

Preparation of Positive Control from *Plasmodium falciparum* Culture for Using in Malaria Rapid Diagnostic Test

Tippawan Sungkapong*, Natpasit Chaianantakul, Kittisak Thawnashom
and Nalinnipa Weaingnak

*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand*

Abstract

Malaria is still a major public health problem in many countries including Thailand. There are 6 species of human malaria. Signs and symptoms of malaria infected-patients are non-specific but malaria treatment requires specific antimalarial drugs against each malaria species. If malaria disease is treated incorrectly, the malaria infected-patients will develop severe disease which can cause death, especially with *Plasmodium falciparum*-infected patients. Therefore, the correct diagnosis is very important. The common laboratory analyses of malaria in the hospital are microscopic examination and malaria rapid diagnostic test (MRDT). The microscopic examination is the standard method. However, this technique requires a highly skilled microscopist to identify the species of malaria. Recently, MRDT has been developed. This is a quick and easy method to detect the histidine-rich protein 2 (HRP-2) and plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) that are the proteins produced by malaria parasites. The quality of MRDT is very important to provide the correct malaria identification. Therefore, the objective of this research was to study the positive control preparation for MRDT from *P. falciparum* culture. The positive controls were prepared from malaria culture with parasite density 200, 2,000 and 20,000 parasites/ μ L. These control were stored in different temperatures (25, 4 and -20° C) at different storage times (1, 2, 3 and 4 weeks). Then the malaria parasite were diluted with distilled water at ratio 1:2 followed by the examination with MRDT. The result showed that positive control with parasite density 20,000 parasites/ μ L gave 100% positive results in all temperatures at all storage durations. Control with malaria parasite density 2,000 parasites/ μ L gave 100% positive results in all temperatures within 4 weeks. However, positive result of this control was reduced to 83% when stored at 25° C for 4 weeks. For control with malaria density 200 parasites/ μ L 100% positive result was obtained only at -20° C when stored for 1, 2 and 3 weeks. At 4 weeks

storage time the positive result was reduced to 67%. The positive result was reduced with higher storage temperature and longer storage duration. The results provide an optimal parasite density of 20,000 parasites/ μ L that gives 100% positive result in all storage temperature and all storage duration as positive control preparation for MRDT.

Keywords: Malaria rapid diagnostic test, Malaria, *Plasmodium falciparum*, Malaria culture

*Corresponding author E-mail address: tippawans@nu.ac.th

Received: February 20, 2018

Revised: June 8, 2018

Accepted: October 29, 2018

การเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวก สำหรับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปจากการเพาะเลี้ยง เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum*

ทิพวรรณ สังขพงษ์* ญัฐพลิชฐ์ ชัยอนันต์กุล กิตติศักดิ์ แถวนาชม

และ นลินนิภา เวียงนาค

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์มี 6 ชนิด ซึ่งอาการของผู้ป่วยโรคมาลาเรียเป็นแบบไม่จำเพาะ แต่การรักษาต้องการยาต้านเชื้อมาลาเรียที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด ถ้าได้รับการรักษาที่ไม่ถูกต้อง จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงขึ้นและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยแยกโรคจึงมีความสำคัญมาก การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่นิยมคือ การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะสูง ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และอาศัยทักษะของเจ้าหน้าที่น้อย ซึ่งวิธีนี้เป็นการตรวจหาโปรตีนจากเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ histidine-rich protein 2 (HRP-2) และ plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) โดยคุณภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปมีความสำคัญมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย เพื่อนำไปควบคุมคุณภาพของชุดตรวจสำเร็จรูป โดยเตรียมเชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่น 200, 2,000 และ 20,000 parasites/ μ L แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:2 ก่อนนำไปทดสอบ พบว่าตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 20,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกกับชุดตรวจสำเร็จรูปร้อยละ 100 จากการเก็บรักษาทุกอุณหภูมิ และทุกช่วงเวลา ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 2,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกร้อยละ 100 จากการเก็บรักษาที่ทุกอุณหภูมิ และทุกช่วงเวลา ยกเว้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 สัปดาห์ ให้ผลบวกร้อยละ 83 ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 200 parasites/ μ L ให้ผลบวกร้อยละ 100 จากการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ และให้ผลบวกร้อยละ 67 จากการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 สัปดาห์ และ

ให้ผลบวกที่ลดลงจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาอื่น ๆ สรุปว่าการเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิด
บวกจากเชื้อมาลาเรีย 20,000 parasites/ μ L มีร้อยละการให้ผลบวกมากที่สุด จากการเก็บรักษาที่ทุก
อุณหภูมิและทุกช่วงเวลา

คำสำคัญ: ชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป มาลาเรีย พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เลียงเชื้อมาลาเรีย

