

รายงานการวิจัย

งานวิจัยเรื่อง

“การประยุกต์วิธีการวินิจฉัยมาลาเรียจากตัวอย่างปัสสาวะและน้ำลายเพื่อประเมินสถานะของโรค
มาลาเรียในเชิงระบาดวิทยา”

“Application of noninvasive malaria diagnosis using urine and saliva samples for
epidemiological assessment”

หน่วยงานวิจัย

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพิทย

ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิวาศย์

อ.ดร. สุนีย์ สีธรรมใจ

ดร.วรรณภา สุวรรณเกิด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ป่วยทุกท่านที่อุทิศเวลาและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน
เจ้าหน้าที่ สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง และหน่วยงานทุกแห่ง ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ จนทำให้งานวิจัยชิ้น
นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ นางสาวอุรุษยา พัฒนวงศ์ นายภัทกร บุษผั่น นางสาวรัตนดิพร โกสุวินทร์ และ
นางสาวนภาพร กวมทรัพย์ ในการช่วยงานการวิจัย และขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุน
ทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2556

บทคัดย่อ

การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย ได้อย่างถูกต้องและการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่มีความไวสูงนับเป็นพื้นฐานอันสำคัญในการรักษาและควบคุมโรคมาลาเรียซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งของมนุษยชาติ โดยทั่วไปการวินิจฉัยโรคมาลาเรียอาศัยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตที่ผ่านการย้อมสีิมซาอันทำให้การรักษาโรคเป็นไปได้โดยมีประสิทธิภาพในเวชปฏิบัติทั่วไป อย่างไรก็ตามมีผู้ติดเชื้อมาลาเรียหลายรายที่มีปริมาณเชื้อในกระแสเลือดต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นจึงมีผู้ติดเชื้อจำนวนมากที่ยังประสบปัญหาความเจ็บป่วยและอาจเสียชีวิตได้รวมทั้งยังเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจร่วมด้วย นอกจากนี้การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียในฟิล์มโลหิตอาจพบลักษณะเชื้อที่ไม่จำเพาะชัดเจนทำให้การวินิจฉัยดังกล่าวขาดความแม่นยำนอกเหนือไปจากปัจจัยในด้านความแตกต่างในทักษะและความสามารถของจุลทรรศนกร ในภายหลังจากการพัฒนาการตรวจหาและจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ทำให้สามารถวินิจฉัยมาลาเรียได้โดยปราศจากอุปสรรคที่พบในการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การประยุกต์ใช้วิธี PCR ในการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียนั้นยังเป็นการสร้างโอกาสให้มีการใช้ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะในการเป็นแหล่งดีเอ็นเอทางเลือกสำหรับการตรวจดังกล่าวแม้ว่าความไวในการวินิจฉัยยังด้อยกว่าผลที่ได้จากการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจและจำแนกมาลาเรียทั้ง ๕ ชนิดที่ก่อโรคในคน โดยอาศัยชิ้นเป้าหมายคือ ไซโตโครมอีอกซิเดสหน่วยย่อยที่ ๑ (PCR-COXI) ไซโตโครมอีอกซิเดสหน่วยย่อยที่ ๓ (PCR-COXIII และ PCR-COXIII-3') และไซโตโครมบี (PCR-Cytb-New) ในจีโนมของไมโตคอนเดรีย จากการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบพบว่า PCR-Cytb-New มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยได้ทัดเทียมกับ PCR-Cytb ที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนามาก่อนหน้านี้ เพื่อเป็นการพัฒนาความไวและประเมินประสิทธิภาพของการใช้ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะในการวินิจฉัยโรคมาลาเรีย คณะผู้วิจัยได้รวบรวมผู้ป่วยที่มีไข้ที่มารับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย ณ มาลาเรียคลินิกในพื้นที่จังหวัดตาก เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และจันทบุรีในการศึกษาครั้งนี้ ผลการตรวจวินิจฉัยโดยกล้องจุลทรรศน์พบผู้ที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ๑๑๐ ราย ผู้ที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ๑๒๘ รายและมีผู้ติดเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน ๓ ราย เมื่อทำการเพิ่มปริมาณตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะเป็น ๒๐๐ ไมโครลิตรในการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการตรวจโดยวิธี PCR-Cytb พบว่าตัวอย่างเลือดให้ผลการตรวจจำแนกชนิดของมาลาเรียอย่างชัดเจนและสามารถตรวจพบมาลาเรียทั้ง ๕ ชนิดในประชากรที่ศึกษาและพบผู้ติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันเพิ่มขึ้นเป็น ๑๑ ราย ในขณะที่ผลการตรวจโดยใช้ตัวอย่างน้ำลายให้ความไวสูงกว่าผลการตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม และพลาสโมเดียมไวแวกซ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เล็กน้อย แม้ว่าผลการตรวจโดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะจะมีความไวต่ำกว่าผลการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แต่ความแตกต่างดังกล่าวมีเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่น่าจะเป็นอุปสรรคต่อการใช้ตัวอย่างปัสสาวะในการเป็นแหล่งดีเอ็นเอทางเลือกสำหรับการตรวจวินิจฉัย โดยวิธีการทางอณูชีววิทยา นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะยังสามารถใช้ตรวจความหลากหลายในรูปแบบอัลลีลของยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอइटชนิดที่ ๒ ของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอร์

โรซอด้ชนิดที่ ๑ ของเชื้อพลาสมาโมเดียมไวแวกซ์ ซึ่งพบว่าอัลลีลในกลุ่ม 3D7 ของยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอด้ชนิดที่ ๒ อัลลีล Sal-1/Belem type b ของยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอด้ชนิดที่ ๑ มีอุบัติการณ์สูงสุดในประชากรที่ศึกษา แม้ว่าการตรวจสอบอัลลีลเหล่านี้จากตัวอย่างปัสสาวะจะให้ผลดี้อยกว่าการตรวจจากตัวอย่างเลือดประมาณร้อยละ ๓๐ และร้อยละ ๖๐ ตามลำดับแต่พบว่าผลการตรวจสอบการกระจายของอัลลีลในประชากรที่ศึกษามีความสอดคล้องกันชัดเจน ไม่ว่าจะใช้ตัวอย่างใดก็ตาม ในการติดตามผู้ติดเชื้อพลาสมาโมเดียมฟัลซิพารัมจำนวน ๑๗ รายและพลาสมาโมเดียมไวแวกซ์จำนวน ๑๘ รายพบว่าไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของมาลาเรียได้ในตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะในวันที่ ๗ ๑๔ ๒๑ และ ๒๘ ยกเว้นมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อพลาสมาโมเดียมฟัลซิพารัม ๒ รายที่ยังคงให้ผลลบในการตรวจโดยใช้ตัวอย่างเลือดในวันที่ ๗ ทั้งนี้ผลดังกล่าวน่าจะเกิดจากการที่ดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ช้ากว่าปกติในผู้ติดเชื้อเหล่านี้เนื่องจากตัวอย่างในภายหลังวันที่ ๗ ส่วนให้ผลการตรวจเป็นลบทั้งที่ผู้ติดเชื้อเหล่านี้ไม่ได้รับยาต้านมาลาเรียเพิ่มเติมอีกเลย โดยสรุปจากการศึกษานี้พบว่า การเพิ่มปริมาณของตัวอย่างส่งตรวจทำให้สามารถใช้ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะเพื่อเป็นแหล่งดีเอ็นเอทางเลือกสำหรับการตรวจโดยวิธี PCR ที่มีความไวสูงสำหรับการวินิจฉัยและจำแนกมาลาเรียทั้ง ๕ ชนิดที่ก่อโรคในคนรวมทั้งสามารถตรวจสอบการกระจายของรูปแบบอัลลีลของยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย อย่างไรก็ตามการประเมินวิธีการที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้โดยใช้ตัวอย่างจำนวนมากขึ้นนับเป็นสิ่งจำเป็นก่อนการนำไปประยุกต์ในเวชปฏิบัติซึ่งจะนำมาซึ่งวิธีการวินิจฉัยโรคมาลาเรียแนวใหม่ที่ไม่ต้องทำการเจาะเลือดจากผู้ป่วยอีกต่อไป

Abstract

Accurate species identification and sensitive detection of malaria parasites are the foundation of treatment and control of malaria, one of the most important infectious diseases of mankind. Microscopy detection with giemsa-stained blood films has been widely deployed for malaria diagnosis, enabling effective management in general clinical practice. However, a number of malaria-infected individuals may harbor low number of parasites in their circulation that could escape conventional microscopy detection threshold; thereby, a considerable number of malaria-related morbidity and mortality as well economic loss could ensue. Furthermore, morphological detection of malaria parasites in blood smears may not unambiguously and accurately identify malaria species besides a considerable variation in competency of microscopists. The advent of polymerase chain reaction (PCR)-based detection and speciation of malaria parasites in blood samples has circumvented limitation of microscopy detection. Importantly, application of PCR-based method has provided a possibility of using saliva and urine samples as alternative DNA sources for malaria diagnosis although the sensitivity remains inferior to that of conventional microscopy detection. Herein, we have devised PCR-based method for detection and identification of all five human malaria species targeting genes encoding cytochrome oxidase subunit I (PCR-COXI), cytochrome oxidase subunit III (PCR-COXIII and PCR-COXIII-3') and cytochrome b (PCR-Cytb-New) of the mitochondrial genome. Comparative analysis has revealed that PCR-Cytb-New confers comparable diagnostic performance with PCR-Cytb previously developed by us. To assess and improve diagnostic sensitivity of using saliva and urine samples for malaria diagnosis, 502 febrile individuals who attended malaria clinics in Tak, Chiangmai, Chiangrai, Mae Hong Sorn and Chantaburi Provinces were recruited in this study. Of these, microscopy could detect 110 *Plasmodium falciparum*, 128 *P. vivax* and 3 co-infections of both species. By increasing volume of blood, saliva and urine samples to 200 μ l for DNA template preparation, PCR-Cytb from blood samples could clearly identify all five malaria species and 11 cases with mixed species infections whereas results from saliva samples yielded slightly more sensitive detection of *P. falciparum* and *P. vivax* than microscopy. Although PCR results from urine samples were less sensitive than that from microscopy, the difference seems to be trivial that may not preclude using urine as an alternative DNA source for molecular diagnosis. Meanwhile, saliva and urine samples could be used to detect allelic diversity in the merozoite surface protein 2 locus of *P. falciparum* (*PfMsp2*) and the merozoite surface protein 1 locus of *P. vivax* (*PvMsp1*) in which 3D7 family of the former and Sal-1/Belem type b of the latter predominate in this study population. Despite the fact that allele typing of these loci using saliva and urine samples offered approximately 30% and 65%, respectively, less sensitive than using blood samples, allelic distribution of these loci in the study population was remarkably concordant regardless of the sources of

samples used. Follow-up study of 17 *P.falciparum*-infected patients and 18 *P.vivax*-infected patients has shown that malarial DNA could not be detected in blood, saliva and urine samples of these patients on day 7, 14, 21 and 28 except two positive PCR results from blood samples on day 7 obtained from patients infected with *P.falciparum*. It is likely that delayed clearance of malarial DNA occurred in these patients because subsequent negative PCR results were observed without additional antimalarial drug administration. Taken together, using a sensitive PCR detection and increasing volume of clinical samples enables saliva and urine samples be deployed as alternative DNA sources for diagnosing all five human malaria species as well as for determination of allelic distribution of malaria vaccine candidate genes. Further assessment of the methods described herein by recruiting larger scale of sample size will be required prior to general clinical implementation that will lead to novel non-invasive malaria diagnosis.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
สารบัญเรื่อง	vii
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	x
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	6
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	18
วิจารณ์ผลการวิจัย	45
สรุปผลการวิจัย	52
ข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม	53
ประวัตินักวิจัยและคณะ	60

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นที่ศึกษาและลักษณะประชากรในแต่ละพื้นที่	18
ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์ม โลหิตจำแนกตามพื้นที่	21
ตารางที่ 3 อัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงหรือความหนาแน่นของเชื้อในตัวอย่างที่ศึกษาจำแนกตามพื้นที่	22
ตารางที่ 4 แสดงสถานะ PCR สำหรับจำแนกชนิดของมาลาเรีย 5 ชนิดที่ใช้เปรียบเทียบ แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	26
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความไวของ PCR แต่ละแบบในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย	27
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความจำเพาะของ PCR แต่ละแบบในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย	28
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคู่เบส น้ำหนักโมเลกุล และจำนวนชุดของ mitochondrial genome สำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด	28
ตารางที่ 8 เปรียบเทียบ ประสิทธิภาพในการเตรียม DNA ในตัวอย่างต่าง ๆ โดยใช้ชุดสกัด DNA ต่างกัน	29
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างเลือด (B) น้ำลาย (S) และปัสสาวะ (U) โดยใช้ชุดสกัด Qiagen DNA minikit ที่ใช้เลือด 20 µl กับ การตรวจวินิจฉัยจากฟิล์ม โลหิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากฟิล์ม โลหิตเป็นมาตรฐาน	31
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างเลือด (B) น้ำลาย (S) และปัสสาวะ (U) โดยใช้ชุดสกัด Qiagen DNA minikit ที่ใช้เลือด 200 µl กับ การตรวจวินิจฉัยจากฟิล์ม โลหิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์	32
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างเลือดที่เตรียม โดยใช้ปริมาณต่างกัน	33
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างน้ำลายที่เตรียม โดยใช้ปริมาณต่างกัน	34
ตารางที่ 13 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างปัสสาวะที่เตรียม โดยใช้ปริมาณต่างกัน	35
ตารางที่ 14 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่าง	35
ตารางที่ 15 ความไวของชุด primer ที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR ของยีน <i>PfMsp2</i>	38
ตารางที่ 16 การกระจาย haplotype ของ <i>PfMsp2</i> จากตัวอย่างที่ตรวจพบ <i>Plasmodium falciparum</i>	39
ตารางที่ 17 รูปแบบอัลลีลในบริเวณ block 6 ของยีน <i>PvMsp-1</i> จากตัวอย่างที่ทราบอัลลีลแล้ว	41
ตารางที่ 18 ความไวของชุด primer ที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR ของยีน <i>PvMsp1</i>	43

ตารางที่ 19 การกระจาย haplotype ของ <i>PvMsp1</i> จากตัวอย่างที่ตรวจพบ <i>Plasmodium vivax</i>	44
ตารางที่ 20 การกระจาย haplotype ของ <i>PvMsp1</i> จากตัวอย่างที่ตรวจพบ <i>Plasmodium vivax</i> ในตอมน้ำลายขุง	44

สารบัญญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของยีน merozoite surface protein 2 ของ <i>Plasmodium falciparum</i> และตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการทำ PCR ซึ่งจำแนกเป็น 3D7 และ FC27 families	15
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของยีน <i>Plasmodium vivax</i> merozoite surface protein 1 (<i>PvMsp1</i>) บริเวณ conserved block แสดงด้วย block สีขาว ส่วน variable block แสดงด้วย block สีดำ ตำแหน่งของ block แสดงไว้ทางด้านบนของภาพ โครงสร้างยีน (b) แสดงบริเวณของยีนเป้าหมายที่รวมทั้งตำแหน่งของ primer ที่ใช้ทำ PCR ภาพลูกศรใต้ภาพ โครงสร้างของยีนแสดงทิศทางของ primers (B5F, B7R, B6F, B6R, S6F และ S6R)	17
ภาพที่ 3 เชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium falciparum</i> จากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดบาง ระยะ gametocyte	19
ภาพที่ 4 เชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium vivax</i> จากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดบาง ระยะ growing trophozoite	20
ภาพที่ 5 การติดเชื่อร่วมกันของมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium falciparum</i> และ <i>Plasmodium vivax</i> จากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดหนา (A) growing trophozoite ของ <i>Plasmodium vivax</i> (B) ระยะ late schizont ของ <i>Plasmodium falciparum</i> และ (C) ระยะ ring form	20
ภาพที่ 6 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit III ของเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium malariae</i> (Pm), <i>Plasmodium ovale</i> (Po), <i>Plasmodium vivax</i> (Pv), <i>Plasmodium knowlesi</i> (Pk) และ <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน	23
ภาพที่ 7 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit III ของเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium malariae</i> (Pm), <i>Plasmodium ovale</i> (Po), <i>Plasmodium vivax</i> (Pv), <i>Plasmodium knowlesi</i> (Pk) และ <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน	24
ภาพที่ 8 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome b ของ <i>Plasmodium malariae</i> (Pm), <i>Plasmodium ovale</i> (Po), <i>Plasmodium vivax</i> (Pv), <i>Plasmodium knowlesi</i> (Pk) และ <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน	24
ภาพที่ 9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit III ในส่วน 3' ของยีนของเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium malariae</i> (Pm), <i>Plasmodium ovale</i> (Po), <i>Plasmodium vivax</i> (Pv), <i>Plasmodium knowlesi</i> (Pk) และ <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน	25

- ภาพที่ 10 แสดงการทดสอบความจำเพาะของ primer ชุด 3D7F/3D7R ที่ให้ผลผลิต PCR บวกของยีน *PfMsp2* ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ใน 2 % agarose gel แถวที่ 1-5 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล 3D7 ส่วนแถวที่ 6-10 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล FC27 M คือ molecular weight marker และ N คือ negative control 37
- ภาพที่ 11 แสดงการทดสอบความจำเพาะของ primer ชุด FC27F/FC27R ที่ให้ผลผลิต PCR บวกของยีน *PfMsp2* ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ใน 2 % agarose gel แถวที่ 1-5 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล 3D7 ส่วนแถวที่ 6-10 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล FC27 M คือ molecular weight marker และ N คือ negative control 37
- ภาพที่ 12 agarose gel electrophoresis แสดงการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer FMSP2F/ FMSP2R แถวที่ 1-9 แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จำนวน copy ของยีน *PfMsp2* ที่ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 5 copies ตามลำดับ M คือ molecular weight marker และ N คือ negative control 38
- ภาพที่ 13 แสดงความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทำ haplotyping ในบริเวณ block 6a และ 6b ของยีน *PvMsp1* ภาพ agarose gel แสดงให้เห็นผลบวกของผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ชุด primer B6F/B6R แถวที่ 1, 3 และ 5 ชุด primer S6F/B6R แถวที่ 2, 4 และ 6 ชุด primer S6F/S6R แถวที่ 7, 9 และ 11 และชุด primer B6F/B6R แถวที่ 8, 10 และ 12 สำหรับ DNA template คือ แถวที่ 1-2 เท่ากับ Belem + Sal-1 แถวที่ 3-4 เท่ากับ Belem + Sal-1 + T064 แถวที่ 5-6 เท่ากับ Belem + Sal-1 + To64 + TF127 แถวที่ 7-8 เท่ากับ Belem + Sal-1 แถวที่ 11-12 เท่ากับ Belem + Sal-1 + TE26 + T107 M คือ molecular weight marker N คือ negative control 41
- ภาพที่ 14 agarose gel electrophoresis แสดงความไวของการทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer PVF/PVR แถวที่ 1-9 แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จำนวน copy ของยีน *PvMsp1* ที่ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 5 copies ตามลำดับ M คือ molecular weight marker 42

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

PCR	=	Polymerase chain reaction
DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNA	=	ribonucleic acid
SSU rRNA	=	small subunit ribosomal RNA
A	=	adenine
T	=	thymine
G	=	guanine
C	=	cytosine
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	=	deoxyadeninosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
PCR	=	polymerase chain reaction
T _m	=	melting temperature
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
ddH ₂ O	=	double distilled water
bp	=	base pair
cm	=	centrimetre
kb	=	kilobases
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
spp.	=	species
UV	=	ultraviolet
°C	=	degree celsius

%	=	percent
λ	=	lambda
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetate
KCl	=	potassium chloride
MgCl ₂	=	magnesium chloride
PBS	=	phosphate buffer saline

1. บทนำ

โรคมalariaเรื้อรังยังเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและการตายที่สำคัญของประชากรโลกประมาณว่าเกือบ 1 ใน 10 ของประชากรมีเชื้อมาลาเรียอยู่ในกระแสเลือด (Hay et al, 2004) แม้ว่าตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาจะมีมาตรการต่าง ๆ ในการควบคุมและป้องกันโรคมalariaเรื้อรังตลอดจนการใช้งบประมาณจำนวนมากในกิจกรรมดังกล่าว อย่างไรก็ตามสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้การควบคุมโรคมalariaเรื้อรังไม่สามารถดำเนินการให้บรรลุผลตามเป้าหมายคือ การที่เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* มีการติดต่อทางด้านมาลาเรียหลายชนิด โดยสายพันธุ์ที่ติดต่อทางด้านมาลาเรียมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก และยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรคมalariaเรื้อรังติดต่อมายังแมลงที่เคยใช้ได้ผลดีในอดีต นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านเศรษฐกิจสังคม และการเมืองเข้ามาเกี่ยวข้อง (Phillips, 2001)

การติดเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติในคนมีสาเหตุมาจากเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi* ซึ่งมาลาเรียชนิดที่ 5 เป็นเชื้อมาลาเรียของลิงมาแควที่พบทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และสามารถติดต่อสู่คนได้ ทั้งนี้ประเทศไทยพบเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิดที่ก่อโรคในคน โดย *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของโรค ซึ่งในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ทั่วโลกประมาณ 300-500 ล้านคน ทั้งนี้ในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ประมาณ 1 ล้านคนซึ่งส่วนใหญ่เป็นเด็กในทวีปแอฟริกา (Hay et al, 2004) ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* นั้นมีการกระจายทางภูมิศาสตร์กว้างขวางที่สุด ในแต่ละปีมีประชากรโลกติดเชื้อนี้ราว 80-130 ล้านคน และส่วนใหญ่เป็นประชากรในทวีปเอเชียและอเมริกาใต้ (Price, 2007) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียที่มีต้นกำเนิดจากลิงยังสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้และพบว่าเป็นปัญหาสำคัญในเขตปรากฏโรคบางแห่ง ดังเช่น การพบการระบาดของมาลาเรียจากการติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* มากกว่าครึ่งหนึ่งเกิดจากเชื้อมาลาเรียชนิดนี้นับบนเกาะบอร์เนียว (Singh et al, 2004) และพบการติดเชื้อได้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทยได้ทุกภูมิภาคในอัตราที่ต่ำ (Jongwutiwes et al, 2004, 2011; Putaporn et al, 2009) และยังมีรายงานพบผู้ป่วยในประเทศจีนตอนใต้ ฟิลิปปินส์ สิงคโปร์ และผู้ป่วยต่างชาติอีกหลายรายที่เดินทางมาในประเทศมาเลเซียและได้รับเชื้อกลับไป (Bronner et al, 2009; Kantele et al, 2008; Ng et al, 2008; Luchavez et al, 2008; Zhu et al, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* อาจมีอาการรุนแรงจนเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ (Cox-Singh et al, 2008) การติดเชื้อมาลาเรียนอกจากจะส่งผลต่อชีวิตและสุขภาพของผู้ติดเชื้อโดยตรงแล้วยังส่งผลต่อทารกที่คลอดจากสตรีที่ติดเชื้อมาลาเรียขณะตั้งครรภ์ทำให้มีน้ำหนักแรกเกิดต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน และเป็นสาเหตุหนึ่งของการตายในทารกแรกเกิด อนึ่งโรคมalariaเรื้อรังก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการสูญเสียเวลาทำงานเนื่องจากการเจ็บป่วยตลอดจนค่าใช้จ่ายในการรักษาโรค (Shulman and Dorman, 2003)

เนื่องจากอาการของโรคมalariaเรื้อรังคล้ายกับการติดเชื้ออื่นๆ หลายโรค ดังนั้นการวินิจฉัยโรคมalariaเรื้อรังต้องอาศัยการตรวจหาเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อทางห้องปฏิบัติการ การวินิจฉัยโรคมalariaเรื้อรังที่ถูกต้องรวดเร็วเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการลดอัตราการเสียชีวิต การควบคุมและการป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ การวินิจฉัยโรคมalariaเรื้อรังทางห้องปฏิบัติการหรือในภาคสนามในเขตปรากฏโรคมalariaเรื้อรัง สามารถกระทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่มีประโยชน์ รวดเร็ว และประหยัด คือการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดบาง (thin blood film) และฟิล์มโลหิตชนิดหนา (thick blood film) ที่ผ่านการย้อมสี Giemsa ซึ่งการตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดหนามีความไวสูงกว่าชนิด

บางประมาณ 3-5 เท่า แม้ว่าการศึกษาเชื้อจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาจะให้ผลการตรวจที่มีความไวสูงกว่าการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดบาง แต่ความสามารถในการแยก species ของมาลาเรียยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่มีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด ดังเช่นรายงานสถานการณ์ไข้มาลาเรียประจำปีของกองมาลาเรียซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากผลการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาเพียงวิธีเดียว โดยผู้ที่ผ่านการฝึกอบรมและมีประสบการณ์ อย่างไรก็ตามในการดำเนินการดังกล่าวไม่เคยตรวจพบ *Plasmodium ovale* เลยตลอดจนการตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดมีเพียงไม่กี่รายละ 2 นอกจากนี้ยังเป็นการยากหรือวินิจฉัยไม่ได้สำหรับการตรวจพบ *Plasmodium knowlesi* จากฟิล์มโลหิตทั้งชนิดหนาและบาง อย่างไรก็ตามผู้ติดเชื้อต้องมีปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตสูงกว่าขีดจำกัดที่สามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กล่าวคือ ปริมาณเชื้อในกระแสเลือดมักต้องไม่ต่ำกว่า 50-100 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร จึงจะตรวจพบได้ (Gilles and Warrell, 1993) ซึ่งในธรรมชาติของการติดเชื้อมาลาเรียนั้นปริมาณเชื้อในผู้ป่วยมักมีความแตกต่างกันและมีผู้ป่วยจำนวนมากที่มีเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดในปริมาณที่ต่ำซึ่งอาจเป็นผลจากการได้รับยาต้านมาลาเรียอย่างไม่ถูกต้องทำให้ปริมาณเชื้อในร่างกายอาจลดลงระดับหนึ่งแต่ไม่หายไปทั้งหมด หรือจากการที่เชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่หลบซ่อนอยู่ในหลอดเลือดดำขนาดเล็กในอวัยวะภายใน (visceral blood) ซึ่งพบในกรณีของการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* (Miller et al, 2002) รวมทั้งยังอาจพบได้ในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบางส่วนต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (partial immunity) เช่น จากการศึกษาโดยใช้แค่การตรวจโดยใช้หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) ที่สามารถแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรจังหวัดตราดในปี พ.ศ. 2536 พบว่าร้อยละ 25 ของผู้ที่มีผลการตรวจจากฟิล์มโลหิตเป็นลบแต่กลับให้ผลบวกจากการตรวจโดยวิธี PCR เป็นต้น (Snounou et al, 1993a, 1993b) ผลกระทบจากการตรวจไม่พบผู้ติดเชื้อที่มีปริมาณเชื้อในกระแสโลหิตในระดับต่ำนอกจากจะทำให้การประเมินสถานการณ์ของการควบคุมโรคผิดพลาดแล้ว ยังส่งผลให้กลุ่มผู้ติดเชื้อดังกล่าวมีโอกาสเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อไป

ลักษณะประการหนึ่งของการติดเชื้อมาลาเรียที่มีความสำคัญอย่างยิ่งคือ การที่ผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันดังกล่าวข้างต้น ซึ่งพบได้แม้ในบริเวณที่มีการแพร่กระจายของโรคในระดับต่ำ (hypoendemic area) และเป็นการยากต่อการวินิจฉัยการติดเชื้อร่วมกันโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ในบางระยะที่พบได้จากการตรวจจากฟิล์มเลือด ทำให้การวินิจฉัยภาวะดังกล่าวอยู่ในระดับต่ำกว่าร้อยละ 2 (Snounou and White, 2004) แต่การตรวจโดยใช้ PCR ทำให้ทราบว่าภาวะการติดเชื้อร่วมกันมีอุบัติการณ์ที่สูงกว่าที่ประเมินได้จากการตรวจจากฟิล์มเลือด ซึ่งในพื้นที่บางแห่งอาจพบสูงถึงร้อยละ 65 (Mayxay et al, 2004) อันเนื่องจากการติดตามผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ภายหลังจากการรักษาผู้ป่วยโดยไม่ได้รับเชื้อใหม่ในระยะเวลาดังกล่าว พบว่าผู้ป่วยประมาณร้อยละ 30 กลับมีอาการไข้มาลาเรียจาก *Plasmodium vivax* (Looareesuwan et al, 1987) และในทางตรงข้ามพบว่าประมาณร้อยละ 10 ของผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ *Plasmodium vivax* กลับมีอาการของโรคมาลาเรียซ้ำ โดยตรวจพบ *Plasmodium falciparum* ในภายหลัง (Mayxay et al, 2001; Siripoon et al, 2002) ดังนั้นถ้าการรักษามาลาเรียไม่ได้กำจัดเชื้อชนิดซ่อนเร้นอยู่นอกจากจะทำให้ระยะเวลาในการเจ็บป่วยยาวนานขึ้นแล้ว เชื้อมาลาเรียชนิดที่ไม่ได้รับการรักษายังมีโอกาสได้รับอิทธิพลการคัดเลือกสายพันธุ์โดยยาที่มีผลบางส่วนในการทำลายเชื้อ อันอาจส่งเสริมให้เกิดการดื้อยาด้านมาลาเรียเพิ่มมากขึ้น

สำหรับการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียโดยการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปโดยใช้หลักการ immuno-chromatographic test เช่น ParaSight™-F dipstick test, ICT Malaria Pf Test™ เป็นการตรวจหา histidine-rich protein 2 หรือ OptiMAL™ เพื่อตรวจหา lactate dehydrogenase ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย (Uguen et al, 1995; Valcha et al, 1998; Ndao et al, 2004) แม้ว่าชุดตรวจดังกล่าวจะมีความสะดวกในการใช้โดยไม่ต้องอาศัยประสบการณ์หรือทักษะพิเศษ และสามารถลดระยะเวลาในการวินิจฉัยอย่างมาก แต่ความไวในการตรวจยังไม่ต่างจากผลที่ได้โดยการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาอย่างมีนัยสำคัญ ในกรณีที่มิเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตต่ำกว่า 500 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ผลของความไวและความจำเพาะจะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 60-70 เท่านั้น (Fryauff et al, 2000) หรือในการศึกษาบางครั้งพบว่าวิธี ICT และ OptiMAL มีความไวเพียงร้อยละ 30-40 ในขณะที่มีความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อใช้วิธี PCR เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ (gold standard) (Ndao et al, 2004) โดยความจำเพาะของผลการตรวจยังจำกัดเฉพาะ *Plasmodium falciparum* แม้ว่าชุดตรวจดังกล่าวได้มีการพัฒนาสำหรับ *Plasmodium vivax* แต่ประสิทธิภาพยังไม่สามารถช่วยในการวินิจฉัยได้ดีทัดเทียมกับวิธีการตรวจอื่นใด (Coleman et al, 2002) นอกจากนี้ชุดตรวจสำเร็จรูปยังมีราคาแพงจึงไม่เหมาะสมในการให้บริการทั่วไปในการตรวจคัดกรอง แม้ว่าในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียโดยอาศัยชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อขจัดปัญหาความผิดพลาดจากการดูเชื้อมาตรฐานที่ด้อยลงจากรศกษณ์ที่ต้องอาศัยทักษะและเวลาในการตรวจซึ่งมีความแตกต่างกันตามปัจเจกบุคคล สำหรับหลักการของชุดตรวจคือการหาโปรตีนหรือเอ็นไซม์บางชนิดของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในกระแสโลหิตของผู้ที่ติดเชื้อ เช่น histidine-rich protein 2, aldolase และ lactate dehydrogenase เป็นต้น เนื่องจากโปรตีนหรือเอ็นไซม์ดังกล่าวถูกสร้างจากเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิต ดังนั้นการตรวจโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปจึงให้ผลบวกในขณะที่ผู้ป่วยมีเชื้ออยู่ในร่างกาย อย่างไรก็ตามภายหลังจากเชื้อได้ถูกกำจัดไปแล้วการตรวจด้วยวิธีนี้ยังคงให้ผลบวกติดต่อกันอีกหลายสัปดาห์ แม้ว่าการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจดังกล่าวพบว่าให้ผลการตรวจที่มีความไวทัดเทียมกับวิธีการตรวจหาเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยตรงจากฟิล์มโลหิต แต่ชุดตรวจที่มีในปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการตรวจหา *Plasmodium vivax* และเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ และการตรวจยังให้ผลต่ำกว่าการตรวจโดยใช้ PCR นอกจากนี้ยังมีปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพของชุดตรวจ การเก็บรักษา และอายุการใช้งานที่จำกัด

