

นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)



การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียระหว่างเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เสเชิงปริมาณกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ในพื้นที่ระบาดของประเทศไทย พ.ศ. 2560-2563

Comparison between Quantitative Polymerase Chain Reaction and Microscopic Examination for Malaria Detection in Endemic Areas of Thailand, 2017-2020

พัชริดา	บุญเดช	Patcharida	Boondej
รุ่งนรินทร์	สุขอร่าม	Rungnirun	Sugaram
พลวัชร	เรืองศิริรักษ์	Ponlawat	Ruangsirarak

บทคัดย่อ

โรคไข้มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากโปรโตซัวในกลุ่มพลาสโมเดียม (*Plasmodium spp.*) ถึงแม้จะมียารักษาให้หายขาดได้ แต่หากวินิจฉัยล่าช้าและรักษาไม่ทันท่วงที อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียระหว่างเทคนิคคอปูซีวโมเลกุล (Quantitative PCR; qPCR) กับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทำการศึกษาในตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 198 ราย ที่เก็บระหว่างปี พ.ศ. 2560-2563 จากโครงการเฝ้าระวังประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรีย (Integrated Drug Efficacy Surveillance; iDES) ในพื้นที่ระบาดของ 14 จังหวัด ได้แก่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ตาก ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ชลบุรี ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา และยะลา ผลการศึกษาพบความสอดคล้องของผลการตรวจทั้งสองวิธีร้อยละ 94.95 (188 ตัวอย่าง) และผลไม่สอดคล้องร้อยละ 5.05 (10 ตัวอย่าง) โดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าหนึ่งชนิดและการติดเชื้อ *P. knowlesi* เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจ พบว่า qPCR มีความถูกต้อง ความไว และความจำเพาะร้อยละ 100 แม้ว่า qPCR จะมีต้นทุนสูงกว่า แต่ความแม่นยำของผลการตรวจสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เสเชิงปริมาณ, มาลาเรีย

บทคัดย่อ

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* spp. Although treatable, delayed diagnosis and treatment can result in fatal outcomes. This study aimed to compare the effectiveness between quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and microscopic examination for malaria detection. A total of 198 malaria patient samples were collected during 2017-2020 under the Integrated Drug Efficacy Surveillance (iDES) program from 14 malaria-endemic provinces in Thailand, including Mae Hong Son, Chiang Rai, Chiang Mai, Tak, Sisaket, Ubon Ratchathani, Chonburi, Ranong, Prachuap Khiri Khan, Chumphon, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat, Phang Nga, and Yala. The results showed 94.95% (188 samples) concordance between both methods, while 5.05% (10 samples) showed discordant results, primarily in cases of mixed infections and *P. knowlesi* infection. The qPCR method demonstrated 100% accuracy, sensitivity, and specificity compared to microscopic examination. Although qPCR has a higher cost than microscopic examination, its precise results provide valuable epidemiological data for better malaria control and prevention strategies.

Key words: Quantitative Polymerase chain reaction, Malaria

บทนำ

โรคไข้มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่พบบ่อยซึ่งเกิดจากโปรโตซัวในสกุลพลาสโมเดียม (*Plasmodium* spp.) ซึ่งติดต่อสู่คนผ่านการกัดของยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อ แม้จะมียารักษาให้หายขาดได้ แต่หากวินิจฉัยล่าช้าและรักษาไม่ทันท่วงที อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ โรคนี้ติดต่อสู่คนโดยการกัดของยุงก้นปล่องตัวเมียที่ติดเชื้อ เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์มี 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* โดยในประเทศไทยพบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* เป็นส่วนใหญ่ ส่วนชนิด *P. knowlesi* ถึงแม้ยังไม่มีรายงานยืนยันว่าสามารถติดต่อจากคนสู่คน นับว่าเป็น Zoonotic malaria และพบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้⁽¹⁾ สถานการณ์โรคไข้มาลาเรียในประเทศไทยมีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจน จากที่เคยพบผู้ป่วยมากกว่า 10,000 รายต่อปี เหลือเพียง 3,940 รายในปี พ.ศ. 2563⁽²⁾ การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียที่ถูกต้องและรวดเร็วมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการควบคุมและกำจัดโรค เนื่องจากช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เหมาะสมและทันท่วงที ซึ่งส่งผลต่อการลดอัตราการเสียชีวิต การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียมีหลายวิธี ประกอบด้วย การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard)⁽³⁾

การตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา และการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี อนุชีววิทยา อย่างไรก็ตาม แต่ละวิธีมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันแต่ไม่ว่าการตรวจด้วยวิธีใดก็ตามล้วนแต่มีข้อจำกัดทั้งสิ้น การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์มีข้อดีคือสามารถจำแนกชนิดและระยะของเชื้อ รวมถึงประเมินความหนาแน่นของเชื้อในผู้ป่วยได้ และมีต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตาม ความแม่นยำของผลการตรวจขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญของผู้ตรวจที่ต้องผ่านการอบรมตามมาตรฐานและมีประสบการณ์สูง⁽⁴⁾ นอกจากนี้ ความหนาแน่นของเชื้อส่งผลโดยตรงต่อความแม่นยำในการวิเคราะห์ฟิล์มเลือด โดยเฉพาะในกรณีที่มีปริมาณเชื้อต่ำ⁽³⁾ การศึกษาพบว่าโดยทั่วไปพบว่าจุลทัศน์สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ความหนาแน่นตั้งแต่ 100 เซลล์ติดเชื้อต่อไมโครลิตร ในขณะที่ผู้เชี่ยวชาญที่ผ่านการรับรองจากองค์การอนามัยโลกสามารถตรวจพบได้ที่ความหนาแน่นต่ำถึง 5-10 เซลล์ต่อไมโครลิตร⁽⁵⁾ การตรวจหาแอนติเจนด้วยชุดตรวจเร็ว (Rapid Diagnostic Test; RDT) แม้จะมีความสะดวกและรวดเร็ว แต่ประสิทธิภาพการตรวจขึ้นอยู่กับความไวและความจำเพาะของแต่ละชุดตรวจ ตามรายงานการประเมินขององค์การอนามัยโลก จึงแนะนำให้เลือกใช้เฉพาะชุดตรวจที่ผ่านการรับรอง (WHO Pre-qualification)⁽⁶⁾ นอกจากนี้ RDT มีข้อจำกัดในการตรวจพบเชื้อ โดยต้องมีความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดงติดเชื้อไม่ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร⁽⁵⁾ การ

ตรวจด้วยวิธีอิมมูโนซีโรวิทยา แม้จะมีต้นทุนสูง แต่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์⁽⁷⁾ โดยสามารถตรวจพบเชื้อได้แม้มีความหนาแน่นต่ำเพียง 0.5-5 เซลล์ต่อไมโครลิตร⁽⁵⁾ ซึ่งเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองในพื้นที่ที่มีการแพร่เชื้อต่ำ⁽⁵⁾

ประเทศไทยมีอัตราป่วยด้วยโรคไข้มาลาเรียต่อประชากรพันคน (Annual Parasite Incidence; API) ต่ำกว่า 1 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 ส่งผลให้มีการปรับยุทธศาสตร์จาก 'การควบคุมโรค' เป็น 'การกำจัดโรคไข้มาลาเรีย' ในปี พ.ศ. 2558 โดยมีเป้าหมายกำจัดโรคให้สำเร็จภายในปี พ.ศ. 2567 โดยดำเนินโครงการกำจัดโรคไข้มาลาเรีย (Malaria eliminate) ซึ่งมีเป้าหมายเพื่อลดอุบัติการณ์ของการแพร่และยับยั้งการแพร่เชื้อมาลาเรีย ในขอบเขตที่กำหนด ลดการเกิดการแพร่เชื้อในพื้นที่ แต่ไม่ได้หมายรวมถึงไม่มีผู้ป่วยในพื้นที่หรือต้องทำลายยุงพาหะให้หมดจากพื้นที่ แต่หากมีผู้ป่วยมาลาเรียเข้ามาในพื้นที่ (Imported case) ต้องมีมาตรการที่ดีพอ เพื่อสามารถค้นหาผู้ป่วย ป้องกันและหยุดการแพร่เชื้อได้ โดยประเทศไทยมีเป้าหมายที่จะมุ่งสู่การกำจัดมาลาเรียให้สำเร็จในปี พ.ศ. 2567⁽⁸⁾ การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์และชุดตรวจอย่างรวดเร็วอาจตรวจได้ผลปลอมในกรณีที่ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียต่ำ การนำเทคนิคทางด้านอิมมูโนซีโรวิทยามาใช้ในพื้นที่ที่มีการแพร่เชื้อต่ำ (low-transmission area) จะเป็นประโยชน์ในการระบุพื้นที่แพร่โรคได้ดียิ่งขึ้น ช่วยให้การดำเนินการตามมาตรการการกำจัดโรคไข้มาลาเรียมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น⁽⁹⁾

