บทความปริทัศน์

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

วีระชัย เอื้อสิทธิชัย

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย ผู้ป่วยจะมีอาการรุนแรงได้หากไม่สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีความไวต่อยาที่ใช้ในการรักษาต่างกัน การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย สามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยรายที่สงสัยว่าติดเชื้อมาลาเรีย แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ จะต้องมีจำนวนเชื้อมาลาเรียในเลือดมากพอจึงจะสามารถตรวจพบได้ รวมทั้งต้องมีความเชี่ยวชาญในการแยกชนิดของเชื้อมาลาเรีย การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีวิทยาภูมิคุ้มกันสามารถทำได้ทั้งการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งให้ความไวอยู่ที่ ๑๐๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร เมื่อทำการตรวจด้วยหลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟฟี่ การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ไฮบริไดเซชั่น Polymerase chain reaction (PCR) และ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งให้ค่าความไวอยู่ที่ ๐.๐๐๔ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุลจะเป็นวิธีที่มีความไวสูงและถูกต้องแม่นยำ แต่ยังมีข้อจำกัดคือ มีราคาแพง การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี LAMP จึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่นอกจากให้ผลความไวใกล้เคียงกับ PCR แล้ว ยังจะมีราคาถูกและไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง ในบทความปริทัศน์นี้ได้ทำการสรุปหลักการและเหตุผลในการตรวจ รวมทั้ง ข้อดี ข้อเสีย ของแต่ละวิธีเพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัย และรักษาโรคมาลาเรียต่อไป

คำสำคัญ: มาลาเรีย, การตรวจวินิจฉัย, ชีววิทยาระดับโมเลกุล

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุขอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบเขตร้อน (Tropical regions) ในปี ค.ศ. ๒๐๐๘ มีการรายงานว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยติดเชื้อ ๒๔๓ ล้านคน (ร้อยละ ๘๖ ในแอฟริกา) และพบว่ามีการเสียชีวิต ๘๖๓,๐๐๐ คน (ร้อยละ ๘๙ ในแอฟริกา)[๑] โดยพบว่ามีอัตราการเสียชีวิตสูงในเด็ก ทุกๆ ๓๐ วินาที จะมีเด็กหนึ่งคนเสียชีวิตจากการติดเชื้อมาลาเรีย โดยสาเหตุในการเสียชีวิตมักเนื่องมาจากการติดเชื้อมาลาเรียในสมอง (Cerebral malaria) ผู้ป่วยมาลาเรียส่วนใหญ่อาการจะไม่รุนแรง พบว่ามีเพียงร้อยละ ๑-๒ เท่านั้นที่มีอาการรุนแรง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียที่ถูกต้อง และแม่นยำเมื่อมีการติดเชื้อในระยะแรก จึงมีความสำคัญอย่างมากในการที่จะบ่งชี้การติดเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด ทั้งนี้เพื่อให้สามารถทำการรักษาได้อย่างถูกต้องและทันท่วงที และป้องกันไม่ให้เกิดอาการรุนแรงหรือเสียชีวิต

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียสามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยรายที่สงสัยว่าติดเชื้อมาลาเรีย แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด

โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คือจะต้องมีจำนวนเชื้อมาลาเรียในเลือดมากพอจึงจะสามารถตรวจพบได้ รวมทั้งต้องมีความเชี่ยวชาญในการแยกชนิดของเชื้อ ซึ่งจะมีความสำคัญในการรักษาโรค เนื่องจากเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด *(Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae)* จะมีความไวต่อยาที่ใช้ในการรักษาต่างกัน และโดยเฉพาะจะมีปัญหาอย่างมากในกรณีมีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าหนึ่งชนิด

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์มี ๒ วิธีใหญ่ๆ คือ ฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick smear) กับฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin smear) และย้อมด้วยสียิมซ่า (Giemsa stain) ซึ่งข้อดีของการตรวจเชื้อด้วยฟิล์มเลือดชนิดหนาคือทำให้โอกาสในการตรวจพบเชื้อมาลาเรียสูงขึ้น (๕-๒๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร) หรือเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัย แต่มีข้อเสียคือจะแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ยากเนื่องจากจะเห็นรูปร่างของเชื้อมาลาเรียได้ไม่ชัดเจน ซึ่งแตกต่างจากการตรวจแบบฟิล์มเลือดชนิดบางซึ่งจะมีโอกาสในการตรวจพบเชื้อได้น้อยกว่าแต่สามารถแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้แม่นยำกว่า

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังมีข้อเสียอยู่มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องของความไวในการทดสอบ (sensitivity) จึงได้มีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีอื่นๆ เพื่อให้การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียมีความถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น โดยนำเทคนิคทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนเพื่อบ่งชี้การติดเชื้อด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น radio-immunoassay (RIA), fluorescence-immunoassay (FIA) enzyme-immunoassay (EIA) และ immuno-chromatography (ICT) เป็นต้น แต่วิธีที่เป็นที่นิยมมากที่สุดคือ EIA และ ICT เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องใช้สารไอโซโทปซึ่งเป็นอันตราย และราคาไม่แพง ซึ่งความไวและความจำเพาะของการทดสอบจะขึ้นอยู่กับแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจจับแอนติเจนของเชื้อ

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียได้ด้วยหลักการ immunoassay ข้อดีคือเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่จะสามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ช้ากว่าการตรวจหาแอนติเจน เนื่องจากจะสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียได้อย่างน้อย ๑-๒ สัปดาห์ หลังการติดเชื้อ ซึ่งหากผู้ป่วยอยู่ในระยะที่เชื้อยังอยู่ในตับ (liver stage) เพื่อเพิ่มจำนวนและยังไม่แพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด (blood stage) จะไม่สามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือดด้วยวิธีทางกล้องจุลทรรศน์ บางกรณีที่เชื้อมาลาเรียอาศัยอยู่ในตับเป็นเวลานานโดยไม่เข้าสู่กระแสเลือด แอนติเจนของเชื้อจะถูกคัดหลั่งและขับออกมาอยู่ในกระแสเลือด ซึ่งร่างกายของผู้ป่วยจะสร้างแอนติบอดีขึ้นเพื่อมาต่อต้านเชื้อมาลาเรีย ทำให้ความไวในการตรวจวินิจฉัยเพิ่มขึ้น แต่การตรวจหาแอนติบอดีจะมีข้อเสียคือไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute) เรื้อรัง (chronic) ไข้กลับจากระยะซ่อนตัว hypnozoite (relapse) การกลับมีเชื้อในกระแสเลือดอีกครั้ง (recrudescence) หรือในรายที่เคยติดเชื้อมาก่อน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจผู้ป่วยในแหล่งระบาด (endemic area) ซึ่งมีการติดเชื้อตลอดเวลาแต่อาจไม่แสดงอาการอาจจะมีแอนติบอดีอยู่ตลอดเวลา

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันแม้ว่าจะให้มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ก็มีข้อเสียที่สำคัญคือ การทดสอบมีหลายขั้นตอน ในแต่ละขั้นตอนต้องใช้เวลาเพื่อให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยากัน ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยแบบรวดเร็ว (rapid diagnostic test, RDT) โดยนำหลักการทางวิทยาภูมิคุ้มกันและโครมาโตรกราฟฟี่มารวมกันและพัฒนาเป็นวิธีอิมมูโนโครมาโตรกราฟฟี่ (immuno-chromatography, ICT) เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ histidine rich protein (HRP)[๒] และ lactate dehydrogenase (LDH)[๓, ๔] เป็นต้น เป็นตัวดักจับแอนติเจนในตัวอย่างเลือด จากนั้นแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยโลหะหนักหรือสี ซึ่งมักจะให้ผสมกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในขั้นตอนแรก ก่อนที่จะทำการหยอดลงบนแถบทดสอบ โดยแอนติบอดีที่ติดฉลากจะจับกับแอนติเจนในตัวอย่างทดสอบและจะวิ่งไปพร้อมๆ กันในรูปของแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ ก่อนที่จะถูกดักจับด้วยแอนติบอดีอีกตัวหนึ่งที่เคลือบอยู่บนแถบทดสอบ และรวมตัวกันจนเกิดเป็นแถบขึ้น ข้อดีของการทดสอบด้วยวิธี ICT คือ รวดเร็ว และไม่ต้องการเครื่องมือพิเศษหรือมีราคาแพงในการทดสอบ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่มีการระบาดได้ ซึ่งมักจะเป็นถิ่นทุรกันดารและไม่มีไฟฟ้าใช้ แต่มีข้อเสียคือความไว วิธี ICT จะสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้เมื่อมีเชื้อในตัวอย่างตรวจมากกว่า ๑๐๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร นอกจากนี้ยังมีปัญหาในเรื่องความจำเพาะ (specificity) ซึ่งอาจให้ผลบวกปลอม หรือลบปลอมได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วย rheumatitis ซึ่งมี rheumatoid factor[๕, ๖] ที่สามารถทำ

ปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติบอดีที่ใช้ดักจับได้ อย่างไรก็ตาม วิธี ICT ยังคงเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการตรวจเพื่อรักษาเบื้องต้น เนื่องจากรวดเร็วแต่จำเป็นต้องมีการพัฒนาต่อไป หรือใช้เป็นวิธีตรวจยืนยันควบคู่ไปกับวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟิล์มหนาและฟิล์มบางก็จะช่วยลดอัตราการให้ผลลบปลอมและบวกปลอมได้ระดับหนึ่ง

จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยเทคนิคการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์หรือเทคนิคทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นยังไม่สามารถที่จะครอบคลุมความต้องการและความเหมาะสมกับพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียได้ จึงได้มีการนำเทคนิคทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมแทนการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งคาดว่าจะสามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจวินิจฉัยได้ เทคนิค DNA hybridization เป็นวิธีที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัย แม้ว่าจะให้ผลการทดสอบที่ดีแต่ยังมีข้อจำกัดบางประการในการที่นำไปใช้ทดสอบในแหล่งระบาด เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่าง ๆ รวมถึงเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง โดยมีการศึกษาและพัฒนาวิธี PCR มาประยุกต์ใช้กับการตรวจเชื้อมาลาเรีย เช่น conventional PCR, reverse transcription PCR, nested PCR, Real time PCR, multiplex PCR เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพงเหมือนกับ PCR โดยดีเอ็นเอเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR หรือ LAMP มีหลายยีนแต่ที่นิยมและให้ผลการทดสอบดี ได้แก่ ยีน small subunit 18S ribosomal RNA[๗, ๘] เนื่องจากมีปริมาณมากในสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย และสามารถเพิ่มความไวในการทดสอบ โดยมีค่าความไวอยู่ที่ ๐.๐๐๔-๓๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร[๙]