การวินิจฉัยโดยวิธี PCR ที่มีผู้พัฒนาขึ้นสำหรับวินิจฉัยชนิดของมาลาเรียโดยการเพิ่มปริมาณของ DNA จากยีนสำหรับ small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) ทั้งนี้ยีนดังกล่าวมีส่วนของลำดับ DNA ที่แตกต่างกันไปและมีความจำเพาะต่อ species ของมาลาเรีย (Waters and McCutchan, 1989) ดังนั้นยีน SSU rRNA จึงเหมาะสมต่อการวินิจฉัยโดยวิธี PCR (Snounou et al, 1993a; 1993b; Kimura et al, 1997; Kawamoto et al, 2002; Kho et al, 2003; Rubio et al, 1999) จากการเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียพบว่าวิธี PCR ให้ผลการตรวจที่ไวกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดหนา 1.23 เท่า และมีความจำเพาะมากกว่า 1.41 เท่า (Snounou et al, 1993a) อย่างไรก็ตามปัญหาและอุปสรรคของการใช้ยีน SSU rRNA เป็นยีนเป้าหมายคือยีนนี้มีจำนวนชุดของยีนประมาณ 3-5 copy ต่อเซลล์ ดังนั้นความไวในการวินิจฉัยอาจยังไม่ดีมากในกรณีที่ผู้ป่วยมีปริมาณเชื้อในระดับต่ำมาก ๆ และยีนนี้ยังมีได้หลายรูปแบบคือ A-type, S-type และ O-type (Nishimoto et al, 2008) ทำให้สามารถเกิด in vitro recombination ในระหว่างปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีผลต่อการเกิดผลบวกหลงได้ เนื่องจากมีคุณลักษณะของยีนทั้งที่เหมือนกันและแตกต่างกันปะปนกันอยู่ นอกจากนี้ความไวและความจำเพาะของการตรวจโดย PCR ยังขึ้นอยู่กับ การออกแบบ PCR primers การกำหนดสภาวะของ PCR ตลอดจนการป้องกันการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์

PCR ในรอบแรกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของ nested PCR อย่างไรก็ตามต่อมาได้มีผู้วิจัยค้นพบว่าในตัวอย่าง น้ำลาย และปัสสาวะของผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย มี DNA ของเชื้อมาลาเรียปะปนออกมาด้วย จากการตรวจสอบโดยใช้ DNA เป้าหมายที่ใช้เป็นยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ชนิดที่ 2 ของ *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-2 (PfMSP2) (Mharakurwa et al, 2006) หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยอีกกลุ่มหนึ่งได้รายงานวิธีการ วิจัยเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* โดยวิธี nested PCR โดยการใช้ยีน SSU rRNA เป็นยีน เป้าหมายเช่นกัน จากตัวอย่างน้ำลาย และปัสสาวะ เปรียบเทียบกับการใช้เลือดโดยตรง โดยให้ผลความไวของ การตรวจสอบจากตัวอย่างน้ำลายร้อยละ 73 และตัวอย่างปัสสาวะร้อยละ 32 เมื่อเทียบความไวกับการใช้เลือด ส่วนผลความจำเพาะให้ค่าใกล้เคียงกันคือร้อยละ 97 ซึ่งผลดังกล่าวมีความผันแปรตามจำนวนเชื้อที่พบ (Nwakanma et al, 2009)

การตรวจวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่ให้ความไว และความถูกต้องสูงกว่าการตรวจทุกวิธีที่มี ในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี nested PCR ซึ่งเป็นการประยุกต์วิธี PCR เพื่อการตรวจหาเชื้อมาลาเรียหลาย ชนิดจากการทำ PCR เพียง 2 ครั้ง เป็นวิธีที่มีความไวสูงมากสามารถตรวจหาเชื้อที่มีจำนวนเพียง 1 ตัว ในเลือด 1 ไมโครลิตร (Snounou et al, 1993a) วิธีการนี้เป็นวิธีที่สะดวกง่ายและรวดเร็วสามารถนำไปใช้ในกรณีที่มีตัวอย่าง จำนวนมากได้ การวิเคราะห์ผลนั้นไม่จำเป็นจะต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์สูงในการตรวจหาเชื้อ ดังเช่นการตรวจ จากกล้องจุลทรรศน์ วิธี PCR สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการวินิจฉัยมาลาเรียได้ทั้ง 5 species ที่ก่อโรคในมนุษย์ รวมทั้ง *Plasmodium knowlesi* แม้ว่าวิธีการวินิจฉัยโดย PCR อาจไม่เหมาะกับการใช้ตรวจหา มาลาเรียเพื่อการ บริการ โดยทั่วไปยกเว้นใน โรงพยาบาลหลักที่เป็นแหล่งอ้างอิงของประเทศ แต่ในด้านการวางมาตรการควบคุม โรคมาลาเรียในระดับประเทศอย่างยั่งยืนนั้น ข้อมูลในเชิงระบาดวิทยาที่มีความละเอียดถูกต้องสูงนับเป็นข้อ สำคัญที่สุดประการหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเด็น เกี่ยวกับ (1) ระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ที่มิเชื้อใน ร่างกายในระดับต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจพบได้จากการตรวจฟิล์มโลหิต ซึ่งผู้ติดเชื้อมักจะไม่ได้รับการ รักษาจึงมีโอกาสที่จะเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อไปนอกเหนือจากภาวะการป่วยจากโรคที่จะมีการดำเนินต่อไป และอาจรุนแรงขึ้นในภายหลังผู้ป่วยเหล่านี้อาจเป็นแหล่งที่ช่วยส่งเสริมให้เชื้อมาลาเรียมากขึ้นจากการหา ซ้อยา รักษาตนเอง (2) ระบาดวิทยาเกี่ยวกับการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันในผู้ป่วยรายเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาโดย วิธี PCR หรือการเฝ้าติดตามผลการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียมักพบว่าภาวะการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดในผู้ป่วยมี มากกว่าผลการตรวจจากฟิล์ม โลหิตชัดเจน ดังนั้นเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าวชนิดที่ไม่ได้รับการวินิจฉัย จึงได้รับปัจจัยการ คัดเลือกสายพันธุ์ที่อาจดื้อยารักษา มาลาเรียมากขึ้น ในอนาคต และยังเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อไป ได้ (3) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* ในผู้ป่วยหลายพื้นที่ ดังนั้นการเฝ้าระวังการติดเชื้อมาลาเรียจึงมีประโยชน์อย่างมากต่อการควบคุม โรคมาลาเรียที่ติดต่อกันใน ประเทศไทย

ในปัจจุบันการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียของผู้ป่วย หรือการศึกษาระบาดวิทยาเกี่ยวกับมาลาเรียนั้นจำเป็นต้อง ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งการเก็บตัวอย่างเลือดจำเป็นต้องมีการเจาะเลือดจากปลายนิ้ว หรือจาก หลอดเลือดดำของผู้ป่วย ในบางครั้งผู้ป่วยอาจไม่ร่วมมือในการเจาะเลือดดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กหรือ ในกรณีที่ต้องตรวจซ้ำหลายครั้ง อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR จากตัวอย่าง DNA ของเชื้อมาลาเรียที่พบได้ในน้ำลายและปัสสาวะของผู้ป่วย โดยใช้ยีน cytochrome b เป็น ยีนเป้าหมาย เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียคนทั้ง 5 ชนิด รวมทั้ง *Plasmodium knowlesi* ที่ติดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งผลการ

ตรวจพบว่าให้ผลความไวสูงกว่าการใช้ชิ้น small subunit ribosomal RNA เป็นยีนเป้าหมายในการทำ PCR ถึงร้อยละ 18 และสูงกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ร้อยละ 39.8 นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อ *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi* ได้จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะ (Putaporntip et al, 2011) ดังนั้นวิธีการใหม่สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่จะพัฒนาขึ้นนี้จะมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีการเจาะเลือดจากผู้ป่วยอีกต่อไปหรือหลีกเลี่ยงการเจาะเลือดในกรณีที่ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาและประเมินผลในตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อมากขึ้น รวมทั้งศึกษาภาพในการใช้ติดตามผู้ติดเชื้อมาลาเรียในระยะเฉียบพลันและในระยะที่หายจากโรค รวมทั้งความเป็นไปได้ การพัฒนาต่อไปเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายของรูปแบบอัลลีลที่พบในน้ำลายและปัสสาวะเปรียบเทียบกับที่พบในกระแสเลือด ผลสัมฤทธิ์จากการศึกษานี้ นอกจากจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคแล้ว ยังสามารถใช้วิเคราะห์พันธุกรรมของประชากรของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างที่ครอบคลุมทุกกลุ่มอายุ

การประยุกต์การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างน้ำลาย และปัสสาวะจึงน่าจะเป็นวิธีการที่คืออีกวิธีหนึ่ง สำหรับการวินิจฉัยมาลาเรีย แต่จากที่มีผู้วิจัยได้รายงานมาจนถึงปัจจุบันยังคงมีขีดจำกัดอย่างมากในชนิดของเชื้อที่สามารถวินิจฉัยได้ และความไวในการวินิจฉัยยังอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับการใช้เลือดโดยตรง ยีนของเชื้อมาลาเรียที่สามารถใช้เป็น DNA เป้าหมายต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียมีด้วยกันหลายชนิดนอกจากยีน SSU rRNA เช่น ยีน ใน mitochondria เป็นยีนที่พบได้ในมาลาเรียทุกชนิดมีขนาดประมาณ 6 kb (Vaidya et al, 1989) ถึงแม้ว่าจะเป็นยีนที่มีความหลากหลายต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับยีน SSU rRNA แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติที่สำคัญของยีนชนิดนี้มีข้อที่เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการใช้เป็น DNA เป้าหมายต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียคือมีจำนวนชุดของยีนซ้ำกันสูงมากประมาณ 30-100 copy ต่อเซลล์ (Vaidya et al, 1989) จึงทำให้ความไวสำหรับการวินิจฉัยในการใช้ยีนนี้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ยีน SSU rRNA และจากข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีนใน mitochondria ของมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด ที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Jongwutiwes et al, 2005) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิดที่มีความแตกต่างกันในบางบริเวณ ซึ่งสามารถนำคุณลักษณะนี้มาใช้ในการออกแบบ primers เพื่อการทำ PCR ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด โดยใช้ยีนใน mitochondria เป็น DNA เป้าหมายเพื่อการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะให้มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรง วิธีการนี้จะมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้สะดวกจากผู้ป่วยคือไม่มีขั้นตอนใดที่จะทำให้ผู้ป่วยได้รับความเจ็บปวดในระหว่างการเก็บตัวอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กเล็ก หรือในกรณีที่ต้องติดตามผู้ป่วยหรือผู้ที่ได้รับวัคซีนในอนาคต

ความหลากหลายในรูปแบบของอัลลีลของแอนติเจนยีนที่พบในเชื้อมาลาเรียมีความสำคัญในการติดตามประชากรของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งถ้าการตรวจหาอัลลีลจากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่พบในน้ำลาย และปัสสาวะสามารถกระทำได้อย่างมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับการตรวจหาอัลลีลในเลือดจะทำให้การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเหล่านี้มีความสมบูรณ์และสามารถทดแทนการตรวจจากเลือดได้ ซึ่งยีนชนิดหนึ่งที่มีความหลากหลายสูงใน *Plasmodium falciparum* ได้แก่ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 ถึง 56 กิโลดาลตัน เรียกว่า merozoite surface protein 2 (MSP2) เป็น โปรตีนที่มีส่วนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของ merozoite โดยอาศัย glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Fenton et al, 1989; 1991; Smythe et al, 1991) โปรตีนชนิดนี้มีความหลากหลายสูงในรูปแบบของยีน ในลำดับกรดอะมิโนและในคุณสมบัติด้านการเป็นแอนติเจน โครงสร้าง

ของ MSP2 ประกอบด้วยบริเวณ N-terminus และ C-terminus ที่มีความคงที่ของลำดับกรดอะมิโนสูง แต่ในส่วนกลางประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย ได้แก่ ส่วนย่อยที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันในลักษณะของ repeats และ ส่วนย่อยของ non-repeats ซึ่งมีความแตกต่างตามสายพันธุ์ของเชื้อ อย่างไรก็ตามความหลากหลายของ MSP2 สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มอัลลิล FC27 และกลุ่มอัลลิล 3D7 กลุ่มอัลลิล FC27 นั้นบริเวณ repeats ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันเป็นชุด 2 แบบ คือ แบบที่มีกรดอะมิโน 32 ตัวใน repeats เรียงต่อกัน 3 ชุด และตามด้วยแบบที่มีกรดอะมิโน 12 ตัวใน repeats ซ้ำกัน 1 ถึง 5 ชุด สำหรับกลุ่มอัลลิล 3D7 เป็นชนิดที่มีกรดอะมิโนผันแปรสูงทั้งจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนใน repeats โดยกรดอะมิโนที่พบส่วนใหญ่คือ alanine, glycine และ serine (Fenton et al, 1989; 1991; Smythe et al, 1991) นอกจากนี้ยังพบอัลลิลที่มีลักษณะเป็นลูกผสมระหว่างกลุ่มอัลลิล FC27 และกลุ่มอัลลิล 3D7 อันเนื่องจากการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมภายในยีนขณะที่เชื้อมาลาเรียสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุงกันปล่อง อย่างไรก็ตามอัลลิลชนิดนี้พบได้น้อยมากในธรรมชาติ (Marshall et al, 1991; Felger et al, 1994) สำหรับใน *Plasmodium vivax* แอนติเจนยีนที่มีความหลากหลายสูงมากคือ merozoite surface protein 1 (*PvMsp1*) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PvMsp1* จำนวน 40 ตัวอย่างจากหลายภูมิภาคของโลก พบว่าสามารถแบ่งยีนเป็น 13 block (Tanabe et al, 1987) ประกอบด้วย conserved block 7 แห่ง และ variable block 6 แห่ง โดยบริเวณ conserved block พบการแทนที่ของ นิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนมากกว่าการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนคงเดิมเล็กน้อย (ประมาณร้อยละ 55) ทั้งนี้การแทนที่ดังกล่าวส่วนใหญ่เป็น dimorphic substitution เมื่อพิจารณาบริเวณ variable block ทั้ง 6 แห่งซึ่งประกอบด้วย block 2, 4, 6, 8 และ 12 นั้น พบว่ามีความหลากหลายของลำดับเบสสูงมาก เช่น block 2 สามารถแบ่งเป็น 3 บริเวณย่อยได้แก่ block 2a ประกอบด้วยลำดับเบสพื้นฐาน (basic type) 4 แบบ และ recombinant type 5 แบบ block 2b ประกอบด้วยลำดับเบสที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด (repeats) พบทั้งหมด 19 แบบ และ block 2c ประกอบด้วย basic type 4 แบบ และ recombinant type 6 แบบ เป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณ variable block 2 ของ *PfMSP1* เป็นบริเวณเดียวที่มี repeats ซัดเจน (Tanabe et al, 1987; Jongwutiwes et al, 1992) แต่สำหรับ *PvMsp1* พบ repeats ใน block 2, 6 และ 10 ดังนั้นขอบเขตความหลากหลายของ variable block ใน *PvMsp1* จึงสูงมาก (Putapornpip et al, 1997; 2000; 2002) บริเวณ variable block ของ *PvMsp1* จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ติดตามหรือใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Plasmodium vivax* ที่ดี การจำแนกและติดตามสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการวางแผนทางควบคุมโรค รวมทั้งการติดตามประเมินผลการควบคุมโรค โดยวิธีต่าง ๆ รวมทั้งผลของวัคซีนที่พึงมีในอนาคตต่อประชากรเชื้อมาลาเรียในแต่ละท้องถิ่น

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยชนิด (species) ของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะให้มีความไวมากขึ้น

2.2 เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยทั่วไปโดยใช้ตัวอย่างน้ำลายและเสมหะเปรียบเทียบกับ การตรวจโดยใช้ตัวอย่างเลือด

2.3 เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* โดยใช้ตัวอย่างน้ำลายและเสมหะเพื่อใช้งานระบาดวิทยาและการประเมินประสิทธิภาพของมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียและวัคซีนในอนาคต

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรตัวอย่าง

ขนาดของตัวอย่าง (sample size) การคำนวณขนาดตัวอย่าง โดยใช้สูตรดังนี้

$$N = \frac{Z^2 P (1 - P)}{d^2}$$

โดย N = sample size,

Z = Z statistic for a level of confidence (for the level of 95%, Z value is 1.96).

P = expected prevalence or proportion (in proportion of one)

d = precision (in proportion of one; if 5%, d = 0.05)

จากข้อมูลอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในประชากรไทย 1000 ราย พบผู้ติดเชื้อมาลาเรีย 0.5 ดังนั้น ค่า P = 0.05 (Cui et al, 2011) ดังนั้น N = 72.99 แต่เนื่องจากการศึกษานี้ต้องการประเมินการตรวจให้ครอบคลุมมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด โดยชนิดที่พบน้อยที่สุดที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียมีเพียงร้อยละ 0.57 (Putapomtip et al, 2009) ดังนั้นค่า N ควรเพิ่มขึ้นประมาณ 1.75 เท่าจึงจะตรวจพบผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย species ที่พบในอุบัติการณ์ต่ำสุด 1 ราย ดังนั้นค่า N ควรไม่ต่ำกว่า 127 อย่างไรก็ตามเพื่อให้การวิเคราะห์ข้อมูลถูกต้องมากขึ้นจึงใช้ขนาดตัวอย่าง N = 500

ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากผู้ที่มีไข้ (อุณหภูมิวัดจากใต้ลิ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 37.5 °C) ที่มารับการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคมาลาเรียในหน่วยควบคุมโรคติดต่อมาโดยแมลงในพื้นที่จังหวัดตากจำนวน 198 ตัวอย่าง จังหวัดจันทบุรีจำนวน 83 ตัวอย่าง จังหวัดเชียงใหม่ 75 ตัวอย่าง จังหวัดเชียงรายจำนวน 79 ตัวอย่าง และจังหวัดแม่ฮ่องสอนจำนวน 67 ตัวอย่าง โดยในแต่ละท้องที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้วจากผู้ที่มีไข้โดยไม่ได้มีอาการไข้หวัดหรืออาการแสดงจำเพาะของโรคติดเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่สอดคล้องกับอาการแสดงของโรคมาลาเรีย โดยเลือดที่เก็บได้จะแบ่งมาทำฟิล์มเลือดชนิดหนาและบางอย่างละ 1 แผ่น ส่วนที่เหลือจะเก็บไว้ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) เพื่อไว้สำหรับการเตรียม DNA และทำการเก็บตัวอย่างน้ำลาย (ประมาณ 2 มิลลิลิตร) และตัวอย่างปัสสาวะ (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) สำหรับในระหว่างขนส่งจากห้องที่เขตปรากฏโรคมาลาเรียมายังห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะได้รับการเก็บรักษาในสภาพที่เย็นโดยใช้น้ำแข็ง เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการได้นำตัวอย่างเหล่านี้มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้สกัด DNA โดยตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดจำนวน 502 ตัวอย่าง

สำหรับพื้นที่จังหวัดตากนั้นคณะผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะเพิ่มเติมในผู้ป่วยจำนวน 35 ราย ที่ตรวจพบเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฆ มาลาเรียคลินิกและเป็นตัวอย่างของผู้ป่วยที่ยินยอมให้เก็บตัวอย่างซ้ำได้โดยเก็บตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดในวันที่ 1, 7, 14, 21 และ 28

3.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิต

การทำแผ่นฟิล์มโลหิตบาง (thin blood film)

- ปิเปตเลือดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาด จำนวน 3 µl บริเวณปลายด้านที่ติดกับส่วนที่เป็นกระจกฝ้าของกระจกสไลด์

- ใช้ขอบกระจกสไลด์ปลายเรียบสม้าเสมออีกแผ่นหนึ่งและหยดเลือดทำมุมประมาณ 45 องศา โดยขอบกระจกสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางปลายโดยเร็วและสม้าเสมอ เลือดจะแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางบนแผ่นกระจก ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

- นำไปจุ่มใน absolute methanol ครึ่งนาที แล้วผึ่งไว้ให้แห้งสนิท

- นำมาข้อมด้วยสีโดยผสมสี Giemsa เข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 ml กับสารละลาย PBS ที่มีค่า pH 7.4

ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วหยดสีลงบนแผ่นฟิล์มโลหิตบนกระจกสไลด์จนท่วมบริเวณที่จะข้อม ทิ้งไว้ 20 นาที

- ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปตรวจหาเชื้อมาลาเรียต่อไป

การทำแผ่นฟิล์มโลหิตหนา (thick blood film)

- ปิเปิดเลือดลงบนตรงกลางแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาด จำนวน 5 μ l

- ใช้มุมของกระจกสไลด์อีกแผ่นหนึ่งและหยดเลือด แล้ววนให้เลือดเป็นแผ่กระจายออกเป็นวงกลม

เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 cm ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

- นำมาข้อมด้วยสีโดยผสมสียิมซาเข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 ml กับสารละลาย PBS ที่มีค่า pH 7.4 ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วหยดสีลงบนแผ่นฟิล์มโลหิตบนกระจกสไลด์จนท่วมบริเวณที่จะข้อมทิ้งไว้ 20 นาที

- ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บไว้ตรวจหาเชื้อต่อไป

การตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตชนิดบางและชนิดหนา โดยทำการตรวจจาก 200 วงกลิ้งองภายใต้ objective lens กำลังขยาย 100 เท่า สำหรับการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตชนิดบางอาศัยหลักการสังเกตระยะและลักษณะของเชื้อมาลาเรีย การเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน รวมทั้งลักษณะของ hemozoin ส่วนการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตชนิดหนา อาศัยลักษณะของเชื้อมาลาเรียเป็นหลัก โดยเทียบเคียงกับเม็ดเลือดขาว ซึ่งมักมีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียมากกว่าฟิล์มโลหิตชนิดบาง

3.3 การพัฒนาวิธีการตรวจและจำแนกชนิดของมาลาเรียโดยวิธี PCR

การออกแบบ PCR primers

ทำการออกแบบ primers โดยอาศัยลำดับ DNA ของยีนใน mitochondria ของ *Plasmodium falciparum* (accession number AJ276845), *Plasmodium vivax* (accession number NC_007243), *Plasmodium malariae* (accession number AB354570), *Plasmodium ovale* (accession number AB354571) และ *Plasmodium knowlesi* (accession number NC_007232) ที่มีใน GenBank databases โดย primers คู่แรกมีความจำเพาะต่อ genus *Plasmodium* ส่วน primers คู่ในมีความจำเพาะต่อ species ของมาลาเรียเหล่านี้ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนดังกล่าวระหว่างเชื้อมาลาเรียชนิดทั้ง 5 ชนิด

สำหรับการเปรียบเทียบลำดับเบสในแต่ละตำแหน่งอาศัยหลักการ 3 ขั้นตอน ได้แก่

(1) pairwise alignment เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสแต่ละคู่สำหรับทุกคู่ของความเป็นไปได้ในการจับคู่ และทำการหาค่าความห่าง (distance) หรือค่าความแตกต่างระหว่างแต่ละคู่ของลำดับเบสเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

(2) ทำการจัดกลุ่มลำดับเบสที่มีความคล้ายคลึงกันให้มาอยู่ในกลุ่มเดียวกันในลักษณะของการทำ dendrogram หรือความเชื่อมโยงข้อมูลที่คล้ายคลึงกัน

(3) ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมด โดยอาศัยข้อมูลจากการสร้าง dendrogram ในข้อ 2 เป็นตัวนำร่อง ทั้งนี้ในการจัดลำดับเบสในแต่ละสดมภ์ (column) ต้องคำนึงถึง gap opening penalty, extension penalty, delay divergence sequences, transition weight และ DNA weight matrix ร่วมด้วย ทั้งนี้ขั้นตอนดังกล่าวสามารถเลือกใช้ใน โปรแกรม Clustal X (Thomson et al, 1997)

ในการออกแบบ primers สำหรับ PCR อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ Cytochrome b gene โดยใช้ primers ในปฏิกิริยาชุดแรกคือ primers คู่นอกที่มีความจำเพาะกับ genus *Plasmodium* ในขณะที่การเพิ่มปริมาณ DNA ในปฏิกิริยาชุดหลังคือ primers คู่ในที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละ species ของเชื้อมาลาเรีย สำหรับหลักการออกแบบ primers มีดังนี้

(1) primer ควรประกอบด้วยจำนวนเบสประมาณ 17-28 ตัว ทั้งนี้อาจต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของเบสด้วยเพื่อให้ค่า melting temperature (T_m) อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

(2) ถ้าเป็นไปได้ควรเลือกบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบส G และ C รวมกันอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60

(3) บริเวณปลายสุดทางด้าน 3' ควรเป็นเบส G, C หรืออาจเป็น GC หรือ CG เพื่อทำให้การจับกันระหว่าง template DNA กับ PCR primer มีเสถียรภาพมากขึ้นส่งผลให้ปฏิกิริยา PCR มีความไวและความจำเพาะมากขึ้น

(4) ค่า T_m ในการจับกันระหว่าง template DNA กับ PCR primer ควรอยู่ในช่วง 55-80°C

(5) หลีกเลี่ยงการใช้ลำดับเบสด้านปลาย 3' ของ primer ที่เป็น homopolymer ของ C หรือ G เพราะจะเสี่ยงต่อการจับกันอย่างไม่จำเพาะระหว่าง template DNA ที่เป็น GC-rich sequence กับ PCR primer ดังกล่าว ส่งผลให้ปฏิกิริยา PCR ขาดความจำเพาะ

(6) ลำดับเบสทางด้าน 3' ของ primer ไม่ควรจับกับลำดับเบสใน primer อื่นได้หรือไม่มี complementary sequence กัน อันอาจทำให้เกิดสภาวะ primer dimer ขึ้น ทำให้ความไวและความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR ลดลง

(7) ลำดับเบสใน primer หนึ่ง ๆ ไม่ควรมี self-complementary sequence ภายในหรือ palindromic sequence ซึ่งการมีลำดับเบสดังกล่าวจะทำให้เกิด secondary structure เช่น เกิด hairpin loop ขึ้น ทำให้ความไวและความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR ลดลงได้เช่นกัน

การทดสอบความไวและความจำเพาะของ primers

ความจำเพาะของ primers แต่ละคู่โดยใช้ DNA ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดเป็นตัวทดสอบรวมทั้งการใช้ DNA จากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) ร่วมด้วยในที่นี้ใช้ DNA ของคนเป็น

negative control ทำการปรับเปลี่ยนสภาวะของการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ได้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับองค์ประกอบที่สำคัญที่ต้องคำนึงถึงในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

(1) การกำหนดอุณหภูมิและเวลาที่ทำให้ PCR primer จับกับ template DNA (annealing temperature and time) อาศัยการคำนวณค่า T_m ของ primer ซึ่งอาจใช้การประเมินจากปริมาณองค์ประกอบของเบสแต่ละชนิดใน primer จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

ดังนั้น primer ที่ยาวหรือมีองค์ประกอบของเบส G และ C สูงย่อมมีค่า T_m ที่สูงกว่า primer ที่สั้นหรือมีองค์ประกอบของเบส G และ C ต่ำ โดยทั่วไปมักเลือกใช้ annealing temperature ต่ำกว่าค่า T_m ราว 5°C สำหรับระยะเวลาในขั้นตอนนี้ โดยทั่วไปเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในเวลาน้อยกว่า 30 วินาที ยกเว้นในกรณีที่เลือกใช้ primer ที่มีค่า T_m ใกล้เคียงกับ annealing temperature ในกรณีดังกล่าวมักต้องกำหนดระยะเวลาในขั้นตอนนี้ให้นานขึ้น

(2) การกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการลอกแบบ DNA สายใหม่จาก template DNA (elongation temperature and time) โดยทั่วไปมักกำหนดอุณหภูมิสำหรับขั้นตอนนี้ในช่วง $70-72^{\circ}\text{C}$ สำหรับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งมีอัตราการลอกแบบในการสร้าง DNA สายใหม่ด้วยอัตราสูงถึง 100 เบสต่อวินาที หรือโดยทั่วไปมักใช้เวลา 1 นาทีต่อการสร้าง DNA สายใหม่ที่มีความยาวประมาณ 1 กิโลเบสหรือมากกว่า

(3) องค์ประกอบของ reaction buffer บางประเภทมักขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่เลือกใช้ อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบและปริมาณที่เหมาะสมของสารที่สำคัญในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

- Tris-HCl, pH 8.3 ปริมาณ 10-50 mM
- KCl ปริมาณมากได้ถึง 50 mM
- MgCl_2 ปริมาณ 1.5 mM หรือมากกว่า
- primer แต่ละสายปริมาณ 0.2-1 μM
- 50-200 μM dNTP
- gelatin หรือ bovine serum albumin ปริมาณมากได้ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$
- สารอื่น ๆ จำพวก non-ionic detergents เช่น Tween-20, Nonidet P-40 หรือ Triton X-100 เป็นต้น ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่เลือกใช้

(4) จำนวนรอบ (cycle) ของปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณ DNA จาก template DNA จำนวน 50 โมเลกุลทำให้สามารถตรวจพบได้จากการวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis นั้นต้องทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ PCR ประมาณ 35-40 รอบ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณ DNA ให้ได้จำนวนที่ดัดเทียบกันจาก template DNA จำนวน 3 แสน โมเลกุลได้โดยใช้จำนวนรอบประมาณ 25-30 รอบ ทั้งนี้เนื่องจากการเกิด plateau effect ในขณะที่ปฏิกิริยา PCR ได้ดำเนินไปหลายรอบแล้ว อย่างไรก็ตามในการพัฒนาวิธี PCR ในการศึกษาที่อาศัยเทคนิค nested PCR หรือการทำ PCR 2 ขั้นตอนซึ่งใช้จำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนไม่มาก ดังนั้นผลของ plateau effect จึงไม่น่าเป็นข้อจำกัดในการเพิ่มปริมาณ DNA จึงไม่เกิดผลกระทบต่อความไวของการทดสอบ

สำหรับขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิต PCR ใช้วิธีการแยกขนาดของ DNA โดยกระแสไฟฟ้าภายใน TBE (Tris-boric acid-EDTA) buffer และใช้ 2 % agarose gel ซึ่งเตรียมได้จากการชั่ง agarose gel 2 กรัม ละลายใน TBE buffer 100 ml นำไปอุ่นให้ร้อนจน agarose ละลายหมดแต่ไม่ควรให้เดือดพล่าน ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50-60°C นำไปเทในแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้ขนาด 5.5 x 10.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำหวี (comb) ที่ปลายด้านหนึ่งเพื่อทำร่องสำหรับเติมสารละลาย DNA ที่ต้องการวิเคราะห์ ตั้งทิ้งไว้ราว 30 นาที หรือจน agarose แข็งตัวเต็มที่แล้วดึงหวีออกจาก gel หลังจากนั้นยกถาดไปวางใน electrophoresis chamber ซึ่งมี TBE buffer อยู่ โดยให้ปริมาณ buffer ท่วม gel ประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ในขณะที่ electrophoresis เนื่องจาก DNA มีหมู่ฟอสเฟตจึงมีประจุลบ ดังนั้น DNA เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนไปทางขั้วบวกด้วยอัตราแตกต่างกันตามน้ำหนักโมเลกุลของ DNA

ในขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการนำตัวอย่างสารละลาย DNA ผสมกับ loading dye ซึ่งประกอบด้วย bromophenol blue และ xylene cyanol ในอัตราส่วนสารละลาย DNA 6-7 ส่วนต่อ loading dye 1-2 ส่วน แล้วหยดลงไปในหลุมใน gel ที่เตรียมไว้ โดยใช้ DNA marker มาตรฐานที่เหมาะสมเป็นตัววัดขนาด ซึ่งในที่นี้ใช้ 50 base pair ladder ในขณะที่ทำ electrophoresis ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์เป็นเวลา 30-40 นาที หลังจากนั้นนำ gel ที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 µg/ml ในสารละลาย TBE buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ล้าง gel ด้วยน้ำสะอาด ตรวจสอบแถบ DNA จากการเรืองแสงภายใต้ลำแสง ultraviolet พร้อมทั้งถ่ายภาพเพื่อบันทึกผลที่ได้

