งานวิจัย

เรื่อง

ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ฮีโมซอยเป็นตัววัดผลในการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อยาในหลอดทดลอง

(Study of possibility to use the hemozoin for measuring the response of Plasmodium falciparum to antimalarial drug)

โดย

นางสาวรุจิรา เลิศพร้อม

นางสาววรรณา ศรีสัจจารักษ์

นางณัฐวรรณ ราชแผ้ว

นางอรัญญา ภิญโญรัตนโชติ

ศูนย์อบรมโรคติดต่อนำโดยแมลง อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี

สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค

ปี พ.ศ. 2552

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.เจตสุมน ประจำศรี จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร แผนก Entomology (ฝ่ายสหรัฐฯ) ที่อนุเคราะห์เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ สถานที่ ในการดำเนินการศึกษาวิจัยขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณฮีโมซอย

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์จีรพัฒน์ ศิริชัยสินธพ ผู้อำนวยการศูนย์อบรมโรคติดต่อนำโดยแมลง พระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี ที่ให้คำปรึกษาตลอดโครงการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอให้ผู้ที่ได้อนุเคราะห์ต่างๆแก่คณะผู้วิจัยมีความสุข สมปรารถนาทุกประการ ตลอดไป

รุจิรา เลิศพร้อม

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.

คำนำ

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะเม็ดเลือดแดงได้ย่อยสลายฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่ถูกใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อ ทำให้เกิดผลึกสีน้ำตาลดำ เรียกว่า มาลาเรีย พิกเม้นต์ (malaria pigment) หรือฮีโมซอยเป็นผลผลิตสุดท้าย ดังนั้นการที่มีฮีโมซอยเกิดขึ้น จึงอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัววัดผลในการทดสอบการตอบสนองต่อยาในหลอดทดลองของเชื้อมาลาเรียได้เช่นกัน ทั้งนี้วิธีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลอง (in vitro) มีหลากหลายวิธี งานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อยาในหลอดทดลองให้สามารถทำได้ง่ายมากยิ่งขึ้น และมีราคาไม่แพง โดยในเบื้องต้นจะศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลอง โดยการวัดปริมาณ ฮีโมซอย (hemozoin) หรือ พิกเมนต์ (pigment) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการเจริญของเชื้อเปรียบเทียบกับ วิธี HRP2 assay

รุจิรา เลิศพร้อม

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
คำนำ	5
บทที่	
1. บทนำ	7
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	7
1.2 คำถามการศึกษา	8
1.3 วัตถุประสงค์	8
1.4 ขอบเขต	8
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
2. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
2.1 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	9
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
3. วิธีดำเนินการศึกษา	16
4. ผลการดำเนินงาน	19
5. สรุปและอภิปรายผลการศึกษา	21
5.1 สรุปและอภิปรายผล	21
5.2 ข้อจำกัด	21
5.3 ข้อเสนอแนะ	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	24

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การดื้อต่อยามาลาเรียของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม ได้ขยายวงกว้างมากขึ้น ทำให้ยากต่อการควบคุม ทั้งนี้จึงต้องการยุทธวิธีใหม่ๆในการเฝ้าติดตามการดื้อยา[1 และ 2]

ในประเทศไทย เชื้อมาลาเรียชนิดฟัลปารัมดื้อต่อยาคลอโรควิน เริ่มขยายวงกว้าง เนื่องจากมีการใช้ยาชนิดนี้ต้านเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมที่แพร่กระจายสูงขึ้น มีการรายงานการดื้อต่อยาคลอโรควินในประเทศไทยครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1950 และจากการที่ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อต่ำลง ทำให้มีการเลือกยาตัวอื่นมาทดแทน เช่น กลุ่มแอนติโฟเลต (antifolates) เมฟโฟลควิน (mefloquine) และอนุพันธุ์อาร์ติมิซินิน (artemisinin derivatives)

ในระหว่างปี ค.ศ.1984 ยาเมฟโฟลควิน ได้ถูกนำมาใช้ในประเทศไทยในรูปแบบแฟนซิเมฟ (fansimef) ประกอบไปด้วยตัวยาเมฟโฟลควิน-ซัลฟาดอกซิน-ไพริเมทามิน (mefloquine-sulfadoxine-pyrimethamine) ซึ่งรักษาได้ผลถึงร้อยละ 95 แต่ต่อมาได้เกิดการดื้อต่อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ชายแดนไทย-พม่า

การดื้อต่อยามาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญต่อการควบคุมการแพร่ขยายของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม ทั้งนี้ ในมาตรการของการรักษา และการควบคุมโรคนั้น ได้อ้างอิงผลจากการทดสอบการตอบสนองต่อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม

ในปัจจุบันวิธีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลอง (in vitro) ตามแบบ WHO micro test เป็นวิธีการที่สามารถติดตามผลได้อย่างต่อเนื่อง[3] แต่ยังคงต้องใช้ผู้ที่ผ่านการอบรม มีทักษะในการเพาะเลี้ยงเชื้อและมีความชำนาญในการตรวจนับเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และมีความรับผิดชอบ

วิธี HRP2 assay เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลองอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นวิธีใหม่ที่เริ่มนิยมใช้มากขึ้น เนื่องจากมีความสะดวกและช่วยลดขั้นตอนการติดตามการเจริญของเชื้อมาลาเรีย ไม่ต้องใช้ผู้ชำนาญในการตรวจนับเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ทั้งนี้ในขั้นตอนวิเคราะห์ผลการทดสอบโดยตรวจวัดปริมาณ HRP2 ต้องใช้หลักการของเทคนิค ELISA และจำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบ หรือสารเคมีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงคิดที่จะพัฒนาวิธีการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อยาในหลอดทดลอง ให้สามารถทำได้ง่าย มีความสะดวกมากยิ่งขึ้น และยังคงรูปแบบที่ใช้อ้างอิงกับวิธีการทดสอบ โดย HRP2 assay ได้ ในขณะที่ขั้นตอนวิเคราะห์ผลการทดสอบมีราคาไม่แพง โดยในเบื้องต้นของงานวิจัย จะศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลอง โดยการวัดปริมาณ ฮีโมซอย (hemozoin) หรือ พิกเมนต์ (pigment) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการเจริญของเชื้อ เปรียบเทียบกับ วิธี HRP2 assay