การเก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

การเตรียมตัวอย่างจะเป็นส่วนสำคัญมากในการตรวจวินิจฉัย สารพันธุกรรมที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PCR สารพันธุกรรมนั้นอาจจะเป็นอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีวิธีสกัดแตกต่างกันไปและจะต้องปราศจาก DNase และ RNase เพื่อป้องกันการย่อยสลายของสารพันธุกรรม โดยตัวอย่างทดสอบอาจจะได้มาจากการเจาะเลือดจากปลายนิ้วหรือเส้นเลือดดำของผู้ป่วย หรืออาจใช้ตัวอย่างเลือดที่หยดลงบนกระดาษกรอง การตรวจการติดเชื้อในยุงสามารถทำได้โดยการตัดส่วนปีกและส่วนขาของยุงออก[๑๐] การเก็บตัวอย่างในที่เย็น (-๒๐ องศาเซลเซียส) และแห้งจะช่วยลดโอกาสการย่อยสลายของสารพันธุกรรมได้ หรือในกรณีที่ต้องส่งตรวจเป็นระยะทางไกลก็อาจใช้ transport media เพื่อช่วยในการคงสภาพของสารพันธุกรรมไว้ หากไม่สามารถทำการเตรียมสารพันธุกรรมได้ทันที ในกรณีที่ตัวอย่างทดสอบเป็นเลือดต้องใส่สารกันเลือดแข็ง เช่น EDTA หรือ heparin แต่ต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสมกับปริมาณเลือด ไม่เช่นนั้นจะมีการปนเปื้อนในตัวอย่างทดสอบ เนื่องจากสารกันเลือดแข็งเหล่านี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ได้

การเตรียมสารพันธุกรรม

การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียสามารถทำได้ทั้งการสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ โดยพบว่าในปัจจุบันมีชุดสกัดสำเร็จรูปมากมาย เพื่อช่วยในการสกัดให้ได้สารพันธุกรรมที่มีคุณภาพดี ปราศจากการปนเปื้อนตัวยับยั้งและมีความบริสุทธิ์สูง แต่มักมีราคาแพงทำให้การทดสอบมีราคาสูงขึ้นซึ่งอาจจะไม่เหมาะกับบางประเทศ เนื่องจากผู้ป่วยมาลาเรียส่วนใหญ่จะมีฐานะทางเศรษฐกิจไม่ดี ทำให้ไม่สามารถเข้าถึงวิธีการทดสอบได้ ดังนั้นวิธีที่เหมาะกับการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียควรจะมีราคาไม่แพงแต่ให้สารพันธุกรรมที่มีคุณภาพและมีการปนเปื้อนน้อย เช่น การต้มหรือการใช้น้ำทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกออก และใช้สารฟีนอล-คลอโรฟอร์มสกัดโปรตีนออก ก่อนที่จะตกตะกอนสารพันธุกรรมด้วยแอลกอฮอล์[๑๐] ซึ่งพบว่าสามารถนำไปใช้เป็นตัวอย่างในการทดสอบด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้

Hybridization

เทคนิค hybridization เป็นวิธีที่ใช้โพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เอนไซม์ สารฟลูโอเรสเซนท์ หรือโปรตีนบางชนิด เช่น digoxigenin หรือ biotin เป็นตัวติดตาม เพื่อให้โพรบจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (complementary) โดยโพรบที่ใช้อาจเป็นโพรบชนิดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอได้ โดยหลักการโพรบชนิดอาร์เอ็นเอจะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดีกว่าโพรบชนิดดีเอ็นเอ เนื่องจากอาร์เอ็นเอจะจับกับอาร์เอ็นเอได้ดีที่สุด อาร์เอ็นเอ-ดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอ-

ดีเอ็นเอ จะจับกันไม่ดีรองลงมาตามลำดับ ดังนั้น การใช้โพรบชนิดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อมาลาเรียจะเป็นวิธีที่ดีที่สุด

ในปี ค.ศ. ๑๙๘๖ Oquendo และคณะ[๑๑] ได้รายงานลำดับเบสของ repetitive DNA ความยาว ๒๑ คู่เบส ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. ๑๙๘๗ Holmberg และคณะ[๑๒] ได้ทำการทดสอบการติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารั่มในผู้ป่วยแกมเบีย โดยใช้โพรบชนิดดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย^{๓๒}P พบว่าค่าความจำเพาะและความไวของการทดสอบเท่ากับร้อยละ ๑๐๐ และ ๖๘ ตามลำดับ แต่ในการศึกษาของ McLaughlin และคณะ[๑๓] พบว่าเมื่อติดฉลากด้วย T4 kinase พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียพบได้ที่ ๑,๐๐๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีการติดฉลากก็จะมีผลต่อความไวในการทดสอบเช่นกัน นอกจากนี้ McLaughlin และคณะ[๑๔] ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพกับโพรบที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียพบได้ที่ ๑๐๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร ต่อมาในปี ค.ศ. ๑๙๘๘ Sethabutr และคณะ[๑๕] ได้ทำการทดสอบการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยไทย โดยใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่มีความยาว ๒๑ bp ที่ติดฉลาก ^{32}P ด้วยวิธี Nick translation พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียพบได้ที่ ๑๐๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร

ในปี ค.ศ. ๑๙๘๘[๑๖] ได้มีการรายงานลำดับเบสของ small subunit 18S ribosomal RNA (18S rRNA) ต่อมาในปี ค.ศ. ๑๙๙๕ Waters และ McCutchan[๑๗] ได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยใช้โพรบแบบจำเพาะ (specific probe) กับ 18S rRNA ซึ่งให้ความไวและความจำเพาะสูง โดยสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง ๔ ชนิด ด้วยโพรบ oligonucleotide ที่ติดฉลากด้วย ^{๓๒}P ที่จำเพาะกับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดพบว่าให้ผลการทดสอบที่ดี โดยสามารถตรวจพบได้แม้ว่าจะมีเชื้อมาลาเรียเพียง ๑๐ ตัวต่อการทดสอบ การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยง่ายเพียงหยดเลือดลงบนเมมเบรนชนิดไนลอน (nylon membrane) แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีสารกัมมันตภาพรังสี จำเป็นต้องมีห้องปฏิบัติการที่รองรับจึงไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่ที่มีการระบาด ต้องทำการขนย้ายตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการซึ่งทำให้ต้องใช้เวลาตรวจนานมากกว่า ๒๔ ชั่วโมง ในการศึกษาของ Barker และคณะ[๑๘] พบว่าการเตรียมตัวอย่างสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียนั้นมีผลต่อความไวของปฏิกิริยา ในการทดสอบวิธี hybridization นั้นเป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอนและต้องใช้เวลา และมักจะตรวจแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียไม่ได้ โดยจะเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหามาลาเรียชนิดฟัลซิพารั่มเป็นส่วนใหญ่ และความไวของการทดสอบยังไม่มีประสิทธิภาพดีพอ ประกอบกับการพัฒนาเทคนิค PCR ซึ่งง่ายกว่าเนื่องจากใช้เครื่องมือเข้ามาช่วย ทำให้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่าง ๆ มากมาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มีจำนวนมากขึ้น ประกอบด้วย ๓ ขั้นตอนหลักคือ

๑. Denature เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอเส้นคู่เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว เพื่อให้ไพร์เมอร์ (primer) สามารถเข้าจับกับเบสคู่สม โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ ๙๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ ๓๐-๖๐ วินาที เป็นตัวช่วยในการแยกสายออกจากกัน

๒. Annealing เป็นขั้นตอนการที่ให้ไพร์เมอร์ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการสร้างสายดีเอ็นเอเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ ๔๕-๖๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ ๓๐-๖๐ วินาที

๓. Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ heat stable DNA polymerase เช่น *Taq* DNA polymerase เป็นต้น มีสายไพร์เมอร์เป็นตัวเริ่มต้น ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ ๗๒ องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ ๓๐-๖๐ วินาที

เมื่อครบหนึ่งรอบดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นหนึ่งเท่าตัว ดังนั้นหากทำ PCR จำนวนรอบมากขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเท่ากับ ๒^{n} (n = จำนวนรอบ) ซึ่งโดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR จะทำประมาณ ๓๐-๓๕ รอบ ก็จะทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายจากหนึ่งชุดเป็นหลายล้านชุด (๑,๐๗๔ ล้าน-๓๔,๓๖๐ ล้าน) ภายในเวลาเพียง ๒-๓ ชั่วโมง

หลังจากที่ทำปฏิกิริยา PCR จะต้องนำผลผลิตที่ได้ไปทดสอบบน agarose gel electrophoresis เพื่อดูแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ต้องใช้เวลาในการทดสอบมากขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นวิธี real-time PCR คือ ทำการติดตามการเพิ่มขึ้นของสายดีเอ็นเอโดยใช้สีฟลูโอเรสเซนท์ (fluorescence) เช่น SYBR green ซึ่งจะทำการวัดการดูดกลืนแสงของสีฟลูโอเรสเซนท์ทุก ๆ รอบของการทำปฏิกิริยา

PCR ทำให้สามารถทราบผลการเพิ่มจำนวนได้ทันที เมื่อจำนวนดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นสีฟลูโอเรสเซนท์จะจับดีเอ็นเอมากขึ้น ทำให้สามารถติดตามดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นได้ แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือจะไม่ทราบชนิดของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นว่าเป็นดีเอ็นเอเป้าหมายหรือเป็นการเพิ่มดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ เนื่องจากสีฟลูโอเรสเซนท์จะจับดีเอ็นเอได้ทุกชนิดไม่ว่าจะมีลำดับเบสเป็นอย่างไร ซึ่งสามารถลดความไม่จำเพาะลงได้ระดับหนึ่งโดยการทำการวิเคราะห์ melting temperature (Tm) เนื่องจากการที่ดีเอ็นเอมีลำดับเบสต่างกันจะมีความแตกต่างกันของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้สายดีเอ็นเอเส้นคู่จำนวนครึ่งหนึ่งแยกออกจากกันต่างกันทำให้สามารถทดสอบได้ว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นในปฏิกิริยา PCR มี Tm ตรงกันกับดีเอ็นเอเป้าหมายหรือไม่ ก็จะทำให้ความจำเพาะของการทดสอบสูงขึ้น

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาอีกขั้นหนึ่งเพื่อเพิ่มความจำเพาะโดยใช้โพรบเป็นตัวติดตามโพรบเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณระหว่างไพร์เมอร์ ๕' และ ๓' โดยปลายข้างหนึ่งของโพรบจะติดฉลากด้วยสีฟลูโอเรสเซนท์และอีกข้างหนึ่งจะติดฉลากด้วยตัวดูดกลืนสีฟลูโอเรสเซนท์ที่เรียกว่า quencher ดังนั้นในกรณีที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอแสงที่สีฟลูโอเรสเซนท์ปล่อยออกจะถูกดูดกลืนโดย quencher แต่ถ้ามีการสร้างสายดีเอ็นเอขึ้น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase สร้างดีเอ็นเอจากไพร์เมอร์ ๕' จนมาถึงบริเวณที่โพรบจับอยู่และสร้างสายของดีเอ็นเอต่อเนื่องเข้ามาในบริเวณที่โพรบจับอยู่และใช้ปฏิกิริยา ๕'-๓' exonuclease ซึ่งเป็นคุณสมบัติ (activity) ที่พบได้ในเอนไซม์ DNA polymerase ทำลายพันธะ phosphodiester ของโพรบ ทำให้เบสแยกออกจากโพรบด้วยปฏิกิริยา ๕'-๓' exonuclease จากนั้นเมื่อสีฟลูโอเรสเซนท์และ quencher ที่ติดอยู่ที่เบสแยกห่างออกจากกัน ทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีฟลูโอเรสเซนท์ที่ปล่อยแสงออกมาได้ โดยที่ไม่มีตัวดูดกลืนแสง quencher ก็จะทำให้ทราบการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอได้ทันทีและเพิ่มความจำเพาะของผลิตผล PCR ที่เกิดขึ้น เนื่องจากมีการเพิ่มความจำเพาะ ๒ ส่วนคือนอกจากที่ไพร์เมอร์จะต้องจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะแล้ว โพรบจะต้องจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเช่นกัน ทำให้เพิ่มความจำเพาะของ real-time PCR มากยิ่งขึ้น