การทดสอบความไวของ primers

เนื่องจากตัวอย่าง DNA ของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ ได้จากตัวอย่างที่มีความหนาแน่นและปริมาณเชื้อต่างกัน และถึงแม้จะทราบอัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดง แต่เนื่องจากเชื้อมาลาเรียเหล่านี้มีหลายระยะของการเจริญเติบโตซึ่งมีจำนวนนิวเคลียสแตกต่างกันในแต่ละระยะทำให้ประเมินจำนวนเชื้อได้ยากซึ่งส่งผลต่อการประเมินความไวของ primers จากจำนวนเชื้อที่แท้จริงมีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการวัดค่าความเข้มข้นของปริมาณ DNA จากผลผลิต PCR ที่ได้จาก primers ที่ออกแบบให้อยู่เลยจากตำแหน่ง primers ที่ใช้ในการทำ PCR รอบแรกมาด้านปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ ซึ่งผลผลิต PCR ที่ได้นี้จะนำไปวัดค่า OD พร้อมทั้งคำนวณหา MW ของสาย DNA ที่ได้เนื่องจากทราบองค์ประกอบของเบสและความยาว ทำให้ทราบจำนวน copy ของสาย DNA ในแต่ละตัวอย่างต่อปริมาตร 1 µl จากนั้นทำ serial dilution ของตัวอย่าง PCR และทำซ้ำ dilution ละ 3 reactions โดยทำ serial dilution ที่ปรับให้มีจำนวน copy ของ DNA ในแต่ละตัวอย่างเชื้อเท่ากับ 10000, 1000, 100, 10, 5, 3, 1 และ 0 copy ต่อ 1 µl เพื่อใช้เป็น template DNA สำหรับการทำให้ PCR

สำหรับองค์ประกอบของสารต่าง ๆ และสภาวะของ PCR มีดังนี้ ในปริมาณสุทธิของสารละลาย PCR 20 µl ประกอบด้วย DNA ของมาลาเรีย 5 ไมโครลิตร forward primer (PCBF) และ reverse primer (PCBR) อย่างละ 0.2 µM สำหรับ nucleotide substrate (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) อย่างละ 2.5 mM ใช้ 10xPCR reaction buffer 2 µl น้ำกลั่น 11.04 µl และมี *Taq* polymerase 0.25 unit เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่อง PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นทำให้ DNA แยกสาย (DNA denaturation) ก่อนปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วยขั้น DNA แยกสายที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเว

ลา 40 วินาที ขั้นตอนทำให้ primer จับกับ DNA template (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน DNA ยืดสาย (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมด ทำซ้ำกันจนครบ 40 รอบ และขั้นการสร้างสาย DNA ที่สมบูรณ์ ใช้ อุณหภูมิ 72°C เป็น เวลา 5 นาที

การทดสอบความจำเพาะของ primers

ทำการเจือจางผลผลิต PCR จากปฏิกิริยารอบแรกด้วยสารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 และ EDTA, pH 8.0) เพื่อใช้เป็น template DNA สำหรับปฏิกิริยา PCR ในรอบที่ 2 ซึ่งใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียในแต่ละชนิด ยกตัวอย่างการทดสอบเช่น การใช้ specific primer สำหรับเชื้อ *Plasmodium vivax* ในการทำปฏิกิริยา PCR ผลบวกของ PCR ดังกล่าวจะเกิดเมื่อใช้ template DNA ของเชื้อ *Plasmodium vivax* เท่านั้น แต่ให้ผลลบกับ *Plasmodium* ชนิดอื่น ๆ โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม ในกรณีที่พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเกิดขึ้น จะดำเนินการทดสอบซ้ำโดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ หรือการออกแบบ primer ใหม่

สำหรับองค์ประกอบของสารต่าง ๆ และสภาวะของ PCR มีดังนี้ ในปริมาณสุทธิของสารละลาย PCR 10 µl ประกอบด้วย DNA ที่เจือจางในสารละลาย TE buffer 2 µl ส่วน forward primer และ reverse primer ซึ่งเป็น species-specific primers อย่างละ 0.2 µM, nucleotide substrate (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) อย่างละ 2.5 mM, 10xPCR reaction buffer 1 µl, น้ำกลั่น 6.02 µl และมี Taq polymerase 0.25 unit เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่อง PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่ทำให้ DNA แยกสายก่อนปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วยขั้น DNA แยกสายที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที ขั้นตอนทำให้ primer จับกับ DNA template ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน DNA ยืดสายที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 25 รอบ และขั้นการสร้างสาย DNA ที่สมบูรณ์ ใช้ อุณหภูมิ 72°C เป็น เวลา 5 นาที

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ PCR และ primers ที่พัฒนาขึ้นนี้จะทำการเปรียบเทียบกับ PCR และ primers ที่คณะผู้วิจัยได้เคยพัฒนามาก่อนหน้านี้แล้ว ซึ่งใช้ DNA เป้าหมายคือ SSU rRNA (Putaporntip et al, 2009; Jongwutiwes et al, 2011) และ mitochondrial cytochrome b (Putaporntip et al, 2011)

3.4 การพัฒนาวิธีการเตรียม DNA จากเลือด น้ำลาย และปัสสาวะ

โดยทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูปจากตัวอย่างเลือด ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะ โดยตรง ที่เหลืออีกส่วนหนึ่งจะทำการแยกกรดนิวคลีอิกให้เข้มข้น โดยใช้ magnetic beads ก่อนที่จะดำเนินการเตรียม DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปต่อไป

การสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด

นำตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะปริมาตร 20 และ 200 µl ที่ได้มาทำการสกัด DNA โดยใช้ QIAamp DNA mini kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- (1) ปิเปิด proteinase K 20 µl ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- (2) ปิเปิดตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down
- (3) เติมนัฟเฟอร์ AL ลงไป 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที นำไป spin down

(4) นำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดไป incubate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างถูกย่อยอย่างสมบูรณ์

(5) หลังจากนั้นนำไป spin down แล้วเติม ethanol 200 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไป spin down

(6) ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp spin column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(7) นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด

(8) เติมน้ำฟลูออไรด์ AW1 500 μ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(9) นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด

(10) เติมน้ำ AW2 500 μ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(11) นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด

(12) นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ส่วนที่เหลือออกให้หมด

(13) นำ QIAamp spin column ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ที่สะอาด

(14) เติมน้ำฟลูออไรด์ AE ลงไป 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

(15) นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(16) ดูดเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR

ต่อไป

การสกัด DNA โดยใช้ magnetic beads

นำตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะปริมาตร 200 μ l มาทำการสกัด DNA โดยใช้ MagMAX™ DNA Multi-Sample kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

(1) เปิดเครื่อง incubator และตั้งที่อุณหภูมิ 56°C

(2) บีบโปรตีน K 16 μ l และ PK digestion buffer 184 μ l ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 ml

(3) บีบตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยการบีบเขย่า 5-7 ครั้ง

(4) นำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที

(5) หลังจากนั้นนำไป spin down แล้วเติม lysis buffer 600 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำหลอดตัวอย่างไปใส่บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 นาที

(6) เติมน้ำ DNA binding bead 40 μ l แล้วนำไปเขย่าต่อเป็นเวลา 3 นาที

(7) นำหลอดตัวอย่างออกจากเครื่องเขย่าแล้วเติมน้ำ 100% isopropanol 800 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex แล้วนำไปเขย่าต่อเป็นเวลา 3 นาที

(8) นำหลอดตัวอย่างวางบน magnetic stand เป็นเวลา 5 นาที หรือนานจนกระทั่งสารละลายและ magnetic bead ตกตะกอนทั้งหมด

- (9) ดูดส่วนสารละลายทิ้งทั้งหมดในขณะที่หลอดตัวอย่างวางบน magnetic stand ด้วยความระมัดระวัง
- (10) ล้างตัวอย่างด้วย wash solution 1 ปริมาตร 300 μ l
- (11) ทำซ้ำข้อ 10 สองครั้งโดยใช้ wash solution 2 ปริมาตร 300 μ l
- (12) ปล่อดตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้องโดยวางหลอดตัวอย่างไว้บน magnetic stand เป็นเวลา 3 นาที
- (13) เติม elution buffer 1 ปริมาตร 100 μ l นำหลอดไปไว้ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5

นาที

- (14) นำหลอดตัวอย่างออกจากเครื่องเขย่าแล้วเติม elution buffer 2 ปริมาตร 100 μ l
- (15) vortex หลอดตัวอย่างเป็นเวลา 20 วินาที แล้ววางหลอดตัวอย่างไว้บน magnetic stand เป็นเวลา 5 นาทีหรือนานจนกระทั่งสารละลายใสและ magnetic bead ตกตะกอนทั้งหมด

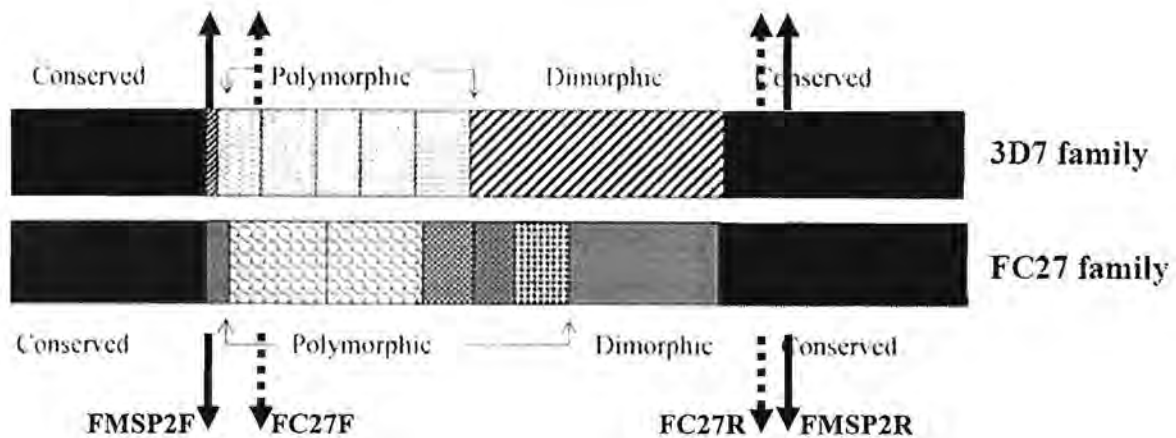
(16) ดูดเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ลงในหลอดสะอาดแล้วไว้ในที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR ต่อไป

3.5 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลาย และปัสสาวะ

นำ DNA ที่เตรียมได้จากขั้นตอนข้างต้นของทั้ง 2 ชุดการสกัด DNA มาทำ PCR ตามที่กล่าวไว้ในหัวข้อการทดสอบความไวของ primer ทำการตรวจสอบแถบ DNA โดย agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยใช้ agarose 2 g ละลายใน TBE buffer 100 ml สำหรับขั้นตอนอื่น ๆ ทำเช่นเดียวกับวิธีเตรียม 2 % agarose gel ดังกล่าวข้างต้น ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ PCR ที่ใช้ยีน SSU rRNA เป็น DNA เป้าหมายโดยใช้ primer จากที่คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้ยีนใน mitochondria เป็น DNA เป้าหมาย ทั้งในด้านความไวและความจำเพาะ

3.6 การวิเคราะห์รูปแบบของอัลลีลของ *PfMSP2*

เพิ่มปริมาณของ DNA โดยวิธี PCR สำหรับยีน *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (*PfMsp2*) โดยใช้ primers ที่ออกแบบเพื่อความจำเพาะต่อรูปแบบของอัลลีล 2 ชนิด คือ 3D7 และ FC27 ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* เท่านั้น โดยใช้ลำดับเบสต้นแบบจาก accession number M73810 และ Y12479 ซึ่ง outer primer ที่ออกแบบได้คือ FMSP2F; 5'-GCTTATAATATGAGTATAAGG-3' และ FMSP2R0; 5'-TGATTATTTCTAGAACCATGC-3' ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ที่จำเพาะต่อยีน *PfMsp2* ขนาดประมาณประมาณ 560-530 bp ส่วน inner primer มี 2 ชุด ซึ่งชุดที่ 1 ได้ถูกออกแบบไว้ให้มีความจำเพาะต่ออัลลีลชนิด 3D7 มีผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 477 bp ได้แก่ primer 3D7F; 5'-GAAAGTAATCCTCCTACTGGT-3' และ 3D7R; 5'-TGGTGCAGATTGTAATTCGG-3' ส่วน primer ชุดที่ 2 มีความจำเพาะต่ออัลลีลชนิด FC27 ให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 450 bp ได้แก่ primer FC27F; 5'-GGCAAATGAAGTTCTAATAC-3' และ FC27R; 5'-CACTGGTGCAGCAGGATTTTC-3' ตำแหน่งของ primer แสดงไว้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดง โครงสร้างของยีน merozoite surface protein 2 ของ *Plasmodium falciparum* และ ตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการทำ PCR ซึ่งจำแนกเป็น 3D7 และ FC27 families (Felger et al, 2003)

ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วยขั้นแรก (primary PCR) ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *PfMsp2* โดยใช้ชุด primers FMSP2F/FMSP2R โดยมีขั้นตอนดังนี้

นำ DNA ที่ให้ผลตรวจว่าเป็นเชื้อ *Plasmodium falciparum* มาเป็น DNA ต้นแบบ (DNA template) องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 20 μ l ประกอบด้วย

DNA template	3.0	μ l
forward primer	0.2	μ M
reverse primer	0.2	μ M
10X <i>ExTaq</i> Buffer	2.0	μ l
dNTP mixture อย่างละ	2.5	mM
sterile distilled water	13.4	μ l
<i>TaKaRa RTaq</i> DNA polymerase	0.25	unit/ μ l

นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR thermal cycler) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ในขั้นตอนแรกต้องทำการแยกสาย DNA (DNA denaturation) ก่อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย

1. การแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที
 2. ขั้นตอนที่ primer จับกับ template DNA (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที
 3. การสร้างสาย DNA จาก DNA ต้นแบบ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที
- โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 40 รอบ และขั้นตอนการสร้างสาย DNA สมบูรณ์หลังรอบสุดท้าย ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนการทำ PCR ขั้นที่สอง (nested PCR) ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของอัลลีลที่จำเพาะต่อชนิด 3D7 และ FC27 โดยใช้ชุด primers 2 ชุด ดังได้กล่าวไว้ข้างต้น โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR และ PCR cycle เหมือนกับที่กล่าวไว้ในขั้นตอนการทำ primary PCR ยกเว้นจำนวนรอบจะลดลงเหลือ 30 รอบ จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจโดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติดังกล่าวไว้ข้างต้น

การทดสอบความจำเพาะของ primer (Primer specificity)

ทำการคัดเลือกตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ทราบลำดับเบสจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Putapomtip et al, 2008) จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีรูปแบบอัลลีลแบบ 3D7 จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ TSY26, TSY1187, TSY1236, TSY1742 และ TSY1748 และรูปแบบอัลลีลแบบ FC27 อีก 5 ตัวอย่าง ได้แก่ TSY12, TSY304, TSY577, TSY673 และ TSY1748 ตัวอย่างเหล่านี้เป็นตัวอย่างที่มีรูปแบบอัลลีลของ *PfMsp2* เพียงรูปแบบเดียวดังนั้นจึงสามารถใช้ DNA ของตัวอย่างเหล่านี้เป็น template สำหรับทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบได้

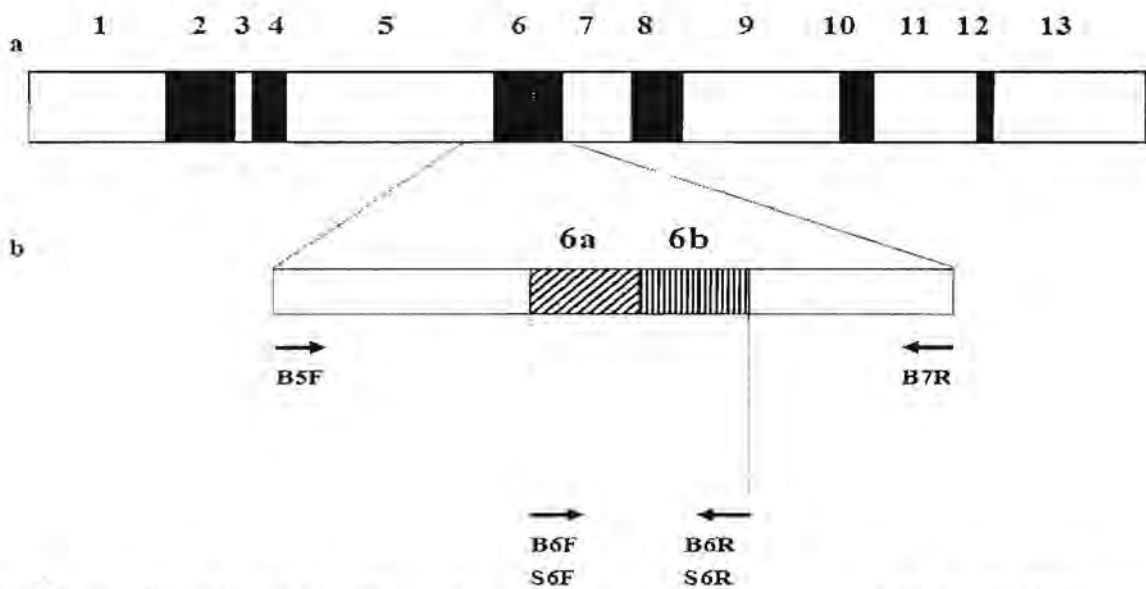
การทดสอบความไวของ primer (Primer sensitivity)

ทำการทดสอบความไวของ primer แต่ละคู่เพื่อให้ได้ primer ที่มีความไวทัดเทียมกัน ดังนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *PfMsp2* ที่มีความยาวประมาณ 770 bp โดยใช้ primer FMSP2F0 (5'-AAAGAATTGTATTT ATTAATTCTTAAC-3') และ FMSP2R0 (5'-CTCTTCATTTTAAAACATTGAC-3') จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop-spectrophotometer และเมื่อทราบความเข้มข้นของ DNA template แล้วจึงนำไปทำ dilution เพื่อให้ได้จำนวน copy ของยีน *PfMsp2* จำนวน 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 1 copy จากนั้นนำ template ที่ทราบจำนวน copy ไปทำ PCR แยกแต่ละคู่ของ primer

3.7 การวิเคราะห์รูปแบบของอัลลีลของยีน *PvMsp1* ในบริเวณ block 6

ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (*PvMsp1*) โดยใช้ primers ที่ออกแบบไว้เพื่อตรวจสอบรูปแบบของอัลลีลที่พบได้ในบริเวณ variable block 6 ของยีน *PvMsp1* ซึ่งมีความเป็นไปได้ทั้งหมด 5 รูปแบบคือ Sal-1/Sal-1, Belem/Belem, Sal-1/Belem subtype a, Sal-1/Belem subtype b และ Belem/Sal-1 ทั้งนี้ในแต่ละแบบจะมีความแตกต่างของจำนวน codon ทำให้รูปแบบของอัลลีลมีมากขึ้น โดยใช้ primer ทั้งหมด 3 ชุด ชุดแรกเป็น primer ที่ออกแบบเพื่อให้มีความจำเพาะต่อยีน *PvMsp1* โดย forward primer ออกแบบมาจากด้านปลาย conserve block 5 คือ primer B5F; 5'-GGTCCTCAAAGGGAAATTGACA-3' และ reverse primer ที่ออกแบบมาจากด้านปลาย 5' ของ conserve block 7 คือ primer B7R; 5'-GCTTGTGACAT GCGTAAGCGGA-3' primary PCR ประกอบด้วย PCR profile 40 รอบ ของ (1) ขั้นตอนการแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที (2) ขั้นตอนที่ primer จับกับ template DNA ที่อุณหภูมิ 62°C เป็นเวลา 30 วินาที (3) การสร้างสาย DNA จาก DNA ต้นแบบ ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และตามขั้นตอนการสร้างสาย DNA ที่สมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที โดยมีองค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ $20\ \mu\text{l}$ ประกอบด้วย DNA ของ *Plasmodium vivax* จำนวน $3\ \mu\text{l}$ $200\ \mu\text{M}$ ของ dNTP แต่ละตัว $2\ \mu\text{l}$ ของ 10X Taq buffer 0.25 unit ของ Taq DNA

Polymerase และ 0.25 μ M ของแต่ละ primer จากนั้นผลผลิตของ primary PCR จะนำไปใช้เป็น template เพื่อการทำ nested PCR โดยใช้ primer ชุดที่ 2 และ 3 เพื่อแยกรูปแบบของอัลลีลทั้ง 4 ชนิดออกจากกัน ซึ่งประกอบไปด้วย primer B6F; 5'-CGAAGCAGCGACAGAGGTC-3' เป็น primer ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีล Belem ด้าน 5' primer S6F; 5'-GCAGATATAGTGGCAAAGGGA-3' เป็น primer ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีล Sal-1 ด้าน 5' primer B6R; 5'-TGCTGGTGTGGCTGATACG-3' เป็น primer ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีล Belem ด้าน 3' และ primer S6R; 5'-AGGTGTCGATGGTGGG-3' เป็น primer ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีล Sal-1 ด้านปลาย 3' ในขั้นตอนการทำ nested PCR เพื่อแยกอัลลีลทั้ง 4 รูปแบบนั้นจะทำใน PCR แยกกัน 4 ชุด ที่ใช้ primer แยกกัน 4 คู่คือ B6F/B6R; S6F/S6R; B6F/S6R และ S6F/B6R โดยในขั้น nested PCR นี้ใช้ PCR profile จำนวน 30 รอบ และมีขั้นตอนการประกอบของปฏิกิริยา PCR เหมือนกับ primary PCR ยกเว้นขั้นการสร้างสาย DNA จาก DNA ดั้งเดิม จะใช้อุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจโดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติดังกล่าวไว้ข้างต้น โครงสร้างของยีน *PvMsp1* และตำแหน่งของ primer แสดงไว้ในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของยีน *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (*PvMsp1*) บริเวณ conserved block แสดงด้วย block สีขาว ส่วน variable block แสดงด้วย block สีดำ (Putaporntip et al, 2002) ตำแหน่งของ block แสดงไว้ทางด้านบนของภาพโครงสร้างยีน (b) แสดงบริเวณของยีนเป้าหมายที่รวมทั้งตำแหน่งของ primer ที่ใช้ทำ PCR ภาพลูกศรได้ภาพโครงสร้างของยีนแสดงทิศทางของ primers (B5F, B7R, B6F, B6R, S6F และ S6R)

การทดสอบความจำเพาะของ primer (Primer specificity)

ทำการคัดเลือกตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *Plasmodium vivax* จำนวน 42 isolates ที่ทราบข้อมูลลำดับเบสทั้งยีนจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Putaporntip et al, 2002) ตัวอย่าง DNA เหล่านี้มาจากตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่มีรูปแบบอัลลีลของยีน *PvMsp1* เพียงรูปแบบเดียวจึงสามารถใช้เป็น DNA ทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบได้

การทดสอบความไวของ primer (Primer sensitivity)

ทำการทดสอบความไวของ primer แต่ละคู่เพื่อให้ได้ primer ที่มีความไวทัดเทียมกัน และเนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ *Plasmodium vivax* และการเตรียม DNA จากตัวอย่างเชื้อธรรมชาติก็มี DNA ของคนปะปนอยู่ ดังนั้น template DNA ที่จะใช้ทดสอบความไวของ primer นั้นจึงได้การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *PvMsp1* ที่มีความยาวประมาณ 5,500 bp โดยใช้ primer PVF (5'-CCTGCATGTGTACATATATACATACACC-3') และ PVR (5'-CATATATATGCCACCTGGGGACGTCAC-3') จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop-spectrophotometer และเมื่อทราบความเข้มข้นของ DNA template แล้วจึงนำไปทำ dilution เพื่อให้ได้จำนวน copy ของยีน *PvMsp1* จำนวน 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 1 copy แล้วนำ template ที่ทราบจำนวน copy ไปทำ PCR แยกแต่ละคู่ของ primer ที่ออกแบบไว้

4 ผลการวิจัย

4.1 ประชากรตัวอย่าง

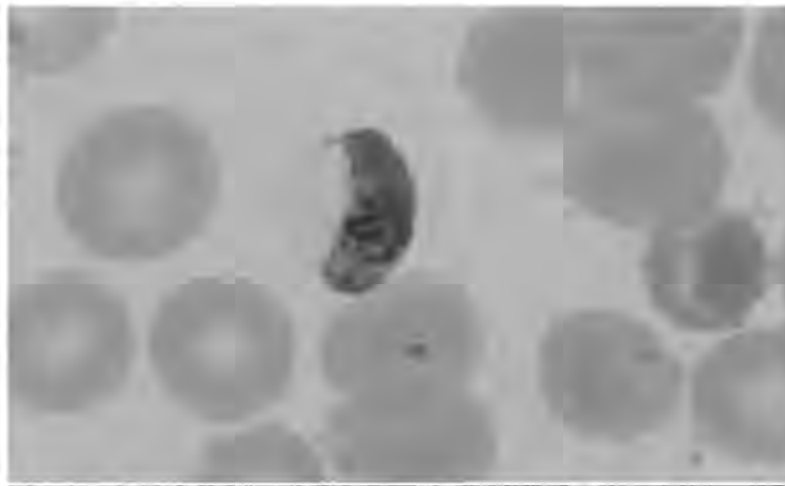
ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะจากผู้ป่วยที่มีไข้ที่มารับการตรวจการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อมาโดยแมลงในพื้นที่จังหวัดตาก จังหวัดจันทบุรี จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย และจังหวัดแม่ฮ่องสอน จำนวน 502 ราย ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยเพศชายรวมทั้งสิ้น 346 รายและเพศหญิง 156 ราย คิดเป็นอัตราส่วนเพศชายมากกว่าเพศหญิง 2.22 เท่า ทั้งนี้สัดส่วนการพบผู้ป่วยเพศชายมากกว่าเพศหญิงมีความสอดคล้องกันในแต่ละพื้นที่ (correlation coefficient = 0.98) ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุในวัยทำงาน โดยอายุเฉลี่ยน้อยที่สุดเป็นผู้ป่วยในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอนซึ่งมาจากผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 15 ถึง 70 ปี เพศชาย 346 คน เพศหญิง 156 คน มีอายุเฉลี่ย 23.7 ปี และมากที่สุดเฉลี่ย 35.6 ปีในเขตจังหวัดเชียงราย ผู้ป่วยที่ได้รับการสุ่มเพื่อการศึกษาในในแต่ละเขตจังหวัดมีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ยมากกว่าหรือเท่ากับ 37.5°C โดยค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 37.5 ถึง 37.9°C ประชากรที่ศึกษาส่วนใหญ่เป็นผู้ที่มารับการตรวจรักษาโรคมมาลาเรียในเขตจังหวัดตากคิดเป็นร้อยละ 39.44 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด สำหรับรายละเอียดข้อมูลในแต่ละพื้นที่ที่ทำการศึกษาแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นที่ศึกษาและลักษณะประชากรในแต่ละพื้นที่

พื้นที่จังหวัด	เพศ		อายุเฉลี่ย (ปี)	อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ย ($^{\circ}\text{C}$)	รวมจำนวน
	ชาย	หญิง			
จันทบุรี	60	23	28.7	37.8	83
ตาก	135	63	33.4	37.6	198
เชียงใหม่	48	27	30.1	37.6	75
เชียงราย	56	23	35.6	37.9	79
แม่ฮ่องสอน	47	20	23.7	37.5	67
รวม	346	156	31.18	37.67	502

4.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิต

การวินิจฉัย *Plasmodium falciparum* จากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดหนาและบาง ที่ผ่านการย้อมสี Giemsa และทำการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตลักษณะของระยะวงแหวน (ring stage) โดยลักษณะวงแหวนอาจมีขนาดเล็กหรือใหญ่ อาจพบเม็ดเลือดแดงที่มีระยะวงแหวนหลายวงในเม็ดเลือดแดงเดียวกัน (multiple infection of ring stage) ระยะแหวนบางตัวอาจมี 2 โครมาติน (double chromatin ring stage) หรืออาจพบระยะวงแหวนอยู่ชิดขอบเม็ดเลือดแดง โดยมีส่วนของไซโทพลาสซึมอยู่ในแนวเดียวกับขอบเม็ดเลือด (marginal form, appliqué หรือ accolé) ในผู้ป่วยบางรายอาจพบระยะ gametocyte ลักษณะคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) (ภาพที่ 3)

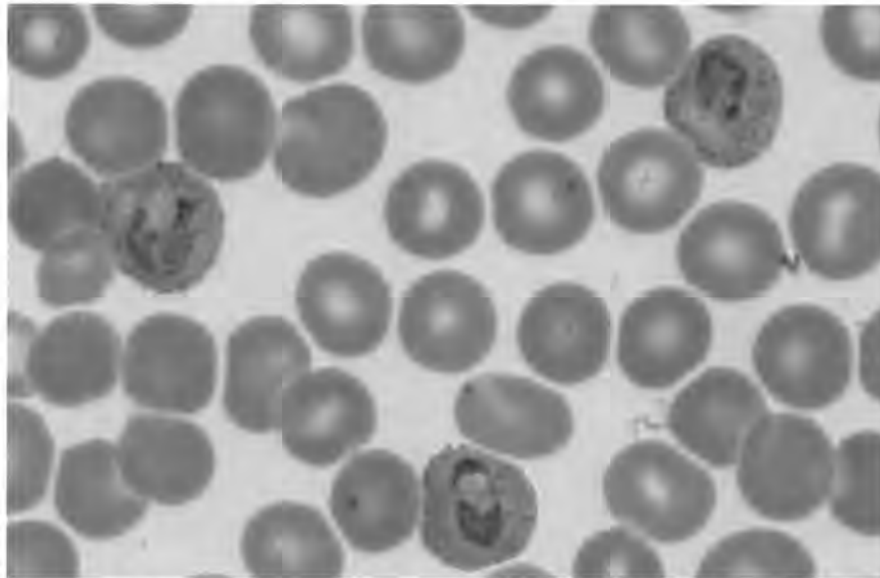


ภาพที่ 3 เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* จากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดบาง ระยะ gametocyte

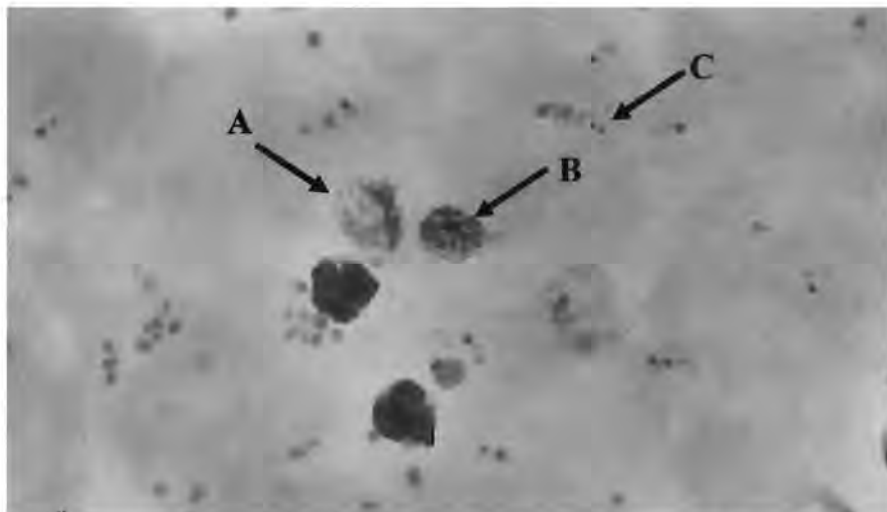
การวินิจฉัย *Plasmodium vivax* จากฟิล์มโลหิตชนิดบาง โดยสังเกตลักษณะของเชื้อระยะที่เจริญตั้งแต่ระยะ growing trophozoite เป็นต้น ไปจนถึง mature schizont หรือ gametocyte เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเหล่านี้จะมีขนาดโตขึ้นชัดเจนและพบ Schuffner's dots อัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงมักไม่เกินร้อยละ 2 (ภาพที่ 4) ทั้งนี้แม้ว่าจะสามารถพบระยะการเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงได้ทุกระยะ แต่โดยทั่วไปมักพบระยะใดระยะหนึ่งมากกว่าระยะอื่น นอกจากนี้อาจพบระยะวงแหวนได้เช่นกัน ดังนั้นจึงมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยภาวะของการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium falciparum* ยกเว้นในกรณีที่พบระยะวงแหวนจำนวนมากและมีอัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงสูงร่วมกับการพบลักษณะของเชื้อ *Plasmodium vivax* ชัดเจน

สำหรับตัวอย่างเชื้อจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาของ *Plasmodium falciparum* ระยะวงแหวนอาจคงรูปเดิมหรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจากกระบวนการย้อมสี ในบางครั้งถ้ามีการติดเชื้อในปริมาณสูงอาจตรวจพบระยะ late schizont ได้ ส่วนลักษณะเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่พบได้ในฟิล์มโลหิตชนิดหนามักมีรูปร่างไม่แน่นอน เนื่องจากกระบวนการย้อมสี ภาพที่ 5 แสดงการติดเชื้อผสมระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium*

vivax ที่ตรวจพบจากฟิล์มโลหิตชนิดหนา อย่างไรก็ตามสำหรับเชื้อ *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* ตรวจไม่พบจากฟิล์มโลหิตทั้งชนิดหนาและชนิดบางในการศึกษานี้



