

การใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างปัสสาวะ  
และน้ำลายของผู้ป่วยในประเทศไทย



นายภัทธร บุปผัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED DETECTION OF MALARIA  
FROM HUMAN URINE AND SALIVA IN THAILAND.



Mr. Pattakorn Buppan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Parasitology  
Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การใช้เทคนิคปฏิบัติการลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อตรวจหาเชื้อ  
มาลาเรียจากตัวอย่างปัสสาวะและน้ำลายของผู้ป่วยใน  
ประเทศไทย

โดย

นายภัทธร บุปผัน

สาขาวิชา

ปรสิตวิทยาทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

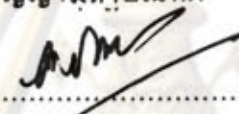
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

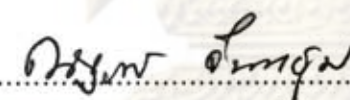
ศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์

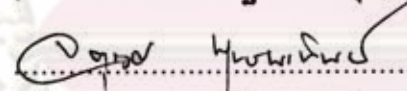
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย

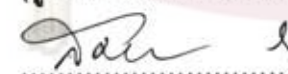
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

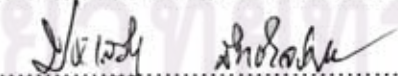
  
..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ณัฐรุต จันทุม)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิมปิกิตติกุล)



ภัทธร นุพันธ์ : การใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างปัสสาวะและน้ำลายของผู้ป่วยในประเทศไทย. (POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED DETECTION OF MALARIA FROM HUMAN URINE AND SALIVA IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร.จตุรงค์ พุทธิพิทย, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ.นพ.ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์, ผศ.นพ.ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย 81 หน้า.

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขระดับโลก ส่งผลให้มีผู้ติดเชื้อปีละประมาณ 300-500 ล้านคนทั่วโลก และเสียชีวิตมากกว่า 1 ล้านคนในการวินิจฉัยมาลาเรียที่จำเพาะอาศัยการตรวจพบเชื้อปรสิตในระยะเวลาที่ยาวนานในเม็ดเลือดซึ่งอาศัยการเจาะเลือดจากผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการตรวจพบเชื้อปรสิตโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสให้ผลความไวสูงกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อมาลาเรียร่วมกันหลายชนิด เมื่อไม่นานมานี้มีการรายงานว่าดีเอ็นเอของพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม สามารถตรวจพบได้จากปัสสาวะและน้ำลายของผู้ป่วยในบริเวณที่มีการระบาดสูง ถึงแม้ว่ามีความไวต่ำกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นเพื่อการตรวจสอบว่าดีเอ็นเอของพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ สามารถตรวจพบได้ในน้ำลายและปัสสาวะได้เช่นกัน รวมทั้งเพื่อเป็นการยืนยันว่าดีเอ็นเอของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมสามารถตรวจพบได้ในพื้นที่ที่มีการระบาดต่ำในการศึกษานี้จึงทำการเก็บตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 100 ตัวอย่างและผู้ที่มีอาการไข้แต่ตรวจไม่พบเชื้อเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากผู้เข้ารับการรักษาจากมาลาเรียคลินิก ในจังหวัดตากซึ่งอยู่ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อเพิ่มจำนวนในส่วนของอินโรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ทั้งนี้พื้นที่ที่ศึกษามีการกระจายของเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิดในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกล้องจุลทรรศน์พบว่าปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสของตัวอย่างน้ำลายมีความไวในการตรวจเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ร้อยละ 74.1 และตรวจพบพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ร้อยละ 84 ในขณะที่ตัวอย่างปัสสาวะมีความไวร้อยละ 44.4 และ 34 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะโดย เปรียบเทียบกับผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากตัวอย่างเลือดพบที่มีความจำเพาะร้อยละ 100 ในการติดเชื้อร่วมกันของทั้ง 2 ชนิดของผู้ป่วยนั้นพบว่าการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยใช้ตัวอย่างเลือดพบภาวะการติดเชื้อร่วมกัน 26 รายและจากตัวอย่างน้ำลายพบ 8 ราย แม้ว่าอัตราการตรวจพบดีเอ็นเอของพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ จากตัวอย่างน้ำลายจะเพิ่มขึ้นตามอัตราความหนาแน่นของเชื้อในเลือด แต่กลับไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในกรณีของการติดเชื้อจากการตรวจปัสสาวะ อย่างไรก็ตามตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะจึงน่าจะเป็นแหล่งของสารพันธุกรรมที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ โดยไม่ต้องเจาะเลือดผู้ป่วย ทั้งนี้การพัฒนายวิธีการตรวจที่มีความไวสูงอาจทำให้สามารถใช้ตัวอย่างดังกล่าวในการวินิจฉัยโรคมาลาเรียได้

ภาควิชา.....ปรสิตวิทยา.....  
 สาขาวิชา.....ปรสิตวิทยาทางการแพทย์.....  
 ปีการศึกษา.....2552.....

ลายมือชื่อผู้นิสิต.....ภัทธร นุพันธ์.....  
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....จตุรงค์ พุทธิพิทย.....  
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....สมชาย จงวุฒิเวศย์.....  
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....ประเสริฐ สิทธิเจริญชัย.....



## 5174805630: MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS: NESTED PCR / SALIVA / URINE / MALARIA

PATTAKORN BUPPAN: POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED  
DETECTION OF MALARIA FROM HUMAN URINE AND SALIVA IN  
THAILAND. THESIS ADVISOR: ASST PROF. CHATURONG PUTAPORN TIP,  
Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, Ph.D.,  
ASST PROF. PRASERT SITTHICHAREONCHAI., 81 pp.

Malaria remains an important public health problem worldwide that affects approximately 300 to 500 million people, leading to over 1 million deaths each year. Definite diagnosis of malaria relies on microscopy detection of blood stages of parasites in peripheral blood which requires blood sample collection. However, the nested PCR method has shown to be more sensitive and superior to microscopy in detecting parasites in circulation, especially when co-infections of *Plasmodium* species occurred. Recent studies have revealed that *P. falciparum* DNA can be identified in urine and saliva of patients in malaria hyperendemic areas, albeit at a lower sensitivity than microscopy. To address whether *P. vivax* DNA could also be detected in saliva and urine specimens and to reaffirm the presence of *P. falciparum* DNA in these samples of infected individuals in a hypoendemic area, we collected blood, saliva and urine samples from 100 microscopy-positive and 20 microscopy-negative febrile patients who attended a malaria clinic in Tak Province, northwestern Thailand for nested PCR analysis targeting the small subunit ribosomal RNA gene of human malaria. Both *P. falciparum* and *P. vivax* have been known to circulate at a comparable rate in the study area. Comparing with microscopy results, nested PCR of saliva samples had a sensitivity of 74.1% for *P. falciparum* detection and 84% for *P. vivax* detection while 44.4% and 34.0% of the corresponding values were observed for urine samples. Both nested PCR results of saliva and urine samples had a specificity of 100% for identification of *P. falciparum* and *P. vivax* when compared with nested PCR results from blood. Co-infections of both species were found in 26 and 8 patients by nested PCR of blood and saliva samples, respectively. Although the positive rates of nested PCR of saliva samples for *P. falciparum* increased with parasite density, no such tendency occurred in results from nested PCR of saliva samples for *P. vivax* as well as those of urine samples. Saliva and urine samples could be alternative noninvasive sources of DNA for molecular detection of both *P. falciparum* and *P. vivax*. Further improvement of the detection method will offer an opportunity to use these samples for a practical malaria diagnostic purpose.

Department : ..... Parasitology .....

Field of Study : ..... Medical Parasitology .....

Academic Year : ..... 2009 .....

Student's Signature Pattakorn Buppan

Advisor's Signature Chaturong Putaporn Tip

Co-Advisor's Signature Somchai Jongwutiwes

Co-Advisor's Signature Prasert Sitthichareonchai

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรพิทย อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำข้อคิดต่าง ๆ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดี ยิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์และผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ประเสริฐ สิวทิวเจริญชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำ ในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ในการทำวิจัย ให้ กำลังใจเมื่อมีอุปสรรค มิตรภาพที่ดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่งตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ณัฐพรส จันทชุม ที่ได้เสียสละเวลามาเป็น ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้กรุณาร่วมแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิมปังกิตติกุล ภาควิชากุมารเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เสียสละเวลามาเป็นกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัยและได้กรุณาร่วมแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ทุกท่านที่ได้คอยเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิจัยตลอดจนความช่วยเหลือและ มิตรภาพอันดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณ คุณรัตติพร โกสุวินทร์ และคุณปณณทัต อารีกุล นิสิตปริญญาโท สาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยช่วยเหลือในเรื่องการเก็บตัวอย่างในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณเฉลิมพล มโนวงศ์ และเจ้าหน้าที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำ โดยแมลงที่ 9.3.11 ต.ท่าสองยาง อ.ท่าสองยาง จ.ตาก ที่คอยช่วยเหลือในเรื่องการเก็บตัวอย่าง และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่จากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนเพื่อสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในระดับ บัณฑิตศึกษา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้กำลังใจ การสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อนุกรมวิธานเชื้อมาลาเรีย .....	5
วงจรชีวิต.....	6
พาหะนำเชื้อมาลาเรีย.....	14
การติดต่อของเชื้อมาลาเรียสู่คน.....	16
การกระจายทางภูมิศาสตร์.....	16
ระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย.....	19
อาการแสดงของโรคมาลาเรีย.....	22
ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย.....	24
พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย.....	25
โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอ.....	26
วิธีการตรวจเพื่อการวินิจฉัยมาลาเรีย.....	29
การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด.....	29
การตรวจหา antibody ในซีรัม .....	30
การตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรีย.....	32
การตรวจหา Nucleic acid.....	33
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	40
รูปแบบการวิจัย.....	40
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	40
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	40
ขนาดของกลุ่มประชากร.....	40
อุปกรณ์.....	41
วัสดุ.....	42



สารเคมี.....	43
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	44
การตรวจเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์ม.....	45
การสกัด DNA (DNA Extraction).....	47
การเพิ่มปริมาณ DNA (DNA Amplification).....	48
การวิเคราะห์ DNA จากผลผลิต PCR ด้วยกระแสไฟฟ้า.....	49
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	51
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	52
ลักษณะทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของประชากรตัวอย่าง.....	52
การตรวจเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์ม.....	55
การตรวจเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะ.....	55
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	65
รายการอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	83



# ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง .....	53
2.	แสดงข้อมูลสรุปทั่วไปของตัวอย่าง.....	55
3.	แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดหนาและบางที่ย้อมด้วยสียิม ซ่า.....	55
4.	แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและ ปัสสาวะ.....	58
5.	แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและ ปัสสาวะ.....	59
6.	แสดง Microscopy diagnosis and nested PCR detection of <i>P.falciparum</i> and <i>P.</i> <i>vivax</i> in blood, saliva and urine samples.....	60
7.	แสดง Diagnostic performance of microscopy and nested PCR assays using DNA templates from saliva and urine samples.....	61
8.	แสดง Comparison of nested PCR assays using blood, saliva and urine samples with microscopy results as reference.....	62
9.	แสดง Relationship between parasite density and positive tests by nested แสดง Relationship between parasite density and positive tests by nested .....	64

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย.....	13
2.	แสดงแผนที่การระบาดของโรคมาลาเรียทั่วโลก.....	18
3.	แสดงรายชื่อจังหวัด 10 จังหวัดที่พบผู้ป่วยด้วยไข้มาลาเรียสูงที่สุด.....	21
4.	แสดง SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรีย.....	28
5.	แสดงลำดับเบสบางส่วนของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียที่จำเพาะกับชนิดเชื้อ <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> , <i>P.knowlesi</i> , <i>P.ovale</i> และ <i>P.malariae</i> , เพื่อใช้ในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย.....	50
6.	แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะซึ่งให้ผล <i>P. falciparum</i> จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อ มาลาเรียด้วย agarose gel electrophoresis.....	57
7.	แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะซึ่งให้ผล <i>P.vivax</i> จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรีย ด้วย agarose gel electrophoresis.....	57
8.	แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะซึ่งให้ผลการติดเชื้อ ร่วมกันระหว่าง <i>P. falciparum</i> และ <i>P.vivax</i> จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียด้วย agarose gel electrophoresis.....	58



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์มีสาเหตุมาจากโปรโตซัวใน phylum Apicomplexa โดยสามารถจำแนกเป็น 4 ชนิด ซึ่ง *Plasmodium falciparum* จัดเป็นชนิดที่พบได้บ่อยและเป็นสาเหตุของโรคมากที่สุด ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อชนิดนี้ทั่วโลกประมาณ 300-500 ล้านคน เชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรง และอาจถึงแก่ชีวิตได้ ทั้งนี้ในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อประมาณ 1 ล้านคน ส่วนใหญ่เป็นเด็กในทวีปแอฟริกา (Hay et al., 2004) ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* นั้นมีการกระจายทางภูมิศาสตร์กว้างขวางที่สุด ในแต่ละปีมีประชากรโลกติดเชื้อนี้ราว 70-80 ล้านคน และส่วนใหญ่เป็นประชากรในทวีปเอเชียและอเมริกาใต้ (Mendis et al., 2001) การติดเชื้อมาลาเรียนอกจากจะส่งผลต่อชีวิตและสุขภาพของผู้ติดเชื้อโดยตรงแล้วยังส่งผลต่อทารกที่ติดเชื้อมาลาเรียขณะตั้งครรภ์ ทำให้มีน้ำหนักแรกเกิดต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานและเป็นสาเหตุหนึ่งของการตายในทารกแรกเกิด นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการสูญเสียเวลาทำงานเนื่องจากการเจ็บป่วยตลอดจนค่าใช้จ่ายในการรักษาโรค (Shulman and Dorman, 2003)

โดยทั่วไปในการประเมินและเฝ้าระวังโรคติดเชื้อที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้อย่างจำเพาะจากอาการแสดงของโรคโดยตรงนั้นจำเป็นต้องอาศัยวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความไวและความจำเพาะสูง สำหรับการวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการหรือในภาคสนาม เช่น ในเขตปรากฏโรคมาลาเรียที่อยู่ตามชายแดนของประเทศไทยสามารถกระทำได้หลายวิธีแต่วิธีที่มีประโยชน์ รวดเร็ว ประหยัด และให้ผลถูกต้อง คือ การตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดบาง (Thin blood film) และฟิล์มเลือดชนิดหนา (Thick blood film) ที่ผ่านการย้อมสีิมซา ทั้งนี้ผู้ติดเชื้อต้องมีปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดสูงกว่าขีดจำกัดที่สามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แม้ว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดชนิดหนาจะให้ผลการตรวจที่มีความไวสูงกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดบาง เนื่องจากปริมาณโลหิตที่ใช้มีความแตกต่างกันประมาณ 3-5 เท่า (Gilles and Warrell, 1993) แต่ความสามารถในการจำแนกชนิดของมาลาเรียยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่มีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด และเป็นที่น่าสังเกตว่ารายงานสถานการณ์ไข้มาลาเรียประจำปีของกองมาลาเรียซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากผลการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดชนิดหนา โดยผู้ที่ผ่านการฝึกอบรมและมีประสบการณ์ไม่เคยตรวจพบ *P. ovale* เนื่องจากข้อจำกัดเกี่ยวกับลักษณะของเชื้อที่ปรากฏในแผ่นฟิล์มเลือดดังกล่าว นอกจากนี้การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มเลือดทั้งชนิดหนาและชนิดบางยังมีข้อจำกัดในการวินิจฉัย

ภาวะของการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดซึ่งในรายงานประจำปีดังกล่าวมีเพียงไม่เกินร้อยละ 2 (Mayxay et al., 2004)

ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโดยอาศัยชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อขจัดปัญหาความผิดพลาดจากการดูเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งต้องอาศัยทักษะและเวลาในการตรวจซึ่งมีความแตกต่างกันตามปัจเจกบุคคล สำหรับหลักการของชุดตรวจคือ การหาโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในกระแสโลหิตของผู้ติดเชื้อ เช่น histidine-rich protein 2 และ lactate dehydrogenase เป็นต้น (Uguen et al., 1995; Valecha et al., 1998; Palmer et al., 1998; Fryauff et al., 2000) เนื่องจากโปรตีนหรือเอนไซม์ดังกล่าวถูกสร้างจากเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิต ดังนั้นการตรวจโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปจึงให้ผลบวกในขณะที่ผู้ป่วยมีเชื้ออยู่ในร่างกาย อย่างไรก็ตามภายหลังจากเชื้อได้ถูกกำจัดไปแล้วการตรวจด้วยวิธีนี้ยังคงให้ผลบวกติดต่อกันอีกหลายสัปดาห์ แม้ว่าการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจดังกล่าวพบว่าให้ผลการตรวจที่มีความไวทัดเทียมกับวิธีการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* โดยตรงจากฟิล์มเลือด แต่ชุดตรวจที่มีในปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพในการตรวจหา *P. vivax* และเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ และการตรวจยังให้ผลต่ำกว่าการตรวจโดยใช้หลักการของ Polymerase chain reaction (PCR) (Coleman et al., 2002)

สำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียโดยการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป เช่น ParaSight™-F dipstick test, ICT Malaria Pf Test™ ซึ่งอาศัยหลักการ immunochromatographic test (ICT) เป็นการตรวจหา histidine-rich protein 2 หรือ OptiMAL™ เพื่อตรวจหา lactate dehydrogenase ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย (Uguen et al., 1995; Valecha et al., 1998; Palmer et al., 1998; Ndao et al., 2004) แม้ว่าชุดตรวจดังกล่าวจะมีความสะดวกในการใช้เนื่องจากไม่ต้องอาศัยประสบการณ์หรือทักษะพิเศษ และสามารถลดระยะเวลาในการวินิจฉัยอย่างมาก แต่ความไวในการตรวจยังไม่ต่างจากผลที่ได้โดยการตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดหนาอย่างมีนัยสำคัญ ในกรณีที่มีเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตต่ำกว่า 500 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ผลของความไวและความจำเพาะจะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 60-70 เท่านั้น (Fryauff et al., 2000) หรือในการศึกษาบางครั้งพบว่าวิธี ICT และ OptiMAL มีความไวเพียงร้อยละ 30-40 ในขณะที่ความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 90 สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่มี parasitemia ต่ำกว่าร้อยละ 0.002 เมื่อใช้วิธี PCR เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ (Ndao et al., 2004) นอกจากนี้ความจำเพาะของผลการตรวจยังจำกัดเฉพาะ *P. falciparum* แม้ว่าชุดตรวจดังกล่าวได้มีการพัฒนาสำหรับ *P. vivax* แต่ประสิทธิภาพยังไม่สามารถช่วยในการวินิจฉัยได้ (Coleman et al., 2002) นอกจากนี้ชุดตรวจสำเร็จรูปยังคงมีราคาแพง



การตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่ให้ความไว และความถูกต้องสูงกว่าการตรวจทุกวิธีที่มีในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี nested PCR ซึ่งเป็นการประยุกต์วิธี PCR เพื่อการตรวจหาเชื้อมาลาเรียหลายชนิดจากการทำ PCR เพียง 2 ครั้ง เป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก สามารถตรวจหาเชื้อที่มีจำนวน parasitemia น้อยกว่า 1 ตัว ในเลือด 1 ไมโครลิตร วิธีการนี้เป็นวิธีที่สะดวก ง่าย และรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากได้ การวิเคราะห์ผลนั้นไม่จำเป็นจะต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์สูงในการตรวจหาเชื่อดังเช่น การตรวจจากกล้องจุลทรรศน์ วิธี PCR สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการวินิจฉัยมาลาเรียได้ทั้ง 4 ชนิด ที่ก่อโรคในมนุษย์ (Snounou et al., 1993a; Snounou et al., 1993b; Ndao et al., 2004; Kimura et al., 1997) รวมทั้งสามารถใช้ตรวจหาเชื้อมาลาเรียของลิงที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ดังในกรณีการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. knowlesi* จากลิงมาสู่คน (Singh et al., 2004; Jongwutiwes et al., 2004)

การวินิจฉัยโดยวิธี PCR ที่มีผู้พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยการเพิ่มปริมาณของ DNA ในบริเวณ small subunit ribosomal RNA gene (SSU rRNA gene) ซึ่งเป็น gene ที่มีหลายชุด (copy) ในแต่ละเซลล์ ทั้งนี้ gene ดังกล่าวมีส่วนของลำดับ DNA ที่แตกต่างกันไป และมีความจำเพาะต่อ species ของมาลาเรีย (Waters and McCutchan, 1989) ดังนั้น SSU rRNA gene จึงเหมาะสมต่อการวินิจฉัยโดยวิธี PCR จากการเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียพบว่าวิธี PCR ให้ผลการตรวจที่ไวกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดหนา 1.23 เท่า และมีความจำเพาะมากกว่า 1.41 เท่า (Snounou et al., 1993) อย่างไรก็ตามความไวและความจำเพาะของการตรวจโดย PCR ยังขึ้นอยู่กับ การออกแบบ PCR primers การกำหนดสภาวะของ PCR ตลอดจนการป้องกันการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ PCR ในรอบแรก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของ nested PCR อย่างไรก็ตามวิธี PCR ที่มีผู้พัฒนาขึ้นยังจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาและปรับปรุง เพื่อให้มีความไว ความจำเพาะ ลดค่าใช้จ่าย และสามารถแยก species ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด รวมทั้งเชื้อมาลาเรียของลิงที่สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้ เช่น *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* และ *P. inui* และชนิดที่ไม่ติดต่อสู่มนุษย์ ได้แก่ *P. coatneyi*, *P. hylobati*, *P. fieldi*, *P. fragile* เป็นต้น (Wolfe et al., 1998; Singh et al., 2004; Jongwutiwes et al., 2004)

แม้ว่าวิธีการวินิจฉัยโดย PCR อาจไม่เหมาะกับการใช้ตรวจหามาลาเรียเพื่อการบริการโดยทั่วไป แต่ในด้านการวางมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียในระดับประเทศอย่างยั่งยืนนั้น ข้อมูลในเชิงระบาดวิทยาที่มีความละเอียดถูกต้องสูงนับเป็นข้อสำคัญที่สุดประการหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเด็นเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ที่มีเชื้อในร่างกายในระดับต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจพบได้จากการตรวจฟิล์มเลือด ซึ่งผู้ติดเชื่อดังกล่าวมักจะไม่ได้รับการรักษาจึงมีโอกาสที่จะเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อไป นอกเหนือจากภาวะการป่วยจากโรคที่จะมีการดำเนินต่อไป



และอาจรุนแรงขึ้นในภายหลัง ผู้ป่วยเหล่านี้อาจเป็นแหล่งที่ช่วยส่งเสริมให้เชื้อมาลาเรียมากขึ้นจากการหาซื้อยารักษาตนเอง รวมทั้งระบาดวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันในผู้ป่วยรายเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาโดยวิธี PCR หรือการเฝ้าติดตามผลการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียมักพบว่าภาวะการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดในผู้ป่วยมีมากกว่าผลการตรวจจากฟิล์มเลือดชัดเจน ดังนั้นเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าวชนิดที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยจึงได้รับปัจจัยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่อาจดีอยากรักษามาลาเรียมากขึ้นในอนาคต และยังเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อไปได้

ปัจจุบันมีการศึกษาคิดค้นเทคนิคต่าง ๆ ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้นมากมายแต่ส่วนใหญ่จะทำการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย บางครั้งพบว่าผู้ป่วยได้ปฏิเสธการตรวจหรือผู้ป่วยมาลาเรียไม่มาตามนัดในการประเมินผลการตรวจรักษาเนื่องจากกลัวการเจาะเลือด โดยเฉพาะเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 10 ปี ทำให้การประเมินผลการรักษาไม่สามารถติดตามได้อย่างชัดเจน และถ้ายังมีเชื้อที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เป็นสาเหตุให้เกิดการดีयरวมถึงทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยสูงขึ้น อันมีผลกระทบในองค์รวมของการควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรีย

การศึกษาวินิจฉัยที่ต้องอาศัยตัวอย่าง DNA ของเชื้อมาลาเรียจำเป็น ต้องทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยในเขตปรากฏโรค ซึ่งมักต้องอาศัยขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเพิ่มเติมนอกเหนือจากการที่ผู้ป่วยต้องมารับการเจาะเลือดที่ปลายนิ้วเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 2006 Mharakurwa และคณะได้ทำการศึกษาประยุกต์ใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในส่วนของยีน merozoite surface protein 2 (MSP2) และ dihydrofolate reductase (DHFR) จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะของผู้ติดเชื้อมาลาเรียในตอนใต้ของประเทศแซมเบีย จำนวน 47 ราย พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบมาลาเรียได้เช่นเดียวกับกับตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยคนเดียวกัน

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยไม่ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจดังกล่าวอย่างชัดเจน และไม่ได้ศึกษาตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. vivax* ซึ่งพบอุบัติการณ์สูงในหลายภูมิภาคของโลก นอกจากทวีปแอฟริกา ดังนั้นเพื่อเป็นการประเมินผลการตรวจวิธีดังกล่าวจากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมาลาเรียในประเทศไทย ซึ่งมีการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียที่แตกต่างจากประเทศแซมเบีย ทั้งในด้านความชุกและการกระจายของเชื้อแต่ละชนิด ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างปัสสาวะ น้ำลายและเลือดของผู้ป่วยในจังหวัดตากซึ่งเป็นท้องที่มีอุบัติการณ์ของโรคสูงสุดในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR เปรียบเทียบผลการตรวจจากฟิล์มเลือดที่ย้อมสี ความรู้ที่ได้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคและการใช้ตัวอย่างในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียต่อไป

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### อนุกรมวิธานเชื้อมาลาเรีย

การศึกษาในด้านชีววิทยาตลอดจนการประยุกต์วิธีการในศาสตร์แขนงต่าง ๆ เพื่อศึกษาเชื้อมาลาเรียและโรคมาลาเรียมีอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุสำคัญของอาการเจ็บป่วยและเสียชีวิตของประชากรโลกนับล้านคนต่อปี ซึ่งในปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวชนิด eukaryote มี nuclear membrane แยก nucleus ออกจาก cytoplasm ชัดเจน ไม่มีออร์แกเนลล์เฉพาะที่ใช้เคลื่อนไหว จัดเป็นโปรโตซัวใน Phylum Apicomplexa เนื่องจากมีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่เรียกว่า apical complex ทำหน้าที่เกี่ยวกับการลุกลามเข้าสู่โฮสต์เซลล์ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามี polar ring, microtubule, rhoptry, conid, micropore และ microneme อยู่ทางด้านหน้าของเซลล์โดยพบได้ในบางระยะ เช่น ระยะเมอโรซอइट (merozoite) ระยะสปอโรซอइट (sporozoite) และระยะโอโอไคไนต์ (ookinete) เชื้อมาลาเรียจัดอยู่ใน Class Sporozoa เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนได้ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ในระยะโอโอซิสต์ (oocyst) ภายในประกอบด้วย sporozoite ซึ่งเป็นระยะติดต่อยู่เป็นจำนวนมาก มีการสร้างแฟลกเจลลา (flagella) เฉพาะในระยะไมโครแกมมีต (microgamete) หรือแกมมีตเพศผู้มีเท้าเทียม (pseudopod) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่สำหรับการกินอาหาร จัดอยู่ใน Subclass Coccidia โดยมีวงจรชีวิตที่ประกอบด้วยการสร้าง merozoite (merogony) กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบใช้เพศ (gametogony) และกระบวนการสร้าง sperozoite (sporogony) (Beaver et al., 1984) เชื้อมาลาเรียจัดอยู่ใน Order Eucoccidiida เนื่องจากมีกระบวนการสร้าง merozoite ซึ่งเกิดขึ้นในสัตว์มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ใน Suborder Haemosporina เนื่องจากไม่มีโคไคโนอิด (conoid) ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ลักษณะเป็นแท่ง ส่วนระยะ sporozoite อยู่เป็นอิสระนอกเซลล์ของโฮสต์โดยกระบวนการสร้าง sporozoite เกิดขึ้นในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง การเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgamete) และเพศเมีย (macrogamete) แยกจากกัน โดยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เจริญเป็น microgamete 8 ตัวที่มีแฟลกเจลลา ระยะ zygote สามารถเคลื่อนที่ได้เรียกว่า ookinete การติดต่อดูดูดโดยอาศัยยุงใน genus *Anopheles* เชื้อมาลาเรียจัดอยู่ใน Family Plasmodiidae โดยพบเชื้อในเลือดของสัตว์จำพวกนก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเจริญแบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยกระบวนการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งในเซลล์เดิม เรียกเซลล์ที่อยู่ในระยะดังกล่าวว่าไซซอนต์ (schizont) ซึ่งเมื่อเกิดการแบ่งไซโทพลาสซึมจะได้เซลล์