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: tippawans@nu.ac.th

รับบทความ: 20 กุมภาพันธ์ 2561

แก้ไขบทความ: 8 มิถุนายน 2561

รับตีพิมพ์บทความ: 29 ตุลาคม 2561

บทนำ

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบผู้ป่วยโรคมาลาเรียจำนวน 216 ล้านราย ในปี พ.ศ. 2559 และมีผู้เสียชีวิตมากถึง 445,000 ราย โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในแถบทวีปแอฟริกา⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทยส่วนใหญ่จะพบผู้ป่วยโรคมาลาเรียในบริเวณชายแดนของประเทศ ซึ่งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรีย จากรายงานของสำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยมาลาเรียในปี พ.ศ. 2560 จำนวน 10,919 ราย โดยพบผู้ป่วยโรคมาลาเรียสูงในจังหวัดตาก ยะลา ศรีสะเกษ แม่ฮ่องสอน นราธิวาส ตามลำดับ⁽²⁾ เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์มีทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* และ *P. knowlesi* โดยเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรครุนแรงได้แก่ *P. falciparum* สำหรับอาการทั่วไปของโรคมาลาเรียนั้นจะเป็นแบบไม่จำเพาะคือ มีไข้ หนาวสั่น เหงื่อออก ปวดหัว ซึ่งเป็นอาการที่ไม่รุนแรง แต่หากได้รับการรักษาที่ไม่ถูกต้องจะทำให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ซึ่งจะมีอาการรุนแรงคือ โรคมาลาเรียขั้นสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วย⁽³⁾ เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียมีอาการที่ไม่จำเพาะ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญมากในการช่วยวินิจฉัยโรคมาลาเรีย โดยการตรวจวิเคราะห์โรคมาลาเรียที่นิยมทำในโรงพยาบาลคือ การทำสเมียร์เลือดชนิดบางและหนา ย้อมด้วยสี Giemsa และตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการสำหรับการวินิจฉัยโรคมาลาเรีย วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายน้อย และมีความแม่นยำสูง เนื่องจากการพบเชื้อ

มาลาเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่นำมาตรวจวิเคราะห์โดยตรง วิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งปริมาณของเชื้อ ชนิด และระยะของเชื้อมาลาเรีย⁽⁴⁾ ซึ่งนอกจากจะช่วยในการวินิจฉัยโรคมาลาเรียแล้วยังมีประโยชน์ในการติดตามการรักษาของผู้ป่วยได้ด้วย อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะสูงในการตรวจวิเคราะห์เชื้อมาลาเรียในสเมียร์เลือด⁽⁵⁾ นอกจากนี้ ความถูกต้องแม่นยำในการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธีนี้ยังขึ้นกับปริมาณของเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า มีการวินิจฉัยผิดพลาดเกิดขึ้นมากจากการตรวจวิเคราะห์โดยการดูเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อมีเชื้อมาลาเรียจำนวนน้อย และการติดเชื้อหลายชนิดในผู้ป่วยรายเดียวกัน ก็ส่งผลให้มีการวินิจฉัยผิดพลาดได้มากยิ่งขึ้นด้วย⁽⁶⁾ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์มาลาเรียด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปเพื่อนำมาใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรคมาลาเรีย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว และอาศัยทักษะของเจ้าหน้าที่ในการตรวจวินิจฉัยน้อยกว่าวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์⁽⁷⁾ การตรวจวิเคราะห์โรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปมีหลักการคือการตรวจหาโปรตีนที่เชื้อมาลาเรียสร้างขึ้นและอยู่ในเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย โดยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปจะมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าวอยู่ ถ้ามีโปรตีนที่เชื้อมาลาเรียสร้างขึ้นอยู่ในตัวอย่างเลือดที่นำมาตรวจวิเคราะห์ โปรตีนดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่อยู่ในชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป ซึ่งผลบวกจะพบแถบสีบนชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป เป็นการบ่งบอกว่ามีเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างเลือดที่นำมาตรวจวิเคราะห์ โปรตีนที่นิยมตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ histidine-rich protein 2 (HRP-2) และ plasmodium lactate dehydrogenase

(pLDH) ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกได้เข้ามาควบคุมดูแลคุณภาพของชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปให้ได้ตามมาตรฐาน เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์มาลาเรียมีความถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียมีความสำคัญต่อการรักษา การควบคุมป้องกันการแพร่ของเชื้อมาลาเรีย รวมไปถึงการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียด้วย ปัจจุบันมีการผลิตชุดตรวจมาลาเรียออกจำหน่ายจากหลายบริษัท⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตาม ระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษาชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป อุณหภูมิและความชื้น อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป ซึ่งจะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมคุณภาพของชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปด้วยตัวอย่างควบคุมชนิดบวก กับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปใน lot นั้น ก่อนที่จะนำชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปใน lot ดังกล่าวไปตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย เพื่อให้การวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธีนี้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีเตรียมตัวอย่างชนิดบวกเพื่อควบคุมการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในประเทศไทย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย และนำมาเตรียมตัวอย่างชนิดบวกที่มีปริมาณเชื้อมาลาเรียที่แตกต่างกัน และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกสำหรับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป

วัสดุและวิธีการ

1. การเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

นำเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ซึ่งเก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความ

เข้มข้นร้อยละ 12, 1.6 และ 0.8 ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อมาลาเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยง เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ซึ่งประกอบด้วย RPMI 1640 (Gibco, USA) สูตรที่มี กลูตามีนผสมกับ 25 mM HEPES (Gibco, USA), 0.2% โซเดียม-ไบคาร์บอเนต, 25 mg/L เจนตามัยซิน (Gibco, USA) และซีรัมร้อยละ 10 นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีไนโตรเจน ร้อยละ 90 ออกซิเจนร้อยละ 5 และคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน และติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียโดยการทำสมียร์เลือดชนิดบาง นำไปตรึงเซลล์เม็ดเลือดด้วยเมทานอลแล้วนำไปย้อมด้วยสี Giemsa ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปตรวจวิเคราะห์ดูการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ร่อนจนกระทั่งเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตดี เพื่อนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างควบคุมชนิดบวก โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณารับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรแล้ว (NU-IRB 0909/60)

2. การเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกสำหรับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป

นำเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ที่เจริญเติบโตดีแล้ว มาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกโดยนำเชื้อมาลาเรียมาปรับจำนวนเชื้อด้วยเลือดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 เพื่อให้ได้เชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 200, 2,000 และ 20,000 parasites/ μ L ตามลำดับ และมีตัวอย่างควบคุมชนิดลบคือเลือดที่ไม่มีเชื้อมาลาเรีย โดยใส่หลอดละ 10 μ L จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบกับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปที่ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยขั้นตอน

การทดสอบแสดงใน Fig. 1

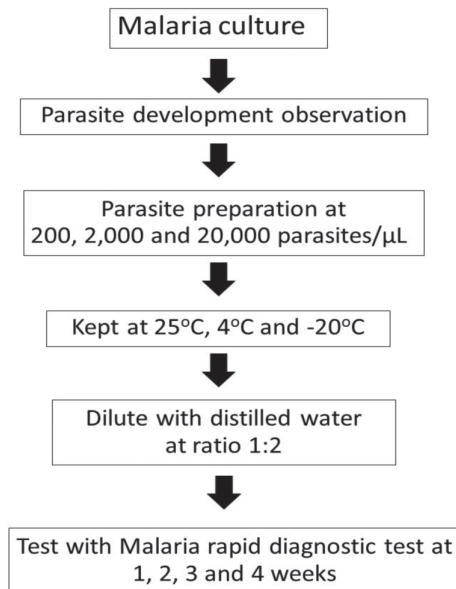


Fig. 1 Flow chart of research methodology

3. ชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป

ใช้ชุดตรวจมาลาเรีย ชนิดที่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอนามัยโรคคือ ควรวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างเลือดที่มีความหนาแน่นของเชื้อน้อย คือ 200 parasites/μL ได้อย่างน้อยร้อยละ 75 ให้ผลบวกลงน้อยกว่าร้อยละ 10 และควรรีให้ผล invalid น้อยกว่าร้อยละ 5 โดยชุดตรวจมาลาเรียชนิดที่เลือกนำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือชุดตรวจชื่อ SD BIOLINE Malaria Ag Pf/Pan ซึ่งเป็นชุดตรวจมาลาเรียที่ประกอบด้วย การตรวจหาโปรตีนชนิด histidine-rich protein 2 (HRP-2) ซึ่งจะตรงกับแถบที่ติดฉลาก P.f ซึ่งจะให้ผลบวกต่อเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และตรวจหาโปรตีนชนิด plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) ซึ่งจะตรงกับแถบที่ติดฉลาก Pan ซึ่งเป็นโปรตีนที่ให้ผลบวกต่อเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* ดังแสดงใน Fig. 2 (SD BIOLINE, Republic of Korea)

4. การทดสอบตัวอย่างควบคุมชนิดบวกกับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป

นำเชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่นของเชื้อ 200, 2,000 และ 20,000 parasites/μL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ปริมาตร 10 μL มาใส่น้ำกลั่น 10 μL (อัตราส่วนของเชื้อมาลาเรียต่อน้ำกลั่น 1:2) แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจึงนำส่วนผสมดังกล่าว 5 μL มาใส่ในช่อง sample และเติม buffer 4 หยด ลงในชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป (Fig. 2) อ่านผลการตรวจวิเคราะห์โดยการพบแถบสีบนชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปจากผู้อ่านผลจำนวน 3 คน ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง (2 independent experiments)

