Original Article

Malaria parasites detection by real-time polymerase chain reaction

Kanungnit Congpuong, Pongwit Bualombai, Nisa Kuisab, Ampai Darakapong

Reference laboratory center for Vector Borne Disease, Bureau of Vector Borne Disease

Abstract

Malaria parasite detection by polymerase chain reaction (PCR) is as sensitive and specific as standard microscopic examination of a Giemsa-stained thick blood film (GS-TBF). At present, PCR is not suitable for use in a malaria clinic because the method is time consuming and sophisticated. Real-time PCR is a new PCR technology developed for the detection of many infectious agents incluing malaria parasites. Besides its shortening of the detection time, the parasite density can also be quantified. This study was a method comparison of multiplex PCR or classical PCR with a TaqMan real-time PCR. A GS-TBF was the standard method for the comparison. One hundred and twenty six samples were malaria positive blood collected from patients attending malaria clinics in Pong Nam Ron District, Chanthaburi Province and Muang District, Ranong Province. In addition, 77 malaria negative samples were also studied. The results showed that multiplex PCR and real-time PCR used in this study were 100% sensitive and specific compared with the standard GS-TBF. However, real-time PCR has more advantages over multiplex PCR as it spent shorter duration and could quantify parasite density which is useful for the following up of treatment especially in areas where there is multidrug resistant *P. falciparum*.

Key words: multiplex PCR, real-time PCR, malaria

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction

คนึงนิจ คงพ่วง, พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, นิสา คุ้ยทรัพย์, อำไพ ดารกะพงษ์

สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าวิธีมาตรฐานการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือดที่ย้อมสียิมซ่าด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่วิธี PCR มีขั้นตอนการทดสอบนานและยุ่งยาก จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มารอรับการรักษาที่มาลาเรียคลินิก ปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า real-time PCR เป็นเทคนิคที่สามารถร่นระยะเวลาในการตรวจและสามารถตรวจวัดปริมาณของเชื้อมาลาเรียในเลือดได้ด้วย จึงเป็นเทคนิคที่คาดว่าในอนาคตอาจนำมาใช้เพื่อวินิจฉัยผู้ป่วยมาลาเรียที่มารอรับการรักษาที่มาลาเรียคลินิกได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบวิธี multiplex PCR ซึ่งคือวิธี PCR ปกติ กับวิธี real-time PCR โดยเปรียบเทียบทั้งสองวิธีกับวิธีมาตรฐาน ตัวอย่างศึกษาเป็นผู้ป่วยมาลาเรียที่มารับการรักษาที่มาลาเรียคลินิก อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี และอำเภอเมือง จังหวัดระนอง จำนวน 126 ราย และผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานจำนวน 77 ราย ผลการศึกษาพบว่าวิธี multiplex PCR และวิธี real-time PCR มีความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน แต่วิธี real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อผสมระหว่างเชื้อฟัลซิปารั่มและเชื้อไวแวกซ์ได้ดีกว่าวิธี multiplex PCR สามารถทราบปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด และใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธี multiplex PCR ดังนั้นจึงเหมาะสมกว่าวิธี multiplex PCR หากต้องการนำมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยมาลาเรีย โดยเฉพาะเมื่อต้องการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยซึ่งมีความจำเป็นในภาวะที่มีปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยาในพื้นที่

คำหัส: multiplex PCR, real-time PCR, มาลาเรีย

บทนำ

ระยะเวลาที่ผ่านมาเกือบร้อยปีแล้วที่การวินิจฉัยโรคมาลาเรียทำโดยการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดแบบหนาหรือบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่าด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐาน[1,2] ต้นทุนต่ำ ทำง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบเชื้ออย่างน้อย 50 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตรสำหรับฟิล์มหนาและ 500 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตรสำหรับฟิล์มบาง[3] สามารถแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนได้ทั้ง 4 สปีชีย์ สามารถวัดปริมาณของเชื้อได้ด้วย ทำให้สามารถประเมินความรุนแรงของโรคและติดตามผลการรักษาได้ดี

อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้เวลาตรวจนาน ผู้ตรวจต้องมีความเชี่ยวชาญ ในทางปฏิบัติในคลินิกที่มีผู้ป่วยจำนวนมากต่อวันจะพบการตรวจผิดพลาดได้มาก หรือถ้าผู้ป่วยมีเชื้อในร่างกายน้อย การตรวจก็ผิดพลาดได้มากเช่นเดียวกัน[4-7] ผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียหลายสปีชีย์พร้อมกันและผู้ป่วยหลังได้รับการรักษา จำนวนเชื้อในเลือดจะน้อย การตรวจฟิล์มเลือดจากผู้ป่วยเหล่านี้ต้องใช้ผู้ตรวจที่มีความชำนาญและใช้เวลาตรวจนาน ซึ่งในมาลาเรียคลินิกที่มีผู้ป่วยมารับบริการมากผู้ตรวจไม่มีเวลามากพอ หรือในพื้นที่ที่มีมาลาเรียน้อย ผู้ตรวจขาดประสบการณ์ทำให้ตรวจผิดพลาดได้เช่นกัน

ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียเพื่อใช้ตรวจได้ทั้งในพื้นที่ที่มีมาลาเรียชุกชุมและไม่ชุกชุม เพื่อให้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีประโยชน์ทางคลินิก สามารถแก้ข้อจำกัดของการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีที่พัฒนาขึ้นควรเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบเชื้อปริมาณน้อย ๆ ได้ สามารถแยกสปีชีย์ของเชื้อมาลาเรียได้ผลการตรวจเหมือนกันโดยไม่ขึ้นกับความสามารถหรือความชำนาญของผู้ตรวจ ปัจจุบันมีวิธีการตรวจทางซีโรโลยีทั้งวิธีที่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และวิธีทดสอบเร็วที่อาศัยหลักการของ malaria antigen capture immunochromatographic strip technology ซึ่งเป็นวิธีที่สอดคล้องกับความต้องการดังกล่าวข้างต้น แต่วิธีทดสอบเร็วยังคงมีความไวน้อยกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเฉพาะเมื่อจำนวนเชื้อในเลือดมีน้อยกว่า 100 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร[2] ชุดทดสอบเร็วที่อาศัยหลักการตรวจหาแอนติเจน HRP2 อาจให้ผลบวกปลอมเนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวจะยังคงอยู่ในเลือดแม้ว่าเชื้อมาลาเรียจะตายแล้ว แต่ยังมีแอนติเจน HRP2 หลงเหลืออยู่ ชุดทดสอบเร็วในปัจจุบันส่วนมากตรวจได้เฉพาะเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม มีบางชนิดที่สามารถแยกเชื้อฟัลซิปารัมจากเชื้อไวแวกซ์ได้ แต่ความไวและความจำเพาะยังไม่เป็นที่น่าพอใจ[8] และไม่สามารถแยกผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อผสม

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เริ่มมีเมื่อไม่นานมานี้ เป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่วิธีการตรวจที่ให้ความไวสูงต้องใช้วิธีเพิ่มจำนวนมากกว่าหนึ่งครั้งที่เรียกว่าวิธี nested หรือ semi-nested PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลานาน ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่รอรับการรักษาและไม่สามารถให้ข้อมูลปริมาณเชื้อในเลือด บอกได้เพียงว่ามีเชื้อมาลาเรียหรือไม่เท่านั้น ปัจจุบันปัญหาที่สำคัญของโรคมาลาเรียคือเชื้อดื้อยา วิธีการตรวจที่สามารถให้ข้อมูลปริมาณเชื้อในเลือดจะมีประโยชน์ต่อการติดตามผลการรักษา ทำให้ทราบว่ายาที่ใช้รักษาสามารถกำจัดเชื้อมาลาเรียในเลือดให้หมดไปได้หรือไม่ ล่าสุดมีการพัฒนาวิธี PCR ให้สามารถวัดปริมาณเชื้อมาลาเรียได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี real-time PCR (RT-PCR) เปรียบเทียบกับวิธี multiplex PCR และวิธีมาตรฐานคือการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจากปลายนิ้วของผู้ป่วยที่มารับบริการที่มาลาเรียคลินิก อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรีและอำเภอเมือง จังหวัดระนอง เป็นเลือดผู้ป่วยตรวจพบเชื้อมาลาเรียจำนวน 126 ราย และผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย 77 ราย ทำฟิล์มเลือดหนาและบางอย่างละหนึ่งฟิล์ม และหยดเลือด 2 หยด ลงบนกระดาษ กรอง 3 MM Whatman หยดละประมาณ 15 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บใส่ของพลาสติกที่บรรจุสารดูดความชื้น ปิดถุงให้แน่น นำมาตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค PCR ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์อ้างอิง ฯ สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำพิล์มเลือดหนาและบางที่เตรียมไว้ ย้อมสียิมซ่าความเข้มข้น 10% pH 7.2 ตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x ตรวจอย่างน้อย 100 วงกล้อง สำหรับพิล์มหนา พิล์มบางจะใช้เพื่อแยกสปีชีย์ของเชื้อ พิล์มเลือดแต่ละพิล์มจะได้รับการตรวจจากผู้ตรวจสองคน โดยที่แต่ละคนไม่ทราบผลการตรวจของกันและกัน คนแรกเป็นจุลทัศนกรของมาลาเรียคลินิก คนที่สองเป็นจุลทัศนากรของศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง คำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยนับจำนวนเชื้อทั้งหมดต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว แล้วคำนวณจำนวนเชื้อต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร โดยใช้มาตรฐานขององค์การอนามัยโลกที่กำหนดให้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร[9]

การเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดบนกระดาษกรองใช้วิธี Chelex method[10] มีวิธีการโดยย่อดังนี้ ตัดกระดาษกรองขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของหยดเลือดซึ่งเท่ากับเลือดประมาณ 15 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่บรรจุ 0.5% Saponin 1 มล. เขย่าเบา ๆ เก็บในตู้เย็น 4°ซ ค้างคืน เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์ เทส่วนน้ำทิ้ง เติม phosphate buffer saline (PBS) 1 มล. เขย่าเบา ๆ เก็บในตู้เย็นอีก 15-30 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เติม 5% Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 200 ไมโครลิตร เขย่าแรง ๆ นำไป incubate ใน heating block อุณหภูมิ 100°ซ นาน 5 นาที vortex 30 วินาที แล้ว incubate ต่ออีก 10 นาที แยก Chelex ออกโดยการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอไปใส่หลอดใหม่ ถ้ายังไม่ใช้ทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ

Multiplex PCR

ใช้วิธีของ Kho และคณะ (2003) primers ที่ใช้เป็นส่วนของ 18S rRNA gene ของเชื้อฟัลซิปารั่มและเชื้อไวแวกซ์ วิธีนี้จึงสามารถแยกเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารั่มและชนิดไวแวกซ์พร้อมกันโดยทำปฏิกริยา PCR เพียงครั้งเดียว forward primer ถูกออกแบบให้จำเพาะกับส่วนของยีนที่จำเพาะต่อ genus *Plasmodium* มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCA GCT TTT GAT GTT AGG GTA TT-3' (ตำแหน่งนิวคลีโอทัยด์ที่ 318-340, GenBank accession no. U03079 strain Sal-1 ของเชื้อไวแวกซ์ และ GenBank no. M19172 ของเชื้อฟัลซิปารั่ม)

reverse primers มีสองชนิดคือชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อไวแวกซ์ มีลำดับเบส 5'-TAA ACT CCG AAG AGA AAA TTC T-3' (ตำแหน่งนิวคลีโอทัยด์ที่ 1150-1129 GenBank no. U03079) และที่จำเพาะต่อเชื้อฟัลซิปารั่ม มีลำดับเบส 5'-GCA TCA AAG ATA CAA ATA TAA GC-3' (ตำแหน่งนิวคลีโอทัยด์ที่ 1768-1746 GenBank no. M19172)

forward primer จะจับได้กับทั้งเชื้อฟัลซิปารั่มและเชื้อไวแวกซ์ reverse primers มีสองชนิด คือ ชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อฟัลซิปารั่มและชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อไวแวกซ์ primers ทั้งหมดจะอยู่ในหลอดทดสอบเดียวกัน เมื่อทำปฏิกริยา PCR แล้ว แยก product ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis จะได้แถบที่แสดงว่ามีเชื้อฟัลซิปารั่มหรือเชื้อไวแวกซ์ที่มีขนาดคู่เบสต่างกัน คือ ชนิดฟัลซิปารั่มจะได้แถบขนาด 1451 คู่เบส และชนิดไวแวกซ์ได้แถบขนาด 833 คู่เบส

การทำปฏิกริยา PCR ใช้เครื่อง Px2 Thermal Cycle (Thermo Hybaid US, MA, USA) ปริมาตรของปฏิกริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 500 μM dNTP แต่ละตัว 250 nM ของ forward primer และ primer ที่จำเพาะกับเชื้อชนิดฟัลซิปารั่มและ 125 nM ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อไวแวกซ์ 100 nM Tris-HCl (pH 8.3), 16 mM $(NH_4)_2SO_4$, 4 mM $MgCl_2$ และ 2 ยูนิตของ Immolase™ DNA polymerase (Bioline USA Inc., MA, USA) ตั้งโปรแกรมปฏิกริยา PCR ดังนี้ ขั้นตอน pre-heating activation 95°ซ 7 นาที ขั้นตอน PCR 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่ 94°ซ 30 วินาที annealing ที่ 58°ซ 90 วินาที extension ที่ 72°ซ 90 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย คือ extenstion ที่ 72°ซ อีก 10 นาที

ตรวจสอบว่า product ที่ได้เป็นเชื้อชนิดฟัลซิปารั่มหรือเชื้อชนิดไวแวกซ์โดยนำ product 7 ไมโครลิตรไปแยกด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใช้ 1% Tris-Borate-EDTA (TBE) เป็นบัฟเฟอร์ และเติม 0.05% ethidium bromide เป็นตัวย้อมสี ใช้เครื่อง GelMate® 2000 ใช้ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที อ่านแถบของดีเอ็นเอที่แยกได้ด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตจากเครื่อง Gel Image Documentation System Dolphin Series (Wealtec Corp. GA, USA)

Real-Time PCR

ใช้วิธี Real-Time monoplex PCR เพื่อแยกสปีชีย์ของเชื้อฟัลซิปารัม ไวแวกซ์ และโอวัลเล[11] primer ที่ใช้เป็นส่วนของ 18S rRNA gene เช่นเดียวกับวิธี multiplex PCR, probe ที่ใช้เป็นชนิด TaqMan ตารางที่ 1 แสดง primer และ probe ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

TaqMan probe ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สังเคราะห์โดย Operon Biotechnologies GmbH (เยอรมนี) ปริมาตรของปฏิกริยาใช้ 20 ไมโครลิตร และใช้ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ในปฏิกริยาประกอบด้วย 10 ไมโครลิตรของ 2x QuantiTect probe PCR master mix (QIAGEN) 0.4 μM ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีย์ และ 0.2 μM ของ probe ที่จำเพาะต่อแต่ละสปีชีย์ ปฏิกริยาทำในเครื่อง ARTUS 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research) ตั้งโปรแกรมเครื่องดังนี้ กระตุ้นปฏิกริยาของ Hot Star Taq DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 95°ซ 15 นาที ทำปฏิกริยา PCR 45 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 95°ซ 15 วินาที และ 60°ซ 1 นาที การทำแต่ละครั้งได้ทำตัวอย่างควบคุมทั้งชนิดบวกและลบพร้อมไปด้วยกัน ผลที่ได้แสดงเป็นกราฟที่เรียกว่า sigmoid-shaped amplification plots เมื่อสร้างกราฟโดยใช้สเกลเส้นตรง กราฟเกิดจากการ plot ระหว่างปริมาณของแสงฟลูออเรสเซ็นต์กับ threshold cycle (CT) ซึ่งเป็นดัชนีที่ใช้วัดปริมาณดีเอ็นเอที่จะตรวจหาในตัวอย่าง เป็นค่าที่แสดงจำนวนรอบที่ดีเอ็นเอที่ต้องการวัดได้เพิ่มมากจนสามารถตรวจวัดได้ โดยวัดจากปริมาณฟลูออเรสเซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นมากกว่า baseline การวัดค่า CT ต้องวัดในช่วงของ log-linear phase

การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้วัดปริมาณ

เตรียมกราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอของเชื้อฟัลซิปารัม และเชื้อไวแวกซ์ที่ทราบปริมาณความหนาแน่นของเชื้อ วัดปริมาณด้วยวิธี RT-PCR นำค่าความหนาแน่นของเชื้อกับค่า threshold cycle (CT) มาสร้างกราฟเส้นตรงและคำนวณสมการถดถอยด้วยโปรแกรม Analysis Function ใน ARTUS3000 software

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณค่า analytical sensitivity ซึ่งหมายถึงจำนวนเชื้อน้อยที่สุดที่วิธีทดสอบนี้จะสามารถตรวจพบได้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยชนิดฟัลซิปารัมและชนิดไวแวกซ์อย่างละหนึ่งตัวอย่าง นำมาเจือจางในลักษณะที่เรียกว่า ten-fold dilution จนได้ปริมาณเชื้อน้อยกว่า 0 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร แล้วนำไปวัดด้วยวิธี real-time PCR

การคำนวณค่าความไวและความจำเพาะเปรียบเทียบระหว่างวิธี multiplex PCR และ real-time PCR โดยใช้วิธีมาตรฐาน คือ Giemsa stained thick blood film (GS-TBF) เป็นตัวเปรียบเทียบค่าความไวคำนวณจากสูตร (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง)/(จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง+จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม) และค่าความจำเพาะคำนวณได้จากสูตร (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง)/(จำนวนที่ให้ผลลบจริง+จำนวนที่ให้ผลบวกปลอม)

ใช้สถิติ Mann-Whitney test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่า median CT ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด และหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า CT กับความหนาแน่นของเชื้อในเลือดโดยใช้สถิติ Non-linear regression analysis

ตารางที่ 1 แสดง primers และ probes ที่ใช้ใน real-time PCR

Species	Primers or Probes	Sequence 5'---3'	Nucleotide position
P. falciparum	FAL-F	5'-CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA-3'	793-821
	FAL-R	5'-TATTCCATGCTGTAGTATTCAAACACAAA-3'	864-891
	FAL probe (FAM)	5'-TGTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCA-3'	829-863
P. vivax	VIV-F	5'-ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT-3'	665-690
	VIV-R	5'-ATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC-3'	777-806
	VIV-probe (TET)	5'-TTCGTATCGACTTTGTGCGCATTTTGC-3'	695-722
P. ovale	OVA-F	5'-TTTTGAAGAATACATTAGGATACAATTAATG-3'	1515-1545
	OVA-R	5'-CATCGTTCCTCTAAGAAGCTTTACAAT-3'	1617-1643
	OVA probe (VIC)	5'-CCTTTTCCCTATTCTACTTAATTCGCAATTCATG-3'	1549-1582