ที่มีนิวเคลียสเดี่ยวจำนวนมากเรียกแต่ละเซลล์ว่า merozoite เชื้อมาลาเรียจัดอยู่ใน Genus *Plasmodium* ประกอบด้วย species ต่าง ๆ ในธรรมชาติประมาณ 120 ชนิด ในหนู ค้างคาวและ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบ 19 ชนิด ใน primate พบ 22 ชนิด ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากกว่า 70 ชนิด แต่มีเพียง 4 ชนิดเท่านั้นที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในคนซึ่งได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* (Spencer, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่า *Plasmodium* ที่ทำให้เกิดโรคในลิงหลายชนิดอาจติดต่อมาสู่คนได้ เช่น *P. knowlesi*, *P. inui*, *P. cynomolgi* (Marquardt and Demaree, 1985; Bruce-Chwatt, 1993), *P. simium* และ *P. simiovale* (Coatney et al., 2003)

### วงจรชีวิต (Life cycle)

เชื้อมาลาเรียมีวงจรชีวิตที่อาศัยสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังด้วยการเจริญแบบอาศัยเพศใน ยุงก้นปล่องเพศเมีย (sexual development) และการเจริญแบบไม่อาศัยเพศในคน (asexual development) ซึ่งประกอบด้วย การเจริญในเซลล์ตับและการเจริญในเม็ดเลือดแดงตามลำดับ

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อมาลาเรียโดยอาจมีเชื้อปะปนกันหลายระยะ แต่ระยะ gametocyte เท่านั้นที่จะเจริญต่อไปเมื่อเข้าไปในกระเพาะอาหารของยุง gametocyte เพศเมีย (female gametocyte) จะเจริญเป็นแกมมีต (gamete) โดย gametocyte เพศผู้ (microgametocyte) จะมีการแบ่งนิวเคลียสเป็น 3 ครั้งและมีการสร้างแฟลกเจลลา (flagella) กระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่า exflagellation จะได้เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgametes) จำนวน 8 ตัวที่มีแฟลกเจลลารูปปร่างยาวรีคล้ายเส้นด้าย นิวเคลียสอยู่ตรงกลาง เซลล์มีลักษณะอัดแน่น (compact) และยืดยาวออกเนื่องจากการเรียงตัวของโครโมโซม ส่วนแกมมีโตไซต์เพศเมีย (macrogametocyte) จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogamete) (Okamoto et al., 2009) เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียแล้วจะเจริญเป็นไซโกต (zygote) มีขนาดประมาณ 6 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลม ซึ่งกระบวนการดังกล่าวยังคงอยู่ ภายในช่องว่าง (lumen) กระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้นไซโกตจะเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยมีการยืดตัวยาวขึ้นและเจริญเป็นโอโอไคเน็ต (ookinete) มีขนาดประมาณ 15-19 ไมโครเมตร กว้าง 1-2.7 ไมโครเมตร บางส่วนของไซโตพลาสซึมจะเปลี่ยนเป็นเท้าเทียม (pseudopod) เพื่อการ เคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุง (Zieler and Dvorak, 2000) จากนั้นจะเคลื่อนที่ไซผ่าน เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารแล้วเจริญอยู่ที่ผิวหนังนอกกระเพาะอาหารของยุง (Billker et al., 1998) โดยมีเยื่อบุกระเพาะอาหารด้านนอกปกคลุมอยู่ เรียกระยะนี้ว่าโอโอซิสต์ (oocyst) ซึ่งมี เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมโครเมตร และภายในมีสปอร์โร بلاส (sporoblast) (Meis et al., 1992) เมื่อโอโอซิสต์เจริญต่อไป สปอร์โร بلاสภายในจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นสปอร์โร



ชอยด์ (sporozoite) ซึ่งในระยะแรกจะยังมีขนาดติดกันอยู่ เมื่อสปอโรโรชอยด์เจริญเต็มที่สปอโรโรชอยด์จะมีขนาดเล็กลงและสลายไปในที่สุด (Sinden and R, 2002) สปอโรโรชอยด์ที่เกิดขึ้นจะมีจำนวนประมาณ 1,000-2,000 ตัวในโอโอซิสต์ดังกล่าว (Rosenberg and Rungsiwongse, 1991) ซึ่งระยะนี้โอโอซิสต์จะมีขนาดใหญ่มากขึ้นเป็นลำดับโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมครอน โดยยุงหนึ่งตัวอาจมีโอโอซิสต์อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อสปอโรโรชอยด์เจริญเต็มที่แตกออกจาก โอโอซิสต์ มีความยาวประมาณ 11 ไมครอนเมตร และความกว้างประมาณ 1 ไมครอนเมตร โดยจะกระจายไปตามช่องว่างในทรวงอกและเคลื่อนที่ไปสู่ต่อมน้ำลายของยุงและสะสมอยู่ในน้ำลายเป็นจำนวนมาก ยุงที่มีสปอโรโรชอยด์ในต่อมน้ำลายสามารถแพร่เชื้อมาลาเรียโดยสปอโรโรชอยด์ซึ่งปะปนมากับน้ำลายยุงขณะกัดคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่งเป็นโฮสต์ที่เหมาะสมต่อไประยะเวลาที่เชื้อมาลาเรียเจริญในยุงแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม กล่าวคือ ถ้าอุณหภูมิสูงจะเจริญเร็วกว่าอุณหภูมิต่ำแต่ทั้งนี้ต้องอยู่ในช่วงเวลาที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียและชนิดของยุงด้วย ซึ่งโดยทั่วไประยะเวลาที่เจริญในยุงประมาณ 8-35 วัน (Spencer, 1986) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย เช่น อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 9-10 วัน ใกล้เคียงกับ *P. vivax* ซึ่งใช้เวลา 8-10 วัน ในขณะที่ *P. malariae* และ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน และ 12-14 วัน ตามลำดับ

ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียสู่คนมีหลายชนิดโดยมีการแพร่กระจายแตกต่างกันไปตามสภาวะทางภูมิศาสตร์ เช่น ในทวีปแอฟริกายุงพาหะหลัก คือ *An. gambiae* complex ส่วนในทวีปอเมริกาใต้ได้แก่ *An. darlingi* สำหรับยุง *An. stephensi* พบมากในประเทศอินเดีย สำหรับในประเทศไทยยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะที่สำคัญได้แก่ *A. dirus*, *An. minimus* และ *An. maculatus* (Kiszewski et al., 2004) โดยที่ *An. dirus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณแหล่งน้ำสะอาดบริเวณชอกหินหรือตามหลุมน้ำในป่า *An. minimus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณลำธารที่น้ำสะอาดและไหลเอื่อย *An. maculatus* มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณชอกหินที่แสงแดดส่องถึง ยุงในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ที่ภูมิประเทศเป็นป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้ ปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการแพร่เชื้อมาลาเรียในธรรมชาติได้แก่ การแพร่กระจายชนิดของยุง นิเวศการกัด อายุขัยของยุงและความหนาแน่นในแต่ละฤดูกาล

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคนจะปล่อยเชื้อระยะสปอโรโรชอยด์เข้าสู่กระแสเลือดภายในเวลาประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง สปอโรโรชอยด์จะเข้าสู่เซลล์ตับโดยอาศัยกระบวนการที่ซับซ้อนและเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจึงเชื่อว่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกที่อาศัยตัวตอบรับ (receptor mediated mechanism) เนื่องจากที่ผิวของสปอโรโรชอยด์ถูกคลุมด้วยโปรตีนหลายชนิด

คือโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 KD เรียกว่า circumsporozoite protein (CSP) (Nussenzweig and Nussenzweig, 1990) โดยแอนติบอดีต่อ CSP สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรรอยต์เข้าสู่เซลล์ตับชนิด HepG2 ในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ CSP ยังมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันในมาลาเรียต่างชนิดกันและมีคุณลักษณะเป็น cell-adhesive motif โดยประกอบด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนที่เป็นเบส (basic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Rich et al., 1990) ทั้งนี้ cell-adhesive motif ยังพบได้ในโปรตีนบนผิวของสปอร์โรรอยต์อีกชนิดหนึ่งที่มีน้อยมาก เรียกว่า thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) (Sultan et al., 1997) จากการศึกษาพบว่า cell-adhesive motif จะทำปฏิกิริยากับบริเวณซึ่งเป็นโปรตีนที่พบบนผิวของสปอร์โรรอยต์ โดยจะจับกับ sulfated glycans ที่บริเวณ basolateral domain ของเซลล์ตับ ในส่วนของ Disse space โดยแอนติบอดีต่อ circumsporozoite protein และ thrombospondin-related adhesion protein สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรรอยต์เข้าสู่เซลล์ตับได้อย่างมีประสิทธิภาพในหลอดทดลอง

เมื่อสปอร์โรรอยต์ลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะในการเจริญ และมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นแบบไม่อาศัยเพศ เรียกระยะต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์ตับนี้ว่า exo-erythrocytic stage หรือ hepatic stage หรือ pre-erythrocytic stage ระยะนี้จะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตพลาสซึมอันเดียวกัน ทำให้เกิดระยะไซซอนต์ (schizont) เมื่อระยะไซซอนต์เจริญเต็มที่ไซโตพลาสซึมจะถูกแยกไปอยู่กับแต่ละนิวเคลียส ทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียวเรียกว่าเมอร์โรซอิต (merozoite) ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร กระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยไม่อาศัยเพศดังกล่าวนี้เรียกว่า schizogony ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของมาลาเรียโปรตีนผิวของมาลาเรียก็จะเปลี่ยนแปลงไปด้วยเช่นกัน โปรตีนที่พบมากในระยะนี้ประกอบด้วยโปรตีนบางชนิดที่พบในระยะสปอร์โรรอยต์ และระยะเมอร์โรซอิต รวมทั้งโปรตีนที่เป็นแอนติเจนที่พบเฉพาะระยะที่อยู่ในเซลล์ตับ (liver stage antigens) ภายในเมอร์โรซอิตไม่มีองค์ประกอบของ malaria pigment หรือ hemozoin เนื่องจากระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญในตับไม่ได้อาศัยฮีโมโกลบินเป็นอาหาร เชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันจะมีจำนวนเมอร์โรซอิตแตกต่างกัน กล่าวคือ *P. falciparum* จะมีจำนวนเมอร์โรซอิตประมาณ 30,000-40,000 ตัว ที่เกิดจากสปอร์โรรอยต์เพียงตัวเดียว ในขณะที่ *P. vivax* นั้นแต่ละ สปอร์โรรอยต์ จะเจริญเป็นเมอร์โรซอิตประมาณ 10,000 ตัว ส่วน *P. ovale* และ *P. malariae* มีประมาณ 15,000 ตัว นอกจากนี้ระยะเวลาที่สปอร์โรรอยต์เจริญจนเกิดเป็นเมอร์โรซอิตในตับมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย กล่าวคือ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 5.5-7 วัน *P. vivax* ใช้เวลาประมาณ



6-8 วัน *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 9 วัน *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน (Sinden, 2002)

สำหรับระยะสปอโรซอइटของ *P. falciparum* และ *P. malariae* เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับแล้ว จะมีการเจริญเติบโตต่อไปตลอดระยะ pre-erythrocytic stage ทั้งหมดโดยไม่มีระยะที่หยุดพัก การเจริญชอนอยู่ในตับ (Urban and Roberts, 2003) แต่สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* นอกจากจะมีการเจริญเติบโตเข้าสู่เซลล์ตับตลอดระยะดังกล่าวแล้ว จะมีการหยุดพักการเจริญ ชั่วขณะจนกว่าจะถึงระยะเวลาหนึ่งจึงกลับมาเจริญต่อไปอีกซึ่งใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ และชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยอาจใช้เวลาเพียงไม่กี่เดือนหรืออาจจะนานเป็นปี เรียกระยะที่เชื้อ มาลาเรียหยุดพักการเจริญเติบโตในเซลล์ตับว่า hypnozoite ซึ่งระยะดังกล่าวจะเป็นสาเหตุทำให้ ผู้ป่วยมีอาการของไข้กลับ (relapse) (Bray and Gamham, 1982)

หลังจากที่เมอริโซซอइटแตกออกจากเซลล์ตับ จะออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ในกระแสเลือด ในระยะเวลาเพียงชั่วขณะเพื่อลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง จึงเป็นเวลาเมอริโซซอइटมีโอกาสสัมผัส กับสารต่าง ๆ ในกระแสเลือดโดยตรงรวมทั้งแอนติบอดีและสารอื่น ๆ ดังนั้นภายในระยะเวลาเพียง ประมาณ 30-60 วินาที เมอริโซซอइटจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง ซึ่งกระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนี้มีความซับซ้อนประกอบด้วยหลายขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนการเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงแบบไม่ เฉพาะเจาะจง (nonspecific attachment) โดยใช้ด้านใดของเมอริโซซอइटก็ได้ หลังจากนั้นเมอริโซซอइटจะหันด้านหน้าให้สัมผัสกับผิวเม็ดเลือดแดง (reorientation) ซึ่งระยะนี้เม็ดเลือดแดงจะมีการ เปลี่ยนแปลงรูปร่างชั่วคราว (deformation of the erythrocyte) ระยะต่อมาจะมีการสร้างรอย เชื่อมต่อ (junction) ระหว่างบริเวณด้านหน้า (apical end) ของเมอริโซซอइट กับผิวเม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นเมอริโซซอइटจะเคลื่อนที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดงโดยมีการสร้างเยื่อหุ้ม vacuole (Berzins, 2002) จนในที่สุดจะมีการเชื่อมปิด (sealing) ของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงพร้อมกับการเกิดเยื่อหุ้ม vacuole ล้อมรอบเมอริโซซอइट โดยกระบวนการทั้งหมดนั้นเชื่อว่าเป็นกลไกที่ต้องอาศัยตัวตอรับ เช่นกัน โดยพบว่าโปรตีนบนผิวเมอริโซซอइटที่สำคัญที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ ดังกล่าวมีหลายชนิด ได้แก่ merozoite surface protein 1 (MSP-1), merozoite surface protein 2 (MSP-2), erythrocyte binding protein (Preiser et al., 2000) ส่วนตัวตอรับบนผิว เม็ดเลือดแดงที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องสำหรับ *P. falciparum* ได้แก่ erythrocyte glycophorin A และ erythrocyte glycophorin B สำหรับ *P. vivax* ได้แก่ Duffy positive blood group นอกจากนี้ มาลาเรียต่างชนิดกันยังสามารถลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดงที่มีอายุแตกต่างกัน กล่าวคือ *P. vivax* และ *P. ovale* สามารถลุกลามเข้าได้เฉพาะเม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย (reticulocyte) ส่วน *P. malariae* ลุกลามเข้าในเม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก (senescent erythrocyte) แต่สำหรับ

*P. falciparum* สามารถกลืนเข้าเม็ดเลือดแดงได้ทุกช่วงอายุ จึงทำให้มีอัตราการพบเชื้อในเม็ดเลือดแดงได้สูงกว่าเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ (Frevert, 2004)

ภายหลังจากเมอริโทรซอิตเข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้วจะมีการเจริญต่อไป เมอริโทรซอิตในเม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะคล้ายวงแหวน โดยเมื่อย้อมเลือดด้วยสียิมซา (Giemsa) จะเห็นไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเป็นเรือนแหวนและมีนิวเคลียสที่ติดสีม่วงหรือแดงเป็นหัวแหวน เรียกระยะดังกล่าวว่าระยะวงแหวน (ring stage หรือ ring form) โดยมี vacuole ขนาดใหญ่อยู่ภายในเซลล์ทำให้นิวเคลียสถูกดันไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ซึ่งการเจริญของเชื้อมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงจะดำเนินต่อไปภายในเยื่อหุ้มมาลาเรียเรียกว่า parasitophorous vacuole ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงไม่ได้สัมผัสโดยตรงกับไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง เชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงจะได้อาหารจากการกินฮีโมโกลบิน โดยอาศัยกระบวนการพินโนไซโตซิส (pinocytosis) กล่าวคือจะมีการหว่าเข้า (invagination) ของเยื่อหุ้มตัวเชื้อมาลาเรีย และเยื่อหุ้มตัว parasitophorous vacuole เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะมีรูปร่างคล้ายปาก เรียกว่า cytostomes ในขณะเดียวกันส่วนของไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงจะไหลเข้าไปในส่วนที่หว่าดังกล่าว แล้วจะมีการเชื่อมปิดของคอคอดกลายเป็น food vacuole ในที่สุด นอกจากนี้มาลาเรียยังมีกระบวนการขนส่งน้ำตาลกลูโคส กรดไขมัน กรดอะมิโน เกลือแร่ต่าง ๆ ตลอดจน นิวคลีโอไซด์ (purine nucleosides) ผ่านเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญ ในขณะเดียวกันก็มีการขนส่งโปรตีนต่าง ๆ จากมาลาเรียไปสู่ไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงโดยอาจจะอยู่ในรูปของ membrane-bound vesicle หรืออาจจะแทรกอยู่ใน โครงสร้างของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดง (cytoskeleton) (Oh and Chishti, 2005)

เมื่อเชื้อมาลาเรียมีการเจริญต่อไประยะวงแหวนจะเปลี่ยนเป็นระยะโทรโฟซอิต (trophozoite) โดยที่ไซโตพลาสซึมจะมีการขยายตัวออกแต่ยังไม่มีการแบ่งตัว ทำให้มีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน อาจพบลักษณะคล้ายเท้าเทียมและส่วนของ vacuole มีขนาดเล็กลง เรียกระยะดังกล่าวว่า ระยะโทรโฟซอิตที่กำลังเจริญ (growing trophozoite) ระยะนี้เชื้อที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็วจะอาศัยสารต่าง ๆ ในเม็ดเลือดแดงเป็นหลัก โดยอาหารส่วนใหญ่จะได้อาหารจากกระบวนการย่อยสลายฮีโมโกลบิน ซึ่งจะถูกละลายเป็นฮีม (heme) และโกลบิน (globin) แต่เชื้อมาลาเรียไม่สามารถย่อยสลายฮีมให้สมบูรณ์ โดยสิ้นสุดการย่อยสลายฮีมให้เป็น ferriprotoporphyrin IX ซึ่งเป็นสารมีพิษต่อเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงมีกระบวนการกำจัดสารดังกล่าวในรูปกากอาหาร โดยอาศัยเอนไซม์ heme polymerase ทำให้สารดังกล่าวรวมตัวกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) และไม่มีสารพิษ ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลทองหรือน้ำตาลปนดำอยู่ในไซโตพลาสซึมของเชื้อมาลาเรีย เรียกลักษณะดังกล่าวว่า malarial pigment



หรือ hemozoin ในระยะโทรโฟซอยต์นี้เชื้อมาลาเรียจะปลดปล่อยโปรตีนหลายชนิดสู่เม็ดเลือดแดง อาจอยู่ในรูปของ caveola-vesicle complex ซึ่งสามารถพบได้ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงโดยอยู่ติดกับด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อย้อมด้วยสีซิมาและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นจุดสีชมพู มีลักษณะรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยที่ *P. falciparum* จะพบ Meurer's dots มีลักษณะรูปร่างเป็นจุดใหญ่หรือแท่งสั้นๆ ส่วน *P. vivax* และ *P. ovale* จะพบ Schuffner's dots มีลักษณะรูปร่างเป็นจุดเล็กๆ ขนาดที่เท่ากันกระจายทั่วไป ส่วน *P. malariae* จะพบ Ziemann's dots เห็นเป็นจุดละเอียดกระจายทั่วไป ในขณะเดียวกันเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ระยะ growing trophozoite เป็นต้นไปจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการติดสีซิมาโดย *P. vivax* เม็ดเลือดแดงจะมีขนาดโตขึ้นและติดสีซีดลง ส่วน *P. ovale* มีขนาดโตขึ้นเล็กน้อยและมักเป็นรูปรีโดยมีปลายแต่ละด้านเป็นแฉก (fimbriation) ในขณะที่ *P. falciparum* และ *P. malariae* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงชัดเจน ซึ่งความแตกต่างของเหล่านี้สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อมาลาเรียได้ (Moore et al., 2006)

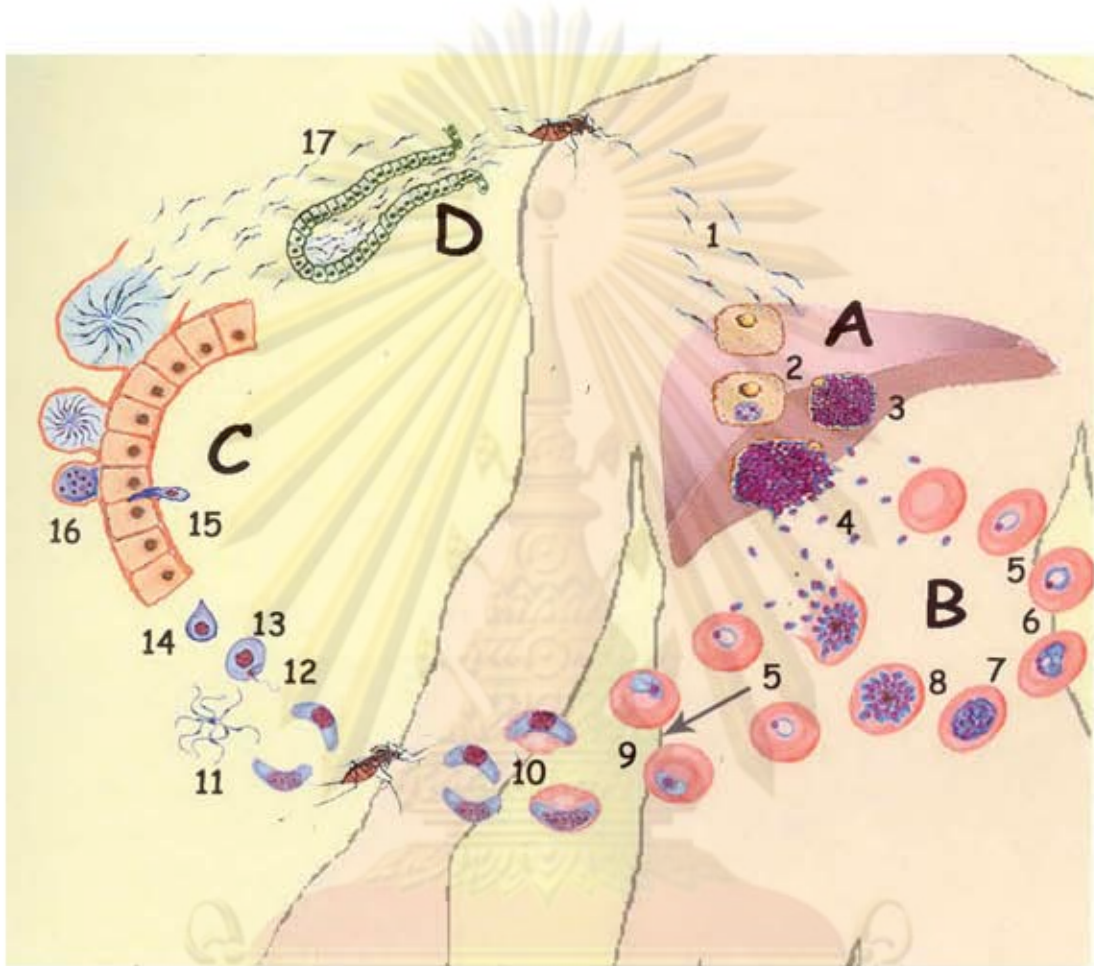
ระยะโทรโฟซอยต์ซึ่งมีนิวเคลียสเดียวนั้นเมื่อเจริญต่อไปจะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตพลาสซึมเดียวกันทำให้เกิดระยะไซซอนต์ระยะแรก (early schizont) และเมื่อไซซอนต์เจริญเต็มที่จะมีการแบ่งไซโตพลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียวเรียกระยะนี้ว่าไซซอนต์ระยะหลัง (late schizont) และภายในประกอบด้วยเมอริโรซอยต์ เรียกกระบวนการแบ่งตัวนี้ว่า schizogony ในช่วงนี้ malarial pigment จะถูกกำจัดออกนอกเซลล์ของเชื้อมาลาเรียและทิ้งไว้ใน parasitophorous vacuole จำนวนเมอริโรซอยต์ที่เกิดขึ้นภายในเม็ดเลือดแดงจะมีจำนวนแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดย *P. falciparum* จะมีจำนวนเมอริโรซอยต์ประมาณ 8-26 ตัว ส่วน *P. vivax* มีจำนวน 12-24 ตัว สำหรับ *P. malariae* และ *P. ovale* มีจำนวนตั้งแต่ 6-12 ตัว เมื่อเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) เมอริโรซอยต์ในระยะหลังจะออกมาอยู่ในกระแสเลือดและพร้อมที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และมีการเจริญเป็นระยะดังกล่าวต่อไป เรียกระยะที่มีการเจริญและเพิ่มจำนวนโดยไม่ใช้เพศภายในเม็ดเลือดแดงว่า asexual erythrocytic cycle ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ระยะวงแหวนจนถึงระยะเมอริโรซอยต์จะแตกต่างกัน กล่าวคือ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 36-48 ชั่วโมง เรียกว่า subtertian หรือ malignant tertian malaria สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เรียกว่า tertian malaria ส่วน *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง เรียกว่า quartan malaria ช่วงเวลาที่เมอริโรซอยต์แตกออกจากเม็ดเลือดแดงจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการแสดงของโรคในผู้ป่วยมาลาเรีย โดยจะทำให้เกิดมีอาการไข้หนาวสั่น