จะเห็นได้ว่าโดยหลักการวิธี PCR สามารถเพิ่มความไวให้กับตรวจวินิจฉัยโรคได้ แต่ในทางกลับกันหากมีการปนเปื้อนหรือมีการตกค้าง (carry over) ของผลผลิตที่เกิดจากการทำ PCR (PCR product) จะทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเฝ้าระวังและป้องกันการปนเปื้อนหรือตกค้าง ในกรณีที่เกิดปัญหาปนเปื้อนหรือตกค้างของผลิตผลที่เกิดจาก PCR และทำให้เกิดผลบวกปลอม สามารถป้องกันและแก้ไขได้โดยใช้เอนไซม์ UNG ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัด uracil ออก ทำให้สายของดีเอ็นเอที่มี uracil เป็นส่วนประกอบถูกทำลายก่อนที่จะเริ่มทำปฏิกิริยา PCR ดังนั้นหากใช้เบส dUTP แทน dTTP ในการทำปฏิกิริยา PCR ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จะมี dUTP แทนที่ dTTP และหากทำการเตรียมตัวอย่างตรวจโดยใส่เอนไซม์ UNG ผลิตผลดีเอ็นเอที่เกิดจาก PCR ที่ตกค้างหรือปนเปื้อนก็จะถูกทำลายและเหลือเฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมายที่มาจากเชื้อทดสอบเท่านั้นที่จะถูกเพิ่มจำนวนต่อไป

ในการทำปฏิกิริยา PCR นั้นบางครั้งให้ผลลบปลอมได้ในกรณีที่มีสารยับยั้ง (inhibitor) การทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง heme ซึ่งมีธาตุเหล็กเป็นส่วนประกอบ จะสามารถรบกวนปฏิกิริยา PCR ได้ในกรณีที่มีการปนเปื้อนจากขั้นตอนวิธีการสกัดสารพันธุกรรม หรือการใช้สารกันเลือดแข็งตัวเช่น EDTA จะสามารถยับยั้งเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ได้ โดยการจับกับ magnesium ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ไม่ดี นอกจากนี้ในกรณีที่ผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องที่เกิดจากการติดเชื้อ HIV ซึ่งมีความจำเป็นจะต้องทานยาต้านไวรัสชนิดที่เป็นอนาลอคของเบส (base analog) ทำให้การทดสอบด้วยวิธี PCR ให้ผลลบปลอมได้เช่นกัน โดยสามารถแก้ไขได้โดยการเจือจางตัวอย่างซึ่งจะเป็นการเจือจางตัวยับยั้งต่างๆ ให้ปริมาณความเข้มข้นของตัวยับยั้งน้อยลงและไม่รบกวนหรือยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้

การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยเทคนิค PCR จำเป็นต้องมีการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อให้จำเพาะกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมาย ได้แก่ small subunit 18S ribosomal rRNA gene (18S rRNA) ซึ่งพบว่า 18S rRNA gene มีจำนวนชุดมากและมีลำดับเบสคงที่ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง ซึ่งทำให้สามารถออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะได้ ทำให้โอกาสในการตรวจหาเชื้อพบมีมากขึ้น ในปี ค.ศ. ๑๙๙๓ Snounou และคณะ[๗] ได้รายงานวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR ซึ่งสามารถระบุชนิดของเชื้อ

มาลาเรียได้ทั้ง ๔ ชนิด โดยไพร์เมอร์จำนวน ๕ คู่ คู่แรกเป็นไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับจีนัสและอีก ๔ คู่มีความจำเพาะกับมาลาเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *P. falciparum, P. vivax, P. malariae* และ *P. ovale* ซึ่งทำให้ได้ผลผลิต PCR ขนาด ๒๐๕ คู่เบส *(P. falciparum)* ๑๒๐ คู่เบส *(P. vivax)* ๑๔๔ คู่เบส *(P. malariae)* และ ๘๐๐ คู่เบส *(P. ovale)* และทำการอ่านผลโดยดูแถบดีเอ็นเอบน agarose gel electrophoresis ผลการทดสอบพบว่ามีความไวที่จำนวน ๑๐ ตัว นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมในกรณีที่ติดเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งหากดูจากฟิล์มเลือดบางครั้งอาจจะไม่สามารถบ่งชี้ได้ แต่พบว่าจากการตรวจด้วยวิธี PCR นี้ มีการเกิดผลลบปลอมและผลบวกปลอมได้ในสัดส่วน ๕/๑๕๖ และ ๑๖/๑๕๖ ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. ๒๐๐๖ Johnston และคณะ[๑๕] ได้ทำการศึกษายืนยันด้วยวิธีเดียวกันกับ Snounou (๑๙๙๓) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมฟิล์มเลือดด้วยสียิมซ่าพบว่า วิธี nested PCR ให้ความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธีการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามี ๗ รายจากทั้งหมด ๗๗ รายที่ให้ผลลบปลอมเมื่อตรวจด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์แต่ให้ผลบวกกับ nested PCR นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR จะสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิด (mixed infection) ได้มากกว่าวิธีกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาได้

นอกเหนือจาก 18S rRNA gene แล้วยังมีการศึกษาโดยใช้ยีนอื่นๆ จากเชื้อมาลาเรีย เช่น circumsporozoite gene, 21 bp repeat sequence, ring-infected erythrocyte surface antigen (pf155/RESA) และ dihydrofolate reductase (DHFR) แต่มีข้อจำกัดคือสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้บางชนิดเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วให้ค่าความไวต่ำกว่าจึงไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้[๒๐] ในปี ค.ศ. ๑๙๙๙ Tham และคณะ[๒๑] ได้ทำการทดสอบความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับ mitochondria cytochrome C oxdiase subunit I (cox I) ของแต่ละสปีชี่ พบว่ามีประสิทธิภาพดี ความไวในตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่สามารถตรวจพบได้คือ ๐.๐๑ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร ต่อมาในปี ค.ศ. ๒๐๐๔ Fabre และคณะ[๒๒] ได้ทำการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR และใช้สี SYBR green I เป็นตัวติดตาม พบว่าให้ค่าความไวต่ำลงคือสามารถตรวจพบได้คือ ๐.๐๓๕ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร ต่อมาได้มีการทดสอบการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี real-time PCR ต่อมาอีกหลายครั้งโดยใช้สีฟลูโอเรสเซนท์ โพรบ ไพร์เมอร์ ที่จำเพาะกับยีนต่างๆ ของเชื้อมาลาเรีย แต่พบว่าประสิทธิภาพ ในการทดสอบและความไวไม่แตกต่างอย่างชัดเจนจากวิธี conventional PCR ของ Snounou[๕] ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี real-time PCR ซึ่งนอกจากไม่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจแล้ว ยังพบว่ามีราคาแพงและจำเป็นต้องใช้เครื่องมือจำเพาะสำหรับทดสอบซึ่งมีราคาสูงมาก ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี conventional PCR น่าเป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียมากกว่าวิธี real-time PCR

การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR แม้ว่าจะให้ผลการทดสอบรวดเร็ว แม่นยำ แต่ยังมีข้อจำกัดอยู่บางประการ เช่น เครื่องควบคุมรอบอุณหภูมิ (thermal cycle) ซึ่งมีราคาแพงแม้ว่าจะถูกกว่าเครื่อง real-time PCR ก็ตาม จึงไม่เหมาะกับการนำวิธี PCR ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่จะอยู่ในประเทศยากจนและไม่มีเครื่องมือดังกล่าวอย่างเพียงพอสำหรับทดสอบ นอกจากนี้วิธี PCR ยังไม่เหมาะกับการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยบริเวณที่เป็นแหล่งระบาด เนื่องจากต้องใช้ไฟฟ้าทำให้ต้องเก็บตัวอย่างผู้ป่วยและนำมาทดสอบภายหลัง ซึ่งการที่ไม่ได้ทดสอบทันทีอาจทำให้สารพันธุกรรมสลายตัวได้ (degrade) หากไม่มีระบบการเก็บและระบบการ ขนส่งที่ดีพอ จึงได้มีการพัฒนา transport media สำหรับการขนส่งตัวอย่างเพื่อเก็บรักษาคุณภาพตัวอย่าง การหยดเลือดลงบนกระดาษกรองที่สะอาดก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถนำมาใช้ได้กับการเก็บตัวอย่างมาลาเรียและสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ภายหลังและเป็นที่นิยมใช้กัน

การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR สามารถตรวจหาเชื้อได้ดีที่สุดคือการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารั่มคือ ๐.๐๐๔ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร[๒๓] ซึ่งมีความไวสูงมากในกรณีที่ผู้ป่วยมีเลือดทั้งหมดร่างกายอยู่ ๕ ลิตร หมายความว่าความไวในการตรวจเท่ากับ ๒๐,๐๐๐ ตัวของเชื้อมาลาเรีย ในกรณีนี้ทำให้เกิดแนวคิด ๓ ประการ คือ

๑. ระดับของ parasitemia ๐.๐๐๔ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร นั้นผู้ป่วยอาจจะยังไม่แสดงอาการ ซึ่งเป็นข้อดีในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นนักท่องเที่ยวจากประเทศที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรียเดินทางไปยังแหล่งระบาด และเริ่มมีอาการหรือตรวจคัดกรองว่ามีการติดเชื้อหรือไม่หลังจากเดินทางไปในพื้นที่ที่มีการระบาด

๒. ในกรณีของเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะชนิดฟัลซิพารั่มนั้นจะมีปรากฏการณ์ sequestration โดยเชื้อมาลาเรียจะไปเกาะอยู่ตามผนังหลอดเลือดทำให้เชื้อมาลาเรียส่วนหนึ่ง ไม่อยู่ในตัวอย่างเลือดที่เจาะตรวจ ดังนั้นจะทำให้ความไวในการตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PCR ลดลง หรือผู้ป่วยจะต้องมีเชื้อมากกว่า ๒๐,๐๐๐ ตัวในร่างกาย ซึ่งผู้ป่วยอาจจะเริ่มแสดงอาการของโรคแล้ว

๓. ในกรณีผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในแหล่งระบาด ผู้ป่วยอาจจะไม่มีอาการแม้ว่ามีเชื้อมาลาเรียอยู่ในร่างกาย ดังนั้นในด้านการรักษาผู้ป่วยมาลาเรีย การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค PCR อาจจะไม่มีความจำเป็น การตรวจด้วยวิธี RDT ซึ่งมีความไวต่ำกว่าอาจจะเหมาะสำหรับการตรวจเพื่อการรักษามากกว่า

