บทคัดย่อ

วิธีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลอง (in vitro) มีหลากหลายวิธี ทั้งนี้วิธี HRP2 assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่เริ่มนิยมใช้มากขึ้น แต่ขั้นตอนวัดปริมาณ HRP2 ต้องใช้หลักการของเทคนิค ELISA และจำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบ หรือสารเคมีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ งานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อยาในหลอดทดลองให้สามารถทำได้ง่าย มากยิ่งขึ้น และมีราคาไม่แพง โดยในเบื้องต้นจะศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลอง โดยการวัดปริมาณ ฮีโมซอย (hemozoin) หรือ พิกเมนต์ (pigment) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการเจริญของเชื้อ เปรียบเทียบกับ วิธี HRP2 assay

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะเม็ดเลือดแดงได้ย่อยสลายฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่ถูกใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อ ทำให้เกิดผลึกสีน้ำตาลดำ เรียกว่า มาลาเรีย พิกเม้นต์ (malaria pigment) หรือฮีโมซอยเป็นผลผลิตสุดท้าย ซึ่งมีการรายงานว่า เชื้อระยะโทรโฟซอยท์ (trophozoint) ในเลือด ได้ใช้ ฮีโมโกลบิน 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอาหาร หลังจากเจริญเป็นระยะไชซอนท์ (schizont) แก่ จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและฮีโมซอย ถูกปล่อยออกมา ดังนั้นการที่มีฮีโมซอยเกิดขึ้น จึงอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัววัดผลในการทดสอบการตอบสนองต่อยาในหลอดทดลองของเชื้อมาลาเรียได้เช่นกัน

ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมในห้องปฏิบัติการ 3 สายพันธุ์ ที่ 0, 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจวัดฮีโมซอย ตามวิธี pyridine-hemochrome method พบเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมทั้ง 3 ชนิด สร้าง ฮีโมซอย สูงที่สุดในเวลา 48 ชั่วโมง โดยสายพันธุ์ NF54 สร้างได้สูงที่สุด การศึกษาความไวในหลอดทดลองต่อยา dihydroartemisinin และ mefloqiune ของสายพันธุ์ NF54 โดยใช้วิธีตรวจวัด ฮีโมซอยด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง เพาะเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจวัดฮีโมซอยและได้เปรียบเทียบกับกรณีที่แช่แข็งตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวัดฮีโมซอย พบว่าค่า IC50s ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทดสอบความไวต่อยา chloroquine กับเชื้อมาลาเรียที่ได้จากผู้ป่วยมาลาเรีย จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำมาแช่แข็งก่อนตรวจวัดฮีโมซอย พบว่ามีค่า IC50s เท่ากับ 16.14 nm และ 16.47 nm ตามลำดับ สำหรับเชื้อตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่างที่ประสบผลสำหรับในการเพาะเลี้ยงและทดสอบได้ทั้ง 2 วิธี

Abstracts

With the spread of anti-malarial drug resistant, simple tools for the assessment of anti-malarial drug resistance have become increasingly important. Recently, a histidine-Rich Protein II (HRP2) based malaria drug sensitivity assay was presented. HRP2 is produced by Plasmodium falciparum and is associated with the development and proliferation of the parasite. It is therefore suited to reflect growth inhibition as a measure of drug susceptibility. Studies have demonstrated HRP2 is an important factor in the detoxification of heme and might facilitate hemozoin formation. During intraerythrocytic growth and proliferation hemoglobin is utilized as a major source of nutrition by the malaria parasite. Heme (ferriprotoporphyrin IX) is released as a toxic byproduct. Malaria parasite detoxifies free heme by converting it into black/ brown crystalline known as malaria pigment or hemozoin. It was the aim of this study to develop a malaria drug sensitivity assay based on the measurement of hemozoin. In our experiments with laboratory strains of Plasmodium falciparum. Three strains of Plasmodium falciparum were cultured for 72h using standard conditions in complete medium. Following incubation, the culture at 0, 24, 48 and 72h were determined hemozoin content by pyridine-hemochrome method. All the strains had the highest hemozoin content at 48h. The Plasmodium falciparum strain NF54 was tested in vitro resistance to Dihydroartemisinin and Mefloquine by using the hemozoin assay after incubation for 48h. In this study, based on spectrophotometric quantification of hemozoin applied to high throughput screening by differential experimental approaches, a total of 7 fresh Plasmodium falciparum isolates were tested for their susceptibility to Chloroqine using the HRP2 method and the hemozoin assay. The two methods were compared by the IC50s after incubation for 48 and 72h.