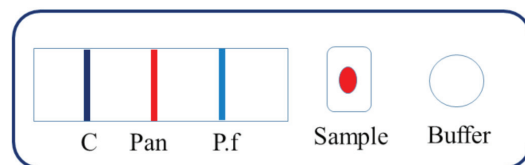


Fig. 2 Rapid diagnostic test

ผลการวิจัย

1. การเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

จากการเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในสภาวะที่เหมาะสม และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน พบว่าเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโต เมื่อเตรียมฟิล์มเลือดชนิดบางแล้วนำไปย้อมสี Giemsa ที่ความเข้มข้น 10% เป็นเวลานาน 10 นาที พบเชื้อมาลาเรียในระยะ ring, trophozoite และ schizont ที่มีรูปร่างดี ประกอบด้วยส่วนของโครมาตินและไซโทพลาซึมของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง โดยเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 ระยะนี้ เป็นระยะของเชื้อมาลาเรียที่พบได้ในเม็ดเลือดแดง (asexual blood stages) ดังแสดงใน Fig. 3

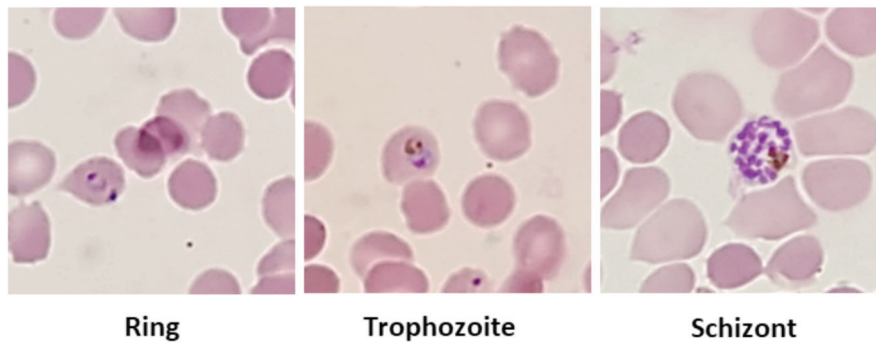


Fig. 3 Asexual blood stages of *P. falciparum* in malaria culture

2. การแปลผลการตรวจด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป

จากการนำเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงและเตรียมเป็นตัวอย่างชนิดบวกที่สภาวะต่าง ๆ มาทดสอบกับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป ให้ผลได้ 3 แบบ คือ A) พบแถบสีบนแถบ P.f และ Pan B) พบแถบสี

บนแถบ Pf เพียงอย่างเดียว ทั้ง 2 แบบนี้จะอ่านผลว่าเป็นบวกสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* และ C) ไม่พบแถบสีที่แถบ Pf และ Pan อ่านผลเป็นลบ โดยทั้ง 3 แบบดังกล่าวจะต้องขึ้นแถบสีที่แถบ C ดังแสดงใน Fig. 4

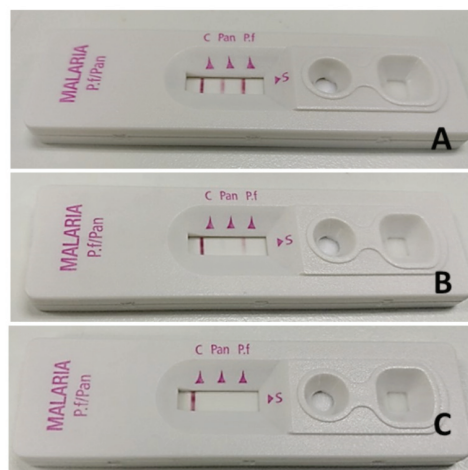


Fig. 4 Interpretation of malaria rapid diagnostic test, (A and B) Positive for *P. falciparum*, C Negative for *P. falciparum*

3. การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมชนิดบวกด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป

จากการนำเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงมาปรับเพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 200, 2,000

และ 20,000 parasites/ μ L และนำไปเก็บเพื่อรักษาสภาพโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ และนำมาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนเชื้อมาลาเรียต่อ

น้ำกลั่น 1:2 แล้วจึงนำมาทดสอบกับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป พบว่าตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 20,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกกับชุดตรวจสำเร็จรูปร้อยละ 100 จากการเก็บรักษาทุกอุณหภูมิ และทุกช่วงเวลา ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 2,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกร้อยละ 100 จากการเก็บรักษาที่ทุกอุณหภูมิ และทุกช่วงเวลา ยกเว้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 สัปดาห์ ให้ผลบวกร้อยละ 83 ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 200 parasites/ μ L ให้ผลบวกร้อยละ 100 จากการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศา

เซลเซียส ที่เวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ และให้ผลบวกร้อยละ 67 จากการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 สัปดาห์ และให้ผลบวกที่ลดลงจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาอื่นๆ คือให้ผลบวกที่ร้อยละ 100, 100, 83 และ 50 จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลาการเก็บรักษา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ และให้ผลบวกที่ร้อยละ 100, 83, 50 และ 50 จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลาการเก็บรักษา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ ดังแสดงใน Fig. 5 โดยสังเกต

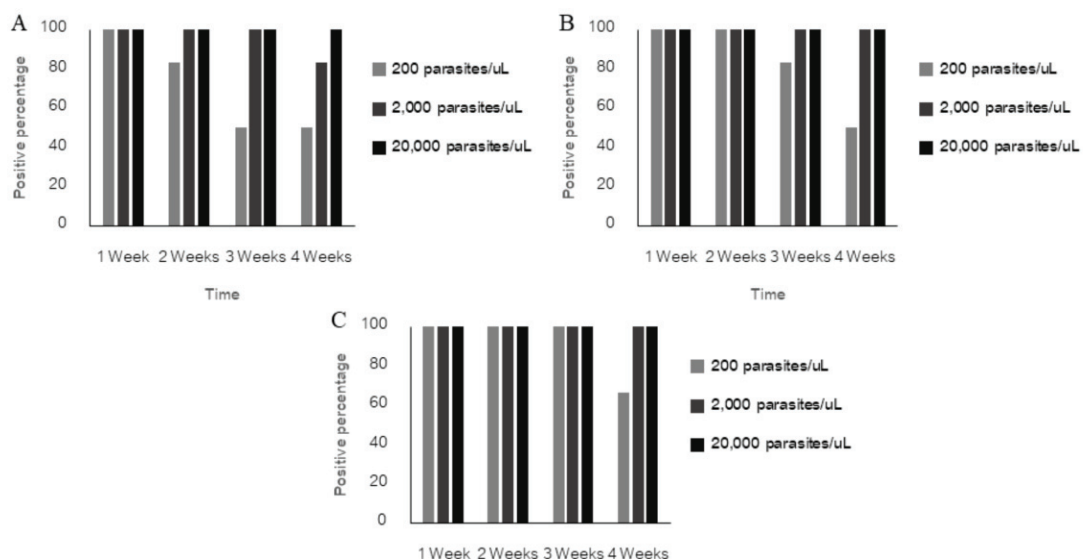


Fig. 5 Positive percentage of malaria rapid diagnostic test: parasite density 200, 2,000 and 20,000 parasites/ μ L, time 1, 2, 3 and 4 weeks, temperature 25 °C (A), 4°C (B) and -20°C (C)

พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษา 1 สัปดาห์ ตัวอย่างควบคุมชนิดบวกจะให้ผลบวกที่ร้อยละ 100 ในทุกช่วงอุณหภูมิ และทุกความหนาแน่น ของเชื้อมาลาเรีย โดยร้อยละของผลบวกจะค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลา

การเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นกับอุณหภูมิ และความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่นำมาเตรียมเป็นตัวอย่างควบคุมชนิดบวกสำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป ดังแสดงใน Fig. 6