ดังนั้นในการตรวจผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี RDT ที่มีความไวอยู่ที่ประมาณ ๑๐๐ ตัวต่อเลือด ๑ ไมโครลิตร จะรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าการตรวจด้วยวิธี PCR ซึ่งต้องใช้เวลานาน ทำให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็วและทันท่วงที วิธี PCR น่าจะเป็นวิธีที่ใช้สำหรับทดสอบในงานวิจัย ระบาดวิทยาหรือการควบคุมโรค รวมถึงการตรวจวินิจฉัยสำหรับการพัฒนาหรือทดสอบวัคซีนโรคมาลาเรีย ซึ่งจำเป็นต้องใช้วิธีที่มีความไว ความจำเพาะและถูกต้องสูง นอกจากนี้เทคนิค real-time PCR มีประโยชน์อย่างมากในการนำไปใช้ในการติดตามการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งจะสามารถบ่งชี้จำนวนชุดของยีนดื้อยาได้

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

วิธี loop-mediated isothermal amplification พัฒนาโดยบริษัท Eiken Chemical Co., Ltd. เป็นวิธีการเพิ่มดีเอ็นเอคล้ายๆ กับการทำ PCR แต่แตกต่างจาก PCR ที่เป็นการเพิ่มดีเอ็นเอที่อุณหภูมิเดียวกันตลอดปฏิกิริยาคือที่อุณหภูมิประมาณ ๔๕-๖๕ องศาเซลเซียส ด้วยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase โดยดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวต่อเนื่องกัน เมื่อมีการสร้างสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยาจะมีการใช้ dNTPs ทำให้เกิด PPi (Pyrophosphate) และ PPi ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ magnesium ซึ่งจะตกตะกอนและขุ่น ทำให้สามารถวัดการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยเครื่องวัดความขุ่น โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง ๑ ชั่วโมง ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิค LAMP มาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัส เช่น เชื้อไข้หวัดใหญ่ H5N1[๒๔] H1N1[๒๕] corona (SARS)[๒๖, ๒๗] เป็นต้น ในการสร้างสายดีเอ็นเอด้วยวิธี LAMP จะมีไพร์เมอร์ ๔-๖ ตัว ได้แก่

Forward Inner Primer (FIP)
Forward Primer (F3)
Backward Inner Primer (BIP)
Backward Primer (B3)
Forward Loop Primer (FLP)
Backward Loop Primer (BLP)

โดยไพร์เมอร์ FLP และ BLP อาจจะใช้หรือไม่ใช้ก็ได้เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา LAMP เร็วขึ้น จะเห็นได้ว่า FIB และ BIP จะมีส่วนที่สามารถจับได้ทั้งเส้น sense และ antisense ดังนั้นเมื่อเกิดปฏิกิริยา LAMP สายของดีเอ็นเอจะเชื่อมต่อกันเป็น loop บริเวณปลายของดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งสองข้าง และจะเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอเส้นที่สร้างขึ้นใหม่ ทำให้เกิดเป็นดีเอ็นเอสายยาวเกี่ยวโยงกันไป โดยการแปลผลของ LAMP สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ วัดความขุ่นด้วยตาเปล่าหรือเครื่องวัดความขุ่น (turbidity meter) สีฟลูโอเรสเซนท์ SYBR green ซึ่งหากเป็นสีเขียวสะท้อนแสงจะเป็นผลบวกและเป็นสีส้มในกรณีที่เป็นผลลบ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปทดสอบด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งจะเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นแบบขั้นบันได (ladder) ตามความยาวของสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น ในขณะที่ผลลบจะไม่พบแถบของดีเอ็นเอ

ในปี ค.ศ. ๑๙๙๖ Poon และคณะ[๒๘] ได้รายงานการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารั่มด้วยวิธี LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับ 18S ribosomal RNA gene ของเชื้อ *P. falciparum* พบว่าให้ค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ ๙๕ และ ๙๙ ตามลำดับ ต่อมาในปี ค.ศ. ๒๐๐๗ Paris และคณะ[๒๙] ได้ทำการพัฒนาเทคนิค LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับ histidine-rich protein encoding gene พบว่าให้ค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ ๗๖.๑ และ ๘๙.๖ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าโดยส่วนใหญ่จะสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้เพียงชนิดเดียว ดังนั้นต่อมาในปี ค.ศ. ๒๐๐๗ Han และคณะ[๓๐] ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อมาลาเรียทั้ง ๔ ชนิด โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับ 18S ribosomal RNA gene พบว่าให้ค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ ๙๘.๕ และ ๙๔.๓ ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. ๒๐๐๙ Yamamura และคณะ[๓๑] ได้พัฒนาให้วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี LAMP และใช้การวิเคราะห์ melting temperature ร่วมด้วย พบว่า

ให้ค่าความไวสูงขึ้นคือร้อยละ ๙๗.๘ และความจำเพาะร้อยละ ๘๕.๗ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๐ Chen และคณะ[๓๒] ได้รายงานการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับ 18S ribosomal RNA gene ของเชื้อ *P. vivax* พบว่าให้ค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ ๙๘.๓ และ ๑๐๐ ตามลำดับ และเมื่อทำการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดโดยวิธีต้ม (heat-treated blood) พบว่ามีความไวและความจำเพาะร้อยละ ๙๓.๓ และ ๑๐๐ ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี LAMP เป็นวิธีที่ถูกต้อง แม่นยำ มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ยังมีราคาถูก และไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง สามารถทดสอบได้ด้วยตา ซึ่งเหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในการตรวจในพื้นที่แหล่งระบาด โดยหากตรวจควบคู่กับวิธี RDT และกล้องจุลทรรศน์แล้วจะทำให้ผลการตรวจมีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำดีขึ้น ซึ่งจะต้องทำการทดสอบต่อไป ในการทดสอบวิธี LAMP อาจจะทำการทดสอบได้ง่ายและไม่ซับซ้อน แต่อาจให้ผลบวกปลอมได้หากใช้ปริมาณของไพร์เมอร์มากเกินไป ซึ่งจะต้องระมัดระวังอย่างมากในการเตรียมปฏิกิริยาให้มีความแม่นยำและถูกต้อง

เอกสารอ้างอิง

๑. World Malaria Report. Geneva 2009.

๒. Shiff CJ, Premji Z, Minjas JN. The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993;87:646-8.

๓. 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.