แม้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเป็นวิธีมาตรฐานที่มีต้นทุนต่ำและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ประสิทธิภาพของการตรวจขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญของผู้ตรวจ แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากต้องอาศัยความเชี่ยวชาญของจุลทรรศน์กรในการตรวจหาและจำแนกชนิดเชื้อ และเทคนิคในการเตรียมและย้อมสีฟิล์มเลือด การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า วิธี PCR มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจจับการติดเชื้อแบบผสมและการจำแนกชนิดเชื้อ *P. malariae* เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ วิธี PCR, qPCR และ nested PCR ยังมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธี Immunochromatography⁽¹¹⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับ conventional PCR แม้จะมีความไวสูง แต่มีข้อจำกัดด้านระยะเวลาการตรวจและความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม⁽¹²⁾ ในขณะที่ qPCR สามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อได้โดยตรงจากสัญญาณการเรืองแสง ช่วยลดเวลาการตรวจลดความเสี่ยงการปนเปื้อน และให้ผลที่มีความไวและความ

จำเพาะสูง⁽¹³⁻¹⁸⁾

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียระหว่างวิธี qPCR กับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรีย 198 ราย จากโครงการเฝ้าระวังประสิทธิผลของยาต้านมาลาเรีย ในพื้นที่ระบาด 14 จังหวัดของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2563 เพื่อใช้ประโยชน์และเป็นข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาช่วยในการควบคุมและป้องกันการแพร่เชื้อมาลาเรีย ได้ดีขึ้น

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ลงทะเบียนรับตัวอย่างที่ส่งมาจากแต่ละพื้นที่ โดยคัดเลือกตัวอย่างตามเกณฑ์ดังนี้เป็นตัวอย่างที่มีทั้งการรายงานผลตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จากเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการในพื้นที่ และมีกระดาษกรองซับเลือดที่ได้เก็บตัวอย่าง ณ วันที่ผู้ป่วยเข้ารับการตรวจวินิจฉัย
2. เตรียมวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่จำเป็นในการตรวจวิเคราะห์ให้พร้อมใช้งาน
 - 2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี
 - กรรไกรสแตนเลสสำหรับตัดกระดาษกรอง
 - กระดาษทิชชู
 - หลอดทดลองขนาด 1.5 มล.
 - ที่วางหลอดทดลองขนาด 1.5 – 2.0 มล.
 - นาฬิกาจับเวลา
 - ถุงมือยางแบบไร้แป้ง
 - ไมโครปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 2, 20, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
 - Filter tip
 - Nuclease free water
 - หลอด real-time PCR ชนิดติดกันเป็น strip 8 หลอด ขนาด 200 ไมโครลิตร
 - Isofreeze PCR ack
 - ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม QIAasympyphony DSP DNA Kits (Qiagen, Hilden, Germany)
 - Primer (รายละเอียดในตารางที่ 1)
 - Probe (รายละเอียดในตารางที่ 2)
 - FastStart™ Essential DNA Probe Master (Roche diagnostics GmbH, Germany)

2.2 เครื่องมือ

- ตู้เย็น -20 °C
- Vortex mixer
- Centrifuge
- Heat Block
- Thermocycle (Bio-Rad CFX96)

3. เตรียมสารพันธุกรรม โดยการสกัด DNA ของเชื้อมาลาเรีย จากกระดาศกรองซับเลือด โดยใช้ชุดน้ำยา QIASymphony DSP DNA Kits (Qiagen, Hilden, Germany)

4. ตรวจสอบวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาสารพันธุกรรมของมาลาเรียด้วยวิธี qPCR Primer และ probe ที่ใช้ในการทดสอบหาชนิดของเชื้อมาลาเรีย ทั้ง 5 ชนิด สำหรับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovalae* และ *P. malariae* มีความจำเพาะต่อ บริเวณ ยีน 18S ribosomal DNA ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิด *P. knowlesi* มีความจำเพาะต่อบริเวณยีน 18S ribosomal RNA มีลำดับเบส ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 PCR primer ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด

ลำดับ	primer	ลำดับเบส (5'-3')	อ้างอิง
1	PF18sF	ATT GCT TTT GAG AGG TTT TGT TAC TTT	(19)
2	PF18sR	GCT GTA GTA TTC AAA CAC ATT GAA CTC AA	(19)
3	PV18sF	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TG	(20, 21)
4	PV18sR	AAT TTA CTC AAA GTA ACA AGG ACT TCC AAG	(20, 21)
5	PO18sF	CCG ACT AGG TTT TGG ATG AAA GAT TTT T	(19)
6	PO18sR	CAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA TAA	(19)
7	PM18sF	AGT TAA GGG AGT GAA GAC GAT CAG A	(19)
8	PM18sR	CAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA TAA	(19)
9	Plasmo1_PK	GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA	(22)
10	Plasmo2_PK	AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA	(22)

ตารางที่ 2 PCR probe ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด

ลำดับ	Probe	ลำดับเบส (5'-3')	อ้างอิง
1	PF18sP	FAM-CAT AAC AGA CGG GTA GTC AT-MGBNFQ	(19)
2	PV18sP	VIC-CGC ATT TTG CTA TTA TGT-MGBNFQ	(20, 21)
3	PO18sP	VIC-CGA AAG GAA TTT TCT TAT T-MGBNFQ	(19, 22)
4	PM18sP	FAM-ATG AGT GTT TCT TTT AGA TAG C-MGBNFQ	(19)
5	PKP	FAM-CTC TCC GGA GAT TAG AAC TCT TAG ATT GCT-QSY	(22,23)

ขั้นตอนการทำ qPCR ในแต่ละตัวอย่างจะทำแบบ Duplex qPCR โดยทำปฏิกิริยา 3 คู่ ได้แก่

- *P. falciparum* และ *P. vivax*
- *P. ovalae* และ *P. malariae*
- *P. knowlesi* และ *P. vivax*

ส่วนประกอบของหนึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยส่วนผสมดังตารางที่ 3 ใช้ DNA ของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับการตรวจด้วยวิธี qPCR จากศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการเป็นตัวอย่างควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจาก DNA และ RNA เป็นตัวอย่างควบคุมลบ จากนั้นนำสารที่เตรียมผสมเข้ากันดีแล้ว ไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ หรือ Thermal cycler รุ่น Bio-Rad CFX96 และใช้ PCR condition ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา qPCR

น้ำยา	ความเข้มข้น	ปริมาตร (μ l)
FastStart Taq DNA Polymerase Master Mix	2x	12.5
Forward Primer-1	20 μ M	0.375
Reverse Primer-1	20 μ M	0.375
Forward Primer-2	20 μ M	0.375
Reverse Primer-2	20 μ M	0.375
Probe-1	10 μ M	0.5
Probe-2	10 μ M	0.5
Nuclease-Free Water	-	8.0
DNA Template	-	2
Total		25

ตารางที่ 4 PCR condition

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Initial denature	95	10	1
2. Denature	94	1	35
3. Annealing	54	1	
4. Extension	72	2	
5. Final extension	72	1	1

