รายงานปริทัศน์ (Review Articles)

การประเมินและเฝ้าระวังการดื้อของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรีย

Monitoring of malaria drug resistance

วรรณา ชัยเจริญกุล
โครงการบัณฑิตศึกษาสาขาชีวเวชศาสตร์
คณะสหเวชศาสตร์ ม. ธรรมศาสตร์

Wanna Chaijaroenkul
Graduate Program in Biomedical Sciences,
Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University

บทคัดย่อ

ปัญหาเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมดื้อต่อยาต้านมาลาเรียเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย การประเมินและเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมมาลาเรียในประเทศไทย การติดตามการรักษาโดยศึกษาการตอบสนองของผู้ป่วยเป็นนโยบายที่สำคัญในการประเมินการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งจะทำควบคู่ไปกับการติดตามความไวของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน การศึกษาความไวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์นั้นมีความยุ่งยากหลายประการ เสียเวลาและต้องใช้แรงงานมากจึงไม่ค่อยเหมาะในการนำมาใช้ศึกษาติดตามเชื้อมาลาเรียดื้อยาจำนวนมากๆ ทำให้การพัฒนาวิธีการวัดความไวในรุ่นถัดมาจะมุ่งเน้นไปที่สะดวกรวดเร็วและลดแรงงานลง วิธีการศึกษาความไวโดยใช้สารรังสี เป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับแต่การใช้สารรังสีก็เป็นอันตรายและยุ่งยากกว่าปกติ ทำให้ห้องปฏิบัติการทั่วๆ ไปไม่สามารถทำตามวิธีนี้ได้ ส่วนวิธีที่เริ่มพัฒนามาใหม่ในช่วงทศวรรษนี้ จะเน้นการใช้สารที่ปลอดภัยเช่นสาร monoclonal antibody ที่จำเพาะกับการวัดสาร HRP2 หรือการใช้สารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์ เป็นต้น วิธีวัดความไวที่เพิ่งพัฒนาใหม่นี้ ยังจะต้องศึกษาเปรียบเทียบความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของผลการทดสอบ ซึ่งพบว่าระยะเวลาในการเพาะเชื้อและชนิดของยามีผลต่อค่าความไว ดังนั้นการเลือกวัดค่าความไวจะต้องระวังปัจจัยดังกล่าวด้วย ส่วนการติดตามเฝ้าระวังจีนดื้อยาก็มีความสำคัญด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ประเทศไทยและตามชายแดนของไทยนั้น พบแนวโน้มการดื้อต่อยาอาร์ติซูเนตและเมฟโฟลควิน โดยพบความเปลี่ยนแปลงของยีนที่สำคัญ คือ ยีน *pfcrt*, *pfmdr1* และ *pfatp6* โดยเฉพาะการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* แต่ในบางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์กับยีนดังกล่าว ทำให้มีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะศึกษาการดื้อยาในระดับอณูพันธุกรรม

Abstract

Drug resistance falciparum malaria is a major health problem in Thailand. To deal with this problem, monitoring of parasite drug susceptibility is the important process. The *in vivo* response is an important strategy to evaluate the efficacy of antimalairal drug, altogether with the *in vitro* test. There are many methods to perform the susceptibility test, the microscopic method is not suitable to do in field study due to many limitations such as laborious and time consuming method. Therefore the next development methods will get rid of this weak point. The radioisotope assays had been developed and allow performing susceptibility with several cases. How ever the major limitation of this method is using the radio-compound. Concerning the risk of using radio-compound, the next generation of susceptibility method is modifying by change to safety substance such as HRP2 or fluorescence. These new methods will be needed the validation of test results. The factors that might be affected the result are incubation time and the type of antimalarials. The previous report of drug resistance malaria along Thai borders showed a markedly of treatment failure from the present regimen (artesunate-mefloquine). The molecular basis of *pfcrt*, *pfmdr1* and *pfatp6* have been reported to correlate with treatment failure especially the increased copy number of *pfmdr1*. However, these data is controversial and need more evidences.

มาลาเรียและสถานการณ์โรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของโลกโดยเฉพาะในประเทศไทย ซึ่งส่งผลกระทบต่อสาธารณสุขและเศรษฐกิจและสังคม จากรายงานขององค์การอนามัยโลก ในปี พ.ศ. 2545 พบว่ามีประชากรจำนวน 300-500 ล้านคนติดเชื้อมาลาเรีย และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 1.5 ล้านคนต่อปี[1] สำหรับประเทศไทยนั้นสถานการณ์โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียบริเวณชายแดนไทยพม่า และไทยกัมพูชา[2] มาลาเรียในประเทศไทยส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อฟัลซิพารัม *(Plasmodium falciparum)* และไวแวกซ์ *(Plasmodium vivax)* โดยพบในอัตราส่วนที่เท่ากัน คือ ร้อยละ 50 แต่ฟัลซิพารัมมาลาเรียจะมีความรุนแรงมากกว่า เพราะอาจทำให้เสียชีวิตได้เนื่องจากภาวะแทรกซ้อน และภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง ส่วนเชื้อไวแวกซ์นั้นผู้ป่วยสามารถเกิดไข้กลับ (relapse) ได้ เนื่องจากเชื้อในตับ (hypnozoite) จะออกมาสู่กระเลือดภายหลัง

ปัจจุบันนี้ปัญหาสำคัญของโรคมาลาเรียในประเทศไทยคือ ปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ซึ่งพบว่ามีเชื้อดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิด (multidrug resistance) นโยบายการใช้ยาต้านมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในปัจจุบันของไทยจะใช้ยาร่วมกันระหว่างยาเมฟโฟลควินและยาอาร์ติซูเนต[3] ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพของยาสูตรนี้