เมื่อเมอริโธซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงและเจริญต่อไปหลาย ๆ รอบจะมีเมอริโธซอยต์บางตัวไม่เข้าสู่วงจรการเจริญเติบโตแบ่งตัว แต่จะมีการเจริญต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ระยะแกมมีโตไซต์ (gametocyte) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในม้าม ไชกระดูกและอวัยวะภายในอื่น ๆ ทั้งนี้ปัจจัยที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีหลายประการ ส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการที่ระยะการเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงได้รับแรงกดดัน เช่น การได้รับยาต้านมาลาเรีย การสร้างแอนติบอดีของโฮสต์ ตลอดจนจันสารจากตัวเชื้อเอง ซึ่งระยะแกมมีโตไซต์ประกอบด้วยแกมมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมีย โดยในระยะแกมมีโตไซต์ของ *P. falciparum* จะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) แกมมีโตไซต์เพศผู้มีลักษณะอ้วนและสั้นกว่าแกมมีโตไซต์เพศเมีย ในขณะที่แกมมีโตไซต์ของ *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* จะมีรูปร่างกลมรี (oval shape) เมื่อย้อมสียิมซาพบว่าแกมมีโตไซต์เพศเมียไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าเข้ม นิวเคลียสมีขนาดเล็กติดสีแดงเข้ม ส่วนแกมมีโตไซต์เพศผู้ไซโตพลาสซึมจะติดสีฟ้าจางกว่า นิวเคลียสมีขนาดใหญ่และติดสีอ่อนกว่า เนื่องจากจำนวนไรโบโซม (ribosome) ของแกมมีโตไซต์เพศเมียมีมากกว่าเพศผู้ นอกจากนี้จะพบนิวเคลียสบริเวณส่วนกลางของเซลล์ โดยแกมมีโตไซต์เพศผู้จะติดสีแดงอ่อนและอยู่กระจายกัน ส่วนเพศเมียจะติดสีแดงเข้มและอยู่อัดกันแน่น (compact) เนื่องจากแกมมีโตไซต์เพศเมียมีนิวคลีโอลัส (nucleolus) ชัดเจน และขนาดใหญ่เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สำหรับระยะเวลาที่แกมมีโตไซต์เริ่มปรากฏในกระแสเลือดนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดย *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 8-15 วัน ส่วน *P. vivax* และ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 5 วัน สำหรับ *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 5-23 วัน หลังจากที่ยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อระยะแกมมีโตไซต์เข้าไป เชื้อมาลาเรียจะเจริญในกระเพาะอาหารของยุงต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุงก้นปล่องและการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในร่างกายคน (ภาพโดยอูร์สยา พัฒนวงศ์จากหนังสือมาลาเรีย: สมชาย จงวุฒิเวศย์และอุษา ทิสยากร บรรณาธิการ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## พาหะนำเชื้อมาลาเรีย

สัตว์สำคัญที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียมาสู่มนุษย์ คือ ยุงก้นปล่องเพศเมีย ซึ่งอยู่ใน genus *Anopheles* โดยเชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของยุง ภายหลังจากเจริญเป็นระยะต่าง ๆ แล้วเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite จะเดินทางผ่านช่องอกและเข้าไปในต่อมน้ำลายยุงพร้อมที่จะแพร่เชื้อสู่คนในขณะที่ยุงก้นปล่องดูดเลือดคน ทั้งนี้ยุงก้นปล่องมีหลายชนิดและมีการกระจายทางภูมิศาสตร์แตกต่างกัน ตลอดจนมีความสามารถในการเป็นพาหะสำหรับเชื้อมาลาเรียได้ไม่เท่ากัน รวมทั้งมีแหล่งเพาะพันธุ์ที่แตกต่างกัน ในปัจจุบันพบว่า ยุงก้นปล่องมากกว่า 500 ชนิด มีประมาณ 72 species ที่พบ sporozoite ของเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ (Collins and Paskewitz, 1995) ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียไม่ได้พบเฉพาะในพื้นที่แพร่เชื้อมาลาเรียเท่านั้น แต่ยังพบได้ในหลายพื้นที่รวมทั้งพื้นที่ปลอดมาลาเรีย พื้นที่เหล่านี้จึงเป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของเชื้อมาลาเรีย สามารถจำแนกตามกลุ่ม ดังนี้

### ยุงพาหะหลัก (primary vector)

ยุงพาหะหลักได้แก่ยุงที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียโดยมีความพร้อมต่อการรับเชื้อมาลาเรียสูง (high receptivity) คือตรวจพบระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายยุงซึ่งถือเป็นระยะติดต่อกัน (infective stage) ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะหลักในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ

1. *Anopheles dirus* เป็นยุงพาหะที่มีความสามารถในการแพร่เชื้อมาลาเรียได้สูงสุด เดิมเข้าใจว่าเป็น species *balabacencis* แต่ต่อมาพบว่าเป็นคนละชนิดกัน เนื่องจากพบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ยุงชนิดนี้มีขนาดใหญ่ พบได้ในพื้นที่ป่าเขา สวนยาง ท้องที่ชุกพลอยในภาคตะวันออกและสวนผลไม้ สามารถพบได้แม้บนดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งอยู่สูงจากระดับน้ำทะเลถึง 4,500 ฟุต ชอบเพาะพันธุ์ในแอ่งน้ำขังที่มีร่มเงาในป่าเขา แอ่งน้ำขังขอบลำธาร แอ่งดิน แอ่งหิน และรอยเท้าสัตว์ที่มีน้ำขัง (Tsuda, Takagi and Suwonkerd, 2000) ไข่ของยุงชนิดนี้สามารถทนความแห้งแล้งได้หลายวัน มีนิสัยชอบกินเลือดคน (anthropophilic) และชอบเกาะพักนอกบ้าน (exophilic) เวลากลางวันจะเกาะพักตามพุ่มไม้เตี้ย ๆ โพงไม้หรือที่สงบเงียบ มีดและมีความชื้นสูงใกล้แหล่งเพาะพันธุ์ เวลาพลบค่ำจะบินไปสู่ที่อาศัยของคน แล้วเกาะพักตามฝาบ้านก่อน จากนั้นจึงกัดคนระหว่างเวลา 22.00-02.00 น. กัดคนได้ทั้งในบ้านและนอกบ้าน ในธรรมชาติพบ sporozoite ในต่อมน้ำลายของยุงชนิดนี้ได้สูงถึง 8.7% (*An. minimus* พบเพียง 2.5%) มีความชุกชุมสูงสุดในช่วงฤดูฝน บริเวณที่ห่างไกลจากป่า ปริมาณความหนาแน่นของยุงชนิดนี้จะลดน้อยลง ในปี ค. ศ. 1988 ได้มีการแบ่งยุงใน species ออกเป็น 6 ชนิด ได้แก่ชนิด A B C D E และ F โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียด โดยชนิด A และ D มักพบตามท้องที่ป่าเขาชายแดนไทย-พม่า ป่าทางภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก *An. dirus* ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นชนิดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายโรคได้สูงสุด เป็นยุงในท้องที่ป่าเขา

ชนิด B พบเฉพาะในภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดพังงาลงไป ชนิด F พบร่วมกับชนิด B บริเวณชายแดน ไทย-มาเลเซีย ชนิด C พบในป่าจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดสุราษฎร์ธานี ส่วนชนิด E พบเฉพาะ ในป่าทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอินเดีย

2. *An. minimus* เป็นยุงพาหะที่สำคัญของพื้นที่ป่าเชิงเขา มักเพาะพันธุ์ตามลำธารน้ำไหล และน้ำซับน้ำซึม พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศ ยุงชนิดนี้มีความชุกชุมที่สูงสุดในเดือน มิถุนายน - กรกฎาคม และกันยายน - พฤศจิกายน มักกัดคนเวลา 18.00 - 19.00 น. ในช่วงฤดูหนาว ส่วนฤดูร้อนและฤดูฝนมักกัดคนเวลา 21.00 - 22.00 น. หลังจากกัดคนแล้วมักจะเกาะพักภายใน บ้าน *An. minimus* ประเทศไทยมี 3 ชนิดคือ ชนิด A C และ D ชนิด A พบได้ทั่วไป ส่วนชนิด C และ D พบได้ในบางพื้นที่ของจังหวัดตากและกาญจนบุรีเท่านั้น (Somboon et al., 2001)

3. *An. maculatus* เป็นยุงพาหะที่พบได้ทั่วไปในท้องที่ป่าเขาทั่วประเทศ เพาะพันธุ์ในธาร น้ำไหลที่มีแดดส่องถึง เช่นเดียวกับยุง *An. minimus* (Chen, Harbach and Bullin, 2002) เป็นพาหะสำคัญของโรคมาเลียในประเทศมาเลเซียและภาคใต้ของประเทศไทย มีนิสัยชอบกัดสัตว์ มากกว่าคน และชอบกัดคนอกบ้าน มักกัดคนระหว่างเวลา 18.00-21.00 น. มีระยะบินไกลประมาณ 1.65 กิโลเมตร ยุงชนิดนี้จัดเป็นพาหะหลักอีกชนิดหนึ่งของโรคมาเลียที่มีการแพร่ระบาดอยู่ใน ภาคใต้ของไทย โดยเฉพาะบริเวณเขตแดนติดต่อกับประเทศมาเลเซีย

#### ยุงพาหะรอง (secondary vector)

ยุงพาหะรอง ได้แก่ยุงที่สงสัยว่าอาจเป็นพาหะนำเชื้อมาเลียได้ มีความพร้อมต่อการรับ เชื้อมาเลียปานกลาง (moderate receptivity) ตรวจพบ sporozoite ในต่อมน้ำลาย แต่มี บทบาทในการแพร่เชื่อน้อยกว่ายุงพาหะหลัก ส่วนมากจะพบว่ายุงกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับการ เกิดโรคต่ำ เช่น ระดับความหนาแน่นของยุงต่ำ (low density) แต่ยังคงมีอุบัติการณ์ของโรคเกิดขึ้น หรืออาจพบว่ายุงเหล่านี้มีนิสัยชอบกินเลือดสัตว์มากกว่าเลือดคน (Suwonkerd et al., 2004) ยุงในกลุ่มนี้มี 3 ชนิด คือ

1. *An. sudaicus* เป็นยุงพาหะที่มักวางไข่ในน้ำกร่อย โดยเฉพาะน้ำที่มีสาหร่ายทะเลขึ้น และมีแสงแดดส่องถึง ดูดเลือดทั้งคนและสัตว์ ทั้งที่อาศัยอยู่ภายในและภายนอกบ้าน แต่หลังจาก นั้นจะเกาะพักอยู่ในบ้าน ยุงชนิดนี้จัดเป็นพาหะหลักของโรคมาเลียที่แพร่ระบาดอยู่แถบชายฝั่ง ทะเลของประเทศไทยโดยเฉพาะบริเวณฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย ตลอดจนบริเวณ เกาะต่าง ๆ

2. *An. aconitus* เป็นยุงพาหะทั่วทุกภาคของประเทศไทย อาศัยอยู่ตามพื้นที่ราบลุ่มที่เป็น พื้นที่การเกษตร เช่น นาข้าว ไร่ สวนและมักวางไข่ในน้ำไหลใสสะอาดรวมทั้งเป็นบริเวณที่มีพืชน้ำ ขึ้น พบเกือบทุกภาคของประเทศไทย



3. *An. pseudowillmori* พบในท้องที่ป่าเขาและเชิงเขา มีลักษณะคล้ายกับยุง

*An. maculatus*

### การติดต่อของเชื้อมาลาเรียสู่คน

1. ติดต่อดังวิธีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการถูกยุงก้นปล่องที่มีเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายกัดซึ่งเป็นวิธีที่พบมากที่สุด
2. ติดต่อกันจากแม่ที่มีเชื้อมาลาเรียในร่างกายและถ่ายทอดทางทารกไปสู่ทารกในครรภ์ วิธีนี้พบไม่มากนักในพื้นที่ที่มีเชื้อมาลาเรียชุกชุม
3. ติดต่อดังการให้เลือด จะพบในผู้บริจาคเลือดที่มีความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดระดับต่ำและไม่มีอาการ ซึ่งหากไม่ได้ทำการตรวจหาเชื้อมาลาเรียก่อน ผู้ที่รับเลือดจะป่วยเป็นมาลาเรียได้
4. ติดเชื้อมาลาเรียจากการปลูกถ่ายอวัยวะ เกิดได้จากการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ นอกจากนี้การปลูกถ่ายตับอาจได้รับมาลาเรียได้ที่อยู่ในระยะ exoerythrocytic stage ที่อาศัยอยู่ในตับได้
5. ติดเชื้อมาลาเรียจากเข็มฉีดยา กล่าวคือ เชื้อมาลาเรียสามารถติดต่อได้แม้จะได้รับเชื้อเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่น การถูกเข็มตำและปนเปื้อนเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียเพียง 0.05 มิลลิลิตร อาจทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนในร่างกายมากกว่าการถูกยุงที่มีเชื้อมาลาเรียกัด

### การกระจายทางภูมิศาสตร์

การกระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งทางเศรษฐกิจ สังคมและลักษณะทางภูมิศาสตร์ รวมทั้งการมี host ที่เหมาะสมโดยเฉพาะยุงก้นปล่อง ซึ่งเป็นพาหะนำโรค มาลาเรียมีขอบเขตการกระจายของโรคอยู่ในพื้นที่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 64° เหนือถึงเส้นรุ้งที่ 32° ใต้ และครอบคลุมพื้นที่ซึ่งอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำทะเล 400 เมตร จนถึงสูงกว่าระดับน้ำทะเล 2,600 เมตร อุณหภูมิระหว่าง 16-38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่าร้อยละ 60 จึงเหมาะสำหรับการแพร่กระจาย

โรคมาลาเรียมีการแพร่กระจายในประเทศต่าง ๆ พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่อยู่ในบริเวณเขตร้อนและเขตอบอุ่นประมาณ 90 ประเทศ (Schantz-Dunn and Nour, 2009) พบการกระจายของโรคมกกว่าบริเวณอื่น ได้แก่ ประเทศในแถบทวีปแอฟริกา อเมริกากลาง อเมริกาใต้ เอเชีย มีประชากรโลกกว่า 350-500 ล้านคนที่ติดเชื้อมาลาเรีย (Duarte et al., 2004) ในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อประมาณ 2-3 ล้านคนและประเทศในทวีปแอฟริกามีผู้ติดเชื้อมาลาเรียสูงมากที่สุด โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงมากกว่าร้อยละ 50 ของประชากรทั้งประเทศและประมาณว่า



มีประชากรทั่วโลกมากกว่า 90% ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย รวมทั้งประมาณ 25 ล้านคนของผู้หญิงตั้งครรภ์ทั่วโลกที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (Haque et al., 2009; Lewison and Srivastava, 2008)

การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดในพื้นที่ต่าง ๆ พบว่าเชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุของโรคส่วนใหญ่เกิดจาก *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยทั่วไปเชื้อ *P. falciparum* พบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่นในทวีปอาฟริกา อเมริกาและเอเชีย (Santos-Ciminera et al., 2007) ส่วน *P. vivax* พบมากในประเทศแถบลาตินอเมริกา จีน ตุรกีและอินเดีย แต่ในทวีปอาฟริกา ตะวันตก จะพบผู้ติดเชื้อชนิดนี้น้อยมากเนื่องจากเชื้อ *P. vivax* เกี่ยวข้องกับ Duffy บนผิวเม็ดเลือดแดง สำหรับ *P. malariae* พบการแพร่กระจายของเชื้อได้ทั่วไป แต่น้อยกว่า *P. falciparum* และ *P. vivax* ส่วน *P. ovale* พบได้น้อยเช่นกันแต่พบมากในทวีปอาฟริกามากกว่าบริเวณอื่นซึ่งการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกที่กล่าวมานี้ (Zhou et al., 1998) มักมีสาเหตุมาจากปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย คือ

1. การเพิ่มจำนวนของพาหะนำโรค ซึ่งได้แก่ยุงก้นปล่อง อันเนื่องมาจากมีแหล่งเพาะพันธุ์ที่ดีและการใช้ยาฆ่าแมลงที่ไม่ได้ผล
2. การเพิ่มจำนวนประชากรในแหล่งระบาดของโรค ทำให้มีผู้ได้รับเชื้อมากขึ้น
3. ภาวะขาดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อของประชากร
4. การมีสภาวะแวดล้อมและภูมิอากาศที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ การแพร่กระจายของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง 18-29 องศาเซลเซียสและมีความชื้นสูง



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 แสดงแผนที่การระบาดของโรคมาลาเรียทั่วโลก (WHO, 2006)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของไทย นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศโดยรวมในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 (Thimasarn et al., 1995) ปี พ.ศ.2484 อัตราการป่วยด้วยโรคมาลาเรียสูงกว่า 350 ต่อประชากรแสนคน ซึ่งเป็นสาเหตุการตายอันดับแรกในขณะนั้นต่อมาในปี พ.ศ.2492 รัฐบาลไทยร่วมกับองค์การอนามัยโลก ทดลองควบคุมโรคมาลาเรียด้วยการพ่นดีดีทีในพื้นที่อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าหยุดการแพร่เชื้อในอำเภอนี้ได้ ในปี พ.ศ.2494 จึงเริ่มขยายโครงการควบคุมโรคมาลาเรียโดยการพ่นดีดีทีเป็นหลักในพื้นที่ที่มีอัตราการแพร่เชื้อสูงทั่วประเทศ ต่อมาพบว่าบางประเทศไม่มีงบประมาณเพียงพอที่จะดำเนินการได้ ในปี พ.ศ.2521 องค์การอนามัยโลกจึงมีนโยบายให้กลับมาใช้โครงการควบคุมโรคมาลาเรียแบบผสมผสานกับโครงการกำจัดโรคมาลาเรียตั้งแต่ปีพ.ศ.2521 เป็นต้นมา

ในปัจจุบันการเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในประเทศไทยประกอบด้วย การค้นหาผู้ป่วยทางตรง และทางอ้อม การให้การรักษาผู้ป่วย การสอบสวนประวัติ การลงทะเบียน การติดตามผลการรักษาและการทำลายแหล่งแพร่เชื้อ รวมผลงานทุกกิจกรรมคิดเป็นอัตราเจาะโลหิตต่อประชากร ร้อยละ 3.12 อัตราพบเชื้อ ร้อยละ 1.32 และอัตราป่วยด้วยไข้มาลาเรีย ต่อประชากรพันคนเท่ากับ 0.41 ในปี 2551 ผู้ป่วยส่วนใหญ่ติดเชื้อ มาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวนผู้ป่วยด้วยไข้มาลาเรียลดลงจากปี 2550 คิดเป็นร้อยละ 26.8 จากข้อมูลของสำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขปี 2551 รายงาน จำนวนตายด้วยไข้มาลาเรียทั้งหมด 101 ราย เพิ่มขึ้นจากปี 2550 จำนวน 4 ราย จำนวนตายเพิ่มขึ้นร้อยละ 4.0 อัตราตายด้วยไข้มาลาเรียต่อประชากรแสนคนเพิ่มขึ้นจาก 0.15 ในปี 2550 เป็น 0.16 ในปี 2551 ซึ่งเป็นไปตามเป้าหมายที่กำหนดไว้คือสิ้นปี 2554 อัตราตายไม่เกิน 0.2 ต่อประชากรแสนคน ส่วนอัตราป่วยตายด้วยไข้มาลาเรีย เพิ่มจากร้อยละ 0.27 ในปี 2550 เป็นร้อยละ 0.38 ในปี 2551 อุบัติการณ์ของโรคในบางพื้นที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดเหตุการณ์ความไม่สงบ ภายในประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน 3 จังหวัดภาคใต้ได้แก่ จังหวัดยะลา นราธิวาส และสงขลา ทำให้ เจ้าหน้าที่มาลาเรียไม่สามารถดำเนินการค้นหาผู้ป่วยได้อย่างทั่วถึง นอกจากนี้ในจังหวัดชายแดนภาค ตะวันออก ได้แก่ จังหวัดระยอง ชลบุรี และจันทบุรี มีแนวโน้มของการติดเชื้อ *P. vivax* สูงขึ้น จึงจำเป็นต้องเพิ่มการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่ดังกล่าวให้มากขึ้น

จังหวัดที่พบผู้ป่วยด้วยไข้มาลาเรียสูงสุด คือ จังหวัดตาก ตรวจพบผู้ป่วย 5,386 ราย คิดเป็นร้อยละ 20.7 ของผู้ป่วยทั้งหมด จังหวัดที่พบผู้ป่วยด้วยไข้มาลาเรียสูงสุด 10 อันดับแรก คือ จังหวัดตาก ยะลา นราธิวาส แม่ฮ่องสอน ระนอง กาญจนบุรี ชุมพร สงขลา จันทบุรี และประจวบคีรีขันธ์ รวม 10 จังหวัด พบผู้ป่วยจำนวน 20,384 ราย คิดเป็นร้อยละ 78.20 ของผู้ป่วยทั้ง



ประเทศ จำนวนผู้ป่วยใน 10 จังหวัดแรก ลดลงร้อยละ 27.65 เมื่อเทียบกับปี 2550 ในปี 2551 ถึงแม้ว่าจังหวัดยะลา สงขลา และ ชุมพร พบจำนวนผู้ป่วยลดลง แต่จังหวัดเหล่านี้เป็นจังหวัดที่มีอาณาเขตติดชายแดนไทย-มาเลเซียและยังคงมี เหตุการณ์ความไม่สงบในจังหวัดชายแดนภาคใต้ ทำให้เจ้าหน้าที่ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมการค้นหาผู้ป่วย ได้ตามปกติ จึงจำเป็นต้องดำเนินการเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในบริเวณนี้อย่างต่อเนื่อง (กองมาลาเรีย, 2551)

ในตอนกลางของประเทศผู้ป่วยมาลาเรียพบจำนวนน้อย การกระจายของผู้ป่วยมาลาเรียส่วนใหญ่อยู่ใน 30 จังหวัดชายแดนของประเทศดังนี้ ชายแดนไทย-พม่า 10 จังหวัดพบผู้ป่วยจำนวน 12,924 ราย คิดเป็นร้อยละ 49.59 ของผู้ป่วยทั่วประเทศ ชายแดนไทย-กัมพูชา 6 จังหวัดพบผู้ป่วย 2,010 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.71 ชายแดนไทย-มาเลเซีย 4 จังหวัดพบผู้ป่วย 8,263 ราย คิดเป็นร้อยละ 31.7 และชายแดนไทย-ลาว 10 จังหวัดพบผู้ป่วย 480 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.84 ของผู้ป่วยทั่วประเทศ รวมมีผู้ป่วยมาลาเรียกระจายอยู่ใน บริเวณ 30 จังหวัดชายแดนทั้งสิ้น 23,677 ราย คิดเป็นร้อยละ 90.85 ของผู้ป่วยทั่วประเทศ ในปี 2551 จำนวนผู้ป่วยชายแดนลดลงจากปี 2550 จำนวน 8,716 ราย คิดเป็นร้อยละ 26.90 อัตราป่วยด้วยไข้มาลาเรียต่อประชากรพันคน บริเวณ 30 จังหวัดชายแดนเท่ากับ 1.06 ซึ่งไม่เกิน 2.8 ตามที่กำหนดไว้ในสิ้นปี 2551

ตั้งแต่ปี 2545-2551 สัดส่วนของเชื้อ *P. vivax* สูงกว่าเชื้อ *P. falciparum* อยู่จำนวน 1,556 ราย โดยในปี 2551 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 12,182 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.74 และพบผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* จำนวน 13,738 คิดเป็นร้อยละ 52.70 นอกจากนี้ยังพบชนิด *P. malariae* ร้อยละ 0.04 ที่เหลือพบร้อยละ 0.51 พบผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. ovale* จำนวน 1 ราย (กองมาลาเรีย, 2551)

การกระจายของผู้ป่วยตามกลุ่มอายุและเพศ คิดเป็น ผู้ป่วยเพศชายร้อยละ 64 เพศหญิง ร้อยละ 36 อัตราส่วนผู้ป่วยชาย: หญิง เท่ากับ 2: 1 ผู้ป่วยที่พบร้อยละ 70 เป็นผู้ป่วยอยู่ในวัยทำงาน (15 ปีขึ้นไป) และร้อยละ 25 เป็นผู้ป่วยวัยเด็กและนักเรียน (5-14 ปี) ผู้ป่วยต่ำกว่า 5 ปี พบร้อยละ 5 แสดงว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงานและติดเชื้อมาลาเรียเนื่องมาจากการประกอบอาชีพ เสี่ยง ซึ่งได้แก่ อาชีพตัดไม้ การทำสวนยาง และทำสวนผลไม้ (Wahwahpaw, Pongchai and Naowarat, 2008)

การกระจายของผู้ป่วยที่พบรายเดือน พบผู้ป่วยสูงในเดือนพฤษภาคม และเดือนมิถุนายน จำนวน 3,129 ราย และ 4,188 ราย ตามลำดับ ซึ่งจำนวนผู้ป่วยสูงกว่าเดือนเดียวกันของปีที่ผ่านมา



รูปที่ 3 แสดงรายชื่อจังหวัด 10 จังหวัดที่พบผู้ป่วยด้วยไข้มาลาเรียสูงที่สุดประกอบ 1.ตาก  
2.ยะลา 3.นราธิวาส 4.แม่ฮ่องสอน 5.ระนอง 6.กาญจนบุรี 7.ชุมพร 8.สงขลา 9.จันทบุรี  
และ 10.ประจวบคีรีขันธ์ (กองมาลาเรีย, 2551)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ในปี พ.ศ. 2551 พบจำนวนเจาะโลหิตชาวต่างชาติ 426,321 ราย ตรวจพบเชื้อมาลาเรีย จำนวน 25,446 ราย อัตราการพบเชื้อมีแนวโน้มลดลงจาก พ.ศ. 2550 จำนวน 2,321 ราย คิดเป็นอัตราลดลงร้อยละ 8.35 เชื้อมาลาเรียที่พบส่วนใหญ่ร้อยละ 50.11 เป็น *P. falciparum* ผู้ป่วยชาวพม่าลดลง 1,860 ราย คิดเป็นร้อยละ 91.27 ของผู้ป่วยต่างชาติทั้งหมด และพบผู้ป่วยต่างชาติบริเวณชายแดน ไทย-มาเลเซีย มีจำนวนลดลง 21 ราย ส่วนผู้ป่วยต่างชาติบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา มีจำนวนลดลง 177 ราย และไทย-ลาว มีจำนวนลดลง 92 ราย ส่วนผู้ป่วยต่างชาติอื่น ๆ ที่พบทั่วประเทศมีจำนวนลดลงจาก พ.ศ. 2550 อย่างไรก็ตามแม้ว่าผู้ป่วยต่างชาติมีจำนวนลดลงก็ตาม แต่ยังคงจำเป็นต้องมีมาตรการเพิ่มความเข้มงวดในด้านนโยบายการควบคุมแรงงานต่างชาติ โดยการประสานงานกับหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องได้แก่ ผู้ประกอบการ ด้านตรวจคนเข้าเมืองเหล่านี้ถือเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องกระทำกันอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ

สถานการณ์ใช้มาลาเรียมีแนวโน้มลดลงมาตั้งแต่ปี 2549 จำนวนผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ลดลง (Carrara et al., 2006) อาจเนื่องมาจากยารักษามาลาเรียชนิดผสมซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอาร์ติมิซินิน ยังใช้ได้ผลดีในปัจจุบัน แต่จำนวนผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนสูงขึ้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเฝ้าระวังการทนต่อยารักษาของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* เพิ่มขึ้นด้วย (Elizabeth et al., 2006)