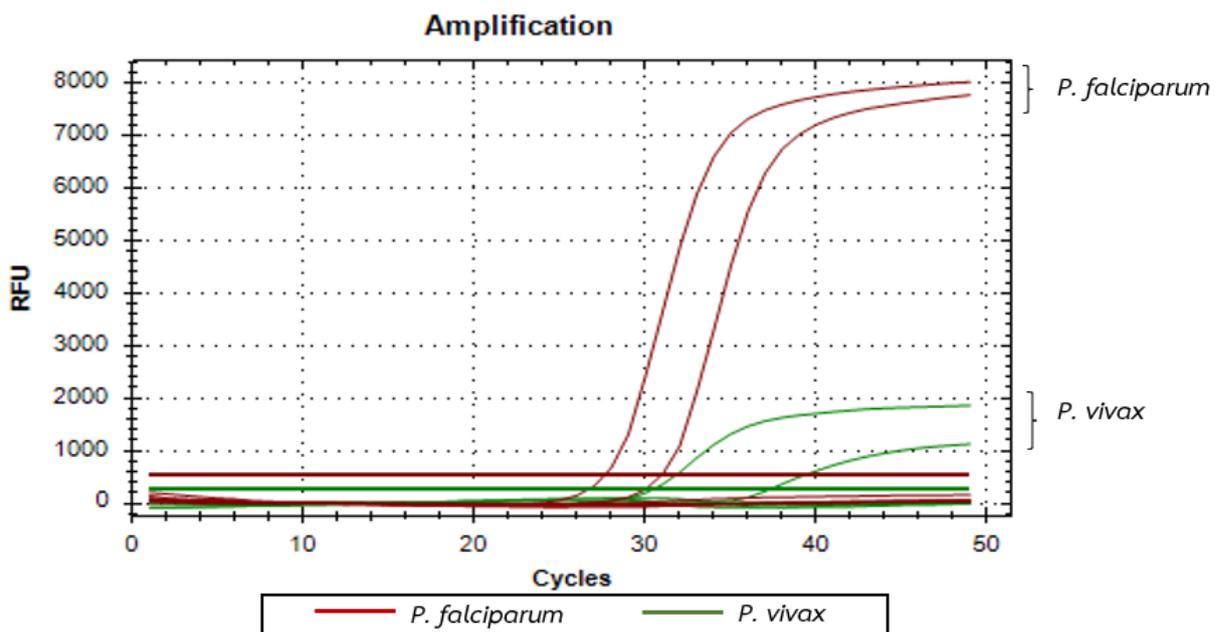
5. ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี qPCR
6. รวบรวมข้อมูลผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจด้วยวิธี qPCR เพื่อเปรียบเทียบผลของทั้งสองวิธี จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเพื่อหาค่าต่างๆดังนี้
 - 6.1 ความไวของการตรวจ (sensitivity)
 - 6.2 ความจำเพาะของการตรวจ (specificity)
 - 6.3 ความถูกต้อง (accuracy)
 - 6.4 Positive predictive value
 - 6.5 Negative predictive value

ผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี qPCR เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากกลุ่มตัวอย่างของผู้ป่วยมาลาเรีย จำนวนทั้งสิ้น 198 ตัวอย่าง จากการตรวจติดตามการรักษา เพื่อเฝ้าระวังประสิทธิภาพของยารักษามาลาเรีย (iDES) จากพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของไข้มาลาเรียในระหว่างปี พ.ศ. 2560 – พ.ศ. 2563 ใน 14 จังหวัด ได้แก่ ชลบุรี ตาก สุราษฎร์ธานี ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ยะลา นครศรีธรรมราช แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ พังงา ศรีสะเกษ และ อุบลราชธานี พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาในปี พ.ศ. 2561 มีจำนวนมาก

ที่สุด คือ 92 ตัวอย่าง (46.46%) ลำดับที่ 2 คือปี 2562 จำนวน 87 ตัวอย่าง (43.94%) ในปี 2560 และ 2563 มีจำนวน 13 และ 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 6.57% และ 3.03% ตามลำดับ ส่วนจำนวนตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษาได้ส่งมาจากจังหวัด 3 อันดับแรก คือ แม่ฮ่องสอน ตาก และ ยะลา (ตารางที่ 1)

