

Assessment of a Real-Time PCR for the Efficacy Monitoring of Antimalarial Treatment

Rujira Lerdprom¹, Kanungnit Congpuong², Wanna Srisajjarak¹, Kallaya Tunjan³

¹Vector Borne Disease Training Center Phrabuddabat, Saraburi Province, ²Bureau of Vector Borne Disease,

³Vector Borne Disease Control Center 9.3 Mae Sot District, Tak Province

Abstract

The objective of this study was to assess a Real-Time PCR for the efficacy monitoring of antimalarial treatment. The assay compared microscopy with Real-Time PCR for assessing the efficacy of artesunate-mefloquine combination in the treatment of falciparum malaria patients. Thirty six patients with uncomplicated falciparum were selected from fifty patients. Thick peripheral blood smears were taken on day 0, 3, 7, 14 and 28. The ratio of male and female was 4:1. The ratio of Thai and Burmest was 2:7.

The results showed that all thick blood films of 36 patients were positive while the Real-Time PCR showed 33 positive for falciparum (T_m 73-74°C) and 3 positive for vivax (T_m 76-77°C). The thick blood film of 165 samples from 33 patients was negative. 16.33 % of these samples were positive when testing with Real-Time PCR. The thick blood film sample of 6 patients from 36 patients was negative on day 3, 7, 14 and 28 after treatment while the results of Real-Time PCR were *P. falciparum* on day 3 and 28 in 3 and 1 patients respectively. The real-time PCR showed positive *P.vivax* on day 7 in 2 patients.

The results showed that thick blood film had a lower sensitivity than the Real-Time PCR method. However, microscopic detection remains the most reliable standard. In this result we classified every negative thick smear corresponding to a positive Real-Time PCR results as a false negative. Furthermore, the important finding in this study is that 16.67 % of treatment failure were detected by the Real-Time PCR method while, 5.56 % of treatment failure were detected by thick blood film. The Real-Time PCR method is useful for *in vivo* drug efficacy studies. It is important to detect resistant malaria parasites before they reach high resistance level.

KEY Words : Real-Time PCR, Efficacy Monitoring, Antimalarial Treatment

ประเมินประสิทธิภาพการรักษาของยามาลาเรียด้วยเทคนิค Real-Time PCR

¹รุจิรา เลิศพร้อม, ²คณินิจ คงพ่วง, ¹วรรณมา ศรีสังจรรย์, ³กัลยา ตุ่นจันทร์

¹ศูนย์อบรมโรคติดต่อ นำโดยแมลง พระพุทธบาท จ.สระบุรี, ²สำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง,

³ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 9.3 อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

บทคัดย่อ

การศึกษาวินิจฉัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการรักษาของยามาลาเรีย โดยเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Real-Time PCR และการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งได้ประเมินประสิทธิภาพการรักษาของยามาลาเรีย (Combination drugs) ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัม โดยคัดเลือกผู้ป่วยที่ยินยอมเป็นอาสาสมัครบริจาคเลือดจำนวน 50 คน และนัดหมายมาเจาะเก็บเลือดหลังได้รับยารักษาามาลาเรียในวันที่ 3, 7, 14 และ 28 จากอาสาสมัครบริจาคเลือดจำนวน 50 คน มีอาสาสมัครบริจาคเลือด 36 คนที่สามารถเจาะเก็บเลือดครบตามทีมนัดหมายในวันที่ 3, 7, 14 และ 28 โดยมีอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 4:1 และอัตราส่วนสัญชาติไทยต่อสัญชาติพม่าเท่ากับ 2:7

จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย 36 ตัวอย่างด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์พบว่า มีผลแสดงเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัมทั้ง 36 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิค Real-Time PCR มีผลแสดงเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัมและชนิดไวแวกซ์ จำนวน 33 (T_m 73-74°C) และ 3 (T_m 76-77°C) ตัวอย่างตามลำดับ และใน 180 ตัวอย่างจากตัวอย่างของอาสาสมัครบริจาคเลือดจำนวน 36 คนพบว่า การตรวจฟิล์มเลือดแสดงผลไม่พบเชื้อเท่ากับ 16.33% ของจำนวนผลการตรวจพบเชื้อทั้งหมดด้วยเทคนิค Real-Time PCR นอกจากนี้ มีตัวอย่างของอาสาสมัครบริจาคเลือด 6 คน จาก 36 คน ที่ตรวจฟิล์มเลือดแล้วแสดงผลไม่พบเชื้อในวันที่ 3, 7, 14 และ 28 หลังจากที่ได้รับประทานยามาลาเรียในวันแรก ในขณะที่การตรวจด้วยเทคนิค Real-Time PCR แสดงผลว่าพบเชื้อชนิดพัลซิพารัมในวันที่ 3 และ 28 จำนวน 3 และ 1 คน ตามลำดับ และแสดงผลพบเชื้อชนิดไวแวกซ์ในวันที่ 7 จำนวน 2 คน แสดงให้เห็นว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์มีความไวต่ำกว่าเทคนิค Real-Time PCR นอกจากนี้ การตรวจด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่ามี จำนวนตัวอย่างที่รักษาไม่ได้ผลเท่ากับ 16.67% ในขณะที่การตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่ากับ 5.56% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค Real-Time PCR สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามการรักษาของยามาลาเรียเพื่อเป็นการตรวจสอบระดับการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียก่อนที่ระดับดื้อยาจะเพิ่มขึ้นในระดับสูงต่อไป

คำรหัส : เทคนิค Real-Time PCR, ประเมินประสิทธิภาพ, ยามาลาเรีย

บทนำ

จากปัญหาการติดต่อยุงมาลาเรียได้ขยายวงกว้างมากขึ้นทำให้ยากต่อการควบคุมในทุกพื้นที่ ทั้งนี้ควรมียุทธวิธีในการเฝ้าติดตามการดื้อยา[1] การดื้อยาสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ได้ผล [2] ซึ่งอัตราการรักษาที่ไม่ได้ผลเพิ่มสูงขึ้นในพื้นที่แพร่เชือนั้นควรจะมีการควบคุมทางระบาดวิทยา

ทั้งนี้ในการควบคุมการระบาดของเชื้อมาลาเรีย ส่วนหนึ่งต้องอาศัยความรู้ ความก้าวหน้าจากการวิจัยทางห้องปฏิบัติการและภาคสนาม[3] ซึ่งวิธีทางห้องปฏิบัติการที่มีความไว รวดเร็ว เป็นที่ยอมรับสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย และประเมินประสิทธิภาพการรักษา[4] ทั้งนี้สามารถเลือกแต่ละวิธีในการตรวจวินิจฉัย การใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายแต่ต้องอาศัยผู้ชำนาญเฉพาะ[5] มีการศึกษาวิธีการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาหรือชุดตรวจแบบรวดเร็วสามารถนำไปใช้ในภาคสนามหรือถิ่นทุรกันดารได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายใช้ปริมาณเลือดน้อย[6] ใช้เวลาตรวจวินิจฉัยน้อย ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ[4] แต่อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวยังมีความไวต่ำ ในกรณีเชื้อในเลือดต่ำ[7] นอกจากนี้อาจเกิดการตรวจผิดได้ในกรณีแอนติเจนที่ยังคงค้างอยู่ในเลือด และยังไม่สามารถแยกเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดได้[4]

วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยมาลาเรียที่มีความไวและความจำเพาะสูงสุด และสามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจวินิจฉัย[5] เชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีปริมาณเชื้อมาลาเรียจำนวนน้อยมาก ๆ ในเลือด[8] อย่างไรก็ตาม วิธี PCR ส่วนใหญ่ค่อนข้างยุ่งยาก ในทางปฏิบัติไม่เหมาะสำหรับตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ๆ และไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

Real-time PCR เป็นวิธีใหม่ที่กำลังเป็นที่นิยม เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR products ในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ[4]

ในการศึกษารุ่นนี้ ได้นำวิธี Real-time PCR มาประยุกต์ใช้ในการติดตามผลการรักษา โดยเปรียบเทียบกับการใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อประโยชน์ในงานด้านการเฝ้าระวังเชื้อมาลาเรียดื้อยา