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะเม็ดเลือดแดงได้ย่อยสลายฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่ถูกใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อ ทำให้เกิดผลึกสีน้ำตาลดำ เรียกว่า มาลาเรีย พิกเม้นต์ (malaria pigment) หรือ ฮีโมซอย เป็นผลผลิตสุดท้าย[4] ซึ่งมีการรายงานว่า เชื้อระยะโทรโฟซอยท์ (trophozoint) ในเลือด ได้ใช้ ฮีโมโกลบินร้อยละ 75 เป็นแหล่งอาหาร[5] หลังจากเจริญเป็นระยะไชซอนท์ (schizont) แก่ จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและฮีโมซอย ถูกปล่อยออกมา ดังนั้นการที่มีฮีโมซอยเกิดขึ้น ก็เพราะเนื่องจากมีเชื้อมาลาเรียในเลือด ซึ่งอาจใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้[6] จึงอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัววัดผลในการทดสอบการตอบสนองต่อยาในหลอดทดลองของเชื้อมาลาเรียได้เช่นกัน

1.2 คำถามการศึกษา

ฮีโมซอยสามารถใช้เป็นตัววัดผลในการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อยาในหลอดทดลองได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ฮีโมซอยวัดผลในการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมต่อยาในหลอดทดลอง

1.4 ขอบเขต

เป็นการศึกษาปริมาณฮีโมซอยในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 3 สายพันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดที่ได้จากการบ่มเพาะเลี้ยงครบตามเวลาที่กำหนด คือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาตรวจวัดฮีโมซอย ตามวิธี pyridine-hemochrome method และศึกษาวิธีการตรวจวัดปริมาณฮีโมซอย ตามวิธี HRP2 assay และ ตามวิธี pyridine-hemochrome method

1.5 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

- ได้พัฒนาเทคโนโลยีการทดสอบเชื้อดื้อยามาลาเรียในหลอดทดลอง
- ได้พัฒนาองค์ความรู้เรื่องการทดสอบเชื้อมาลาเรียดื้อยาในหลอดทดลองกับบุคลากรของหน่วยงานสาธารณสุขหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง
- นำผลการศึกษาไปพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ดำเนินงานภายในประเทศได้ในอนาคต

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

<u>การใช้ยาฆ่าเชื้อมาลาเรีย</u>[7]

วิธีสำคัญที่จะลดอัตราป่วยและอัตราตายด้วยไข้มาลาเรีย คือ การบำบัดรักษาผู้ป่วยมาลาเรียโดยใช้ยาฆ่าเชื้อหรือยาต้านมาลาเรีย ยาพวกนี้มีฤทธิ์ต่อเชื้อบางชนิดและบางระยะเท่านั้น ฉะนั้นจึงจำแนกยาต้านมาลาเรียตามฤทธิ์ที่มีต่อเชื้อมาลาเรียดังนี้

1. ยาที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อไร้เพศในเม็ดโลหิตแดง (Blood Schizontocide) ยานี้ใช้รักษาผู้ป่วยมาลาเรียเพราะเชื้อที่เป็นตัวทำให้เกิดอาการป่วยคือเชื้อระยะนี้ ยาที่ใช้ในประเทศไทยในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาคลอโรควิน ควินิน เมโฟลควิน อาร์ติซูเนท
2. ยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่อยู่ในเนื้อเยื่อตับ (issue Schizontocide) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อก่อนเข้าเม็ดเลือดแดงฆ่าเชื้อระยะที่อยู่ในตับ (Hypnozoite) จึงสามารถใช้เป็นยาป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียและป้องกันไม่ให้เกิดไข้กลับซ้ำ ยาที่ใช้อยู่ในประเทศไทยได้แก่ยาไพรมาควิน ใช้ในการรักษามาลาเรียชนิดไวแวกซ์มาลาริอี และโอวาเล่
3. ยาที่มีฤทธิ์ฆ่าแกมีโตซัยท์ (Gametocytocidal) ยาที่ใช้อยู่ ได้แก่ ไพรมาควิน
4. ยาที่มีฤทธิ์กีดขวางป้องกันการเกิดโอโอซิสต์และสปอโรซอยท์ในยุง ยานี้จะใช้ในการป้องกันการแพร่โรค ได้แก่ ยาไพรมาควิน

<u>ข้อควรทราบและพึงระวังในการใช้ยารักษาไข้มาลาเรีย</u>

1. คลอโรควิน (Chloroquine)

กลุ่มของยา:	4-Aminoquiniline
ขนาดที่ใช้:	25 มิลลิกรัม เบส/กิโลกรัม
ค่าครึ่งชีวิต:	10 วัน
การออกฤทธิ์:	Blood Schizontocide สำหรับเชื้อมาลาเรียทุกชนิด และ Gametocyte สำหรับเชื้อ Vivax, Malariae และ Ovale
ผลข้างเคียงที่พบบ่อย:	มึนงง ตาพร่า

2. ควินิน (Quinine)

กลุ่มของยา:	Cinchona Alkaloid
ขนาดที่ใช้:	10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ค่าครึ่งชีวิต:	10-12 ชั่วโมง
การออกฤทธิ์:	Blood schizontocide สำหรับเชื้อมาลาเรียทุกชนิด
ผลข้างเคียงที่พบบ่อย:	Chinconism คือเวียนศีรษะ คลื่นไส้ มีเสียงในหู ตาพร่า

3. เมโฟลควิน (Mefloquine)

กลุ่มของยา: Quinoline-methanol

ขนาดที่ใช้: 15-25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ค่าครึ่งชีวิต: 10-20 วัน

การออกฤทธิ์: Blood schizontocide สำหรับเชื้อมาลาเรียทุกชนิด

ผลข้างเคียงที่พบบ่อย: คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง มึนงง

4. เตตราซัยคลิน (Tetracycline)

กลุ่มของยา: Antibiotics

ขนาดที่ใช้: 5-10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ค่าครึ่งชีวิต: 8 ชั่วโมง

การออกฤทธิ์: Blood schizontocide สำหรับเชื้อมาลาเรียทุกชนิด แต่ต้องให้ร่วมกับยาตัวอื่น

ผลข้างเคียงที่พบได้: คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายท้อง ฟันเหลืองหากกินติดต่อนาน

5. ด๊อกซีซัยคลิน (Doxycycline)

