J Trop Med Parasitol. 2017;40:1-7.

REVIEW

การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ต่อยาต้านมาลาเรียในหลอดทดลอง

วรรณา ชัยเจริญกุล

วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมในหลอดทดลองเป็นแนวทางสำคัญในการประเมินเชื้อมาลาเรียดื้อยา การศึกษาความไวมีหลากหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป การศึกษาความไวด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่ง่าย แต่มีความลำบากและเสียเวลามาก ไม่เหมาะในการศึกษาเชื้อจำนวนมาก ส่วนการศึกษาความไวด้วยสารรังสี การใช้ monoclonal antibody และการใช้สารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์นั้น เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และลดแรงงาน แต่สารที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาแพง และจำเป็นต้องมีอุปกรณ์ที่จำเพาะในการวัดผล ห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไปไม่สามารถทำได้ แต่วิธีการศึกษาความไวที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นั้นมีจุดเด่นที่สำคัญ คือ มีความสะดวกและรวดเร็ว ซึ่งเหมาะกับการนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในโลกยุคโลกาภิวัฒน์นี้

มาลาเรียและสถานการณ์โรคมาลาเรีย

มาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในประเทศเขตร้อนโดยเฉพาะในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2558 พบว่ามีประชากรจำนวน 214 ล้านคนติดเชื้อมาลาเรีย และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 438,000 ราย (WHO, 2015) ปัญหามาลาเรียในประเทศไทยนั้นยังคงมีความรุนแรงโดยเฉพาะในบริเวณจังหวัดชายแดนไทยพม่าและชายแดนไทยกัมพูชา เชื้อมาลาเรียเกิดจากปรสิตพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ซึ่งในประเทศไทยมักจะพบการติดเชื้อชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) และไวแวกซ์ (*Plasmodium vivax*) เป็นหลัก โดยพบมาลาเรียฟัลซิพารัมในอัตราส่วนประมาณร้อยละ 35 และร้อยละ 60 เป็นมาลาเรียไวแวกซ์ จากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุข 10 จังหวัดที่พบผู้ป่วยมาลาเรียมากได้แก่ ตาก กาญจนบุรี ระนอง แม่ฮ่องสอน สงขลา สุราษฎร์ธานี ศรีสะเกษ ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ และยะลา ตามลำดับ และจากรายงานของกระทรวงสาธารณสุขในปี 2559 (ตั้งแต่ มกราคม - กันยายน 2559) พบว่าผู้ป่วยมาลาเรียชาวไทย 8,404 ราย (ลดลงร้อยละ 12.10 เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปีที่แล้ว) และผู้ป่วยมาลาเรียชาวต่างชาติ 4,204 ราย (ลดลงร้อยละ 49.01 เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปีที่แล้ว) (สำนักงานโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2545) ถึงแม้ว่าจะมีการดำเนินงานควบคุมโรคนี้จนประสบความสำเร็จในระดับหนึ่งแล้วก็ตาม แต่โรคนี้ก็ยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความจำเป็นเร่งด่วนในการติดตาม เนื่องจากการระบาดของโรคมาลาเรียบริเวณแนวชายแดนระหว่างประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน

Corresponding author: *Wanna Chaijaroenkul*
Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University
Email: wn_ap39@yahoo.com

เชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมซึ่งดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิด (Multidrug Resistance)

ถึงแม้ว่าอัตราการเสียชีวิตของประชากรไทยจากโรคไข้มาลาเรียจะลดลง แต่ปัญหาสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรีย คือ ปัญหาเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมซึ่งดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิด (multidrug resistance) โดยเฉพาะในพื้นที่ชายแดนของประเทศไทยที่พบเชื้อดื้อยาสูงมาก (Na-Bangchang and Congpuong 2007; Na-Bangchang et al., 2013) ยาในกลุ่มควิโนลีน เช่น คลอโรควิน เมฟโฟลควิน และ ควินิน เป็นยากลุ่มสำคัญที่ใช้ในการรักษาและป้องกันมาลาเรียตลอดมา แต่พบปัญหาการดื้อยา จึงต้องระงับการใช้ยาเหล่านี้ (Harinasuta et al., 1962; Nosten et al., 1991; Karbwang et al., 1994)

