อนที่อาจตามมาหลังจากการได้รับยาไพราเมควินหรือสารอนุมูลอิสระอื่นๆ ได้ โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยความผิดปกตินี้จำเป็นต้องอาศัยการตรวจพิเศษเพื่อช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีดังกล่าว ได้แก่ การตรวจคัดกรอง (Screening test) เช่น Fluorescent spot test (FST) มีความไวและความจำเพาะ 95% (Thielemans et al., 2018) และ Methemoglobin reduction (MR) test มีความไวอยู่ที่ 85.7% และความจำเพาะอยู่ที่ 98.1% (Sanpavat et al., 2001) การยืนยันการทดสอบ (Confirm test) ได้แก่ การวัดระดับของเอนไซม์ จีซิกพีดีเชิงปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative G6PD activity assay) มีความไวอยู่ที่ 89% และความจำเพาะ 96% (Thielemans et al., 2018) สุดท้ายคือ พีซีอาร์ (PCR) มีความไวและความจำเพาะ 100% (Sanpavat et al., 2001) ข้อดี คือ สามารถตรวจหาพื้นที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ ส่วนข้อเสียคือต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญและราคาค่อนข้างสูง (Hsu et al., 2014) เทคนิคพีซีอาร์ เช่น เทคนิคเอชอาร์เอ็ม (high resolution melting curve analysis, HRM), และเทคนิคการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) (Boonyuen et al., 2021) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ก่อนการให้ยาด้านมาลาเรีย โดยเฉพาะในเพศหญิงกลุ่มเฮเทอโรไซกัสซึ่งอาจไม่แสดงอาการผิดปกติในการตรวจทั่วไป เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกจากการได้รับยาไพราเมควินในขนาดสูง

การทบทวนวรรณกรรม

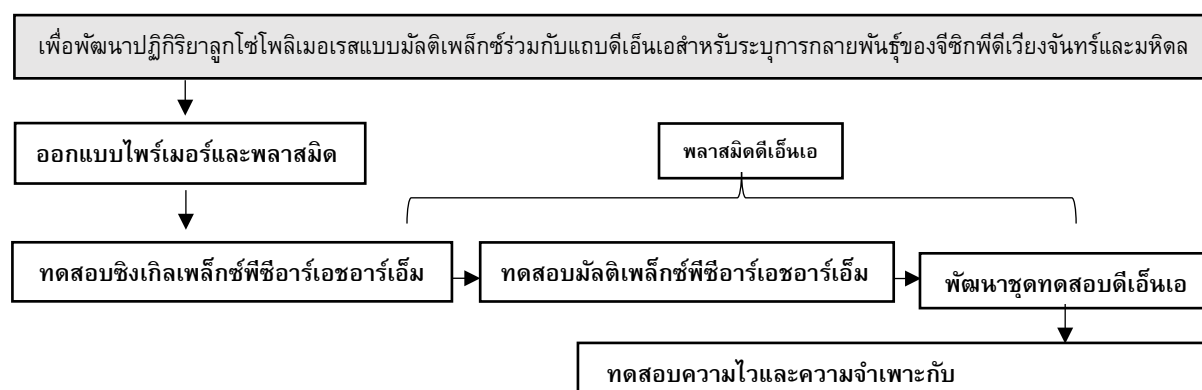
โรคจีซิกพีดีหรือโรคพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี สามารถพบได้ 400 ล้านคนทั่วโลก ซึ่งพบมากที่สุดที่เพศชาย โดยจีซิกพีดีจะพบได้ประมาณ ร้อยละ 5-20 ในบริเวณที่มีการระบาดของมาลาเรียซึ่งมาจากการได้เปรียบในการอยู่รอดหรือการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ของการพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (Tantular & Kawamoto, 2021) โดยผู้ที่มีภาวะที่พร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมักจะแสดงอาการและดำเนินชีวิตได้ปกติ อย่างไรก็ตามผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีมีความเสี่ยงที่จะเกิดเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันโดยการกระตุ้นจากการติดเชื้อ, การกินถั่วปากอ้าและยาที่มีศักยภาพในการออกซิเดชันสูง (Tantular & Kawamoto, 2021) เอนไซม์ จีซิกพีดีเป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน

กระบวนการเมแทบอลิซึมในวัฏจักรเพนโทสฟอสเฟต ซึ่งเกิดขึ้นที่ไซโทซอล เอนไซม์จีซิกพีดีมีหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่มีนิวเคลียสและไม่มีนิวเคลียส เซลล์ที่มีนิวเคลียสสามารถกักเก็บอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้ แต่เซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส เช่น เม็ดเลือดแดงจะต้องอาศัยเอนไซม์จีซิกพีดีในการกำจัดอนุมูลอิสระออกไป โดยเอนไซม์จีซิกพีดีจะเปลี่ยน กลูโคส 6-ฟอสเฟต เป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนต พร้อมทั้งผลิต NADPH ซึ่ง NADPH จะเปลี่ยนออกซิไดซ์กลูตาไธโอน เป็นรีดิวซ์กลูตาไธโอน เพิ่มมากขึ้นเพื่อเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้กลายเป็นน้ำ (Gómez-Manzo et al., 2016) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่มีระดับเอนไซม์ >6 U/gHb ($>70\%$ ของคนปกติ) จะได้รับยาทาเฟโนควิน ปริมาตร 300 mg ครั้งเดียวและผู้ที่ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่มีระดับเอนไซม์ 4-6 U/gHb ($30\%-70\%$ ของคนปกติ) จะได้รับยาไพโรมาควิน 15 mg วันละครั้ง นาน 14 วัน และ ระดับเอนไซม์ G6PD < 4 U/gHb ($<30\%$ ของระดับปกติ) จ่ายยา ไพโรมาควิน 45 มก. สัปดาห์ละครั้ง นาน 8 สัปดาห์ (al., 2021) โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้กล่าวไว้เกี่ยวกับระดับเอนไซม์ในเพศหญิงและเพศชายซึ่งเพศชายแบบเฮมิโซทิก โดยระดับเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 2.68 ± 1.37 U/gHb แต่ในเพศหญิงสามารถพบได้แบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส โดยมีการรวมกันระหว่างระดับเอนไซม์จีซิกพีดีที่ปกติกับการพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีโดยมีระดับต่ำกว่าค่าปกติซึ่งระดับเอนไซม์จีซิกพีดีของเฮเทอโรไซกัสในเพศหญิงคือ 11.04 ± 4.97 U/gHb ซึ่งเป็นระดับที่สามารถให้ยาต้านมาลาเรียในปริมาณที่สูงได้ทั้งที่มีการพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีอยู่ ดังนั้นการประเมินแต่ละระดับเอนไซม์อาจจะผิดพลาดได้โดยเฉพาะในกลุ่มเพศหญิงแบบเฮเทอโรไซกัส (Sudsumrit et al., 2022)

สมมติฐานการวิจัย

เทคนิคปฏิบัติการลูกโซ่โพลิเมอไรเซชันแบบมัลติเพล็กซ์ร่วมกับแถบดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นสามารถระบุการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีชนิดเวียงจันทน์และมหิดลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

กรอบแนวคิดการวิจัย



วิธีดำเนินการวิจัย

1) ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานอัตราการเกิดการกลายพันธุ์จีซิกพีดีเวียงจันทน์ในผู้ป่วยติดเชื้อ Plasmodium ในประเทศไทยที่ร้อยละ 1.25% โดยใช้สูตรสำหรับการคำนวณขนาดตัวอย่างในกรณีที่มีสัดส่วนประชากรเดียว การคำนวณดำเนินการภายใต้ช่วงความเชื่อมั่น 99% (CI) และค่าความคลาดเคลื่อน 3% ได้เท่ากับ 91 คน โดยได้ทำการสุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรียมา 15 คนมาทำการทดสอบ (n=15)

2) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับชุดทดสอบดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น และการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับชุดทดสอบดีเอ็นเอ (สตริป เทสต์ คิท) จะใช้ไพรเมอร์จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Boonyuen et al., 2021) และนำเอามา Alignment ใน BIOEDIT จากนั้นได้ทำการ modification ไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะมากขึ้น จากนั้นทำนายอุณหภูมิหลอมเหลวด้วย โปรแกรม uMelt Quartz และนำไปใช้ในชุดทดสอบดีเอ็นเอต่อไป

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของ ยีนจีซิกพีดีได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์, จีซิกพีดีมหิดล, Human positive control และ internal control เพื่อส่งสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ใน pUC57 vector

3) การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี และการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีเวียงจันทน์และจีซิกพีดีมหิดล โดยใช้ พลาสมิดดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอแม่แบบของการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีส่วนประกอบในแต่ละ ปฏิกริยามีปริมาณ 20 μ L ประกอบด้วย 0.5X Hotstart PCR Master mix (Apsalagen co.ltd., Thailand), 0.25 μ M forward primer, 0.25 μ M reverse primer, Midori Green Xtra 1 μ L, DNA 3 μ L และน้ำ 10 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะ initial denature 95°C 5 นาที 1 รอบ แล้วตามด้วย 29 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 61°C 30 วินาทีและ extension 72°C 30 วินาทีและ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้น วิเคราะห์ผลด้วย HRM โดยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 75°C จนถึง 95°C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.3°C ต่อหนึ่ง วินาที

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มใช้พลาสมิดดีเอ็นเอความเข้มข้น 1000 copies/ μ L เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยเตรียมไพรเมอร์มิกซ์ประกอบด้วย 20 nM F/R- จีซิกพีดีเวียงจันทน์, 30 nM F/R- จีซิกพีดีมหิดล, 8 nM F/R- Human positive control, 4 nM F/R- internal control และน้ำ 13.8 μ L จากนั้นเตรียม มาสเตอร์มิกซ์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแต่ละปฏิกริยามีปริมาณ 25 μ L ประกอบไปด้วย 0.4X Hotstart PCR Master mix (Apsalagen co.ltd., Thailand), ไพรเมอร์มิกซ์ 10 μ L, 0.2 μ M F/R- ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์, plasmid internal control (100,000 copies/ μ L) 0.5 μ L, Midori Green Xtra 1 μ L, DNA 3 μ L และน้ำ 12 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยใช้สภาวะ initial denature 95°C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 25 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, ทดสอบอุณหภูมิ ของ annealing ระหว่าง 60°C 45 วินาที และ extension 72°C 30 วินาที ต่อด้วย 20 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 65°C 30 วินาที และ extension 72°C 30 วินาทีและ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเอชอาร์เอ็มโดยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 70°C จนถึง 92 °C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.3°C ต่อหนึ่งวินาที

4) การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยชุดทดสอบดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น เทียบกับเทคนิคการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดทดสอบดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นใช้พลาสมิดดีเอ็นเอความเข้มข้น 1000 copies/ μ L เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยเตรียมไพรเมอร์มิกซ์ประกอบด้วย 20 nM F/R- จีซิกพีดีเวียงจันทน์, 30 nM F/R- จีซิกพีดีมหิดล, 8 nM F/R- Human positive control, 4 nM F/R- internal control และน้ำ 13.8 μ L จากนั้นเตรียม มาสเตอร์มิกซ์ซึ่งเป็น ส่วนประกอบของแต่ละปฏิกริยามีปริมาณ 25 μ L ประกอบไปด้วย 0.4X Hotstart PCR Master mix (Apsalagen co.ltd., Thailand), ไพรเมอร์มิกซ์ 3 μ L, 0.2 μ M F/R- ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์, พลาสมิด internal control (100,000 copies/ μ L) 1 μ L, DNA 3 μ L และน้ำ 12 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยใช้สภาวะ initial denature 95°C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 25 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, ทดสอบ อุณหภูมิ ของ annealing 60°C 45 วินาทีและ extension 72°C 30 วินาที ต่อด้วย 20 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 65°C 30 วินาทีและ extension 72°C 30 วินาทีและ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้น เตรียม Bridge มิกซ์ ประกอบไปด้วย Bridge1 1uL, Bridge2 0.30 uL, Bridge3 1 uL, Bridge4 1.5 uL, น้ำ 6 uL จากนั้นนำเข้า PCR product 10 uL ผสมกับ Bridge มิกซ์ 7 uL นำไปเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยใช้สภาวะ denature 95°C 3 นาที, annealing 60°C 5 นาที เมื่อได้ PCR product แล้วจะเติม 300 mM Hyb buffer 10 uL, น้ำ 20 uL, Gold dye 2 uL จากนั้นนำเข้าชุดทดสอบดีเอ็นเอมาจุ่มรอเวลา 15-20 นาทีแล้วอ่านผล

สำหรับเทคนิคการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอได้อ้างอิงโปรแกรมจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Al-Jaouni et al., 2011; Chaowanathikhom et al., 2017) โดยกลุ่ม Exon 6-8, Exon 9 ประกอบด้วย 1X Buffer, 2.5mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 0.5 mM F/R Viangchan, 0.05 U Taq polymerase, น้ำ 10.8 uL และดีเอ็นเอ 3 uL จากนั้นนำเข้าเครื่อง T100 Bio-Rad PCR Thermal cycler โดย initial denaturation 95°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นใช้สภาวะ 35 รอบประกอบไปด้วย denaturation 95°C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 60°C เป็นเวลา 30 วินาที, extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที และ Final extension 72°C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ มาวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ชำระที่ได้ไป purify ด้วย PureDireX (bio-helix) และนำส่งเพื่อวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ

5) การทดสอบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีเวียงจันทน์และมิดลเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยเทคนิคการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ

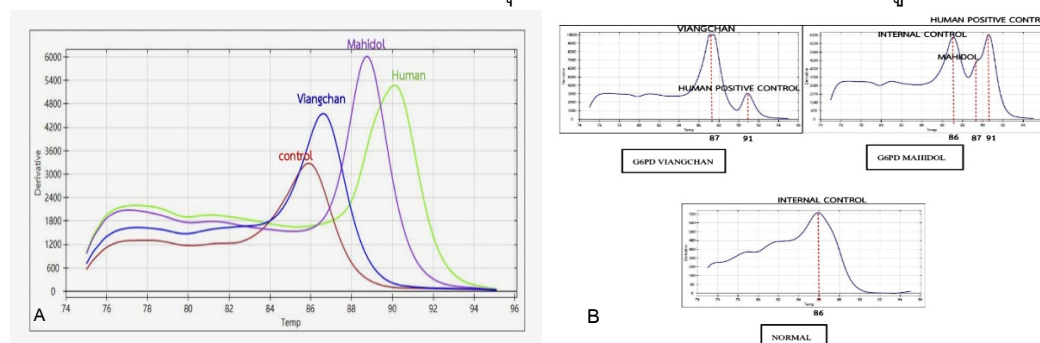
ประเมินชุดทดสอบดีเอ็นเอ กับผู้ป่วยมาลาเรีย 15 ราย ตรวจการกลายพันธุ์ G6PD เวย์จันท์และมิดล เปรียบเทียบความไวและความจำเพาะกับการหาลำดับดีเอ็นเอแบบ 2x2 table

ผลการวิจัย

1) ผลการทดสอบความจำเพาะของโปรแกรมด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มและเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม

ผลการทดสอบความจำเพาะของโปรแกรมที่ออกแบบสำหรับการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีด้วย เทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม พบว่า โปรแกรมที่ออกแบบสำหรับการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reaction) และให้ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มของการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีมีอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) ที่แตกต่างกันอย่างจำเพาะ ได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์ 87°C, จีซิกพีดีมิดล 89°C, human positive control 91°C และ internal control 86°C ดังแสดงในรูปที่ 1A