กลุ่มของยา: Antibiotics

ขนาดที่ใช้: 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ค่าครึ่งชีวิต: 14-24 ชั่วโมง

การออกฤทธิ์: Blood schizontocide สำหรับเชื้อมาลาเรียทุกชนิด แต่ต้องให้ร่วมกับยาตัวอื่น

ผลข้างเคียงที่พบได้: คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายท้อง ฟันเหลืองหากกินติดต่อนาน

6. ไพรมาควิน

กลุ่มของยา: 8-Aminoquiniline

ขนาดที่ใช้: 0.5-1.0 มิลลิกรัม เบส/กิโลกรัม

ค่าครึ่งชีวิต: 5 ชั่วโมง

การออกฤทธิ์: สำหรับเชื้อ Vivax, Malariae และ Ovale

ผลข้างเคียงที่พบบ่อย: คลื่นไส้ ปวดมวนท้อง

7.อาร์ติซูเนท (Artesunate)

กลุ่มของยา: Sesquiterpene Lactones

ขนาดที่ใช้: 12 มิลลิกรัม เบส/กิโลกรัม

ค่าครึ่งชีวิต: 4-11 ชั่วโมง

การออกฤทธิ์: Blood schizontocide สำหรับเชื้อมาลาเรียทุกชนิดและ Reduce Gametocyte Carriage Rate

ผลข้างเคียงที่พบบ่อย: มีอาการแสดงน้อย ข้อมูลยังไม่มากพอ

ยารักษามาลาเรียชนิดใหม่[8]

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ศึกษายารักษามาลาเรียใหม่ๆที่ได้ผลดีในประเทศไทย ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ยารักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อนที่ได้ผลดีในประเทศไทย

malarone[18] (atovaquoune - proguanil)	- combination tablet of atovaquone 250 mg plus proguanil 100 mg - adult dose: 4 tab OD ให้ 3 วัน - cure rate ร้อยละ 100
coartem[19] (artemether - lumefantrine)	- combination tablet of artemether 20 mg plus lumefantrine 120 mg - adult dose: 4 tab bid ให้ 3 วัน - cure rate ร้อยละ 97
artequin[20] (artesunate - mefloquine)	- blister- prepacked of combination tablet of artesunate 200 mg plus mefloquine 250 mg - dose: artesunate 4-5 mg/kg plus mefloquine 25 mg/kg (~ 8.5 mg/kg/day) OD ให้ 3 วัน - cure rate ร้อยละ 100
artesunate – mefloquine[21] (2 day - regimen)	- adult dose: artesunate 200 mg plus mefloquine 312.5 mg bid ให้ 2 วัน - cure rate ร้อยละ 99
artecom[22] (dihydroartemisinin - piperaquine -trimethoprim)	- combination tablet of dihydroartemisinin 32 mg plus piperaquine 320 mg plus trimethoprim 90 mg - adult dose: 2 tab at 0, 6, 24, 32 hr plus primaquine 26.4 mg at 0 hr - cure rate ร้อยละ 97

artekin[23] (dihydroartemisinin - piperaquine)	- combination tablet of dihydroartemisinin 40 mg plus piperaquine 320 mg - dose: dihydroartemisinin 6.4 mg/kg + piperaquine 51.2 mg/kg - adult dose: 2 tab at 0, 8, 24, 48 hr - cure rate ร้อยละ 96.1
DNP[24] (dihydroartemisinin - napthoquine - trimethoprim)	- combination tablet of dihydroartemisinin 160 mg plus naphthoquine 400 mg plus trimethoprim 200 mg - adult dose: 1 tab bid ให้ 1 วัน - cure rate ร้อยละ 99
artesunate – azithromycin[25]	*Regimen 1.* - adult dose: artesunate 100 mg bid + azithromycin 750 mg bid ให้ 3 วัน - cure rate ร้อยละ 92 *Regimen 2.* - adult dose: artesunate 200 mg OD + azithromycin 1,000 mg OD ให้ 3 วัน - cure rate ร้อยละ 88.9
quinine – azithromycin[26]	- adult dose: quinine 10 mg/kg tid + azithromycin 500 mg tid ให้ 3 วัน - cure rate ร้อยละ 92

หมายเหตุ: ยารักษามาลาเรียทุกตัวที่จดทะเบียนใหม่ในประเทศไทยภายหลังปี พ.ศ.2528 ในขณะนี้มีเพียง 3 ตัว ได้แก่ mefloquine-artesunate และ artemether-lumefantrine ซึ่งจัดเป็นยาควบคุมใช้เฉพาะในหน่วยงานภาครัฐเท่านั้น ภาคเอกชนที่มีความจำเป็นต้องใช้จะต้องขออนุญาตจากกระทรวงสาธารณสุขเป็นกรณีพิเศษ

<u>การศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง (in vitro testing)</u>

เป็นวิธีมาตรฐานอย่างหนึ่งที่ใช้ติดตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย โดยทดสอบในหลอดทดลอง มีหลากหลายวิธีดังต่อไปนี้

1. วิธี WHO MarkIIImicro-testassay เป็นวิธีดั้งเดิมที่อาศัยหลักการยับยั้งการเจริญของเชื้อไปสู่ระยะไชซอนต์(schizontmaturation inhibition) โดยจะมีการเตรียมยามาตรฐานใส่เพลทไว้แล้วนำ เชื้อมาลาเรียมาเติมในเพลท จากนั้น นำ ไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำเชื้อมาเตรียมฟิล์มเลือดหนา (Thicks mear) แล้วนับปริมาณไชซอนต์เทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับยา วิธีนี้ค่อนข้าง สะดวกและง่าย เพราะไม่ได้ใช้อุปกรณ์และสารเคมีราคาแพง แต่การอ่านผลและวิเคราะห์มีความยุ่งยากมากเพราะต้องอาศัยความชำนาญของผู้วิจัยในการดูลักษณะรูปร่างของเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์และเสียเวลามาก ซึ่งความแปรปรวนของผลจะขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญในการดูรูปร่าง ของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาที่มีตัวอย่างจำนวนมาก (Rieckmann et al., 1978)[9]