ภาพที่ 4 เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* จากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดบาง ระยะเวลา growing trophozoite



ภาพที่ 5 การติดเชื้อร่วมกันของมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* จากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดหนา (A) growing trophozoite ของ *Plasmodium vivax* (B) ระยะเวลา late schizont ของ *Plasmodium falciparum* และ (C) ระยะเวลา ring form

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์จากผู้ป่วยจำนวน 502 ราย พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียใน 241 ตัวอย่างหรือร้อยละ 48 และตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ 261 ตัวอย่าง ในกลุ่มตัวอย่างที่พบเชื้อมาลาเรียตรวจพบว่าเป็นชนิด *Plasmodium falciparum* 110 ตัวอย่างหรือร้อยละ 45.63 ชนิด *Plasmodium vivax* จำนวน 128 ตัวอย่างหรือร้อยละ 53.11 พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* จำนวน 3 ตัวอย่างหรือร้อยละ 1.25 ส่วนมาลาเรียชนิด *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* ตลอดจน *Plasmodium knowlesi* ตรวจไม่พบด้วยวิธีดังกล่าว (ตารางที่ 2) ในกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ 241 ตัวอย่างนั้น

ประกอบด้วยตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อในจังหวัดตาก 121 ตัวอย่างหรือร้อยละ 50.21 ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งหมด สำหรับอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่พบว่าผู้ที่มารับการตรวจโรคมาลาเรียในพื้นที่จังหวัดตากมีอัตราการพบเชื้อสูงสุดถึงร้อยละ 61.11 (50 รายพบเชื้อจากทั้งหมด 121 ตัวอย่าง) รองลงมาได้แก่จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงราย จันทบุรี และเชียงใหม่ โดยมีอัตราการตรวจพบเชื้อร้อยละ 49.25, 43.04, 36.14 และ 30.67 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงการกระจายชนิดของเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่พบว่า *Plasmodium vivax* เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียมากกว่า *Plasmodium falciparum* ในทุกจังหวัดที่ศึกษา ยกเว้นจังหวัดตากซึ่งตรวจพบ *Plasmodium falciparum* มากกว่า *Plasmodium vivax* เล็กน้อยคิดเป็นร้อยละ 53.72 และร้อยละ 45.45 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิตจำแนกตามพื้นที่

พื้นที่จังหวัด	จำนวนทั้งหมด (%)**	จำนวนที่พบเชื้อ* (%)**	ชนิดของเชื้อมาลาเรีย		
			<i>Plasmodium falciparum</i> (%)***	<i>Plasmodium vivax</i> (%)***	<i>P.falciparum</i> + <i>P.vivax</i> (%)***
จันทบุรี	83 (16.53)	30 (12.45)	9 (30)	21 (70)	0 (0)
ตาก	198 (39.44)	121 (50.21)	65 (53.72)	55 (45.45)	1 (0.83)
เชียงใหม่	75 (14.94)	23 (9.54)	9 (39.13)	14 (60.87)	0 (0)
เชียงราย	79 (15.74)	34 (14.11)	15 (44.12)	18 (52.94)	1 (2.94)
แม่ฮ่องสอน	67 (13.35)	33 (13.69)	12 (36.36)	20 (60.61)	1 (3.03)
รวม	502 (100)	241 (13.69)	110 (45.64)	128 (53.11)	3 (1.24)

* จำนวนที่พบเชื้อ ไม่ได้แสดงอุบัติการณ์ของโรคในท้องที่โดยตรง เนื่องจากมีการคัดกรองอาการผู้ป่วยโดยการซักประวัติอาการของไข้หวัดหรือคออักเสบออกไป และมีการจำกัดสัดส่วนที่พบเชื้อและไม่พบเชื้อให้อยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากเกินไปเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบผลการตรวจ โดยวิธีหาเชื้อจากแผ่นฟิล์มโลหิต

** ร้อยละของจำนวนทั้งหมด

*** ร้อยละของจำนวนทั้งหมดในแต่ละพื้นที่

สำหรับการประเมินอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงหรือความหนาแน่นของเชื้อในตัวอย่าง (parasite density) ในหน่วยของจำนวนตัวเชื้อมาลาเรียในเลือดปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยพบว่าค่าเฉลี่ยเรขาคณิต

(geometric mean) ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* มีค่ามากกว่าในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ในทุกพื้นที่ที่ศึกษาโดยค่าป่วยจำแนกตามพื้นที่พบว่า geometric mean โดยรวมจากทุกพื้นที่สำหรับผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* มีค่ามากกว่า 3 เท่าของ geometric mean ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ซึ่งถ้าประเมินร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* จะมีค่าระหว่าง 0.018 ถึงร้อยละ 3.73 (เฉลี่ยร้อยละ 1.00) ในขณะที่ร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* จะมีค่าระหว่าง 0.018 ถึงร้อยละ 1.25 (เฉลี่ยร้อยละ 0.29) ทั้งนี้พบว่า ความหนาแน่นของเชื้อในตัวอย่างผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในพื้นที่จังหวัดจันทบุรีมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตมากที่สุด (81,651 ตัวในเลือดปริมาตร 1 ไมโครลิตร) ในขณะที่ค่าดังกล่าวในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ในจังหวัดแม่ฮ่องสอนมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตที่สุด (28,028 ตัวในเลือดปริมาตร 1 ไมโครลิตร) เป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ติดเชื้อมาลาเรียร่วมกันระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* ทั้ง 3 รายมีค่าร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อตั้งแต่ 1.13 ถึงร้อยละ 1.60 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 อัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงหรือความหนาแน่นของเชื้อในตัวอย่างที่ศึกษาจำแนกตามพื้นที่

พื้นที่จังหวัด	ความหนาแน่นของเชื้อ (parasites/ μ l)		
	<i>Plasmodium falciparum</i> (geometric mean)	<i>Plasmodium vivax</i> (geometric mean)	<i>P.falciparum</i> + <i>P.vivax</i> (geometric mean)
จันทบุรี	2,800 – 186,640 (81,651)	880 – 48,880 (10,056)	0
ตาก	840 – 126,000 (45,439)	1,960 – 28,640 (9,459)	62,800
เชียงใหม่	4,400 – 60,400 (34,325)	8,800 – 53,240 (20,596)	0
เชียงราย	8,440 – 180,840 (40,912)	4,440 – 62,400 (11,993)	56,720
แม่ฮ่องสอน	12,440 – 164,800 (60,740)	17,600 – 42,440 (28,028)	80,320
รวม	848 – 186,640 (50,126)	880 – 62,400 (14,579)	56,720 – 80,320 (65,893)

หมายเหตุ ปริมาณเชื้อมาลาเรียในเลือดปริมาตร 1 ไมโครลิตร คิดเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดขาว 8,000 เซลล์

4.3 การพัฒนาวิธีการตรวจและจำแนกชนิดของมาลาเรียโดยวิธี PCR

เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีจำนวน copy ของ mitochondrial genome มากกว่า small subunit ribosomal RNA ประมาณ 10 ถึง 30 เท่า (Vaidya, 2005; Dame et al, 1983; Langsley et al, 1983) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธี PCR เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยใช้ยีนใน mitochondrial genome เป็นเป้าหมาย จากการวิ

เคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ genome ดังกล่าวจากเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนทั้ง 5 ชนิด พบว่ามีบริเวณที่น่าจะใช้เป็นเป้าหมายในการจำแนกชนิดของมาลาเรียได้ 4 บริเวณนอกเหนือจากบริเวณที่คณะผู้วิจัยเคยพัฒนามาก่อนหน้านี้แล้ว ดังนั้นในการประเมินประสิทธิภาพของ primers ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้จากบริเวณดังกล่าวในด้านความไวและความจำเพาะจึงอาศัยการเปรียบเทียบกับ PCR ที่คณะผู้วิจัยเคยพัฒนามาก่อนหน้านี้แล้วทั้ง primers จากส่วนของยีนใน mitochondrial genome (Putapomtip et al 2011) สำหรับ primers ทั้ง 4 ชุดที่พัฒนาขึ้นแสดงในภาพที่ 6 ถึง 9

malaria-specific primer-F

```
Pm AGCATAGTATATATGAAGGTTT-CTATGGAAACACACTTCCCTTCTCGCCATTTGATAGCGGTTAACCTTTTCCTTTCCCTTA
Po AGCATAGTCTATATGAAGGTTTCTATGGAAACACACTTCCCTTCTCGCCATTTGATAGCGGTTAACCTTTTCCTTTCCCTTA
Pv AGCATAGTCTATATGAAGGTTT-CTATGGAAACACACTTCCCTTCTCGCCATTTGATAGCGGTTAACCTTTTCCTTTCCCTTA
Pk AGCATAGTCTATATGAAGGTTT-CTATGGAAACACACTTCCCTTCTCGCCATTTGATAGCGGTTAACCTTTTCCTTTT-CCCTTA
Pf AGCATAGTATATATGAAGGTTT-CTATGGAAACACACTTCCCTTCTCGCCATTTGATAGCGGTTAACCTTTTCCTTTCCCTTA
*****
```

species-specific primer-F

```
Pm CGTACTCTA[REDACTED]GT-CTACATTAGATAC-TATATTTGAAACAGGACATATATGT---TCAAT
Po CGTACTCTA[REDACTED]GT-CAAATATAAGTAC-TTTAATCGAAACAGGACATATATGT---TACAT
Pv CGTACTCTA[REDACTED]T-CTATACTAGATAC-TATAGTTGAAACAGGACATATACATATATTCAT
Pk CGTACTCTA[REDACTED]T-CTATACTAGATAC-TATGGACGAAACAGGACATATA-----TTCAT
Pf CGTACTCTA[REDACTED]GTACAATTATTCATATATATATTTGAAACAGGACATACATGT---TCATT
*****
```

```
Pm TATTCTGAATAGAAATAGGAACCTCTATAAAATAACCATACTATTTCTATAAAATGCCAATATAAATATTGTTATTTGATCAGTAT
Po TATTCTGAATAGAAATAGGAACCTCTATAAAATAACCATACTATTTCTATAAAATGCCAATATAAATATTGTTATTTGATCAGTAT
Pv TATTCTGAATAGAAAAGAACTCTATAAAATAACCATACTATTTCAACAAAATGCCAGTATAAATATTGTAATTTGATCAGTAT
Pk TATTCTGAATAGAAAAGAACTCTATAAAATAACCATACTATTTCAACAAAATGCCAGTATAAATATTGTAATTTGATCAGTAT
Pf TATTCTGAATAGAAATAGGAACCTCTATAAAATAACCAGATATTTCAACAAAATGCCAATATAAAATTTGTAATTTGATCAGTAT
*****
```

R-species-specific primer

```
Pm GAGGTAATAAATATATGATATACC-ATATAATGAATATGACCATTCACATTT[REDACTED]ATTCTTATAA
Po GAGGTAATAAATATATGATATACC-ATATAGTGAATATGACCATTCGTTATTA[REDACTED]ATTCTTATAA
Pv GAGGTAATAAATATATGATATACC-ATATAATGAATATGACCATTCACATTTA[REDACTED]ATTCTTATAA
Pk GAGGTAATAAATATATGATATACC-ATATAATGAATATGACCATTCACAATTA[REDACTED]ATTCTTATAA
Pf GAGGTAATAAATATATGATATACC[REDACTED]TATA-BACCATTCGGTAGCA-TATCA[REDACTED]TATATTTCTATTATCTTATAA
*****
```

R-malaria-specific primer

```
Pm AGTATATTAATAATAATAAACCATAAATAACATGTGAAAAATGTAACCTGTAACACAATAAATAATGTTCCCTGAAAC
Po AGTATATCATTAATAAATAAACCACAATAAATAACATGTGAAAAATGTAACCTGTAACACAATAAATAATGTTACCAGATAT
Pv AATATATTAATAATAATAAACCACAATAAATAACATGTGAAAAATGTAACCTGTAACACAATAAATAATGTTACCAGATAT
Pk AATATATTAATAATAATAAACCACAATAAATAACATGTGAAAAATGTAACCTGTAACACAATAAATAATGTTACCAGATAT
Pf AGTATATPATTAATAATAAACCATTA[REDACTED]TACTACATGAGAAAAATGTAATCCTGTAACACAATAAATAATGTTAGTATATAC
*****
```

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit III ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium malariae* (Pm), *Plasmodium ovale* (Po), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium knowlesi* (Pk) และ *Plasmodium falciparum* (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

malaria-specific primer-F

species-specific primer-F

Pm ATAGAGCTCAAATCTTTATATACTATTGGCACCTCCATGTCGGTCTCATCGCA...
 Po ATAGAGCTCAAATCTTTATATACTATTGGCACCTCCATGTCGGTCTCATCGCA...
 Pv ATAGAGCTCAAATCTTTATATACTATTGGCACCTCCATGTCGGTCTCATCGCA...
 Pk ATAGAGCTCAAATCTTTATATACTATTGGCACCTCCATGTCGGTCTCATCGCA...
 Pf ATAGAGCTCAAATCTTTATATACTATTGGCACCTCCATGTCGGTCTCATCGCA...

Pm TATTGTTGCCCTTGTACACACCGCTCGTCACGCAAAATTTATATATTAAAGATAAAGA...
 Po TATTGTTGCCCTTGTACACACCGCTCGTCACGCAAAATTTATATTTCAAAGATAGAGA...
 Pv TATTGTTGCCCTTGTACACACCGCTCGTCACGCAAA-TTTATATTTACTAAGATAA...
 Pk TATTGTTGCCCTTGTACACACCGCTCGTCACGCAAA-TTTATATCACTAAGATAA...
 Pf TATTGTTGCCCTTGTACACACCGCTCGTCACGCAATATCAATATACT--GGGTATA...

R-species-specific primer

Pm AGATGAAACAGCCGAAAGGTAATATTACGTC...
 Po AGATGAAACAGCCGAAAGGTAATATTACGTC...
 Pv AGATGAAACAGCCGAAAGGTAATATTACGTC...
 Pk AGATGAAACAGCCGAAAGGTAATATTACGTC...
 Pf AGATGAAACAGCCGAAAGGTAATATTACGTC...

R-malaria-specific primer

Pm TTATGTTGTTGGTTTAAAGCCCTTTTACCATAACAAGAGATCGCGTACTTTGGATTG...
 Po TTATGTTGTTGGTTTAAAGCCCTTTT-ACCATAACAAGAGATCGCGTACTTTGGACT...
 Pv TTATGTTGTTGGTTTAAAGCCCTTTT-ACCATAACAAGAGATCGCGTACTTTGGACT...
 Pk TTATGTTGTTGGTTTAAAGCCCTTTT-ACCATAACAAGAGATCGCGTACTTTGGACT...
 Pf TTATGTTGTTGGTTTAAAGCCCTTATT-ACCATAACAAGAGATCGCGTACTTTGGACT...

ภาพที่ 7 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit III ของเชื้อ มาลาเรีย *Plasmodium malariae* (Pm), *Plasmodium ovale* (Po), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium knowlesi* (Pk) และ *Plasmodium falciparum* (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

malaria-specific primer-F

species-specific primer-F

Pm GTTCCAATTATATGGTTTATGTTTCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGAAATTTTCATTTTATATGGTCCG
 Po GTTCCAATTATATGGTTTATGTTTCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGTCCG
 Pv GTACCAATGATATGGTTTATGTTTCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTG...
 Pk GTACCAATGATATGGTTTATGTTTCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATTTTCATTTTATATGGTCCG
 Pf GTTCCATTTATATGGTTTATGTTTCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATATTCATTTTATATGGTCCG
 ** * * * *****

species-specific primer-F

Pm TCTATTTATTATAATCATCTCTCTAGTGGATTATTGGCACTTGTTCATTATAAAGAACAATATTATGATTACAGCTCCCAAGCAAACA
 Po TTTATTTATA-TATTATTTTCTCCAGTCTTTATTGTTACTTGTTCATTATAAAGAACAACATTATGATTACAGCTCCCAAGCAAACA
 Pv TTTATTTATAATCATCTCTCTAGTGGATTATTGGCACTTGTTCATTATAAAGAACAACATTATGATTACAGCTCCCAAGCAAACA
 Pk TTTATTTATAATAT...
 Pf TTTATTTATTGTTATTATTTTCTGAGTGGTTATTGTTACTTGTTCATTATAGACGAACACATTATGATTACAGCTCCCAAGCAAACA
 ** *****

R-species-specific primer

R-malaria-specific primer

Pm TTTAAAATTACAAGGCTACGATAAGACGATATTTCTGAATA...
 Po TTTAAA-TTACAAGGCTACGATAAGACGATATTTCTGAATA...
 Pv TTTAAA-TTACAAGGCTACGATAAGACGATATTTCTGAATA...
 Pk TTTAAA-TTACAAGTCTACGATAAGACAATATCTCTG...
 Pf TATAATATTACAAGATTGTGATAAGATGACATTTCTGAGTATTGACGCGAA...
 + * * *****

ภาพที่ 9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome b ของ *Plasmodium malariae* (Pm), *Plasmodium ovale* (Po), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium knowlesi* (Pk) และ *Plasmodium falciparum* (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

malaria-specific primer-F

Pm ACTTGATATTTCAAAACATACCTTTTCTAAAAGAAATGTAAACATGCAGTCATACATGATGCACCTTGCTAAAGTAAAT
Po ACTTGATATTTCAAAACATATCCCTTTTCTATAAGAAATGTAAACATGCTGTCATACATGATGCACCTTGCTAAATATAAAT
Pv ACTAGAAATTTCTAAAACATATCCCTTTTCTATTAGAAATGTAAACATGCTGTCATACATGATGCACCTTGCTAAAATAAAT
Pk ACTAGAAATTTCTAAAACATATCCCTTTTCTATTAGAAATGTAAACATGCTGTCATACATGATGCACCTTGCTAAAATAAAT
Pf ACTAGAGATTTCAAAACATATCCCTTTTCTATAAATACTTGTAAACATGCAGTCATACATGATGCACCTAGCTAAATATAAAT
*** ** ***** ***** * * ***** ***** ***** *****

species-specific primer-F

Pm GTAATAGTTAAAATTAACATTCCTTGATGAAGTTAATAAATTCCTTCATCATATAAAGGACATGGAGATAAACTAAAATGTA
Po GTAATAGTTAAAATTAACATTCCTTGATGAAGTTAATAAATTCCTTCATCATATAAAGGAGATGGAGATAAACTAAAATGTA
Pv GTAATAGTTAGAATTAACATTCCTTGATGATGTAAAATAATTCCTTCATCATATAAAGGACATGGAGATAAACTAAAATGTA
Pk GTAATAGTTAAAATTAACATTCCTTGATGATGTAAAATAATTCCTTCATCATATAAAGGACATGGAGATAAACTAAAATGTA
Pf GTAATAGTTAGAATTAACATTCCTTGATGAAGTTAATAAATACTTCATTAATTAATGGATATGGAGATAAACTAAAATGTA
***** ** ***** ***** * * ***** ***** ***** *****

Pm ATATACCCCAAAAATATGTAATAAATAAATGCCTTCAGATATAAATAATGATAACATACCAGATACTAATGAAGAAAATGT
Po ATATACCCCAAAAATATGTAATAAATAAATGCCTTCAGATATAAATAATGATAACATACCAGATACTAATGAAGAAAATGT
Pv AAATACCCCAAAAATATGTAATAAATAAATGCCTTCAGATATAAATAATGATAACATACCAGATACTAATGAAGAAAATGT
Pk AAATACCCCAAAAATATGTAATAAATAAATGCCTTCAGATATAAATAATGATAACATACCAGATACTAATGAAGAAAATGT
Pf ATATACCCCAAAAATATGTAATAAATAAATGCCTTCAGATATAAATAATGATAACATACCAGATACTAATGAAGAAAATGT
* ***** ** ***** ***** ***** ***** * * ***** ***** ***** *****

R-species-specific primer

Pm GGAATAAAAACCTTTCCTAATAGAAATATACAAAATTAATAAAATTTATTTGCTTAAAGGTAATAAATAACCAACAGAAAAG
Po AGAATAAAAACCTTTCCTAATAGAAATATACAAAATTAATAAATAATAGGATTAAGGTAATAAATAACCAACAGAAAAG
Pv AGAATAAAAACCTTTCCTAATAGAAATATACAAAATTAATAAATAATAGGATTAAGGTAATAAATAACCAACAGAAAAG
Pk AGAATAAAAACCTTTCCTAATAGAAATATACAAAATTAATAAATAATAGGATTAAGGTAATAAATAACCAACAGAAAAG
Pf AGAATAAAAACCTTTCCTAATAGAAATATACAAAATTAATAAATAATAGGATTAAGGTAATAAATAATCCCTACAGAAAAG
***** ***** ***** ***** * * ***** ***** ***** *****

R-species-specific primer

Pm TATTTTAAAGATGTTCCATATAATGATGTTAATGAAGGATAAGATATTAATGTGCTTTTATATTTTAAATTTAAATTA
Po TATTTTAAAGATGTTCCATATAATGATGTTAATGAAGGATAAGATATTAATGTGCTTTTACATATTTATAGTTACTAAATA
Pv TTTTAAAGATGTTCCATATAATGATGTTAATGAAGGATAAGATATTAATGTGCTTTAATATTTATAGTTACTAAATA
Pk TTTTAAAGATGTTCCATATAATGATGTTAATGAAGGATAAGATATTAATGTGCTTTTATATTTATAGTTACTAAATA
Pf TATTTTAAAGATGTTCCATATAATGATGTTAATGCAGGATATGAAACTAGATGTGCTTTTATATTTGATAAATTTACTAAATA
***** ***** ***** ***** * * ***** ***** ***** *****

R-malaria-specific primer

Pm CAAAAATATATTTATAAGAACGGTTATTTGTGTACCCTTAACATATAACGGTAAGAAGGTTCCCGGGGATAACAGGTTA
Po TAAAAATATATTTATAAGAACGGTGATTTTGTGTGCCGTTAACATATAACGGTAAGAAGGTTCCCGGGGATAACAGGTTA
Pv TAAAAATATATTTATAAGAACGGTGATTTTGTGTGCCGTTAACATATAACGGTAAGAAGGTTCCCGGGGATAACAGGTTA
Pk TAAAAATATATTTATAAGAACGGTAAATTTTGTGTGCCGTTAACATATAACGGTAAGAAGGTTCCCGGGGATAACAGGTTA
Pf ---AAAAATTTATAAGAACGGTGAGATAATGTGCCGTTAACATATAACGGTAAGAAGGTTCCCGGGGATAACAGGTTA
***** ***** ***** * * ***** ***** ***** *****

ภาพที่ 8 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit III ในส่วน 3' ของยีนของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium malariae* (Pm), *Plasmodium ovale* (Po), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium knowlesi* (Pk) และ *Plasmodium falciparum* (Pf) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นอักษรเข้มและขีดเส้นใต้ คือบริเวณของ PCR outer primers ส่วนบริเวณที่ระบายสีคือ PCR inner primers เครื่องหมายดอกจันคือตำแหน่ง ที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

ภายหลังจากการคัดเลือกและออกแบบ PCR primers แล้วได้ทำการทดสอบสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR โดยการปรับเปลี่ยน annealing temperature และระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีความไวและจำเพาะสำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด ผลการปรับสถานะเพื่อให้เกิดการสร้างสาย DNA ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละชุดของ primers แสดงในตารางที่ 4 ทั้งนี้ได้เปรียบเทียบกับ PCR ที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนา และรายงานไปก่อนหน้านี้ (Putaporntip et al, 2009; 2011; Jongwutiwes et al, 2011)

ตารางที่ 4 แสดงสภาวะ PCR สำหรับจำแนกชนิดของมาลาเรีย 5 ชนิดที่ใช้เปรียบเทียบ

DNA target (PCR ID)	Primer set	PCR condition	No. of cycle	Product (bp)
Cytochrome oxidase III (PCR-COXIII)	Primary PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s	40	362-371
	Nested PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s (same for all species-specific primers)	25	Pf = 211 Pv = 221 Pm = 221 Po = 219 Pk = 215
Cytochrome oxidase I (PCR-COXI)	Primary PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s	40	301-306
	Nested PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s (same for all species-specific primers)	25	Pf = 163 Pv = 167 Pm = 164 Po = 168 Pk = 165
Cytochrome b (PCR-Cytb-New)	Primary PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s	40	448-452
	Nested PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s (same for all species-specific primers)	25	Pf = 148 Pv = 181 Pm = 138 Po = 137 Pk = 131
Cytochrome oxidase III-3' (PCR-COXIII-3')	Primary PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s	40	445-449
	Nested PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s (same for all species-specific primers)	25	Pf = 187 Pv = 194 Pm = 131 Po = 269 Pk = 297
Cytochrome b (PCR-Cytb)*	Primary PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s	40	226-227
	Nested PCR	94°C 40 s, 50°C 30 s and 72°C 30 s (same for all species-specific primers)	25	Pf = 148 Pv = 181 Pm = 138 Po = 137 Pk = 131

* Outer primers: PCBF (5'-ATGCTTTATTATGGATTGGATGTC-3') and PCBR (5'-ACATAATTATAACCTTACGGTCTG-3'); *Plasmodium falciparum*: PFCBF (5'-ATTATTTATTGTATTATTTTCTG-3') and PFCBR (5'-GATTTGTCCGCTCAATAC-3'); *Plasmodium vivax*: PVCBF (5'-AGTTACCACAAGATATT-3') and PVCBR (5'-CTGTATTGTTCTGCTCAA-3'); *Plasmodium malariae*: PMCBF (5'-ATATCATCTTTTCTAGTGGT-3') and PMCBR (5'-CTGTATTGTTCTGCACGACAG-3'); *Plasmodium ovale*: POCBF (5'-ATATCATTTTCTCCAGTGGG-3') and POCBR (5'-CTGTATTGTTCTGCTCAT-3'); *Plasmodium knowlesi*: PKCBF (5'-TATTCTTCTTTAGTGGATTATTTA-3') and PKCBR (5'-GTATTGTTCTAATCAGTA-3') (Putaporntip et al, 2011)

เนื่องจากเชื้อมาลาเรียที่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยปราศจากการปนเปื้อน DNA ของคนมีเพียงชนิดเดียวคือ *Plasmodium falciparum* ดังนั้นเพื่อให้การเปรียบเทียบมีมาตรฐานเดียวกัน จึงได้ใช้ผลผลิต PCR ของ mitochondrial genome ทั้งหมดของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดเป็น DNA ต้นแบบซึ่งครอบคลุมความยาว 6 kb ทำการวัดความเข้มข้นของ DNA แล้วปรับให้เจือจางตัดเทียบกัน แล้วจึงเจือจางในระดับ 10 เท่า และ 5 เท่า หรือ 2 เท่าสำหรับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบผลผลิต PCR ได้ การประเมินประสิทธิภาพ PCR สำหรับแต่ละชุด primers ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ตัดสินผลบวกสุดท้ายจากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ผลบวก PCR อย่างน้อย 2 ใน 3 การทดสอบ โดยผลที่ได้แสดงเปรียบเทียบในตารางที่ 5 ซึ่งพบว่า PCR-COXIII, PCR-Cytb-New และ PCR-Cytb ที่ได้พัฒนาไว้ก่อนหน้านี้ (Putapomtip et al, 2011) ล้วนมีความไวตัดเทียบกัน โดยให้ผลบวกที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ความเจือจาง 1 ต่อ 2500 สำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดอย่างตัดเทียบกัน ในขณะที่ PCR-COXIII-3' ให้ความไวในการตรวจหา มาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi* ได้ตัดเทียบ กับ PCR-COXIII, PCR-Cytb-New และ PCR-Cytb แต่กลับพบว่าให้ผลบวกสำหรับ *Plasmodium malariae* ที่ความเจือจาง 1 ต่อ 1250 ในทางตรงข้าม PCR-COXI ให้ความไวในการตรวจหา มาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ความเจือจาง 1 ต่อ 2500 แต่ความไวดังกล่าวกลับลดลงในการตรวจ *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi* (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความไวของ PCR แต่ละแบบในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย

PCR set	Minimum positive dilution				
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>
PCR-COXIII	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500
PCR-COXI	1:2500	1:1250	1:1250	1:1250	1:1250
PCR-COXIII-3'	1:2500	1:2500	1:1250	1:2500	1:2500
PCR-Cytb-New	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500
PCR-Cytb	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500

เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ primers แต่ละชุดพบว่า PCR-COXI, PCR-Cytb-New และ PCR-Cytb ให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะสำหรับมาลาเรียแต่ละ species โดยไม่พบผลบวกหลงเลย ในขณะที่ PCR-COXIII และ PCR-COXIII-3' นั้นมีการเกิดผลบวกหลงสำหรับ primers ที่ใช้ในการตรวจเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* โดยพบว่าถ้า DNA ของ *Plasmodium vivax* ที่มีความเข้มข้นสูงมากกว่า 1 ต่อ 100 จะพบผลบวกหลงได้ในขณะที่ DNA ที่เจือจางลงจะไม่พบปัญหาดังกล่าว (ตารางที่ 6) ดังนั้นแม้ว่า PCR-COXIII จะให้ความไวในการตรวจตัดเทียบ กับ PCR-Cytb-New และ PCR-Cytb แต่การพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ primers สำหรับ *Plasmodium knowlesi* ทำให้ PCR ดังกล่าวไม่เหมาะสมในการพัฒนาต่อไป ซึ่งการปรับเปลี่ยน

primer ในส่วนนี้มีข้อจำกัดมากกว่า primer ที่ได้จากส่วนของ cytochrome b ดังนั้น PCR-Cytb-New เพียงชนิดเดียวที่ให้ความไวและความจำเพาะมากกว่า PCR ชุดอื่น ๆ ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของ PCR ดังกล่าวยังให้ผลที่เทียบแต่ไม่ดีกว่า PCR-Cytb ที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความจำเพาะของ PCR แต่ละแบบในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย

PCR set	Cross-reactivity with other malaria species				
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>
PCR-COXIII	no	no	no	no	<i>P. vivax</i>
PCR-COXI	no	no	no	no	no
PCR-COXIII-3'	no	no	no	no	<i>P. vivax</i>
PCR-Cytb-New	no	no	no	no	no
PCR-Cytb	no	no	no	no	no

4.4 การพัฒนาวิธีการเตรียม DNA จากเลือด น้ำลาย และปัสสาวะ

ในการศึกษาก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ทำการเตรียม DNA จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปคือ Qiagen DNA Mini Kit (Hilden, Germany) ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงประมาณ 20 µl ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการเพิ่มปริมาณตัวอย่างเป็น 200 µl โดยใช้ชุดตรวจเดียวกันและเปรียบเทียบกับชุดสกัด DNA ที่อาศัยหลักการของขี้ผึ้งแม่เหล็กในการจับ DNA โดยใช้ชุดเตรียมคือ MagMAX DNA multi sample kit (Foster City, USA) ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่าง 200 µl เช่นเดียวกัน ดังนั้นก่อนการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการเตรียม DNA จากเลือด น้ำลาย และปัสสาวะ จึงได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจเหล่านี้สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด โดยการเติม DNA ของ mitochondrial genome ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ซึ่งสามารถวัดปริมาณ DNA และคำนวณความเข้มข้นได้ ดังนั้นจึงทราบจำนวน copy ของ mitochondrial genome ที่เติมลงในตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะได้ จากความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคู่เบส น้ำหนักโมเลกุลและจำนวนชุดของ mitochondrial genome สำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคู่เบส น้ำหนัก โมเลกุล และจำนวนชุดของ mitochondrial genome สำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด

Mitochondrial genome	Sequence length (bp)	Molecular weight/ds DNA (Da)	Number of copy/pg of ds DNA
<i>Plasmodium falciparum</i>	5949	3674852.43	155,975
<i>Plasmodium vivax</i>	5990	3700110.38	154,908
<i>Plasmodium malariae</i>	5970	3687719.06	155,426
<i>Plasmodium ovale</i>	5972	3689002.88	155,374
<i>Plasmodium knowlesi</i>	5957	3679726.05	155,766