๔. Moody AH, Chiodini PL. Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. Br J Biomed Sci 2002;59:228-31.

๕. Iqbal J, Sher A, Rab A. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factors. J Clin Microbiol 2000; 38:1184-6.

๖. Iqbal J, Khalid N, Hira PR. Performance of rapid malaria Pf antigen test for the diagnosis of malaria and false-reactivity with autoantibodies. Adv Exp Med Biol 2003;531:135-48.

๗. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993;61:315-20.

๘. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol 1993;58:283-92.

๙. Berry A, Benoit-Vical F, Fabre R, Cassaing S, Magnaval JF. PCR-based methods to the diagnosis of imported malaria. Parasite 2008;15:484-8.

๑๐. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. Methods Mol Biol 1996;50:263-91.

๑๑. Oquendo P, Goman M, Mackay M, Langsley G, Walliker D, Scaife J. Characterisation of a repetitive DNA sequence from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1986;18:89-101.

๑๒. Holmberg M, Shenton FC, Franzen L, Janneh K, Snow RW, Pettersson U, et al. Use of a DNA hybridization assay for the detection of *Plasmodium falciparum* in field trials. Am J Trop Med Hyg 1987;37:230-4.

๑๓. McLaughlin GL, Breman JG, Collins FH, Schwartz IK, Brandling-Bennett AD, Sulzer AJ, et al. Assessment of a synthetic DNA probe for *Plasmodium falciparum* in African blood specimens. Am J Trop Med Hyg 1987;37:27-36.

๑๔. McLaughlin GL, Ruth JL, Jablonski E, Steketee R, Campbell GH. Use of enzyme-linked syn-

thetic DNA in diagnosis of falciparum malaria. Lancet 1987;1:714-6.

๑๕. Sethabutr O, Brown AE, Gingrich J, Webster HK, Pooyindee N, Taylor DN, et al. A comparative field study of radiolabeled and enzyme-conjugated synthetic DNA probes for the diagnosis of falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1988;39:227-31.

๑๖. McCutchan TF, de la Cruz VF, Lal AA, Gunderson JH, Elwood HJ, Sogin ML. Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1988;28:63-8.

๑๗. Waters AP, McCutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. Lancet 1989;1:1343-6.

๑๘. Barker RH, Jr., Suebsaeng L, Rooney W, Wirth DF. Detection of *Plasmodium falciparum* infection in human patients: a comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis. Am J Trop Med Hyg 1989;41:266-72.

๑๙. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. J Clin Microbiol 2006;44:1087-9.

๒๐. Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995;8:113-30.

๒๑. Tham JM, Lee SH, Tan TM, Ting RC, Kara UA. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf tests in a clinical environment. J Clin Microbiol 1999;37:1269-73.

๒๒. Fabre R, Berry A, Morassin B, Magnaval JF. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. Parasitology 2004;128:15-21.

๒๓. Elsayed S, Plewes K, Church D, Chow B, Zhang K. Use of molecular beacon probes for real-time PCR detection of *Plasmodium falciparum* and other plasmodium species in peripheral blood specimens. J Clin Microbiol 2006;44:622-4.

๒๔. Jayawardena S, Cheung CY, Barr I, Chan KH, Chen H, Guan Y, et al. Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus. Emerg Infect Dis 2007;13:899-901.

๒๕. Kubo T, Agoh M, Mai le Q, Fukushima K, Nishimura H, Yamaguchi A, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. J Clin Microbiol 2010;48:728-35.

๒๖. Poon LL, Leung CS, Tashiro M, Chan KH, Wong BW, Yuen KY, et al. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay. Clin Chem 2004;50:1050-2.

๒๗. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Clin Microbiol 2004;42:1956-61.

๒๘. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. Clin Chem 2006;52:303-6.

๒๙. Paris DH, Imwong M, Faiz AM, Hasan M, Yunus EB, Silamut K, et al. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of

falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 2007;77:972-6.

๓๐. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. J Clin Microbiol 2007;45:2521-8.

๓๑. Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. Jpn J Infect Dis 2009;62:20-5.

๓๒. Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, et al. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Acta Trop 2010;113:61-5.

Abstract

Molecular diagnosis of malaria

Veerachai Eursitthichai

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

Malaria is an important infectious disease and causes severe public health problems in many tropical countries including Thailand. An effective diagnosis to discriminate the various *Plasmodium* species is needed to select the proper regimen for malarial treatment. Diagnosis of malaria by thick or thin blood films under the light microscope is the gold standard. The limitations of this technique are low sensitivity (5-20 parasites/μl) and the need for an experienced examiner able to discriminate the *Plasmodium* species. Diagnosis can also be based on the detection of circulating antibodies and antigens. The sensitivity of the immuno-chromatographical test (ICT) in detection of antigen is 100 parasites/μl. Nucleic acid based diagnosis, e.g., hybridization, polymerase chain reaction (PCR) or loop-mediated isothermal amplification (LAMP), can detect as little as 0.004 parasites/μl. Although the sensitivity of molecular diagnosis is very high, it requires in general expensive equipment. A favorable method which is inexpensive and effective for detection of malaria such as LAMP should be applied. In this article, the rationale, principle, advantage and disadvantage of each technique have been outlined to serve as a diagnostic guideline in the treatment of malaria.

Key words: Malaria, Diagnosis, Molecular biology