2. วิธี Hypoxanthine assay โดยอาศัยหลักการติดสารรังสีที่ดีเอ็นเอ (DNA) เพื่อวัดการเจริญของเชื้อมาลาเรีย สารรังสีที่ใช้คือสารรังสีไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) สารนี้จะเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิตและเข้าไปร่วมในการสร้างสายดีเอ็นเอเมื่อเชื้อเจริญเติบโต ซึ่งทำให้ติดตามเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ตามระดับค่ารังสีที่วัดได้ดังนั้นถ้ายาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ระดับค่ารังสีก็จะลดลง วิธีการนี้ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญดูลักษณะรูปร่างของเชื้อมาลาเรีย จึงสามารถศึกษาความไวของเชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือสูง แต่วิธีการนี้ต้องใช้สารรังสีซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ทดสอบ สารรังสีไฮโปแซนทีน และอุปกรณ์ที่วัดปริมาณรังสีมีราคาแพง อีกทั้งต้องมีการตรวจรับรองห้องปฏิบัติการเพื่อขออนุญาตใช้สารรังสีอีกด้วย[10]

3. วิธีอีไลซ่า(Enzyme linkedimmunosorbentassays;ELISA) เป็นการวัดระดับสาร histidinerichprotein2 (HRP2) ที่เชื้อมาลาเรียหลั่งออกมาภายนอกเม็ดเลือดแดงหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการวัดจะใช้หลักการSandwichELISA ซึ่งอาศัยแอนติบอดีที่จำ เพาะกับ สารที่ต้องการวัด (monoclonal antibody) ติดไว้ในเพลท แล้ว นำ ไปทำปฏิกริยากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มาจากการทดสอบยา สาร HRP2 (antigen) จะจับกับแอนติบอดีจากนั้นนำแอนติบอดี อีกตัวที่มีการติดสารที่ผลิตสีเข้าไปจับอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงนำไป วัดสีที่เกิดขึ้น Histidine rich protein 2 (HRP2) เป็นแอนติเจนสำคัญ ที่ใช้พิสูจน์เชื้อมาลาเรีย การทดสอบความไวด้วยวิธีนี้จะต้องเพาะ เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาที่นานประมาณ 72 ชั่วโมง ซึ่งจะแตกต่าง จากวิธีอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 24 หรือ 48 ชั่วโมง ข้อดีของวิธีวัดความไวนี้คือ สะดวกและเชื่อถือได้แต่จุดอ่อนที่สำคัญคือเรื่องของการสังเคราะห์สาร monoclonalantibody ซึ่ง ค่อนข้างราคาแพง ถึงแม้ว่าจะมีสามารถหาซื้อได้ง่ายก็ตาม[11]

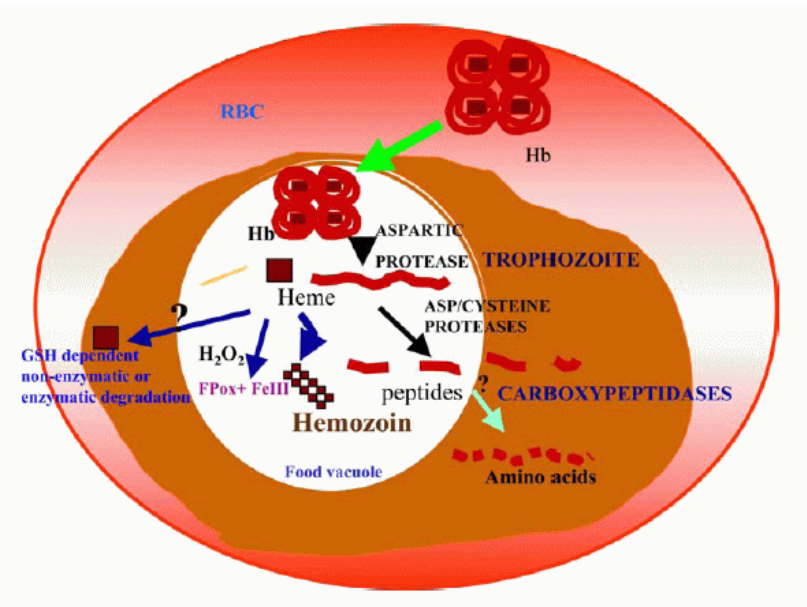
4. วิธี Immunoenzymatic capture technique วิธีการนี้จะคล้ายกับการวัดความไวด้วยวิธีอีไลซ่า (Enzyme linked immunosorbent assays; ELISA) เป็นการวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ actatedehydrogenaseprotein (pLDH) ของเชื้อมาลาเรีย และได้พัฒนา วิธีการวัดเอนไซม์pLDH จากเชื้อมาลาเรียโดยใช้double-site enzyme-linked LDH immunodetection (DELI) ซึ่งเพิ่ม ประสิทธิภาพในการวัดระดับ pLDH โดยอาศัย monoclonal antibody เข้ามาช่วย[12]

5. การประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีสารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์ วิธีนี้จะอาศัยหลักการคล้ายกับวิธีการใช้สารรังสีทั้งนี้สารเรืองแสงฟลูโอเรสเซ้นท์ เช่น SYBR นั้น สามารถเข้าไปจับกับ ดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียได้ปริมาณการเรืองแสงจะขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเจริญเติบโต การวัดสารเรืองแสงเป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ต้องระวัง เรื่องของสัญญาณรบกวนด้วย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I นั้นจะ จำ เพาะกับเชื้อมาลาเรียเท่านั้น ทั้งนี้เพราะในเม็ดเลือดแดงไม่มี ดีเอ็นเอ[13]

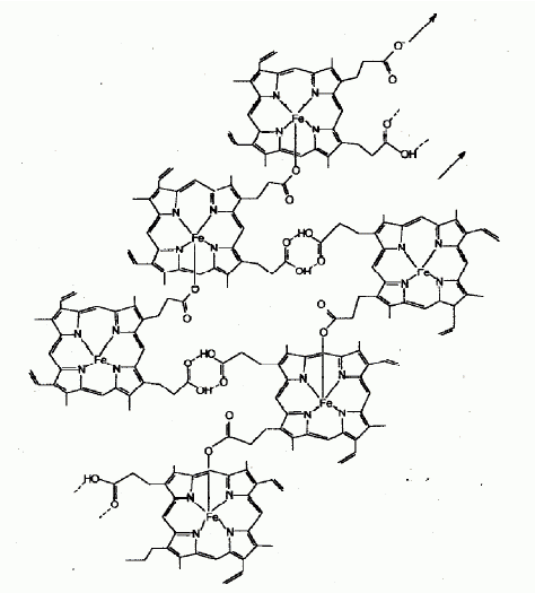
<u>ฮีโมซอย</u>

ฮีโมซอย หรือ มาลาเรียพิกเม้นต์ มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาลดำ เป็นผลผลิตสุดท้ายที่เกิดจากการย่อยสลาย ฮีโมโกลบิน ที่ถูกเชื้อมาลาเรียย่อยสลาย เมื่อเจริญอยู่ในระยะเม็ดเลือดแดง หรืออีกนัยหนึ่ง เป็นกลไกการกำจัดความเป็นพิษของ ฮีม (heme) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายดังกล่าว[4] แสดงในรูปที่ 1[6] ฮีโมซอยมีคุณสมบัติ และโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ เบต้า-ฮีมาติน ซึ่งมีฮีมมาเชื่อมกันด้วยพันธะโคออดิเนต (co-ordinate bond) แสดงในรูปที่ 2[4]