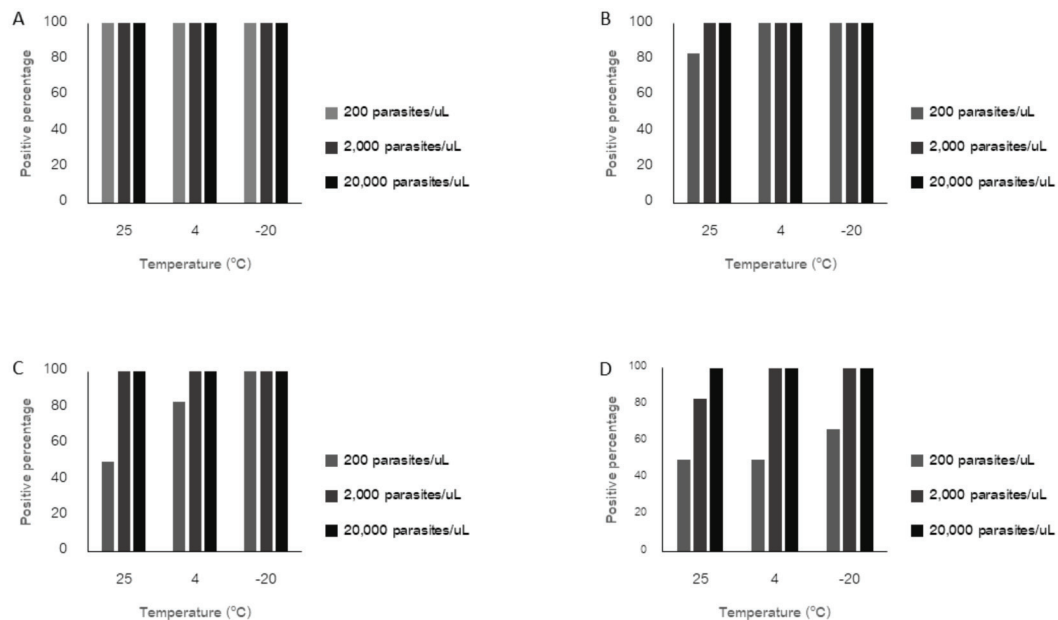


Fig. 6 Positive percentage of malaria rapid diagnostic test: parasite density 200, 2,000 and 20,000 parasites/μL, temperature 25°C, 4°C and -20°C and Time for 1 (A), 2 (B), 3 (C) and 4 (D) weeks

วิจารณ์

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกสำหรับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่สามารถเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการ และเป็นเชื้อมาลาเรียที่มีความรุนแรงมากที่สุด เมื่อเทียบกับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ ที่ก่อโรคในคน⁽³⁾ นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดที่พบว่ามีกระเพาะในประเทศไทยด้วย⁽²⁾ โดยคณะผู้วิจัยได้เลือกความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่จะนำมาใช้เป็นตัวอย่างควบคุมชนิดบวกเริ่มต้นที่ 200 parasites/μL เนื่องจากเป็นความหนาแน่นที่มีเชื้อจำนวนน้อยมากที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ชุดตรวจที่ควรตรวจวิเคราะห์ได้ สำหรับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปที่ได้เลือกมาใช้ในการศึกษานี้เป็นชุดตรวจที่ผ่านเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก⁽⁸⁾

และสามารถตรวจวิเคราะห์โปรตีน histidine-rich protein 2 (HRP-2) และ plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป เนื่องจาก HRP-2 เป็นโปรตีนที่เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สร้างได้เป็นจำนวนมาก⁽⁹⁾ และสามารถละลายน้ำได้ดี หลักการตรวจวิเคราะห์โปรตีนชนิดนี้ ทำโดยการติดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดนี้ในชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปหลายชนิด ได้แก่ Paracheck-Pf Device, ICT Malaria Pf Cassett และ SD Bioline Malaria Antigen P.f เป็นต้น⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์โรคมาลาเรียโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนชนิด HRP-2 นี้ก็มีข้อจำกัดคือ แอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดนี้สามารถเกิด cross reaction กับโปรตีนชนิดอื่น ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้⁽¹¹⁾ ส่วนโปรตีน pLDH นอกจากจะถูกสร้าง

จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* แล้วยังสร้างโดยเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นได้ด้วย⁽⁹⁾ ชุดตรวจมาลาเรียที่ใช้การตรวจโดยการติดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดนี้ ได้แก่ CareStart™ Malaria pLDH (Pan), CareStart™ Malaria, และ pLDH (Pan, Pf) เป็นต้น⁽¹²⁾ สำหรับงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้เลือกทดสอบตัวอย่างควบคุมชนิดบวกกับชุดตรวจมาลาเรียเพียงชนิดเดียวคือ SD BIOLINE Malaria Ag Pf/Pan ดังนั้นหากนำไปทดสอบกับชุดตรวจของบริษัทอื่นอาจได้ร้อยละของผลบวกที่ต่างไป

จากการเตรียมเชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่นแตกต่างกันคือ 200, 2,000 และ 20,000 parasites/ μ L พบว่าเชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่น 20,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกร้อยละ 100 ต่อการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อมาลาเรียด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส และทุกช่วงเวลาตั้งแต่ 1-4 สัปดาห์ โดยผลบวกที่ได้มีค่าว่าเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมาก โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อมาลาเรียที่มาจากหลายๆ ระยะ มาเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวก แต่จากการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นระยะ ring stage ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่เตรียมจากงานวิจัยนี้ ดังนั้นเพื่อให้ได้ตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่เหมือนกับตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย จึงควรเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่มาจากระยะ ring stage โดยสามารถเตรียมจาก synchronized culture อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้มีคุณสมบัติที่ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมชนิดบวก สำหรับชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปได้

จากการวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเตรียมตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 35