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี qPCR ในตัวอย่าง โดยใช้ primer และ probe ตามผลงานวิจัยต่างๆ ที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ (ตารางที่ 1 และ 2) และใช้น้ำยาดังรายละเอียดที่แสดงในวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี การทดลองทำ duplex qPCR เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ และตรวจติดตามโดยใส่ primer และ probe ของยีนทั้งสองเชื้อในหลอดเดียวกัน ในน้ำยาปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส ในบัฟเฟอร์สำเร็จรูป FastStart Taq DNA Polymerase Master Mix (Roche diagnostics GmbH, Germany) ที่ primer แต่ละเส้นความเข้มข้น 20 μ M และตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 μ l ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermocycle (Bio-Rad CFX96) ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 10 นาที ตามด้วยการทำปฏิกิริยา 35 รอบที่ 94 °C นาน 1 นาที 54 °C 1 นาที 72 °C 2 นาที และที่ 72 °C 1 นาที ตรวจผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรม Bio-Rad CFX Maestro อ่านค่า Cycle threshold (Ct) โดยใช้ค่า cut-off ที่ Ct=40 (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงผล duplex qPCR ด้วยคู่ primer PF18sF และ PF18sR เพื่อตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* และคู่ primer PV18sF เพื่อตรวจหาเชื้อ *P. vivax*

เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี qPCR ในตัวอย่างทั้งหมด และเปรียบเทียบผลกับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีผลสอดคล้องกัน จำนวน 188 ตัวอย่าง (94.95%) ในตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อมีผลสอดคล้องกันทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

ส่วนตัวอย่างที่ผลไม่สอดคล้องกันมีจำนวน 10 ตัวอย่าง (5.05%) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าหนึ่งชนิด และการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. knowlesi* (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การตรวจเชื้อมาลาเรียและผลเปรียบเทียบความสอดคล้องระหว่างวิธีตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และการตรวจด้วยวิธี qPCR

ลำดับ	จังหวัด	ผลการตรวจ		ผลการเปรียบเทียบ		รวม
		กล้องจุลทรรศน์	qPCR	สอดคล้อง	ไม่สอดคล้อง	
1	แม่ฮ่องสอน	N=2 PV=64 PF=13 PF+PV=2	N=2 PV=64 PF=12 PF+PV=1 PF=1, PV=1	78	3	81
2	เชียงใหม่	PV=9 PF=1	PV=9 PF=1	10	0	10
3	เชียงราย	PV=14	PV=14	14	0	14
4	ตาก	N=4 PV=22 PF=2	N=4 PV=22 PF=2	28	0	28
5	ชลบุรี	PV=10	PV=10	10	0	10
6	ศรีสะเกษ	N=3	N=3	3	0	3
7	อุบลราชธานี	N=5	N=5	5	0	5
8	สุราษฎร์ธานี	PM=1	PK=1	0	1	1
9	ชุมพร	N=4 PM/PK=1 PM=1	N=4 PK=1 PK=1	4	2	6
10	ระนอง	PV=7	PV=6, PK=1	6	1	7
11	พังงา	N=1 PK=1	N=1 PK=1	2	0	2
12	นครศรีธรรมราช	PM=1	PK=1	0	1	1
13	ประจวบคีรีขันธ์	PV=2	PK=2	0	2	2
14	ยะลา	N=9 PV=17 PF=2	N=9 PV=17 PF=2	28	0	28
		รวม		188	10	198
		%		94.95	5.05	100.00

หมายเหตุ: N = No malaria parasite seen, PF = *P. falciparum*, PV = *P. vivax*, PM = *P. malariae*, PK = *P. knowlesi*

จากนั้นนำผลที่ได้มาแจกแจงในตาราง 6 เพื่อเปรียบเทียบผลบวกและผลลบเพื่อประเมิน แล้วนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความไวของการตรวจ (sensitivity) ความจำเพาะของการตรวจ (specificity) ความถูกต้อง (accuracy) Positive predictive value และ Negative predictive value (ตารางที่ 6) และมีวิธีการคำนวณดังแสดงต่อไปนี้

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี qPCR และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

Method		Microscopic		Total
		Positive	Negative	
qPCR	Positive	170 (a)	0 (b)	170 (a+b)
	Negative	0 (c)	28 (d)	28 (c+d)