ฮีโมซอย ไม่ละลายใน ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์อ่อนๆ (bicarbonate buffer) และตัวทำลายบางชนิด เช่น ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulphoxide) และ พิริดีน (pyridine)[6]



รูปที่ 1 กระบวนการย่อยสลาย ฮีโมโกลบิน ของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง



รูปที่ 2 โครงสร้างของ ฮีโมซอย

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 รายงานการศึกษาของ Jonathan M. Belisle และคณะ, ปีค.ศ.2007 ศึกษาการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียจากเลือดตัวอย่างด้วยการตรวจฮีโมซอยโดยวิธี Automated optical detection by Third harmonic generation (THG) imaging เป็นการใช้เลเซอร์ THG (Third Harmonic Generation) คือ ชื่อเรียกของเลเซอร์ UV ที่มีความยาวคลื่นเพียงหนึ่งในสามของความยาวคลื่นมาตรฐาน (1064 nm) ความยาวคลื่นนี้อยู่ในช่วงอุลตร้าไวโอเลต จึงมีชื่อเรียกว่า “เลเซอร์ UV” ในเลเซอร์ UV เลเซอร์ความยาวคลื่นมาตรฐานจะถูกส่งผ่านผลึกชนิด Non-Linear เพื่อสร้างเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 532 nm จากนั้นลำแสงที่ถูกแปลงความยาวคลื่นจะถูกส่งต่อไปยังผลึกอีกชุดหนึ่ง เพื่อแปลงความยาวคลื่นเป็น 355 nm ความยาวคลื่นนี้จึงสามารถใช้ในการตัดที่ต้องการคุณภาพสูงได้ซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็วและสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียในระยะเริ่มแรกได้[14]

2.2.2 รายงานการศึกษาของ Noppadon Tangpukdee และคณะ, ปีค.ศ.2009 รายงานการใช้วิธี Flow cytometry ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย โดยหลักการของเทคนิคนี้เป็นการตรวจหา hemozoin ที่เกิดขึ้นเมื่อเชื้อมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงย่อยสลายฮีโมโกลบินของโฮสต์และตกผลึกเป็น heme ที่เป็นพิษที่ปล่อยออกมาเป็น hemozoin ในแวคิวโอล สามารถตรวจจับ Hemozoin ภายใน phagocytotes ได้โดยการสลับขั้วของแสงเลเซอร์เมื่อเซลล์ผ่านเครื่อง Flow cytometer สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีนี้พบว่ามีความไว 49-98% และความจำเพาะ 82-97% ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย clinically unsuspected malaria ข้อเสียคือต้องใช้แรงงานมาก ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญที่ผ่านการฝึกอบรม อุปกรณ์ตรวจวินิจฉัยมีราคาแพง และอาจแปลผลการวิจจฉัยผิดพลาดกรณีมีการปนเปื้อนจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสอื่นๆ ดังนั้นวิธีนี้จึงควรใช้เป็นเพียงเครื่องมือสำหรับการคัดกรองมาลาเรียเท่านั้น[15]

บทที่ 3
วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1.1 Microtiter plate 96 หลุม (12 x 8 wells) แต่ละหลุมจะมียาที่จะศึกษาเคลือบก้นหลุมในขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ จากความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก ยกเว้นหลุมแรกไม่มียาเคลือบอยู่ เนื่องจากหลุมแรกเป็นหลุม Control

3.1.1.2 Eppendorf pipette ขนาด 20 – 200 ไมโครลิตร, 100 – 1000 ไมโครลิตร, 5 มิลลิลิตร

3.1.1.3 Multichanel pipette ขนาด 50 – 300 ไมโครลิตร

3.1.1.4 Eppendorf pipette tip ฆ่าเชื้อแล้ว (ขนาดสวมปลาย Eppendorf pipette ขนาด 50 ไมโครลิตร ได้พอดี)

3.1.1.5 Falcon tube แบบฝากดขนาด 30 และ 50 มิลลิลิตร

3.1.1.6 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.1.7 กระจกสไลด์ขอบฝ้า

3.1.1.8 Reagent reservoirs ขนาด 30 – 60 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อแล้ว

3.1.1.9 Elisa plate

3.1.1.10 Candle jars

3.1.1.11 Incubator

3.1.1.12 เครื่องเซ็นตริฟิวก์

3.1.1.13 Elisa plate reader

3.1.1.14 Sodium hydroxide

3.1.1.15 Pyridine

3.1.1.16 Triton-X 100

3.1.1.17 Monoclonal IgM anti-Plasmodium falciparum

3.1.1.18 Monoclonal IgG anti-Plasmodium falciparum Peroxidase Conjugated

3.1.1.19 Alkaline buffer

3.1.1.20 Tris-HCL buffer

31.1.21 Potassium ferricyanide (III)

3.1.1.22 Sodiumhydrosulfite

3.1.1.23 BSA powder

3.1.1.24 PBS powder

3.1.1.25 Substrate solution

3.1.1.26 Stop solution

3.1.1.27 อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม

3.1.1.28 น้ำกลั่น

3.1.1.29 Hematin porcine

3.1.1.30 Hemin

3.1.2 ขั้นตอนวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1.2.1 ศึกษาปริมาณฮีโมซอยในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

3.1.2.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมในห้องปฏิบัติการ 3 สายพันธุ์