### อาการแสดงของโรคมมาลาเรีย

หลังจากผู้ป่วยได้รับเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ร่างกาย โดยทั่วไปเชื้อ *P. falciparum* มีระยะฟักตัวประมาณ 8-12 วัน ส่วนเชื้อ *P. vivax* มีระยะฟักตัวน้อยกว่าเล็กน้อยคือ 10-15 วัน ซึ่งเท่ากับเชื้อ *P. ovale* และเชื้อ *P. malariae* มีระยะฟักตัวนานที่สุดคือ 15-30 วัน ผู้ป่วยจะแสดงอาการที่สำคัญออกเป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 ระยะหนาวสั่น (cold stage) ผู้ป่วยมีอุณหภูมิร่างกายลดลง มีอาการหนาวสั่นนานประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เกร็ง ความดันโลหิตสูง ผิวหนังเย็น คลื่นไส้และอาเจียน

ระยะที่ 2 ระยะไข้ (fever stage) มีไข้สูง เป็นเวลาประมาณ 1-4 ชั่วโมง อุณหภูมิของร่างกายสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ชีพจรเต้นแรง หน้าและผิวหนังแดง แห้ง คลื่นไส้ อาเจียน กระจายน้ำ กระสับกระส่ายและปวดศีรษะแบบลึกเข้าไปในกระบอกตา

ระยะที่ 3 ระยะเหงื่อออก (sweating stage) มีระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ระยะนี้จะเริ่มมีเหงื่อออก ทั่วร่างกาย อุณหภูมิร่างกาย ชีพจรและความดันเลือดกลับสู่ภาวะปกติ ผู้ป่วยจะรู้สึกอ่อนเพลีย เหนื่อยและหลับไป ระยะนี้ไม่มีอาการไข้



การเกิดอาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ กัน โดยเว้นช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า paroxysm ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระยะที่เมอริโซซอइटแตกตัวออกจากเม็ดเลือดแดง (Warrell et al., 1990) ดังนั้นจึงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่มาลาเรียเจริญแบบไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ระยะวงแหวน จนถึงไซซอนต์ระยะหลังแล้วทำให้มีอาการไข้หนาวสั่นเกิดขึ้น โดยที่เชื้อ *P. falciparum* จะมีการจับไข้ทุก ๆ 36-48 ชั่วโมง แต่ส่วนใหญ่จะมีไข้ได้ทุกวัน สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* จะมีการจับไข้ทุก ๆ 48 ชั่วโมง ส่วน *P. malariae* จะมีการจับไข้ทุก ๆ 72 ชั่วโมง อาการไข้จากเชื้อมาลาเรียนั้นเชื่อว่าเกิดจากท็อกซิน (toxins) ของมาลาเรียกระตุ้นให้ macrophage ผลิต tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) และ interleukin-1 นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว มาลาเรียทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีด (anemia) โดยกลไกการแตกของเม็ดเลือดแดงที่มีมาลาเรียในระยะเมอริโซซอइटออกจากเซลล์ (O'Meara, Hall and McKenzie, 2007) รวมทั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีมาลาเรียโดยปฏิกิริยาทางอิมมูนและภาวะที่ไขกระดูกมีการสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง (dyserythropoiesis)

ถึงแม้ว่าเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ทำให้เกิดอาการหนาวสั่นคล้ายกัน (Dey et al., 2009) แต่สำหรับมาลาเรียที่เกิดจาก *P. falciparum* ผู้ป่วยจะมีอาการหนาวสั่นทุกวันซึ่งเป็นชนิดที่มีความรุนแรงมากที่สุดเพราะสามารถทำให้เสียชีวิตเนื่องจากก่อให้เกิดภาวะมาลาเรียขึ้นสมองได้ นอกจากนี้ยังมีอาการแทรกซ้อนที่รุนแรงอื่น ๆ ได้แก่ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะน้ำท่วมปอดที่ไม่ได้เกิดจากหัวใจวาย (noncardiac pulmonary edema) ภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory insufficiency) ภาวะความดันโลหิตต่ำกว่าปกติจนเกิดอาการช็อค (algid malaria) ภาวะดีซ่าน (jaundice) ตลอดจนภาวะที่เลือดเป็นกรดมากกว่าปกติ (acidosis) (Crawley et al., 1998)

อย่างไรก็ตามหลังจากอาการไข้มาลาเรียหายไปแล้ว แต่ถ้ายังมีเชื้อมาลาเรียอยู่ในร่างกาย โดยอาจมีระดับที่ต่ำเกินกว่าจะตรวจพบได้หรือมีเชื้อหลบซ่อนอยู่ในเซลล์ตับจะทำให้มีโอกาสที่กลับมาเป็นไข้ได้อีก ถึงแม้ไม่ได้รับเชื้อมาลาเรียใหม่ก็ตาม การเกิดอาการไข้กลับแท้ (true relapse) เกิดจากเชื้อมาลาเรียในระยะพักตัวในตับหรือระยะ hypozoit และเชื้อสามารถออกสู่กระแสเลือดได้อีกครั้ง (Reyburn et al., 2009) ไข้กลับชนิดนี้สามารถพบได้ใน *P. vivax* และ *P. ovale* สำหรับไข้กลับชนิด recrudescence เกิดจากมีเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดในระดับที่ต่ำกว่าจะตรวจพบได้จากการตรวจฟิล์มเลือด ไข้กลับชนิดนี้สามารถพบได้ในเชื้อมาลาเรียทุกชนิดแต่ มักพบในกรณีที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ที่มีการดื้อต่อยาที่ใช้รักษา (Gardella et al., 2008)

## ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย

1. ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (natural immunity) คือภูมิคุ้มกันที่มีอยู่แล้วแต่กำเนิด ได้แก่ การมี hemoglobin F ในเม็ดเลือดแดงสูงกว่าปกติ ซึ่งเกิดจากการทดลองพบว่าเชื้อมาลาเรียเจริญในเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ได้ไม่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงโดยทางพันธุกรรม เช่น heterozygous hemoglobin S ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ glucose 6 phosphate dehydrogenase และโรค thalassemia เป็นต้น ผู้ที่มีอาการดังกล่าวจะมีอาการของโรคมาลาเรียที่ไม่รุนแรงเนื่องจากเชื้อมาลาเรียเจริญในเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ได้ไม่ดี หลักฐานที่ชัดเจนอีกอย่างหนึ่งคือในคนที่หมู่เลือด Duffy negative ( $Fy^a - Fy^b$ ) จะไม่เป็นโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. vivax* แต่ยังสามารถเป็นโรคมาลาเรียที่เกิดจากมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ได้ (Qari et al., 1996)

2. ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากการได้รับเชื้อมาลาเรีย (acquired immunity) ภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดภายหลังจากการได้รับเชื้อมาลาเรียบ่อย ๆ และเป็นเวลานานหลายปี แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าถึงแม้จะมีภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดขึ้นแต่ก็ไม่สามารถให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในครั้งต่อไปได้ และภูมิคุ้มกันนี้จะลดลงหากไม่ได้รับการกระตุ้นโดยการติดเชื้อมาลาเรียซ้ำอีก (Rodulfo et al., 2007) ภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะลดลงในภาวะอื่น ๆ ได้อีกด้วย เช่น การตั้งครรภ์ การได้รับยากดภูมิคุ้มกัน การได้รับยาต้านมะเร็ง การปลูกถ่ายอวัยวะและการถูกตัดม้าม เป็นต้น เช่นเด็กชาวอาฟริกาที่เกิดอยู่ในถิ่นที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย และเป็นโรคมาลาเรียบ่อย ๆ โดยไม่ได้รับการรักษาให้หายขาดหลังจากอายุเกิน 6 เดือน เมื่อเติบโตเป็นผู้ใหญ่จะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย แต่ยังเป็นโรคมาลาเรียได้เพียงแต่อาการจะไม่รุนแรงเท่ากับครั้งก่อน ๆ หรืออาจไม่แสดงอาการเลยเพราะมีภูมิคุ้มกัน เรียกภาวะนี้ว่า tolerance หรือ asymptomatic parasitemia ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อมาลาเรียแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ

2.1 แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immunity) ในร่างกายของคนหรือสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อมาลาเรียพบว่า macrophage phagocyte และ nature killer cell ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียเองและสารบางชนิดเช่น tumor necrosis factor (TNF) ทำให้เซลล์เหล่านี้กำจัดเชื้อมาลาเรียออกไปได้ส่วนหนึ่ง ซึ่งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้มีลักษณะเดียวกันกับการสนองต่อโรคติดเชื้ออื่น ๆ

2.2 แบบจำเพาะเจาะจง (specific immunity) ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อมาลาเรียจะมีระดับ IgG IgM และ IgA สูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย แต่มีเพียง IgG เท่านั้นที่สามารถให้ผลในการต้านเชื้อได้ดีที่สุด ส่วน IgM และ IgA จะมีระดับสูงขึ้นก่อน IgG เล็กน้อยแต่หลังจากนั้นจะลดระดับอย่างรวดเร็ว ซึ่งภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงนี้จะมี



ความจำเพาะต่อ species ของเชื้อและจำเพาะต่อระยะของเชื้อที่ได้รับ (species and stage specific) ซึ่งจากการทดลองฉีดวัคซีนที่ทำจากระยะ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีเอกซ์เข้าไปในหนู แล้วทดสอบด้วยการฉีดระยะ sporozoite ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ตามปกติพบว่าหนูไม่เป็นมาลาเรีย แต่เมื่อทดสอบด้วยการฉีดระยะ blood stage พบว่าหนูเป็นมาลาเรีย

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าภูมิคุ้มกันทั้งชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและชนิดที่เกิดหลังจากการได้รับเชื้อมาลาเรีย ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นทางเลือกใหม่ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเชื้อและป้องกันโรคให้มากขึ้น ซึ่งก็คือการพัฒนาวัคซีน

## พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

### สายวิวัฒนาการ

การศึกษาความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด eukaryote สายพันธุ์ต่าง ๆ ในระยะแรกมีการจัดสายวิวัฒนาการ genus *Plasmodium* (Roy and Irimia, 2008) โดยอาศัยหลักเกณฑ์ทางด้านชีววิทยา สัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์กับ host ในการศึกษาดังกล่าวสามารถที่จะแสดงถึงความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการได้ระดับหนึ่ง ต่อมาการศึกษาวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล (molecular evolution) โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อมาลาเรียและเปรียบเทียบระหว่างแต่ละชนิด เช่น การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของ small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) พบว่า *P. falciparum* มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในนกมากกว่าชนิดอื่น ๆ (Waters et al., 1993) แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาของการแยกสายวิวัฒนาการ (divergence) ของ *P. falciparum* ออกจากเชื้อมาลาเรียของนกมีความแตกต่างกันมากกว่าหลายสิบล้านปี (Leclerc et al., 2004) นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA และ circumsporozoite protein (CSP) จากเชื้อมาลาเรียหลายชนิด พบว่าสายวิวัฒนาการของ *P. falciparum* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อมาลาเรียที่เกิดโรคในลิงชิมแปนซี คือ *P. reichenowi* โดยมีระยะเวลาของการแยกสายวิวัฒนาการแตกต่างกันประมาณ 8-12 ปี สำหรับ *P. vivax* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในลิง ได้แก่ *P. simium*, *P. fragile*, *P. knowlesi* และ *P. cynomolgi* ส่วน *P. malariae* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. brasilianum* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในลิง (Ayala and Rich, 2000; Rich and Ayala, 2000; Wolfe et al., 1998)

จากการศึกษาดังกล่าวได้แสดงความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน พบว่าในแต่ละชนิดมีอายุสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน โดย *P. vivax* และ

*P. malariae* มีสายวิวัฒนาการกันมากกว่า *P. falciparum* สำหรับ *P. ovale* แม้ว่าจะมีต้นกำเนิดของสายวิวัฒนาการแตกต่างจากทั้ง 3 ชนิด แม้มีเวลาระยะเวลาของวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับ *P. vivax* มากกว่า *P. falciparum* และ *P. malariae* สำหรับ *P. falciparum* มีช่วงอายุสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *P. rechenowi* มากกว่าสายพันธุ์อื่น (Nishimoto et al., 2008)

### โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอ

จีโนมของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ A+T สูงถึงร้อยละ 70 ถึง 80 สำหรับ *P. falciparum* มีองค์ประกอบ A+T อยู่มากถึงร้อยละ 82 (Sharma, Dash and Das, 2010) เมื่อเปรียบเทียบ A+T ที่เป็นองค์ประกอบดีเอ็นเอของ *Escherichai coli*, *Mycobacterium tuberculosis* และคน พบว่า A+T มีอยู่ประมาณร้อยละ 50, 67 และ 37 ตามลำดับ โดยองค์ประกอบของ A+T พบมากในบริเวณที่ไม่ได้สร้างโปรตีน (noncoding region) และในส่วนของ intron ดังนั้นคุณลักษณะดังกล่าวอาจแสดงให้เห็นว่าบริเวณใดที่เป็นบริเวณที่มีการสร้างโปรตีนและยังมีผลต่อการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonucleases) ตัดดีเอ็นเอของมาลาเรียได้แตกต่างจากดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่น (Mackinnon et al., 2009)

การศึกษาโครโมโซมของเชื้อมาลาเรีย โดยใช้เทคนิคการแยกโดยใช้สนามไฟฟ้าเป็นห่วง (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) พบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ประกอบด้วย 14 โครโมโซม และการวัดขนาดจีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* และ *P. berghei* ด้วยวิธี cytofluorimetry, reassociation kinetics และ purification yield pluse field electrophoresis พบว่ามีขนาดจีโนมประมาณ  $2-4 \times 10^7$  bp ต่อจีโนม haploid โดยแต่ละโครโมโซมมีขนาดที่แตกต่างกันและโครโมโซมเดียวกันในสายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 800 ถึง 3500 kb สำหรับโครโมโซมในสายพันธุ์เดียวกัน ถึงแม้ว่าระยะเวลาการเติบโตจะแตกต่างกันแต่จำนวนโครโมโซมมีขนาดเท่ากัน โดยจำนวนโครโมโซมในเกือบทุกระยะของการเติบโตส่วนใหญ่จะมีเพียงชุดเดียว (haploid) ยกเว้นระยะที่มีการเติบโตในยุง ซึ่งเป็นระยะที่มีการปฏิสนธิและเจริญไปเป็น ookinete โดยเกิดขึ้นในระยะเวลานั้น ๆ

ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียจะมีการจัดเรียงอย่างมีระเบียบจากลำดับของ nucleic acid บนสายดีเอ็นเอ การแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรม (gene expression) โดยผ่านทาง RNA ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการสร้างโปรตีนที่จำเพาะ ลักษณะเฉพาะที่ปรากฏของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นเป็นการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายชนิด

การสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นจากองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ amino acid ribosome ribonucleic acid (RNA) adenosine triphosphate (ATP) เป็นแหล่งพลังงาน



guanosine triphosphate เป็นแหล่งพลังงานในการสังเคราะห์ peptide bond นอกจากนี้ยังต้องการอิออนชนิดต่าง ๆ เช่น  $Mg^{+2}$ ,  $NH_4^+$  และ  $K^+$

ในระหว่างการสังเคราะห์โปรตีน ข้อมูลทางพันธุกรรมจะถูกส่งผ่านมาในรูปแบบของ mRNA แต่การสังเคราะห์โปรตีนจะเกิดขึ้นบน intracellular particle ที่เรียกว่า ribosome ซึ่งเป็น nucleoprotein ประกอบด้วยเอ็นไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีน ribosome จะประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย และถูกกำหนดชนิดจากตัวเลขที่แสดงถึงระดับความเร็วที่ใช้ในการตกตะกอน ribosome ของ prokaryotic cell และ eukaryotic cell นั้นมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ ribosome ของ prokaryotic cell จะมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ส่วน คือ 30S และ 50S เมื่อนำหน่วยย่อยแต่ละหน่วยมาทำการแยกในสภาวะที่เหมาะสม จะพบ ribosome หน่วยย่อย (small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA) ขนาดต่าง ๆ และโปรตีน คือ

30S ประกอบด้วย 16S rRNA และโปรตีน 10 ชนิด

50S ประกอบด้วย 5S rRNA, 23S rRNA และโปรตีน 32 ชนิด

สำหรับ ribosome ของ eukaryotic cell มีคุณลักษณะพื้นฐานคล้ายกับ prokaryotic cell แต่มีขนาดใหญ่กว่า คือ 80S ที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 40S และ 60S สำหรับขนาดจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิตประมาณร้อยละ 10

40S ประกอบด้วย 18S rRNA และโปรตีน 30 ชนิด

60S ประกอบด้วย 5S rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA และโปรตีน 50 ชนิด

SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียมีความยาวประมาณ 2 Kb มีการสร้าง ribosomal RNA อย่างเป็นระเบียบในแต่ละช่วงของชีวิต SSU rRNA gene ชนิด A ของเชื้อมาลาเรียจะทำหน้าที่ในระยะที่เชื้ออาศัยอยู่ในเลือด (asexual blood stage) ใน host ที่มีกระดูกสันหลัง (vertebrate host) ส่วนยีนชนิด C จะทำหน้าที่ในช่วงที่อาศัยอยู่ในยุง การที่กลุ่มยีนทั้ง 2 ชนิดมีการแสดงออกอย่างสัมพันธ์กันในแต่ละช่วงของวงจรชีวิต อาจเกี่ยวข้องกับผลของสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความชื้น หรือลักษณะทางพันธุกรรมของ host

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ ในส่วนของ SSU rRNA gene พบว่าประกอบด้วยส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสสูง (conserved regions) (Das et al., 1995) และส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับเบส (variable regions) ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (eukaryotic organisms) จะพบการเรียงตัวซ้ำกันของลำดับเบสใน SSU rRNA gene (repetitive and tandem arrays) ในวงจำกัดเพียง 1-3 แห่ง ในโครโมโซม 1 ชุด (genome) ส่วนของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีลักษณะดังกล่าว 4-7 gene ซึ่งกระจายอยู่ในโครโมโซมต่าง ๆ ในเซลล์ พบว่าความแตกต่างของ gene นี้สามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพื่อ

ประโยชน์ทางการศึกษาสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ส่วนของยีนดังกล่าวในการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย

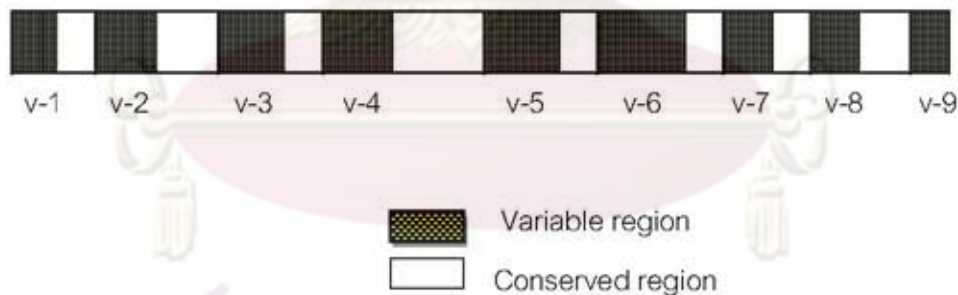
ประเด็นที่มีการศึกษา rRNA gene และนำไปใช้ประโยชน์ คือ (Waters, 1995)

1.ด้านอณูชีวภาพ (Molecular biology) เกี่ยวข้องโดยตรงกับหน้าที่หลักของ rRNA gene รวมถึงความเข้าใจในกลไกการทำงานของ gene ที่มีบทบาทในการสังเคราะห์โปรตีนและเอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาของ rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียอาจนำไปสู่การควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรีย

2.สายวิวัฒนาการระดับอณูชีววิทยา (Molecular phylogeny) จาก sequence analysis ที่แสดงออกในลักษณะความคงที่ในการทำงานในรูปแบบของ conserved structure ของ SSU rRNA เป็นข้อมูลสำคัญส่วนหนึ่งในการศึกษาสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย

3.ด้านการช่วยวินิจฉัย (Dianostics) โดย rRNA gene มีขนาดใหญ่ มีหลาย copy มีส่วนที่มีลักษณะเฉพาะที่นำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือ ในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพสูง

*Plasmodium* small subunit rRNA



รูปที่ 4 แสดง SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรีย (Li et al., 1995)



วิธีการตรวจเพื่อการวินิจฉัยมาลาเรียสามารถจำแนกออกได้เป็น (Tangpukdee et al., 2009)

1. การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด
2. การตรวจหาแอนติบอดี (antbody)
3. การตรวจหาแอนติเจน (antigen)
4. การตรวจสารพันธุกรรม (nucleic acid)

### การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่ดีที่สุด ซึ่งนิยมใช้กันอยู่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน จำแนกตามชนิดสีที่ใช้ย้อม ดังนี้

#### 1. การย้อมด้วยสีิมซา จำแนกเป็น

1.1 การตรวจด้วยฟิล์มเลือดบาง โดยการไถเลือดผู้ป่วยเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนแผ่นสไลด์และย้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยการนับเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย คิดอัตราเป็นร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ

1.2 การตรวจด้วยฟิล์มเลือดหนา โดยการหยดลงบนสไลด์ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แล้วปล่อยให้เชื้อมาลาเรียออกมาในระหว่างการย้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 200 ตัว (Chiodini and Moody, 1989)

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการย้อมฟิล์มเลือดด้วยสีิมซามีข้อดี คือ

-การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มหนา โดยผู้เชี่ยวชาญจะมีความไวสูง สามารถหาเชื้อมาลาเรียได้ แม้มีจำนวนน้อยเพียง 40 ตัวในเลือด 1 ไมโครลิตร หรือสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่มีอยู่ 1-5 ตัวในเม็ดเลือดแดงล้านตัว

-มีความจำเพาะสูง สามารถจำแนกชนิดของเชื้อ เป็นวิธีที่เหมาะสมในทางปฏิบัติเพื่อวินิจฉัยโรคทางคลินิก ส่วนใหญ่ใช้เวลา 5-10 นาที (Nidao et al., 2004)

-เป็นวิธีที่ตรวจได้ง่ายและยังสามารถบอกได้ว่าเชื้อมาลาเรียที่พบมีรูปร่างอย่างไร (Coleman et al., 2006)

#### 2. การย้อมด้วยสีอคริดีน ออเรนจ์ (Acridine orange stain) จำแนกเป็น

2.1 เนื่องจากการย้อมฟิล์มเลือดด้วยสีิมซ่านั้นมีข้อเสีย คือ ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ตรวจเป็นสำคัญ เพื่อให้การตรวจหาเชื้อมาลาเรียง่ายขึ้น จึงใช้สี acridine orange ย้อมฟิล์มเลือด ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับแสงที่มีช่วงคลื่นสั้นแต่มีพลังงานสูง เช่น แสง ultra violete และเปล่งแสงที่มีช่วงคลื่นยาวกว่า ดังนั้นต้องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มี

interference filter ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นกระจกเคลือบสีเรืองแสงไว้ได้คอนแดนเซอร์ และใส่ barrier filter SD-54 ซึ่งมีแสงสีเหลืองไว้ได้แลนส์ตา ใช้แหล่งกำเนิดแสงจาก halogen light source ข้อดีของวิธีนี้ คือ เชื้อมาลาเรียที่ถูกย้อมด้วยสีดังกล่าวสามารถเรืองแสงได้ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังกล่าว ทำให้สามารถมองเห็นส่วนประกอบของเชื้อมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงชัดเจนยิ่งขึ้น สามารถตรวจเชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่นประมาณ 5 ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร แต่ก็มีข้อเสีย คือ acridine orange มีพิษต่อผิวหนังและตาของสิ่งมีชีวิต และไม่สะดวกในการนำมาใช้ในภาคสนามเพราะต้องใช้อุปกรณ์ประกอบกล้องจุลทรรศน์และเครื่องกำเนิดแสง ซึ่งต่อมาสามารถพัฒนาใช้เลนส์พิเศษขึ้นเดียวในการกรองแสงแดงให้เหลือเฉพาะแสงที่ทำให้เชื้อมาลาเรียเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) เมื่อย้อมด้วยสี acridine orange

2.2 Quantitative buffy coat (QBC) เป็นการนำ acridine orange มาเคลือบที่ผิวด้านในของ capillary tube เมื่อบรรจุเลือดลงในหลอดดังกล่าว เชื้อมาลาเรียที่ถูกย้อมจะเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้เลนส์พิเศษขึ้นเดียวในการกรองแสงแดงให้เหลือเฉพาะแสงที่ทำให้เกิดฟลูออเรสเซนซ์

### การตรวจหา antibody ในซีรัม

การศึกษาวิจัยเพื่อตรวจหา antibody ที่มีความเฉพาะต่อเชื้อมาลาเรียมีประโยชน์สำหรับงานทางด้านระบาดวิทยาของมาลาเรีย วิธีการตรวจดังกล่าว ได้แก่

1. Indirect immunofluorescent antibody test (IFA) เป็นวิธีการตรวจหา antibody โดยนำเอาซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียหรือเอาตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาเจือจางที่ระดับต่างกัน โดยลำดับ แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่ทำเป็นแผ่นฟิล์มบนสไลด์ หลังจากนั้นนำไปล้างซีรัมส่วนเกินออก นำ antihuman-immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เช่น fluorescein isothiocyanate (FICT) เป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง นำไปตรวจหา antibody ในซีรัมจากการเรืองแสงบนตัวของเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ antigen ที่ใช้ในการตรวจเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน ซึ่งเตรียมจากเลือดผู้ป่วยมาลาเรียหรือเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ วิธีจะให้ผลบวกในผู้ป่วยมาลาเรียโดยตรวจพบ antibody เมื่อเริ่มมีเชื้อมาลาเรียในเลือดและระดับ antibody จะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์แรก ต่อมาระดับ antibody จะลดต่ำลง antibody ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างนี้ส่วนใหญ่จะเป็น antibody ชนิด IgG และ IgM โดย antibody ชนิด IgM จะอยู่ไม่นาน แต่ IgG จะอยู่ได้นานกว่า ข้อดีของวิธีการนี้คือ การเตรียม antigen สะดวก เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะได้พอสมควร ซึ่งสัมพันธ์กับการเคยติดเชื้อมาลาเรีย (Eggelte et al., 1999) ส่วน



ข้อเสียคือ ใช้ได้แต่ในห้องปฏิบัติการ ที่มีเครื่องมือ เช่น กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้ การอ่านผลในห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งอาจได้ผลสรุปต่างกันและโดยทั่วไปไม่สามารถแยกผู้ที่เคยติดเชื้อมาลาเรียออกจากผู้ที่กำลังมีเชื้ออยู่ภายในร่างกายได้ เนื่องจากระดับ antibody ยังคงอยู่นานภายหลังจากเชื้อได้หมดไปจากร่างกายแล้ว

2. Indirect hemagglutination test (IHA) เป็นวิธีการตรวจที่อาศัยเม็ดเลือดแดงเป็นตัวกลาง โดยให้ antigen ของเชื้อมาลาเรียที่ไปเกาะเชื่อมโยงกับ antigen ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง โดยใช้ tannic acid หรือ chromic chloride เป็นตัวช่วย หลังจากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับซีรัมที่มี antibody ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อจะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจน สามารถอ่านระดับความเข้มข้นของ antibody จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น วิธีนี้มีคุณค่าและประโยชน์ในการตรวจหา antibody คล้ายคลึงกับ IFA ข้อดีของวิธี IHA เป็นวิธีที่กระทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สามารถเก็บ antigen ของเชื้อมาลาเรียในรูปแห้ง (lyophilized) ได้เป็นระยะเวลาอันนานและได้ตรวจซีรัมได้คราวละจำนวนมาก สามารถประยุกต์ใช้ได้ในทุกพื้นที่ มีความไวสูงกว่าวิธี IFA ส่วนข้อจำกัดของวิธี IHA คือ การเตรียมและการทำ antigen ให้ได้มาตรฐานนั้นยุ่งยากกว่าการเตรียม antigen ที่ใช้ในวิธีของ IFA ดังนั้นจึงเตรียมได้เฉพาะห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น และเมื่อนำมาทดสอบผู้ป่วยมาลาเรียระยะเฉียบพลันหรือได้รับเชื้อเป็นครั้งแรก พบว่ามีความไวต่ำกว่าวิธี IFA นอกจากนี้วิธี IHA ไม่สามารถระบุชนิดของ antibody ได้