ในปัจจุบัน ยาที่มีประสิทธิภาพในการต้านมาลาเรียได้ดีที่สุด คือ ยากลุ่มอาร์ติมิซินิน (artemisinin) และอนุพันธ์ (อาร์ติซูเนต, ยาอาร์ติมีเตอร์ อาร์ติอีเตอร์, และยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน เป็นต้น) ซึ่งสกัดได้จากสมุนไพรจีน *Artemisia annua* L. (Quinghao) (Na-Bangchang and Congpuong, 2007) เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการต้านมาลาเรียที่ดื้อยา ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้ออย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อและปลอดภัยสูงมาก ประเทศไทยเป็นประเทศแรกในโลกที่ใช้ยาอาร์ติมิซินินร่วมกับยา

ต้านมาลาเรียอื่น (artemisinin-based combination therapy: ACT) โดยนำยาอาร์ติซูเนตมาใช้ร่วมกับยาเมฟโฟลควินเป็นยาหลัก (first-line drug) (สำนักงานโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2545) แต่จากการศึกษาประสิทธิภาพของยาผสมระหว่างอาร์ติซูเนตและเมฟโฟลควินในการรักษาพบว่าอัตรารักษาหายขาดในการรักษามาลาเรียฟัลซิพารัมในพื้นที่บริเวณชายแดนไทย-พม่า และไทย-กัมพูชา มากกว่าร้อยละ 95 (Rojanawatsirivet et al, 2004) แต่ในปี 2546 พบว่าในพื้นที่จังหวัดตราดอัตรารักษาหายขาดลดลงเหลือเพียงร้อยละ 78 (Vijaykadga et al, 2006) ซึ่งข้อมูลนี้สอดคล้องกับการศึกษาในพื้นที่เมืองไพลิน ประเทศกัมพูชาในปี พ.ศ. 2546 (Denis et al., 2006) และการศึกษาในพื้นที่แม่สอด จังหวัดตาก (Na-Bangchang et al., 2010) ทั้งนี้จากการศึกษาของ Dondorp และคณะ พบว่าเชื้อที่มีแนวโน้มจะดื้อต่อยากลุ่มอาร์ติมิซินินนั้นเวลาที่เชื้อหมดไปจากกระแสเลือดจะนานขึ้น (Dondorp et al., 2009) การศึกษาดังกล่าวข้างต้นเป็นสัญญาณการเตือนภัยว่าเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมเริ่มดื้อต่อยาอาร์ติมิซินินและอนุพันธ์ และจากการศึกษาอณูชีววิทยาค้นพบยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาอาร์ติซูเนต คือ K13-propeller (Ariey et al., 2014)

การประเมินเชื้อมาลาเรียดื้อต่อยาต้านมาลาเรีย (Monitoring of drug resistance)

การพิสูจน์ว่าเชื้อมาลาเรียดื้อยาหรือไม่นั้น ประกอบไปด้วยหลายปัจจัย เช่น ปัจจัยทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ผลการตอบสนองของผู้ป่วย (*in vivo* response) การประเมินความไวของเชื้อต่อยาในหลอดทดลอง (*in vitro* sensitivity test) และปัจจัยทางอณูชีววิทยาระดับพันธุกรรมของเชื้อ (drug resistance genes) การวิเคราะห์ผลการดื้อยาจะต้องรวมองค์ประกอบเหล่านี้ในการพิสูจน์ว่าเชื้อดื้อต่อยาอย่างแท้จริง อย่างไรก็ตามการศึกษาให้ครบทุกองค์ประกอบเป็นไปได้ยาก เพราะต้องการกำลังคน กำลังเงิน และเทคโนโลยีระดับสูง ดังนั้นโดยทั่วไปจึงมีการศึกษาปัจจัยเพียงบางส่วนเท่านั้น ที่นิยมศึกษามักจะเป็นการประเมินความไวของเชื้อต่อยาในหลอดทดลอง และปัจจัยทางอณูชีววิทยาระดับพันธุกรรมของเชื้อ ในบทความนี้จะเน้นการประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง

ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการศึกษาความไวในหลอดทดลอง (Inoculum effect)

การศึกษาความไวในหลอดทดลองในห้องปฏิบัติการนั้นจะใช้เชื้อมาลาเรียเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.5-1 ซึ่งเป็นระดับมาตรฐานที่นิยมใช้กัน แต่อย่างไรก็ตามในพื้นที่ระบาดของมาลาเรียนั้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้นจากคนไข้นั้นจะมีความหลากหลายแตกต่างกันไป ซึ่งจากการศึกษาของ Duraisingh และคณะ พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.5 -2.5 นั้น ระดับการดื้อยาจะแตกต่างกันไป โดยเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้น ระดับการดื้อยาก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องมีการควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาความไวเพื่อให้ผลการศึกษามีความถูกต้อง (Duraisingh et al., 1999)

การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรียในหลอดทดลอง (*in vitro* testing)

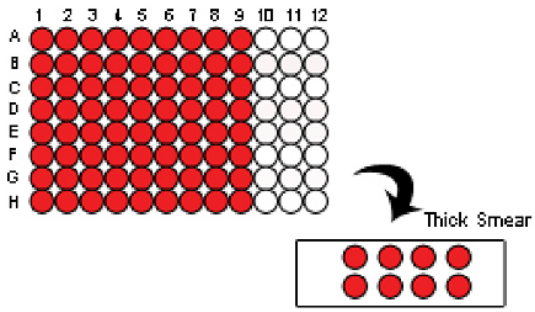
การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง เป็นวิธีมาตรฐานอย่างหนึ่งที่ใช้ติดตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากสะดวกและรวดเร็ว และสามารถทำซ้ำได้ โดยทั่วไปนิยมศึกษาเฉพาะเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมเท่านั้น เพราะเชื้อชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ อย่างไรก็ตาม ได้มีการพัฒนาวิธีทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ แต่ยังไม่เป็นที่นิยมเพราะมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและมีปัญหาเรื่องการเพาะเลี้ยงเชื้อ การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมในหลอดทดลองมีหลากหลายวิธี ดังต่อไปนี้

1. *การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมด้วยวิธี Schizont maturation inhibition*

การประเมินความไวของเชื้อด้วยวิธีนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า WHO Mark III micro-test assay เป็นวิธีดั้งเดิมที่อาศัยหลักการยับยั้งการเจริญของเชื้อไปสู่ระยะไซซอนต์ (schizont maturation inhibition) (Rieckmann et al., 1978) โดยจะมีการเตรียมยามาตรฐานใส่เพลทไว้ แล้วนำเชื้อมาลาเรียมาเติมในเพลท จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำเชื้อมาเตรียมฟิล์มเลือดหนา (Thick smear) ดังแสดงในรูปที่ 1 แล้วจึงนับปริมาณไซซอนต์เทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับยา วิธีนี้ค่อนข้างสะดวกและง่าย เพราะไม่ได้ใช้อุปกรณ์และสารเคมีราคาแพง และสามารถประเมินความไวในพื้นที่ระบาด และแม้แต่ในกรณีที่มีเชื้อระดับต่ำ ๆ ถึงแม้วิธีการทำจะง่าย แต่การอ่านผลและวิเคราะห์กลับมีความยุ่งยากมาก เพราะต้องอาศัยความชำนาญของผู้วิจัยในการดูลักษณะรูปร่างของเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์ และเสียเวลามาก ซึ่งความแปรปรวนของผลจะขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญในการดูรูปร่างของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาที่มีตัวอย่างจำนวนมาก และยังมีจุดอ่อนที่สำคัญคือระยะเวลาในการเพาะเชื้อที่สั้น ทำให้ประเมินความไวของยาบางชนิดที่ออกฤทธิ์ช้า เช่น ยาไพริเมทธามีน (pyrimethamine) คลาดเคลื่อนได้ และจากประสบการณ์ในการวิจัยพบว่าในบางครั้งเชื้อมาลาเรียจะพัฒนาไปสู่ระยะไซซอนต์ได้แตกต่างกัน ทำให้ในบางครั้งแม้จะครบเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อก็ยังไม่เข้าสู่ระยะไซซอนต์ และบางครั้งเชื้อเข้าสู่ระยะไซซอนต์ไวเกินทำให้วิเคราะห์ผลไม่ได้ เพราะเชื้อมาลาเรียแตกออกจากเม็ดเลือดแดงไปแล้ว

2. *การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมด้วยวิธี Hypoxanthine assay*

เนื่องจากปัญหาในการศึกษาความไวด้วยวิธี Schizont maturation inhibition ทำให้ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 Desjardins และคณะ พัฒนาวิธีใหม่เพื่อประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียได้เร็วขึ้น โดยอาศัยหลักการติดสารรังสีที่ดีเอ็นเอ (DNA) เพื่อวัดการเจริญของเชื้อมาลาเรีย สารรังสีที่ใช้คือสารรังสีไฮโปแซนทีน



รูปที่ 1 เพลทยาและการเตรียมฟิล์มเลือดหนาสำหรับประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมด้วยวิธี Schizont maturation inhibition

(Hypoxanthine) สารนี้จะเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิตและเข้าไปร่วมในการสร้างสายดีเอ็นเอเมื่อเชื้อเจริญเติบโต ซึ่งทำให้ติดตามเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ตามระดับค่ารังสีที่วัดได้ ดังนั้นถ้ายาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ระดับค่ารังสีก็จะลดลง จะเห็นได้ว่าวิธีการนี้ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญดูลักษณะรูปร่างของเชื้อมาลาเรีย จึงสามารถศึกษาความไวของเชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือสูง แต่วิธีการนี้ต้องใช้สารรังสีซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้วิจัย สารรังสีไฮโปแซนทีนและอุปกรณ์ที่วัดปริมาณรังสีมีราคาแพง อีกทั้งต้องมีการตรวจรับรองห้องปฏิบัติการเพื่อขออนุญาตใช้สารรังสีอีกด้วย จึงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญทำให้วิธีการประเมินนี้ไม่แพร่หลายในประเทศที่มีการระบาดของมาลาเรีย (ประเทศที่เป็นแหล่งระบาดของมาลาเรียส่วนใหญ่จะเป็นประเทศที่อยู่ในกลุ่มกำลังพัฒนาและด้อยพัฒนา) นอกจากนี้ปริมาณเชื้อมาลาเรียตั้งต้นก็ควรอยู่ในระดับที่สูงพอควรด้วย (ควรมากกว่าร้อยละ 0.5) ผู้วิจัยที่ใช้วิธีนี้ในการประเมินความไวจำเป็นต้องผ่านการบอบรมการใช้สารรังสี และต้องตรวจสุขภาพและตรวจวัดปริมาณสารรังสีที่ร่างกายได้รับเป็นประจำทุกปี

3. *การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมด้วยวิธี ELISA*

ความยุ่งยากของการใช้สารรังสีที่กล่าวมาในข้างต้น ทำให้ในปัจจุบันนี้มีการพัฒนาวิธีการวัดความไวในรูปแบบอื่นขึ้นมาเพื่อทดแทนการใช้สารรังสี เช่นการวัดความไวด้วยวิธีอีไลซ่า (Enzyme linked immunosorbent assays; ELISA) เป็นการวัดระดับสาร histidine rich protein 2 (HRP2) (Noedl et al., 2003; Noedl et al., 2004) วิธีนี้เป็นตรวจหาสาร HRP2 ที่เชื้อมาลาเรียหลั่งออกมาภายนอกเม็ดเลือดแดงหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการวัดจะใช้หลักการ Sandwich ELISA ซึ่งอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะกับสารที่ต้องการวัด (monoclonal antibody) ติดไว้ในเพลท แล้วนำไปทำปฏิกริยากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มาจากการทดสอบยา สาร HRP2 (antigen) จะจับกับแอนติบอดี จากนั้นนำแอนติบอดีอีกตัวที่มีการติดสารที่ผลิตสี เข้าไปจับอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงนำไปวัดสีที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2

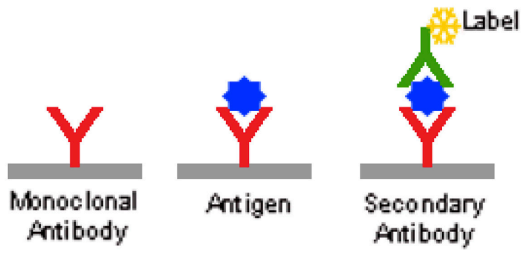
Histidine rich protein 2 (HRP2) เป็นแอนติเจนสำคัญที่ใช้พิสูจน์เชื้อมาลาเรีย การทดสอบความไวด้วยวิธีนี้จะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาที่นานประมาณ 72 ชั่วโมง ซึ่งจะแตกต่างจากวิธีอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 24 หรือ 48 ชั่วโมง ข้อดีของวิธีวัดความไวนี้คือ สะดวกและเชื่อถือได้ แต่จุดอ่อนที่สำคัญคือเรื่องของการสังเคราะห์สาร monoclonal antibody ซึ่งค่อนข้างราคาแพง ถึงแม้ว่าจะมีสามารถหาซื้อได้ง่ายก็ตาม

4. *การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมด้วยวิธี Immunoenzymatic capture technique*

วิธีการนี้จะคล้ายกับการวัดความไวด้วยวิธีอีไลซ่า (Enzyme linked immunosorbent assays; ELISA) แต่แตกต่างกันคือเป็นการวัดปฏิกริยาของเอนไซม์ lactate dehydrogenase protein (pLDH) (Makler et al., 1993) ของเชื้อมาลาเรีย

pLDH เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการ Embden—Meyerhof หรือไกลโคไลซิส (glycolysis) ของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเอนไซม์นี้ในเชื้อมาลาเรียจะมีรูปแบบ (isoform) ที่แตกต่างจากของมนุษย์ และเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดก็มีรูปแบบของเอนไซม์ที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี rapid immunochromatographic หรือชุดตรวจสำเร็จรูป

การประเมินความไวด้วยวิธีนี้ อาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ pLDH (monoclonal antibody) ติดไว้ในเพลท แล้วนำเชื้อมาลาเรียที่ผ่านการสัมผัสยามาใส่ จากนั้นเติมสาร nitroblue tetrazolium (NBT) และ diaphorase เพื่อให้เอนไซม์ pLDH ทำงานโดยเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็น formazan salt ที่มีสีฟ้าถึงน้ำเงินเข้ม และสามารวัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมีทรี (spectrophotometry) ซึ่งปฏิกริยานี้จะเกิดขึ้นแปรผันตรงกับเชื้อที่มีชีวิตอยู่ การเปลี่ยนสีนี้จำเป็นต้องใช้เชื้อในปริมาณสูงประมาณร้อยละ 1-2 ซึ่งไม่เหมาะสมหากนำไปประเมินความไวในพื้นที่ระบาดของมาลาเรีย (Basco et al., 1995) ต่อมามีการพัฒนาวิธีการวัดเอนไซม์ pLDH จากเชื้อมาลาเรียโดยใช้ double-site enzyme-linked LDH immunodetection (DELI) ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดระดับ pLDH โดยอาศัย monoclonal antibody เข้ามาช่วย (Druilhe et al., 2001)



รูปที่ 2 Sandwich ELISA

5. *การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมด้วยวิธีสารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์*

วิธีนี้จะอาศัยหลักการคล้ายกับวิธีการใช้สารรังสี ทั้งนี้สารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์เช่น SYBR นั้น สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียได้ ปริมาณการเรืองแสงจะขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเจริญเติบโต (Smilkstein et al., 2004; Bennett et al., 2004; Johnson et al., 2007) การวัดสารเรืองแสงเป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ต้องระวังเรื่องของสัญญาณรบกวนด้วย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Bennett และคณะ พบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I นั้นจะจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียเท่านั้น ทั้งนี้เพราะในเม็ดเลือดแดงไม่มีดีเอ็นเอ