จากตารางพบว่าให้ผลดังนี้

ผลบวกจริง (true positive; a) = 170

ผลบวกเท็จ (false positive; b) = 0

ผลลบเท็จ (false negative; c) = 0

ผลลบจริง (true negative; d) = 28

เมื่อนำค่ามาคำนวณ ได้ผลดังนี้

- ความไวของการตรวจ (sensitivity) = $[a/(a+c)] \times 100$
= $[170/(170+0)] \times 100$
= 100 %
- ความจำเพาะของการตรวจ (specificity) = $[d/(b+d)] \times 100$
= $[28/(0+28)] \times 100$
= 100 %
- ความถูกต้อง (accuracy) = $[(a+d) \times 100] / (a+b+c+d)$
= $[(170+28) \times 100] / (170+0+0+28)$
= $(198 \times 100) / 198$
= 100 %
- Positive predictive value = $[a/(a+b)] \times 100$
= $[170/(170+0)] \times 100$
= 100 %
- Negative predictive value = $[d/(c+d)] \times 100$
= $[28/(0+28)] \times 100$
= 100 %

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษานี้พบว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค qPCR เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีประสิทธิภาพสูงโดยมีความถูกต้อง ความไว และความจำเพาะร้อยละ 100 ผลการตรวจสอบสอดคล้องกันร้อยละ 94.95 (188 จาก 198 ตัวอย่าง) และพบผลไม่สอดคล้องร้อยละ 5.05 (10 ตัวอย่าง) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Coleman et al. (2006) (24) ที่พบว่า qPCR มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าร้อยละ 96 ในการตรวจเชื้อมาลาเรีย และการศึกษาของ Swan et al. (2005) (25) ได้รายงานความสามารถของ qPCR ในการตรวจจับการติดเชื้อแบบผสมได้ดีกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ Tan et al. (2022) (26) ได้รวบรวมผลการศึกษาที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้ qPCR และวิธีอื่นๆ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียชนิด *P. knowlesi* และเห็นว่าควรนำวิธี qPCR ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจที่มีประสิทธิภาพดีมาใช้จำแนกเชื้อ *P. knowlesi* จุดเด่นของการศึกษานี้คือความสามารถในการจำแนกการติดเชื้อชนิด *P. knowlesi* ได้ถึง 8 ตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถทำได้ด้วยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เนื่องจากความคล้ายคลึงทางสัณฐานวิทยากับเชื้อ *P. falciparum* และ *P. malariae* นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการติดเชื้อแบบผสมได้แม่นยำกว่าการศึกษานี้มีข้อจำกัดที่ควรพิจารณา ได้แก่ ข้อจำกัดด้านต้นทุนของการตรวจด้วยวิธี qPCR ที่สูงกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ระยะเวลาในการรายงานผลที่อาจนานกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความต้องการบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญและเครื่องมือเฉพาะ และข้อจำกัดในการเก็บและขนส่งตัวอย่างที่ต้องควบคุมอุณหภูมิ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะมีต้นทุนที่สูงแต่คาดว่าจะจะเป็นประโยชน์ในการนำวิธี qPCR มาใช้ในการเฝ้าระวังเชื้อชนิด *P. knowlesi* ในอนาคต ประเทศไทยมีเป้าหมายปลอดจากโรคไข้มาลาเรีย (Malaria elimination) ภายในปี พ.ศ. 2567 เพื่อสนับสนุนการดำเนินงานในการกำจัด การแพร่เชื้อมาลาเรียโดยไม่ให้มีผู้ติดเชื้อมาลาเรียที่ได้รับเชื้อภายในพื้นที่นั้นๆ (Indigenous case) จึงจำเป็นต้องมีมาตรการค้นหาเพื่อป้องกันการแพร่เชื้ออย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงควรนำเทคโนโลยี มาตรการที่เหมาะสมมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ การประยุกต์ใช้ qPCR ในระบบเฝ้าระวัง ใช้เป็นวิธีตรวจยืนยัน ในกรณีที่สงสัย การติดเชื้อแบบผสม ใช้ในการเฝ้าระวังเชื้อ *P. knowlesi* ในพื้นที่เสี่ยง ใช้ในการติดตามประสิทธิผลของการรักษา จัดตั้งเครือข่ายห้องปฏิบัติการ qPCR ในระดับภูมิภาค พัฒนาระบบการขนส่งตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพ ฝึกอบรมบุคลากร ให้มีความเชี่ยวชาญ