3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นปฏิกิริยาที่นำเอา antigen ที่จำเพาะที่ต้องการจะทดสอบมาเกาะติดกับ solid phase เช่น ผิวของ microtiter plate หรือหลอดทดลอง ซึ่งอาจทำมาจากพลาสติกจำพวก polypropylene polystyrene polyvinyl หรือ nylon หลังจากนั้นเติมซีรัมที่ต้องการจะทดสอบลงไปให้ความเข้มข้นที่ระดับต่างกันหรือใช้ความเข้มข้นของซีรัมระดับเดียวลงไป ปล่อยทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา แล้วล้างเอาซีรัมส่วนเกินออก เติม anti-human immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase หรือ alkaline phosphatase ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไปเพื่อให้เกิดสี ตรวจวัดระดับ antibody ที่จำเพาะโดยการดูจากสีของ substrate ที่เปลี่ยนไปด้วยตาเปล่า ในกรณีที่ตรวจซีรัมที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันอาจใช้เครื่องอ่านผลช่วย (ELISA reader) วิธี ELISA นี้มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ทำได้ค่อนข้างง่าย จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจในภาคสนาม เพื่อนำมาใช้มาตรวจจำนวนมาก อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้ ELISA reader จะเพิ่มความถูกต้องในการอ่านมากขึ้น นอกจากนี้วิธี ELISA ยังเป็นวิธีที่มีความไวสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IHA และการตรวจหาระดับ antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียยังสามารถบอกระดับและความจำเพาะของ antibody ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และชนิดของ antigen ที่ใช้

ตรวจสอบ รวมทั้งอาจใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นมาลาเรียที่มีอยู่ในพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของมาลาเรีย ข้อจำกัด คือ การเตรียม antigen ที่ไม่สามารถเตรียมได้ทุกห้องปฏิบัติการและการทดสอบอาจให้ผลลบในผู้ป่วยมาลาเรียในระยะเฉียบพลันหรือเพิ่งติดเชื้อครั้งแรก ตลอดจนระดับ antibody อาจคงอยู่นานแม้ว่าจะหายจากโรคมาลาเรียแล้ว

### การตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรีย

1. Radioimmunoassay (RIA) และ Immunoradiometric assay (IRMA) การตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรียในเลือด โดยหา antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ของเชื้อมาลาเรียที่ทำการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นตัวทดสอบ โดยวิธี RIA และ IRMA หลักการของ RIA คือ solid phase antibody binding inhibition test สามารถคำนวณหาเชื้อที่มีอยู่ตั้งแต่ 1-10 ตัวต่อเม็ดเลือดแดง 1 ล้านตัว ทั้งนี้ความไวและความจำเพาะขึ้นอยู่กับ antibody ที่ใช้ ส่วนวิธี IRMA โดยวิธี two-site sandwich วิธี IRMA นี้มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 0.67 ตัว ต่อเม็ดเลือดแดง 1 ล้านตัว แต่เนื่องจากการพัฒนาวิธีการตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรียโดยใช้สารกัมมันตรังสี มีความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในภาคสนามหรือทางคลินิก และอาจเป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง

2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นอกจากวิธี ELISA ตรวจหา antibody ต่อเชื้อมาลาเรีย ยังสามารถตรวจหา antigen โดยใช้ antibody ที่จำเพาะติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ สำหรับ antibody ที่ใช้อาจเป็น monoclonal antibody หรือ polyclonal antibody แต่การใช้ monoclonal antibody มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการประยุกต์ใช้หลักการ ELISA สำหรับการตรวจหา antigen มีดังนี้

2.1 Two-site sandwich ELISA หลักการคือ เคลือบผิวของ solid phase ด้วย antibody และเติม antigen ที่ต้องการทดสอบ ล้าง antigen ที่เป็นส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติม antibody ชนิดเดียวกับที่ใช้เคลือบ solid phase ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ ซึ่งจะไปจับกับ antigen ที่ทำปฏิกิริยากับ antibody บน solid phase หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไป ถ้ามี antigen ที่ต้องการตรวจสอบในตัวอย่าง เอ็นไซม์มีจะเปลี่ยนสี substrate สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า หรือวัดปฏิกิริยาที่เกิดเป็นค่า optical density (OD) โดยใช้ ELISA reader เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับเลือดคนปกติ

2.2 Dot ELISA โดยการนำตัวอย่างเลือดที่ต้องการทดสอบ ไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้วหยดลงบนแผ่น membrane หลังจากนั้นใส่ Ig ซึ่งเป็น monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ alkaline phosphatase เมื่อเติม substrate ที่



เหมาะสมเอ็นไซม์จะเปลี่ยนสี substrate เกิดจุดสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า วิธีนี้มีความไวสามารถตรวจหาเชื้อได้ที่ระดับความหนาแน่นร้อยละ 0.001 เมื่อนำวิธีนี้มาทดสอบกับเลือดของผู้ป่วยมาลาเรีย พบว่ามีความไวคิดเป็นร้อยละ 82-90 และมีความจำเพาะร้อยละ 100 โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม species ของเชื้อมาลาเรีย (Militao, Camargo and Katzin, 1993)

2.3 Dye-conjugated monoclonal antibody-based assay (dipstick assay) เป็นวิธีการตรวจที่รวดเร็ว สะดวก สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ สามารถทราบผลภายในเวลา 10-15 นาที โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า ParaSight<sup>®</sup>-F test และ Immunochromotographic (ICT) test การตรวจมีหลักการดังนี้ โดยแผ่นทดสอบ (nitrocellulose mambrane) (Tjitra et al., 1999) ประกอบด้วยแถบที่มี monoclonal antibody ต่อ *P. falciparum* histidine-rich protein (PfHRP)-2 ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดย PfHRP-2 เป็น antigen ที่ถูกสร้างจาก *P. falciparum* ระยะ trophozoite (Uguen et al., 1995) เมื่อนำแผ่นทดสอบจุ่มในเลือดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้ว ถ้าเลือดตัวอย่างนั้นมีเชื้อมาลาเรีย PfHRP-2 จะทำปฏิกิริยากับ dye-conjugated anti *P. falciparum* PfHRP-2 monoclonal antibody จะปรากฏแถบสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (Genton et al., 1998) การทดสอบมีความไวร้อยละ 80-90 ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อมากกว่า 80 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร และการตรวจด้วยวิธีทั้งสองยังให้ผลตรวจว่าติดเชื้อมาลาเรีย 28 วันหลังจากได้รักษา

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการตรวจที่คล้ายคลึงกับวิธีนี้ คือ OptiMal test ที่สามารถตรวจได้ทั้ง *P. falciparum* และ *P. vivax* ในแผ่นเดียวกัน เป็นการตรวจหา lactate dehydrogenase (pLDH) ที่สร้างจากเชื้อมาลาเรียที่ยังมีชีวิตและมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในเชื้อแต่ละชนิด (Fryauff et al., 2000) วิธีนี้มีความไวร้อยละ 88 และมีความจำเพาะร้อยละ 99 แต่ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อมากกว่า 100 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร พบว่ามีความไวร้อยละ 50 และความหนาแน่นร้อยละ 75 (Palmer et al., 1998; Chayani et al., 2004)

#### การตรวจหา Nucleic acid

1. Nucleic acid hybridization เป็นวิธีสำหรับการตรวจหา nucleic acid เป้าหมายของเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) เริ่มต้นจากการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เสียสภาพโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมี เช่น formamide หรือต่าง ดีเอ็นเอสายคู่จะแยกเป็นสายเดี่ยว และถ้าลดอุณหภูมิดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะมาจับคู่ (hybridization) กับสายเดิม โดยลักษณะการจับคู่จะเป็นแบบ antiparallel นอกจากนั้นหลักการของ hybridization

สามารถใช้ได้สำหรับ DNA กับ RNA ที่มีลำดับเบสคู่ตรงกัน (complementary) โดยจำแนกวิธีการตรวจที่ใช้ ดังนี้

1.1 Solid phase hybridization โดยการแยกสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งที่ต้องการส่งตรวจ นำมาตรึงบนแผ่นค้ำจุน (Seesod et al., 1993) ซึ่งอาจทำมาจาก nylon หรือ nitrocellulose membrane หลังจากนั้นนำมา hybridize ในสารละลายของ probe ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นที่มีลำดับเบส complementary กับ DNA เป้าหมาย ซึ่งในที่นี้คือ DNA ของเชื้อมาลาเรียและสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นค้ำจุนหรือบนที่กบนแผ่นฟิล์ม X-ray ทั้งนี้อาจนำ DNA ที่ต้องการทดสอบมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonuclease) ก่อน หลังจากนั้นทำการแยกขนาดโดยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วจึงขนถ่าย (transfer) สู่ม้วนค้ำจุนดังกล่าว ดังนั้น DNA เป้าหมายจะถูกตัดให้มีขนาดสั้นลงและมีขนาดจำเพาะ (Katzin, kimura and Alexandre, 1991)

ส่วนในกรณีของ Dot blot hybridization สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก ทำได้ง่าย โดยการแยกสกัด DNA แล้วนำมาขนถ่ายลงบนแผ่นค้ำจุนในลักษณะเป็นวงเล็ก ๆ หลังจากนั้นจึงนำมา hybridize ในสารละลายของ probe ซึ่งตามชนิดของ probe คือ

1. DNA probe เตรียมจากสาย DNA ในส่วนที่จำเพาะกับชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยอาจใช้ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การเตรียมโดยนำส่วนของ DNA ของเชื้อมาลาเรียที่ต้องการทำเป็น probe มาเพิ่มปริมาณโดยการ subclone เข้าสู่ plasmid หรืออาจใช้ synthetic oligonucleotide จากลำดับเบสของ DNA เป้าหมายที่พบในเชื้อมาลาเรียนำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือเอนไซม์ การตรวจด้วยวิธี DNA probe โดยทั่วไปใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง มีความไวของการทดสอบร้อยละ 80-85 และมีความจำเพาะประมาณร้อยละ 90-100 การใช้ DNA probe ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี พบว่ามีความไวมากกว่าวิธีการที่ใช้เอนไซม์ โดยจำนวนเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจะแตกต่างกันแล้วแต่วิธีการและความจำเพาะของ DNA probe ที่ใช้ ทั้งนี้สามารถตรวจพบเชื้อได้เมื่อตัวอย่างเลือดมีปริมาณเชื้อตั้งแต่ 40-500 ตัวต่อเลือด

1 ไม่ใคร่ลิสต์ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด เช่น ความไวของการตรวจไม่ดีไปกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีเชื้อในเลือดจำนวนต่ำ และวิธี DNA probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นวิธีที่ยุ่งยาก มีอายุการใช้งานสั้นและมีราคาแพง (Tangpukdee et al., 2009)

2. RNA probe ใช้หลักการเช่นเดียวกับ DNA probe โดยใช้ RNA ที่จำเพาะต่อสาย RNA ของเชื้อมาลาเรียเป็นตัวตรวจ สาเหตุที่มีการพัฒนาวิธีการนี้มาเพื่อใช้ทดแทน DNA probe เนื่องจากเชื่อว่า RNA probe น่าจะมีความไวสูงกว่า DNA probe โดยทฤษฎีแล้วเชื้อ



มาลาเรียแต่ละเซลล์จะมีปริมาณของ DNA ปริมาณ 0.02 พิโคกรัม แต่จะมีปริมาณ RNA มากถึง 0.21 พิโคกรัม ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าและในห้องปฏิบัติการสามารถให้ผลบวกได้ แม้ว่าจะมีเชื้อน้อยเพียงร้อยละ 0.00046 ค่าที่อ่านได้จาก RNA probe มีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อมาลาเรียในเลือดที่ได้จากการอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ในทางปฏิบัตินั้นยังมีปัญหาในเรื่องเกี่ยวกับการเตรียม probe การเตรียม RNA ซึ่งมีขั้นตอนที่ต้องการความระมัดระวังอย่างมากจากการปนเปื้อนของเอนไซม์ Rnase ที่ย่อยสลาย RNA ได้ง่าย นอกจากนั้นการพัฒนาเทคนิค PCR ขึ้นมาใช้เป็นเทคโนโลยีที่มีความเร็วและความจำเพาะ จึงทำให้มีการพัฒนา RNA probe มีข้อจำกัดมาก

ส่วน Southern blot hybridization ใช้ในการวินิจฉัยเคราะห์ DNA ที่แยกสกัดจากตัวอย่างแล้วนำไปตัดด้วย restriction endonuclease ที่เหมาะสม นำไปแยกขนาดโดยการใช้ agarose gel electrophoresis ทำการขนถ่าย DNA จากเจลสู่แผ่นค้ำจุน ซึ่งอาจเป็นแผ่น nitrocellulose หรือ nylon จากนั้นจึงนำ hybridize กับ probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เอนไซม์ หรือสาร chemiluminescence นอกจากนี้ Northern blot hybridization นั้นมีขั้นตอนการทำคล้ายกับ Southern blot hybridization แตกต่างกันตรงที่เป็นการตรวจหา RNA อย่างไรก็ตามแม้ว่าในปัจจุบันการพัฒนาการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี hybridization เพื่อการวินิจฉัยอย่างมีข้อจำกัดด้านวิธีการและความเหมาะสมในการนำไปใช้ แต่วิธีการดังกล่าวยังมีประโยชน์ในการตรวจจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในการศึกษาพันธุกรรมประชากรที่เป็นพื้นฐานของการพัฒนาวัคซีน

1.2 Liquid phase hybridization วิธีนี้เป็นการตรวจจับกันระหว่าง nucleotide ในสภาวะที่เป็นของเหลวโดยอาศัยการผนวกลักษณะ hybridization ระหว่าง DNA เป้าหมายกับ oligonucleotide probe ที่ติดฉลาก ร่วมกับหลักการของ ELISA ในขั้นตอนการวัดผลวิธีนี้เมื่อใช้หลักการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อมาลาเรียโดยเทคนิค PCR พบว่ามีความไวสูงมากโดยสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียในระดับที่มีอัตราการติดเชื้ของเม็ดเลือดแดงต่ำถึงร้อยละ 0.0001

2. Polymerase chain reaction (PCR) หลักการของวิธีนี้โดยการแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงในระดับที่ primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวมาจับอย่างจำเพาะกับ DNA ต้นแบบในตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่ complementary กับ primer และอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสร้างสาย DNA ใหม่ที่มีลำดับเบสเหมือนสาย DNA ต้นแบบ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติพิเศษคือ ทนความร้อนและสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65-75 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรีย

*Thermus aquaticus* ที่เจริญในน้ำพุร้อน นอกจากนี้การประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อเพิ่มและลดอุณหภูมิอัตโนมัติโดยอัตโนมัติ (automatic thermal cycler) ทำให้ PCR ได้รับการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง (Johnston et al., 2006) เทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

1. DNA เป้าหมาย (target DNA)
2. เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนสูง
3. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)
4. Oligonucleotide primer ที่จำเพาะ 1 คู่
5. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมซึ่งมีองค์ประกอบของ magnesium chloride

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ DNA โดยวิธี PCR เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องกันหลาย ๆ รอบแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. ขั้นตอนการแยกสายคู่ของ DNA ต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอนที่ oligonucleotide primer จับกับ DNA ต้นแบบ (primer-template annealing) ตรงบริเวณที่มีลำดับเบส complementary กัน โดยต้องมีการลดอุณหภูมิลงมาในระดับที่เหมาะสม
3. ขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่ต่อจาก primer (primer extension) ซึ่งสร้างในทิศทาง 5' ไปยังด้าน 3' โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนสูง ปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 70 ถึง 74 องศาเซลเซียส

Primer สิ่งที่สำคัญในการเลือกใช้ primer ต้องคัดเลือกหรือออกแบบ primer โดยต้องคำนึงถึงความยาวของ primer ควรยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60 หลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypyrimidine หรือ polypurine การเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ต้องมีความจำเพาะไม่พบดีเอ็นเออื่น ๆ และตรงบริเวณปลาย 3' ของ primer ทั้งคู่ไม่ควรจะเป็นเบสมีลำดับ complementary กันเพื่อป้องกันการเกิดการจับคู่กันเองของ primer (primer-dimer) การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรมีลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่ออ่านทิศทางจาก 5'-3' และ 3'-5' (palindromic sequence) เพื่อป้องกันปลาย 3' ของมาจับกับ primer สายเดียวกันเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของ primer อุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature,  $T_m$ ) ของ primer ควรใกล้เคียงและอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส ค่า  $T_m$  สามารถคำนวณโดยใช้สูตรง่าย ๆ โดยแต่ละ adenine และ thymine แต่ละอันคิด 2 องศาเซลเซียส ส่วน guanine และ cytosine คิด 4 องศาเซลเซียส สุดท้ายเป็นการปรับ



ความเข้มข้นของ primer ให้เหมาะสมซึ่งอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 ไมโครโมล ถ้ามากเกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้นหรือทำให้เกิดผลผลิตจากวิธี PCR ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น และยังเพิ่มโอกาส primer-dimer ให้สูงขึ้นด้วย สุดท้ายจะได้ผลผลิตจากวิธี PCR ที่ต้องการลดลง (Cunha et al., 2009)

ความเข้มข้นของ DNA polymerase ถ้าใช้ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 1.0-2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร การใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงเกิน นอกจากสิ้นเปลืองแล้วยังก่อให้เกิดผลผลิตจากวิธี PCR ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น

Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ที่ใช้ในวิธี PCR ควรมีค่า pH เท่ากับ 7 และความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 ไมโครโมล

บัฟเฟอร์สำหรับ PCR ที่นิยมใช้คือ 10-15 mM Tris-HCL pH 8.3-8.8 และ KCL มีความเข้มข้นประมาณ 50 mM KCL จะทำหน้าที่เร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้ามี KCL มากเกินไปจะก่อกำกวมการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

การเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้น primer annealing ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของ primer อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า  $T_m$  ประมาณ 5 องศาเซลเซียส และควรคำนึงถึง *Taq* DNA polymerase สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-85 องศาเซลเซียส ไม่สูงไม่ต่ำเกินไป ถึงแม้ว่าจะเกิด primer annealing ได้ แต่อาจจะก่อให้เกิด mispriming หรือ misextension ได้ สำหรับระยะเวลาของการ annealing ใช้ระยะเวลาเพียงไม่กี่วินาที

ระยะเวลาที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เนื่องจากระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ *Taq* DNA polymerase โดยอัตราการสร้างสาย จะอยู่ในช่วง 35-100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย ความเข้มข้นของเกลือและระดับความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์

การตั้งอุณหภูมิต่ำหรือใช้ระยะเวลาน้อยไป ในขั้นตอนการแยกสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะเกิดไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ปริมาณผลผลิตจาก PCR ที่ควรได้ลดลง แต่ถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงและเวลาที่มากเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาทีแต่ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบมี guanine และ cytosine จำนวนมาก อาจใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น

ปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถมีผลกระทบต่อ PCR เช่น ความสะอาดของอุปกรณ์ น้ำที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูง ในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ ถ้ามี ethanol ปนเปื้อนจะมีผลยับยั้งการทำงาน

ของ *Taq* DNA polymerase โดย ethanol ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 จะยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการประยุกต์การตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR นับว่าเป็นวิธีที่ให้ความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยอื่น ๆ (Maher et al., 2008) และโดยหลักการแล้วสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างแม้จะมีเชื้อเพียงตัวเดียว เมื่อมีการประยุกต์การตรวจโดยทำ PCR ซ้ำ 2 ครั้งหรือ nested PCR โดยใช้ผลผลิต PCR ในรอบแรกเป็น DNA ต้นแบบสำหรับการทำ PCR ในรอบถัดไป ร่วมกับการออกแบบ primer สำหรับ PCR ในรอบที่ 2 เพื่อให้มีความจำเพาะสำหรับเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด (Rougemont et al., 2004) หรือออกแบบ primer ให้ครอบคลุมเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในคนได้ (Putaporntip et al., 2009; Singh et al., 2004) นอกจากนี้ยังสามารถออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อชนิดของมาลาเรียโดยให้ผลผลิต PCR มีขนาดต่างกันทำให้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อวินิจฉัยจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียภายในหลอดเดียวกันได้ (Mueller et al., 2009) อย่างไรก็ตามการตรวจโดยวิธี PCR ยังไม่สามารถใช้ทั่วไปได้ด้วยข้อจำกัดด้านค่าใช้จ่ายและต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงตลอดจนต้องอาศัยบุคลากรที่มีทักษะและประสบการณ์

การนำวิธี PCR มาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียได้มีการศึกษา โดยใช้ gene ของดีเอ็นเอเป้าหมายที่แตกต่างกัน ได้แก่ การใช้ DNA เป้าหมายเป็น gene ที่มี 1 ชุดต่อ genome เช่น dihydrofolate reductase (DHFR) gene และ circumsporozoite protein (CSP) gene (Mueller et al., 2009; Putaporntip et al. 2009) เป็นต้น และการใช้ DNA เป้าหมายที่มีหลายชุดต่อ genome (multicopy gene) เช่น rRNA gene (Snounou et al., 1993; Miyake et al., 1995; Kimura et al., 1997) อย่างไรก็ตามการใช้ DNA เป้าหมายที่เป็น multicopy gene จะให้ผลดีกว่าการใช้ gene ที่มีเพียง 1 ชุดต่อ 1 genome

Snounou และคณะ 1993 ได้นำวิธี PCR มาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR เมื่อใช้ SSU rRNA gene เป็น DNA ต้นแบบพบว่ามี ความไว (sensitivity) มากกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนา 1.23 เท่าและมีความจำเพาะมากกว่า 1.41 เท่า แต่ขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยาค่อนข้างยาว (510-960 คู่เบส) จึงใช้ระยะเวลามากในการทำปฏิกิริยาดังกล่าว แม้ primer ที่ใช้จะมีความไวและไม่ทำปฏิกิริยข้ามชนิดของเชื้อมาลาเรียแต่มีผลลบปลอม (false negative) 5 ราย จากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 196 ตัวอย่าง (Snounou et al., 1993) และในปีเดียวกัน Snounou ได้ปรับปรุงขั้นตอนในการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในคนสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ต้นแบบให้มีผลผลิตมากขึ้นและลดผลผลิตที่ไม่



จำเพาะ (non-specific products) โดยทำปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนหรือเทคนิค nested PCR (Snounou et al., 1993)

Roper และคณะ (1996) ใช้เทคนิค nested PCR ที่พัฒนาโดย Snounou ศึกษาระบาดของวิทยาของเชื้อ *P. falciparum* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเชื้อแต่ไม่ปรากฏอาการ (asymptomatic infection) และผู้ป่วยที่ปรากฏอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ (submicroscopically patent infection) ในประเทศชูดานสามารถใช้วิธีนี้ตรวจพบเชื้อมากกว่าการตรวจด้วยฟิล์มเลือด ทั้งที่อยู่ในช่วงฤดูกาลที่ไม่เหมาะสมต่อการแพร่เชื้อมาลาเรีย

ปัจจุบันได้มีการศึกษาคิดค้นเทคนิคต่าง ๆ ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้นมากมายแต่ส่วนใหญ่จะทำการตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย เมื่อ ค.ศ. 2006 Mharakurwa และคณะ ได้ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในส่วนของยีน merozoite surface protein 2 (MSP2) และ dihydrofolate reductase (DHFR) จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะของผู้ติดเชื้อมาลาเรียในตอนใต้ของประเทศแซมเบีย จำนวน 47 ราย พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบมาลาเรียได้เช่นเดียวกับตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยคนเดียวกันและเมื่อปี ค.ศ. 2009 Nwakanma และคณะ ได้ปรับปรุงการใช้วิธี PCR ในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ในตัวอย่าง DNA จากเลือด น้ำลายและปัสสาวะซึ่งเปรียบเทียบกับกรณีวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีจำนวนความหนาแน่นของเชื้อ  $\square$  1000 ตัว/ไมโครลิตร พบว่าความไวในตัวอย่างน้ำลายร้อยละ 73 ความจำเพาะร้อยละ 97 ส่วนในตัวอย่างปัสสาวะมีความไวร้อยละ 32 และมีความจำเพาะร้อยละ 98 จึงนับว่าวิธี PCR มีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจหาเชื้อที่มีความหนาแน่นต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจได้โดยกล้องจุลทรรศน์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานควบคุมโรคมาลาเรียและใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย (Nwakanma, et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยยังไม่ได้ศึกษาตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. vivax* ซึ่งพบอุบัติการณ์สูงในหลายภูมิภาคของโลก นอกจากทวีปแอฟริกา ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้เพื่อเป็นการประเมินผลการตรวจวิธีดังกล่าวจากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทย ซึ่งมีการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียที่แตกต่างจากภูมิภาคอื่น ทั้งในด้านความชุกของโรครวมทั้งการกระจายของเชื้อแต่ละชนิด จึงทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างปัสสาวะ น้ำลายและเลือดของผู้ป่วยในจังหวัดตากซึ่งเป็นท้องที่ที่มีอุบัติการณ์ของโรคสูงสุดในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR เปรียบเทียบผลการตรวจจากฟิล์มเลือดที่ย้อมสี ซึ่งความรู้ที่ได้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคและการใช้ตัวอย่างในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียต่อไป

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษาการประเมินเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเพื่อวินิจฉัยโรค (Diagnostic study)

#### วัตถุประสงค์ (Objectives)

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสตรวจหามาลาเรียในตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะของผู้ป่วยในประเทศไทย

#### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ประชากรตัวอย่าง (Population sample) คือ ตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะที่เก็บมาจากกลุ่มประชากรเป้าหมาย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction) คือ ปฏิกิริยาที่มีการสร้างสาย nucleotide ต่อเนื่องกันไปในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ถือได้ว่าเป็นเทคนิค ที่มีความสำคัญอย่างมากต่องานทางอณูชีววิทยา

ฟิล์มเลือดหนา (Thick blood film) คือ การย้อมสีเม็ดเลือดบนกระจกสไลด์ การเตรียมฟิล์มเลือดชนิดนี้จะไม่เห็นเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดไม่กระจาย ทำให้พบเชื้อมาลาเรียได้ง่ายกว่า แต่บางครั้งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดใด จำเป็นที่จะต้องเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจฟิล์มเลือดบาง

ฟิล์มเลือดบาง (Thin blood film) คือ การย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ การย้อมลักษณะนี้ จะมีการตรึงด้วย absolute methanol ก่อนที่จะนำไปย้อมสี เพื่อที่จะให้เม็ดเลือดแดงแตก ดังนั้นจึงสามารถวินิจฉัยโดยใช้ลักษณะของเม็ดเลือดแดงและตัวเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบกันได้