เนื่องจาก PCR ที่ใช้ตรวจจำแนกชนิดของมาลาเรียที่มีความไวและความจำเพาะมากที่สุดคือ PCR-Cytb-New และ PCR-Cytb แต่เนื่องจาก PCR-Cytb ได้รับการพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพมาก่อนอย่างชัดเจน (Putapomtip et al, 2011) ดังนั้นในการประเมินประสิทธิภาพของการเตรียม DNA จึงใช้การวัดผลจาก PCR-Cytb เพียงระบบเดียว ซึ่งในการศึกษานี้ได้เตรียม DNA ของเชื้อมาลาเรียที่มีจำนวนชุดของ mitochondrial genome แตกต่างกันซึ่งเทียบเท่ากับจำนวน 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 copies ดังแสดงในตารางที่ 8 และเติมลงในตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) น้ำลายและปัสสาวะที่ได้จากอาสาสมัคร 4 รายที่ไม่ได้มีอาการใช้ตลอดจนตรวจไม่พบ DNA ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด ในตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะ โดยใช้ปริมาตรตัวอย่างละ 1 ml สำหรับตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะได้ทำการเติม buffy coat 20 μ l ซึ่งมีเซลล์เม็ดโลหิตขาวประมาณ 160,000 เซลล์ ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเหล่านี้โดยใช้ 20 μ l (สกัดข้ามคืน) และ 200 μ l สำหรับชุดสกัด Qiagen DNA Mini Kit และใช้ 200 μ l สำหรับ MagMAX DNA multi sample kit

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบ ประสิทธิภาพในการเตรียม DNA ในตัวอย่างต่าง ๆ โดยใช้ชุดสกัด DNA ต่างกัน*

Species	Genome copies	Blood			Urine			Saliva		
		Q20	Q200	M200	Q20	Q200	M200	Q20	Q200	M200
<i>Plasmodium falciparum</i>	10,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	-	+	+	-	+	±	-	+	±
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plasmodium vivax</i>	10,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	-	+	+	-	+	±	-	+	±
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plasmodium malariae</i>	10,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,000	±	+	+	±	+	+	±	+	+
	100	-	+	±	-	±	±	-	±	±
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plasmodium ovale</i>	10,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	-	+	±	-	+	±	-	+	±
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plasmodium knowlesi</i>	10,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,000	+	+	+	±	+	+	+	+	+
	100	-	±	+	-	±	±	-	+	±
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Q20 และ Q200 คือ Qiagen DNA mini kit ที่ใช้ตัวอย่าง 20 μ l และ 200 μ l ตามลำดับ M200 คือ MagMAX DNA multi sample kit ใช้ตัวอย่าง 200 μ l

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเตรียม DNA ในตัวอย่างต่าง ๆ โดยใช้ชุดสกัด DNA ที่ต่างกัน พบว่าการใช้ Qiagen DNA Mini Kit ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่างเพียง 20 µl ให้ผลดีน้อยกว่าการเตรียม DNA โดยวิธีอื่น ซึ่งวิธี Qiagen DNA Mini Kit ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่าง 200 µl ให้ผลการตรวจหา DNA ของมาลาเรียได้ดีกว่าการใช้ MagMAX DNA multi sample kit กล่าวคือในปริมาณ DNA 100 copies พบว่า Qiagen DNA Mini Kit ซึ่งใช้ ปริมาณตัวอย่าง 200 µl ให้ผลบวกทั้ง 4 ครั้งในการตรวจสอบยกเว้นตัวอย่างเลือดในการตรวจหา *Plasmodium knowlesi* และตัวอย่างปัสสาวะในการตรวจหา *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium knowlesi* ในขณะที่ MagMAX DNA multi sample kit ให้ผลบวกทั้ง 4 ครั้งสำหรับ DNA 100 copies ในการตรวจหา *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium knowlesi* ในเลือดและ *Plasmodium knowlesi* ในตัวอย่างน้ำลาย (ตารางที่ 8)

4.5 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด น้ำลาย และปัสสาวะ

เมื่อนำ DNA จากตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะที่เตรียมโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปคือ Qiagen DNA Mini Kit ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่างเพียง 20 µl มาสกัด DNA และนำมาทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยใช้ PCR-Cytb ที่จำเพาะกับ *Plasmodium* แต่ละชนิด โดยทำการทดสอบเพื่อหาเชื้อมาลาเรียชนิดที่พบในคน 5 ชนิด จากผลการตรวจโดยวิธี PCR ดังกล่าวพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง 5 ชนิดที่พบในคน รวมทั้งพบ การติดเชื่อปะปนระหว่างเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันได้มากกว่าการตรวจจากแผ่นฟิล์ม โลหิตซึ่งตรวจวินิจฉัยได้ เฉพาะ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax*, รวมทั้งพบการติดเชื่อร่วมกันเพียง 3 ตัวอย่าง ในขณะที่ PCR สามารถตรวจพบการติดเชื่อร่วมกันมากถึง 11 ตัวอย่างจากการใช้ DNA ที่ได้จากเลือด และสามารถตรวจ พบเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถึง 7 ราย ในขณะที่ผู้ป่วยทุกรายที่ ตรวจพบเชื้อจากฟิล์ม โลหิตให้ผลการตรวจโดยวิธี PCR เป็นบวกทุกราย ดังนั้นจำนวนผู้ติดเชื่อ โดยรวมจากการ ตรวจโดย PCR จากตัวอย่างเลือดที่ใช้เลือดปริมาตร 20 µl โดยรวมจึงมีจำนวน 248 ราย สำหรับผลการตรวจโดย ใช้ตัวอย่างน้ำลายพบว่าให้ผลบวกทั้งสิ้น 223 ตัวอย่าง ในขณะที่ตัวอย่างปัสสาวะให้ผลบวกน้อยกว่าคือ 199 ตัวอย่าง เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างน้ำลายสามารถตรวจพบการติดเชื่อมาลาเรียร่วมกันดังที่ตรวจพบได้ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ 3 ราย ได้อย่างสอดคล้องกัน และยังตรวจพบการติดเชื่อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium vivax* ร่วมกับ *Plasmodium malariae* 1 ราย และ *Plasmodium vivax* ร่วมกับ *Plasmodium knowlesi* 1 ราย ซึ่งตัวอย่าง ทั้งสองตรวจพบเฉพาะตัวอย่าง *Plasmodium vivax* จากฟิล์ม โลหิต อย่างไรก็ตามการพบการติดเชื่อร่วมกันจาก การตรวจจาก DNA ที่ได้จากตัวอย่างปัสสาวะพบว่าให้ผลบวกเพียงรายเดียวซึ่งเป็นตัวอย่างที่พบการติดเชื่อ ร่วมกันจากฟิล์ม โลหิต แม้ว่าการตรวจ โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือดจะพบการติดเชื่อมาลาเรียในปริมาณที่ต่ำ กว่าที่สามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 11 ราย แต่วิธี PCR สามารถตรวจพบภาวะดังกล่าวจากการ ใช้ ตัวอย่างน้ำลายเพียง 1 รายและตรวจไม่พบเลยจากตัวอย่างปัสสาวะ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ติดเชื่อ *Plasmodium falciparum* จำนวน 9 ราย และผู้ป่วยที่ติดเชื่อ *Plasmodium vivax* จำนวน 10 รายจากการตรวจจากฟิล์ม โลหิต ให้ผลการตรวจเป็นลบ โดยวิธี PCR ซึ่งผลลบดังกล่าวจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อตรวจจากตัวอย่างปัสสาวะกล่าวคือ ผู้ป่วยที่ติดเชื่อ *Plasmodium falciparum* จำนวน 21 ราย และผู้ป่วยที่ติดเชื่อ *Plasmodium vivax* จำนวน 19 ให้ผล การตรวจเป็นลบ ซึ่งโดยรวมแล้วตัวอย่างน้ำลายให้ผลบวก 223 รายและตัวอย่างปัสสาวะให้ผลบวก 199 ราย (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างเลือด (B) น้ำลาย (S) และปัสสาวะ (U) โดยใช้ชุดสกัด Qiagen DNA minikit ที่ใช้เลือด 20 µl กับการตรวจวินิจฉัยจากฟิล์มโลหิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Microscopy	F			V			FV			Negative			Total		
	B	S	U	B	S	U	B	S	U	B	S	U	B	S	U
PCR															
F	107	100	89	2	2	-	-	-	-	4	1	-	113	103	89
V	1	1	-	121	114	109	-	-	-	2	-	-	124	115	109
FV	2	-	-	1	-	-	3	3	1	1	-	-	7	3	1
VM	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0
VK	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0
VO	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Negative	-	9	21	-	10	19	-	-	2	254	260	261	254	279	303
Total PCR positives	110	101	89	128	118	109	3	3	1	7	1	0	248	223	199
Total slide results	110	110	110	128	128	128	3	3	3	261	261	261	502	502	502

หมายเหตุ F = *Plasmodium falciparum*; V = *Plasmodium vivax*; FV = *Plasmodium falciparum*+*Plasmodium vivax*; VM = *Plasmodium vivax* + *Plasmodium malariae*; VK = *Plasmodium vivax* + *Plasmodium knowlesi* และ VO = *Plasmodium vivax* + *Plasmodium ovale*

สำหรับการตรวจโดยใช้ DNA ที่เตรียมจากตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะปริมาตร 200 µl โดยวิธี PCR พบว่าการใช้ตัวอย่างเลือดให้ผลการตรวจที่ดีที่สุด รองลงมาคือผลการตรวจจากน้ำลาย ส่วนผลการตรวจจากตัวอย่างปัสสาวะให้ผลการตรวจพบมาลาเรียได้น้อยกว่าวิธีอื่น ๆ กล่าวคือ ผลการตรวจจากตัวอย่างเลือดให้ผลการตรวจที่สอดคล้องกับการตรวจหาเชื้อจากแผ่นฟิล์มโลหิตจำนวน 473 ตัวอย่าง (ตรวจพบ *Plasmodium falciparum* จำนวน 104 ราย *Plasmodium vivax* จำนวน 121 ราย *Plasmodium falciparum* ร่วมกับ *Plasmodium vivax* จำนวน 3 รายและตรวจไม่พบเชื้อ 245 ราย) ซึ่งตัวอย่างจากผู้ป่วย 69 รายที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันนั้น เป็นตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากฟิล์มโลหิตจำนวน 6 รายในขณะที่ PCR ตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* รวมด้วยจำนวน 5 ราย ส่วน 1 รายที่เหลือเป็นการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วย 7 รายที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* จากการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นกลับพบว่าวิธี PCR จากตัวอย่างเลือดมีการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* รวมด้วยจำนวน 2 ราย มีการติดเชื้อ *Plasmodium malariae* รวมด้วยจำนวน 2 รายมีการติดเชื้อ *Plasmodium ovale* รวมด้วย 1 ราย และ *Plasmodium knowlesi* รวมด้วย 1 ราย ส่วน 1 รายที่เหลือเป็นการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* เพียงชนิดเดียว โดยไม่พบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เลย ในทางตรงข้ามตัวอย่างจากผู้ป่วย 16 รายที่ตรวจไม่พบการติดเชื้อมาลาเรียกลับตรวจพบเชื้อโดยวิธี PCR ได้แก่ *Plasmodium falciparum* จำนวน 8 ราย *Plasmodium vivax* จำนวน 7 ราย และ *Plasmodium falciparum* ร่วมกับ *Plasmodium vivax* จำนวน 1 ราย

ผลการตรวจโดยวิธี PCR จากตัวอย่างน้ำลายพบว่าให้ผลสอดคล้องกับการตรวจจากแผ่นฟิล์มโลหิตจำนวน 480 ตัวอย่าง (ตรวจพบ *Plasmodium falciparum* จำนวน 103 ราย *Plasmodium vivax* จำนวน 121 ราย

Plasmodium falciparum ร่วมกับ *Plasmodium vivax* จำนวน 3 ราย และตรวจไม่พบเชื้อ 253 ราย) ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับผลจากจากฟิล์มโลหิตมีจำนวน 22 ราย เป็นตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Plasmodium falciparum* หรือ *Plasmodium vivax* เพียงชนิดเดียวอย่างละ 7 ราย ในขณะที่ PCR ตรวจพบการติดเชื้อร่วมกันมากกว่า 1 จำนวน 6 ราย ผลการตรวจชนิดของมาลาเรียไม่สอดคล้องกัน 2 ราย และตรวจไม่พบเชื้อ 6 ราย สำหรับตัวอย่างจากผู้ป่วย 8 รายที่ตรวจไม่พบการติดเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กลับตรวจพบเชื้อโดยวิธี PCR ได้แก่ *Plasmodium falciparum* จำนวน 3 ราย *Plasmodium vivax* จำนวน 3 ราย และ *Plasmodium falciparum* ร่วมกับ *Plasmodium vivax* จำนวน 2 ราย ในทางตรงข้ามการตรวจโดยวิธี PCR จากตัวอย่างน้ำลายพบว่าให้ผลลบลง 6 ตัวอย่าง สำหรับผลการตรวจจากตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี PCR พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการตรวจจากแผ่นฟิล์มโลหิตจำนวน 483 ตัวอย่าง ผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกัน 19 ตัวอย่างนั้นเป็นการตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด 3 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบเชื้อไม่ตรงชนิด 2 ตัวอย่าง ผลการตรวจจากฟิล์มโลหิตพบเชื้อแต่วิธี PCR จากตัวอย่างปัสสาวะกลับเป็นผลลบ 6 ตัวอย่าง และผลการตรวจจากฟิล์มโลหิตไม่พบเชื้อแต่วิธี PCR ให้ผลบวกจำนวน 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างเลือด (B) น้ำลาย (S) และปัสสาวะ (U) โดยใช้ชุดสกัด Qiagen DNA minikit ที่ใช้เลือด 200 µl กับการตรวจวินิจฉัยจากฟิล์มโลหิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Microscopy	F			V			FV			Negative			Total		
	B	S	U	B	S	U	B	S	U	B	S	U	B	S	U
F	104	103	102	1	1	1	-	-	-	8	3	2	113	107	105
V	1	1	1	121	121	122	-	-	-	7	3	2	129	125	125
FV	5	2	1	2	-	-	3	3	3	1	2	1	11	7	5
VM	-	-	-	2	2	1	-	-	-	-	-	-	2	2	1
VK	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1
VO	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0
Negative	-	4	6	-	2	3	-	-	-	245	253	256	245	259	265
Total PCR positives	110	106	104	128	126	125	3	3	3	16	8	5	257	243	237
Total slide results	110	110	110	128	128	128	3	3	3	261	261	261	502	502	502

หมายเหตุ F = *Plasmodium falciparum*; V = *Plasmodium vivax*; FV = *Plasmodium falciparum*+*Plasmodium vivax*; VM = *Plasmodium vivax* + *Plasmodium malariae*; VK = *Plasmodium vivax* + *Plasmodium knowlesi* และ VO = *Plasmodium vivax* + *Plasmodium ovale*

เมื่อทำการประเมิน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจแต่ละวิธีจากตัวอย่างต่าง ๆ กัน โดยเลือกใช้วิธีการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นตัวเทียบเคียงพบว่าการตรวจโดยวิธี PCR จากการใช้ตัวอย่างเลือด 20 µl สามารถตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* เพิ่มขึ้นร้อยละ 6.2 และตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.1 นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้น

ถึง 3.667 เท่า ในขณะที่การใช้ปริมาณตัวอย่างเลือดเพิ่มขึ้นเป็น 200 µl พบว่าประสิทธิภาพการตรวจ โดยวิธี PCR ให้ผลดีขึ้นชัดเจน กล่าวคือสามารถตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.7 และตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพิ่มขึ้นร้อยละ 9.9 และสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากการใช้เลือด 200 µl ดีกว่าการใช้เลือด 20 µl โดยสามารถตรวจหา *Plasmodium falciparum* เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.3 และตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพิ่มขึ้นร้อยละ 6.7 และสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 36.4 เมื่อพิจารณาโดยรวมจะพบว่าประสิทธิภาพการตรวจ โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด 20 µl และ 200 µl ให้ผลดีขึ้นกว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตร้อยละ 2.9 และร้อยละ 6.6 ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพโดยรวมของการใช้เลือด 200 µl ให้ผลดีขึ้นกว่าการใช้เลือด 20 µl คิดเป็นร้อยละ 3.6 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย โดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างเลือดที่เตรียมโดยใช้ปริมาตรต่างกัน

Category	Microscopy No. positive	Qiagen kit (20 µl sample)		Qiagen kit (200 µl sample)		
		No. positive	Efficacy ratio*	No. positive	Efficacy ratio#	Efficacy ratio¶
<i>P. falciparum</i>	113	120	1.062	124	1.097	1.033
<i>P. vivax</i>	131	135	1.031	144	1.099	1.067
<i>P. malariae</i>	0	2	**	2	**	1.000
<i>P. ovale</i>	0	1	**	1	**	1.000
<i>P. knowlesi</i>	0	1	**	1	**	1.000
Co-infections	3	11	3.667	15	5.000	1.364
Total malaria cases	241	248	1.029	257	1.066	1.036

หมายเหตุ

* Ratio of positives by Qiagen kit (20 µl sample) to microscopy.

Ratio of positives by Qiagen kit (200 µl sample) to microscopy.

¶ Ratio of positives by Qiagen kit (200 µl sample) to Qiagen kit (20 µl sample).

** Denominator is zero.

สำหรับประสิทธิภาพของการตรวจ โดยวิธี PCR จากตัวอย่างน้ำลาย 20 µl พบว่าให้ผลการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium falciparum* น้อยกว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตร้อยละ 6.2 และตรวจหาเชื้อ *Plasmodium vivax* ได้น้อยกว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตร้อยละ 8.4 แต่สามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 66.7 อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพโดยรวมลดลงร้อยละ 7.5 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตามกลับพบว่าการใช้ปริมาณตัวอย่างน้ำลายในการเตรียม DNA เพิ่มขึ้นเป็น 200 µl กลับพบว่าวิธี PCR ให้ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียดีกว่าผลการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิต โดยสามารถตรวจพบ *Plasmodium falciparum* เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.9 และตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.8 และสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้น 3.667 เท่า และประสิทธิภาพโดยรวมเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.5 ทั้งนี้การใช้ตัวอย่างน้ำลายเพิ่มขึ้นจาก 20 µl เป็น 200 µl พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหา *Plasmodium*

falciparum เพิ่มขึ้นร้อยละ 7.5 ตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.3 และสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้น 2.2 เท่า และประสิทธิภาพโดยรวมเพิ่มขึ้นร้อยละ 16.1 (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างน้ำลายที่เตรียมโดยใช้ปริมาตรต่างกัน

Category	Microscopy No. positive	Qiagen kit (20 µl sample)		Qiagen kit (200 µl sample)		
		No. positive	Efficacy ratio*	No. positive	Efficacy ratio#	Efficacy ratio¶
<i>P. falciparum</i>	113	106	0.938	114	1.009	1.075
<i>P. vivax</i>	131	120	0.916	136	1.038	1.133
<i>P. malariae</i>	0	1	**	2	**	2.000
<i>P. ovale</i>	0	0	**	1	**	**
<i>P. knowlesi</i>	0	1	**	1	**	1.000
Co-infections	3	5	1.667	11	3.667	2.200
Total malaria cases	241	223	0.925	259	1.075	1.161

หมายเหตุ

* Ratio of positives by Qiagen kit (20 µl sample) to microscopy.

Ratio of positives by Qiagen kit (200 µl sample) to microscopy.

¶ Ratio of positives by Qiagen kit (200 µl sample) to Qiagen kit (20 µl sample).

** Denominator is zero.

ในการตัวอย่างปัสสาวะสำหรับตรวจโดยวิธี PCR พบว่าประสิทธิภาพของการใช้ตัวอย่าง 20 µl นั้นให้ผลการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium falciparum* ได้น้อยกว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตถึงร้อยละ 20.4 และตรวจหาเชื้อ *Plasmodium vivax* ลดลงถึงร้อยละ 26 รวมทั้งตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดลดลงร้อยละ 66.7 และพบว่าประสิทธิภาพโดยรวมลดลงถึงร้อยละ 17.4 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะในการเตรียม DNA เพิ่มขึ้นเป็น 200 µl กลับพบว่าวิธี PCR ให้ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ผลใกล้เคียงกับการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิต โดยสามารถตรวจพบ *Plasmodium falciparum* ลดลงเพียงร้อยละ 2.7 และตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.8 และสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้น 2.333 เท่า และประสิทธิภาพโดยรวมลดลงเพียงร้อยละ 1.7 ทั้งนี้การใช้ตัวอย่างปัสสาวะเพิ่มขึ้นจาก 20 µl เป็น 200 µl ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหา *Plasmodium falciparum* เพิ่มขึ้นร้อยละ 22.2 ตรวจพบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพิ่มขึ้นร้อยละ 20 และสามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดเพิ่มขึ้น 7 เท่า และประสิทธิภาพโดยรวมเพิ่มขึ้นร้อยละ 19.1 (ตารางที่ 13)

เมื่อทำการเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (accuracy) สัดส่วนความน่าจะเป็นให้ผลถูกต้องเมื่อการทดสอบเป็นบวก (likelihood ratio of positive test) และสัดส่วนความน่าจะเป็นให้ผลถูกต้องเมื่อการทดสอบเป็นลบ (likelihood ratio of negative test) โดยใช้ผลการตรวจจากตัวอย่าง DNA ที่เตรียมจากเลือด 200 µl เป็นผลอ้างอิงสำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่างปัสสาวะที่เตรียมโดยใช้ปริมาตรต่างกัน

Category	Microscopy No. positive	Qiagen kit (20 µl sample)		Qiagen kit (200 µl sample)		
		No. positive	Efficacy ratio*	No. positive	Efficacy ratio#	Efficacy ratio¶
<i>P. falciparum</i>	113	90	0.796	110	0.973	1.222
<i>P. vivax</i>	131	110	0.840	132	1.008	1.200
<i>P. malariae</i>	0	0	**	1	**	**
<i>P. ovale</i>	0	0	**	0	**	**
<i>P. knowlesi</i>	0	0	**	1	**	**
Co-infections	3	1	0.333	7	2.333	7.000
Total malaria cases	241	199	0.826	237	0.983	1.191

หมายเหตุ * Ratio of positives by Qiagen kit (20 µl sample) to microscopy.
 # Ratio of positives by Qiagen kit (200 µl sample) to microscopy.
 ¶ Ratio of positives by Qiagen kit (200 µl sample) to Qiagen kit (20 µl sample).
 ** Denominator is zero.

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR-Cytb จากตัวอย่าง

Category	Species	% Sensitivity	% Specificity	Accuracy	Likelihood Ratio	
					Positive test	Negative test
Microscopy						
	<i>P. falciparum</i>	90.32	99.74	97.41	341.41	0.097
	<i>P. vivax</i>	90.91	99.72	97.21	326.36	0.091
Qiagen kit (20 µl)						
Blood	<i>P. falciparum</i>	96.77	100	99.20	infinity*	0.032
	<i>P. vivax</i>	97.78	96.73	97.01	29.90	0.023
Saliva	<i>P. falciparum</i>	85.48	100	96.41	infinity	0.145
	<i>P. vivax</i>	83.33	100	95.22	infinity	0.167
Urine	<i>P. falciparum</i>	71.77	100	93.03	infinity	0.282
	<i>P. vivax</i>	76.39	100	93.23	infinity	0.236
Qiagen kit (200 µl)						
Saliva	<i>P. falciparum</i>	91.94	100	98.01	infinity	0.081
	<i>P. vivax</i>	93.75	99.72	98.01	335.62	0.063
Urine	<i>P. falciparum</i>	88.71	100	97.21	infinity	0.113
	<i>P. vivax</i>	91.67	100	97.61	infinity	0.083

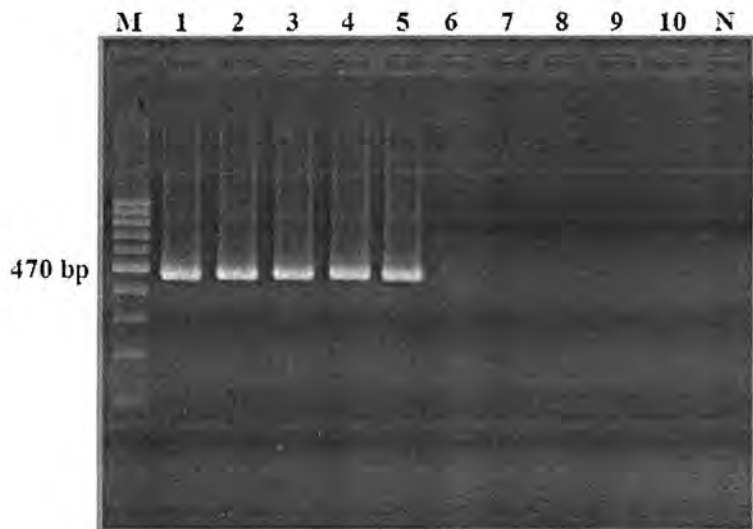
หมายเหตุ ใช้ผลการตรวจจากเลือดที่สกัด DNA โดยใช้ Qiagen kit (200 µl sample) เป็น reference standard
 * Infinity (Denominator is zero).

Plasmodium vivax ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งจะพบว่าทุกการทดสอบให้ค่าความจำเพาะในการตรวจมากกว่าร้อยละ 99 ยกเว้น การวินิจฉัย *Plasmodium vivax* จากตัวอย่างเลือดที่เตรียมจากปริมาตร 20 μ l ให้ค่าความจำเพาะร้อยละ 96.73 สำหรับค่า accuracy นั้นพบว่าทุกการทดสอบให้ค่าความแม่นยำในการทดสอบสูงเกินร้อยละ 95 ยกเว้นการทดสอบที่ใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 20 μ l ในการทำ PCR ซึ่งให้ค่าดังกล่าวที่ร้อยละ 93.03 นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ค่า likelihood ratio ของการตรวจที่เป็นบวกพบว่ามีค่าสูงทุกการทดสอบในขณะที่ค่า likelihood ratio ของการตรวจที่เป็นลบมีค่าต่ำสำหรับทุกการทดสอบ อย่างไรก็ตามการทดสอบที่ต่างกันเหล่านี้มีค่าความไวแตกต่างกัน ทั้งนี้ความไวในการตรวจโดยใช้ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะเพียง 20 μ l ให้ความไวในการทดสอบต่ำกว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิต โดยค่าความไวอยู่ในช่วงร้อยละ 71.77 ถึงร้อยละ 85.48 ในขณะที่ค่าความไวดังกล่าวโดยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตมีค่าความไวร้อยละ 90.32 ถึงร้อยละ 90.91 เป็นที่น่าสังเกตว่าผลการตรวจโดยวิธี PCR จากตัวอย่าง DNA จากน้ำลาย 200 μ l ให้ผลการตรวจดีกว่า การตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เล็กน้อยในขณะที่การตรวจโดยใช้ตัวอย่าง DNA จากปัสสาวะ 200 μ l ให้ค่าความไวมากกว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตสำหรับ *Plasmodium vivax* ในขณะที่ค่าความไวสำหรับ *Plasmodium falciparum* มีค่าต่ำกว่าการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพียงร้อยละ 1.61 (ตารางที่ 14)

4.6 การวิเคราะห์รูปแบบอัลลีลของ *PfMSP2*

4.6.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer ของยีน *PfMsp2*

โครงสร้างของยีน *PfMsp2* นั้นประกอบด้วยส่วน 5' และ 3' ที่มีลำดับเบสคงที่สูงไม่เปลี่ยนแปลงตามสายพันธุ์ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในขณะที่ส่วนกลางของยีนประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย ได้แก่ ส่วนย่อยที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้ำกันในลักษณะของ repeats และส่วนย่อยของ non-repeats ซึ่งมีความแตกต่างตามสายพันธุ์ของเชื้อ อย่างไรก็ตามความหลากหลายของยีน *PfMsp2* สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มอัลลีล FC27 และกลุ่มอัลลีล 3D7 ดังนั้นจึงได้ออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อการแยกอัลลีลทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วยวิธี PCR haplotyping และเมื่อนำชุด primer 3D7F/3D7R มาทดสอบกับตัวอย่างที่ทราบลำดับเบสว่าเป็นอัลลีลชนิด 3D7 จำนวน 5 ตัวอย่างคือ TSY26, TSY1187, TSY1236, TSY1742 และ TSY1748 ปรากฏว่า primer ชุดนี้ให้ผลบวกกับตัวอย่างเหล่านี้ทั้งหมด แต่ให้ผลลบเมื่อใช้ตัวอย่างที่มีรูปแบบอัลลีลแบบ FC27 จำนวน 5 ตัวอย่างคือ TSY12, TSY304, TSY577, TSY673 และ TSY1748 ในทำนองเดียวกันเมื่อทำ PCR โดยใช้ชุด primer FC27F/FC27R ก็ให้ผลบวกกับ template DNA ที่มีรูปแบบอัลลีล FC27 ทั้งหมด และให้ผลลบ PCR กับตัวอย่างที่มีอัลลีลแบบ 3D7 ดังนั้น primer ที่ออกแบบในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความจำเพาะสูงต่ออัลลีลทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 10 และภาพที่ 11



ภาพที่ 10 แสดงการทดสอบความจำเพาะของ primer ชุด 3D7F/3D7R ที่ให้ผลผลิต PCR บวกของยีน *PfmSp2* ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ใน 2 % agarose gel แถวที่ 1-5 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล 3D7 ส่วนแถวที่ 6-10 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล FC27 M คือ molecular weight marker และ N คือ negative control

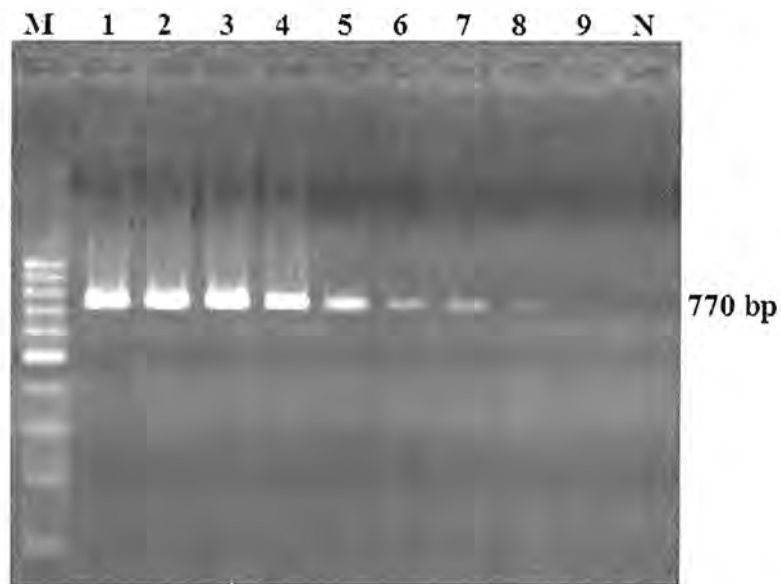


ภาพที่ 11 แสดงการทดสอบความจำเพาะของ primer ชุด FC27F/FC27R ที่ให้ผลผลิต PCR บวกของยีน *PfmSp2* ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ใน 2 % agarose gel แถวที่ 1-5 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล 3D7 ส่วนแถวที่ 6-10 เป็นตัวอย่างเชื้อที่มีรูปแบบอัลลีล FC27 M คือ molecular weight marker และ N คือ negative control

4.6.2 การทดสอบความไวของ primer ของยีน *PfmSp2*

โดยนำผลผลิต PCR ของยีน *PfmSp2* ที่ได้จากการใช้ชุด primer FMSP2F0/FMSP2R0 มาเป็นตัวตรวจสอบความไวของ primer ชุด 3D7F/3D7R และ FC27F/FC27R ที่ออกแบบไว้ โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวัดค่า OD เพื่อหาความเข้มข้น จากนั้นนำมาทำ dilution เพื่อให้ได้จำนวน copy ของยีน *PfmSp2* จำนวน 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 5 และ 1 copy ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 12 จากนั้นนำ template ที่ทราบจำนวน copy ไปเป็น template สำหรับทำ PCR ของ primer ชุด 3D7F/3D7R และ FC27F/FC27R ซึ่งความไวที่ทดสอบนี้

มาจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และให้ผลสอดคล้องกัน ตารางที่ 15 เป็นการสรุปความไวของวิธีการทำ haplotyping ของยีน *PfMsp2* ที่ได้จากการใช้ชุด primer ที่ออกแบบไว้ต่าง ๆ กัน จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าจำนวน copy ของ template DNA ที่ต่ำสุดที่สามารถก่อให้เกิดผลผลิต PCR ได้ในแต่ละชุด primer คือ 5 copies แสดงให้เห็นว่าวิธีการ haplotyping ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูงมาก จากนั้นได้ทำการทดสอบความไวของ primer เพิ่มเติมในกรณีตัวอย่างที่จะนำมาตรวจสอบนั้นมีการติดเชื้อที่มีอัลลีลต่างชนิดกันปะปนอยู่โดยการผสม template DNA ต่างอัลลีลกันเข้าด้วยกัน โดยใช้ตัวอย่าง DNA ที่มีรูปแบบอัลลีลแบบ 3D7 และ FC27 ได้แก่ตัวอย่าง TSY26 และ TSY12 ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับตรงกันกับอัลลีลที่ใช้ทดสอบและชุด primer



ภาพที่ 12 agarose gel electrophoresis แสดงการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer FMSP2F/FMSP2R แถวที่ 1-9 แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จำนวน copy ของยีน *PfMsp2* ที่ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 5 copies ตามลำดับ M คือ molecular weight marker และ N คือ negative control