3.1.2.1.2 เก็บตัวอย่างเลือดที่ได้จากการบ่มเพาะเลี้ยงครบตามเวลาที่กำหนด คือ 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง มาตรวจวัดฮีโมซอย ตามวิธี pyridine-hemochrome method

3.1.2.2 ทดสอบความไวต่อยามาลาเรียในหลอดทดลอง

3.1.2.2.1 เตรียมเพลททดสอบที่เคลือบยามาลาเรีย

3.1.2.2.2 นำเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมที่ได้จากข้อ 3.1.2.1 มาเพาะเลี้ยงในเพลทที่เคลือบยามาลาเรีย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.1.2.2.3 เมื่อเลี้ยงเชื้อครบเวลาตามกำหนดแล้ว เก็บตัวอย่างเลือดมา ตรวจวัดฮีโมซอยตามวิธีใน 9.4 และ 9.7

3.1.2.3 ศึกษาวิธีการตรวจวัดปริมาณฮีโมซอย

3.1.2.3.1 เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมในห้องปฏิบัติการ 1 สายพันธุ์

3.1.2.3.2 เตรียมเพลททดสอบที่เคลือบยามาลาเรีย

3.1.2.3.3 นำเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมที่ได้จากข้อ 3.1.2.3.1 มาเพาะเลี้ยงในเพลทที่เคลือบยามาลาเรีย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.1.2.2.4 เมื่อเลี้ยงเชื้อครบเวลาตามกำหนดแล้ว เก็บตัวอย่างเลือดมาแช่แข็ง และละลาย ก่อน เพื่อตรวจวัด HRP2 ตามวิธี HRP2 assay และ ตรวจวัดฮีโมซอย ตามวิธีดัดแปลงจาก 9.4 และ 9.7 และ ตามวิธี pyridine-hemochrome method

3.1.2.4 ประเมินผล

เปรียบเทียบผลโดยการเปรียบเทียบค่า EC_{50} (Effective concentration ที่ 50%) ของการตรวจ ทั้ง 2 วิธี โดยใช้โปรแกรม HN-nonlin

3.2 สถานที่ศึกษาวิจัย และระยะเวลาศึกษาวิจัย

3.2.1 <u>สถานที่ศึกษาวิจัย</u>

3.2.1.1 ศูนย์อบรมโรคติดต่อนำโดยแมลง พระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี

3.2.1.2 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (AFRIMS)

3.2.1.3 สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช

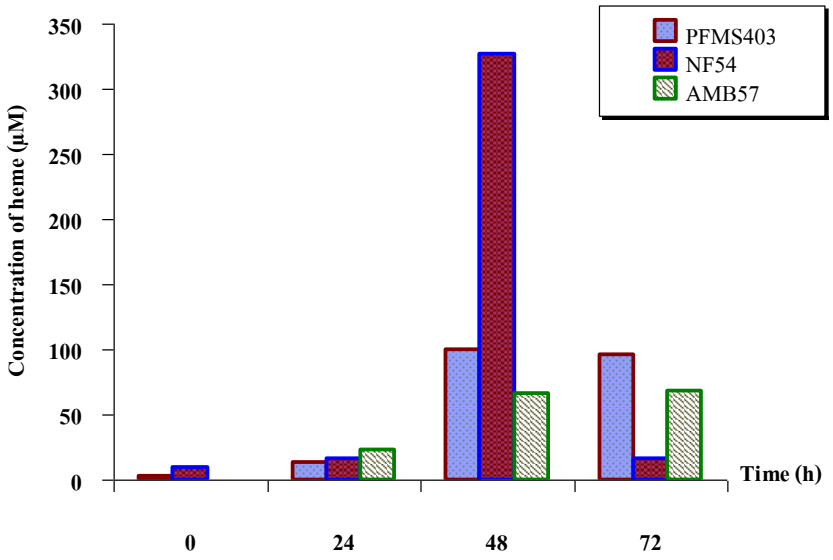
3.2.2 <u>ระยะเวลาศึกษาวิจัย</u>

12 เดือน (ตุลาคม 2551 – กันยายน 2552)

บทที่ 4
ผลการดำเนินงาน

4.1 ผลการศึกษา

จากผลการศึกษา พบว่าเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมทั้ง 3 ชนิด สร้างฮีโมซอยสูงที่สุดในเวลา 48 ชั่วโมง โดยสายพันธุ์ NF54 สร้างได้สูงที่สุด แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงปริมาณฮีโมซอยที่ถูกสร้างโดยเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัม 3 สายพันธุ์

ศึกษาความไวในหลอดทดลองต่อยา Dihydroartemisinin และ Mefloqiune ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมสายพันธุ์ NF54 โดยทดสอบในเพลทที่เคลือบยาแบบมาตรฐานของ WHO แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ได้เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มาตรวจวัด ฮีโมซอย และได้เปรียบเทียบกับกรณีที่แช่แข็งตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวัดฮีโมซอย ผลการศึกษาพบว่าค่า IC_{50}s ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (แสดงในตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50}s จากการทดสอบความไวต่อยาโดยวิธีตรวจวัดฮีโมซอย

ยา	IC_{50}s (nm)		
	48 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง (แช่แข็ง-ละลาย)	72 ชั่วโมง
Dihydroartemisinin	ND	0.24	0.22
Mefloquine	3.22	3.49	ND

ND, the inhibitory concentration was not determined due to insufficient growth of the parasites.

เมื่อทดสอบความไวต่อยา chloroquine กับเชื้อมาลาเรียที่ได้จากผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 7 ตัวอย่าง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในเพลทยาแบบมาตรฐานของ WHO และเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำมาแช่แข็งก่อนตรวจวัดฮีโมซอย พบว่ามีค่า IC_{50}s เท่ากับ 16.14 nm และ 16.47 nm ตามลำดับ สำหรับเชื้อตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่างที่ประสบผลสำหรับในการเพาะเลี้ยงและทดสอบได้ทั้ง 2 วิธี

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

5.1 สรุปและอภิปรายผล

การศึกษานี้เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยามาลาเรียในหลอดทดลอง โดยใช้วิธีตรวจวัดฮีโมซอยด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิรัม (*P. falciparum*) สร้างฮีโมซอยได้สูงที่สุดในเวลาที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งสัมพันธ์กับเวลาในการสร้าง HRP2 (Histidine-rich Protein 2)

จากตารางที่ 1 พบว่าค่า IC50s ที่ได้จากการทดสอบความไวและตรวจวัดฮีโมซอยจากตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งนั้นไม่ต่างกัน ซึ่งนับว่าเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ในการทดสอบระดับภาคสนามอย่างยิ่ง เนื่องจากทำให้สะดวกต่อการวิเคราะห์ การขนส่ง และกรณีดำเนินการในพื้นที่ห่างไกล โดยสรุป สามารถใช้วิธีทดสอบความไวต่อยามาลาเรียในหลอดทดลองโดยการตรวจวัดฮีโมซอยได้ แต่เนื่องจากผลการศึกษายังอยู่ในระดับเบื้องต้น ยังต้องการพัฒนาแนวทางเลือกทางสารเคมีอื่นเพื่อการตรวจวัดฮีโมซอย เพื่อลดค่าใช้จ่าย สะดวกและไม่มีสารพิษ และให้สามารถทดสอบได้กับตัวอย่างจำนวนมากในระดับภาคสนามต่อไป ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Nguyen Tien Huy และคณะ, ปีค.ศ.2007[16] ศึกษายามาลาเรียชนิดใหม่ทางห้องปฏิบัติการที่สามารถยับยั้งการสร้างสารฮีโมซอยของเชื้อมาลาเรีย โดยวิธีการตรวจวัดปริมาณฮีโมซอยด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสี (Colorimetric assay) ของสารฮีม (Heme) ที่อยู่ภายในโครงสร้างเบตาฮีมาติน (β-hematin) โดยได้ทดลองใช้สารเคมีที่หาได้ง่ายมีราคาไม่แพง คือ Tween20 ที่ความเข้มข้นต่างๆช่วยในขั้นตอนการสกัดสารเบตาฮีมาติน ไม่ใช้สารย้อมสีราคาแพงและอันตราย ประยุกต์ใช้ไมโครเพลทในการตรวจวัดได้กับตัวอย่างจำนวนมากในเวลาเดียวกัน และแตกต่างจากการศึกษาของ Saranya Auparakkitanon และคณะ ปีค.ศ. 2006[17] ศึกษาปริมาณเบตาฮีมาตินของเชื้อมาลาเรียหลังทดสอบด้วยยามาลาเรียโดยตรวจวัดด้วยวิธี [3H]hypoxanthine incorporation method ซึ่งเป็นวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) จากการใช้สารย้อมสีที่มีราคาแพงและเป็นพิษ

5.2 ข้อจำกัด

จากการทบทวนวรรณกรรม มีรายงานศึกษาวิจัยเรื่องการตรวจวัดฮีโมซอยจากเชื้อมาลาเรียหรือเรื่องที่มีความเกี่ยวข้องน้อยมาก และขั้นตอนการสกัดฮีโมซอยใช้สารเคมีที่มีความเป็นพิษ ซึ่งต้องมีการป้องกันในระหว่างการดำเนินงานและการกำจัดทิ้งเพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

5.3 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการพัฒนาแนวทางการทดสอบอื่นๆ เช่นการปรับเปลี่ยนสารเคมี หรือการใช้เพลท (96 well plate) มาช่วยในการตรวจวัดปริมาณฮีโมซอย

เอกสารอ้างอิง

1. Labbe AC., Patel S., Crandall I. and Kain KC. 2003. Molecular Surveillance System for Global Patterns of Drug Resistance in Imported Malaria. Emerging Infectious Disease. Vol.9, No.1, p. 33-36

2. Lopes D., Rungsihirunrat K., Nogueria F., Seugorn A., Gil J.P., Rosario V.E. and Cravop. 2002. Molecular Characterisation of Drug Resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. Malaria Journal. 4:28, 7 pages (http://www.malariajournal.com/content/1/1/12)

3. Abhai K. Tripathi, Satyendra K. Garg and Bubul. L. Tekwani. 2002. A Physiochemical Mechanism of Hemozoin (β-hematin) Synthesis by Malaria Parasite. Biotech and Biophysical Research Communications, Vol. 290, No. 1, p. 595-601

4. A.K. Tripathi and B.L.Tekwani. 1999. Mechanism of Formation of β-hematin in Malaria Parasite. Lipid Edge over Proteins as Possible Mediators, Vol. 23, p. 61-70

5. Babu L. Tekwani and Larry A. Walker. 2005. Target the Hemozoin Synthetic Pathway for New Antimalarial Drug Discovery : Technologies for In vitro β-hematin Formation Assay, Vol. 8, No. 1, p. 63-79

6. Abhai K. Tripathi, Shabana I. Khan, Larry A. Walker and Babu L. Tekwani. 2004. Spectrophotometric Determination of de novo Hemozoin/β-hematin Formation in an in vitro Assay. Analytical Biochemistry, Vol. 325, p. 85-91

7. สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2548. คู่มือการรักษาไข้มาลาเรียชนิดไม่มีภาวะแทรกซ้อน ฉบับ พ.ศ.2548, 24 หน้า

8. สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2549. แนวทางการรักษาไข้มาลาเรียสำหรับแพทย์ พ.ศ.2549, 63 หน้า

9. Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. Drug sensitivity of Plasmodium falciparum. An in-vitro microtechnique. Lancet 1978;1:22- 3.

10. Baniecki ML. Wirth DF. Clardy J. High-throughput Plasmodium falciparum growth assay for malaria drug discovery. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007; 51:716–723.

11. 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.

12. Pierre Druilhe, Alicia Moreno, Catherine Blanc, Philippe H. Brasseur and Patrick Jacquier. 2001. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* baed on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 64(5, 6), pp. 233–241

13. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, et al. 2004. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 48:1807-10.