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินประสิทธิภาพการรักษาของยามาลาเรียโดยเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Real-Time PCR และการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์

วัสดุและวิธีการ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ได้จากการศึกษา คือ อาสาสมัครบริจาคเลือดที่เป็นผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่เข้ารับบริการตรวจในมาลาเรียคลินิกของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 9.3 อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 50 ตัวอย่าง

ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

1. การคัดเลือกและเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับการตรวจวินิจฉัย

คัดเลือกตัวอย่างจำนวน 50 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยโรคมาลาเรียที่เข้ารับบริการตรวจที่มาลาเรียคลินิกของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 9.3 แม่สอด จ.ตาก เก็บตัวอย่างเลือด นำมาทำฟิล์มหนาและบาง และเก็บอีกส่วนหนึ่งโดยหยดเลือดบนกระดาษ Whatman 3 MM ปล่อยให้แห้ง เพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR

2. การคัดเลือกและเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับการติดตามการรักษา

จากตัวอย่าง ข้อ 1 ติดตามการรักษา มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม หลังจากได้รับยา (Combination drugs) ตามตารางที่ 1 โดยทำการเก็บเลือดหลังได้รับยารักษา มาลาเรียดังกล่าวในวันที่ 3, 7, 14 และ 28 นำมาทำฟิล์มหนาและบาง และเก็บอีกส่วนหนึ่งโดยหยดเลือดบนกระดาษ Whatman 3 MM ปล่อยให้แห้ง เพื่อใช้ทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR

ตารางที่ 1 ยารักษาหายขาดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในพื้นที่ด้อยาเมโพลควิน[9] กลุ่มผู้ป่วย

กลุ่มผู้ป่วย (อายุ)	วันที่ 1			วันที่ 2		รวมยาที่จ่าย		
	มือแรก		มือที่สอง	ATS (เม็ด)	P (มก.)	ATS (เม็ด)	M (เม็ด)	P (มก.)
	ATS (เม็ด)	M (เม็ด)	M (เม็ด)					
14 ปี ขึ้นไป	6	3	2	6	30	12	5	30

หมายเหตุ ยา ATS และ M สำหรับวันที่ 1 ให้รับประทานต่อหน้าเจ้าหน้าที่ ยาที่เหลือมอบให้ไปรับประทานต่อที่บ้าน

ATS คือ ยา Artesunate มีเม็ดละ 50 มก. ขนาด 12 มก./กก.

M คือ ยา Mefloquine มีเม็ดละ 250 มก. ขนาด 25 มก./กก.

P คือ ยา Primaquine มีเม็ดละ 5 มก. และ 15 มก. ขนาด 0.5 มก./กก.

3. การวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย

ตรวจวินิจฉัยฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR ตามวิธีการของคิงนิจ คางพวง และคณะ 2008[10]

4. การจำแนกระดับการดื้อยาและการตอบสนองต่อการรักษา

ประเภทการตอบสนองต่อการรักษา [11]

พื้นที่ที่มีการแพร่ในระดับเชื้อสูง
Early Treatment Failure (ETF)
ETF <ul style="list-style-type: none"> มีอาการแสดงรุนแรงในวันที่ 1 2 หรือ 3 และยังมีเชื้อในเลือด มีเชื้อในเลือดในวันที่ 2 สูงกว่า วันที่ 0 มีเชื้อในเลือดในวันที่ 3 และอุณหภูมิ $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ มีเชื้อในเลือดในวันที่ 3 $\geq 25\%$ (ของการนับในวันที่ 0)
Late Treatment Failure (LTF)
Late Clinical Failure <ul style="list-style-type: none"> มีอาการแสดงรุนแรงหลังวันที่ 3 และมีเชื้อในเลือด (นอกเหนือจากเกณฑ์ของ ETF) มีเชื้อในเลือด และมีอุณหภูมิ $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ ในระหว่างวันที่ 4 ถึง 14 (นอกเหนือจากเกณฑ์ของ ETF)
Late Parasitological Failure <ul style="list-style-type: none"> มีเชื้อในเลือดในวันที่ 14 และมีอุณหภูมิ $< 37.5^{\circ}\text{C}$ (นอกเหนือจากเกณฑ์ของ ETF และ LCF)

5. การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล ค่าสัดส่วน ค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละ

ผลการศึกษา

การศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้ ได้ประเมินประสิทธิภาพการรักษาของยามาลาเรีย (Combination drugs) ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม แสดงตามตารางที่ 1 โดยคัดเลือกผู้ป่วยตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกและยินยอมเป็นอาสาสมัครบริจาคเลือด จำนวน 50 คน และสามารถมาตามนัดหมายเพื่อเก็บเลือดหลังได้รับยารักษาามาลาเรียแล้วในวันที่ 3, 7, 14 และ 28

จากอาสาสมัครบริจาคเลือดจำนวน 50 คน มีอาสาสมัครบริจาคเลือด 36 คน ที่สามารถเก็บเลือดครบตามที่นัดหมาย โดยเป็นเพศชาย 40 คน (80%) เพศหญิง 10 คน (20%) สัญชาติไทย 11 คน (22%) สัญชาติพม่า 39 คน (78%) อายุเฉลี่ย 30 ปี อุณหภูมิเฉลี่ยเริ่มต้น 38 องศาเซลเซียส และความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้นเฉลี่ย 403 ตัว/เลือด 1 ไมโครลิตร

จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย 36 ตัวอย่าง ด้วยการตรวจพื้ลัมเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค Real-Time PCR พบว่า มีผลแสดงเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมทั้ง 36 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิค Real-Time PCR มีผลแสดงเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจำนวน 33 (T_m 73-74°C) และชนิดไวแวกซ์จำนวน 3 (T_m 76-77°C) ตัวอย่าง (ค่า T_m : melting temperature ของ *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. ovale* และ *P. vivax* เท่ากับ 71.0-72.0, 73-74, 75.0-75.0 และ 76.0-77.0 ตามลำดับ[10])

ตารางที่ 2 ผลเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค Real-Time PCR

ฟิล์มหนา	Real-Time PCR			รวม
	F	V	ไม่พบเชื้อ	
F	38	3	0	41
V	0	0	0	0
ไม่พบเชื้อ	6	2	131	139
รวม	44	5	131	180

หมายเหตุ : วิธีการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีความไวของการทดสอบ (Sensitivity) เท่ากับ 83.67 %

จากตารางที่ 2 ผลเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค Real-Time PCR ใน 165 ตัวอย่าง จากอาสาสมัครบริจาคเลือดจำนวน 36 คน พบว่า การตรวจฟิล์มเลือดแสดงผลไม่พบเชื้อเท่ากับ 16.33% โดยมีผลไม่พบเชื้อชนิดพลาสโมเดียมและไวแวกซ์ เท่ากับ 13.64% และ 40.0% ตามลำดับของจำนวนผลการตรวจพบเชื้อทั้งหมดด้วย เทคนิค Real-Time PCR นอกจากนี้ มีตัวอย่างของอาสาสมัครบริจาคเลือด 6 คน จาก 36 คนที่ตรวจฟิล์มเลือดแล้วแสดงผลไม่พบเชื้อ ในวันที่ 3, 7, 14 และ 28 หลังจากที่ได้รับประทานยามาลาเรียในวันแรก ในขณะที่การตรวจด้วยเทคนิค Real-Time PCR แสดงผลว่าพบเชื้อชนิดพลาสโมเดียม ในวันที่ 3 และ 28 จำนวน 3 และ 1 คน ตามลำดับ และแสดงผลว่าพบเชื้อชนิดไวแวกซ์ ในวันที่ 7 จำนวน 2 คน แสดงให้เห็นว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ มีความไวต่ำกว่าเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Liliane C. และคณะ ปี ค.ศ. 1999 ได้เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค PCR พบว่า ใน 132 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 12 คน ที่ได้รับการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตัดสินผลว่าไม่พบเชื้อ เท่ากับ 27.7% ของผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ที่ตัดสินว่าพบเชื้อ[12]

ตารางที่ 3 ผลเปรียบเทียบของประเภทการตอบสนองการรักษา จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค Real-Time PCR