จัดสรรงบประมาณสำหรับการตรวจด้วย qPCR อย่างมีประสิทธิภาพ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียจึงมีประโยชน์เพื่อใช้เป็น ข้อมูลด้านระบาดวิทยาในการควบคุมและป้องกันการแพร่เชื้อ มาลาเรียได้ดีมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Cox-Singh J. Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*: , an emerging pathogen. 2012;25(5):530-6.
2. Thailand malaria elimination programme 2021 [cited 2021 20 may 2021]. Available from: http://malaria.ddc.moph.go.th/malariaR10/index_newversion.php.
3. World Health Organization. Microscopy for the detection, identification and quantification of malaria parasites on stained thick and thin blood films in research settings (version 1.0); procedure: methods manual.2015. [cited 2021 20 may 2021]. Available from: <https://fctc.who.int/resources/publications/i/item/2015-04-28-microscopy-for-the-detection-identification-and-quantification-of-malaria-parasites-on-stained-thick-and-thin-blood-films-in-research-settings>.
4. Maguire JD, Lederman ER, Barcus MJ, O'Meara WAP, Jordan RG, Duong S, et al. Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching, testing and quality assurance during an era of declining diagnostic proficiency. 2006;5(1):1-8.
5. Zimmerman PA, Howes REJ Coiid. Malaria diagnosis for malaria elimination. 2015;28(5):446-54.
6. WHO. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016–2018)2018. 157 p.
7. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic Infection in *Plasmodium falciparum*-Endemic Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. The Journal of Infectious Diseases. 2009;200(10):1509-17.
8. สำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง. ยุทธศาสตร์การกำจัดโรคไข้มาลาเรียประเทศไทย พ.ศ. 2560-25692559. 106 p.

9. WHO. Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings September 2014. 2014:13.
10. Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KCSA, Oliveira AM, Ferreira SRS, Boulos MJRdIdMTdSP. PCR-based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. 2004;46(4):183-7.
11. Lima GF, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MCA, Segurado AA, Hristov AD, et al. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. 2011;106(6):691-700.
12. Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JJTajotm, hygiene. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. 2002;66(5):503-8.
13. Blessmann J, Buss H, Nu PAT, Dinh BT, Ngo QTV, Van AL, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. 2002;40(12):4413-7.
14. Bretagne SJCM, Infection. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. 2003;9(6):505-11.
15. Farcas GA, Zhong KJ, Mazzulli T, Kain KCJJoCM. Evaluation of the Real Art Malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. 2004;42(2):636-8.
16. Limor JR, Lal AA, Xiao LJJoCM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. 2002;40(7):2335-8.
17. Lin M-H, Chen T-C, Kuo T-t, Tseng C-C, Tseng C-PJJoCM. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. 2000;38(11):4121-5.
18. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. 2004;42(3):1214-9.
19. Taylor SM, Juliano JJ, Trottman PA, Griffin JB, Landis SH, Kitsa P, et al. High-throughput pooling and real-time PCR-based strategy for malaria detection. 2010;48(2):512-9.
20. Veron V, Simon S, Carne BJE. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. 2009;121(4):346-51.
21. WangB, HanS-S, ChoC, HanJ-H, ChengY, LeeS-K, et al. Comparison of microscopy, nested-PCR, and Real-Time-PCR assays using high-throughput screening of pooled samples for diagnosis of malaria in asymptomatic carriers from areas of endemicity in Myanmar. 2014;52(6):1838-45.
22. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton KJJocm. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. 2004;42(12):5636-43.
23. Divis PC, Shokoples SE, Singh B, Yanow SKJMj. A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. 2010;9(1):1-7.
24. Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum*/*vivax* endemic area in Thailand. *Malar J*. 2006;5:121.
25. Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Krudsood S, Leowattana W, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;73(5):850-4.
26. Tan JH, Lau YL. Diagnostic methods for *Plasmodium knowlesi*: performance, limitations and recommendations. *Diagnostics and Therapeutics*. 2022:13-24.