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวัดความไวของเชื้อมาลาเรีย

ในปัจจุบันการศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียนั้นต้องมีความรวดเร็ว มีความแม่นยำ และเชื่อถือได้ ซึ่งทำให้การใช้กล้องจุลทรรศน์ในการประเมินความไวไม่เป็นที่นิยม ผู้วิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการอื่น ๆ ที่สะดวก รวดเร็ว และเปลืองแรงงานน้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ความไวของเชื้อมาลาเรียจะมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับห้องปฏิบัติการและวิธีที่ใช้ ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะศึกษาเปรียบเทียบความไวแต่ละวิธี โดยเฉพาะการใช้ monoclonal antibody (HRP2) และการใช้สารเรืองแสงฟลูโอเรสเซนท์ ทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่กำลังแพร่หลาย เป็นที่นิยมในการศึกษาความไวของนักวิจัยหลาย ๆ กลุ่มที่เฝ้าติดตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธี HRP2 และ การใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าค่าความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ร้อยละ 50 (Inhibition concentration at 50%; IC_{50}) ทั้งสองวิธีนี้มีความใกล้เคียงกันมาก ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าวิธีการวัดระดับ HRP2 นั้นจะใช้ทดแทนการศึกษาความไวด้วยสารรังสีได้ (Noedl et al., 2003) และจากการศึกษาในพื้นที่ระบาดพบว่า ค่า IC_{50} ของวิธีใช้กล้องจุลทรรศน์จะต่ำกว่าวิธี HRP2 แต่ค่าไปในทางเดียวกัน ($R^2 = 0.96$) และมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sharma et al., 2016)

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการใช้สารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์ (SYBR Green I) และสารรังสี ในการประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ระบาดจำนวน 138 ราย พบว่าการวัดด้วยสาร SYBR Green I ให้ผลความไวที่เหมือนกับวิธีการวัดด้วยสารรังสี โดยค่า IC_{50} ของทั้งสองวิธีมีความใกล้เคียงกันมาก ($R^2 = 0.93$) ทั้งนี้การศึกษานี้จะใช้ปริมาณเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.25-0.5 และจะต้องปราศจากเม็ดเลือดขาว (Rason et al., 2008) ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการศึกษาความไวด้วยสารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์สามารถนำมาใช้วัดกับเชื้อมาลาเรียที่เก็บจากพื้นที่ระบาดได้

การศึกษาเปรียบเทียบวิธี HRP2 และ SYBR Green I โดยใช้เชื้อมาตรฐานในห้องปฏิบัติการพบว่าค่า IC_{50} ของยามาตรฐานคลอโรควิน (chloroquine) เมฟโฟลควิน (mefloquine) และควินีน (quinine) ของทั้งสองวิธีนั้นใกล้เคียงกัน ทั้งนี้การศึกษานี้ใช้เชื้อมาลาเรียเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.75 และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียนาน 72 ชั่วโมงภายหลังการได้รับยา นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาในการเพาะเชื้อจะมีผลต่อค่า IC_{50} อีกด้วย (Bacon et al., 2007) การศึกษาต่อมาของ Vossen และคณะ ซึ่งเปรียบเทียบวิธี HRP2 และ SYBR Green I เช่นเดียวกัน แต่ทำการเจือจางปริมาณเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นและเติมเม็ดเลือดขาวลงไปในการทดสอบยา ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ถ้าในตัวอย่างมีเม็ดเลือดขาวปนจะทำให้มีสัญญาณรบกวนในการวัดด้วยวิธี SYBR Green I แต่ไม่รบกวนการวัดด้วยวิธี HRP2 และค่าเชื้อมาลาเรียเริ่มต้นที่ต่ำสุดที่เหมาะสมในการใช้วิธี SYBR Green I คือ ร้อยละ 0.2 ส่วนวิธี HRP2 คือร้อยละ 0.013 ซึ่งผลการศึกษาบ่งชี้ว่าในการศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการทั้งสองวิธีมีผลที่คล้ายคลึงกัน แต่การใช้ SYBR Green I ไม่เหมาะที่จะใช้ในพื้นที่ระบาดที่มีเชื้อมาลาเรียต่ำ หรือมีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาว (Vossen et al., 2010) ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น (inoculums effect) มีผลต่อการศึกษาความไวในหลอดทดลอง