ตารางที่ 15 ความไวของชุด primer ที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR ของยีน *PfMsp2*

Primers	Allelic type	PCR (bp)	Exp No.	Copy number of template										
				10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	5	1	
3D7F/3D7R	3D7	477	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FC27F/FC27R	FC27	450	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Exp. No = ทำการทดสอบ 3 ครั้ง โดยใช้ DNA template เดียวกัน

4.6.3 ผลการตรวจสอบรูปแบบอัลลีล (haplotyping) ของยีน *PfMsp2* ที่ได้จากตัวอย่างผู้ป่วย

ทำการคัดเลือกตัวอย่าง DNA ที่ตรวจพบเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด 200 μ l จำนวน 124 ตัวอย่าง (พบการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* เพียงชนิดเดียว 113 ตัวอย่างและการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ร่วมกับ *Plasmodium vivax* จำนวน 11 ตัวอย่าง) แล้วนำมาทำ haplotyping ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นดังผลแสดงในตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างจากเลือดเหล่านี้ให้ผลบวกสำหรับยีน *PfMsp2* จำนวน 111 ตัวอย่าง (ร้อยละ 89.50) โดยพบรูปแบบอัลลีล 3D7 มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 61.26 ส่วนอัลลีล FC27 พบร้อยละ 27.93 และพบอัลลีลต่างกันในตัวอย่างเดียวกัน 12 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 30.65 ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR พบว่าภายในอัลลีล 3D7 ยังประกอบด้วยอัลลีลที่มีขนาดต่างกันถึง 7 แบบ (haplotype) และภายในอัลลีล FC27 ยังประกอบด้วยอัลลีลที่มีขนาดต่างกันถึง 4 แบบ (ตารางที่ 16) นอกจากนี้ยังพบอัลลีล 3D7 ที่มี haplotype ต่างกันในตัวอย่างเดียวกันนอกจากการพบอัลลีล FC27 ร่วมกับ 3D7

อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ตัวอย่างน้ำลาย 200 μ l ในการเตรียม DNA พบว่าให้ผลบวกสำหรับยีน *PfMsp2* เพียง 77 ตัวอย่างหรือให้ผลบวกเพียงร้อยละ 62.10 ของตัวอย่างทั้งหมด และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *PfMsp2* โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 200 μ l ในการเตรียม DNA พบว่าให้ผลบวกลดลงเหลือเพียง 38 ตัวอย่างหรือร้อยละ 10.81 ดังนั้นจำนวน haplotype สำหรับยีน *PfMsp2* จึงตรวจพบได้น้อยกว่าการตรวจจากตัวอย่างเลือด อย่างไรก็ตามความถี่ในการตรวจพบแต่ละ haplotype ในตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะมีแนวโน้มที่สอดคล้องกัน เช่น haplotype I ถึง VI อัตราการพบจากตัวอย่างเลือดคิดเป็นร้อยละ 51.5, 10.3, 7.4, 13.2, 5.9 และ 10.3 ในขณะที่ตัวอย่างน้ำลายพบร้อยละ 54.9, 9.8, 7.8, 13.7, 2.0 ($r = 0.996$) และ 11.8 ส่วนตัวอย่างปัสสาวะพบร้อยละ 52.2, 8.7, 8.7, 13.0, 4.3 และ 13.0 ตามลำดับ ($r = 0.995$) ในทำนองเดียวกันการกระจายอัลลีล FC27 ระหว่างการตรวจจากตัวอย่างเลือดมีความสอดคล้องกับการตรวจจากน้ำลาย ($r = 0.981$) และจากการตรวจโดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะ ($r = 0.961$) ในทางตรงข้ามการตรวจพบและความถี่ของการตรวจพบอัลลีลที่ต่างกันในตัวอย่างเดียวกันจากเลือดนั้นให้ผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องชัดเจนกับการตรวจโดยใช้ตัวอย่างน้ำลาย ($r = 0.629$) และตัวอย่างปัสสาวะ ($r = 0.721$) ในการเตรียม DNA

ตารางที่ 16 การกระจาย haplotype ของ *PfMsp2* จากตัวอย่างที่ตรวจพบ *Plasmodium falciparum*

Category	Allele	Haplotype	bp	Blood (n)	Saliva (n)	Urime (n)
Single allele	3D7	I	470	35	28	12
		II	500	7	5	2
		III	520	5	4	2
		IV	525	9	7	3
		V	550	4	1	1
		VI	585	7	6	3
		VII	615	1	-	-
	Total			68	51	23

Category	Allele	Haplotype	bp	Blood (n)	Saliva (n)	Urime (n)	
Single allele	FC27	VIII	430	18	13	8	
		IX	460	4	2	2	
		X	470	1	-	-	
		XI	550	8	7	2	
		Total			31	22	12
Mixed alleles	3D7 + 3D7	I + IV	470 + 525	4	2	1	
		I + VI	470 + 585	1	1	-	
		III + V	520 + 550	2	-	1	
		I + VIII	470 + 430	3	1	1	
		III + VIII	520 + 430	2	-	-	
		Total			12	4	3
		Total			111	77	38

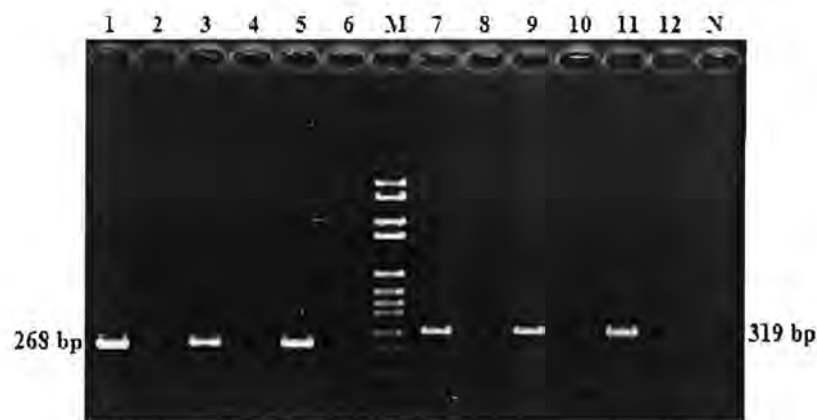
4.7 การวิเคราะห์รูปแบบอัลลีลของยีน *PvMspI* ในบริเวณ block 6

4.7.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer สำหรับ variable block 6 ของยีน *PvMspI*

ในยีน *PvMspI* มีส่วนของ variable block 6 ที่สามารถแบ่งออกได้เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับเบสสูง 2 บริเวณคือมีรูปแบบอัลลีลพื้นฐานเป็นแบบ Sal-1 หรือ Belem ซึ่งอัลลีลพื้นฐานสามารถเกิด recombination ในส่วนกลางของ variable block 6 ทำให้ด้านปลาย 5' หรือ 3' อาจมีอัลลีลแบบเดียวกันหรือต่างกันได้ โดยที่การใช้ PCR ด้วยชุด primer B6F/B6R จะให้ผลผลิต PCR ในตัวอย่างที่มีรูปแบบของอัลลีลเป็นแบบ Belem ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ของ block 6 เช่นพบในตัวอย่าง T107, TE26, TG46, BD6, BR07 และ Belem ส่วนชุด primer S6F/S6R ให้ผลผลิต PCR ในตัวอย่างที่มีรูปแบบของอัลลีลเป็นแบบ Sal-1 ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' และให้ผล PCR เป็นลบเมื่อใช้ชุด primer ที่ไม่ตรงกับอัลลีลของทั้ง 2 ชุด primer ในขณะที่ชุด primer B6F/S6R จะให้ผลบวก PCR ในตัวอย่างที่มีรูปแบบอัลลีลลูกผสมระหว่างอัลลีล Belem ด้าน 5' และอัลลีล Sal-1 ด้าน 3' ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างที่มีการศึกษามาทั้งหมดยังไม่เคยพบรูปแบบอัลลีลแบบนี้ในธรรมชาติจำนวนมาก (Putapornitip et al, 2008) จึงไม่มีตัวอย่างที่จะให้ผลบวก PCR สำหรับ primer ชุดนี้ได้ สำหรับชุด primer S6F/B6R ให้ผลบวก PCR ที่มีขนาด 216-250 หรือ 292 bp แสดงให้เห็นว่ามีอัลลีลย่อย 2 รูปแบบคือแบบที่มีลำดับกรดอะมิโนชนิด glutamine ซ้ำกันเป็นชุด และแบบที่ไม่มี glutamine ซ้ำกันเป็นชุด ในอัลลีลลูกผสมชนิดนี้ (ตารางที่ 17) และในกรณีที่มีการผสมอัลลีลของ block 6a และ block 6b ต่างชนิดกันเข้าด้วยกัน ชุด primers ที่ออกแบบไว้ก็ยังสามารถก่อให้เกิดผลบวกของ PCR ตรงตามอัลลีลที่จำเพาะต่อ primer นั้น ๆ ได้ ดังแสดงในภาพที่ 13

ตารางที่ 17 รูปแบบอัลลีลในบริเวณ block 6 ของยีน *PvMsp-1* จากตัวอย่างที่ทราบอัลลีลแล้ว

Haplotype	Variable block 6		Isolates	Agreement with sequences
	5' allele (6a)	3' allele (6b)		
I	Belem (B)	Belem (B)	Belem, T107, TE26, TG46, BD6, BR07	Perfect agreement
II	Belem (B)	Sal-1 (S)	NONE	Perfect agreement
III	Sal-1 (S)	Sal-1 (S)	Sal-1, T064, T077, TC22, TC28, TC103, TF14, TF127, TFF18, TG44, TG48, TG55, TG57, TV400, BD1, BD2, BD4, BD9, BP1, BP13, BP29, BP30, BP63, VM55, IN1	Perfect agreement
IV	Sal-1 (S)	Belem (Ba)	TD29, BP39, BR44, SK1, SK2, SK3, SK4, VM27	Perfect agreement
V	Sal-1 (S)	Belem (Bb)	T124, T131, TG40	Perfect agreement

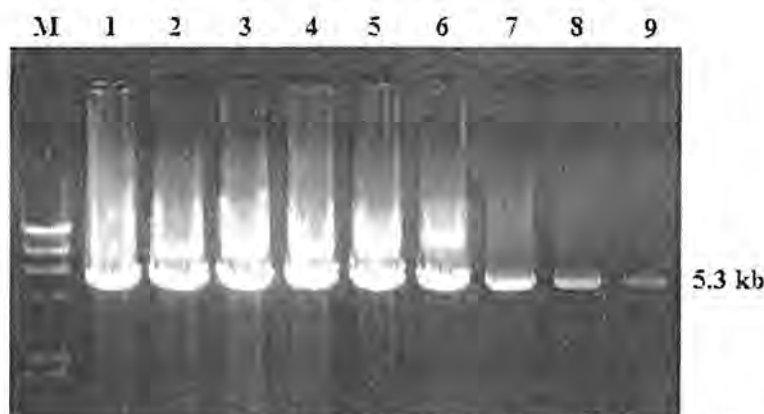


ภาพที่ 13 แสดงความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทำ haplotyping ในบริเวณ block 6a และ 6b ของยีน *PvMsp1* ภาพ agarose gel แสดงให้เห็นผลบวกของผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ชุด primer B6F/B6R แถวที่ 1, 3 และ 5 ชุด primer S6F/B6R แถวที่ 2, 4 และ 6 ชุด primer S6F/S6R แถวที่ 7, 9 และ 11 และชุด primer B6F/B6R แถวที่ 8, 10 และ 12 สำหรับ DNA template คือ แถวที่ 1-2 เท่ากับ Belem + Sal-1 แถวที่ 3-4 เท่ากับ Belem + Sal-1 + T064 แถวที่ 5-6 เท่ากับ Belem + Sal-1 + To64 + TF127 แถวที่ 7-8 เท่ากับ Belem + Sal-1 แถวที่ 11-12 เท่ากับ Belem + Sal-1 + TE26 + T107 M คือ molecular weight marker N คือ negative control

4.7.2 ผลการทดสอบความไวของ primer สำหรับ variable block 6 ของยีน *PvMsp1*

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ชุด primer PVF/PVR มาเป็นตัวตรวจสอบความไวของ primer ที่ออกแบบไว้เนื่องสามารถประเมินจำนวน copy ของยีน *PvMsp1* ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้ว จำนวน copy ของยีน

PvMspI ที่ต่ำสุดที่สามารถใช้เป็น template ในการทำให้เกิดผลผลิต PCR ของ primer คู่ใน ซึ่งความไวที่ทดสอบนี้มาจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และให้ผลสอดคล้องกัน ดังแสดงในภาพที่ 14 และตารางที่ 18 เป็นการสรุปความไวของวิธีการทำ haplotyping ของยีน *PvMspI* ที่ได้จากการใช้ชุด primer ที่ออกแบบไว้ต่าง ๆ กัน จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าจำนวน copy ของ template DNA ที่ต่ำสุดที่สามารถก่อให้เกิดผลผลิต PCR ได้ในแต่ละชุด primer คือ 5 copies ยกเว้นในกรณีที่เป็นอัลลีลแบบ Belem/Sal-1 ซึ่งอัลลีลชนิดนี้ยังไม่พบในธรรมชาติ จึงแสดงให้เห็นว่าวิธีการ haplotyping ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูงมาก จากนั้นยังได้ทำการทดสอบความไวของ primer เพิ่มเติมสำหรับในกรณีที่ตัวอย่างที่จะนำมาตรวจสอบนั้นมีการติดเชื้อที่มีอัลลีลต่างชนิดกันปะปนกันอยู่ โดยการผสม template DNA ต่างอัลลีลกันเข้าด้วยกัน โดยใช้ตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วย 3 ตัวอย่างคือ TE26, TF127, SK1 และจากสายพันธุ์ Belem อีก 1 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น template ในการทดสอบ ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับตรงกันกับอัลลีลที่ใช้ทดสอบของแต่ละชุด primer



ภาพที่ 14 agarose gel electrophoresis แสดงความไวของการทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer PVF/PVR แถวที่ 1-9 แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จำนวน copy ของยีน *PvMspI* ที่ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 และ 5 copies ตามลำดับ M คือ molecular weight marker

4.7.3 ผลการตรวจสอบรูปแบบอัลลีลของยีน *PvMspI* ที่ได้จากตัวอย่างผู้ป่วย

ตัวอย่าง DNA ที่ตรวจพบเชื้อ *Plasmodium vivax* โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด 200 μ l มีจำนวน 144 ตัวอย่าง (พบการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพียงชนิดเดียว 129 ตัวอย่างและการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ร่วมกับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น จำนวน 15 ตัวอย่าง) ผลการทำ haplotyping ในส่วนของ 5' และ 3' ของยีน *PvMspI* ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นแสดงผลในตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างจากเลือดเหล่านี้ให้ผลบวกสำหรับยีน *PvMspI* จำนวน 140 ตัวอย่าง (ร้อยละ 97.22) โดยพบรูปแบบอัลลีล Sal-1/Belem type b มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 65.3 ส่วนอัลลีล Belem/Belem พบร้อยละ 25.0 อัลลีล Sal-1/Belem type a พบร้อยละ 5.6 และพบอัลลีล Sal-1/Sal-1 ร้อยละ 4.0 นอกจากนี้ยังพบอัลลีลต่างกันในตัวอย่างไม่เกินจากผู้ป่วย 16 รายหรือร้อยละ 11.4

เมื่อใช้ตัวอย่างน้ำลาย 200 μ l ในการเตรียม DNA พบว่าให้ผลบวกสำหรับยีน *PvMspI* จำนวน 94 ตัวอย่างหรือให้ผลบวกร้อยละ 67.1 ของตัวอย่างทั้งหมด และเมื่อใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 200 μ l ในการเตรียม DNA

แล้วตรวจสอบโดยวิธี PCR สำหรับยีน *PvMsp1* พบว่าให้ผลบวกลดลงเหลือเพียง 49 ตัวอย่างหรือร้อยละ 35.0 ดังนั้นจำนวน haplotype สำหรับยีน *PvMsp1* จึงตรวจพบได้น้อยกว่าการตรวจจากตัวอย่างเลือดเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ยีน *PfMsp2* ในตัวอย่าง *Plasmodium falciparum* อย่างไรก็ตามความถี่ในการตรวจพบแต่ละ haplotype ในตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะมีแนวโน้มที่สอดคล้องกัน โดยค่าสหสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจเลือดและน้ำลายมีค่า $r = 0.994$ และระหว่างเลือดและปัสสาวะมีค่า $r = 0.005$ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โดยใช้ยีน *PfMsp2* ในตัวอย่าง *Plasmodium falciparum* ในทางตรงข้ามการตรวจพบและความถี่ของการตรวจพบอัลลีลที่ต่างกันในตัวอย่างเป็นเดียวกันจากเลือดนั้นให้ผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องชัดเจนกับการตรวจโดยใช้ตัวอย่างน้ำลาย ($r = 0.365$) และตัวอย่างปัสสาวะ ($r = -0.365$)

ตารางที่ 18 ความไวของชุด primer ที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR ของยีน *PvMsp1*

Primers	Allelic type	PCR (bp)	Exp No.	Copy number of template										
				10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	5	1	
B6F/B6R	Belem	268-280	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B6F/S6R	Not found	-	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S6F/S6R	Sal-1	319	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S6F/B6R	Thai-131	292	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S6F/B6R	Thai-D29	216-250	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Exp. No = ทำการทดสอบ 3 ครั้ง โดยใช้ DNA template เดียวกัน

ND = ไม่ได้ตรวจ

* ตำแหน่ง block อ้างอิงจาก Putapomtip et al, 2002

** จำนวน copy ของยีน *PvMsp1* ที่ต่ำสุดที่สามารถใช้เป็น template สำหรับปฏิกิริยา PCR ของแต่ละชุด primer

ตารางที่ 19 การกระจาย haplotype ของ *PvMsp1* จากตัวอย่างที่ตรวจพบ *Plasmodium vivax*

Category	Allele (5'-3')	Haplotype	Blood (n)	Saliva (n)	Urime (n)
Single allele	Belem/Belem	I	31	19	10
	Belem/Sal-1	II	0	0	0
	Sal-1/Sal-1	III	5	4	1
	Sal-1/Belem type a	IV	7	3	2
	Sal-1/Belem type b	V	81	68	36
	Total		124	94	49
Mixed alleles		I + III	5	1	0
		I + IV	2	1	0
		I + V	3	0	0
		IV + V	6	1	0
		Total	16	3	0
Total			140	97	49

4.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดตามอย่างต่อเนื่อง

จากการติดตามผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* จำนวน 17 รายและผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* จำนวน 18 ราย โดยติดตามในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 พบว่าสามารถติดตามผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในวันดังกล่าวได้ 17, 15, 10 และ 7 รายตามลำดับ ในขณะที่สามารถติดตามผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ได้ 16, 11, 8 และ 8 รายตามลำดับ เมื่อทำการตรวจหาผลพบว่าการตรวจจากฟิล์มโลหิตและการตรวจโดยวิธี PCR จากการใช้ตัวอย่าง 200 μ l จากเลือด น้ำลายและปัสสาวะในการเตรียม DNA พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลลบตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป ยกเว้นพบตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* 2 รายยังคงให้ผลการตรวจโดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือดในวันที่ 7 (ตารางที่ 20) แม้ว่าผู้ป่วยเหล่านี้จะไม่มีอาการของโรคมาลาเรียแล้วและไม่ได้รับยาต้านมาลาเรียใด ๆ หลังจากการวินิจฉัยในครั้งแรกแล้ว

ตารางที่ 20 การกระจาย haplotype ของ *PvMsp1* จากตัวอย่างที่ตรวจพบ *Plasmodium vivax*

Category	Sample	Result (Positives/Total examined*)				
		Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
<i>Plasmodium falciparum</i> (Total = 17)						
	Microscopy	17/17	0/17	0/15	0/10	0/7
	Blood	17/17	2/17	0/15	0/10	0/7
	Saliva	17/17	0/17	0/15	0/10	0/7
	Urine	15/17	0/17	0/15	0/10	0/7

Category	Sample	Result (Positives/Total examined*)				
		Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
<i>Plasmodium vivax</i> (Total = 18)						
	Microscopy	18/18	0/16	0/11	0/8	0/8
	Blood	18/18	0/16	0/11	0/8	0/8
	Saliva	18/18	0/16	0/11	0/8	0/8
	Urine	17/18	0/16	0/11	0/8	0/8

* ตัวเลขลดลงเพราะผู้ป่วยส่วนหนึ่งขาดการติดต่อกลับ

5. วิจัยผลการวิจัย

แม้ว่าการวินิจฉัยโรคปรสิตโดยการตรวจหาเชื้อที่ก่อโรคที่มีลักษณะจำเพาะซึ่งสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นมีความสำคัญและจัดเป็นมาตรฐานหนึ่งในการวินิจฉัยโรค อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจมีข้อจำกัดในกรณีที่มีปริมาณน้อยกว่าขีดจำกัดในการตรวจพบปรสิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปรสิตจำพวก โปรโตซัว ซึ่งการวินิจฉัยโรคมาลาเรียยังประสบปัญหาในด้านความถูกต้องแม่นยำจากการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อันอาจมีผลกระทบต่อการวางมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียซึ่งต้องอาศัยข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ถูกต้อง การวินิจฉัยโรคมาลาเรียอย่างถูกต้องนั้นนอกจากจะเป็นการทราบสถานะการณ์ของโรคแล้ว ยังเป็นพื้นฐานสำหรับการประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการวางมาตรการต่าง ๆ ในการควบคุมโรค ซึ่งในประเทศไทย กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขได้มีระบบการเฝ้าระวังโรคมาลาเรียโดยจัดตั้งมาลาเรียคลินิกหรือสำนักงานควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ในเขตปริมณฑล ทั่วประเทศ การบริการตรวจเลือดเพื่อการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย พร้อมกับการให้ยารักษา ตลอดจนการเฝ้าติดตามผู้ป่วยอย่างเป็นระบบ ได้ส่งผลให้การควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทยประสบผลดีกว่าประเทศใกล้เคียง ทั้งนี้บนพื้นฐานของความสำเร็จดังกล่าวเกิดจากการสร้างระบบตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพร้อมกับการสร้างระบบกำกับมาตรฐานของการตรวจดังกล่าว อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดเรื่องเวลาและอื่น ๆ ทำให้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับมาลาเรียจึงมีการเลือกใช้เฉพาะวิธีตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาเพียงอย่างเดียว แม้ว่าวิธีตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนามีความไวสูงกว่าวิธีตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดบาง แต่ในทางปฏิบัติที่มีข้อจำกัดเรื่องเวลาทำให้ความไวในการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาอาจสูงกว่าชนิดบาง 10 ถึง 30 เท่า (Moody & Chiodini 2000; Trape 1985) รวมทั้งสามารถลดเวลาในการตรวจหาเชื้อได้ดีกว่าการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดบาง แต่ความจำเพาะในการตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรียมักจำกัดเพียง 2 ชนิดคือ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* นอกจากนี้ขีดจำกัดของการตรวจพบเชื้อมาลาเรียยังขึ้นกับปริมาณเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างเลือด ตลอดจนความละเอียดและทักษะของจุลทรรศน์กร สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตมักให้ความไวที่ต่ำเมื่อปริมาณเชื้อในกระแสเลือดน้อยกว่า 50 ตัวต่อไมโครลิตร (Payne 1988; WHO 1990; Bruce-Chwatt 1993)

ด้วยข้อจำกัดด้านเวลาและความสามารถตลอดจนทักษะของผู้ตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่แตกต่างกันได้มาก จึงทำให้เกิดการพัฒนาการวินิจฉัยมาลาเรียในลักษณะของชุดตรวจสำเร็จรูปในเชิงการค้าโดยอาศัยหลักการ immunochromatography เพื่อทำการตรวจหาโปรตีนของเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตของผู้ติดเชื้อ เช่น histidine-rich protein-2 (HRP-2), lactae dehydrogenase และ aldolase เป็นต้น ซึ่งเป็นโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่พบในกระแสเลือดของผู้ที่ติดเชื้อ ทั้งนี้หลักการของชุดตรวจดังกล่าวคือใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนเหล่านี้ทำให้ติดอยู่ในลักษณะเป็นแถบบนแผ่นกระดาษกรองที่เหมาะสม ซึ่งเมื่อนำเลือดที่ต้องการทดสอบที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้ว ทำการจุ่มหรือหยดเลือดดังกล่าวที่ปลายด้านหนึ่งของแผ่นกระดาษกรอง โปรตีนในเลือดจะเคลื่อนไปหาแถบ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจ โดยอาศัยหลักการ chromatography โปรตีนถูกจับไว้ที่แถบล่างกล่าวจะมีระบบติดตามที่สามารถมองเห็นผลของปฏิกิริยาได้จากการเกิดแถบสีขึ้น วิธีการนี้ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ผู้ที่ทำการทดสอบสามารถอ่านผลได้โดยตรงและไม่ต้องอาศัยทักษะหรือความรู้พิเศษ จึงเหมาะที่จะใช้ในภาคสนาม โดยเฉพาะในท้องที่ที่มีปัญหาเรื่องไฟฟ้าและอุปกรณ์ที่จำเป็นอื่น ๆ อย่างไรก็ตามชุดตรวจนี้ยังมีราคาแพงจึงเป็นอุปสรรคต่อการใช้ทั่วไป และให้ผลดีเฉพาะเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ในขณะที่ *Plasmodium vivax* และเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ยังต้องมีการพัฒนาต่อไป เนื่องจากยังให้ผลความจำเพาะที่ต่ำ นอกจากนี้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวจะคงอยู่นานอีกประมาณ 2 ถึง 3 สัปดาห์ หรือ 1 เดือน ภายหลังจากผู้ป่วยได้รับการรักษาให้หายแล้ว ดังนั้นการแปลผลจึงต้องอาศัยข้อมูลจากผู้ป่วยร่วมด้วย (Shiff et al 1993; Van den Ende et al 1998) และในการประเมินผลบางครั้งพบว่าให้ความไวต่ำมากในผู้ที่มีปริมาณเชื้อต่ำ (Ricci et al 2000) ดังนั้นวิธีดังกล่าวจึงไม่สามารถใช้เป็นเครื่องมือเพื่อแสวงหาข้อมูลทางระบาดวิทยาที่มีความแม่นยำ

สำหรับวิธี PCR แม้ว่าจะไม่สามารถใช้ทดแทนการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในภาคสนาม แต่ความไวและความจำเพาะของวิธีดังกล่าวทำให้สามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ในระดับที่ต่ำกว่าระดับที่จะตรวจได้จากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรียจำนวน 16 ตัวอย่างหรือร้อยละ 6.13 ของตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อจากฟิล์ม โลหิตกลับให้ผลบวกต่อการทดสอบโดยวิธี PCR นอกจากนี้วิธี PCR ยังมีประสิทธิภาพในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ดีกว่าการตรวจหาเชื้อจากฟิล์ม โลหิต ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถวินิจฉัยได้เฉพาะ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* เท่านั้น ในขณะที่วิธี PCR สามารถตรวจพบได้ทั้ง *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* ตลอดจน *Plasmodium knowlesi* ทั้งนี้ข้อมูลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ถูกต้องนอกจากจะมีผลโดยตรงในการรักษาโรคแล้ว ยังมีความสำคัญในการวางมาตรการควบคุมโรคที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* แม้ว่าเชื้อชนิดนี้จะไม่มีระยะแฝงในตับหรือ hypnozoite จึงไม่พบภาวะ การเกิด ไข้กลับ ชนิด relapse ในการติดเชื้อชนิดนี้ แต่ในบางภาวะที่มีการติดเชื้อปริมาณมากพบว่าผู้ป่วยอาจมีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ดังเช่นที่พบในการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ทั้งนี้อุปสรรคในการจำแนกชนิดของมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* นอกจากข้อจำกัดในการพบปริมาณเชื้อที่ค่อนข้างน้อยและต้องพบระยะที่จำเพาะที่ช่วยในการวินิจฉัยได้ ส่วนการวินิจฉัย *Plasmodium knowlesi* จากฟิล์ม โลหิตไม่สามารถทำได้อย่างแม่นยำเพราะเชื้อมาลาเรียชนิดนี้มีระยะ growing trophozoite ที่มี

ลักษณะเป็นแถบ (band shape) ที่ไม่สามารถจำแนกได้จาก *Plasmodium malariae* และมีระยะวงแหวนรูปแบบต่าง ๆ ดังที่พบใน *Plasmodium falciparum* ดังนั้นวิธี PCR จึงเป็นวิธีเดียวที่สามารถวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียได้อย่างแม่นยำในปัจจุบัน นอกจากนี้ *Plasmodium knowlesi* เป็นเชื้อมาลาเรียชนิดในคนที่มีการตรวจพบโดยบังเอิญในลิงแว่น (*Macaca fascicularis*) และลิงกัง (*Macaca nemestrina*) เป็นรังโรคหลัก แม้ว่าเชื้อมาลาเรียสามารถติดต่อไปมาระหว่างคนได้โดยผ่านยุงก้นปล่องพาหะ (Putapomtip et al, 2013) แต่การติดต่อจากลิงสู่คนโดยผ่านยุงก้นปล่องพาหะยังนับเป็นช่องทางติดต่อที่สำคัญ ดังนั้นมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียที่ติดต่อกันจากสัตว์ย่อมมีความแตกต่างจากเชื้อมาลาเรียที่ปราศจากรังโรคโดยสิ้นเชิง

ประเด็นที่มีความสำคัญมากประการหนึ่งคือการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกัน โดยทั่วไปการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดมักตรวจพบไม่เกินร้อยละ 1 จากการตรวจฟิล์ม โลหิต ทั้งนี้อาจเนื่องจากความคลาดเคลื่อนจากการตรวจของจุลทรรศน์หรือจากการพบระยะวงแหวนที่ไม่สามารถจำแนก species ของเชื้อมาลาเรียได้อย่างจำเพาะ ตลอดจนการติดเชื้อมาร่วมกันที่มีปริมาณเชื้อต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจพบได้จากกล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งการมีระยะ hypnozoite แอบแฝงอยู่ จากการศึกษานี้พบว่าการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันพบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศ แต่พบมากในบริเวณภาคเหนือและตะวันตกมากกว่าทางภาคตะวันออกและภาคใต้ซึ่งมีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียของประชากรต่ำกว่า (Putapomtip et al, 2009) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่การติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันนั้นมีปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการแพร่เชื้อ เช่น ชนิดของยุงพาหะ เป็นต้น กล่าวคือ *Anopheles dirus* สามารถนำได้ทั้ง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* ในขณะที่ *Anopheles maculatus* สามารถนำ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium malariae* ส่วน *Anopheles gambiae* ซึ่งเป็นยุงพาหะหลักในทวีปแอฟริกา สามารถนำเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง 4 species ในรายงานก่อนหน้านี้พบว่าผู้ป่วยประมาณร้อยละ 30 ที่ได้รับการรักษาการติดเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ภายหลังจากรักษากลับพบการติดเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium vivax* โดยไม่มีการรับเชื้อใหม่ (Looareesuwan et al 1987) และในทางตรงข้ามผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium vivax* ประมาณร้อยละ 8 มีการติดเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ร่วมด้วย (Mayxay et al 2001; Siripoon et al 2002) สำหรับการศึกษานี้พบว่าการตรวจฟิล์ม โลหิตสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* ร่วมกันในผู้ป่วย 3 รายซึ่งพบว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีปริมาณเชื้อในกระแสเลือดสูง และตรวจไม่พบภาวะดังกล่าวเลยในกลุ่มผู้ป่วยที่มีปริมาณเชื้อต่ำ อย่างไรก็ตามการตรวจโดยวิธี PCR กลับพบภาวะการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันในผู้ป่วย 11 รายหรือเพิ่มขึ้นมากกว่า 3 เท่า

โดยทั่วไปการวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันหรือการติดเชื้อมาลาเรียผสมอาจได้รับการวินิจฉัยจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายหลังจากการประเมินประสิทธิภาพของการรักษาเชื้อที่ตรวจพบในครั้งแรก (Mason et al 2001) ซึ่งอัตราที่ตรวจพบมักมีค่าการประเมินที่ต่ำกว่าจริงเนื่องจากเชื้อที่แฝงอยู่อาจถูกกำจัดจากยาที่ใช้รักษาเชื้อมาลาเรียที่วินิจฉัยได้ ดังนั้นเชื้อมาลาเรียที่แฝงอยู่นั้นจึงไม่ได้รับการวินิจฉัย และในกรณีการตรวจพบเชื้อในภายหลังมักเป็นเชื้อที่ติดต่อยาต้านมาลาเรียที่ใช้ในการรักษาเชื้อที่วินิจฉัยได้ในครั้งแรก หรือเป็นเชื้อที่มีระยะแฝงในเซลล์ตับเช่น *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium ovale* ผลกระทบที่เกิดขึ้นอันเนื่องจากการตรวจไม่พบการติดเชื้อมาร่วมกันจะทำให้เกิดกระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียมีโอกาพัฒนาการดื้อยาได้มากขึ้น โดยเชื้อที่ยังคงความไวต่อยาได้ถูกทำลายไป เช่น การติดเชื้อมาร่วมกันระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ

Plasmodium vivax ถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาเฉพาะ *Plasmodium falciparum* จะทำให้ *Plasmodium vivax* มีโอกาสสัมผัสกับยาขนานต่าง ๆ โดยไม่จำเป็นมากกว่าการได้รับยาคลอโรควินเพียงขนานเดียวในการทำลยาระยะ asexual blood stages นอกจากนี้ขนาดของยาไพโรมาควินที่ใช้ทำลายระยะ gametocyte ของ *Plasmodium falciparum* เพื่อป้องกันการแพร่เชือนั้นไม่สามารถทำลายระยะ hypnozoite ของ *Plasmodium vivax* ได้ ในทางตรงข้ามในกรณีที่ *Plasmodium vivax* ได้รับการวินิจฉัยและรักษา แต่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* แฝงอยู่นั้น ภายหลังกการรักษาผู้ป่วยย่อมเกิดอาการของโรคได้อีกจากเชื้อชนิดหลัง เนื่องจากการดื้อยาคลอโรควินของ *Plasmodium falciparum* ที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ภาวะดังกล่าวย่อมส่งผลต่อการสูญเสียทางเศรษฐกิจของชาติจากค่าใช้จ่ายซ้ำซ้อนในการแสวงหาการรักษาที่ต้องเกิดขึ้นอีก รวมทั้งยังเป็นการเพิ่มระยะเวลาของการสูญเสียแรงงาน (Amexo et al 2004) นอกจากนี้แม้ว่าผลกระทบโดยตรงต่อเชื้อมาลาเรียดังกล่าวอาจไม่เกิดขึ้นทันที แต่จากการศึกษาในประเทศมาลาวีในแอฟริกาพบว่าภายหลังกการเลิกใช้ยาคลอโรควินในการรักษาภาวะของการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 ปีหลังจากนั้น พบว่าเชื้อมาลาเรียที่เคยดื้อยาดังกล่าวกลับมีการตอบสนองต่อยาได้ดีเช่นเดิม (Mita et al 2003) ทั้งนี้เนื่องจากในธรรมชาติมีการกระจายของ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ที่ดื้อยาและสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาปะปนกัน ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้อาจมีอัตราการเจริญแตกต่างกัน ดังนั้นการหยุดใช้ยาคลอโรควินทำให้เชื้อที่ไม่ดื้อยาดังกล่าวมีโอกาสเพิ่มปริมาณและเกิดการเจริญแข่งขันกับเชื้อที่ดื้อยาได้มากขึ้น ซึ่งการค้นพบดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาการทดสอบความไวของเชื้อทางห้องปฏิบัติการในประเทศไทย กล่าวคือภายหลังกการหยุดใช้ยาคลอโรควินเป็นระยะเวลานาน เชื้อมาลาเรียที่เก็บรวบรวมในระยะหลังลดระดับการดื้อยาดังกล่าวอย่างชัดเจน แต่ยังไม่อยู่ในระดับที่สามารถนำยาคลอโรควินกลับมาใช้สำหรับ *Plasmodium falciparum* ใหม่ได้ (Thaithong et al 1988) อนึ่งการที่ *Plasmodium falciparum* ได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เป็นเวลานาน อาจเป็นการส่งเสริมให้เกิดสายพันธุ์ของ *Plasmodium falciparum* ทำให้เกิดสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาหลายขนานมากขึ้น แม้ว่ายาต้านมาลาเรียไม่ใช่สารเร่งการกลายพันธุ์ (mutagen) แต่จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าการที่เชื้อมาลาเรียอยู่ภายใต้แรงกดดันของยาจะเกิดการปรับตัวของเชื้อและเกิดการผ่าเหล่าของยีนต่าง ๆ ได้ (Waller et al 2004) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการตั้งข้อสังเกตว่าการติดเชื้อผสมนั้นอาจเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันข้ามชนิดของเชื้อมาลาเรีย (cross-species immunity) โดยเชื่อว่า *Plasmodium vivax* อาจทำให้ภาวะความรุนแรงของการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ลดลง หรือในทางตรงข้ามผลการเกิด dyserythropoiesis จาก *Plasmodium falciparum* อาจลดปริมาณ reticulocyte ลงจึงเป็นการลดโอกาสที่ระยะ merozoite ของ *Plasmodium vivax* จะลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดง อย่างไรก็ตามการศึกษาสภาวะดังกล่าวจากการติดตามผู้ป่วยที่ติดเชื้อในธรรมชาติย่อมให้ผลการศึกษาที่คลาดเคลื่อนจากความจริงอันเนื่องจากข้อจำกัดของข้อมูลทางระบาดวิทยาที่อาศัยผลการตรวจจากแผ่นฟิล์มโลหิตเพียงอย่างเดียว

โดยทั่วไปการวินิจฉัยโรคมมาลาเรียโดยวิธีต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นล้วนมีความจำเป็นในการเจาะเลือดแม้ว่าการเจาะเลือดโดยบุคลากรทางการแพทย์จะมีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนได้น้อย แต่การเจาะเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ต้องการติดตามผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง เช่น การประเมินประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรีย ตลอดจนการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน ซึ่งต้องการตัวอย่างเลือดหลายครั้งอาจไม่ได้รับความร่วมมือจาก

ผู้ป่วยอย่างเต็มที่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มผู้ป่วยเด็กและทารก ตลอดจนอาจมีข้อจำกัดเชิงจริยธรรมสำหรับกลุ่มสตรีมีครรภ์ ดังนั้นการใช้สิ่งส่งตรวจอื่นที่ได้มาโดยปราศจากการสร้างความเจ็บปวดดังเช่นการเจาะเลือดย่อมสร้างความร่วมมือและซัดออุปสรรคเชิงจริยธรรมได้ แม้ว่าการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยวิธี PCR จากการใช้ตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะของผู้ติดเชื้อจะได้รับการพัฒนาครั้งแรกสำหรับการตรวจหาเชื้อ *Plasmodium falciparum* แม้ประสิทธิภาพจะต่ำกว่าการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Mharakurwa et al, 2006) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยพบว่าตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะของผู้ติดเชื้อสามารถใช้ตรวจวินิจฉัย *Plasmodium vivax* ได้เช่นกัน (Buppan et al, 2010) ต่อมาคณะผู้วิจัยได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR ซึ่งใช้ยีนเป้าหมายคือ mitochondrial cytochrome b ซึ่งมีจำนวนชุดของยีนในเชื้อแต่ละเซลล์มากกว่ายีนเป้าหมายเดิมคือ small subunit ribosomal RNA ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะได้ดีขึ้น ทั้งนี้พบว่าผลรวมจากการตรวจจากตัวอย่างเหล่านี้มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ฟิล์มโลหิตชนิดหนา (Putaporntip et al 2011) สำหรับการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี PCR โดยเลือกใช้ DNA เป้าหมายในตำแหน่งอื่นของ mitochondrial genome อย่างไรก็ตามด้วยข้อจำกัดที่ความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ใน mitochondrial genome ของเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันมีไม่มากและจำกัดเฉพาะบางส่วนของ genome เท่านั้น ทำให้นักออกแบบ PCR primers ไม่สามารถพัฒนาให้มีความหลากหลายมากได้ และอาจเผชิญกับปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มอันส่งผลให้เกิดผลบวกหลงได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ายีนในส่วน mitochondrial cytochrome b ให้ประสิทธิภาพในการวินิจฉัยจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ดีกว่าบริเวณ mitochondrial cytochrome oxidase subunit I และ subunit III นอกจากนี้ในการศึกษาก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างตัวอย่างเลือด น้ำลายและปัสสาวะของผู้ติดเชื้อเพียง 20 µl ในการเตรียม DNA ซึ่งในการศึกษานี้ได้เพิ่มปริมาณตัวอย่างเหล่านี้เป็น 10 เท่า ทำให้ผลการวิเคราะห์พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยและจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากการใช้ตัวอย่างน้ำลายให้ผลดีกว่าผลจากการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิต ในขณะที่ตัวอย่างปัสสาวะให้ผลใกล้เคียงกับการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิต ดังนั้นวิธีการที่ค้นพบและพัฒนาในการศึกษานี้ นอกจากจะมีประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ในการประเมินติดตามผู้ป่วยในระยะยาวแล้ว ยังสามารถใช้ทดแทนการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งต้องมีการเจาะเลือดเพื่อการวินิจฉัยดังกล่าว

ในการตรวจติดตามผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* และผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ระยะยาวพบผู้ป่วยมาลาเรียจาก *Plasmodium falciparum* 2 รายยังคงให้ผลการตรวจโดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือดเป็นบวกในวันที่ 7 ซึ่งแม้ว่าผลบวกดังกล่าวอาจเกิดจากผู้ป่วยได้รับเชื้อใหม่โดยเชื่อดังกล่าวกำลังเจริญในตับในขณะที่ผู้ป่วยมีอาการจากการติดเชื้อกลุ่มอื่นมาก่อนหน้านี้ โดยยาที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียชนิดนี้ไม่มีผลต่อระยะที่เชื้อเจริญในตับทำให้เชื่อดังกล่าวสามารถพัฒนาต่อจนพบการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงในระดับต่ำกว่าที่สามารถตรวจพบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แต่สามารถตรวจพบได้โดยวิธี PCR อย่างไรก็ตามภาวะดังกล่าวไม่น่าจะอธิบายการตรวจที่เป็นลบในภายหลังได้โดยผู้ป่วยรายดังกล่าวไม่ได้รับยาค้านมาลาเรียในภายหลังเลยทั้งนี้แม้ผู้ป่วยจะได้รับยา primaquine เพื่อทำลายระยะ gametocyte ของ *Plasmodium falciparum* แต่ยาและปริมาณที่ผู้ป่วยได้รับไม่สามารถกำจัดระยะที่เชื้อมาลาเรียดังกล่าวเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นความน่าจะเป็นไปได้

คือการเกิดภาวะการหลงเหลืออยู่ของ DNA จากเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ตายแล้ว โดยร่างกายยังกำจัด DNA เหล่านี้ไม่หมด (delayed malarial DNA clearance) ซึ่งสามารถอธิบายการตรวจที่ให้ผลลบในภายหลังของผู้ป่วย ทั้ง 2 รายดังกล่าวได้ ซึ่งสอดคล้องกับการพบว่ามีโปรตีนของเชื้อมาลาเรียบางชนิดที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค โดยวิธี immunochromatic graphic test นั้นในผู้ติดเชื้อบางรายสามารถให้ผลบวกต่อไปได้อีกราว 2 ถึง 4 สัปดาห์ หลังจากผู้ป่วยหายจากโรคแล้ว (Shiff et al 1993; Van den Ende et al 1998)

ในการศึกษารั้วนี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการที่ง่ายและสะดวกในการตรวจแยกสายพันธุ์ประชากรของเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยอาศัยหลักการออกแบบ PCR primer ที่มีความจำเพาะต่อรูปแบบของอัลลีล ชนิด 3D7 และ FC27 เพื่อทำ PCR haplotyping แยกอัลลีลทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกัน และจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ได้จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศพบว่าอัลลีล 3D7 มีอุบัติการณ์มากกว่าอัลลีล FC27 ประมาณ 2 เท่าสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Putaporntip et al , 2008) และเนื่องจาก primer มีความจำเพาะสูง จึงทำให้ไม่เกิดผลบวกปลอมในขั้นตอนการทำ nested PCR ที่มีสาเหตุมาจากการเกิด in vitro recombination ระหว่างอัลลีลต่างชนิดกันที่ปะปนกันได้ (Tanabe et al, 2002) ดังนั้นวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการติดตามลักษณะ โครงสร้างประชากร *Plasmodium falciparum* ในตัวอย่างธรรมชาติ โดยอาศัยความหลากหลายของยีน *PfMsp2* เป็นตัวติดตาม

เนื่องจากโปรตีนบนผิวของระยะ merozoite ที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียนั้นนอกจาก merozoite surface protein 1 แล้วยังพบว่า *PfMsp2* มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน เนื่องจากแอนติบอดีต่อ *Msp2* สามารถยับยั้งการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดง และแอนติบอดีในผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยากับส่วน repeats ของ *Msp2* (Epping et al, 1988; Ocampo et al, 2000) ในขณะที่แอนติบอดีต่อบริเวณ N-terminus และ C-terminus มักเกิดขึ้นภายหลังที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อบ่อยครั้งและมีความแปรผันตามอายุของผู้ที่ได้รับเชื้อ ดังเช่นในการศึกษาระดับแอนติบอดีของผู้ที่อาศัยในประเทศเคนยาจากหลายกลุ่มอายุต่อ recombinant peptides ของ FC27 และ 3D7 families พบว่าผู้ที่มีระดับของแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวในระดับต่ำจะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าผู้ที่มีระดับแอนติบอดีที่สูง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาถึงความจำเพาะในการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ *PfMsp2* พบว่าแอนติบอดีต่อบริเวณ repeats มีความจำเพาะสำหรับแต่ละ family และ repeats ใน family เดียวกันอาจมีการตอบสนองข้าม variant หรือไม่ขึ้นกับความแตกต่างของ repeats เป็นสำคัญ กล่าวคือ variant ของ repeats ใน FC27 family ซึ่งมีความคล้ายคลึงในโครงสร้างสูงจะมีการตอบสนองของแอนติบอดีข้าม variant ได้มากกว่าการตอบสนองของแอนติบอดีข้าม variant ใน 3D7 family ซึ่งมีความแตกต่างในโครงสร้างของ repeats มากกว่า ดังนั้นการเข้าใจโครงสร้างประชากร *Plasmodium falciparum* จากพื้นฐานความหลากหลายของยีน *PfMsp2* รวมทั้งการกระจายของรูปแบบอัลลีลทั้ง 2 ชนิดนี้ในประชากรจำนวนมากและในช่วงเวลาที่แตกต่างกันจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการวางมาตรการในการพัฒนาวัคซีน โดยอาศัยโปรตีนชนิดนี้ (Franks et al, 2003; Polley et al, 2006; Tonon et al , 2004)

ในการประยุกต์ข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายใน *PfMsp2* กับการพัฒนาวัคซีนนั้น เนื่องจาก immunodominant epitopes พบว่าอยู่ในส่วนของ repeats ซึ่งมีสายวิวัฒนาการอันยาวนานที่แยกจากกัน

เปรียบเทียบกับ การแยกสายวิวัฒนาการระหว่าง variant ใน family เดียวกันนั้นทำให้ไม่พบว่าแอนติบอดีต่อ family หนึ่งทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับอีก family หนึ่ง แต่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่าง variant ใน family เดียวกันแม้จะไม่เกิดขึ้นเสมอไป (Franks et al, 2003) ดังนั้นในการพัฒนาวัคซีนบนพื้นฐานของ *PfMsp2* นั้น นอกจากจะต้องนำ repeats ของทั้ง 2 families ในการเป็นองค์ประกอบแล้วยังขึ้นกับ variant ที่ปรากฏใน ธรรมชาติตามภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก (Ferreira and Hartl, 2006) อย่างไรก็ตามการไม่คงที่ของ variant ต่าง ๆ ตามกาลเวลาทำให้อาจต้องคำนึงถึงการเปลี่ยนรูปแบบของโปรตีนในองค์ประกอบของวัคซีนตามช่วงเวลาที่เหมาะสม ซึ่งจำเป็นต้องติดตามอย่างสม่ำเสมอต่อไป

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการที่ง่ายและสะดวกในการตรวจแยกสายพันธุ์ประชากรของเชื้อ *Plasmodium vivax* โดยอาศัยภาวะหลายรูปแบบของยีน *PvMsp1* ในบริเวณ variable block 6 ที่มีพื้นฐานยีน 2 รูปแบบคือ Sal-1 และ Belem โดย primer ที่ออกแบบไว้ในการศึกษานี้สามารถตรวจแยกสายพันธุ์ Sal-1, Belem และ สายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Sal-1 และ Belem ทำให้วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจแยกรูปแบบอัลลีลได้ ทั้งหมด 5 รูปแบบคือ Sal-1/Sal-1, Sal-1/Belem subtype a, Sal-1/Belem subtype b, Belem/Belem และ Belem/Sal-1 แต่เนื่องจากอัลลีลลูกผสมแบบ Belem/Sal-1 นี้ยังไม่เคยมีการตรวจพบในธรรมชาติ ดังนั้น ณ ปัจจุบันรูปแบบอัลลีลของ variable block 6 จึงมีรูปแบบหลักทั้งหมด 4 รูปแบบสอดคล้องกับการศึกษาในอดีต (Putapomtip et al, 2002; Jongwutiwes et al, 2010) ในขั้นตอนการดำเนินปฏิกิริยา PCR นั้นคณะผู้วิจัยได้ออกแบบอุณหภูมิในขั้นตอนการจับของ primer กับ template DNA (annealing temperature) ให้มีอุณหภูมิเดียวกันในทุกชุด primers เพื่อให้สะดวกในการปฏิบัติ นอกจากนี้ถึงแม้ยีน *PvMsp1* จะมีจำนวนชุดบน โครโมโซมเพียงชุดเดียว (single copy gene) แต่วิธีการที่พัฒนาขึ้นสามารถทำให้เกิดผล nested PCR เป็นบวกได้ แม้มีจำนวน copy ของยีนเพียง 5 copy เท่านั้น หรือเทียบได้เท่ากับจำนวนเชื้อมาลาเรีย 5 ตัว ดังนั้นวิธีการนี้จึงมีความไว และความจำเพาะสูงรวมทั้งมีความสะดวกต่อการปฏิบัติ

ถึงแม้การเกิดผลบวกปลอมในขั้นตอนการทำ nested PCR อันเนื่องมาจากการเกิด in vitro recombination จากการที่มีการปะปนของอัลลีลต่างชนิดเดียวกันใน template DNA ซึ่งลักษณะการเกิดผลบวกปลอมรูปแบบนี้ได้มีการรายงานขึ้นมาก่อนหน้านี้ (Tanabe et al, 2002) อย่างไรก็ตามวิธีการ haplotyping ที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นนี้จะไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอมจากปรากฏการณ์ดังกล่าวอันเนื่องมาจากคณะผู้วิจัยได้ออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อชนิดของอัลลีลและผลผลิต PCR เป้าหมายนั้นอยู่ในช่วงสั้นมีจำนวนเบสไม่เกิน 320 bp ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอมตามที่กล่าวมาเพราะการที่จะเกิด in vitro recombination ได้นั้นจะต้องมีการใช้ primer ที่ไม่มีความจำเพาะและผลผลิต PCR เป้าหมายมีความยาวมากกว่า 500 bp นอกจากนี้จากการใช้กลุ่มตัวอย่างทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการดังกล่าวโดยใช้ template DNA จำนวน 42 ตัวอย่างและสายพันธุ์ ที่ทราบลำดับเบสของยีน *PvMsp1* ชัดเจนจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ก็ให้ผลสอดคล้องกันคือให้ผล haplotyping ตรงกันกับลำดับเบสทุกประการ ส่วนในการการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการผสม template DNA ที่มีรูปแบบของอัลลีลต่างชนิดเข้าด้วยกันด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ กัน วิธีการที่พัฒนาขึ้นก็สามารถตรวจแยกชนิดของอัลลีลได้ตรงกับที่ผสมไว้ ซึ่งในการศึกษาของคณะผู้วิจัยในอดีตพบว่าประชากรเชื้อ *Plasmodium vivax* ในประเทศไทยและอะเมซอนมีลักษณะการติดเชื้อต่างสายพันธุ์กันปะปนกันสูงในธรรมชาติ

จากการใช้ยีน *PvMsp1* และ *PvTRAP* (*Plasmodium vivax* thrombospondin-related adhesive protein) เป็นตัวทดสอบ (Putaporntip et al, 2001; 2002) ดังนั้นวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการตรวจแยกประชากร *Plasmodium vivax* ในตัวอย่างธรรมชาติ

ความหลากหลายของรูปแบบอัลลีลของยีน *PfMsp1* มีพื้นฐานมาจากการเกิด meiotic recombination ระหว่างอัลลีลหลักในยุงพาหะ (Kerr et al, 1994) อย่างไรก็ตามรูปแบบผสมของอัลลีลในยีน *PfMsp1* นั้นจะพบเฉพาะในบริเวณ variable blocks 2, 4a และ 4b ในขณะที่รูปแบบอัลลีลที่เชื่อมต่อกัน (link) อย่างสมบูรณ์จะพบใน variable blocks 6, 8, 10, 14 และ 16 ในทุกตัวอย่างเชื้อที่มีการรายงานถึง ณ ปัจจุบัน (Sakihama et al, 1999; Tanabe et al, 2000) ทั้งนี้เนื่องมาจากลักษณะ โครงสร้างและหน้าที่ของยีนดังกล่าวที่ต้องมีความจำเพาะต่อการคงอยู่ของมาเลเรียซึ่งมีผลกำหนดความหลากหลายของยีน *PfMsp1* เช่นหน้าที่ในการถูกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของระยะ merozoite ถึงแม้จะมีการเกิด intrageic recombination ในยีน *PvMsp1* เช่นเดียวกับที่พบในยีน *PfMsp1* แต่รูปแบบความหลากหลายของยีน *PvMsp1* มีสูงกว่ายีน *PfMsp1* มาก เนื่องจากไม่พบลักษณะการเกิด allele association ในยีน *PvMsp1* จากตัวอย่างที่มีการศึกษามาทั้งหมด (Putaporntip, 2002)

ประเด็นทางด้านคลินิกของ *Plasmodium vivax* ที่มีผู้ให้ความสนใจกันมากคือการเกิด hypnozoite ที่เป็นสาเหตุของการเกิด ไข้กลับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาเลเรียชนิดนี้ ซึ่งการศึกษาลักษณะประชากรของเชื้อ *Plasmodium vivax* ในกรณีของ relapse นั้นสามารถใช้คุณลักษณะหลายรูปแบบของยีน *PvMsp1* เป็นตัวบ่งชี้ได้ (Craig et al, 1996) และเป็นที่ทราบกันว่าลักษณะ โครงสร้างประชากรของ hypnozoite ไม่เป็นแบบ clonal จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบตัวอย่างก่อนและหลังการเกิด relapse (Kirchgatter et al, 1998) อย่างไรก็ตามกลไกของการเกิด relapse ยังคงต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ดังนั้นวิธีการ haplotyping ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษารุ่นนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการตรวจสอบ clone และสายพันธุ์ของตัวอย่างเชื้อได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการระบาดของ การคือยาชนิด chloroquine ของเชื้อ *Plasmodium vivax* ในหลายพื้นที่ จึงมีความจำเป็นอย่างมากที่ต้องมีการติดตามประสิทธิภาพของการใช้ยาด้านมาเลเรียในกลุ่มประชากรเชื้อ *Plasmodium vivax* เหล่านี้ (Rieckmann et al, 1989; Schuurkamp et al, 1992) ทั้งนี้ปัญหาดังกล่าวจะมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งที่มีการแพร่กระจายของเชื้อที่ คือยาดังกล่าวไปยังแหล่ง โรคมาเลเรียอื่น ๆ ทั่วโลก

การกลับมาระบาดของใหม่ของมาเลเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในหลายพื้นที่ทำให้เกิดผลกระทบที่สำคัญต่อการสาธารณสุขและการควบคุม โรค (Sleigh et al, 1998; Lim et al, 2000; Hay, 2002) ดังนั้นจึงความจำเป็นอย่างยี่งที่ต้องมีการตรวจสอบลักษณะประชากรของเชื้อมาเลเรียนั้น ๆ เพื่อให้เข้าใจกลไกการแพร่กระจายของ เชื้อดังกล่าว จึงได้มีการศึกษาขอบเขตของความหลากหลายของรูปแบบอัลลีลและความถี่ในการได้ติดเชื้อ โดย การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งระบาดของโรคความชุกของการส่งผ่านเชื้อในยุงพาหะ (Kaneko et al, 1997; Sakihama et al, 1999; Tanabe et al, 2000) หรือในระหว่างที่เกิด outbreak ของ โรคมาเลเรียในบางพื้นที่ ลักษณะ โครงสร้างประชากรที่เกิดขึ้นนั้นอาจไม่ใช่ panmictic แต่เป็นแบบ clonal ก็ได้ (Lim et al, 2000; Tanabe et al, 2002) ดังนั้นการคัดเลือกตัวติดตามที่เหมาะสมต่อการศึกษาลักษณะดังกล่าวจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการวิเคราะห์พันธุกรรมประชากรของเชื้อมาเลเรียเพื่อเป็นพื้นฐานในการควบคุม โรคต่อไป

ในการประยุกต์ใช้วิธีการตรวจสอบอัลลีลของ *PfMsp2* และ *PvMsp1* จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะ นั้นพบว่าสามารถตรวจได้ในตัวอย่างจำนวนน้อยกว่าการใช้ตัวอย่างเลือดประมาณร้อยละ 30 และร้อยละ 65 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพของวิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในระดับที่สามารถตรวจพบ DNA จาก เชื้อมาลาเรียเทียบเท่าหรือประมาณไม่น้อยกว่า 5 เซลล์ ในขณะที่การตรวจโดยใช้วิธี PCR-Cytb สามารถตรวจหา ยีนเป้าหมายที่มีอยู่เพียงชุดเดียว (Putapomtip et al, 2011) ทั้งนี้ยีนใน mitochondrial genome ดังกล่าวพบในเชื้อ มาลาเรียแต่ละเซลล์มากถึง 30-100 ชุด (Vaidya et al, 1989) ในขณะที่ยีน *PfMsp2* และ *PvMsp1* มีเพียงอย่างละ 1 ชุดในแต่ละเซลล์ ดังนั้นความแตกต่างในประสิทธิภาพของการตรวจและความไวสำหรับวิธี PCR เหล่านี้จึง ส่งผลชัดเจนในตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA น้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างจากน้ำลายและปัสสาวะ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าการกระจายในความถี่ของอัลลีลของยีนเหล่านี้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด น้ำลายและ ปัสสาวะล้วนให้ผลสอดคล้องกันมาก ดังนั้นแม้ว่าประสิทธิภาพของการตรวจสอบอัลลีลของ *PfMsp2* และ *PvMsp1* จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะจะต่ำกว่าการตรวจจากเลือดอย่างชัดเจน แต่ข้อมูลที่ได้นับว่ามี ประโยชน์ในเชิงระบาดวิทยาที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมประชากรของเชื้อมาลาเรีย ตลอดจนการเป็นพื้นฐาน สำหรับการพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกัน โรคมมาลาเรียในอนาคตโดยไม่ต้องทำการเจาะ เลือดจากผู้ป่วย ซึ่งน่าจะนำมาซึ่งความร่วมมือในการศึกษาจากประชากรเป้าหมายได้ดีขึ้น

6. สรุปผลการวิจัย

6.1 ในการพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกชนิดของมาลาเรียโดยวิธี PCR พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก บริเวณต่าง ๆ ใน mitochondrial genome ให้ความไวและความจำเพาะต่างกัน โดยส่วนของยีนใน cytochrome b (*Cytb*) ให้ความไวและความจำเพาะมากกว่าส่วนของยีนใน cytochrome oxidase subunit I (*COXI*) และ cytochrome oxidase subunit III (*COXIII*) โดยระดับความไวในการทดสอบได้ในระดับเทียบเท่าเชื้อมาลาเรีย 1 เซลล์

6.2 การเตรียม DNA จากตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะโดยใช้ปริมาตรเพิ่มขึ้นทำให้ผลการตรวจ โดยวิธี PCR มีความไวมากขึ้น ซึ่งการเพิ่มปริมาตรตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะอย่างละ 10 เท่าทำให้ความ ไวในการวินิจฉัยมาลาเรียโดยรวมเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.6 ร้อยละ 16.1 และร้อยละ 19.1 ตามลำดับ

6.3 แม้ว่าค่าความจำเพาะ ความแม่นยำและค่า likelihood ratio ของผลการทดสอบที่เป็นบวกและเป็นลบ ในการวินิจฉัยมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* โดยการตรวจจากฟิล์มโลหิต จาก วิธี PCR โดยใช้ตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะที่เตรียมจากปริมาตรที่ต่างกันจะให้ผลใกล้เคียงกัน แต่ค่าความ ไวของการตรวจเหล่านี้มีความแตกต่างกัน ซึ่งการใช้ปริมาตรน้ำลายหรือปัสสาวะ 200 μ l ในการเตรียม DNA สำหรับการตรวจโดยวิธี PCR ทำให้ความไวในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียทั้ง 2 ชนิดในระดับที่หักเหเทียบกับการ ตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิต

6.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายในรูปแบบของยีน *PfMsp2* จากตัวอย่าง *Plasmodium falciparum* ที่ได้ จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศพบว่าอัลลีล 3D7 มีอุบัติการณ์มากกว่าอัลลีล FC27 ประมาณ 2 เท่าและพบการติด

เชื้อที่มีอัลลีลของ *PfMsp2* ที่ต่างกันร้อยละ 10.8 ของตัวอย่างที่ศึกษา ทั้งนี้พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจรูปแบบอัลลีลของ *PfMsp2* จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะให้ผลต่ำกว่าที่ตรวจได้จากการใช้ตัวอย่างเลือดประมาณร้อยละ 30 และร้อยละ 65 แต่แนวโน้มการกระจายของอัลลีลจากการใช้ตัวอย่างที่ต่างกันเหล่านี้ให้ความสอดคล้องกันสูง

6.5 ในทำนองเดียวกันจากการวิเคราะห์ความหลากหลายในรูปแบบของยีน *PvMsp1* ในส่วน variable block 6 จากตัวอย่าง *Plasmodium vivax* จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศพบอัลลีลลูกผสมระหว่าง Sal-1 ทางด้าน 5' และอัลลีล Belem type b ทางด้าน 3' มีอุบัติการณ์มากกว่าอัลลีลแบบอื่น ๆ ส่วนการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่มีอัลลีลของ *PvMsp1* ต่างกันพบร้อยละ 11.4 ของตัวอย่างที่ศึกษา ทั้งนี้พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจรูปแบบอัลลีลของ *PvMsp1* จากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะให้ผลต่ำกว่าที่ตรวจได้จากการใช้ตัวอย่างเลือดในสัดส่วนใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์รูปแบบของยีน *PfMsp2* จากตัวอย่าง *Plasmodium falciparum* และพบแนวโน้มการกระจายของอัลลีลจากการใช้ตัวอย่างที่ต่างกันเหล่านี้มีความสอดคล้องกันสูงเช่นกัน

6.6 จากการติดตามผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ในเขตจังหวัดตากพบว่า การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์ม โลहित การตรวจโดยวิธี PCR จากตัวอย่างเลือด ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 หลังการติดเชื้อและได้รับการรักษาแล้วนั้นทุกรายให้ผลการตรวจที่เป็นลบ ยกเว้นผู้ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* 1 รายที่ยังคงให้ผลบวกโดยวิธี PCR จากการตรวจตัวอย่างเลือดในวันที่ 7 ซึ่งอาจเกิดจากการที่ร่างกายกำจัด DNA ของเชื้อมาลาเรียได้ช้าในผู้ติดเชื้อบางราย

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้ใช้เวลาจำกัดและการได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ชัดเจนควรมีการศึกษาและติดตามต่อเนื่องมากขึ้น รวมทั้งการใช้ตัวอย่างที่มากขึ้นจากหลายพื้นที่ที่เป็นเขตปรากฏโรคมาลาเรีย
2. เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทยค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR ควรเลือกใช้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจฟิล์ม โลहितก่อน เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนตัวอย่างและประหยัดค่าใช้จ่าย
3. ควรมีการนำวิธี PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยการตรวจจากตัวอย่างน้ำลายและปัสสาวะเพื่อการตรวจและประเมินสถานการณ์ของโรคในบางท้องที่ โดยการสุ่มตัวอย่างจากพื้นที่ที่มีปัญหาการควบคุมโรค
4. ควรมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อมาลาเรียของลิงในคนต่อไปเพื่อให้ได้ข้อสรุปเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อ และบริเวณที่มีลิงที่มีศักยภาพในการเป็นรังโรค

บรรณานุกรม

Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet* 2004;364:1896-98.

Bronner U, Divis PC, F?mert A, Singh B. Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malar J* 2009 Jan 16;8:15.