#### ขนาดของประชากร (Sample size)

การคำนวณตัวอย่างอาศัยข้อมูลการนำร่องจากเลือดตัวอย่างที่นำมาจากมาลาเรียคลินิกในจังหวัดตาก จำนวน 30 ตัวอย่าง ทำการตรวจด้วยเทคนิค PCR และตรวจฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ้า อัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียเท่ากับร้อยละ 43.33 และ 23.33 ตามลำดับมาคำนวณขนาดประชากรตัวอย่างโดยใช้สูตร (Ingelfinger et al., 1987)



$$N = \frac{[Z_{\alpha}(P1Q1)^{1/2} + Z_{\beta}(P2Q2)^{1/2}]^2}{[P1+P2]^2}$$

โดย N = ขนาดตัวอย่าง

$\alpha$  = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR

$\beta$  = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้จากการตรวจฟิล์มเลือดหน้าที่ย้อมสียิมซ่า

$Z_{\alpha}$  = 1.96, the two-tailed Z value ที่ระดับ 0.05 จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR

$Z_{\beta}$  = 1.96, the two-tailed Z value ที่ระดับ 0.05 จากการตรวจฟิล์มเลือดหน้าที่ย้อมสียิมซ่า

P1 = อัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากการตรวจด้วยเทคนิค PCR

Q1 = 1- P1

P2 = อัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากการตรวจฟิล์มเลือดหน้าที่ย้อมสียิมซ่า

Q2 = 1- P2

ดังนั้นขนาดของกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 65 คนเป็นอย่างน้อยแต่เนื่องจากเพื่อให้การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องมากขึ้น จึงทำการศึกษาตัวอย่างประชากร ไม่ต่ำกว่า 120 ตัวอย่าง

## อุปกรณ์

Vortex mixer (Scientific Industries)

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (Olympus)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (Automatic thermal cycler, Takara)

เครื่องซั่งน้ำหนักละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Bosh)

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิและเวลาได้ (High speed refrigerated microcentrifuge, Tomy)

เครื่องไมโครเวฟ (LG)

เครื่อง Laminar flow (Model ABS 1200)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Cyberscan 500)

ชุดอุปกรณ์สำหรับแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid-II)

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Hitachi)

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Puffer Hubbard)

ตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส (Haier)  
 ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Forma Scientific)  
 ตู้อบแห้ง (Memmert)  
 นาฬิกาจับเวลา (Merck)  
 หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (Hirayama)  
 เครื่องอ่านผลแถบ DNA จากเจล (Bio Rad)

### วัสดุ

กระจกสไลด์ (ขนาด 2.5 x 7.5 เซนติเมตร)  
 กระบอกล้างจาน  
 กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร  
 กล้องโพรบใส่น้ำแข็ง  
 ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี  
 ถุงมือยาง (Latex gloves)  
 ถุงพลาสติก  
 ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร  
 เทอร์โมมิเตอร์  
 แท่งแก้วสำหรับคนสาร  
 บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร  
 ปากคีบ (Forcep)  
 ปิเปตต์ทิป (Pipette tip) ขนาด 10, 100 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)  
 พาราฟิล์ม (Parafilm)  
 หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (Microtube) ขนาดความจุขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารเคมี

### สารเคมีทั่วไป

absolute ethanol (Merck)  
 absolute methanol (Mallinkrot)  
 agarose (1 st BASE)  
 boric acid (Sigma)  
 cleaning solution (ICN Biomedicals)  
 double distilled water  
 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Promega)  
 ethidium Bromide (Bio Rad)  
 Giemsa stain  
 TE Buffer (Promega)  
 Tris Base (Promega)

### สารเคมีที่เป็น Reagent Kit

QIAGEN DNA Extraction Kit

### เอ็นไซม์

*r-Taq* DNA polymerase (TaKaRa)

### Oligonucleotides (Putaporntip et al., 2009)

Oligonucleotides ที่เป็น inter-species primers

M18SFO: 5'-CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGG-3' (26 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1261 ถึง 1286 ใน SSU rRNA gene ของ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* และ *P. malariae*)

M18SRO: 5'-TGTTGTTGCCTTAACTTCCTTG-3' (23 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1899 ถึง 1921 ใน SSU rRNA gene ของ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* และ *P. malariae*)

Oligonucleotides ที่เป็น species-specific primers

PF18SFO: 5'-CATCTTTCGAGGTGACTTTTAG-3' (22 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1373 ถึง 1400 ใน SSU rRNA gene ของ *P. falciparum*)

PF18SRO: 5'-GAAGAGAGAAATAGAGTAAAAAAC-3' (24 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1816 ถึง 1839 ใน SSU rRNA gene ของ *P. falciparum*)

PVSM18SFO: 5'-GAATTTTCTCTTCGGAGTTTATTC-3' (24 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1367 ถึง 1399 ใน SSU rRNA gene ของ *P. vivax*)

PVSM18SRO: 5'-GTAGAAAAGGGAAAGGGAAACTGT-3' (24 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1774 ถึง 1806 ใน SSU rRNA gene ของ *P. vivax*)

PK18SFO : 5'-GAGTTTTTCTTTTCTCTCCGCAG-3' (23 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1367 ถึง 1379 ใน SSU rRNA gene ของ *P. knowlesi*)

PK18SRO : 5'-GGGAAAGGAATCACATTTAACGT-3' (22 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1771 ถึง 1779 ใน SSU rRNA gene ของ *P. knowlesi*)

PO18SFO : 5'-GAAAATTCCTTTTCGAAATTTCTTAG-3' (26 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1367 ถึง 1403 ใน SSU rRNA gene ของ *P. ovale*)

PO18SRO : 5'-GGGAAAAGGACACTATAATGTATC-3' (24 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1767 ถึง 1798 ใน SSU rRNA gene ของ *P. ovale*)

PMB18SFO : 5'-GAGACATTCATATATATGAGTG-3' (22 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1369 ถึง 1393 ใน SSU rRNA gene ของ *P. malariae*)

PMB18SRO: 5'-GGGAAAAGAACGTTTTTATTAACAAAAAAC-3' (29 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1770 ถึง 1798 ใน SSU rRNA gene ของ *P. malariae*)

## ดีเอ็นเอมาตรฐาน

Ladder 100 bp marker

## ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะจากผู้ป่วยมาลาเรีย มารับการตรวจรักษาโรคมาลาเรีย ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 9.3.11 ต.ท่าสองยาง อ.ท่าสองยาง จ.ตาก ระหว่างปี พ.ศ.2551 - พ.ศ.2552 และทำการซักประวัติเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ เชื้อชาติ ภูมิภาคและอาการป่วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### ตัวอย่างเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้วของผู้ป่วยที่มีไข้และสงสัยว่าจะติดเชื้อมาลาเรียที่เข้ามารับการรักษา ณ ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อมาโดยแมลง โดยใช้เลือดที่เจาะได้จำนวน 300 ไมโครลิตร เก็บในหลอดที่มีสาร EDTA เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ตัวอย่างเลือดทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส ใช้เลือดที่เหลือหยดลงบนแผ่นสไลด์แก้วสำหรับทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนาและบางอย่างละ 2 แผ่นและย้อมด้วยสี Giemsa เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มดังกล่าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการแยกชนิดและประเมินความหนาแน่นของเชื้อในแต่ละตัวอย่าง

### ตัวอย่างปัสสาวะ และน้ำลาย

เก็บตัวอย่างปัสสาวะ และน้ำลายในรายที่ให้ผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดลงในหลอด Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ preserve ด้วย absolute ethanol ในอัตราส่วน 2:1 และอีกหนึ่งส่วนคือการแช่เย็น จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนก้นหลอด และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัด DNA

## 2. การตรวจเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มเลือด

### วิธีการตรวจฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin blood film)

หยดเลือดประมาณ 1-2 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด โดยหยดเลือดอยู่ห่างจากปลายด้านหนึ่งของสไลด์ ทำการไถเลือดที่หยดไว้ด้วยปลายสไลด์อีกแผ่นหนึ่งที่มีขอบเรียบโดยแตะปลายดังกล่าวที่หยดเลือดทำมุมเอียงกับแผ่นสไลด์ที่มีเลือดหยดประมาณ 30-45 องศา เลื่อนสไลด์สำหรับไถถอยหลังให้ขอบด้านหนึ่งแตะกับหยดเลือด แล้วทำการไถเลือดด้วยความเร็วสม่ำเสมออย่าให้หยุดชะงักไปในทิศทางตรงข้ามกับตำแหน่งที่หยดเลือดไว้ในตอนแรก รอให้ฟิล์มเลือดแห้งสนิท จากนั้นนำไปตรึงด้วย absolute methanol เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งสนิทเพื่อรักษาเม็ดเลือดแดงและเชื้อให้คงสภาพไม่หลุดออกขณะทำการย้อม แล้วนำไปย้อมด้วยสียิมซำต่อไป

### วิธีการนับจำนวนเชื้อ

ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 40x เลื่อนหาบริเวณที่เม็ดเลือดแดงมีการกระจายตัวสม่ำเสมอและเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว โดยปกติแล้วจะพบในบริเวณส่วนปลายของฟิล์มเลือด จากนั้นเปลี่ยนกำลังขยายเป็น objective lens 100x นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบใน 3 วงกล้อ ค่าจำนวนหาจำนวนวงกล้อที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ แล้วนับ

จำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียที่พบในวงกล้างเท่ากับจำนวนวงกล้างที่คำนวณได้แล้วคำนวณเป็นค่าร้อยละ

วิธีการประเมินจากฟิล์มเลือดชนิดหนา

ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย =  $\frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ} \times \text{จำนวนเม็ดเลือดแดงในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงต่อ 1 วงกล้าง} \times \text{จำนวนวงกล้าง}}$

(ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงเท่ากับ  $5 \times 10^6$  ตัว)

ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเม็ดเลือดแดงในวงกล้าง 3 วงกล้างได้เท่ากับ 990 เซลล์ จำนวนวงกล้างที่จะพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์เท่ากับ  $10,000 \times 3/990$  เท่ากับ 30 วงกล้าง ดังนั้นจะต้องนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อที่พบใน 30 วงกล้าง สมมุติว่านับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเท่ากับ 50 เซลล์ต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ คิดเป็นอัตราการติดเชื้อในเลือดของผู้ป่วยรายนี้เท่ากับร้อยละ 0.50

วิธีการตรวจฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film)

การย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนานี้คล้ายกับวิธีการย้อมฟิล์มเลือดชนิดบาง ยกเว้นขั้นตอนการตรึงด้วย absolute methanol ซึ่งไม่ต้องใช้สำหรับการย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนา เนื่องจากต้องการให้เม็ดเลือดแดงแตกในระหว่างขั้นตอนการย้อม ซึ่งมีขั้นตอนคือ หยดเลือดประมาณ 3-5 ไมโครลิตร โดยหยดลงที่จุดศูนย์กลางของสไลด์ ทำการเกลี่ยเลือดให้เป็นวงโดยใช้มุมของสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร เมื่อเลือดแห้งสนิทแล้วจึงนำไปย้อมด้วยสียิมซา ในอัตราส่วนเช่นเดียวกับวิธีการย้อมชนิดบาง ซึ่งต้องระวังไม่ให้ฟิล์มเลือดนั้นหนาเกินไปเพราะจะทำให้การติดสีไม่ดีอาจหลุดลอกออกจากสไลด์ในขั้นตอนการย้อมสี ในทางตรงข้ามถ้าฟิล์มเลือดบางเกินไปจะทำให้เสียเวลาในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการนับจำนวนเชื้อ

ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย objective lens 40x เลื่อนหาเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แล้วเปลี่ยนกำลังขยาย objective lens เป็น 100x นับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว แล้วสามารถคำนวณหาเชื้อต่อเลือด 1 มิลลิลิตร โดยค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 เซลล์ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร

วิธีการประเมินจากฟิล์มเลือดชนิดหนา

ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย =  $\frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้} \times \text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้}}$



ตัวอย่าง เช่น นับจำนวนเชื้อมาลาเรียในแต่ละวงกล้องพบจำนวนเชื้อมาลาเรีย 100 ตัวต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว ถ้าประมาณว่าเลือด 1 ไมโครลิตร มีเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยประมาณ 8,000 ตัว ดังนั้นความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในเลือด มีจำนวนประมาณ 4,000 ตัวต่อ 1 ไมโครลิตร

### 3. การสกัด DNA (DNA Extraction)

1. ทำการสกัดโดยใช้ ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAGEN DAN Extraction Kit โดยนำเลือด ปัสสาวะและน้ำลายแต่ละตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ ATL 160 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
2. เติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปป้อนไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะละลาย
3. นำหลอดที่ป้อนไว้มาเติมบัฟเฟอร์ AL 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที
4. เติมเอทานอล (96-100%) 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
5. ดูดสารละลายในหลอด ใส่ลงใน QIAamp Spin Column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
6. ล้าง DNA ด้วยบัฟเฟอร์ AW1 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
7. เติม AW2 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ตัดฝาออก นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
8. นำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม บัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
9. ดูดดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดกลาง 0.5 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

#### 4. การเพิ่มปริมาณ DNA (DNA Amplification)

##### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรก

องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Double distilled water 13.04 ไมโครลิตร 10X PCR reaction buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris HCL ความเข้มข้น 100 มิลลิโมล KCL ความเข้มข้น 500 มิลลิโมล  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร buffer ที่ใช้คือ 2.00 ไมโครลิตร เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ Nucleotide substrate (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 1.60 ไมโครลิตร *Plasmodium* genus-species primers คู่ในส่วนของ SSU rRNA gene (M18SFO และ M18SRO) ความเข้มข้น 30 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.13 ไมโครลิตร เอนไซม์ *r-Taq* DNA polymerase 0.10 ไมโครลิตร เพื่อเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ส่วนประกอบทั้งหมดนี้เรียกว่า PCR reaction mixture แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วย การทำให้ DNA ต้นแบบแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีในรอบแรก และ 0.40 นาที ในรอบต่อ ๆ ไป จากนั้นทำให้ Primers จับคู่กับ DNA ต้นแบบ (Primer Template Annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นคือขั้นตอนการสร้างสาย DNA (Primer Extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปครบ 40 รอบ และในรอบที่ 40 จะเพิ่มระยะเวลาในขั้นตอนการสร้างสาย DNA ออกไปอีก 5 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์

##### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบสอง (nested PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบที่สอง แบ่งผลผลิตจากการทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรกมาเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในรอบที่สองทั้งหมดมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย species-specific inter primers ได้แก่ *P. falciparum* (PF18sFO : PF18sRO), *P. vivax* (PVSM18sFO : PVSM18sRO), *P. knowlesi* (PK18sFO : PK18sRO), *P. ovale* (PO18sFO : PO18sRO) และ *P. malariae* (PMB18sFO : PMB18sRO) ความเข้มข้น 30 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.13 ไมโครลิตร โดยแยกปฏิกิริยาสำหรับแต่ละ species เป็น 5 หลอด ส่วนองค์ประกอบอื่น ๆ เช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบแรก แต่ลดปฏิกิริยาที่จะดำเนินไปเหลือเพียง 30 รอบ แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาต่อไป



## 5. การวิเคราะห์ DNA จากผลผลิต PCR ด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

การวิเคราะห์ DNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis เป็นวิธีที่นิยมใช้กัน อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ในการศึกษากกรดนิวคลีอิกปริมาณเล็กน้อย นำมาศึกษาโครงสร้าง ขนาดและปริมาณของกรดนิวคลีอิกที่มีความยาวที่เหมาะสม โดยอาศัยคุณสมบัติโครงสร้างทางเคมีของกรดนิวคลีอิกที่มีองค์ประกอบของหมู่ฟอสเฟต ( $PO_4^-$ ) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นประจุลบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะมีการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวก โดยอาศัย Agarose gel เป็นตัวกลางในการแยกขนาดของ DNA เคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ขณะที่เคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ซึ่งมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียม Agarose ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน 1X TBE ทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาให้ความร้อน จนส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้ความร้อนลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส ถึง 60 องศาเซลเซียส นำส่วนผสมนี้เทลงบนแม่พิมพ์สำหรับเตรียมเจล (gel chamber) ขนาด 5.5 x 10.5 เซนติเมตร จากนั้นใส่หวีเจล (comb) ลงไปในช่องสำหรับใส่หวี เพื่อทำหลุม (well) สำหรับวิเคราะห์ PCR Products ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จนเจลแข็งตัว เติม TBE Buffer โดยให้ปริมาตรของบัฟเฟอร์ท่วมเจลเล็กน้อย เพื่อช่วยให้ดึง comb ออกจากเจลได้ง่ายขึ้นและเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดหลุมในเจลแตกหรือการฉีกขาดของเจล ค่อย ๆ ดึง comb ออกจากนั้นนำไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่เติม TBE ไว้ให้ปริมาตรที่ท่วมผิวหน้าของเจล ประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งใช้ TBE:  $H_2O$  ในอัตราส่วน 9:1 ในปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำผล PCR Product ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตหยอดแต่ละอย่างลงในหลุมเจล โดยเรียงตามลำดับและบันทึกข้อมูล ซึ่ง Ladder 100 bp เป็น DNA บอกรายละเอียด เพื่อเปรียบเทียบขนาดโดยประมาณของ DNA ที่ศึกษา เปิด power supply จากขั้วลบเข้าหาขั้วบวกใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งสีของ loading dye เคลื่อนไปได้ 2 ใน 3 ส่วนของเจล นำเจลไปย้อมด้วย Ethidium bromide (EtBr) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน TBE Buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจากแหล่งกำเนิดแสง (UV transilluminator) และถ่ายภาพเก็บไว้เพื่อนำมาวัดขนาดของแถบ DNA product โดยเปรียบเทียบกับแถบ DNA บอกรายละเอียด

## primer-M18SFO

Pv U03079	12051	TAAAATACTT	CCATTAATCA	AGAACGAAAG	TTAAGGGAGT	GAAGACGATC	1300
Pk L07560	12051	TAAAATACTT	CCATTAATCA	AGAACGAAAG	TTAAGGGAGT	GAAGACGATC	1300
Po AB182489	12051	TAAAATACTT	CCATTAATCA	AGAACGAAAG	TTAAGGGAGT	GAAGACGATC	1300
Pm M54897	12051	TAAAATACTT	CCATTAATCA	AGAACGAAAG	TTAAGGGAGT	GAAGACGATC	1300
Pf M19172	12051	TAAAATACTT	CCATTAATCA	AGAACGAAAG	TTAAGGGAGT	GAAGACGATC	1300

## species-specific primer

Pv U03079	1351	AAAGATTTTA	AAATAAGAA	TTT----C	TCTTCGGAGT	TTA---TTCT	1400
Pk L07560	1351	AAAGATTTTA	AAATAAGAGT	TTTCTTTTC	TCTCCGGAGA	TTAGAACTCT	1400
Po AB182489	1351	AAAGATTTT	AAATAAGAAA	ATT----C	CTTTCGGGGA	AAT---TTCT	1400
Pm M54897	1351	ATAGTGTA	AAATAAAGA	GACA---TTC	TTATATATGA	GTGTTTCTTT	1400
Pf M19172	1351	AAAGTGTTAA	AAATAAAGT	--CA---TCT	TTCGAGGTGA	-----CTTT	1400

Pv U03079	1401	TAGATTGCTT	CCTTCAGTGC	C TTATGAGAA	ATCAAAGTCT	TTGGGTCTG	1500
Pk L07560	1401	TAGATTGCTT	CCTTCAGTGC	C TTATGAGAA	ATCAAAGTCT	TTGGGTCTG	1500
Po AB182489	1401	TAGATTGCTT	CCTTCAGTAC	C TTATGAGAA	ATCAAAGTCT	TTGGGTCTG	1500
Pm M54897	1401	TAGATAGCTT	CCTTCAGTAC	C TTATGAGAA	ATCAAAGTCT	TTGGGTCTG	1500
Pf M19172	1401	TAGATTGCTT	CCTTCAGTAC	C TTATGAGAA	ATCAAAGTCT	TTGGGTCTG	1500

## species-specific primer

Pv U03079	1751	TCGAAGAAAA	TATTGGGAT-	ACGTTAAA	---GTT--TC	CGTTTCGGT	1800
Pk L07560	1751	TTGAAGAAAA	TATTGGAATT	ACGTTAAA	---TGTGAT	CGTTTCGGT	1800
Po AB182489	1751	TTGAAGAATA	CATTAGTAT	ACAATPAA	---TGTG--TC	CGTTTCGGTA	1800
Pm M54897	1751	TTGATTAAAA	TATTAGAAT-	TTTTTTTAA	TAAAAATTT	CTTTTCGGT	1800
Pf M19172	1751	C-AGTAATCA	AATTAGGATA	TTTTTATT--	--AAAATATC	CTTTTCCTCG	1800

Pv U03079	1801	TTCTACTTAA	TTAG	T--TCGCTTT	TCATACTGTT	TCTTT--TTCG	CGTAAGAATG	1850
Pk L07560	1801	TTCTACTTAA	T--TTACATT	TCCATCTATT	TCTTT--TTTG	CGTATGAATG	1850	
Po AB182489	1801	TTCTACTTAA	T--TCGCAAT	TCATGCTGTT	TCTCT--TTTG	CATAGGAATG	1850	
Pm M54897	1801	TTPTTCTTAA	TTATGCATAT	TTATTCPTTT	TCTTTTTTCG	CATAAGAATG	1850	
Pf M19172	1801	TTCTACTAAT	AAATTGCTT	TTACTTAAAT	TCTCTCTTT	TTTAAGAATG	1850	

## primer-M18SRO

Pv U03079	1851	TATTTGCTTG	ATTGTAAGC	TTCTTAGAGG	AACGATGTGT	GCCTAACACA	1900
Pk L07560	1851	TATTTGCTTG	ATTGTAAGC	TTCTTAGAGG	AACGATGTGT	GTCTAACACA	1900
Po AB182489	1851	TATTCGTTG	ATTGTAAGC	TTCTTAGAGG	AACGATGTGT	GTCTAACACA	1900
Pm M54897	1851	TATTTGCTTA	AT--GTAAGC	TTCTTAGAGG	AACGATGTGT	GTCTAACACA	1900
Pf M19172	1851	TACTTGCTTG	ATTGAAAAGC	TTCTTAGAGG	AACATGTGT	GTCTAACACA	1900

Pv U03079	1901	AGGAAGTTTA	AGGCAACAAC	AGGTCTGTGA	TGTCCCTAGA	TGAAGTAGGC	1900
Pk L07560	1901	AGGAAGTTTA	AGGCAACAAC	AGGTCTGTGA	TGTCCCTAGA	TGAAGTAGGC	1900
Po AB182489	1901	AGGAAGTTTA	AGGCAACAAC	AGGTCTGTGA	TGTCCCTAGA	TGAAGTAGGC	1900
Pm M54897	1901	AGGAAGTTTA	AGGCAACAAC	AGGTCTGTGA	TGTCCCTAGA	TGAAGTAGGC	1900
Pf M19172	1901	AGGAAGTTTA	AGGCAACAAC	AGGTCTGTGA	TGTCCCTAGA	TGAAGTAGGC	1900

รูปที่ 5 แสดงลำดับเบสบางส่วนของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียที่จำเพาะกับชนิดเชื้อ *P. vivax* (Pv), *P. knowlesi* (Pk), *P. ovale* (Po), *P. malariae* (Pm) และ *P. falciparum* (Pf) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 6. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ทำการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้คอมพิวเตอร์ โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows (Statistical Package for the Social Science for Windows) ดังนี้

6.1 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น เพศ เชื้อชาติ ประวัติการเป็นมาลาเรียและอาการสำคัญวิเคราะห์ในรูปของความถี่และร้อยละ ส่วนลักษณะข้อมูลทั่วไปที่เป็นเชิงปริมาณ เช่น อายุ จำนวนครั้งที่ เป็นมาลาเรีย อุณหภูมิ วิเคราะห์ในรูปความถี่ ร้อยละ ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6.2 เก็บรวบรวมข้อมูลชนิดของเชื้อมาลาเรียและความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย โดยอาศัยจากการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาและบาง

6.3 เก็บรวบรวมข้อมูลชนิดของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจากการตรวจด้วยวิธี PCR โดยอ่านผลจากภาพถ่ายแถบ DNA

6.4 เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะโดยวิธี PCR และเปรียบเทียบกับผลการตรวจจากจากฟิล์มเลือดและประเมินที่ให้ความไวสูง

6.5 ความไว (Sensitivity) เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค PCR ที่บอกถึงอัตราส่วนของผลบวกในการตรวจผู้ป่วยมาลาเรีย

6.6 ความจำเพาะ (Specificity) เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค PCR ที่บอกถึงอัตราส่วนของผลลบในการตรวจคนปกติ

6.7 ความเที่ยงตรง (likelihood ratio) เป็นคุณสมบัติของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียที่จะบอกจำนวนที่เป็นโรคมมาลาเรียเมื่อได้ผลบวก และไม่เป็นโรคมมาลาเรียเมื่อได้ผลลบเป็นสัดส่วนเท่าใดในประชากรที่มาตรวจ

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. ลักษณะทั่วไปและข้อมูลทางคลินิกของประชากรตัวอย่าง

จากตัวอย่างเลือด บีสสภาวะและน้ำตาลาย จำนวน 120 ตัวอย่าง ของประชากรเป้าหมายซึ่งมารับการตรวจรักษาจากมาลาเรียคลินิกในจังหวัดตากระหว่างปี พ.ศ.2551 - พ.ศ.2552 ประกอบด้วยตัวอย่างจากผู้ป่วยเพศชาย 73 ราย คิดเป็นร้อยละ 60.83 และเพศหญิงจำนวน 47 ราย คิดเป็นร้อยละ 39.17 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ประชากรที่ศึกษามีอายุตั้งแต่ 4-60 ปี มีอายุเฉลี่ย 20.29 ช่วงอายุที่มีประชากรมากที่สุดคือ 11-20 ปี มีจำนวน 47 ราย คิดเป็นร้อยละ 39.17 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ประชากรที่ศึกษาส่วนใหญ่เป็นนักเรียนคิดเป็นร้อยละ 37.50 และมีเชื้อชาติพม่ามากที่สุด จำนวน 57 คน คิดเป็นร้อยละ 47.50 เชื้อสายกะเหรี่ยง จำนวน 42 ราย คิดเป็นร้อยละ 35 ส่วนที่เหลือเป็นประชากรที่มีเชื้อชาติไทยที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.ท่าสองยาง จำนวน 21 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.5 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด อาการของผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นไข้สูงและหนาวสั่น คิดเป็นร้อยละ 40.83 และมีอุณหภูมิร่างกายสูงสุด 40.3 องศาเซลเซียส ผู้ป่วยเคยเป็นมาลาเรียมาก่อนคิดเป็นร้อยละ 69.17 โดยเฉลี่ยเคยเป็นมาลาเรีย 1.77 ครั้ง มีกลุ่มผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียครั้งสุดท้ายหลังสุดประมาณ 1-2 เดือนที่แล้วก่อนการติดเชื้อมาก่อนคิดเป็นร้อยละ 43.33 และมีอาการไข้ก่อนมารับการตรวจเลือด 3 วัน คิดเป็นร้อยละ 42.5 (ตารางที่ 1-2)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

	ข้อมูล	จำนวน	ร้อยละ
1.เพศ	ชาย	73	60.83
	หญิง	47	39.17
2.อายุ	1-10 ปี	27	22.50
	11-20 ปี	47	39.17
	21-30 ปี	20	16.67
	31-40 ปี	18	15.00
	41-50 ปี	6	5.00
	51-60 ปี	2	1.67
	3.เชื้อชาติ	ไทย	21
	พม่า	57	47.50
	กะเหรี่ยง	42	35.00
4.อาชีพ	เด็ก	6	5.00
	นักเรียน	45	37.50
	ทำไร่	18	15.00
	ทำนา	6	5.00
	ทำสวน	2	1.67
	รับจ้าง	33	27.5
	ค้าขาย	5	4.17
	อื่นๆ	5	4.17