14. Belisle JM, Costantino S, Leimanis ML, Bellemare MJ, Bohle DS, Georges E and Wiseman PW. 2007. Sensitive Detection of Malaria Infection by Third Harmonic Generation Imaging. Biophysical Journal: Biophysical Letters, p. L26-L28

15. Noppadon Tangpukdee, Chatnapa Duangdee , Polrat Wilairatana, and Srivicha Krudsood. 2009. Malaria Diagnosis: A Brief Review. Korean J Parasitol. Vol. 47, No. 2: p.93-102, p.93-102

16. Nguyen Tien Huy, Dinh Thanh Uyen, Atsushi Maeda, Dai Thi Xuan Trang, Tatsuo Oida, Shigeharu Harada and Kaeko Kamei. 2007. Simple Colorimetric Inhibition Assay of Heme Crystallization for High-Throughput Screening of Antimalarial Compounds. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 51, No. 1, p. 350–353

17. Saranya Auparakkitanon, Soebsakul Chapoomram, Kannika Kuaha, Thamrong Chirachariyavej and Prapon Wilairat. 2006. Targeting of Hematin by the Antimalarial Pyronaridine. Antimalarial agents and chemotherapy, Vol. 50, No. 6, p. 2197–2200

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- RPMI 1640 power 10.43 กรัม
- HEPES 6 กรัม
- Gentamyycin 25 มิลลิกรัม/ลิตร
- 0.5% W/V Albumax I
- เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร
- 7.5% NaHCO3 (2.8 มิลลิลิตร/อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร)
- อาหารเลี้ยงเชื้ออาจเตรียมก่อนได้หลายวัน ขณะที่ยังไม่ได้นำมาใช้ให้เก็บในตัวเย็น 4 องศาเซลเซียส

2. เพลทเคลือบยาทดสอบ

<u>เพลทเคลือบยาวิธี WHO assay</u>

	DHA		MEF		CHL		QNN		Control 24 ชม.		Control 72 ชม.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Drug free control											
B	3	3	40	40	20	20	80	80				
C	10	10	80	80	40	40	160	160				
D	30	30	160	160	80	80	320	320				
E	100	100	320	320	160	160	640	640	Drug free control			
F	300	300	640	640	320	320	1280	1280				
G	1000	1000	1280	1280	640	640	2560	2560				
H	3000	3000	2560	2560	1280	1280	5120	5120				

Concentration in nmol/l (50 μl/well)

3. วิธี Hemozoin assay

<u>วิธีใน 9.4 และ 9.7</u>

- เก็บตัวอย่างเลือดที่ได้จากการบ่มเพาะเลี้ยงครบตามเวลาที่กำหนด คือ 72 ชั่วโมง Centrifuge 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที
- นำตะกอนที่ได้มาละลายใน Tris-HCL buffer (100 mM, pH 7.8) / SDS 2% และ Centrifuge 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที
- นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย Alkaline bicarbonate (100 mM, pH 9.2) และ Centrifuge 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที
- นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย 1 N NaOH 100 ไมโครลิตร
- ผสมด้วยสารละลาย SDS 2% 900 ไมโครลิตร

- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

<u>วิธี pyridine-hemochrome method</u>

- เก็บตัวอย่างเลือดที่ได้จากการบ่มเพาะเลี้ยงครบตามเวลาที่กำหนด คือ 72 ชั่วโมง มาแช่แข็งและละลาย
- Centrifuge 13,000 rpm เป็นเวลา 45 นาที (4°C)
- นำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น และ Centrifuge 13,000 g เป็นเวลา 15 นาที (4°C)
- นำตะกอนที่ได้มาละลายในในน้ำกลั่น
- ผสม N NaOH และ pyridine
- แยกสารละลายเป็น 2 ส่วนให้เท่ากัน
- เติม 2.5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ในหลอดหนึ่ง และเติม $Na_2S_2O_4$ ในหลอดหนึ่ง
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

4. วิธี HRP2 assay

<u>การทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolyzing)</u>

1. นำเพลทออกจากตู้อบหลังเลี้ยงเชื้อ 72 ชม. นำไปใส่ในช่องแช่แข็ง – 20°C จนสารละลาย ในเพลทแข็งตัว

2. นำเพลทออกจากช่องแช่แข็ง นำไปใส่ในตู้อบ 37°C จนสารในเพลทละลาย โดยวิธีนี้จะทำให้ เม็ดเลือดแดงแตก ถ้าเม็ดเลือดแดงยังแตกไม่หมดให้ทำซ้ำอีกจนเป็นสารละลายใส

<u>การอ่านผลด้วยวิธี ELISA</u>

1. การทำ ELISA จะใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปคือ Malaria Ag CELISA ของ Cellabs Pty Ltd., Brookvale, NSW. Australia, (http://www.cellabs.com.au) วิธีการทดสอบ คือ ตรวจดูความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือดผู้ป่วยก่อนทำการทดสอบจากนั้นเจือจางตัวอย่างที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้มีความหนาแน่นของเชื้อ 0.03-0.1%

2. นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ทุกหลุมๆละ 100 μl รวมทั้งหลุม control ที่เก็บไว้หลัง incubate ไปแล้ว 24 ชั่วโมง ที่ได้แช่แข็งเอาไว้มาใส่ในหลุม ELISA 2 หลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ผลจากหลุม control นี้จะใช้เพื่อลบ background

3. ปิดฝาเพลท ELISA นำไป incubate ใน chamber ที่มีความชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม.

4. เตรียมสารละลาย conjugate โดยเจือจาง conjugate 5 ไมโครลิตร ในตัวละลาย (conjugate diluent) 1 มิลลิลิตร ปริมาณที่เตรียมนี้ใช้ได้กับ ELISA strip 1 อัน

5. เตรียม washing solution โดยเติม PBS-Tween concentrate 50 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร

6. ล้างเพลท 5 ครั้งด้วย washing solution ครั้งละ 200 ไมโครลิตร/หลุม ตบเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

7. เติม conjugate ที่ได้ตรียมไว้แล้วลงทุกหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ปิดฝาเพลท นำไป incubate ใน chamber ที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม.

8. เตรียมสารละลาย substrate ก่อนที่จะครบเวลา incubate โดยผสม TMB chromogen 50 ไมโครลิตร กับ substrate buffer 1 มิลลิลิตร (สารละลายนี้จะอยู่ได้นานเพียง 30 นาทีเท่านั้น)

9. ล้างเพลท 5 ครั้งด้วย washing solution ครั้งละ 200 ไมโครลิตร/หลุม ตบเพลทบนกระดาษซับให้แห้ง

10. เติม Substrate ลงในทุกหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร incubate ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

11. เติม stop solution ทุกหลุมๆละ 50 เคาะเพลทเบาๆ เพื่อให้สารละลายผสมกัน

12. อ่านค่า OD ด้วยเครื่องอ่าน (ELISA plate reader) ที่ 450 nm ใช้อากาศเป็น blank

<u>การวิเคราะห์ผล และการรายงานผล</u>

วิเคราะห์ด้วย computer โดยใช้โปรแกรม Non-linear model เช่น HN-Nonlin