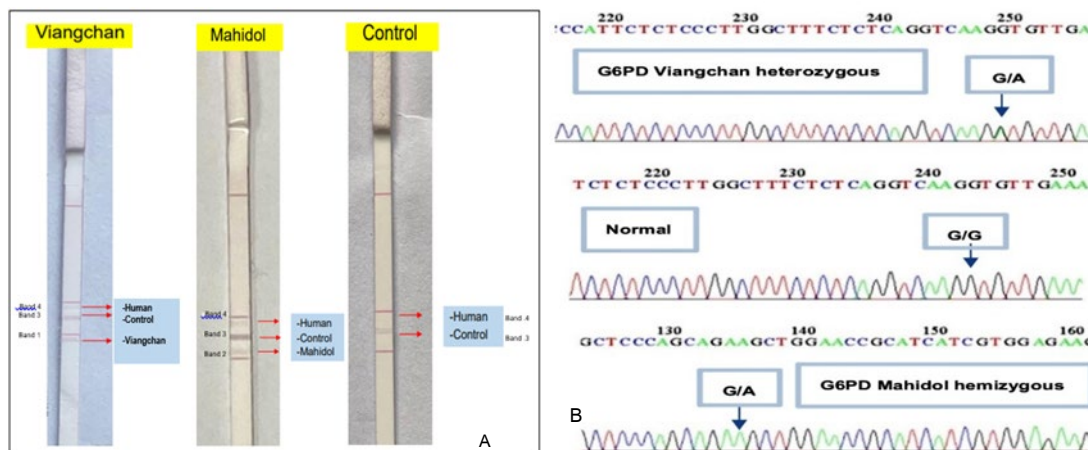
สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจหาการกลายพันธุ์ของจีซิกพีด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม โดยจะใช้สภาวะ initial denature 95°C นาที 1 รอบ ตามด้วย 25 รอบของ denaturation 95°C 30 วินาที, ทดสอบอุณหภูมิ ของ annealing ระหว่าง 60°C 45 วินาทีและ extension 72°C 30 วินาที ต่อด้วย 20 รอบของ denaturation 95°C 30 วินาที annealing 65°C 30 วินาทีและ extension 72°C 30 วินาทีและ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเอชอาร์เอ็มโดยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 70°C จนถึง 92°C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.3°C ต่อหนึ่งวินาทีซึ่งให้ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มที่สามารถแยกการกลายพันธุ์ของจีซิกพีได้อย่างจำเพาะดังแสดงในรูปที่ 1B



ภาพที่ 1 (A) ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มของการทดสอบซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม การกลายพันธุ์ของจีซิกพีดี ได้แก่ internal control, จีซิกพีดีเวียงจันทน์, จีซิกพีดีมิดล และ human positive control (B) ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มของการทดสอบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม การกลายพันธุ์ของจีซิกพีดี ได้แก่ internal control, จีซิกพีดีเวียงจันทน์, จีซิกพีดีมิดล และ human positive control

2) ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบมัลติเพล็กซ์ร่วมกับแถบดีเอ็นเอ โดยเทียบกับการทดสอบหาลำดับดีเอ็นเอ (Sanger sequencing)

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบมัลติเพล็กซ์ร่วมกับแถบดีเอ็นเอพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะไม่เกิดการเพิ่มจำนวนปฏิกิริยาข้ามกันและให้ผลการวิเคราะห์ได้แก่ แบนที่ 1 เวียงจันทน์, แบนที่ 2 มหิดล, แบนที่ 3 internal control, แบนที่ 4 Human positive control ดังแสดงในรูปที่ 2A และผลการทดสอบหาลำดับดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 2B



ภาพที่ 2 (A) ผลของเทคนิคพีซีอาร์แบบมัลติเพล็กซ์ร่วมกับแถบดีเอ็นเอ ได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์, จีซิกพีดีมหิดล, internal control (B) ผลการทดสอบหาลำดับดีเอ็นเอ ได้แก่ G6PD Viangchan heterozygous, Normal, G6PD Mahidol hemizygous

3) ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบดีเอ็นเอสำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีเวียงจันทน์และมหิดลเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยเทคนิคการหาลำดับดีเอ็นเอ

ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นในการตรวจการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีเวียงจันทน์และจีซิกพีดีมหิดลในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยมีเพศชาย 10 ตัวอย่าง เพศหญิง 5 ตัวอย่าง ตรวจพบจีซิกพีดีเวียงจันทน์ 1 ตัวอย่าง, จีซิกพีดีมหิดล 1 ตัวอย่าง และไม่พบการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีเวียงจันทน์และจีซิกพีดีมหิดล 13 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยเทคนิคการหาลำดับดีเอ็นเอ ซึ่งพบผลลบปลอม ดังแสดงในตารางที่ 7, 8

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบดีเอ็นเอสำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีเวียงจันทน์เปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยเทคนิควิธีการหาลำดับดีเอ็นเอ

Results Viangchan detection	No. of reference samples	
	True positive (Sanger Sequencing)	True negative (Sanger Sequencing)
DNA strip test positive	0 (TP)	0 (FP)
DNA strip test negative	1 (FN)	14 (TN)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มีความสำคัญในการคัดกรองผู้ป่วยมาลาเรียก่อนใช้ยาไพเรมาคิน เนื่องจากยาอาจกระตุ้นให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก การตรวจแบ่งเป็นระดับฟีโนไทป์และจีโนไทป์ โดยการทดสอบการเรืองแสง แม้จะตรวจพบในเพศชายได้ทั้งหมด แต่ในเพศหญิงกลุ่มโฮโมไซกัสหรือเฮเทอโรไซกัสตรวจพบได้เพียงร้อยละ 20

(Yeung et al., 1970) การวัดระดับการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีในกลุ่มผู้หญิงที่เป็นเฮเทอร์โรไซกัสอยู่ในระดับปานกลางเพราะว่ายังมีเม็ดเลือดแดงที่สามารถผลิต NADPH ได้อาจจะมีระดับเอนไซม์อยู่ในช่วงปกติ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการที่จะได้รับยารักษามาลาเรียได้ (Peters & Van Noorden, 2009) ดังนั้นการตรวจในระดับจีโนไทป์ ได้แก่ เทคนิคแอลลีลสเปคิฟิฟิซาร์, พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม, โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทดสอบจีซิกพีดีด้วยวิธีพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มมีความไวและความจำเพาะ 100%, 100% ตามลำดับ (Sudsumrit et al., 2022)

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ร่วมกับแถบดีเอ็นเอทดสอบ โดยขั้นตอนแรก ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีเวียงจันทน์และมิตล โดยมีอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ที่แตกต่างกันอย่างจำเพาะ ได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์ 87°C , จีซิกพีดีมิตล 89°C จากนั้นได้พัฒนาวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มเป็นการตรวจเช็กเบื้องต้นก่อนการทำชุดทดสอบดีเอ็นเอโดยเบื้องต้นมีอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ที่แตกต่างกันอย่างจำเพาะ ได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์ 87°C , จีซิกพีดีมิตล 89°C , Internal control 86°C , Human positive control 91°C . ซึ่งในการพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอสามารถพัฒนาได้ถึงขั้นตอนการใช้พลาสมิด โดยในชุดทดสอบดีเอ็นเอ แบบที่ 1 บ่งชี้จีซิกพีดีเวียงจันทน์, แบบที่ 2 บ่งชี้จีซิกพีดีมิตล, แบบที่ 3 คือ Internal control และแบบที่ 4 คือ Human positive control จากนั้นได้ทดสอบความไวและความจำเพาะเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ซึ่งพบผลลบปลอม โดยชุดทดสอบดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นสามารถทดสอบโดยใช้ พลาสมิดที่จำเพาะกับการกลายพันธุ์ของจีซิกพีดีเวียงจันทน์และจีซิกพีดีมิตลได้สำเร็จ แต่เมื่อนำไปทดสอบโดยใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรียที่ได้รับการยืนยันด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอพบว่า เป็นจีซิกพีดีเวียงจันทน์แบบเฮเทอร์โรไซกัส ซึ่งพบว่าชุดทดสอบดีเอ็นเอให้ผลเป็นลบปลอม จากนั้นได้ทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและลดดีเอ็นเอ ซึ่งผลที่ได้ก็ยังให้ผลลบปลอมเช่นเดิม หลังจากนั้นได้ทดลองเพิ่มจำนวนรอบของพีซีอาร์ โดยผลที่ได้ก็ยังเป็นเช่นเดิม จากปัญหาวางต้นได้ทำการทดสอบและแก้ปัญหาด้วยกันหลายวิธี จนสันนิษฐานว่าการสกัดใช้ชุดสกัดที่แตกต่างกันทำให้คุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้ไม่เท่ากันส่งผลให้ชุดทดสอบดีเอ็นเอไม่ขึ้นแบบ และอีกข้อสันนิษฐานคือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากเกินไป อาจเป็นผลรบกวนความจำเพาะของตำแหน่งการกลายพันธุ์ได้ ถ้ามีโอกาสในการพัฒนาต่อจะแก้ปัญหาตั้งแต่การสกัดโดยขั้นตอนสุดท้ายของการ elute อาจต้องปรับปริมาณลงจากปกติ elute 200 μL เปลี่ยนเป็น 50 μL เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอและลดปริมาณการใส่ดีเอ็นเอที่มากเกินไปจนไปรบกวนความจำเพาะของตำแหน่งการกลายพันธุ์ เพราะจากการได้ทำการทดลองขั้นตอนของพลาสมิดเมื่อใส่พลาสมิดในปริมาณที่มากเกินไปทำให้แบนไม่ขึ้นเช่นเดียวกัน แต่พลาสมิดคือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เรสนใจขึ้นมาโดยปริมาณความเข้มข้นคงที่ ซึ่งแตกต่างจากดีเอ็นเอที่ต้องสกัดด้วยชุดสกัดที่ความเข้มข้นในแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน ซึ่งการพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอเป็นสิ่งที่น่าสนใจมากและในอนาคตถ้ามีโอกาสก็จะพัฒนาต่อจนสำเร็จ จากนั้นได้ศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอโดยตรวจหาการปนเปื้อนของเนื้อหมูในลูกชิ้นเนื้อวัวมีค่า LOD อยู่ที่ 0.01% โดยจะตรวจการปนเปื้อนของเนื้อหมูเป็นแบบที่ 1 และสัตว์ชนิดอื่นแบบที่ 2 (Takasaki et al., 2018)

ข้อเสนอแนะที่ได้รับจากการวิจัย

จากการพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอ ได้มีการเสนอให้วัดความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ความเข้มข้นของ พลาสมิดดีเอ็นเอที่สามารถทำให้เกิดแถบสับนชุดทดสอบเป็นความเข้มข้นอ้างอิง เพื่อนำดีเอ็นเอผู้ป่วยที่สกัดมาวัดความเข้มข้นและใส่ปริมาณให้เท่ากับปริมาณของความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่นำทดสอบ

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

จากการพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอพบว่าเมื่อนำชุดทดสอบดีเอ็นเอมาใช้กับดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่เป็นโรคจีซิกพีดีพบว่าไม่ขึ้นแถบสีของ control และแถบของการกลายพันธุ์ในชุดทดสอบ จากปัญหาในข้างต้นจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาเพิ่มเติม ซึ่งเบื้องต้นจะปรับตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอโดยในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดจะลดปริมาณของ elute เพื่อให้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณความเข้มข้นที่มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Al-Jaouni, S. K., Jarullah, J., Azhar, E., & Moradkhani, K. (2011). Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Jeddah, Kingdom of Saudi Arabia. *BMC Res Notes*, 4, 436.
- Boonyuen, U., Songdej, D., Tanyaratsrisakul, S., Phuanukoonnon, S., Chamchoy, K., Praoparotai, A., Pakparnich, P., Sudsumrit, S., Edwards, T., Williams, C. T., Byrne, R. L., Adams, E. R., & Imwong, M. (2021). Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in malaria endemic area of Thailand by multiplexed high-resolution melting curve analysis. *Malar J*, 20(1), 194.
- Chaowanathikhom, M., Nuchnoi, P., & Palasuwan, D. (2017). Significance of 3'UTR and Pathogenic Haplotype in Glucose-6-Phosphate Deficiency. *Lab Med*, 48(1), 73-88.
- Chu, C. S., Bancone, G., Moore, K. A., Win, H. H., Thitipanawan, N., Po, C., Chowwiwat, N., Raksapraidee, R., Wilairisak, P., Phyo, A. P., Keereecharoen, L., Proux, S., Charunwatthana, P., Nosten, F., & White, N. J. (2017). Haemolysis in G6PD Heterozygous Females Treated with Primaquine for Plasmodium vivax Malaria: A Nested Cohort in a Trial of Radical Curative Regimens. *PLoS Med*, 14(2), e1002224.
- Garcia, A. A., Koperniku, A., Ferreira, J. C. B., & Mochly-Rosen, D. (2021). Treatment strategies for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: past and future perspectives. *Trends Pharmacol Sci*, 42(10), 829-844.
- Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Vanoye-Carlo, A., Serrano-Posada, H., Ortega-Cuellar, D., González-Valdez, A., Castillo-Rodríguez, R. A., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Rodríguez-Bustamante, E., & Arreguin-Espinosa, R. (2016). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *Int J Mol Sci*, 17(12).
- Hsu, J., Fink, D., Langer, E., Carter, M. L., Bengo, D., Ndidde, S., Slusher, T., Ross, J. A., & Lund, T. C. (2014). PCR-based allelic discrimination for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Ugandan umbilical cord blood. *Pediatr Hematol Oncol*, 31(1), 68-75.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol*, 6(3), 236-246.
- Lalloo, D. G., Shingadia, D., Bell, D. J., Beeching, N. J., Whitty, C. J. M., & Chiodini, P. L. (2016). UK malaria treatment guidelines 2016. *J Infect*, 72(6), 635-649.
- 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.
- Peters, A. L., & Van Noorden, C. J. (2009). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *J Histochem Cytochem*, 57(11), 1003-1011. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953828>
- Pfeffer, D. A., Satyagraha, A. W., Sadhewa, A., Alam, M. S., Bancone, G., Boum, Y., 2nd, Brito, M., Cui, L., Deng, Z., Domingo, G. J., He, Y., Khan, W. A., Kibria, M. G., Lacerda, M., Menard, D., Monteiro, W., Pal, S., Parikh, S., Roca-Feltrer, A., . . . Ley, B. (2022). Genetic Variants of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and Their Associated Enzyme Activity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*, 11(9).

- Sanpavat, S., Nuchprayoon, I., Kittikalayawong, A., & Ungbumnet, W. (2001). The value of methemoglobin reduction test as a screening test for neonatal glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Med Assoc Thai*, 84(Suppl 1), S91-98.
- Sudsumrit, S., Chamchoy, K., Songdej, D., Adisakwattana, P., Krudsood, S., Adams, E. R., Imwong, M., Leartsakulpanich, U., & Boonyuen, U. (2022). Genotype-phenotype association and biochemical analyses of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants: Implications for the hemolytic risk of using 8-aminoquinolines for radical cure. *Front Pharmacol*, 13, 1032938.
- Takasaki, K., Yamakoshi, Y., & Futo, S. (2018). Single-Laboratory Validation of Rapid and Easy DNA Strip for Porcine DNA Detection in Beef Meatballs. *J AOAC Int*, 101(5), 1653-1656.
- Tantular, I. S., & Kawamoto, F. (2021). Distribution of G6PD deficiency genotypes among Southeast Asian populations. *Trop Med Health*, 49(1), 97.
- Thielemans, L., Gornsawun, G., Hanboonkunupakarn, B., Paw, M. K., Porn, P., Moo, P. K., Van Overmeire, B., Proux, S., Nosten, F., McGready, R., Carrara, V. I., & Bancone, G. (2018). Diagnostic performances of the fluorescent spot test for G6PD deficiency in newborns along the Thailand-Myanmar border: A cohort study. *Wellcome Open Res*, 3, 1.
- Yeung, C. Y., Lai, H. C., Sin, W. K., & Leung, N. K. (1970). Fluorescent spot test for screening erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn babies. *J Pediatr*, 76(6), 931-934.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2025 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).