- Buppan P, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Malar J* 2010;9:72.
- Coleman RE, Maneechai N, Rachapaew N, Kumpitak C, Soyseng V, Miller RS, Thimasarn K, Sattabongkot J. 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* 2002;66:379-83.
- Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 2008;46:165-71.
- Craig AA, Kain KC. Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections. *J Infect. Dis* 1996;174:373-9.
- Cui L, Yan G, Sattabongkot J, Cao Y, Chen B, Chen X, Fan Q, Fang Q, Jongwutiwes S, Parker D, Sirichaisinthop J, Kyaw MP, Su XZ, Yang H, Yang Z, Wang B, Xu J, Zheng B, Zhong D, Zhou G. Malaria in the Greater Mekong Subregion: heterogeneity and complexity. *Acta Trop.* 2012;121:227-239.
- Epping RJ, Goldstone SD, Ingram LT, et al. An epitope recognised by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1988;28:1-10.
- Felger I, Tavul L, Kabintik S, Marshall V, Genton B, Alpers M, Beck HP. *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Exp Parasitol* 1994;79:106-12.
- Fenton B, Clark JT, Khan CM, Robinson JV, Walliker D, Ridley R, Scaife JG, McBride JS. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1991;11:963-71.
- Fenton B, Clark JT, Wilson CF, McBride JS, Walliker D. Polymorphism of a 35-48 kDa *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* 1989;34:79-86.
- Ferreira MU, Hartl DL. *Plasmodium falciparum*: Worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Exp Parasitol* 2007;115:32-40.
- Franks S, Baton L, Tetteh K, Tongren E, Dewin D, Akanmori BD, Koram KA, Ranford-Cartwright L, Riley EM. Genetic diversity and antigenic polymorphism in *Plasmodium falciparum*: Extensive serological cross-reactivity between allelic variants of merozoite surface protein 2. *Infect Immun* 2003;71:3485-95.

- Fryauff DJ, Purnomo, Sutamihardja MA, Elyazar IR, Susanti I, Krisin, Subianto B, Marwoto H. Performance of the OptiMAL assay for detection and identification of malaria infections in asymptomatic residents of Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63:139-45.
- Gilles HM, Warrell DA. Bruce-Chwatt's essential malariology. 3rd ed. London: Edward Arnold, 1993.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 2004;4:327-36.
- Hay SI, Cox J, Rogers DJ, Randolph SE, Stern DI, Shanks GD, Myers MF, Snow RW. Climate change and the resurgence of malaria in the East African highlands. *Nature* 2002;415:905-9.
- Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, Putaporntip C. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques Thailand. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1799-1806.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Hughes AL. Bottleneck effects on vaccine-candidate antigen diversity of malaria parasites in Thailand. *Vaccine* 2010;28:3112-7.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol.* 2005;22:1733-9.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human in Thailand. *Emerg Infect Dis* 2004;10:2211-2213.
- Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, Yanagi T, Kanbara H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1992;51:81-9.
- Kaneko O, Kimura M, Kawamoto F, Kawamoto F, Ferreira F, Tanabe K. *Plasmodium falciparum*: allelic variation in the merozoite surface protein 1 gene in wild isolates from southern Vietnam. *Exp Parasitol* 1997;86:45-57.
- Kantele A, Marti H, Felger I, Müller D, Jokiranta TS. Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1434-6.
- Kawamoto F, Win TT, Mizuno S, Lin K, Kyaw O, Tantular IS, Mason DP, Kimura M, Wongsrichanalai C. Unusual *Plasmodium malariae*-like parasites in southeast Asia. *J Parasitol* 2002;88:350-7.
- Kerr PJ, Ranford-Cartwright L, Walliker D. Proof of intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1994;66:241-8.
- Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim MY, Kim DW, Jongwutiwes S, Tanabe K. A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitol Int* 2003;52:229-36.

- Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Tanabe K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int* 1997;46:91-5.
- Kirchgatter K, del Portillo HA. Molecular analysis of *Plasmodium vivax* relapses using the MSP1 molecule as a genetic marker. *J Infect Dis* 1998;177:511-5.
- Lim CS, Kim SH, Kwon SI, Song JW, Song KJ, Lee KN. Analysis of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:261-5.
- Looareesuwan S, White NJ, Chittamas S, Bunnag D, Harinasuta T. High rate of *Plasmodium vivax* relapse following treatment of *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet* 1987;2:1052-5.
- Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P, Nolder D, Sutherland C, Lee KS, Singh B. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis* 2008;14:811-3.
- Marshall VM, Coppel RL, Martin RK, Oduola AM, Anders RF, Kemp DJ. A *Plasmodium falciparum* MSA-2 gene apparently generated by intragenic recombination between the two allelic families. *Mol Biochem Parasitol* 1991;45:349-51.
- Mason DP, Krudsood S, Wilairatana P, Viriyavejakul P, Silachamroon UChokechindachai W, Singhasivanon P, Supavej S, McKenzie FE, Looareesuwan S. Can treatment of *P.vivax* lead to a unexpected appearance of *falciparum* malaria? *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:57-63.
- Mayxay M, Pukritrayakamee S, Chotivanich K, Imwong M, Looareesuwan S, White NJ. Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with *vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:588-92.
- Mayxay M, Pukritrayakamee S, Newton PN, White NJ. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol* 2004;20:233-40.
- Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ. PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malar J.* 2006;5:103.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415:673-9.
- Mita T, Kaneko A, Lum JK, et al. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:413-415.
- Moody AH, Chiodini PL. Methods for the detection of blood parasites. *Clin Lab Haemat* 2000;22:189-201.
- Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ. 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* 2004;42:2694-700.
- Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Lee PJ, Ng LC, Pei SW, Tu TM, Loh JP, Leo YS. Naturally acquired human

- Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg Infect Dis* 2008;14:814-6.
- Nishimoto Y, Arisue N, Kawai S, Escalante AA, Horii T, Tanabe K, Hashimoto T. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol Phylogenet Evol* 2008;47:45-53.
- Nwakanma DC, Gomez-Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E, Locke E, Conway DJ. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. *J Infect Dis* 2009;199:1567-74.
- Ocampo M, Urquiza M, Guzman F, et al. Two MSA 2 peptides that bind to human red blood cells are relevant to *Plasmodium falciparum* merozoite invasion. *J Pept Res* 2000;55:216-23.
- Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, Ager AL. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol* 1998;36:203-6.
- Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull WHO* 1988;66:621-6.
- Phillips RS. Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:208-26.
- Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, et al. High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine* 2006;24:4233-46.
- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(Suppl):79-87.
- Putaporntip C, Thongaree S, Jongwutiwes S. Differential sequence diversity at merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium knowlesi* suggests possible human to human transmission. *Infect Gen Evol* 2013; (in press).
- Putaporntip C, Buppan P, Jongwutiwes S. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1484-1491.
- Putaporntip C, Hongsriruang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongwutiwes S. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *J Infect Dis* 2009;199:1143-50.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Hughes AL. Differential selective pressures on the merozoite surface protein 2 locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. *Gene* 2008;427: 51-57.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium*

- vivax* merozoite surface protein-1 locus. Proc Nat Acad Sci USA 2002;99:16348-53.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tia T, Ferreira MU, Kanbara H, Tanabe K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (*TRAP*) of *Plasmodium vivax*. Gene 2001;268:97-104.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 (MSP1) gene of *Plasmodium vivax*. Mol Biochem Parasitol 2000;109:111-9.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. Mol Biochem Parasitol 1997;84:49-56.
- Ricci L, Viani I, Piccolo G, Fabio A, Calderaro A, Galati L, et al. Evaluation of OptiMAL assay test to detect imported malaria in Italy. N Microbiol 2000;23:391-8.
- Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? Lancet 1989;i:1183-4.
- Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, Garcia ML, Mico M, Edu M, Alvar J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. Am J Trop Med Hyg 1999;60:183-7.
- Sakihama N, Kimura M, Hirayama K, Kanda T, Na-Bangchang K, Jongwutiwes S, Conway D, Tanabe K. Allelic recombination and linkage disequilibrium within Msp-1 of *Plasmodium falciparum*, the malignant human malaria parasite. Gene 1999;230:47-54.
- Schuurkamp GJ, Spicer PE, Kereu RK, Bulungol PK, Rieckmann. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1992;86:121-2.
- Shulman CE, Dorman EK. Importance and prevention of malaria in pregnancy. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003;97:30-5.
- Shiff CJ, Premji Z, Minjas JN. The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993;87:646-648.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 2004;363:1017-24.
- Siripoon N, Snounou G, Yamogkul P, Na-Bangchang K, Thaithong S. Cryptic *Plasmodium falciparum* Parasites in clinical *P. vivax* blood samples from Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002;96:70-1.
- Sleigh AC, Liu XL, Jackson S, Li P, Shang LY. Resurgence of vivax malaria in Henan province, China. Bull World Health Organ 1998;76:265-70.
- Smythe JA, Coppel RL, Day KP, et al. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:1751-1755.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite

- species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993;58:283-92.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993;61:315-20.
- Snounou G, White NJ. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from *falciparum* and *vivax* malaria in Thailand. *Trends Parasitol* 2004;20:333-9.
- Tanabe K, Sakihama N, Farnet A, Rooth I, Bjorkman A, Walliker D, Ranford-Cartwright L. In vitro recombination during PCR of *Plasmodium falciparum* DNA: a potential pitfall in molecular population genetic analysis. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:211-6.
- Tanabe K, Sakihama N, Nakamura Y, Kaneko O, Kimura M, Ferreira MU, Hirayama K. Selection and genetic drift of polymorphisms within the merozoite surface protein-1 gene of *Plasmodium falciparum*. *Gene* 2000;241:325-31.
- Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 1987;195:273-87.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-82.
- Thaithong S, Suebsaeng L, Rooney W, Beale GH. Evidence of increased chloroquine sensitivity in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:37-8.
- Tonon AP, Hoffmann EHE, da Silveira LA, Ribeiro AG, Goncalves CRS, Ribolla PEM, Wunderlich G, Ferreira MU. *Plasmodium falciparum*: sequence diversity and antibody recognition of the merozoite surface protein-2 (MSP-2) in Brazilian Amazonia. *Exp Parasitol* 2004;108:114-25.
- Trape JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1985;79:181-4.
- Uguen C, Rabodonirina M, De Pina JJ, Vigier JP, Martet G, Maret M, Peyron F. ParaSight-F rapid manual diagnostic test of *Plasmodium falciparum* infection. *Bull World Health Organ* 1995;73:643-9.
- Vaidya AB, Akella R, Suplick K. Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;35:97-107.
- Valecha N, Sharma VP, Devi CU. A rapid immunochromatographic test (ICT) for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:257-60.
- Van den Ende J, Vervoort T, Van Gompel A, Lynen L. Evaluation of two tests based on the detection of

- histidine rich protein 2 for the diagnosis of imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998;92:285-288.
- Waller KL, Lee S, Fidock DA. Molecular and cellular biology of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. In: *Malaria parasites: Genomes and molecular biology*. Waters AP, Janse CJ, ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2004:501-540.
- Waters AP, McCutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet* 1989;1: 1343-6.
- World Health Organization. Severe and complicated malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1990;84(suppl 2):1-65.
- Zhu HM, Li J, Zheng H. Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2006;24:70-1.

ประวัติคณะผู้วิจัย

ผู้วิจัยหลัก

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Chaturong Putaporntip
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3240100025105
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2564000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-2524963
e-mail: p.chaturong@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาศาสตร์	2534
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สัตววิทยา	2538
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Parasitology	2546

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

Medical Parasitology, Molecular Biology, Population Genetics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

- Detection and genetic characterization of malaria in wild and domesticated nonhuman primate populations in Narathivas Province

- A study of anopheline potential vectors to human and primate malaria in western and southern Thailand

- Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax*: analysis of the genes encoding merozoite surface proteins 4 and 5 (PvMsp-4/5)

- Development of highly sensitive and specific diagnostic methods for human and primate malaria from blood samples stored in various conditions

- Population structure of *Plasmodium vivax* in Thailand based on the merozoite surface protein 1 gene

- Population genetics of anopheline primary vectors of human malaria in Thailand

- Detection of malaria among primate populations in natural habitats and some tourist attraction sites in Thailand

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

ผลงานตีพิมพ์ (ผลงาน 5 ปีย้อนหลัง)

1. **Putaporntip C**, Thongaree S, Jongwutiwes S. Differential sequence diversity at merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium knowlesi* from humans and macaques in Thailand. Infection Genetics and Evolution 2013;18C:213-219.
2. Miao M, Wang Z, Yang Z, Yuan L, Parker DM, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Xangsayarath P, Pongvongsa T, Moji H, Dinh Tuong T, Abe T, Nakazawa S, Kyaw MP, Yan G, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Mu J, Su XZ, Kaneko O, Cui L. Genetic diversity and lack of artemisinin selection signature on the *Plasmodium falciparum* ATP6 in the Greater Mekong Subregion. PLoS One 2013;8:e59192.
3. **Putaporntip C**, Hughes AL, Jongwutiwes S. Low level of sequence diversity at merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* from Thai isolates. PLoS One 2013;8:e58962.
4. Kuamsab N, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. A novel reverse transcription polymerase chain reaction reveals a high prevalence of *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in an endemic area of Thailand. Asian Biomedicine 2013;7:219-216.
5. Ungcharoensuk C, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Sequence conservation in the *Ancylostoma* secreted protein-2 of *Necator americanus* (Na-ASP-2) from hookworm infected individuals in Thailand. Infection Genetics and Evolution 2012;12:1926-32.
6. Kuamsab N, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. Malaria Journal 2012;11:190.
7. Suankratay C, Thiansukhon E, Nilaratanakul V, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Disseminated infection caused by novel species of microsporidium, Thailand. Emerging Infectious Diseases 2012;18:302-304.
8. Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, **Putaporntip C**. *Plasmodium knowlesi* Malaria in humans and macaques, Thailand. Emerging Infectious Diseases 2011;17:1799-806.
9. Tia T, **Putaporntip C**, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. Clinical Microbiology and Infection 2012;18:598-603.
10. **Putaporntip C**, Buppan P, Jongwutiwes S. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. Clinical Microbiology and Infection 2011;17:1484-1491.
11. Suwancharoen C, **Putaporntip C**, Rungruang T, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies against the C-terminal part of *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein in a low endemic area. Parasitology Research 2011;109:315-320.
12. Huang Y, Yang Z, **Putaporntip C**, Miao M, Wei H, Zou C, Jongwutiwes S, Cui L. Isolation and identification of a South China strain of *Plasmodium inui* from *Macaca fascicularis*. Veterinary Parasitology. 2011;176:9-15.

13. Nuprasert W, **Putaporntip C**, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. Journal of Clinical Microbiology. 2010;48:4636-40.
14. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Thongaree S, Seethamchai S, Grynberg P, Hughes AL. Ecology of malaria parasites infecting Southeast Asian macaques: evidence from cytochrome b sequences. Molecular Ecology. 2010;19:3466-76.
15. Buppan P, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. Malaria Journal. 2010;9:72.
16. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Hughes AL. Bottleneck effects on vaccine-candidate antigen diversity of malaria parasites in Thailand. Vaccine. 2010;28:3112-7.
17. **Putaporntip C**, Udomsangpetch R, Pattanawong U, Cui L, Jongwutiwes S. Genetic diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-5 locus from diverse geographic origins. Gene. 2010;456:24-35.
18. Kosuwin R, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. Gene. 2010;449:1-8.
19. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. Infection Genetics and Evolution. 2009;9:1295-300.
20. Areekul P, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Sitthicharoenchai P, Jongwutiwes S. Molecular Biology of Malaria *Trichuris vulpis* and *T. trichiura* infections among schoolchildren of a rural community in northwestern Thailand: the possible role of dogs in disease transmission. Asian Biomedicine 2010;4:49-60.
21. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Hughes AL. Natural selection maintains a stable polymorphism at the circumsporozoite protein locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. Infection Genetics and Evolution. 2009;9:567-73.
22. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Ferreira MU, Kanbara H, Udomsangpetch R, Cui L. Limited global diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 4 gene. Infection Genetic and Evolution. 2009;9:821-826.
23. **Putaporntip C**, Hongsrimuang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongwutiwes S. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. Journal of Infectious Diseases. 2009;199:1143-1150.
24. Teeranaipong P, Ohashi J, Patarapotikul J, Kimura R, Nuchnoi P, Hananantachai H, Naka I, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Tokunaga K. A functional single-nucleotide polymorphism in the CR1 promoter region contributes to protection against cerebral malaria. Journal of Infectious Diseases. 2008;198:1880-1891.

25. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Hughes AL. Differential selective pressures on the merozoite surface protein 2 locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. Gene 2008;427:51-57.
26. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Karnchaisri K, Seethamchai S, Hongsrimuang T, Kanbara H. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein: Analysis of isolates mainly from low endemic areas. Gene 2008;410:139-146. 18.
27. Seethamchai S, **Putaporntip C**, Malaivijitnond S, Cui L, Jongwutiwes S. Malaria and *Hepatozoon* species in wild macaques, southern Thailand. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2008;78:646-653.
28. **Putaporntip C**, Seethamchai S, Suvannadhat V, Hongsrimuang T, Sattabongkot J, Jongwutiwes S. Selective pressure on the merozoite surface protein-1 genes of *Plasmodium vivax*, *P. knowlesi* and *P. cynomolgi*. Asian Biomedicine 2008;2:123-134.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน

- โครงการวิจัยเรื่อง “การกระจายตามธรรมชาติ คุณลักษณะของสายพันธุ์ และการวินิจฉัยโดยวิธีอณูชีววิทยาของอะมีบาที่ดำรงชีพเป็นอิสระชนิดที่สามารถก่อโรคในคนในประเทศไทย”

ระยะเวลา 1 ปี

ทุนสนับสนุน: ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ประจำปี 2554

สถานภาพในการทำวิจัย: ได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละ 90

- โครงการวิจัยเรื่อง “วิวัฒนาการของตัวรับดัดพีไฟแอนติเจนสำหรับคีโมไคส์ของลิงกังและลิงแสม และความสามารถในการติดเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมโนวลิไซและพลาสโมเดียมไซโนโมลิตที่ใกล้ชิดกับพลาสโมเดียมไวแวกซ์”

ระยะเวลา 3 ปี

ทุนสนับสนุน: ทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2554

สถานภาพในการทำวิจัย: ได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละ 60

ผู้วิจัยร่วม 1

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Somchai Jongwutiwes

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3100503095200

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

โทรศัพท์ 02-2528181 ต่อ 3685 โทรสาร 02-2525944

e-mail: jongwutiwes@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม)	วิทยาศาสตร์การแพทย์	2525
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2527
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Protozoology	2536

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Medical Parasitology, Molecular Parasitology, Molecular Population Genetics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

- หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัยระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็น
แนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย

- งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

ผลงานตีพิมพ์ (ผลงาน 5 ปีย้อนหลัง)

1. Putaporntip C, Thongaree S, **Jongwutiwes S**. Differential sequence diversity at merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium knowlesi* from humans and macaques in Thailand. Infection Genetics and Evolution. 2013;18C:213-219.

2. Miao M, Wang Z, Yang Z, Yuan L, Parker DM, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Xangsayarath P, Pongvongsa T, Moji H, Dinh Tuong T, Abe T, Nakazawa S, Kyaw MP, Yan G, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Mu J, Su XZ, Kaneko O, Cui L. Genetic diversity and lack of artemisinin selection signature on the *Plasmodium falciparum* ATP6 in the Greater Mekong Subregion. PLoS One. 2013;8:e59192.

3. Putaporntip C, Hughes AL, **Jongwutiwes S**. Low level of sequence diversity at merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* from Thai isolates. PLoS One. 2013;8:e58962.

4. Kuamsab N, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, **Jongwutiwes S**. A novel reverse transcription polymerase chain reaction reveals a high prevalence of *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in an endemic area of Thailand. Asian Biomedicine. 2013;7:219-216.

5. Ungcharoensuk C, Putaporntip C, Pattanawong U, **Jongwutiwes S**. Sequence conservation in the *Ancylostoma* secreted protein-2 of *Necator americanus* (Na-ASP-2) from hookworm infected individuals in Thailand. Infection Genetics and Evolution. 2012;12:1926-32.
6. Kuamsab N, Putaporntip C, Pattanawong U, **Jongwutiwes S**. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. Malaria Journal. 2012;11:190.
7. Suankratay C, Thiansukhon E, Nilaratanakul V, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Disseminated infection caused by novel species of microsporidium, Thailand. Emerging Infectious Diseases 2012;18:302-304.
8. **Jongwutiwes S**, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, Putaporntip C. *Plasmodium knowlesi* Malaria in humans and macaques, Thailand. Emerging Infectious Diseases 2011;17:1799-806.
9. Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, **Jongwutiwes S**. A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. Clinical Microbiology and Infection 2012;18:598-603.
10. Putaporntip C, Buppan P, **Jongwutiwes S**. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. Clinical Microbiology and Infection 2011;17:1484-1491.
11. Suwancharoen C, Putaporntip C, Rungruang T, **Jongwutiwes S**. Naturally acquired IgG antibodies against the C-terminal part of *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein in a low endemic area. Parasitology Research 2011;109:315-320.
12. Huang Y, Yang Z, Putaporntip C, Miao M, Wei H, Zou C, **Jongwutiwes S**, Cui L. Isolation and identification of a South China strain of *Plasmodium inui* from *Macaca fascicularis*. Veterinary Parasitology 2011;176:9-15.
13. Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, **Jongwutiwes S**. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. Journal of Clinical Microbiology 2010;48: 4636-40.
14. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Thongaree S, Seethamchai S, Grynberg P, Hughes AL. Ecology of malaria parasites infecting Southeast Asian macaques: evidence from cytochrome b sequences. Molecular Ecology 2010;19:3466-76.
15. Buppan P, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, **Jongwutiwes S**. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. Malaria Journal 2010;9:72.
16. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Hughes AL. Bottleneck effects on vaccine-candidate antigen diversity of malaria parasites in Thailand. Vaccine 2010;28: 3112-7.

17. Putaporntip C, Udomsangpetch R, Pattanawong U, Cui L, **Jongwutiwes S**. Genetic diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-5 locus from diverse geographic origins. Gene 2010;456:24-35.
18. Kosuwint R, Putaporntip C, Pattanawong U, **Jongwutiwes S**. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. Gene 2010;449: 1-8.
19. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. Infection, Genetics and Evolution 2009;9:1295-300.
20. Areekul P, Putaporntip C, Pattanawong U, Sitthicharoenchai P, **Jongwutiwes S**. Molecular Biology of Malaria *Trichuris vulpis* and *T. trichiura* infections among schoolchildren of a rural community in northwestern Thailand: the possible role of dogs in disease transmission. Asian Biomedicine 2010;4:49-60.
21. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Hughes AL. Natural selection maintains a stable polymorphism at the circumsporozoite protein locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. Infection, Genetics and Evolution 2009;9:567-73.
22. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Ferreira MU, Kanbara H, Udomsangpetch R, Cui L. Limited global diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 4 gene. Infection, Genetic and Evolution 2009;9:821-826.
23. Putaporntip C, Hongsrimuang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, **Jongwutiwes S**. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. Journal of Infectious Diseases 2009;199:1143-1150.
24. Teeranaipong P, Ohashi J, Patarapotikul J, Kimura R, Nuchnoi P, Hananantachai H, Naka I, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Tokunaga K. A functional single-nucleotide polymorphism in the CR1 promoter region contributes to protection against cerebral malaria. Journal of Infectious Diseases 2008;198:1880-1891.
25. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Hughes AL. Differential selective pressures on the merozoite surface protein 2 locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. Gene 2008;427:51-57.
26. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Karnchaisri K, Seethamchai S, Hongsrimuang T, Kanbara H. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein: Analysis of isolates mainly from low endemic areas. Gene 2008;410:139-146.
27. Seethamchai S, Putaporntip C, Malaivijitnond S, Cui L, **Jongwutiwes S**. Malaria and *Hepatozoon* species in wild macaques, southern Thailand. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2008;78:646-653.
28. Putaporntip C, Seethamchai S, Suvannadhat V, Hongsrimuang T, Sattabongkot J, **Jongwutiwes S**. Selective pressure on the merozoite surface protein-1 genes of *Plasmodium vivax*, *P. knowlesi* and *P. cynomolgi*. Asian Biomedicine 2008;2:123-134.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน

- โครงการวิจัยเรื่อง “ระบาดวิทยาาระดับ โมเลกุลของปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติดิส จีโรเว็คซี ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัส

ภูมิคุ้มกันบกพร่องในประเทศไทย”

ระยะเวลา 3 ปี

ทุนสนับสนุน: ทุนมหาวิทยาลัยวิจัยและกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสม โภช

สถานภาพในการทำวิจัย: อยู่ในระหว่างเริ่มดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัยร่วม 2

- ชื่อ – สกุล (ภาษาไทย) อาจารย์ สุเนย์ สีธรรมใจ
ชื่อ – สกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Sunee Seethamchai
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 5299 00070 49 6
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
99 หมู่ 9 ต.ท่าโพธิ์ อ.พิษณุโลก-นครสวรรค์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก
65000
โทรศัพท์ 055-261024 หรือ 055-261000 ต่อ 3301
โทรสาร 055-261025
e-mail: sunoat@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
มหาวิทยาลัยนเรศวร	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สัตววิทยา	2538
มหาวิทยาลัยนเรศวร	Doctor of Philosophy	Biological Sciences	2552

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Medical Parasitology, Molecular Biology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

ผลงานตีพิมพ์

- Kuamsab N, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. A novel reverse transcription polymerase chain reaction reveals a high prevalence of *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in an endemic area of Thailand. Asian Biomedicine. 2013;7:219-216.
- Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, Putaporntip C. *Plasmodium knowlesi* Malaria in humans and macaques, Thailand. Emerging Infectious Diseases 2011;17:1799-806.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Thongaree S, Seethamchai S, Grynberg P, Hughes AL. Ecology of malaria parasites infecting Southeast Asian macaques: evidence from cytochrome b sequences. Molecular Ecology 2010;19:3466-76.
- Buppan P, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. Malaria Journal 2010;9:72.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. Molecular and Biochemical Parasitology 2000;109:111-9.

6. **Seethamchai S**, Putapornpip C, Malaivijitnond S, Cui L, Jongwutiwes S. Malaria and *Hepaticystis* species in wild macaques, southern Thailand. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2008;78:646-653.
7. Putapornpip C, **Seethamchai S**, Suvannadhat V, Hongsriruang T, Sattabongkot J, Jongwutiwes S. Selective pressure on the merozoite surface protein-1 genes of *Plasmodium vivax*, *P. knowlesi* and *P. cynomolgi*. Asian Biomedicine 2008;2:123-134.

ผู้วิจัยร่วม 3

- ชื่อ ดร.วรรณภา สุวรรณเกิด
Wannapa Suwonkerd Ph. D.
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3509900024303
- ตำแหน่งปัจจุบัน: หัวหน้าสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10
- สถานที่ทำงาน : สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10
18 ถ.บุญเรืองฤทธิ์ ต.ศรีภูมิ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์ 053-221529 ต่อ 216, 203 โทรสาร 053-212389
e-mail: suwannapa@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
มหาวิทยาลัยรามคำแหง	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	จุลชีววิทยา	2532
มหาวิทยาลัยมหิดล	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	กัญญาวิทยาทางการแพทย์	2537
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Medical Entomology	2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

โรคติดต่อฯ โดยแมลง กัญญาวิทยาทางการแพทย์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

- งานวิจัยเกี่ยวกับระบาดวิทยาของมาลาเรียและยุงพาหะในบริเวณภาคเหนือตอนบน
- งานวิจัยเกี่ยวกับยุงพาหะนำโรคไข้เลือดออก
- งานวิจัยเกี่ยวกับโรคชิคุนกุนยาไวรัส

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

ผลงานตีพิมพ์ (ผลงาน 5 ปีย้อนหลัง)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

- 1: Tainchum K, Polsomboon S, Grieco JP, **Suwonkerd W**, Prabaripai A, Sungvornyothin S, Chareonviriyaphap T, Achee NL. Comparison of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) resting behavior on two fabric types under consideration for insecticide treatment in a push-pull strategy. *J Med Entomol* 2013;50:59-68.
- 2: Thongsahuan S, Baimai V, Junkum A, Saeung A, Min GS, Joshi D, Park MH, Somboon P, **Suwonkerd W**, Tippawangkosol P, Jariyapan N, Choochote W. Susceptibility of Anopheles campestris-like and Anopheles barbirostris species complexes to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in Thailand. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:105-12.
- 3: **Suwonkerd W**, Vryheid R, Suwannachote N. Progress of partial integration of malaria control with other vector borne diseases control in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2010;41:1297-305.

- 4: Chareonviriyaphap T, Grieco JP, **Suwankerd W**, Prabaripai A, Polsomboon S, Thainchum K, Sungvornyothin S, Achee NL. An improved experimental hut design for the study of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement patterns in Thailand. *J Vector Ecol* 2010;35:428-31.
- 5: Thanispong K, Achee NL, Grieco JP, Bangs MJ, **Suwankerd W**, Prabaripai A, Chauhan KR, Chareonviriyaphap T. A high throughput screening system for determining the three actions of insecticides against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in Thailand. *J Med Entomol* 2010;47:833-41.
- 6: Malaithong N, Polsomboon S, Poolprasert P, Prabaripai A, Bangs MJ, **Suwankerd W**, Pothikasikorn J, Akratanakul P, Chareonviriyaphap T. Human-landing patterns of *Anopheles dirus* sensu lato (Diptera: Culicidae) in experimental huts treated with DDT or deltamethrin. *J Med Entomol* 2010;47: 823-32.
- 7: Suwannachote N, Grieco JP, Achee NL, **Suwankerd W**, Wongtong S, Chareonviriyaphap T. Effects of environmental conditions on the movement patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) into and out of experimental huts in Thailand. *J Vector Ecol* 2009;34:267-75.
- 8: Mongkalagoon P, Grieco JP, Achee NL, **Suwankerd W**, Chareonviriyaphap T. Irritability and repellency of synthetic pyrethroids on an *Aedes aegypti* population from Thailand. *J Vector Ecol* 2009;34:217-24.
- 9: Thanispong K, Achee NL, Bangs MJ, Grieco JP, **Suwankerd W**, Prabaripai A, Chareonviriyaphap T. Irritancy and repellency behavioral responses of three strains of *Aedes aegypti* exposed to DDT and alpha-cypermethrin. *J Med Entomol* 2009;46:1407-14.
- 10: Joshi D, Choochote W, Park MH, Kim JY, Kim TS, **Suwankerd W**, Min GS. The susceptibility of *Anopheles lesteri* to infection with Korean strain of *Plasmodium vivax*. *Malar J* 2009;8:42.
- 11: Polsomboon S, Poolprasert P, Suwankerd W, Bangs MJ, Tanasinchayakul S, Akratanakul P, Chareonviriyaphap T. Biting patterns of *Anopheles minimus* complex (Diptera: Culicidae) in experimental huts treated with DDT and deltamethrin. *J Vector Ecol* 2008;33:285-92.
- 12: Khantikul N, Butraporn P, Kim HS, Leemingsawat S, Tempongko MA, **Suwankerd W**. Adherence to antimalarial drug therapy among vivax malaria patients in northern Thailand. *J Health Popul Nutr* 2009;27:4-13.
- 13: Silawan T, Singhasivanon P, Kaewkungwal J, Nimmanitya S, **Suwankerd W**. Temporal patterns and forecast of dengue infection in Northeastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008;39:90-8.
- 14: Polsomboon S, Poolprasert P, Bangs MJ, **Suwankerd W**, Grieco JP, Achee NL, Prabaripai A, Chareonviriyaphap T. Effects of physiological conditioning on behavioral avoidance by using a single age group of *Aedes aegypti* exposed to deltamethrin and DDT. *J Med Entomol* 2008;45:251-9.
- 15: Hutamai S, **Suwankerd W**, Suwannchote N, Somboon P, Prapanthadara LA. A survey of dengue viral infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from re-epidemic areas in the north of Thailand using nucleic acid sequence based amplification assay. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38:448-54.

- 16: Grieco JP, Achee NL, Chareonviriyaphap T, **Suwankerd W**, Chauhan K, Sardelis MR, Roberts DR. A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. PLoS One 2007;2:e716.
- 17: **Suwankerd W**, Mongkalagoon P, Parbaripai A, Grieco J, Achee N, Roberts D, Chareonviriyaphap T. The effect of host type on movement patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) into and out of experimental huts in Thailand. J Vector Ecol 2006;31:311-8.
- 18: Tsuda Y, **Suwankerd W**, Chawprom S, Prajakwong S, Takagi M. Different spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* along an urban-rural gradient and the relating environmental factors examined in three villages in northern Thailand. J Am Mosq Control Assoc 2006;22:222-8.
- 19: Chareonviriyaphap T, Kongmee M, Bangs MJ, Sathantriphop S, Meunworn V, Parbaripai A, **Suwankerd W**, Akranakul P. Influence of nutritional and physiological status on behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to deltamethrin and cypermethrin. J Vector Ecol 2006;31:89-101.
-