องศาเซลเซียส โดยนำตัวอย่างมาทำให้แห้งก่อนแล้วจึงนำมาละลายในสารละลายหลายชนิด คือ 0.01 M PBS; 0.138 M NaCl; 0.0027 M KCl และ 0.05% Tween 20 ที่ pH 7.4 และจำเป็นต้องละลายตัวอย่างชนิดบวกในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดสอบ⁽¹³⁾ ซึ่งทำให้ยุ่งยากในการเตรียม ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างเลือดที่ต้องการเตรียมเป็นตัวอย่างเลือดชนิดบวกโดยไม่ต้องทำให้แห้งก่อน และในขั้นตอนการละลาย คือ การละลายด้วยน้ำกลั่น 10 μ L แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 15 วินาที ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้เวลา 1 ชั่วโมงในการละลายตัวอย่าง ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ร้อยละของผลบวกลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น อาจมีสาเหตุจากการที่โปรตีนยังไม่ละลายที่เวลา 15 วินาทีก็ได้ จึงได้นำส่วนผสมดังกล่าว 5 μ L ไปทดสอบด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป เพื่อช่วยลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างชนิดบวก แต่ยังคงให้ผลการทดสอบที่ดี สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างควบคุมชนิดบวก พบว่าตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 20,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกกับชุดตรวจสำเร็จรูปร้อยละ 100 จากการเก็บรักษาทุกอุณหภูมิ และทุกช่วงเวลา ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 2,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกร้อยละ 100 จากการเก็บรักษาที่ทุกอุณหภูมิ และทุกช่วงเวลา ยกเว้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 สัปดาห์ ให้ผลบวกร้อยละ 83 ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 200 parasites/ μ L ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่มีปริมาณเชื้อมาลาเรียที่สูงกว่า โดยร้อยละของผลบวกจะค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นกับอุณหภูมิ โดยร้อยละของผลบวกที่ลดลงจากการใช้เชื้อมาลาเรียจำนวนน้อย เนื่องจากการมีปริมาณเชื้อน้อย ทำให้มีโปรตีนชนิด HRP-2 และ pLDH น้อย

ลงเมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาอันอาจทำให้โปรตีน
ดังกล่าวสลายตัวเหลือน้อยลง จึงไม่เพียงพอต่อการ
นำมาตรวจวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามการติดเชื้อมาลาเรีย
ชนิด *P. falciparum* ในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะมี
ปริมาณเชื้อมาลาเรียสูงในเลือดของผู้ป่วย ดังนั้น
การเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกเพื่อใช้ควบคุม
คุณภาพของชุดตรวจมาลาเรียจึงควรเตรียมให้มี
ปริมาณเชื้อสูงเช่นเดียวกับสภาวะของเลือดผู้ป่วย

วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย
ทางห้องปฏิบัติการคือ การตรวจพบเชื้อมาลาเรียจาก
การดูฟิล์มเลือดชนิดหนาและบางด้วยกล้องจุลทรรศน์
เนื่องจากการพบเชื้อมาลาเรียได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม
ก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเมื่อเปรียบเทียบ
วิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ กับ
วิธีการตรวจด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป โดยใช้การ
ตรวจทางอณูชีววิทยาซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง
มาเป็นวิธีอ้างอิง พบว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจ
มาลาเรียสำเร็จรูป เป็นวิธีที่มีความไวในการวินิจฉัยโรค
มาลาเรียสูงกว่าการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้อง
จุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจด้วยชุดตรวจมาลาเรียจึง
มีประโยชน์ในการช่วยคัดกรองโรคมาลาเรีย แต่
อย่างไรก็ตามควรมีการยืนยันผลการตรวจด้วยวิธีอื่น ๆ
เพื่อให้มีความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์โรคมาลา
เรียยิ่งขึ้น⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้วิธีการตรวจวิเคราะห์มาลาเรีย
ด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป ยังสามารถเกิดผลบวก
ลวงได้จากการคงอยู่ของโปรตีนที่วิเคราะห์แม้เชื้อมา
ลาเรียจะถูกกำจัดออกไปแล้วจากร่างกายของผู้ป่วย^(15, 16) โดยวิธีการตรวจที่มีความไวและความ
จำเพาะสูง เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาได้แก่วิธี PCR
ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อมา
ลาเรีย⁽¹⁷⁾ แต่เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิจัยมากกว่า
การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล
ทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือราคาสูง มีขั้นตอน
ค่อนข้างยากและใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์มากกว่า

วิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และการตรวจด้วย
ชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูป

คณะผู้วิจัยเลือกศึกษาอุณหภูมิการเก็บ
ตัวอย่างควบคุมที่ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส
เนื่องจากเป็นอุณหภูมิของห้องปฏิบัติการ ตู้เย็นเก็บ
สารเคมีต่างๆ ที่ใช้กันทั่วไปในโรงพยาบาล และเพื่อ
สะดวกในการขนส่งตัวอย่างควบคุมชนิดบวก อย่างไรก็ตาม
อุณหภูมิของประเทศไทยในบางเดือนสูงเกิน
35 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจส่งผลให้มีการสลายของ
โปรตีนได้มากขึ้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมที่
อุณหภูมิดังกล่าว โดยผู้วิจัยได้เตรียมตัวอย่างควบคุม
ชนิดบวกในหลอดทดลองขนาดเล็ก ทำให้สะดวก
ในการขนส่งไปยังโรงพยาบาลต่างๆ นอกจากนี้
คณะผู้วิจัยมีโครงการที่จะทดลองเพิ่มเติม โดยการ
เตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกด้วยการหยดเลือดที่มี
เชื้อมาลาเรียลงบนกระดาษกรอง เพื่อให้สะดวกในการ
จัดส่งมากยิ่งขึ้น และควรมีการพัฒนาการเก็บตัวอย่าง
ควบคุมชนิดบวกให้ได้ยาวนานมากขึ้นโดยใช้สาร
preservative ชนิดต่างๆ แต่การเตรียมตัวอย่าง
ควบคุมชนิดบวกดังกล่าว อาจมีขั้นตอนที่ยุ่งยากใน
การสกัดเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย ออกจากกระดาษกรอง
ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุป

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ
มีความสำคัญมาก โดยวิธีการตรวจด้วยชุดตรวจ
มาลาเรียสำเร็จรูป เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และอาศัย
ทักษะของเจ้าหน้าที่น้อย ดังนั้นการควบคุมคุณภาพ
ของชุดตรวจสำเร็จรูปจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก แต่ปัจจุบัน
ยังไม่มีมีการเตรียมตัวอย่างควบคุมใช้ในห้องปฏิบัติการ
ของโรงพยาบาลทั่วไป คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาหาสภาวะ
ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวก
พบว่า ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 20,000 parasites/
μL ให้ผลบวกกับชุดตรวจสำเร็จรูปร้อยละ 100

จากการเก็บรักษาทุกอุณหภูมิคือ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส และทุกช่วงเวลาจากการศึกษาในครั้งนี้คือ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรีย 2,000 parasites/ μ L ให้ผลบวกร้อยละ 100 จากการเก็บรักษาที่ทุกอุณหภูมิ และทุกช่วงเวลา ยกเว้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 สัปดาห์ ให้ผลบวกร้อยละ 83 ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเตรียมตัวอย่างควบคุมชนิดบวกเพื่อควบคุมการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อมาลาเรียด้วยชุดตรวจมาลาเรียสำเร็จรูปต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายไต้มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization [Internet] Geneva: World Health Organization; 2018 [cited 2018 January 15]. Available from: <http://www.who.int/malaria/en/>
2. Malaria situation in Thailand [Internet] Thailand: Bureau of the Vector — borne Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health; 2018 [cited 2018 January 15]. Available from: <http://www.thaivbd.org/n/histories/view/2806> (in Thai)
3. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016; 167: 610-24.
4. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern [Internet] USA: Centers for Disease Control and Prevention; 2018 [cited 2018 January 24]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/blood/microexam.html>
5. Ayalew F, Tilahun B, Taye B. Performance evaluation of laboratory professionals on malaria microscopy in Hawassa Town, Southern Ethiopia. *BMC Res Notes* 2014; 7: 839.
6. Mekonnen SK, Aseffa A, Medhin G, Berhe N, Velavan TP. Re-evaluation of microscopy confirmed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria by nested PCR detection in southern Ethiopia. *Malar J* 2014; 13: 48.
7. Murphy SC, Shott JP, Parikh S, Etter P, Prescott WR, Stewart VA. Malaria diagnostics in clinical trials. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89: 824-39.
8. Malaria rapid diagnostic test performance. [Internet] Geneva: World Health Organization; 2018 [cited 2018 March 18]. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/978924151268/en/>
9. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 66-78.

10. Chinkhumba J, Skarbinski J, Chilima B, *et al.* Comparative field performance and adherence to test results of four malaria rapid diagnostic tests among febrile patients more than five years of age in Blantyre, Malawi. *Malar J* 2010; 9: 209.
11. 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.
12. Ashley EA, Touabi M, Ahrer M, *et al.* Evaluation of three parasite lactate dehydrogenase-based rapid diagnostic tests for the diagnosis of falciparum and vivax malaria. *Malar J* 2009; 8: 241.
13. Aidoo M, Patel JC, Barnwell JW. Dried *Plasmodium falciparum*-infected samples as positive controls for malaria rapid diagnostic tests. *Malar J* 2012; 11: 239.
14. Alareqi LM, Mahdy MA, Lau YL, *et al.* Field evaluation of a PfHRP-2/pLDH rapid diagnostic test and light microscopy for diagnosis and screening of falciparum malaria during the peak seasonal transmission in an endemic area in Yemen. *Malar J* 2016; 15: 49.
15. Iqbal J, Siddique A, Jameel M, Hira PR. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* monoinfection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4237-41.
16. Tjitra E, Suprianto S, McBroom J, Currie BJ, Anstey NM. Persistent ICT malaria P.f/P.v panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of *Plasmodium vivax* in convalescence. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1025-31.
17. 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.