ผลการศึกษา

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบระหว่าง multiplex PCR, real-time PCR และ GS-TBF ตารางที่ 3 เปรียบเทียบระหว่าง real-time PCR กับ GS-TBF ตารางที่ 4 เปรียบเทียบระหว่าง multiplex PCR กับ real-time PCR จากการคำนวณค่าความไวและความจำเพาะจากสูตรดังกล่าวข้างต้นพบว่าวิธี multiplex PCR และ real-time PCR มีความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับวิธี GS-TBF และเมื่อเทียบระหว่าง multiplex PCR กับ real-time PCR พบว่าวิธี real-time PCR มีความไวและความจำเพาะเท่ากับวิธี multiplex PCR อย่างไรก็ตามวิธี real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อผสมระหว่างฟัลซิปารัมและไวแวกซ์ได้ดีกว่าวิธี multiplex PCR โดยพบว่ามีตัวอย่าง 3 ตัวอย่างที่ตรวจด้วยวิธี multiplex PCR เป็นเชื้อไวแวกซ์ แต่เมื่อตรวจด้วย real-time PCR พบมีการติดเชื้อผสมระหว่างฟัลซิปารัมกับไวแวกซ์ เมื่อนำฟิล์มเลือดผู้ป่วยทั้งสามตัวอย่างนี้ไปตรวจซ้ำด้วยวิธี GS-TBF อีกครั้ง โดยผู้เชี่ยวชาญอีก 2 ท่าน พบว่ามีการติดเชื้อผสมจริง

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบชนิดเชื้อฟัลซิปารัมและไวแวกซ์ที่ตรวจพบด้วยวิธี GS-TBF, Multiplex PCR และ Real-time PCR

Methods			No. of samples
GS-TBF	Multiplex PCR	Real-time PCR	
F	F	F	53
V	V	V	45
N	N	N	57
V	V	V+F	2
N	F	F	4
N	F	N	4
N	V	N	2

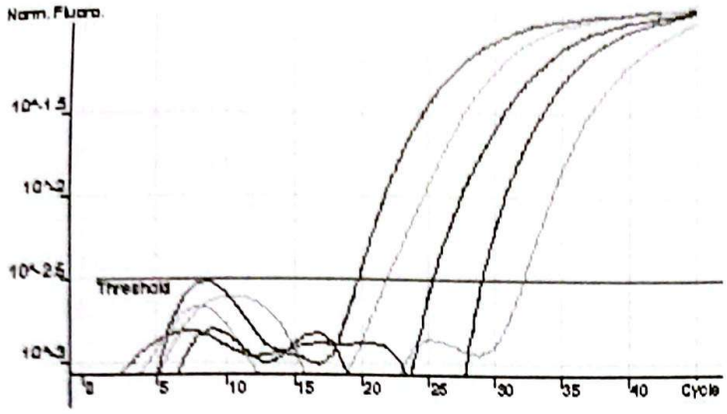
F = *P. falciparum*, V = *P. vivax*, N = negative

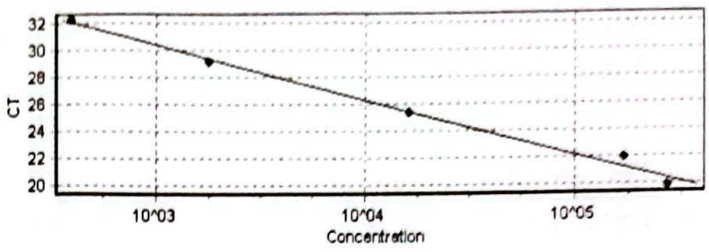
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อฟัลซิปารัมและไวแวกซ์ที่ตรวจพบด้วยวิธี Multiplex PCR และ GS-TBF

Multiplex PCR	GS-TBF			Total
	P. falciparum	*P. vivax*	Negative	
P. falciparum	32	-	-	32
P. vivax	-	42	-	42
Negative	-	-	50	50
Total	32	42	50	124

รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานและสมการถดถอยที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณของเชื้อมาลาเรีย การแปลผลว่าตัวอย่างที่ตรวจมีเชื้อมาลาเรียหรือไม่ด้วยวิธี real-time PCR จะใช้ ค่า cut off ของค่า CT เท่ากับ 38 สำหรับเชื้อชนิดฟัลซิปารัมและเท่ากับ 32 สำหรับเชื้อชนิดไวแวกซ์ ค่านี้ได้จากการทดสอบตัวอย่างไม่มีเชื้อมาลาเรียจำนวน 57 ตัวอย่าง สำหรับการคำนวณหาความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานหรือสมการถดถอยที่คำนวณได้จากโปรแกรม ARTUS 3000 ของเครื่อง real-time PCR

เมื่อนำค่า CT ที่วัดได้จากการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR มาหาความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียจากการคำนวณด้วยวิธี GS-TBF พบว่ามีความสัมพันธ์แบบ non-linear regression models แบบ compound, power, growth, exponential หรือ แบบ logistic non-linear regression models สำหรับเชื้อฟัลซิปารัม (R^2= 0.343, $p < 0.0001$) และพบความสัมพันธ์แบบ growth, exponential หรือ logistic non-linear equation สำหรับเชื้อไวแวกซ์ (R^2= 0.695, $p < 0.0001$)





Colour	Sample No.	CT	Parasitaemia (parasite/μl)
	MSF5-F	19.83	274,774.0
	MSF5.1-F	21.97	171,782.0
	MSF5.2-F	25.43	16,387.0
	MSF5.3-F	29.11	1,778.0
	MSF5.4-F	32.27	396.0

รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานและสมการถดถอยที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณของเชื้อมาลาเรีย

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี real-time PCR ที่สามารถวัดปริมาณเชื้อได้ด้วยเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง วิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธี PCR ธรรมดา วิธี real-time PCR รวมขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและการตรวจวัดว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบหรือไม่ในขั้นตอนเดียวกัน ในขณะที่วิธี PCR ธรรมดา หลังการเพิ่มจำนวนแล้วต้องใช้เวลาอีกไม่ต่ำกว่า 1 ชม. เพื่อตรวจว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่โดยการทำ gel electrophoresis

วิธี real-time PCR เป็นการทดสอบในขั้นตอนเดียวกัน ทั้งการเพิ่มจำนวนและการตรวจวัดปริมาณ ทั้งสองขั้นตอนทำในหลอดเดียวกันจึงไม่มีการปนเปื้อน ในขณะที่ PCR ปกติถ้าต้องการให้มีความไวเพิ่มขึ้นต้องทำ nested คือเพิ่มจำนวน 2 ครั้ง และต้องตรวจหาว่ามีการเพิ่มจำนวนที่จำเพาะหรือไม่ด้วยการทำ gel electrophoresis ดังนั้นโอกาสที่จะมีการปนเปื้อนระหว่างการทดสอบจึงมีมากกว่า

real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เวลาเพียง 2 ชม. เทียบกับ multiplex PCR ที่ใช้เวลา 5-6 ชม. real-time PCR จึงเหมาะสมที่จะใช้ในโรงพยาบาลที่จำเป็นต้องมีการวินิจฉัยที่ถูกต้องรวดเร็ว ปัจจุบันมีเครื่องมืออัตโนมัติที่สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอทำให้การสกัดดีเอ็นเอสะดวกรวดเร็วขึ้น

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อฟัลซิปารัมและไวแวกซ์ที่ตรวจพบด้วยวิธี real-time PCR และ GS-TBF

Real-time PCR	GS-TBF				Total
	P. falciparum	*P. vivax*	Mixed	Negative	
P. falciparum	45	-	-	-	45
P. vivax	-	37	-	-	37
Mixed	-	2	-	-	2
Negative	-	-	-	51	51
Total	45	39	-	51	135

การที่วิธี real-time PCR สามารถวัดปริมาณได้ทำให้สามารถนำไปใช้เพื่อประเมินผลการรักษาผู้ป่วยได้ โดยเฉพาะในสถานการณ์ปัจจุบันที่มีปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยามากขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่วัดได้ด้วยวิธี real-time PCR มีความสัมพันธ์กับที่คำนวณได้ด้วยวิธี GS-TBF โดยมีค่า correlation coefficience (r) เท่ากับ 0.819 ($p<0.0001$)

วิธี real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความไวสูง สามารถวัดเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุดที่ 0.04 และ 1.5 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตรสำหรับเชื้อฟัลซิปารั่มและเชื้อไวแวกซ์ตามลำดับ

การคำนวณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี GS-TBF มีความแปรผันได้มากจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความชำนาญของผู้ตรวจ ความหนาบางของฟิล์มเลือด จำนวนเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันในแต่ละคน เป็นต้น การคำนวณความหนาแน่นของเชื้อด้วยวิธี real-time PCR มีความแปรผันน้อยกว่าจากการที่ใช้เครื่องวัด

การศึกษาครั้งนี้วิธี real-time PCR มีความไวเท่ากับวิธี multiplex PCR แต่วิธี real-time PCR สามารถตรวจหาการติดเชื้อแบบผสมได้ดีกว่า วิธี real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แบบ monoplex PCR คือทดสอบเชื้อแต่ละสปีชี่ย์แยกกัน แต่สามารถทำพร้อมกันโดยใช้โปรแกรมการเพิ่มจำนวนอย่างเดียวกัน ทำให้ประหยัดเวลาในการทดสอบ การที่วิธี monoplex PCR สามารถตรวจพบการติดเชื้อผสมได้ดีกว่า multiplex PCR อธิบายได้ว่าเมื่อมี primers มากกว่าหนึ่งคู่ในปฏิกริยาและมีเชื้อมาลาเรียชนิดใดชนิดหนึ่งมากหรือน้อยกว่าอีกชนิดหนึ่งมาก ความไวที่จะตรวจพบเชื้อที่มีน้อยกว่าจะด้อยกว่าเชื้อชนิดที่มีมากกว่าเป็นธรรมดา

อย่างไรก็ตาม วิธี real-time PCR มีข้อจำกัดในเรื่องของราคาเครื่องมือและน้ำยาที่ใช้ ในขณะที่งานตรวจวินิจฉัยมาลาเรียของประเทศไทยส่วนมากยังอยู่ในท้องที่ทุรกันดารงบประมาณเพื่อการตรวจวินิจฉัยมีน้อย ประกอบกับการตรวจด้วยวิธี PCR ไม่สามารถบอกระยะของเชื้อมาลาเรียซึ่งมีความสำคัญต่อการรักษาและการป้องกันการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ วิธี PCR นี้เหมาะกับการศึกษาทางระบาดวิทยา เนื่องจากสามารถตรวจตัวอย่างเลือดได้พร้อมกันเป็นจำนวนมาก ๆ ด้วยเวลาที่รวดเร็ว เครื่องมือที่ใช้ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์อ้างอิง ฯ มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจตัวอย่างได้พร้อมกันสูงสุดถึงครั้งละ 72 ตัวอย่าง และมีความเบี่ยงเบนน้อยกว่าวิธี GS-TBF การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ตรวจได้ครั้งละ 1 ฟิล์ม ถ้ามีจำนวนฟิล์มที่จะตรวจต่อวันมากจะมีผลกระทบต่อผลการตรวจ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2548 ของสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค ขอขอบคุณหน่วยควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี และหน่วยควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงอำเภอเมือง จังหวัดระนอง ที่สนับสนุนการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่มาลาเรียคลินิก

เอกสารอ้างอิง

1. Warhurst DC, Williams JE. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol* 1996; 49: 533-8.
2. Mills CD, Burgess DC, Taylor HJ, Kain KC. Evaluation of a rapid and inexpensive dipstick assay for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 553-9.
3. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 66-78.
4. Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 142-9.
5. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1994; 47: 740-2.

6. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus-and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 687-92.
7. Snounou G, Pinheiro L, Goncalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, do Rosario VE. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 649-53.
8. Playford EG, Walker J. Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travellers. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4166-71.
9. World Health Organization. Bench aids for the diagnosis of malaria infections. WHO document, 2nd edition, 2000.
10. Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1993; 9: 303-5.
11. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Medici M, *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1214-9.