ฟิล์มหนา	Real-Time PCR				รวม
	ACPR	LTF	ETF	ตัดสินไม่ได้	
ACPR	26	4	0	3	33
LTF	0	2	0	0	2
ETF	0	0	0	0	0
ตัดสินไม่ได้	0	0	0	1	1
รวม	26	6	0	4	36

จากตารางที่ 3 แสดงผลเปรียบเทียบของประเภทการตอบสนองการรักษา จากการตรวจวินิจฉัย เชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค Real-Time PCR โดยจำแนก ตามองค์การอนามัยโลก (WHO)[11]

จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดโดยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า จากตัวอย่างอาสาสมัครบริจาคเลือด 36 คน ได้จำแนกประเภทการตอบสนองการรักษาเป็น LTF จำนวน 2 ตัวอย่าง ในขณะที่ การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค Real-Time PCR มีจำนวน 6 ตัวอย่าง ที่ได้จำแนกประเภทการตอบสนองการรักษาเป็น LTF แสดงให้เห็นว่าระดับการดี้อยากจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR

วิจารณ์ผล

งานวิจัยครั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพการรักษาของยามาลาเรีย โดยเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วย วิธี Real-Time PCR กับการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ในการติดตามผู้ป่วยหลังรับการรักษา ซึ่งถ้าการรักษาไม่ได้ผล อาจเกิดจากเชื้อดื้อต่อยา ทั้งนี้ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จำแนกระดับการดี้อยา ดังนี้ คือ 1. S/ACPR 2. RI/LTF 3. RII/ETF หรือ LTF และ 4. RIII/ETF อิงกับปริมาณเชื้อที่ตรวจได้จากกล้องจุลทรรศน์[13] ซึ่งวิธีดังกล่าวขึ้นกับผู้ตรวจแต่ละคน หรือในแต่ละวัน แต่ถ้าใช้เทคนิค Real-time PCR อาจช่วยตัดปัญหาการแปรปรวนเหล่านี้ได้ ประกอบกับวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูงกว่า ดังนั้นในการจำแนกระดับการดี้อยาอาจเป็นไปได้ในกรณีระดับการดี้อยาจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ อาจเปลี่ยนแปลงเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR

ผลการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้ พบว่า ใน 180 ตัวอย่าง จากอาสาสมัครบริจาคเลือดจำนวน 36 คนที่ได้รับการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตัดสินผลว่าไม่พบเชื้อ เท่ากับ 16.33% ของผลการตรวจด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่ตัดสินว่าพบเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค Real-Time PCR เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ การตรวจด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่ามีจำนวนตัวอย่างที่รักษาไม่ได้ผลเท่ากับ

16.67% ในขณะที่การตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่ากับ 5.56% (ตารางที่ 3) ซึ่งจากผลดังกล่าว ได้ถูกยืนยันจากการที่ตรวจพบการรักษาไม่ได้ผลอย่างรวดเร็วของเทคนิค Real-time PCR ดังนั้นเทคนิค Real-Time PCR สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามการรักษาด้วยยามาลาเรีย เพื่อเป็นการตรวจสอบระดับการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย ก่อนที่ระดับดื้อยาจะถึงระดับสูงต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย เพื่อเสริมวิธีการตรวจวินิจฉัยอื่น ๆ ในพื้นที่ที่มีการแพร่เชื้อมาลาเรียในระดับต่ำและปานกลาง และขาดแคลนบุคลากรที่เชี่ยวชาญในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือด[5] แม้ว่าวิธีการตรวจฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังคงได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard)[12] ในปัจจุบัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีมาตรการในการติดตามผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียที่ยินยอมเป็นอาสาสมัครบริจาคเลือดในโครงการวิจัยให้มาเจาะเก็บเลือดตามเวลาที่นัดหมายอย่างเหมาะสม
2. ควรคัดเลือกผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียที่ยินยอมเป็นอาสาสมัครบริจาคเลือดในโครงการวิจัยที่มีพื้นที่ที่สามารถติดตามได้สะดวก เพื่อลดปัญหาการสูญเสียตัวอย่าง เวลา และค่าใช้จ่าย
3. ควรมีการขยายการศึกษาอย่างต่อเนื่อง หรือเพิ่มพื้นที่ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประเภทการตอบสนองการรักษาของยามาลาเรียในแต่ละพื้นที่หรือแต่ละปี

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความร่วมมือและการสนับสนุนการดำเนินการวิจัยจากศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 9.3 อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์จิรพัฒน์ ศิริชัยสินธพ ผู้อำนวยการศูนย์อบรมโรคติดต่อ นำโดยแมลงอำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี ที่ให้ข้อเสนอแนะในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ดร.คณินิจ คงพ่วง และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ สำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค ที่ให้ข้อเสนอแนะและการสนับสนุนการทดสอบ Real-Time PCR และขอขอบพระคุณประชาชนในอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บรวบรวมข้อมูล จนทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Labbe AC, Patel S, Crandall I. and Kain KC. Molecular Surveillance System for Global Patterns of Drug Resistance in Imported Malaria. *Emerging Infectious Disease*. 2003; 9: 33-36.
2. Rabbo AA, Bassilia A, and Atta H. The Quality of Antimalarials Available in Yemen. *Malaria Journal*. 2005; 4: 7 p. (<http://www.malariajournal.com/content/14/1/28>)

3. Tjitra E, Baker J, Suprianto S, Cheng Q. and Anstey NM. Therapeutic efficacies of artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine and Chloroquine-Sulfadoxine-Pyrimethamine in Vivax Malaria Pilot Studies : Relationship to *Plasmodium vivax dhfr* Mutations. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 2002; 46: 3947-3953.
4. Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J. and Cui L. *Plasmodium vivax* transmission : chances for control ?, Trend in Parasitology. 2004; 20: 192-198.
5. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L *et al.* Development of a RealTime PCR Assay for Detecion of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. Journal of Clinical Microbiology, 2004; 42: 1214-1219.
6. Maria HC, Maristela G, Richardo LD, Orlando C, Mauricio M. and Irene S. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. Malaria Journal, 2003; 2: 7 p.
7. Safeukui I, Millet P, Boucher S, Melinard L, Fregeville F, Receveur MC, *et al.* Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of Plasmodium species in returning travellers and migrants. Malaria Journal, 2008; 7: 11 p. (<http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-7-70.pdf>)
8. Lopes D, Rungsihirunrat K, Noguera F, Seugorn A, Gil JP, Rosario VE *et al.* Molecular Characterisation of Drug Resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. Malaria Journal. 2002; 4: 7 pages (<http://www.malariajournal.com/content/1/1/12>)
9. ชัยพร โจนวัฒน์ศิริเวช. คู่มือการรักษาไข้มาลาเรียชนิดไม่มีภาวะแทรกซ้อน ฉบับ พ.ศ. 2547. ใน ชัยพร โจนวัฒน์ศิริเวช, สมศักดิ์ ประจักษ์วงศ์, จีรพัฒน์ ศิริชัยสินธรพ, สุทัศน์ นุตสถาปนา, พรพิมล งามเทาว์, เสาวนิต วิชัยชัชตะ, ธวัช กั่นตศรี, บรรณาธิการ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยและคณะ; 2547 น. 9-10
10. Congpuong K, Gil PJ, Bualombai P, Kangchaingone Y, Darakapong A, Wernsdorfer HW. Mix-species malaria infection in high transmission areas of Thailand. Asian Biomedicine, 2008; 2: 5 p.
11. Blair S, Fonseca JC, Pineros GJ, Rios A, Alvarez T, Alvarez G, *et al.* Therapeutic efficacy test in malaria *falciparum* in Antioquia, Colombia. Malaria Journal. 2006; 5: 9 p. (<http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-5-14.pdf>)
12. Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, and Danis M. Development of a Plasmodium PCR for Monitoring Efficacy of Antimalarial Treatment. Journal of Clinical Microbiology, 1999; 37: 35-38
13. Plowe VC, Doumbo KO, Djimde A, D, Kayentao K, Diourte Y, Doumbo NS, *et al.* Chloroquine Treatment of Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria in Mali : Parasitology resistance versus Therapic Efficacy. The American Society of Tropical Medicine and Hygine, 2001; 64: 242-246