ศูนย์วิจัยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง (ต่อ)

ข้อมูล	จำนวน	ร้อยละ
5.อุณหภูมิร่างกาย		
35.00-36.00	12	10.00
36.01-37.00	43	35.83
37.01-38.00	44	36.67
38.01-39.00	13	10.83
39.01-40.00	7	5.83
มากกว่า 40.00	1	0.83
6.จำนวนวันที่เป็นไข้		
1 วัน	13	10.83
2 วัน	44	36.67
3 วัน	51	42.50
4 วัน	12	10.00
7.อาการสำคัญ		
มีไข้	42	35.00
มีไข้และปวดหัว	29	24.17
ไข้และหนาวสั่น	49	40.83
8.ประวัติการเป็นไข้มาลาเรีย (จำนวนครั้ง)		
1-2 ครั้ง	68	56.67
3-4 ครั้ง	14	11.67
5-9 ครั้ง	1	0.83
ไม่เคย	37	30.83
9.ครั้งสุดท้ายที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรีย		
1-2 เดือนที่แล้ว	52	43.33
3-4 เดือนที่แล้ว	9	7.50
5-9 เดือนที่แล้ว	3	2.50



ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลสรุปทั่วไปของตัวอย่าง

ข้อมูล	Mean	Minimum	Maximum	Std.Deviation
1. อายุ	20.29	4	60	12.72
2. อุณหภูมิ	37.19	34.5	40.3	1.00
3. จำนวนครั้งที่เคยเป็นมาลาเรีย	1.77	1	5	0.90
4. จำนวนวันที่เป็นไข้	2.52	1	4	0.66

## 2. การตรวจเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์ม

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซา สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากผู้ป่วยจำนวน 100 ราย โดยมีอัตราความหนาแน่นของเชื้อตั้งแต่ 35 ถึง 311,395 ตัวต่อไมโครลิตร (geometric mean =13,920 ตัวต่อไมโครลิตร) คิดเป็นร้อยละ 83.33 จำแนกออกเป็นความหนาแน่นของเชื้อชนิด *P. falciparum* ตั้งแต่ 35 ถึง 217,805 ตัวต่อไมโครลิตร (geometric mean =2,761 ตัวต่อไมโครลิตร) จำนวน 52 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.33 และความหนาแน่นของเชื้อ *P. vivax* ตั้งแต่ 35 ถึง 44,250 ตัวต่อไมโครลิตร (geometric mean =1,248 ตัวต่อไมโครลิตร) จากผู้ป่วย 48 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 และในการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบเชื้อ *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* จากแผ่นฟิล์มเลือด (ตารางที่ 3)

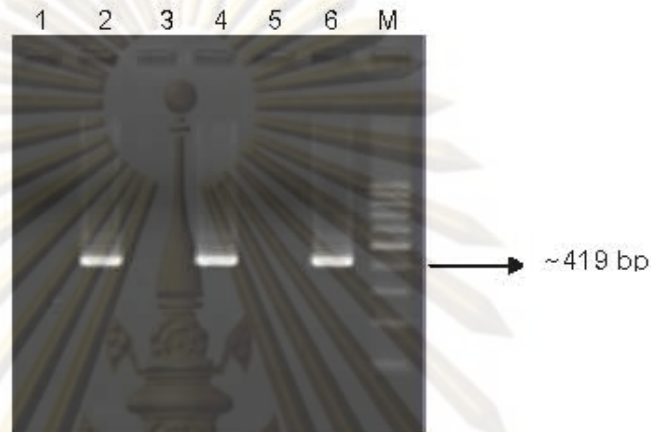
ตารางที่ 3 แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซา

ชนิดของเชื้อ	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบเชื้อ (%)
<i>P. falciparum</i>	52	43.33
<i>P. vivax</i>	48	40.00
Negative	20	16.67
รวม	120	100

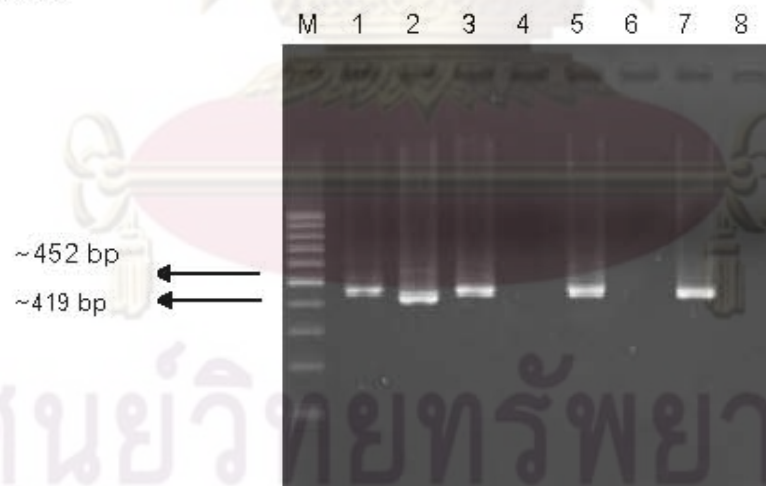
## 3. การตรวจเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน SSU rRNA gene โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากการทำ nested PCR โดยใช้ species-specific primers วิเคราะห์ผลผลิต PCR จาก

ตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะจำนวน 120 ตัวอย่าง ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาด คือ 100 bp ladder พบว่าเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* มีขนาดประมาณ 419 และ 452 bp ดังรูปที่ 6 และ 7 ตามลำดับ และบางตัวอย่างมีการติดเชื้อผสมร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ดังแสดงในรูปที่ 8

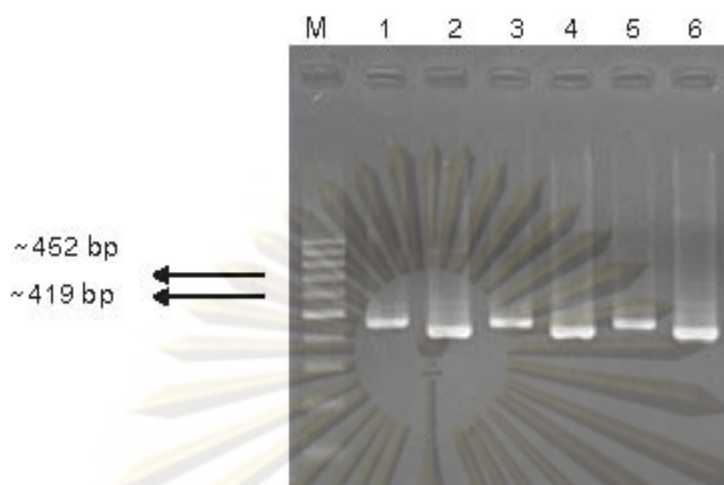


รูปที่ 6 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะซึ่งให้ผล *P. falciparum* จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อ มาลาเรียด้วย agarose gel electrophoresis โดย 1-2= ตัวอย่างเลือด, 3- 4= ตัวอย่าง น้ำลาย, 5-6= ตัวอย่างปัสสาวะและ M=100 bp ladder



รูปที่ 7 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะซึ่งให้ผล *P. vivax* จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียด้วย agarose gel electrophoresis โดย M=100 bp ladder, 1=*P. vivax* Positive control, 2=*P. falciparum* Positive control, 3- 4=ตัวอย่างเลือด, 5-6=ตัวอย่าง น้ำลาย 7- 8=ตัวอย่างปัสสาวะ





รูปที่ 8 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองของตัวอย่างเลือดและน้ำลายที่เกิดการติดเชื่อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียด้วย agarose gel electrophoresis โดย M=100 bp ladder, 1=*P. vivax* Positive control, 2=*P. falciparum* Positive control, 3-4= ตัวอย่างเลือด, 5-6= ตัวอย่างน้ำลาย

จากตารางที่ 4-5 แสดงผลการตรวจของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด อัตราการพบเชื้อร้อยละ 88.33 จากจำนวนผู้ป่วย 106 ราย จำแนกเป็นเชื้อชนิด *P. falciparum* จำนวน 43 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.83 พบ *P. vivax* จำนวน 37 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.83 และพบการติดเชื่อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* จำนวน 26 รายคิดเป็นร้อยละ 21.67

อัตราการพบเชื้อในตัวอย่างน้ำลายที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์จำนวน 76 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.33 จำแนกเป็นเชื้อชนิด *P. falciparum* จำนวน 32 ราย คิดเป็นร้อยละ 26.67 ตรวจพบเชื้อ *P. vivax* จำนวน 37 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.83 ซึ่งผลการตรวจได้เท่ากับผลการตรวจหาเชื้อ *P. vivax* จากวิธี PCR ของตัวอย่างเลือด พบการติดเชื่อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* คิดเป็นร้อยละ 5.83 จากผู้ป่วย 7 ราย ในส่วนของตัวอย่างน้ำลายที่แช่น้ำแข็งพบอัตราการติดเชื่อร้อยละ 58.83 จำแนกเป็นเชื้อชนิด *P. falciparum* ร้อยละ 19.17 และ *P. vivax* ร้อยละ 13.33 การติดเชื่อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* คิดเป็นร้อยละ 3.33

พบเชื้อในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วย แอลกอฮอล์ จำนวน 30 ราย คิดเป็นร้อยละ 25 จำแนกเป็นเชื้อชนิด *P. falciparum* จำนวน 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.67 เชื้อ *P. vivax* จำนวน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.33 ส่วนในตัวอย่างปัสสาวะที่แช่น้ำแข็งพบอัตราการติดเชื่อร้อยละ 15

และจำแนกเป็น *P. falciparum* ร้อยละ 9.17 *P. vivax* ร้อยละ 5.83 และในตัวอย่างปัสสาวะไม่พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากน้ำลายและปัสสาวะในการศึกษานี้ พบว่าตัวอย่างที่มีการเก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์สามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้มากกว่าตัวอย่างที่แช่น้ำแข็งและสามารถตรวจพบเชื้อ *P. vivax* และการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ได้เป็นครั้งแรกซึ่งไม่มีการรายงานการศึกษาดังกล่าวมาก่อน

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะ

Procedure, results	Concordance with consensus microscopy result for smear, no (%) of samples		
	Positive (n=100)	Negative (n=20)	Total (n=120)
<b>Blood</b>			
Positive	100(100)	6(30)	106(88.33)
Negative	0	14(70)	14(11.67)
<b>Saliva preserved in ethanol</b>			
Positive	73(73)	3(15)	76(63.33)
Negative	27(27)	17(85)	44(36.67)
<b>Saliva kept on ice</b>			
Positive	43(43)	0	43(58.83)
Negative	57(57)	20(100)	77(64.17)
<b>Urine preserved in ethanol</b>			
Positive	30(30)	0	30(25)
Negative	70(70)	20(100)	90(75)
<b>Urine kept on ice</b>			
Positive	18(18)	0	18(15)
Negative	82(82)	20(100)	102(85)



ตาราง 5 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะ

Examination	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum+P.vivax</i>	Negative	Total
Blood	43	37	26	14	120
Saliva (preserve in ethanol)	32	37	7	44	120
Saliva (kept on ice)	23	16	4	77	120
Urine (preserve in ethanol)	20	10	0	90	120
Urine (kept on ice)	11	7	0	102	120
Total	129	107	37	327	600

ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* การตรวจด้วยฟิล์มเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี PCR ในตัวอย่างเลือด น้ำลาย และปัสสาวะโดยเปรียบเทียบกับผล PCR ของตัวอย่างเลือด นั้นพบว่าผลการตรวจด้วยฟิล์มเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในตัวอย่างเลือด สามารถตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* 41 ราย พบเชื้อ *P. vivax* 36 ราย ส่วนวิธี PCR จากตัวอย่าง น้ำลายที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* 27 ราย เชื้อ *P. vivax* 32 ราย พบ การติดเชื้อร่วมกัน 7 ราย ตัวอย่างน้ำลายที่แช่ด้วยน้ำแข็งตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* 18 ราย เชื้อ *P. vivax* 12 ราย พบการติดเชื้อร่วมกัน 3 ราย ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ตรวจ พบเชื้อ *P. falciparum* 16 ราย เชื้อ *P. vivax* 8 ราย ส่วนตัวอย่างน้ำลายที่แช่ด้วยน้ำแข็งตรวจพบ เชื้อ *P. falciparum* 8 ราย เชื้อ *P. vivax* 6 ราย ไม่พบการติดเชื้อร่วมกันจากตัวอย่างปัสสาวะเมื่อ เทียบกับผล PCR จากตัวอย่างเลือด ดังตารางที่ 6

เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยการคำนวณจะได้คุณสมบัติของการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยการ ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี PCR ในตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะนั้นพบว่า การตรวจดู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* มีความไวร้อยละ 78.3 และ 79.4 ตามลำดับ พบความไวในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* จากวิธี PCR ในตัวอย่างน้ำลายที่เก็บ รักษาด้วยแอลกอฮอล์ ตัวอย่างน้ำลายที่แช่น้ำแข็ง ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ และตัวอย่างน้ำลายที่แช่น้ำแข็ง คิดเป็นร้อยละ 56.5, 37.7, 29 และ 14.5 ส่วนเชื้อ *P. vivax* มี ความไวร้อยละ 69.8, 31.8, 15.9 และ 12.7 จากวิธี PCR ในตัวอย่างน้ำลายที่เก็บรักษาด้วย แอลกอฮอล์ ตัวอย่างน้ำลายที่แช่น้ำแข็ง ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์และตัวอย่าง น้ำลายที่แช่น้ำแข็ง และคิดความจำเพาะได้ร้อยละ 100 จากตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 Microscopy diagnosis and nested PCR detection of *P. falciparum* and *P. vivax* in blood, saliva and urine samples.

Method	Specimen (n=120)	Result	Nested PCR (blood)				Total
			<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negative	
Microscopy	Blood	<i>P. falciparum</i>	43	0	9	0	52
		<i>P. vivax</i>	0	33	10	0	48
		<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0	0	0	0	0
		Negative	2	1	3	14	20
Nested PCR	Saliva(in ethanol)	<i>P. falciparum</i>	27	0	5	0	32
		<i>P. vivax</i>	0	32	5	0	37
		<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0	0	7	0	7
		Negative	16	5	9	14	44
	Saliva(on ice)	<i>P. falciparum</i>	18	0	5	0	23
		<i>P. vivax</i>	0	12	5	0	17
		<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0	0	3	0	3
		Negative	25	25	13	14	77
	Urine(in ethanol)	<i>P. falciparum</i>	16	0	4	0	20
		<i>P. vivax</i>	0	8	2	0	10
		<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0	0	0	0	0
		Negative	27	29	20	14	90
	Urine(on ice)	<i>P. falciparum</i>	8	0	2	0	10
		<i>P. vivax</i>	0	6	2	0	8
		<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0	0	0	0	0
		Negative	35	31	22	14	102



ตารางที่ 7 Diagnostic performance of microscopy and nested PCR assays using DNA templates from saliva and urine samples.

Method/Specimen	Category	% Sensitivity	% Specificity	% Positive	% Negative	Accuracy	Kappa
				predictive value	predictive value		
Microscopy	<i>P. falciparum</i>	78.3 (67.2-86.4)	100 (77.2-100)	100 (93.4-100)	77.3 (65.8-85.7)	87.5	0.75 (0.64-0.87)
	<i>P. vivax</i>	79.4 (67.8-87.5)	100 (93.7-100)	100 (92.7-100)	81.4 (70.8-88.8)	89.2	0.79 (0.68-0.89)
Nested PCR							
Saliva (in ethanol)	<i>P. falciparum</i>	56.5 (44.8-67.6)	100 (93.0-100)	100 (91.0-100)	63 (52.1-72.7)	75	0.53 (0.40-0.65)
	<i>P. vivax</i>	69.8 (57.6-79.8)	100 (93.7-100)	100 (92.0-100)	75 (64.2-83.4)	84.2	0.69 (0.57-0.81)
Saliva (on ice)	<i>P. falciparum</i>	37.7 (27.2-49.5)	100 (93.0-100)	100 (87.1-100)	54.3 (44.2-64.0)	64.2	0.34 (0.22-0.46)
	<i>P. vivax</i>	31.8 (21.6-44.0)	100 (93.7-100)	100 (83.9-100)	57 (47.2-66.3)	64.2	0.31 (0.19-0.43)
Urine (in ethanol)	<i>P. falciparum</i>	29 (19.6-40.6)	100 (93.0-100)	100 (83.9-100)	51 (41.3-60.6)	87.5	0.26 (0.15-0.37)
	<i>P. vivax</i>	15.9 (9.0-27.2)	100 (93.7-100)	100 (72.2-100)	52.7 (43.5-61.8)	55.8	0.15 (0.06-0.24)
Urine (on ice)	<i>P. falciparum</i>	14.5 (8.1-24.7)	100 (93.0-100)	100 (72.2-100)	46.4 (37.3-55.6)	50.8	0.13 (0.05-0.20)
	<i>P. vivax</i>	12.7 (6.9-23.1)	100 (93.7-100)	100 (67.6-100)	50.9 (41.8-59.9)	54.2	0.12 (0.04-0.20)

Note. Nested PCR results from blood samples are used as the reference standard. Parentheses denote 95% confidence interval.

ตารางที่ 8 Comparison of nested PCR assays using blood, saliva and urine samples with microscopy results as reference.

Nested PCR	Microscopy (%)			
	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>	
	Positive (n=54)	Negative (n=66)	Positive (n=50)	Negative (n=70)
<b>Blood</b>				
Positive	54 (100)	15 (22.7)	50 (100)	13 (18.6)
Negative	0	51 (77.3)	0	57 (81.4)
<b>Saliva (in ethanol)</b>				
Positive	35 (64.8)	4 (6.1)	40 (80.0)	4 (5.7)
Negative	19 (35.2)	62 (93.9)	10 (20.0)	66 (94.3)
<b>Saliva (on ice)</b>				
Positive	24 (44.4)	2 (3.0)	18 (36.0)	2 (2.9)
Negative	30 (55.6)	64 (97.0)	32 (64.0)	68 (97.1)
<b>Saliva (all)</b>				
Positive	40 (74.1)	5 (7.6)	42 (84.0)	6 (8.6)
Negative	14 (25.9)	61 (92.4)	8 (16.0)	64 (91.4)
<b>Urine (in ethanol)</b>				
Positive	20 (37.0)	0	10 (20.0)	0
Negative	34 (63.0)	66 (100)	40 (80.0)	70 (100)
<b>Urine (on ice)</b>				
Positive	9 (16.7)	1 (1.5)	8 (16.0)	0
Negative	45 (83.3)	65 (98.5)	42 (84.0)	70 (100)
<b>Urine (all)</b>				
Positive	24 (44.4)	1 (1.5)	17 (34.0)	0
Negative	30 (55.6)	65 (98.5)	33 (66.0)	70 (100)



จากตารางที่ 8 ผลการตรวจดูด้วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นสามารถตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 54 ตัวอย่าง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผล PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลาย ที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ น้ำลายที่แช่น้ำแข็ง ปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ ปัสสาวะที่แช่น้ำแข็งสามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวได้ 54, 35, 24, 20 และ 9 จากจำนวนทั้งหมด และไม่พบเชื้อ โดยการตรวจดูด้วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 66 ตัวอย่าง แต่ผล PCR ที่ได้จากตัวอย่างเลือด น้ำลายที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ น้ำลายที่แช่น้ำแข็ง ปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ และปัสสาวะที่แช่น้ำแข็ง นั้นพบได้ 15, 4, 2, 0 และ 1 ของจำนวนทั้งหมด ตามลำดับ

ส่วนเชื้อ *P. vivax* เมื่อตรวจดูด้วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นพบ 50 ตัวอย่างแต่สามารถพบเชื้อจาก PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลายที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ น้ำลายที่แช่น้ำแข็ง ปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ ปัสสาวะที่แช่น้ำแข็งได้ใน 50, 40, 18, 10 และ 8 ตามลำดับ จากจำนวนทั้งหมดและตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว 70 ตัวอย่างแต่สามารถพบเชื้อได้โดยวิธี PCR จำนวน 13, 4 และ 2 จากตัวอย่างเลือด น้ำลายที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์ น้ำลายที่แช่น้ำแข็งและไม่พบเชื้อโดยวิธี PCR ในตัวอย่างปัสสาวะ

ตารางที่ 9 Relationship between parasite density and positive tests by nested PCR of saliva and urine samples from malaria patients with single infections

Specimen	Parasites/ $\mu$ l	No. positives/Total positives by blood PCR (%)	
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Saliva			
	<1000	5/7(71.4)	2/3(66.7)
	>1,000	25/34(73.5)	30/33(90.9)
	>5,000	23/27(85.2)	15/16(93.8)
	>10,000	18/19(94.7)	11/12(94.7)
	>50,000	8/8(100)	-
Urine			
	<1000	2/7(28.6)	0/30(0)
	>1,000	17/34(50.0)	13/33 (39.4)
	>5,000	11/27(37.0)	6/16 (37.54)
	>10,000	10/19(52.6)	4/12 (33.3)
	>50,000	5/8(62.5)	-

จากตารางที่ 9 จากผลแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียและอัตราการตรวจพบชนิดของเชื้อจากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะของผู้ป่วยต่อจำนวนที่สามารถตรวจพบเชื้อได้โดยใช้วิธี PCR จากตัวอย่างเลือดนั้นพบว่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่น้อยกว่า 1000 ตัวต่อไมโครลิตร สามารถตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ของตัวอย่างน้ำลายในอัตราร้อยละ 71.4 และ 66.7 ส่วนในตัวอย่างปัสสาวะสามารถตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ในอัตรา 28.6 และจากการศึกษาพบว่าไม่สามารถตรวจหาเชื้อ *P. vivax* ได้ ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่มากกว่า 50000 ตัวต่อไมโครลิตร สามารถตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ในตัวอย่างน้ำลายอัตราร้อยละ 100 ส่วนตัวอย่างปัสสาวะพบได้ในอัตราร้อยละ 62.5



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### อภิปรายผลการวิจัย

เนื่องจากโรคมาลาเรียมีอาการคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ อีกหลายโรค ตลอดจนการรักษาโรคมาลาเรียซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียขึ้นมาหลายวิธี แต่สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง โดยการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนาพร้อมกับชนิดบางซึ่งผ่านการย้อมสี Giemsa เพื่อแยกชนิดและระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความจำเพาะและเหมาะสมมากที่สุด รวมทั้งมีความไวอยู่ในระดับที่ใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคได้ดี อย่างไรก็ตาม การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียให้มีประสิทธิภาพสูงโดยการตรวจหา DNA ของเชื้อมาลาเรียจากวิธี PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความไวและมีความถูกต้องสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี nested PCR ซึ่งเป็นการประยุกต์วิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียหลายชนิดจากการทำ PCR เพียง 2 ครั้ง เป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก สามารถตรวจหาเชื้อที่มีจำนวนความหนาแน่นของเชื่อน้อยกว่า 1 ตัว ในเลือด 1 ไมโครลิตร และยังสามารถตรวจหาเชื้อได้ในสภาวะที่ติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดจากผู้ป่วยในรายเดียวกัน สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในกระแสเลือดโดยชุดตรวจสำเร็จรูปสามารถใช้เป็นทางเลือกในการวินิจฉัยโรคได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในการแยกชนิดต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรีย ส่วนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียมักมีประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยา แต่มีข้อจำกัดด้านการวินิจฉัยโรคเพื่อการรักษา (Murray et al., 2008) อย่างไรก็ตามสิ่งจำเป็นที่สุดจากที่กล่าวมาข้างต้นสำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียนั้นขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเชื้อที่มีอยู่ในกระแสเลือดรวมทั้งจำเป็นต้องทำการเจาะเลือดจากผู้ป่วยเพื่อเป็นการวินิจฉัยดังกล่าวและเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการรายงานว่า DNA ของ *P. falciparum* สามารถตรวจพบได้จากตัวอย่างปัสสาวะและน้ำลายของผู้ป่วยมาลาเรียในบริเวณที่มีการระบาดสูง ถึงแม้ว่าจะให้ประสิทธิภาพในการตรวจต่ำกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ในตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศแอมเบียจำนวน 386 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานนั้นพบว่ามีความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 97-98 ในขณะที่ตัวอย่างน้ำลายมีความไวร้อยละ 72 ส่วนตัวอย่างปัสสาวะนั้นมีความไวเพียงร้อยละ 32 (Nwakanma et al., 2009)

ในการศึกษานี้จึงมีเป้าหมายเพื่อเป็นการยืนยันว่า DNA ของเชื้อ *P. falciparum* สามารถตรวจพบได้ทั้งในน้ำลายและปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดต่ำกว่าประเทศแอมเบีย นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย

ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* จากตัวอย่างดังกล่าว โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 100 ราย และผู้ที่มีอาการไข้แต่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 20 ราย โดยเก็บตัวอย่างจากผู้เข้ารับการรักษาที่มาลาเรียคลินิกในจังหวัดตากซึ่งอยู่ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยอาศัยปฏิบัติการลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อเพิ่มจำนวนในส่วนของยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กของเชื้อมาลาเรีย จากผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าการตรวจด้วยวิธี PCR โดยใช้ DNA จากตัวอย่างน้ำลายมีความไวในการตรวจร้อยละ 74.1 ในขณะที่ความไวจากตัวอย่างปัสสาวะมีค่าร้อยละ 44.4 โดยที่ความจำเพาะมีค่าร้อยละ 100 จากตัวอย่างทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nwakanma และคณะ (Nwakanma et al., 2009) ทั้งนี้การตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างดังกล่าวน่าจะเกิดจากการที่ DNA ของเชื้อมาลาเรียได้ถูกส่งผ่านมาในน้ำลายและปัสสาวะซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการติดเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจพบ DNA ของ *P. vivax* ได้เป็นครั้งแรกจากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะซึ่งยังไม่มีรายงานการตรวจพบมาก่อน โดยพบสัดส่วนของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* สูงกว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* นอกจากนี้ยังตรวจพบจากการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ของตัวอย่างน้ำลายซึ่งให้ผลสอดคล้องกับตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.8 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ จตุรงค์และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 ที่พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ในบริเวณจังหวัดตาก ประมาณร้อยละ 24 จากการตรวจด้วยวิธี nested PCR (Putapornlip et al., 2009) ซึ่งในพื้นที่จังหวัดตากเป็นจังหวัดที่มีอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียสูงและวิธีการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่ใช้วินิจฉัยเชื้อมาลาเรียในทุกพื้นที่ที่มีการระบาดในประเทศไทย แต่จากการตรวจด้วยฟิล์มเลือดพบอัตราการติดเชื้อร่วมกันต่ำกว่าการตรวจด้วยวิธี PCR ปัญหาดังกล่าวจึงทำให้เป็นอุปสรรคสำคัญในการวางมาตรการป้องกันควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพ การเพิ่มปริมาณ DNA จากตัวอย่างน้ำลายพบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* คิดเป็นร้อยละ 5.83 ทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อสูงกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์คิดเป็นร้อยละ 0.45 (Putapornlip et al., 2009) ส่วนตัวอย่างปัสสาวะนั้นไม่พบการติดเชื้อร่วมกันในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากขนาดโมเลกุลของ DNA ของเชื้อมาลาเรียมีขนาดใหญ่กว่าของกรวยไต ดังนั้นโอกาสที่ DNA ของเชื้อมาลาเรียที่อาจส่งผ่านมาในปัสสาวะจึงลดลงทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อนั้นได้น้อยลงตามลำดับ