สูงมาก ยาสูตรนี้ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้ออย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ และความปลอดภัยสูงมาก ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะยังไม่มีหลักฐานใดๆ ที่แสดงว่าเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมดื้อต่อยากลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามพบว่า มีรายงานการเปลี่ยนแปลงความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียต่อยาสูตรนี้ในบริเวณชายแดนไทยพม่า และไทยกัมพูชา[4,5,6,7,8]

ในปี 2005 จากการติดตามผลการรักษามาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่จังหวัดตราด พบว่าอัตรารักษาหายขาด ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 78[(8)] และต่อมาก็มีรายงานว่าประสิทธิภาพของยาลดลงในพื้นที่ชายแดนไทย-กัมพูชา โดยพบว่าอัตรารักษาหายในปี 2002 เท่ากับร้อยละ 86.7 และในปี 2004 ลดลงเหลือร้อยละ 79[9] จากการศึกษารูปแบบการออกฤทธิ์ของยาสูตรนี้ต่อการกำจัดเชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วย (parasite clearance time) จะพบว่าระยะเวลาที่จะกำจัดเชื้อให้หมดจากกระแสเลือดจะนานขึ้น สิ่งเหล่านี้ เป็นข้อมูลพื้นฐานที่อาจจะบ่งชี้ถึงการดื้อยาสูตรนี้ ดังนั้นการเฝ้าระวังการดื้อยาจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จำเป็นอย่างเร่งด่วนในการติดตามประสิทธิภาพของยาสูตรนี้

การประเมินและเฝ้าระวังการดื้อของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรีย (Monitoring of drug resistance)

การพิสูจน์ว่าเชื้อดื้อยาหรือไม่นั้นจะต้ององค์ประกอบที่สำคัญ 4 ส่วน คือ ปัจจัยทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ผลการตอบสนองของผู้ป่วย (*in vivo* response) การประเมินความไวของเชื้อต่อยาในหลอดทดลอง (*in vitro* sensitivity test) และปัจจัยทางอณูชีววิทยาระดับพันธุกรรมของเชื้อ (drug resistance genes)

การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic)

การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดซึมยา (absorption) การกระจายตัวของยา (distribution) การเปลี่ยนแปลงยา โดยตับ (metabolism/biotransformation) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้มีผลต่อระดับยาต้านมาลาเรียในกระแสเลือดของผู้ป่วย โดยทั่วไปนั้นการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์มีความยุ่งยาก และต้องอาศัยความร่วมมือจากผู้ป่วยเป็นส่วนใหญ่ เพราะจะต้องเจาะเลือดเพื่อวัดระดับยาเป็นระยะๆ และการวัดระดับยาจะต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ และห้องปฏิบัติที่มีอุปกรณ์จำเพาะ คือ เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งทำให้ปัจจัยทางด้านเภสัชจลนศาสตร์มีผู้ศึกษาน้อยมาก อย่างไรก็ตาม ข้อมูลระดับยาของผู้ป่วยจะเป็นข้อมูลสำคัญที่บ่งบอกว่าเชื้อมาลาเรียดื้อต่อยาหรือไม่ เพราะการรักษาล้มเหลวนั้นอาจจะเกิดจากระดับยาของผู้ป่วยต่ำกว่าระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้[10] จะเห็นได้ว่าการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์มีความจำเป็นที่ต้องทำควบคู่ไปกับการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ด้วย

การศึกษาผลการตอบสนองของผู้ป่วยต่อยาต้านมาลาเรีย (*in vivo* response)

การศึกษาผลการตอบสนองของผู้ป่วยจะใช้เกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกและติดตามการพบเชื้อกลับในผู้ป่วยเป็นเวลา 28-42 วัน[11] ซึ่งในส่วนของประเทศไทยนั้น ก็ได้ดำเนินการเฝ้าระวังการดื้อของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม โดยใช้วิธีการประเมินประสิทธิภาพของยาในผู้ป่วย (*in vivo* test) ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก นอกจากนี้ยังทำควบคู่กับการประเมินความไวของเชื้อในหลอดทดลอง (*in vitro* test)

การติดตามผู้ป่วยจะศึกษาติดตามการพบเชื้อมาลาเรียในระยะเวลา 42 วันหลังจากการให้ยา ซึ่งตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก จะแบ่งการตอบสนองของผู้ป่วยออกเป็น 4 ระดับดังนี้[11]

1. S (Sensitive) หมายความว่า ภายหลังการรักษา 48 ชั่วโมง ระดับเชื้อมาลาเรียลดลงไม่น้อยกว่าร้อยละ 25 จากปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในวันแรก และตรวจไม่พบเชื้อเลยหลังจากการรักษาในวันที่ 7 จนกระทั่งจบการศึกษาติดตาม

2. RI (Low grade resistance) พบการลดลงของเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง แต่ตรวจพบเชื้อภายหลังการรักษาวันที่ 7

3. RII (High grade resistance) พบการลดลงของเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง โดยพบเชื้อลดลงน้อยกว่าร้อยละ 25 แต่ตรวจพบเชื้อในช่วง 7 วันหลังการรักษา

4. RIII (High grade resistance) เชื้อมาลาเรียไม่ได้ลดจำนวนลงภายหลังการรักษา

การติดตามผลการตอบสนองของผู้ป่วย สำหรับการรักษาเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมนั้น ภายหลังเมื่อตรวจพบเชื้อมาลาเรียแล้ว จะต้องทำการตรวจพิสูจน์ทางด้านอณูชีววิทยาเพื่อจำแนกว่าเป็นการติดเชื้อใหม่ (re-infection) หรือเป็นเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาและอยู่ในกระแสเลือดตลอดตั้งแต่เริ่มการรักษา (recrudescence)[11]

สำหรับการติดตามผู้ป่วย เมื่อได้รับยาเมฟโฟลควินและอาร์ติซูเนตนั้น พบว่าเวลาในการกำจัดเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดช้าขึ้น ซึ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเวลาที่กำจัดเชื้อนั้น ก็เป็นข้อมูลพื้นฐานแสดงถึงการดื้อต่อยาได้[12]

ข้อจำกัดที่สำคัญสำหรับการติดตามผู้ป่วยนั้น คือ เรื่องเวลาและตัวผู้ป่วย ทั้งนี้การติดตามผู้ป่วยเป็นระยะเวลานานถึง 42 วันนั้น ค่อนข้างเป็นไปได้ยาก โดยส่วนมากจะติดตามผู้ป่วยได้เพียงแค่ 28 วันเท่านั้น หากนานกว่านั้นผู้ป่วยมักจะไม่ให้ความร่วมมือ

การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรียในหลอดทดลอง (*in vitro* test)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านมาลาเรียในหลอดทดลองเป็นวิธีมาตรฐานอย่างหนึ่งที่ใช้ติดตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากสะดวกและรวดเร็ว วิธีนี้ได้มีการพัฒนาขึ้นและใช้ได้ผลดีในเชื้อฟัลซิพารัม การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมในหลอดทดลองมีหลากหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. การประเมินความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียด้วยวิธี Schizont maturation inhibition

โดยวิธีดั้งเดิมนั้นจะใช้หลักการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไปสู่ระยะไชซอนต์ (schizont maturation inhibition)[13] วิธีนี้ค่อนข้างสะดวกและง่าย เพราะไม่ได้ใช้อุปกรณ์และสารเคมีราคาแพง และสามารถประเมินความไวในพื้นที่ระบาด และแม้แต่ในกรณีที่มีเชื้อระดับต่ำๆ โดยปกติจะเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะสั้นภายในเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น เมื่อครบกำหนดเวลาก็นำมาทำฟิล์มเลือดแบบหนา (thick smear) แล้วจึงนับปริมาณไชซอนต์เทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับยา ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะง่ายมาก แต่การอ่านและวิเคราะห์ผลจะขึ้นอยู่กับความชำนาญ

ของผู้วิจัยเป็นหลัก ความผันผวนของผลวิจัยสืบเนื่องมาจากความเชี่ยวชาญในการดูลักษณะรูปร่างของเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์ และข้อเสียที่สำคัญของวิธีนี้คือ เสียเวลาและใช้แรงงานมากในการอ่านผล นอกจากนี้วิธีนี้ยังมีจุดอ่อนที่สำคัญคือช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างสั้น ทำให้การประเมินผลความไวของยาบางชนิดที่ออกฤทธิ์ช้า เช่น ยาไพริเมทธามีน (pyrimethamine) คลาดเคลื่อนได้

2. การประเมินความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียด้วยวิธี Hypoxanthine assay

ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 Desjardins และคณะ[14] พัฒนาวิธีใหม่เพื่อประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียได้เร็วขึ้น โดยใช้สารรังสีไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) เป็นสารที่วัดการเจริญของเชื้อ โดยสารนี้จะเข้าไปร่วมในการสร้างสายดีเอ็นเอเมื่อเชื้อเจริญเติบโต ดังนั้นถ้ายาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ระดับค่ารังสีก็จะลดลง วิธีการนี้รวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือสูง ซึ่งในปัจจุบันถือว่าเป็นวิธีการอ้างอิงสำหรับการวัดความไว อย่างไรก็ตามการวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องการใช้สารรังสีที่ค่อนข้างอันตรายและต้องการใช้อุปกรณ์ราคาแพง ในการวัดอีกทั้งต้องมีการตรวจรับรองห้องปฏิบัติการเพื่อขออนุญาตใช้สารรังสีอีกด้วย นอกจากนี้ปริมาณเชื้อมาลาเรียตั้งต้นก็ควรอยู่ในระดับที่สูงพอควรด้วย (ควรมากกว่า 0.5%) ความยุ่งยากของการใช้สารรังสีที่กล่าวมาในข้างต้น ทำให้ในปัจจุบันนี้มีการพัฒนาวิธีการวัดความไวในรูปแบบอื่นขึ้นมาเพื่อทดแทนการใช้สารรังสี เช่น การวัดความไวด้วยวิธีอีไลซ่า (Enzyme linked immunosorbent assays; ELISA) และสารเรืองแสง (fluorescent assay) เป็นต้น

3. การประเมินความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียด้วยวิธี ELISA

การวัดความไวด้วยวิธี ELISA นั้นมีการพัฒนามา 2 วิธีด้วยกันคือ การวัดระดับสาร histidine rich protein 2 (HRP2)[15,16] และการวัดสาร lactate dehydrogenase protein (pLDH)[17] ทั้งสองวิธีนี้จะวัดระดับสารดังกล่าวที่เชื้อมาลาเรียหลั่งออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งระดับสารจะเป็นสัดส่วนกับการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่วิธีการวัดด้วย ELISA นั่นจะต้องอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะกับสารที่ต้องการวัด (monoclonal antibody)

- Lactate dehydrogenase (pLDH): สารนี้เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการ Embden-Meyerhof หรือไกลโคไลซิส (glycolysis) ของเชื้อมาลาเรีย[17] แต่เดิมนั้นจะใช้สารนี้ในการตรวจพิสูจน์เชื้อมาลาเรีย[18] ในช่วงแรกนั้นการวัดความไวของเชื้อจะประเมินจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ pLDH ซึ่งจะทำการเปลี่ยนสี tetrazolium ให้เป็น formazan ซึ่งมีสีฟ้าและสามารวัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมีทรี (spectrophotometry) ซึ่งการเปลี่ยนสีนี้จำเป็นต้องใช้เชื้อในปริมาณสูงประมาณ 1-2% ซึ่งไม่เหมาะสมหากนำไปประเมินความไวในพื้นที่ระบาดของมาลาเรีย[19] ต่อมามีการพัฒนาวิธีการวัดเอนไซม์ pLDH จากเชื้อมาลาเรียโดยใช้ double-site enzyme-linked LDH immunodetection (DELI) ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดระดับ pLDH โดยอาศัย monoclonal antibody เข้ามาช่วย[20]

- Histidine rich protein 2 (HRP2): วิธีนี้จะคล้ายกับวิธีการวัดความไวจาก pLDH สาร HRP2 เป็นแอนติเจนสำคัญที่ใช้พิสูจน์เชื้อมาลาเรีย

การทดสอบความไวด้วยวิธีนี้จะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาที่นานประมาณ 72 ชั่วโมง ซึ่งจะแตกต่างจากวิธีอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 24 หรือ 48 ชั่วโมง ข้อดีของวิธีวัดความไวนี้คือ สะดวกและเชื่อถือได้[15] แต่จุดอ่อนอย่างหนึ่งคือเรื่องของการสังเคราะห์สาร monoclonal antibody ซึ่งค่อนข้างราคาแพง ถึงแม้ว่าจะมีสามารถหาซื้อได้ง่ายก็ตาม

4. การประเมินความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียด้วยวิธีสารเรืองแสง

สำหรับการวัดความไวของเชื้อด้วยวิธีสารเรืองแสงนั้น สารเรืองแสงเช่น SYBR นั้นจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอของเชื้อทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น ซึ่งปริมาณการเรืองแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเจริญเติบโต[21, 22, 23] การวัดสารเรืองแสงเป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ต้องระวังเรื่องของสัญญาณรบกวนด้วย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Bennett และคณะ พบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I นั้นจะจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียเท่านั้น ทั้งนี้เพราะในเม็ดเลือดแดงไม่มีกรดนิวคลีอิก

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวัดความไวของเชื้อมาลาเรีย

ในปัจจุบันการศึกษาความไวโดยวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์นั้นลดน้อยลง ผู้วิจัยส่วนใหญ่นำเอาเทคนิคใหม่ๆ มาใช้วัดความไวของเชื้อมาลาเรียเพื่อความสะดวกรวดเร็ว และเปลืองแรงงานน้อยที่สุด แม้ว่าการใช้สารรังสีจะเป็นวิธีมาตรฐาน แต่การนำไปใช้ยังบริเวณระบาดหรือที่ห่างไกลชุมชนยังไม่เป็นที่แพร่หลาย และวิธีนี้ก็มีต้นทุนค่อนข้างสูงด้วย ดังนั้น การวัดความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียในบริเวณระบาดมักจะนำเอาเทคโนโลยีการวัด โดยใช้ ELISA และสารเรืองแสงเข้ามาแทนที่

ทั้งสองวิธีนี้กำลังเป็นที่กล่าวถึงกันอย่างแพร่หลายในแวดวงของนักวิจัยที่ติดตามการดื้อยาของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรีย โดยเฉพาะความน่าเชื่อถือของการวัดระดับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ร้อยละ 50 (Inhibition concentration at 50%; IC_{50}) พบว่ามีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างความไวของเชื้อมาลาเรียโดยใช้ HRP 2 กับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าทั้งสองวิธีนี้มีความใกล้เคียงกันมาก ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าวิธีการวัดระดับ HRP II นั้นจะใช้ทดแทนการศึกษาความไวด้วยสารรังสีได้[24]

สำหรับการศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียโดยใช้สารเรืองแสงนั้นเริ่มมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีใช้สารเรืองแสง (SYBR Green I) กับวิธีการใช้สารรังสีของ Rason และคณะในปี 2008 นั้นพบว่าวิธีการใช้สาร SYBR Green I วัดความไวต่อเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียที่เก็บมาจากผู้ป่วย จำนวน 138 ราย ให้ผลความไวที่เหมือนกับวิธีการวัดด้วยสารรังสี ค่า IC_{50} ของทั้งสองวิธีมีความใกล้เคียงกันมา โดยพบว่าค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นใกล้เคียงเส้นตรงมาก ($r2 = 0.93$)[25] จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการศึกษาความไวด้วยสารเรืองแสงสามารถนำมาใช้วัดกับเชื้อมาลาเรียที่เก็บจากพื้นที่ระบาดได้ นอกจากนี้การศึกษาของ Bacon และคณะแสดงให้เห็นว่าการวัดความไวด้วยวิธี HRP2 และ SYBR Green I เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่เวลา 72 ชั่วโมงภายหลังการได้รับยาแล้วนั้น ค่า IC_{50} ของยามาตรฐานคลอโรควิน (chloroquine) เมฟโฟลควิน (mefloquine) และควินีน (quinine) ของทั้งสองวิธีนั้นใกล้เคียง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาในการเพาะเชื้อจะมีผลต่อค่า IC_{50} อีกด้วย[26]

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบข้อมูลทั่วไปของวิธีการวัดความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียในหลอดทดลอง

	Microscope	Isotopic	ELISA (HRP2)	SYBR Green I
ความไวในการทดสอบ	สูง	ปานกลาง	สูง	สูง
เวลาในการเพาะเลี้ยง	24 ชม.	42-72 ชม.	48-72 ชม.	48-72 ชม.
หลักในการวัดความไว	ศึกษาการพัฒนาเชื้อไปสู่ระยะไชซอนท์	สารรังสีเข้าไปร่วมกับสายดีเอ็นเอ	วัดสาร HRP2 ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ	สารเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอและเรืองแสงออกมา
ความต้องการอุปกรณ์ที่พิเศษ	น้อย	สูง	ปานกลาง	สูง
การสิ้นเปลืองแรงงาน	มาก	น้อย	น้อย	น้อย

ผลการเปรียบเทียบวิธีการวัดความไว 4 วิธีนั้น แสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าการนำวิธีการวัดด้วย ELISA และสารเรืองแสงไปประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียเป็นอีกหนทางหนึ่งที่ช่วยให้การวัดความไวสะดวกและง่ายขึ้นมาก แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงการนำผลหรือค่า IC_{50} ของวิธีการวัดความไวที่แตกต่างกันมาเปรียบเทียบกัน

และเมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวัดความไว ชนิดของยาต้านมาลาเรีย และเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงจากการศึกษานี้นักวิจัยพบว่ายาแต่ละชนิดจะมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ยาที่ออกฤทธิ์ช้า ถ้ามีการเพาะเลี้ยงน้อยเกินไปจะทำให้ได้ค่า IC_{50} ไม่เป็นไปตามความเป็นจริง ยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียในรุ่นถัดมาของวงจรชีวิต ทำให้การวิเคราะห์ความไวของยากลุ่มนี้จะต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานกว่าปกติ[27, 28] และผลความไวในแต่ละวิธีของการทดสอบแสดงให้เห็นว่าวิธีการวัดด้วยสารรังสี (Hypoxanthine) ให้ผลดีที่สุดและเชื่อถือได้ไม่ว่าจะเพาะเชื้อเป็นเวลา 48, 72 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้นก็ตาม แต่การวัดความไวด้วยสาร SYBR Green I ต่อยากลุ่ม antibiotics และยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อมาลาเรีย จะต้องระมัดระวังเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะต้องนานกว่าปกติอย่างน้อยก็ต้องเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการวัดความไวด้วยวิธี ELISA HRP2 แต่สำหรับการวัดความไวด้วยวิธี pLDH นั้นพบว่ามีความน่าเชื่อถือต่ำกว่าวิธีอื่นๆ[29]

โดยสรุปนั้น การทดสอบความไวของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียด้วยวิธีแตกต่างกัน ผลความไวหรือค่า IC_{50} จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสภาวะเวลาและชนิดของยาที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไวของยาด้วยวิธีการใช้สารรังสีเป็นวิธีมาตรฐานและให้ผลดีที่สุด แต่มีจุดอ่อนเรื่องสารรังสีและอุปกรณ์ที่พิเศษ ส่วนการวัดด้วยสารเรืองแสงเช่น SYBR Green I และการใช้เทคนิค ELISA วัดระดับ HRP2 เป็นทางเลือกที่น่าสนใจ และให้ผลที่สอดคล้องกับการทดสอบด้วยสารรังสี แต่ต้องระวังเรื่องระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผลต่อค่าความไวและชนิดของยาที่ออกฤทธิ์ช้าจะต้องมีการปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือต่อไป และสามารถนำมาเปรียบเทียบค่าความไวระหว่างห้องทดลองได้

การศึกษาปัจจัยทางอณูชีววิทยาระดับพันธุกรรมของเชื้อ (drug resistance genes)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการศึกษาถึงลักษณะการดื้อยาของเมฟโฟลควิน ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ซึ่งจะมีการดื้อข้าม (cross resistance) ระหว่างยาเมฟโฟลควิน ฮาโลแฟนทริน และควินินกลไกการดื้อต่อยามฟโฟลควินในระดับชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่าขึ้นอยู่กับยีน *pfmdr1* ยีนนี้มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยาเมฟโฟลควินทั้งเชื้อที่เลี้ยงในห้องทดลอง และเชื้อที่แยกได้จากการศึกษาผู้ป่วยในพื้นที่ระบาด[30, 31, 32] Wilson และคณะ ศึกษาเชื้อที่เลี้ยงในห้องทดลองพบว่าเชื้อที่มีจำนวนชุด (copy number) ของยีน *pfmdr1* มากขึ้น (amplification) จะมีความสัมพันธ์กับการลดลงของการตอบสนองต่อยาเมฟโฟลควิน หลังจากนั้นได้มีการทดสอบเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก็พบความสัมพันธ์นี้เช่นกัน ถึงแม้ว่าการศึกษาในประเทศไทย โดย Price และคณะ พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่แสดงการดื้อต่อยาเมฟโฟลควิน ส่วนหนึ่งเท่านั้นที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* ความสัมพันธ์นี้ได้มีการยืนยันโดยการทดลองทำให้เชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมดื้อต่อเมฟโฟลควินในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* selection for mefloquine resistance) พบว่าเชื้อเหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* มากขึ้น[33, 34] อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรีย ประเทศไทย ทั้งที่ทำโดย Price และคณะ และ Chaiyaroj และคณะพบเชื้อที่ดื้อต่อยาเมฟโฟลควิน บางสายพันธุ์มียีน *pfmdr1* ชุดเดียว นอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อที่ทำให้ดื้อต่อเมฟโฟลควิน บางสายพันธุ์ที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับที่พบในการทดลองที่ทำให้เชื้อดื้อต่อฮาโลแฟนทริน (*In vitro* selection for halofantrine resistance) เชื้อนี้แสดงลักษณะดื้อข้ามต่อเมฟโฟลควิน และไม่พบการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* เมื่อเทียบกับเชื้อตั้งต้น[35] ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อเหล่านี้อาจมีกลไกการดื้อยาอื่นๆ อย่างไรก็ตามกลไกอื่นที่เชื่อว่ามีผลทำให้เชื้อดื้อยาเมฟโฟลควิน ในปัจจุบันยังคงมีความเกี่ยวข้องกับยีน *pfmdr1* กล่าวคือ เชื้อที่มีลักษณะของยีนเป็น wild type จะดื้อต่อยากลุ่มนี้มากกว่าเชื้อที่มีลักษณะยีนที่กลายพันธุ์[36, 37] ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* เท่าที่พบในปัจจุบันมีเพียง 2 ลักษณะ คือ K1-type ซึ่งพบในทวีปเอเชียและอัฟริกาและ 7G8-type ซึ่งพบในทวีปอเมริกาใต้[38] โดยการกลายพันธุ์แบบ K1-type จะมีการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 86 จาก Asn เป็น Tyr ในขณะที่การกลายพันธุ์แบบ 7G8-type จะมีการเปลี่ยนแปลงของ amino acid 4 ตำแหน่งร่วมกัน คือ 184 (Tyr เป็น Phe), 1034 (Ser เป็น Cys), 1042 (Asn เป็น Asp) และ 1246 (Asp เป็น Tyr) การพบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ในประเทศไทยพบเฉพาะแบบ K1-type ซึ่งถูกยืนยันโดยการศึกษาของ Chaiyaroj และคณะ และ Mungthin และคณะ ถึงแม้ว่าเชื้อสายพันธุ์ไทยบางสายพันธุ์จะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 184, 1034, 1042 และ 1246 แต่ก็พบในอัตราส่วนที่ต่ำมากและไม่เคยพบร่วมกัน ซึ่งเป็นลักษณะของการกลายพันธุ์แบบ 7G8-type นอกจากนี้การกลายพันธุ์เฉพาะจุดทั้ง 4 จุดนี้ไม่เคยพบว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยาในเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย[32,39] การทดลองโดยใช้ระบบ Transfection ในเชื้อ *P. falciparum* พบว่าเมื่อมีการถ่ายทอดจีน *pfmdr1* ชนิด wild type ที่ตำแหน่ง 1034, 1042 และ 1246 จะทำให้เชื้อดื้อต่อเมฟโฟลควินมากขึ้น[37]

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของจีน *pfmdr1* กับผลการศึกษาแบบ *in vivo* ของยากลุ่มควิโนลีน

Genotype	Associated phenotypes	Relative risk (*adjusted hazard ratio)
Pfmdr1 amplification	Mefloquine failure	6.3*
	Mefloquine-artesunate failure	5.4*
	4-dose lumefantrine-artemether failure	3.2
Pfmdr1 86N vs 86Y	Reinfection after	2.7
	lumefantrine-artemether	2.2

อย่างไรก็ตามการศึกษายีน *pfmdr1* กับผลการรักษาหายของผู้ป่วยติดเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรีย ณ บริเวณชายแดนไทยพม่า พบว่า การกลายพันธุ์ของยีนนี้ที่ตำแหน่ง 86 จะเพิ่มระดับ IC_{50} ของยาเมฟโฟควิน จาก 19.0 เป็น 52 นาโนโมลาร์ แต่ไม่มีผลต่อการทำนายผลการรักษาฟัลซิพารัมมาลาเรียในผู้ป่วยเมื่อรักษาด้วยยาเมฟโฟลควินแบบเดี่ยวๆ[40] แต่จำนวนชุดของยีน *pfmdr1* เป็นตัวชี้วัดผลการรักษาด้วยยาเมฟโฟควินได้ดีที่สุด โดยพบว่าเมื่อจำนวนชุดของยีนเพิ่มมากขึ้น ผลการรักษาผู้ป่วยด้วยยาเมฟโฟควินแบบเดี่ยวๆ จะล้มเหลวมากขึ้น ซึ่งจำนวนชุดของยีนกับการทำนายผลการรักษาจะมีค่าความไวถึงร้อยละ 71 และมีค่าความจำเพาะถึงร้อยละ 78 (sensitivity and specificity)[40] ความสัมพันธ์ของยีน *pfmdr1* กับผลการศึกษาแบบ *in vivo* ของยากลุ่มควิโนลีนแสดงอยู่ในตารางที่ 2

นอกจากยีน *pfmdr1* แล้ว ยังพบว่ายีน *pfcrt* ก็เป็นยีนที่มีความสำคัญกับการดื้อยากลุ่มควิโนลีนด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะยาคลอโรควิน ซึ่งจากการศึกษา allelic exchange ระหว่างเชื้อที่ไวและดื้อต่อยาคลอโรควิน ทำให้มีการค้นพบยีน *pfcrt*[41] จากการศึกษาเชื้อฟัลซิพารัมในหลายๆ พื้นที่จะพบการกลายพันธุ์หลายตำแหน่งด้วยกัน แต่ที่มีความสำคัญมากที่สุดคือ K76T ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก lysine เป็น threonine โดยจะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นๆ 74, 75, 220, 271, 326, 356, และ 371 ร่วมด้วยเสมอ การศึกษาต่อมาโดย Sidhu[42]แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของยีน *pfcrt* เป็นกุญแจสำคัญของการดื้อยาคลอโรควิน และจากการศึกษาเชื้อมาลาเรียในบริเวณต่างๆ พบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์กับการดื้อยาคลอโรควินทั้งจากทวีปแอฟริกา[43, 44, 45] ทวีปเอเชีย[46, 47] และทวีปอเมริกาใต้[48] อย่างไรก็ตามพบว่า บางครั้งถึงแม้เชื้อจะมีการกลายพันธุ์แต่เชื้อก็ยังไวต่อยาคลอโรควิน[49, 50]

การดื้อยากลุ่มอาร์ติมิซินินของเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจมาก ถึงแม้ว่าจะมีผู้เสนอว่ายากลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งไม่น่าจะเกิดการดื้อยาได้ แต่อาจเกิดการดื้อยาเนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีน drug transporters เช่น *pfcrt* หรือ *pfmdr1*[51] จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการและการศึกษา transfection พบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* จะทำให้เชื้อไวต่อยาอาร์ติมิซินินมากขึ้น (hypersensitivity)[37, 52, 53] และการศึกษาเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียจากผู้ป่วยก็ให้ผลที่คล้ายกัน นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *pfcrt* มีผล

ต่อระดับ IC_{50} ของยากลุ่มอาร์ติมิซินินด้วย แต่มีผลค่อนข้างน้อย หรืออาจจะไม่มีผลต่อยากลุ่มอาร์ติมิซินินเลย[54] ต่อมามีผู้เสนอว่าการดื้อยาน่าจะขึ้นอยู่กับยีน *pfatp6* เพราะเป็นยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน sarco/endoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase (SERCA)-type ATP6 ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในการออกฤทธิ์ของยากลุ่มอาร์ติมิซินิน[55]

การศึกษาเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียที่ได้จากผู้ป่วยจำนวนมากตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 ค่า IC_{50} ของเชื้อบางตัวในประเทศ French Guiana ต่อยาอาร์ทีมิเตอร์มีค่าสูงมาก เมื่อทำการทดสอบในหลอดทดลองซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวต่อยาอาร์ติมิเตอร์ลดลง[56] แต่เชื้อเหล่านี้มีความไวต่อยาชนิดอื่นตรงข้ามกับยาอาร์ติมิเตอร์จากการศึกษาลำดับยีน *pfatp6* พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 769 (S769N) โดยพบว่าเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนี้จะมีค่า median IC_{50} ของยาอาร์ติมิเตอร์เท่ากับ 79.4 นาโนโมลาร์ (37.2-109.3 นาโนโมลาร์) ในขณะที่เชื้อมาลาเรียที่ไม่มีการกลายพันธุ์จะมีค่าเท่ากับ 1.7 นาโนโมลาร์ (0.98-3.6 นาโนโมลาร์) ซึ่งมีค่าสูงกว่าถึง 20 เท่า[56] ต่อมามีการศึกษาลำดับยีน *pfatp6* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาอาร์ติมิซินินจะเข้าไปจับกับบริเวณ thapsigargin binding cleft ซึ่งการกลายพันธุ์ในบริเวณ binding site นี้โดยเฉพาะตำแหน่งที่ 263 จะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงระดับยาอาร์ติมิซินิน[57] ถึงแม้ว่าการศึกษาเชื้อฟัลซิพารัมจากผู้ป่วยในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะไม่พบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ในยีนนี้กับการเปลี่ยนแปลงระดับ IC_{50} ของยาอาร์ติซูเนต[40] และในการศึกษาดังกล่าวไม่ได้วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของจีน *pfatp6* ที่ตำแหน่ง 263 อย่างไรก็ตามบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นี้ยังไม่มีรายงานการดื้อยาอาร์ติซูเนตทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* จนกระทั่งเมื่อไม่นานนี้ พบว่าผลการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อฟัลซิพารัมมาลาเรียด้วยยาอาร์ติซูเนตร่วมกับยาเมฟโฟควินบริเวณชายแดนไทยกัมพูชามีอัตราการรักษาหายลดลงเหลือร้อยละ 78.6 (28-day cure rate)[8] และการศึกษาในบริเวณฝั่งกัมพูชาก็พบอัตราการรักษาหายลดลงเช่นกัน (28-day cure rate 85.7%)[58] จากการศึกษาเชื้อฟัลซิพารัมที่ดื้อต่อยาอาร์ติมิซินินและยาเมฟโฟควินจากฝั่งกัมพูชาพบว่าระดับการดื้อยามีความสัมพันธ์กับจำนวนชุดของ *pfmdr1* อย่างไรก็ตามผลการศึกษาจากกลุ่ม Noedl และคณะ ในปี 2008 พบว่าเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมที่ดื้อต่อยาผสมเมฟโฟลควินและอาร์ติซูเนตไม่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดของยีน *pfmdr1*[12]

นอกจากนี้การสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *pfatp6* ในปัจจุบันนี้พบการกลายหลากหลายตำแหน่ง ซึ่งมีรายงานจากประเทศต่างๆ เช่นในประเทศไทยพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง I89T, ในประเทศแคมมารูนและซีนีกัลบ์พบการกลายพันธุ์ทีตำแหน่ง E431K, E432K ส่วนในแอฟริการพบการกลายพันธุ์ H243Y[59]

จากข้อมูลทางอณูชีววิทยาดังกล่าวข้างต้นนั้นยังไม่มีข้อมูลใดที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ที่แน่ชัดระหว่างยีนใดยีนหนึ่งกับการดื้อยาอาร์ติซูเนต-เมฟโฟลควินของเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัม ซึ่งประเด็นนี้ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันอย่างแพร่หลายในหมู่นักวิจัยทางด้านมาลาเรีย แต่เป็นที่แน่ชัดว่าน่าจะมียีนดื้อยาอื่นๆ เกี่ยวข้องด้วย ซึ่งงานด้านนี้กำลังเป็นที่สนใจในวงการศึกษาด้านมาลาเรียเป็นอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Anitmalarial drug combination therapy. Report of a WHO technical consultation. WHO/CDS/RBM/ 2001.35, Geneva, Switzerland 2001.
2. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. Lancet Infect Dis 2002;2:209-18.
3. 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;211:99-113.
4. Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, Price RN, Stepniewska K, Barends M, et al. Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. PloS one 2009;4:e4551.
5. Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, et al. *Pfmdr1* copy number and arteminisin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. Malar J 2009;8:11.
6. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. N Engl J Med 2008;359:2619-20.
7. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. Malar J. 2009;8:10.
8. Vijaykadga S, Rojanawatsirivej C, Cholpol S, Phoungmanee D, Nakavej A, Wongsrichanalai *C. In vivo* sensitivity monitoring of mefloquine mono-therapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. Trop Med Int Health 2006;11:211-9.
9. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. Declining artesunate-mefloquine efficacy against falciparum malaria on the Cambodia-Thailand border. Emerging infectious diseases 2008;14:716-9.
10. White NJ. Antimalarial drug resistance. J Clin Invest 2004;113:1084-92.
11. WHO. The use of antimalarial drugs. Geneva, Swizerland: World Health Organisation 2001.
12. Noedl H, Socheat D, Satimai W. Artemisinin-resistant malaria in Asia. N Engl J Med 2009; 361:540-1.
13. Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique. Lancet 1978;1:22-3.
14. Desjadins RE, Pamplin CL, vonBredow J, Barry KG, Canfield CJ. Kinetics of a new antimalarial, mefloquine. Clin Pharmacol Ther 1979;26:372-9.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Piper R, Lebras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houze S, Chiodini P, et al. Immunocapture diagnostic assays for malaria using Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH). Am J Trop Med Hyg 1999;60:109-18.
19. 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.
20. 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.

21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. Trends Parasitol 2003;19:175-81.
25. 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.
26. 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.
27. Divo AA, Geary TG, Jensen JB. Oxygen- and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *Plasmodium falciparum* in culture. Antimicrob Agents Chemother 1985;27:21-7.
28. Dahl EL, Rosenthal PJ. Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. Antimicrob Agents Chemother 2007;51: 3485-90.
29. 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.
30. Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin SK, Kyle DE, Milhous WK, et al. Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. Mol Biochem Parasitol 1993;57:151-60.
31. Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Shanker AH, Wirth DF. Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant Plasmodium falciparum. Science. 1989;244 (1184-6).
32. Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, Van Vugt M, White NJ, et al. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2943-9.
33. 33. Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric RS. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog *(pfmdr)* of *Plasmodium falciparum in vitro*. Am J Trop Med Hyg 1994;51:648-58.
34. Cowman AF, Galatis d, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in Plasmodium *falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:1143-7.
35. Ritchie GY, Mungthin M, Green JE, Bray PG, Hawley SR, Ward SA. *In vitro* selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of Pgh1. Mol Biochem Parasitol 1996;83:35-46.
36. Mungthin M, Bray PG, Ward SA. Phenotypic and genotypic characteristics of recently adapted isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. Am J Trop Med Hyg 1999;60:469-74.

37. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. Nature 2000;403:906-9.
38. Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Nature 1990; 345:255-8.
39. Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Gil JP, do Rosario VE, et al. Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. Malar J 2002;1:12.
40. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. Lancet 2004;364:438-47.
41. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Mol Cell 2000;6:861-71.
42. Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. Science 2002;298:210-3.
43. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene pfcrt and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*. J Infect Dis 2001;183:1535-8.
44. Basco LK, Ringwald P. Analysis of the key pfcrt point mutation and *in vitro* and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. J Infect Dis 2001;183:1828-31.
45. Ringwald P, Basco LK. Comparison of *in vivo* and *in vitro* tests of resistance in patients treated with chloroquine in Yaounde, Cameroon. Bull World Health Organ 1999;77:34-43.
46. Chen N, Russell B, Staley J, Kotecka B, Nasveld P, Cheng Q. Sequence polymorphisms in pfcrt are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. J Infect Dis 2001;183: 1543-5.
47. Pillai DR, Labbe AC, Vanisaveth V, Hongvangthong B, Pomphida S, Inkathone S, et al. *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. J Infect Dis 2001;183:789-95.
48. Vieira PP, das Gracas Alecrim M, da Silva LH, Gonzalez-Jimenez I, Zalis MG. Analysis of the PfCRT K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon region of Brazil. J Infect Dis 2001;183:1832-3.
49. Ariey F, Randrianarivelojosia M, Duchemin JB, Rakotondramarina D, Ouledi A, Robert V, et al. Mapping of a *Plasmodium falciparum pfcrt* K76T mutation: a useful strategy for controlling chloroquine resistance in Madagascar. J Infect Dis 2002;185:710-2.
50. Thomas SM, Ndir O, Dieng T, Mboup S, Wypij D, Maguire JH, et al. *In vitro* chloroquine susceptibility and PCR analysis of pfcrt and *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. Am J Trop Med Hyg 2002;66:474-80.
51. Woodrow CJ, Krishna S. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. Cell Mol Life Sci 2006;63:1586-96.
52. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisisnin. Mol Biochem Parasitol 2000;108:13-23.
53. Sidhu AB, Valderramos SG, Fidock DA. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol 2005; 57:913-26.

54. Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, Johnson DJ, Horrocks P, Muhle RA, et al. A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. EMBO J 2005;24:2294-305.

55. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum.* Nature 2003;424:957-61.

56. Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in-vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. Lancet 2005;366:1960-3.

57. Uhlemann AC, Ramharter M, Lell B, Kremsner PG, Krishna S. Amplification of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 in isolates from Gabon. J Infect Dis 2005;192:1830-5.

58. Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, Lindegardh N, Yi P, Top SN, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. Trop Med Int Health 2006;11:1800-7.

59. Krishna S, Pulcini S, Fatih F, Staines H. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. Trends Parasitol. 2010 Jul 16.