นอกจากนี้มีผู้วิจัยศึกษาเปรียบเทียบความไวของยาต้านมาลาเรียชนิดต่าง ๆ และเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมยาต้านมาลาเรีย โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายาต้านมาลาเรียที่ออกฤทธิ์ช้า ถ้าเวลาที่เพาะเลี้ยงเชื้อสั้นเกินไปจะทำให้ได้ค่า IC_{50} ไม่เป็นไปตามความเป็นจริง และเมื่อเปรียบเทียบความไวด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่า ยาต้านมาลาเรียทุกชนิดเมื่อวัดความไวด้วยสารรังสีให้ผลที่น่าเชื่อถือ ไม่มีความแตกต่างของค่าความไว ไม่ว่าจะเพาะเชื้อนานเท่าใดก็ตาม แต่การวัดความไวด้วยสาร SYBR Green I และ HRP2 นั้น ค่าความไวของยาที่ออกฤทธิ์ช้าเช่น ยากลุ่ม antibiotics และยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อมาลาเรีย จะมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ส่วนการศึกษาความไวด้วยวิธี pLDH นั้นพบว่ามีความน่าเชื่อถือต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ (Wein et al., 2010)

ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นการเปรียบเทียบข้อมูลทั่วไปของวิธีการวัดความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียในหลอดทดลองทั้ง 5 วิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยอาจสรุปได้ว่า การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมมีหลากหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกันไป ผลความไวของแต่ละวิธีนั้นมีแนวโน้มที่ไปในทางเดียวกัน แต่ค่า IC_{50} จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสภาวะเวลาและชนิดของยาที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบข้อมูลทั่วไปของวิธีการวัดความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียในหลอดทดลอง

	Schizont maturation inhibition	Hypoxanthine assay	ELISA	Immuno-enzymatic capture technique	SYBR Green I
หลักการ	ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไปสู่ระยะไชซอนท์	สารรังสีเข้าไปร่วมกับสายดีเอ็นเอ	วัดสาร HRP2 ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ	วัดปฏิกริยาของเอนไซม์ lactate dehydrogenase protein (pLDH) ของชื้อ	สารเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอและเรืองแสงออกมา
ระยะเวลาในเพาะเชื้อ	24 ชม.	42-72 ชม.	48-72 ชม.	48-72 ชม.	48-72 ชม.
อุปกรณ์ในการวัด	กล้องจุลทรรศน์	เครื่องวัดปริมาณรังสี	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	เครื่องวัดปริมาณสารเรืองแสง
สารเคมีจำเป็นที่ต้องใช้	สีย้อม	สารรังสี	สารแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HRP2	สารแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ pLDH	สารเรืองแสง
ต้นทุน	น้อย	สูง	ปานกลาง	ปานกลาง	สูง
การสิ้นเปลืองแรงงาน	มาก	น้อย	น้อย	น้อย	น้อย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิจัยทางชีวเวชศาสตร์ (Center of Excellence in Research of Biomedical Sciences), ศูนย์แห่งความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเภสัชวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของโรคมาลาเรียและมะเร็งท่อน้ำดี (Center of Excellence in Pharmacology and Molecular Biology of Malaria and Cholangiocarcinoma), สภาวิจัยแห่งชาติ (National Research Council of Thailand) และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนการวิจัยทางด้านมาลาเรียมาโดยตลอด

เอกสารอ้างอิง

1. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 2014;505(7481):50-5.
2. Bacon DJ, Latour C, Lucas C, Colina O, Ringwald P, Picot S. Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for in vitro antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007;51: 1172-8.
3. Basco LK, Marquet F, Makler MM, Le Bras J. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: lactate dehydrogenase activity and its application for *in vitro* drug susceptibility assay. Exp Parasitol 1995;80:260-71.
4. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1807-10.
5. Denis MB, Tsuyuoka R, Poravuth Y, Narann TS, Seila S, Lim C, et al. Surveillance of the efficacy of artesunate and mefloquine combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Cambodia. Trop Med Int Health. 2006;11(9):1360-6.
6. Desjadins RE, Pamplin CL, vonBredow J, Barry KG, Canfield CJ. Kinetics of a new antimalarial, mefloquine. Clin Pharmacol Ther 1979;26:372-9.
7. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med. 2009;361(5):455-67.

8. Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P. A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 2001;64:233-41.
9. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. Inoculum effect leads to overestimation of *in vitro* resistance for artemisinin derivatives and standard antimalarials: a Gambian field study. Parasitology 1999; 119 (Pt 5): 435-40.
10. Harinasuta T, Migasen S, Bunnag D. Chloroquine resistance in Thailand. UNESCO 1st Regional Symp on Sci Knowledge of Trop Parasitol Mdica. 1962;3:239-59.
11. Johnson JD, Dennull RA, Gerena L, Lopez-Sanchez M, Roncal NE, Waters NC. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1926-33.
12. Karbwang J, Na-Bangchang K. Clinical application of mefloquine pharmacokinetics in the treatment of *P falciparum* malaria. Fundam Clin Pharmacol. 1994;8(6):491-502.
13. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. Am J Trop Med Hyg 1993; 48:739-41.
14. Na-Bangchang K, Congpuong K. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. The Tohoku journal of experimental medicine. 2007;211(2): 99-113.
15. Na-Bangchang K, Muhamad P, Ruaengweerayut R, Chaijaroenkul W, Karbwang J. Identification of resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-mefloquine combination in an area along the Thai-Myanmar border: integration of clinico-parasitological response, systemic drug exposure, and *in vitro* parasite sensitivity. Malar J. 2013;12:263.
16. Na-Bangchang K, Ruengweerayut R, Mahamad P, Ruengweerayut K, Chaijaroenkul W. Declining in efficacy of a three-day combination regimen of mefloquine-artesunate in a multi-drug resistance area along the Thai-Myanmar border. Malar J. 2010;9:273.
17. Noedl H, Attlmayr B, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Miller RS. A histidine-rich protein 2-based malaria drug sensitivity assay for field use. Am J Trop Med Hyg 2004;71: 711-4.
18. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1658-64.
19. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. Trends Parasitol 2003;19:175-81.
20. Nosten F, ter Kuile F, Chongsuphajaisiddhi T, Luxemburger C, Webster HK, Edstein M, et al. Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border. Lancet. 1991;337(8750):1140-3.
21. Rason MA, Randriantsoa T, Andrianantenaina H, Ratsimbasoa A, Menard D. Performance and reliability of the SYBR Green I based assay for the routine monitoring of susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008;102:346-51.
22. Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique. Lancet 1978;1:22-3.
23. Rojanawatsirivet C, Congpuong K, Vijaykadga S, Thongphua S, Thongsri K, Bangchang KN, et al. Declining mefloquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* along the Thai-Myanmar border. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004;35(3):560-5.
24. Sharma S, Mishra N, Valecha N, Anvikar AR. Comparison of WHO Mark III and HRP II ELISA for *in vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum*. J Vector Borne Dis. 2016;53(4):341-7.

25. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1803-6.
26. Vijaykadga S, Rojanawatsirivej C, Cholpol S, Phoungmanee D, Nakavej A, Wongsrichanalai C. *In vivo* sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. Trop Med Int Health. 2006;11(2):211-9.
27. Vossen MG, Pferschy S, Chiba P, Noedl H. The SYBR Green I malaria drug sensitivity assay: performance in low parasitemia samples. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(3):398-401.
28. Wein S, Maynadier M, Tran Van Ba C, Cerdan R, Peyrottes S, Fraisse L, et al. Reliability of antimalarial sensitivity tests depends on drug mechanisms of action. J Clin Microbiol 2010; 48:1651-60.
29. WHO, 2015. The World Malaria Report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Assessment of *in vitro* antimalarial drugs susceptibility against *Plasmodium falciparum*

Wanna Chaijaroenkul

Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University

Abstract

The *in vitro* antimalarial drug susceptibility is an important approach to evaluate the efficacy of drug resistance. There are several methods to perform the susceptibility test; the microscopic method is easy but not suitable for field study due to many limitations such as being laborious and time consuming. Other methods such as radioisotope assays, monoclonal antibody assay and fluorescent assay had been developed and offered high-through put susceptibility performance. But the major limitations of these methods are that they required expensive reagents and equipment even though they are more convenient and time saving which are suitable for researchers in globalization era.