โดยธรรมชาติแล้วการเก็บรักษาสภาพตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับทางการแพทย์ในภาคนามานั้นถือเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อการนำตัวอย่างมาตรวจสอบในแง่คุณภาพของตัวอย่าง เนื่องจากโรคมาลาเรียเป็นโรคที่เกิดขึ้นในเมืองร้อน ดังนั้นปริมาณของเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิต



ชนิดอื่น ๆ อาจมีการปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะซึ่งส่งผลต่อการเตรียม DNA ของเชื้อ มาลาเรียเพื่อการทดสอบ PCR การศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธีการเก็บรักษาสภาพตัวอย่างเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการเตรียม DNA จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะ โดยพบว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาสภาพด้วยแอลกอฮอล์นั้นสามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาสภาพจากการแช่ด้วยน้ำแข็ง โดยที่ตัวอย่างน้ำลายที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์พบอัตราการติดเชื้อถึงร้อยละ 63.33 ส่วนตัวอย่างปัสสาวะนั้นพบอัตราการติดเชื้อร้อยละ 25 ของตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะที่แช่ด้วยน้ำแข็งสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียคิดเป็นร้อยละ 58.83 และ 15 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากตัวอย่างดังกล่าวแอลกอฮอล์มีคุณสมบัติเป็นตัวช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ก่อนที่จะนำมาสกัด DNA รวมทั้งช่วยยืดระยะเวลาของการเก็บรักษาสภาพตัวอย่างหลังจากสกัด DNA

จากปริมาณของเชื้อ *P. falciparum* ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะนั้นพบได้น้อยกว่าตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียในรายเดียวกัน แต่ที่สำคัญคือสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียได้ถึงแม้ว่าจำนวนของเชื้อจะน้อยกว่าก็ตาม จากความไวของเทคนิค PCR ที่ตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* ในตัวอย่างน้ำลายเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจพบเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าอัตราการตรวจพบเชื่อนั้นสูงขึ้นตามความหนาแน่นของเชื้อในเลือดที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1000 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร (Nwakanma et al., 2009) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR จากตัวอย่างน้ำลายนั้นเพิ่มขึ้นตามความหนาแน่นของเชื้อและมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับตัวอย่างปัสสาวะนั้นไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการตรวจหาเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะโดยวิธี PCR นั้นไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว

ดังนั้นตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะนั้นน่าจะเป็นแหล่งของสารพันธุกรรมที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยไม่ต้องเจาะเลือดผู้ป่วย ทั้งนี้การพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความไวสูงอาจทำให้สามารถใช้ตัวอย่างดังกล่าวในการวินิจฉัยโรคมาลาเรียได้ นอกจากการใช้ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียแล้วยังสามารถตรวจหาโปรตีนหรือสารเคมีอื่น ๆ เพื่อวินิจฉัยโรคได้อีกด้วย โดยที่ตัวอย่างปัสสาวะสามารถตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ฮอริโมน ปริมาณยา ปริมาณอิเล็กโทรไลต์ ส่วนตัวอย่างน้ำลายสามารถนำมาวินิจฉัยแอนติบอดีซึ่งเกิดจากโรคติดเชื้อไวรัส เช่น HIV, ไวรัสตับอักเสบบ A, B และ C นอกจากนี้ตัวอย่างน้ำลายยังสามารถใช้ตรวจติดตามระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ติดตามระบบภูมิคุ้มกันต่อโรคหัด คางทูม และหัดเยอรมัน (Perry et al., 1993) ส่วนการวินิจฉัยด้วย DNA จากน้ำลายยังสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้โดยตรง เช่น *Herpes simplex virus* (โรคเริม), *Varicella zoster virus* (โรคสุกใส) (Mehta et al., 2008) และตรวจหาแบคทีเรีย เช่น *Helicobacter pylori* (Suzuki et al., 2008)

ดังนั้นวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นจึงมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเจาะเลือดจากผู้ป่วยหรือหลีกเลี่ยงการเจาะเลือดในกรณีที่ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือ

### สรุปผลการวิจัย

การประยุกต์วิธี nested PCR เพื่อวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียในการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วน 18S rRNA gene จากตัวอย่างเลือด ปัสสาวะและน้ำลายที่เก็บมาจากผู้ป่วยที่เข้ารับบริการจาก มาลาเรียคลินิกในจังหวัดตากระหว่างปี พ.ศ.2551 - พ.ศ.2552 จำนวน 120 ตัวอย่าง นั้นพบว่า

1. ตัวอย่างน้ำลายสามารถใช้ตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ โดยให้ผลทัดเทียมกับการตรวจดู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะเพื่อการเตรียม DNA พบว่าตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะที่เก็บรักษาด้วยแอลกอฮอล์สามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ดีที่สุดซึ่งสามารถใช้ข้อมูล ส่วนนี้ในการเก็บรักษาสภาพตัวอย่างก่อนที่จะนำมาศึกษาได้
3. ในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจหาเชื้อ *P. vivax* และการติดเชื้อมาร่วมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะได้เป็นครั้งแรกซึ่งข้อมูลยังไม่มี ผู้รายงานการตรวจพบเชื่อดังกล่าวมาก่อน

### ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อเป็นการพัฒนาความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะโดยวิธี PCR ควรเลือกใช้ยีนเป้าหมายชนิดอื่น
2. ควรพัฒนาวิธี PCR จากการศึกษาครั้งนี้ให้เป็นแบบ multiplex PCR เพื่อการประหยัดค่าใช้จ่าย และเวลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

กรมควบคุมโรคติดต่อ กองมาลาเรีย. รายงานประจำปี 2551. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย

### ภาษาอังกฤษ

Ayala, F.J., and Rich, S.M., 2000. Genetic variation and the recent worldwide expansion of *Plasmodium falciparum*. **Gene** 261: 161-170.

Ashley, E.A., Lwin, K.M., Mcgready, R., Simon, W.H., Phaiphun, L., et al. 2006. An open label randomized comparison of mefloquine artesunate as separate tablets vs. a new co-formulated combination for the treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria in Thailand. **Trop Med and Inter Health** 11: 1653-1660.

Bray, R.S., and Garnham, P.C. 1982. The life-cycle of primate malariaparasite. **Br Med Bull** 38: 117-122.

Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp, F.W. 1984. **Clinical Parasitology**. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 35-40.

Berzins, K. 2002. Merozoite antigens involved in invasion. **Chem Immunol** 80: 125-143.

Billker, O., Lindo, V., Panico, M., et al. 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. **Nature** 392: 289-292.

Bruce-Chwatt, L.J., editor. **Essential malariology**. 4<sup>nd</sup> ed. William Heinemann Medical Book, 1993.

Boonma, P., Christensen, P.R., Suwanarusk, R., Price, R.N., Russell, B., and Lek-Uthai, U. 2007. Comparison of three molecular method for the the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. **Malaria J** 6: 124.

Carrara, V.I., Sililak, S., Thonglairuam, J., et al. 2006. Deployment of Early diagnosis and mefloquine Artesunate treatment of Falciparum Malaria in Thailand: the tak Malaria Initiative. **Plos Med** 3: 856-864.

- Chayani, N., Das, B., Sur, M., and Bajorria, S. 2004. Comparison of parasite lactate dehydrogenase based immunochromatographic antigen detection assay (optimal) with microscopy for detection of malaria parasites. *Indian J Med Microbiol* 22: 104-106.
- Chiodini, P.L., and Moody, A.H. 1989. Techniques for the detection of malaria parasites. *J Roy Soc Med* 82:95-97.
- Chen, B., Harbach, R.E., Butlin, R.K., 2002. Molecular and morphological studies on the *Anopheles minimus* group of mosquito in southern China: taxonomic review, distribution and malaria vector status. *Med Vet Entomol* 16:253-265.
- Coatney, G.R., Collins, W.E., Warren, M., and Contacos, P.G. The primate malarias (original book published 1971)(CD ROM). Version 1.0. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2003.
- Coleman, R.E., Maneechai, N., Rachapaew, N., Kumpitak, C., Soyseng, V., Miller, R.S., Thimasarn, K., and Sattabongkot, J. 2002. Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 66: 379-83.
- Coleman, R.E., Sattabongkot, J., Promstapom, S., Maneechai, N., Tippayachai, B., et al. 2006. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malaria J* 5: 121.
- Collins, F.H., and Paskewitz, S.M. 1995. Malaria current and future prospect for control. *Ann Rev Entomol* 40: 195-219
- Crawley, J., English, M., Waruiru, C., Mwangi, I., and Marsh, K. 1998. Abnormal respiratory patterns in childhood cerebral malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 92: 305-308.
- Cunha, M.C., Medina, T.S., Oliveira, S.G., Marinho, A.N., Povoia, M.M., and Ribeiro-dos-Santos, Andrea K.C. 2009. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Acta Tropica* 111: 35-38.



- Das, A., Holloway, B., Collins, W.E., Shama, V.P., Ghosh, S.K., Sinha, S., Hasnain, s.E., Talwar, G.P., and Lal, A.A. 1995. Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P.falciparum* and *P.vivax* malaria parasites. *Mol and cellular Probes* 9: 161-165.
- Dey, S., Guha, M., alam, a., Goyal, M., Bindu, S., Pal, C., Maity, P., Mitra, K., and Babdyopadhyay, U. 2009. Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free Radical Biol & Med* 46: 271-281.
- Duarte, E.C., Gyorkos, T.W., Pang, L., and Abrahamowicz, M. 2004. Epidemiology of malaria in a hypoendemic Brazilian amazon migrant population: a cohort study. *Am soc Trop Med Hyg* 70: 229-237.
- Ebrahimzadeh, A., Fouladi, B., and Fazaeli, A. 2007. High rate of detection of mixed infection of *P.vivax* and *falciparum* in South-East of Iran, using nested PCR. *Parasitol Inter* 56: 61-64.
- Egglte, T.A., Van Agtmale, M.A., Vuong, T.D., and Van Boxtel, C.J. 1999. The development of an immunoassay for the detection of artemisinin compounds in urine. *Am J Trop Med Hyg* 61: 449-456.
- Frevert, U. 2004. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol* 20: 417-424.
- Fryauff, D.J., Purnomo, Sutamihardja, M.A., Elyazar, I.R., Susanti, I., Krisin, Subianto, B., and Marwoto, H. 2000. Performance of the OptiMAL assay for detection and identification of malaria infections in asymptomatic residents of Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 63: 139-45.
- Fungladda, W., Sormani, S., Klongkamnuankam, K., and Hungsapruet, T., 1987. Sociodemographic and behavioural factors associated with hospital malaria patient in Kanchanaburi, Thailand. *Southeast Asian J trop Med Public Health* 90:233-237.
- Fujioka, H., and Aikawa, M., "The malaria parasite and its life cycle," in malaria; Molecular and clinical aspects, eds. Wahlgren, M. and Perlmann P. (Singapore: Overseas Publishers Association, 1999), p. 19-56.

- Gardella, F., Assi, S., Simon, F., Bogreau, H., Eggelte, T., et al. 2008. Antimalarial drug use in general population of tropical Africa. *Malaria J* 7: 124
- Gilles, H.M., 1989. Malaria: An overview. *J Infect Dis* 18: 11-23.
- Genton, B., Paget, S., Beck, H.P., Gibson N., Alpers, M.P., and Hii J. 1998. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection using ParaSight-F test in blood and urine of Papua new guinean children. *Southeast Asian J trop Med Public Health* 29: 35-39.
- Haque, u., Huda, M., Hossain, A., Ahmed, S.M., Moniruzzaman, m., and Haque, R. 2009. Spatial malaria epidemiology in Bangladeshi highlands. *Malaria J* 8: 185.
- Hay, S.I., Guerra, C.A., Tatem, A.J., Noor, A.M., and Snow, R.W. 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 4: 327-36.
- Ingelfinger, J.A., Mosteller, F., Thibodeau, L.A., and Ware, J.H. *Biostatistics in clinical medicine*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Macmillan, 1987.
- Johnston, S.P., Pieniazek, N.J., xayavong, M.V., Slemenda, S.B., Wilkins, P.P., and da Silva, A.J. 2006. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory diagnosis of Malaria. *J Clin Microbiol* 44: 1087-1089.
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T., and Kanbara, H. 2004. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human in Thailand. *Emerg Infect Dis* 10: 2211-2213.
- Katzin, A.M., Kimura, E.S., Alexandre, O.P., and Val Ramos, M.S. 1991. Detection of Antigens in Urine of Patients with acute falciparum and vivax malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 45: 453-462.
- Kimura, M., Kaneko, O., Liu, Q., Zhou, M., Kawamoto, F., Wataya, Y., and Tanabe, K. 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int* 46: 91-5.
- Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S.E., and Sachs, J. 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 70: 486-498.



- Li, J., Wirtz, R.A., McConkey, G.A., Sattabonkot, J., Water, A.P., Rogers, M.J., et al. 1995. Plasmodium: genus-conserved primers for species identification and quantitation. *Exp Parasitol* 81: 182-190.
- Leclerc, M.C., Hugot, J.P., Durand, P., and Renaud, F. 2004. Evolutionary relationships between 15 Plasmodium species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitol* 129: 677-84.
- Lewison, G., and Srivastava, D. 2008. Malaria research , 1980-2004, and the burden of disease. *Acta Trop* 106; 96-103.
- Luxemburger, C., Thwai, K.L., White, N.J., Webster, H.K., Kyle, D.E., Maelankirri, L., et al. 1996. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 90: 105-111.
- Mackinnon, M.J., Li, J., Mok, S., Kortok, M.M., Marsh, K., Preiser, P.R., and Bozdech, Z. 2009. Comparative Transcriptional and Genomic Analysis of *Plasmodium falciparum* Field Isolates. *Transcriptome of Malaria Parasites* 5: 1-18.
- Maher, S.P., Balu, B., Shoue, D.A., Weissenbach, M.E., and Adams, J.H. 2008. A highly sensitive, PCR-based method for the detection of *Plasmodium falciparum* clones in microtiter plates. *Malaria J* 7: 222.
- Mharakuwa, S., Simoloka, C., Thuma, P.E., Shiff, C.J., and Sullivan, D.J. 2006. PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malaria J* 5:103.
- Marquardt, W.C., and Demaree, R.S. *Parasitology*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Macmillan, 1985.
- Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Newton, P.N., and White, N.J. 2004. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 20: 233-40.
- Militao, Dina N.A., Camargo, Luis M.A., and Katzin, Alejandro M. 1993. Detection of Antigens in the urine of patients with acute Plasmodium vivax malaria. *Exp Parasitol* 76: 115-120.
- Miyake, H., Kim, H.S., Kawai, S., Yamane, A., Kimura, M., and Wataya, Y. 1995. DNA diagnosis of malaria using microtiter plate hybridization. *Nucleic Acids Res* 34: 241-242.
- Mendis, K., Sina, B.J., Marchesini, P., and Carter, R. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64(1-2 Suppl): 97-106.

- Mehta, S.K., Tying, S.K., Gilden, D.H., et al. 2008. *Varicella zoster* virus in the saliva of patients with herpes zoster. *J Infect Dis* 197:654–657.
- Moore, L.R., Fujioka, H., Williams, P.S., et al. 2006. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. *FASEB J* 20: 747-749.
- Mueller, I., Widmer, S., Michel, D., Maraga, S., Mcnamara, D.T., Kiniboro, B., Sie, A., Smith, T.A., and Zimmerman P.A. 2009. High sensitivity detection of *Plasmodium* species reveals positive correlation between infection of different species, shifts in age distribution and reduced local variation in Papua New Guinea. *Malaria J* 8: 41
- Murray, C.T., Gasser, R.A., Magill, A.J., and Miller, R.S., 2008. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev* 21: 97-110.
- Nwakanma, D.C., Gomez-Escobar, N., Walther, M., Crozier, S., Dubovsky, F., Malkin, E., Locke, E., and Conway, D.J. 2009. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva blood and urine. *J Infect Dis* 199: 1567-1574.
- Ndao, M., Bandyayera, E., Kokoskin, E., Gyorkos, T.W., MacLean, J.D., and Ward, B.J. 2004. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 42: 2694-700.
- Nishimoto, Y., Arisue, N., Kawai, S., Escalante, A., Horii, T., Tanabe, K., Hashimoto, T. 2008. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol Phylo and Evol* 47: 45–53.
- Nussenzweig, V., and Nussenzweig, W.S. 1989. Rationale for the development of an engineered sporozite malaria vaccine. *Adv Immunol* 45: 283-334.
- Okamoto, N., Spurck, T.P., Goodman, C.D., and Mcfeadden, G.I. 2009. Apicoplast and Mitochondrion in Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell* 8: 128-132.
- O'Meara, W.P., Hall, B.F., and McKenzie, F.E. 2007. Malaria vaccine efficacy: the difficulty of detecting and diagnosing malaria. *Malaria J* 6: 36.
- Oh, S.S., and Chishti, A.H. 2005. Host receptors in malaria merozoite invasion. *Curr Top Microbiol Immunol* 295: 203-232.



- Palmer, C.J., Lindo, J.F., Klaskala, W.I., Quesada, J.A., Kaminsky, R., Baum, M.K., and Ager, A.L. 1998. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol* 36:203-6.
- Perry, K.R., Brown, D.W., Parry, J.V., Panday, S., Pipkin, C., Richards, A. 1993. Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay. *J Med Virol* 40:235– 240.
- Phensaengngam, W., Harnyuttanakorn, P., and Kanchanakhan, N. 2008. Assessment of knowledge, attitude, and practice regarding malaria prevention towards Karen ethnic group in umpiem mai refugee camp, phobphra district, Tak province. *J Health Res* 22: 195-198.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannis-ter, L., and Jarra, W. 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* 2: 1461-1477.
- Putapornpip, C., Jongwutiwes, S., and Hughes, A.L. 2009. Natural selection maintains a stable polymorphism at the circumsporozoite protein locus of *Plasmodium falciparum* in low endemic area. *Infection, Genetic and Evolution* 9: 567-573.
- Putapornpip, C., Hongsrirung, T., Seethamchai, S., Kobasa, T., Limkittikul, K., Cui, L., and Jongwutiwes, S. 2009. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *J Infect Dis* 199: 1143-1150.
- Qari, S.H., Shi, Y.P., Pieniazek, N.J., Collins, W.E., and Lal, A.A. 1996. Phylogenetic relationship among the malaria parasite based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic Nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Phylo and Evol* 6: 157-165.
- Rich, K.A., George, I.V., F.W., Law, J.L., and Martin, W.J. 1990. Cell-adhesive motif in region II of malaria circumsporozoite protein. *Science* 249: 1574-1577.
- Rich, S.M., and Ayala, F.J., 200. Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6994-7001.

- Reyburn, H., mbakilwa, H., Mwangi, R., Mwerinde, O., et al. 2009. Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomized trial. *Mol Biochem Parasitol* 58: 283-92.
- Rodulfo, H., Donalo, M.d., mora, R., Gonzalez, L., and Contreras, C.E. 2007. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Brazilian J Med and Biol Research* 40: 535-543.
- Rougemont, M., Saanen, M.V., Sahli, R., Hinrikson, H.P., Bille, J., and Jaton K. 2004. Detection of four *Plasmodium* Species in blood from humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J Clin Microbiol* 42;5636-5643.
- Rosenberg, R., and Rungsiwongse, J. 1991. The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg* 45: 574-577.
- Roy, S.W., and Irimia, M., 2008. Origins of Human malaria: rare genomic Changes and Full Mitochondrial genomes Confirm the relationship of *Plasmodium falciparum* to Other mammalian parasites but Complicate the Origins of *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol* 26:1192-1198.
- Sharma, M., and Dash & Aparup Das, A.P. 2010. Evolutionary genetic insights into *Plasmodium falciparum* functional genes. *Parasitol Research* 106: 3.49-355
- Spencer, H.C. 1986. Epidemiology of malaria. *Clin Trop Med Com Dis* 1: 1-28.
- Santos-ciminera, P.D., Roberts, D.R., and Quinnan Jr, G.V. 2007. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the State of Amazonas, Brazil. *Acta Tropica* 102: 38-40.
- Schantz-Dunn, J., and Nour, N.M. 2009. Malaria and Pregnancy: A Global health Perspective. *Reviews in Obstetrics Gynecology* 2: 186-192.
- Sinden, R.E. 2002. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. *Cell Microbiol* 4: 713-724.
- Singh, B., Kim., Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S., Cox-Singh, J., et al. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-24.



- Seesod, N., Nopparat, P., Hedrum, A., Holder, A., Thaitong, S., Uhlen, M., et al. 1997. An integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 56: 322-328.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaitong, S., and Brown, K.N. 1993. 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* 58: 283-92.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jarra, W., Pinheir, L., do Rosario, V.E., Thaitong, S., and Brown, K.N. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 61: 315-20.
- Somboon, P., Aramrattana, A., Lines, J., and Webber, R., 1998. Entomological and epidemiology investigation of malaria transmission in relation to population movements in forest areas of north-west Thailand. *Southeast Asian J trop Med Public Health* 29: 3-9.
- Somboon, P., Walton, C., Sharpe, R.G., et al. 2001. Evidence for a new sibling species of *Anopheles minimus* from the Ryukyu Archipelago, Japan. *J Am Mosq Control Assoc* 17: 98-113.
- Shulman, C.E. and Dorman, E.K. 2003. Importance and prevention of malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 30-5.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., et al. 1997. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoite. *Cell* 90: 511-522.
- Suwonkerd, W., Tsuda, Y., Overgard, H.J., et al. 2004. Changes in malaria vector density over a twenty-three year period in Mae Hong Son Province, northern Thailand. *Southeast Asian J trop Med Public Health* 35: 316-324.
- Suzuki, N., Yoneda, M., Naito, T., et al. 2008. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis. *J Med Microbiol* 57: 1553-1559.
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., and Krudsood, S. 2009. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol* 47: 93-102.

- Thimasarn, K., Jatapadma, S., Vijaykadga, S., Sirichaisinthop, J., and Wongsrichanalai, C. 1995. Epidemiological of Malaria in Thailand. *J Travel Med* 2: 59-65.
- Tjitra, E., Suprianto, S., Dyer, M., Currie, B.J., and Anstey, N.M. 1999. Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v Immunochromatographic Test for Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Patients with a Presumptive Clinical Diagnosis of Malaria in Eastern Indonesia. *J Clin Microbiol* 37:2412-2417.
- Tsuda, Y., Takagi, M., and Suwonkerd, W. 2000. A mark-release recapture study on the spatial distribution of host seeking anophelines in northern Thailand. *J Vector Ecol* 25: 16-22.
- Urban, B.C., and Roberts, D.J. 2003. Inhibition of T cell function during malaria: implications for immunology and vaccinology. *J Exp Med* 197: 137-141.
- Uguen, C., Rabodonirina, M., De Pina, J.J., Vigier, J.P., Martet, G., Maret, M., and Peyron, F. 1995. ParaSight-F rapid manual diagnostic test of *Plasmodium falciparum* infection. *Bull World Health Organ* 73: 643-9.
- Valecha, N., Sharma, V.P., and Devi, C.U. 1998. A rapid immunochromatographic test (ICT) for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30: 257-60.
- Warrell, D.A., Molyneux, M.E., and Beale, P.E. 1990. Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 1-65.
- Waters, A.P. and McCutchan, T.F. 1989. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet* 1: 1343-6.
- Waters, A.P., Higgins, D.G., and McCutchan, T.F. 1993. Evolutionary relatedness of some primate models of *Plasmodium*. *Mol Biol Evol* 10: 914-923.
- Waters, A.P. 1994. The ribosomal RNA genes of *Plasmodium*. *Advances in Parasitology* 34: 33-79.
- Wolf, N.D., Escalante, A.A., Karesh, W.B., Kilbourn, A., Spielman, A., and Lal, A.A. 1998. Wild primate populations in emerging infectious diseases research: the missing link?. *Emerg Infect Dis* 4: 149-58.
- World Health Organization. *A global strategy for malaria control*. Geneva: WHO graphics, 2006.



Ziele, H., and Dvorak, J.A. 2000. Invasion in vitro of mosquito midgut cell by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11516-11521.

Zhou, M., Liu, Q., Wongsrichannalai, C., Suwonkerd, W., Panat, K., Prajakwong, S., et al. 1998. High prevalence of Plasmodium malaria and Plasmodium ovale in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orangstaining and PCR-based diasnoses. *Trop Med Int Public Health* 3: 304-312.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก

## การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1 g.
Double distilled water	800.0 ml.

ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH= 8.0 และ ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร ด้วย Double distilled water นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

## การเตรียม loading dye (Gel-loading buffer,6x buffer type II)

Bromophenol blue	0.25 g.
Xylene cyano FF	0.25 g.
Ficoll (type 400; Phamacia)	15.00 g.

ละลายใน double distilled water ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 ml.

## การเตรียม Marker

DNA marker	20 $\mu$ l.
Dye	80 $\mu$ l.
TE buffer	360 $\mu$ l.

## การเตรียม TBE buffer,pH 8.3 (10X)

Tri base	108 g.
Boric acid	55g.
Na <sub>2</sub> EDTA	7.4 g

ละลายใน double distilled water ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 ml.

## การย้อมสียิมซ่า

## สารเคมีที่ใช้

สียิมซ่า สำเร็จรูป (Merck Cat.no. 1.09204.0500)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sodium dihydrogen orthophosphate,BDH Product No.30132)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(Dihydrogen orthophosphate,UNIVAR No.0711020)

Absolute methanol alcohol (Merck Cat.no.6009 2500)

### การเตรียม Solution I,II

Solution I : ชั่ง  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.92 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

(สารละลายที่ได้มีฤทธิ์เป็นกรด)

Solution II : ชั่ง  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

(สารละลายที่ได้มีฤทธิ์เป็นด่าง)

### อัตราส่วนระหว่าง Solution I : Solution II : สียิมซ่า

Solution I : Solution II : สียิมซ่า

1 ส่วน : 9 ส่วน : 1 ส่วน หรือ 4 : 36 : 4 (ml)

ขั้นตอนการย้อมสไลด์เลือดด้วยสียิมซ่าสำเร็จรูป

1. Fix พิล์มเลือดด้วย Absolute methanol alcohol นาน 2 นาที เป่าให้แห้งสนิท หรือทิ้งไว้ให้แห้งสนิท ก่อนนำมาย้อมด้วยสียิมซ่า
2. ผสม Solution I: Solution II: สียิมซ่าตามอัตราส่วน ผสมให้เข้ากันก่อนนำมาใช้ (ขั้นตอนนี้ไม่ควรเตรียมส่วนผสมไว้ล่วงหน้า เมื่อจะใช้ให้เตรียมเป็นครั้ง ๆ และไม่ควรมานำมาย้อมซ้ำอีก)
3. นำส่วนผสมที่ได้ในข้อ 2. มาหยดบนแผ่นฟิล์มเลือดให้ทั่ว โดยฟิล์มเลือดหนาใช้เวลา 15 นาที และฟิล์มเลือดบางใช้เวลา 30 นาที
4. ล้างด้วยน้ำแรง ๆ ประมาณ 5 วินาที เป่าหรือตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภัทรกร บุษผั่น เกิดวันที่ 7 เดือนเมษายน พ.ศ. 2527 ที่ ตำบลหัวตะพาน  
อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาปลายจาก  
โรงเรียนพรหมคีรีพิทยาคม จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อปี พ.ศ.2549 สำเร็จการศึกษาระดับ  
ปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัย  
ทักษิณ จังหวัดสงขลา และในปี พ.ศ.2551 เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย