

การตรวจหาแกมมาโตไซด์ของพลาสมาเดี่ยว ไวแวกซ์ ในกระแสเลือด โดยวิธี
ปฏิกิริยาภูมิต้านทานโพลีเมอร์เรส รีเวอร์ส ทรานส์คริปชัน

นางสาวนภาพร กวมทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DETECTION OF PLASMODIUM VIVAX GAMETOCYTES IN CIRCULATION BY REVERSE
TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION

Miss Napaporn Kuamsab

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

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรวจหาแกมีโตไซด์ของพลาสมิเดียม ไวแวกซ์
ในกระแสเลือด โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
รีเวอร์ส ทรานสคริปชัน

โดย

นางสาวนภาพร กวมทรัพย์

สาขาวิชา

ปริสดีตวิทยาทางการแพทย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิริหิตเจริญชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกรียงศักดิ์ ลิ้มปัทมกุล)

นภาพร กวมทรัพย์ : การตรวจหาแกมีโตไซต์ของพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ในกระแสเลือด โดยวิธี
 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส รีเวอร์ส ทรานสคริปชัน. (DETECTION OF PLASMODIUM VIVAX
 GAMETOCYTES IN CIRCULATION BY REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN
 REACTION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. นพ. สมชาย จงวุฒิเวศย์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 ร่วม : รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์, 121 หน้า.

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก ในแต่ละปีมีผู้ป่วยมาลาเรียประมาณ
 350 - 500 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 1 ล้านคน ถึงแม้ว่าโรคมาลาเรียส่วนใหญ่จะเกิดจากการติดเชื้อพลาสโมเดียม
 ฟัลซิพารัม ซึ่งก่อให้เกิดอาการรุนแรงและมีอุบัติการณ์ก่อโรคมามากกว่ามาลาเรียชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามเชื้อพลาสโมเดียม
 ไวแวกซ์ มีการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์อย่างกว้างขวางและมีความสามารถในการก่อให้เกิดความเจ็บป่วยเรื้อรังและ
 กลับมาเป็นซ้ำได้เนื่องจากการมีระยะพักตัวที่อยู่ในเซลล์ตับและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการรุนแรงทางคลินิก สำหรับ
 เป้าหมายของการกำจัดเชื้อมาลาเรียโดยการตัดขั้นตอนในการติดต่อของเชื่อนั้น ระยะแกมีโตไซต์ในกระแสเลือดของผู้ที่
 ติดเชื้อมาลาเรียจึงเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับยาและวัคซีน ดังนั้นการประมาณการแพร่กระจายของระยะดังกล่าวจึงมี
 ความสำคัญต่อการควบคุมโรค ถึงแม้ว่าวิธีการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถือเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปทาง
 ห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำ
 กว่า การตรวจสอภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปัจจุบันได้มีการพัฒนานำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจหาแกมีโต
 ไซต์ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาวิธีปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส รีเวอร์ส ทรานสคริปชัน โดยใช้ยีนเป้าหมาย คือ พีวีเอส 25
 เพื่อการตรวจหาแกมีโตไซต์ระยะที่ 5 ของเชื้อพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 106 ตัวอย่าง
 จากผู้ป่วยติดเชื้อพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ที่เข้ารับการรักษาจากมาลาเรียคลินิกในจังหวัดตาก จัดเป็นตัวอย่างในฤดูฝน
 จำนวน 49 ตัวอย่าง และในฤดูแล้งจำนวน 57 ตัวอย่าง โดยใช้อาร์เอ็นเอที่เตรียมจากเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์
 เอ็นเอและเลือดที่เก็บบนกระดาษกรอง ผลการศึกษาพบระยะแกมีโตไซต์ในกระแสเลือด จากการตรวจภายใต้กล้อง
 จุลทรรศน์จากฟิล์มเลือดชนิดหนาและชนิดบางที่ย้อมด้วยสีย้อมซาร์รอยละ 56.0 และร้อยละ 52.38 ของผู้ที่ติดเชื้อพ
 ลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส รีเวอร์ส
 ทรานสคริปชัน ที่มีความจำเพาะต่อยีนพีวีเอส 25 ผลการตรวจพบร้อยละ 91.84 และร้อยละ 94.87 ของอาร์เอ็นเอจาก
 ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน ตามลำดับ โดยสรุปผลการตรวจหาแกมีโต
 ไซต์ให้ผลบวกร้อยละ 93.18 จากการใช้อาร์เอ็นเอที่เตรียมจากเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ และร้อยละ 89.77
 โดยวิธีการหยดเลือดบนกระดาษกรอง การวินิจฉัยความไวของการตรวจสอยีนพีวีเอส 25 โดยวิธีปฏิกริยาลูกโซ่โพลี
 เมอร์เรส รีเวอร์ส ทรานสคริปชัน อาร์เอ็นเอที่เตรียมจากเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและเลือดที่เก็บบน
 กระดาษกรองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และพบว่าความชุกของแกมี
 โตไซต์ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในช่วงฤดู
 แล้งและฤดูฝน การศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธีปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส รีเวอร์ส ทรานสคริปชัน มีความไวในการ
 ตรวจพบแกมีโตไซต์ของเชื้อพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ได้ดีกว่าการตรวจสอภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากตัวอย่างเลือด
 ผู้ป่วยที่ถูกเก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและบนกระดาษกรอง และพบความชุกสูงของแกมีโตไซต์ของเชื้อพลาสโมเดียม
 ไวแวกซ์ เกิดขึ้นทั้งในฤดูกาลที่มีการแพร่กระจายของเชื้อต่ำในช่วงฤดูแล้งและสูงในช่วงฤดูฝนจากพื้นที่ที่มีการ
 แพร่กระจายของเชื้อในประเทศไทย

ภาควิชา.....ปรสตีวิทยา.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....ปรสตีวิทยาทางการแพทย์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5274780630 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS : GAMETOCYTES / PLASMODIUM VIVAX / REVERSE TRANSCRIPTION
POLYMERASE CHAIN REACTION

NAPAPORN KUAMSAB : DETECTION OF PLASMODIUM VIVAX GAMETOCYTES IN
CIRCULATION BY REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION.
ADVISOR : PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, CO-ADVISOR : ASSOC. PROF.
CHATURONG PUTAPORNTIP, 121 pp.

Malaria remains one of the world's most important public health burdens. It has been estimated that 350-500 million people are infected with malaria, resulting in about 1 million deaths each year. Although malaria caused by *Plasmodium falciparum* is the most pernicious and contributes the most disease burden of all malaria species at the global scale, *Plasmodium vivax* occupies a larger geographical niche and is capable of causing chronic relapsing illness due to the presence of a dormant stage in hepatocyte and can be responsible for severe clinical syndromes. For malaria eradication aiming at abrogating malaria transmission, circulating gametocytes in infected individuals are targets for drugs and vaccines. Therefore, estimation of gametocyte carriage has important implication for disease control. Although microscopy is considered to be a practical tool for malaria diagnosis. Furthermore, a number of infected blood samples harboring parasites below microscopic detection threshold are undiagnosed by microscopy. Herein, a novel nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR) targeting *Pvs25* mRNA was developed for detection of mature gametocytes (stage V) of *P. vivax*. The performance of the RT-PCR method was evaluated using blood samples from 106 *P. vivax*-infected patients who attended a malaria clinic in Tak Province in rainy season (n=49) and in dry season (n=57). RNA was extracted from both fresh blood spotted onto filter paper and RNA-preserved blood sample from each subject. Results showed that 56% (28/50) and 52.38% (22/42) of patients infected with *P. vivax* collected in dry and in rainy seasons, respectively, had gametocytes in their circulation based on microscopic examination of Giemsa stained thin and thick blood films. On the other hand, the nested RT-PCR method could specifically amplify *Pvs25* mRNA in 91.84% (45/49) and 94.87% (37/39) of RNA-preserved blood samples from patients infected with *P. vivax* in dry and in rainy seasons, respectively. In total, 93.18% (82/88) of RNA-preserved blood samples gave positive tests for nested RT-PCR method and 89.77% (79/88) of blood samples spotted onto filter paper conferred positive results. It is noteworthy that no significant difference in diagnostic sensitivity for *Pvs25* mRNA detection by nested RT-PCR was observed when templates were derived from RNA-preserved blood samples or from blood samples spotted onto filter paper ($p>0.05$). The prevalence of *P. vivax* gametocyte carriage did not show significant difference between samples collected in dry season and those collected in rainy seasons. Taken together, this study demonstrated that the nested RT-PCR method was superior to microscopy for detection of *P. vivax* mature gametocytes in patients' blood samples that could be efficiently stored either on filter paper or RNA preservative and that a high prevalence of submicroscopic *P. vivax* gametocytemia occurred in both low (dry season) and high (rainy season) transmission seasons in an endemic area of Thailand.

Department : Parasitology..... Student's Signature

Field of Study : Medical Parasitology..... Advisor's Signature

Academic Year : 2011..... Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำข้อคิดต่างๆ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง วิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำ ในการแก้ปัญหาต่างๆ ในการทำวิจัย ให้กำลังใจเมื่อมีอุปสรรค มิตรภาพที่ดี ตลอดจนแก้ไข ข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์มาด้วยดียิ่งตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ สิทธีเจริญชัย ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกรียงศักดิ์ ลิมปังกิตติกุล ภาควิชากุมารเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและ สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณกีฟ้า ก่ออำไพ คุณภัทธร บุปผัน และคุณเจริญชัย อึ้งเจริญสุข ช่วยเหลือในเรื่องการเก็บตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่จากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนเพื่อสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในระดับ บัณฑิตศึกษา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่ๆ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ ให้กำลังใจการสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญกราฟ.....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ประวัติความเป็นมาของเชื้อมาลาเรีย.....	5
อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย.....	6
การกระจายทางภูมิศาสตร์.....	7
วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย.....	11
พาหะนำเชื้อมาลาเรีย.....	15
อาการและลักษณะแสดงทางคลินิก.....	16
การป้องกันโรค.....	18
ยาด้านเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด.....	18
พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย.....	19
ระบบภูมิคุ้มกันและวัคซีนป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ <i>P. vivax</i>	20
ชีววิทยาของแกมีโตไซต์.....	22
ช่วงชีวิตของแกมีโตไซต์.....	24
ระบอดิวิทยาของแกมีโตไซต์.....	24
ความหนาแน่นของแกมีโตไซต์กับช่วงฤดูกาล.....	25
อัตราการแพร่กระจายของแกมีโตไซต์.....	26
แกมีโตไซต์ในคน.....	27

บทที่	หน้า
แกมีโตไซต์ในยุงพาหะ.....	31
การวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ.....	39
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	51
รูปแบบการวิจัย.....	51
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	51
ระเบียบวิธีวิจัย.....	52
ขนาดของตัวอย่าง (sample size).....	52
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	54
การเก็บตัวอย่าง.....	57
การตรวจเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือด.....	57
การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction).....	59
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification).....	60
การตรวจผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	62
การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA Extraction).....	62
การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA (cDNA synthesis).....	64
การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้เป็น PCR primers.....	64
การเพิ่มปริมาณ cDNA (complimentary DNA Amplification).....	66
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	67
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	68
ลักษณะทั่วไป และข้อมูลทางคลินิกของประชากรตัวอย่าง.....	68
ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	70
ผลการตรวจหาแกมีโตไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	70
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับแยกชนิดของเชื้อมาลาเรีย.....	71
เปรียบเทียบความจำเพาะของไพรเมอร์ Pvs25 โดยใช้ gDNA และ cDNA.....	75
ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ Pvs25 ด้วยวิธี RT-PCR.....	76
ผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ <i>P. vivax</i>	77
เปรียบเทียบความไวของวิธีการเก็บอาร์เอ็นเอที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR.....	85
เปรียบเทียบความไวของการตรวจหาแกมีโตไซต์ด้วยวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี RT-PCR.....	87

บทที่	หน้า
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล.....	92
ข้อเสนอแนะ.....	95
รายการอ้างอิง.....	96
ภาคผนวก.....	117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	121

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคมาลาเรีย.....	69
2. แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	70
3. แสดงผลการตรวจหาแกมีโตไซต์ของเชื้อ <i>P. vivax</i> ในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง จากฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซ่า.....	71
4. แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดด้วยวิธีพีซีอาร์ จากยีน SSU rRNA.....	74
5. แสดงผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ <i>P. vivax</i> จากตัวอย่างเลือด ที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR.....	81
6. แสดงผลการตรวจหาแกมีโตไซต์ในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งจากตัวอย่างเลือด ที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ.....	82
7. แสดงผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ <i>P. vivax</i> จากตัวอย่างเลือด ที่หยดบนกระดาษกรองด้วยวิธี RT-PCR.....	85
8. แสดงผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ <i>P. vivax</i> จากวิธีการเตรียมอาร์ เอ็นเอของตัวอย่างเลือดและวิธีเก็บตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง โดยวิธี RT-PCR	86
9. แสดงผลการเปรียบเทียบแกมีโตไซต์โดยใช้วิธีการตรวจสอบภายใต้กล้อง จุลทรรศน์และวิธี RT-PCR	87
10. แสดงผลการเปรียบเทียบแกมีโตไซต์ด้วยวิธี nested RT-PCR โดยใช้ตัวอย่าง เลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง กับวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	88
11. แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย และอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์โดยใช้วิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือด ที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ.....	89
12. แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย และอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์โดยใช้วิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือด ที่หยดบนกระดาษกรอง.....	90

ตารางที่		หน้า
13.	แสดงผลความไว และความจำเพาะของการวินิจฉัยด้วยวิธี nested RT-PCR และวิธีการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสภาวะอาร์เอ็นเอและตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง.....	91

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการกระจายตัวของเชื้อมาลาเรีย.....	8
2. แสดงจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยในประเทศไทยปี พ.ศ. 2552.....	9
3. แสดงวงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่องและในคน.....	15
4. แสดงลักษณะรูปร่างแกมีโตไซต์ในเชื้อมาลาเรีย.....	20
5. แสดงโปรตีนของระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ <i>P. vivax</i> ในยุงพาหะ.....	21
6. แสดงลักษณะรูปร่างของแกมีโตไซต์ระยะที่ 1-5 ของเชื้อ <i>P. falciparum</i>	27
7. แสดงโครงสร้างภายในของแกมีโตไซต์เพศผู้ระยะที่ 5.....	29
8. แสดง Axoneme ของแกมีโตไซต์เพศผู้ระยะที่ 5.....	29
9. แสดงโครงสร้างภายในของแกมีโตไซต์เพศเมียระยะที่ 5.....	30
10. แสดง subpellicular membrane ของแกมีโตไซต์เพศเมียระยะที่ 5.....	30
11. แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของแกมีโตไซต์ในระหว่างการส่งจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนไปสู่ยุงพาหะ.....	38
12. แสดงการสร้างสาย cDNA จากแม่แบบที่เป็น mRNA.....	45
13. แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์.....	65
14. แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 ของตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย จากการใช้ inter-species primers ในส่วน SSU rRNA gene ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส...	72
15. ผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 2 ของตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	73
16. แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 และ 2 ของ gDNA และ cDNA จากการใช้ไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F และคู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วนยีน Pvs25.....	76
17. แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 3 ของ cDNA เจือจางที่ 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, 1 และ 0.1 copy/ μ l จากไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วนยีน Pvs25.....	77

ภาพที่	หน้า
18. แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 ของตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ และมีเชื้อ <i>P. vivax</i> จากการใช้ไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F ใน ส่วนยีน Pvs25.....	79
19. แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 2 ของตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ และมีเชื้อ <i>P. vivax</i> จากการใช้ไพรเมอร์คู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วน ยีน Pvs25.....	80
20. แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 ของตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองและมี ระยะเวลาไมโตไซส์ของเชื้อ <i>P. vivax</i> จากการใช้ไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F ในส่วนยีน Pvs25.....	83
21. แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 2 ของตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองและมี ระยะเวลาไมโตไซส์ของเชื้อ <i>P. vivax</i> จากการใช้ไพรเมอร์คู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วนยีน Pvs25.....	84
22. แสดงแผนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	118

สารบัญกราฟ

กราฟที่		หน้า
1.	กราฟเส้นแสดงจำนวนผู้ป่วยโรคมาลาเรียในช่วง 10 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2552 กับปี พ.ศ. 2551.....	10

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ซึ่งก่อให้เกิดอาการโรครุนแรงและนำมาสู่การเสียชีวิตของประชาชนโดยเฉพาะในกลุ่มประเทศเขตร้อนทั่วโลก ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อโปรโตซัวใน phylum Apicomplexa, class Sporozoa และ genus *Plasmodium* โดยมียุงก้นปล่องเพศเมียเป็นพาหะนำโรค เชื้อมาลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคน มี 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และเชื้อมาลาเรียของลิงที่สามารถติดต่อมาสู่คนได้ คือ *Plasmodium knowlesi* (Jongwutiwes et al., 2004; Singh et al., 2004)

เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรคที่พบได้บ่อยในแต่ละปีมีผู้ป่วยมาลาเรียประมาณ 350-500 ล้านคนและเสียชีวิตประมาณ 1 ล้านคน (Hay et al., 2010) โดยเฉพาะในทวีปแอฟริกา พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. falciparum* มากกว่าร้อยละ 75 ส่วนมากเป็นเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 0.7-2.7 ล้านคน (Bremner, 2001) เชื้อมาลาเรียที่พบรองลงมา คือ เชื้อ *P. vivax* พบมากในเขตร้อนและกึ่งร้อน เช่น ทวีปเอเชีย อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ แต่ละปีมีผู้ติดเชื้อ *P. vivax* ประมาณ 130-145 ล้านคน (Price et al., 2007) แม้ว่าเชื้อชนิดนี้จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตแต่ผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* นั้นสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ (relapse) เนื่องจากเชื้อมีระยะฮิปโนซอยต์ (hypnozoite) ซึ่งอาศัยอยู่ในเซลล์ตับของผู้ป่วย ภายในระยะเวลาสั้นๆ 3-5 สัปดาห์ หรือระยะเวลาสั้น 5-10 เดือน (Baird et al., 1997) และสามารถออกสู่กระแสเลือดได้ในภายหลัง ส่งผลให้ผู้ที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง อาจแพร่เชื้อต่อไปได้ ทำให้ส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกายของประชากรและก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจในการพัฒนาประเทศชาติ อย่างเช่น ประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชียรวมถึงประเทศไทย ซึ่งจากการศึกษาของ Putaporntip และคณะ พบการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* มากที่บริเวณจังหวัดจันทบุรี ซึ่งพบผู้ติดเชื้อร้อยละ 91.03 จังหวัดยะลาและจังหวัดนราธิวาสพบผู้ติดเชื้อร้อยละ 61.31 จังหวัดตากพบผู้ติดเชื้อร้อยละ 52.63 และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์พบผู้ติดเชื้อร้อยละ 43.87 (Putaporntip et al., 2009) ดังนั้นประเทศไทยจึงเป็นพื้นที่ที่ต้องเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้

จากรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่าจำนวนผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทยระหว่างเดือนมกราคม-ตุลาคม พ.ศ. 2552 เป็นผู้ป่วยชาวไทยจำนวน 18,740 ราย มีอัตราส่วนระหว่างเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* เป็นอัตรา 1:1 เท่ากัน จังหวัดที่มีผู้ป่วยมาลาเรียสูงสุด 10 อันดับ ได้แก่ จังหวัดตาก ยะลา แม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี นราธิวาส ชุมพร ศรีสะเกษ สุรินทร์ ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มการแพร่กระจายของโรคมาลาเรียในบางจังหวัดที่มีแรงงานต่างชาติเข้ามาอาศัยและทำงานเป็นจำนวนมาก เช่น จังหวัดตาก ชุมพร และศรีสะเกษ ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีชายแดนติดต่อกับประเทศพม่าและกัมพูชา จึงมีการเคลื่อนย้ายของประชากรข้ามพรมแดนอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงต้องมีการเฝ้าระวังผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าว

นอกจากนี้การรักษาและป้องกันโรคมาลาเรียในปัจจุบันยังมีอุปสรรคสำคัญ คือ การดื้อยาของเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* ต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิด อีกทั้งยังยากันปล่องที่เป็นพาหะสามารถปรับตัวให้มีความทนทานต่อยาฆ่าแมลง รวมถึงการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมเกาะพักของยุงหลังการดูดเลือด ซึ่งทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการใช้ยาฆ่าแมลงจำพวก residual spray เท่าที่ควร นอกจากนี้ผู้ที่มีเชื้อมาลาเรียระยะแกมีโตไซต์จะไม่ก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยแต่จะปรากฏอยู่ในกระแสเลือดประมาณ 22 วัน ของผู้ที่ไม่ได้รับยา ซึ่งสามารถเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อไปได้ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Nassir และคณะ (2005) พบว่าผู้ที่มีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์โอกาสที่จะพบแกมีโตไซต์ในกระแสเลือดได้ยาวนานกว่าผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียที่มีสายพันธุ์เดียว ดังนั้นแกมีโตไซต์จากผู้ติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์จึงมีโอกาสติดต่อจากคนไปสู่ยุงพาหะสามารถแพร่เชื้อไปยังบุคคลอื่นต่อไปได้มากขึ้น ดังนั้นการกำจัดระยะแกมีโตไซต์จึงมีความสำคัญในการป้องกันโรคมาลาเรียในเขตปรากฏโรค

จากการวิเคราะห์ระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อมาลาเรียพบโปรตีนทั้งหมด 900 ชนิด และในระยะแกมีโตมีโปรตีนประมาณ 600 ชนิด แต่โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อระยะนี้มีเพียง 97 ชนิด และยีนที่มีความสำคัญต่อการเจริญของระยะแกมีโตไซต์มีประมาณ 250-300 ยีน (Baker et al., 2010) โดยกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อมาลาเรียสามารถจำแนกได้เป็น 2 ช่วงคือ ระยะการสืบพันธุ์ก่อนเกิดการปฏิสนธิ (pre-fertilization) และระยะการสืบพันธุ์หลังเกิดการปฏิสนธิ (post-fertilization) โดยระยะการสืบพันธุ์ก่อนเกิดการปฏิสนธิ ประกอบด้วยระยะแกมีโตไซต์และระยะแกมีต โดยมีการสร้างโปรตีนจากยีนที่เกี่ยวข้องคือ P45, P48 และ P230 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวของแกมีโตไซต์และแกมีต มีน้ำหนักโมเลกุล 45, 48 และ 230

กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ ยีนเหล่านี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสทีน (cysteine) เรียงตัวซ้ำกัน 6 ชุด ซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์ (SO_4^{2-}) สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่ต่อต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของแกมมาเม็ด สำหรับระยะการสืบพันธุ์หลังเกิดการปฏิสนธิ มีการสร้างโปรตีนจากยีนที่เกี่ยวข้องคือ ookinete surface protein-25 (P25) และ ookinete surface protein-28 (P28) มีน้ำหนักโมเลกุล 25 และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ มีหน้าที่สร้างโปรตีนที่แสดงออกบนผิวของไซโกตและโอโอโคไนต์ นอกจากนี้ยังพบโปรตีนในช่วงท้ายของระยะโอโอโคไนต์และโอโอซิสต์ คือ ไคทีเนส (chitinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อย peritrophic membrane ของโอโอซิสต์ ทั้งนี้จากการศึกษาเชื้อมาลาเรียหลายชนิดโดย Duffy และคณะ (1997) พบว่าการแสดงออกของยีน P25 ในระยะแรกของแกมมาโตไซต์มีปริมาณต่ำและจะเพิ่มขึ้นหลังจากปฏิสนธิ โดยโครงสร้างของโปรตีน P25 และ P28 ประกอบด้วย signal sequence บริเวณ N-terminus มี epidermal growth factor (EGF)-like domain 4 แห่ง และ C-terminus มี glycosyl phosphatidyl moiety เพื่อยึดเหนี่ยวโปรตีนบริเวณผิวของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด จากการวิเคราะห์โปรตีน P25 พบกรดอะมิโนซิสทีน 22 ตัว และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ 11 พันธะ ส่วนโปรตีน P28 มีกรดอะมิโนซิสทีน 20 ตัว และพันธะไดซัลไฟด์ 10 พันธะ นอกจากนี้ยังพบว่ายีนทั้งสองมี copy number จำนวน 1 ชุด (Tsuboi et al., 1998)

การตรวจหาระยะแกมมาโตไซต์ของเชื้อมาลาเรียในเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* สามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยฟิล์มเลือดหนาและฟิล์มเลือดบางจากการย้อมด้วยสียิมซ่า (Giemsa) เนื่องจากวิธีนี้มีความจำเพาะในการตรวจหาระยะอื่นๆ ของเชื้อมาลาเรียรวมทั้งระยะแกมมาโตไซต์ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในเรื่องการตรวจหาระยะแกมมาโตไซต์ในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำ ซึ่งวิธีนี้ใช้เลือดในปริมาณที่น้อยสามารถตรวจพบแกมมาโตไซต์ประมาณ 20 ถึง 50 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร (Dowling et al., 1966; Karl et al., 2009; Moody, 2002) อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในระยะนี้ได้ ดังนั้นการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในระยะนี้ได้ ดังนั้นการพัฒนาการวิจัยโดยใช้เทคนิคที่มีความจำเพาะในการตรวจหาระยะแกมมาโตไซต์ของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยสามารถตรวจพบโดยใช้วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งมีความไวมากกว่าการตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในช่วง 0.02 ถึง 0.1 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ดังเช่น การประยุกต์ใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจหา messenger RNA ของยีนที่จำเพาะต่อระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ โดยใช้ยีนเป้าหมาย คือ Pfs16, Pfs48, Pfs45, Pfs230 และ Pfs25 พบว่าวิธีนี้มีความไวในการตรวจพบระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศที่มีปริมาณเชื้อต่ำกว่าร้อยละ 0.1 ดังนั้นเทคนิค

RT-PCR จึงมีความเหมาะสมในการตรวจหาระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้ยีนเป้าหมาย คือ Pfg377 เพื่อตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ในผู้ป่วยประเทศเวียดนามจำนวน 131 ราย โดยเก็บตัวอย่างเลือดหยดบนกระดาษกรอง ตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR พบว่าให้ผลบวกจำนวน 67 ราย ซึ่งสามารถตรวจพบแกมีโตไซต์ในระดับต่ำสุดคือ 0.03 ตัว ในเลือด 1 ไมโครลิตร โดยมีอัตราการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เพียงชนิดเดียวมีค่าสูงกว่าในกรณีที่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ร่วมกับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น (Maeno et al., 2008) ดังนั้นการวิจัยโดยใช้เทคนิคที่มีความจำเพาะในการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย จึงมีความสำคัญทางการแพทย์เพื่อเป็นประโยชน์ในการป้องกันและควบคุมโรคต่อไป

แม้ว่ามีการนำเทคนิค RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* กันอย่างแพร่หลาย (Maeno et al., 2008; Menegon et al., 2000; Mlambo et al., 2008) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีมีการประยุกต์เทคนิคดังกล่าว สำหรับการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์โดยใช้ยีนเป้าหมาย คือ Pvs25 ที่จำเพาะต่อระยะนี้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค RT-PCR ในการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากผู้ป่วยในประเทศไทย และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโดยใช้วิธีการเก็บในหลอดที่มีสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ (RNA later) และเก็บบนกระดาษกรอง โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยในช่วงต้นฤดูฝนในเดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงต้นฤดูแล้งในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2554 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความชุกของระยะแกมีโตไซต์ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* และฤดูกาลโดยใช้เทคนิค RT-PCR และทำการเปรียบเทียบผลกับฟิล์มเลือดซึ่งอุบัติการณ์ของผู้ที่มีระยะแกมีโตไซต์ในกระแสเลือดจะเป็นพื้นฐานสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรียต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติความเป็นมาของเชื้อมาลาเรีย

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่มีมานาน จากบันทึกเก่าแก่ที่เขียนโดยชาวอียิปต์โบราณตั้งแต่ 1600 ปีก่อนคริสตกาล (Breasted, JH., 1930) กล่าวว่า โรคมาลาเรีย หรือโรคไข้หนาวสั่นสามารถป้องกันได้โดยใช้น้ำมันสกัดที่ได้จากต้นไม้ *Balanites* ทาตัว เมื่อ 400 ปีก่อนคริสตกาล นักปราชญ์ Hippocrates (Boyd, M.R., 1949) ได้บันทึกอาการของโรคมาลาเรียว่ามีอาการหนาวสั่นเป็นระยะเหงื่อออก ม้ามโต บางคนมีอาการไข้ทุกวันและรุนแรงขึ้นจนเสียชีวิต บางคนมีอาการไข้วันเว้นสองวันปัจจุบัน คือ เชื้อ *Plasmodium malariae* ซึ่งเป็นเชื้อที่อันตรายน้อยที่สุด ในช่วง ค.ศ. 800-1300 ชาวจีนโบราณและชาวอาหรับได้บรรยายลักษณะไข้จับสั่นไว้เช่นเดียวกัน ส่วนในทวีปอเมริกาได้มีข้อสันนิษฐานว่าไม่มีโรคมาลาเรีย ก่อนที่ Columbus จะค้นพบทวีปอเมริกา แต่เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* และ *P. falciparum* เกิดการแพร่กระจายในทวีปอเมริกาในภายหลัง เนื่องจากการอพยพของชาวสเปน ชาวโปรตุเกส และชาวแอฟริกาเข้ามาเป็นทาสในทวีปอเมริกา (Jarcho, S., 1847)

ในปี ค.ศ. 1847 Meckel (Meckel, H., 1847) ทำการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียมีสมองและม้ามเป็นสีดำ เมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาตรวจสอพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีสีดำติดอยู่ ต่อมาในปี ค.ศ. 1880 ในประเทศอัลจีเรีย Laveran (Laveran, A., 1884) ได้เจาะเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรีย ซึ่งไม่ได้ย้อมสีมาตรวจสอพบว่ามีเม็ดเลือดแดงมีการเกาะเพื่อก้อนและมีก้อนกลมๆ อยู่ตรงกลาง มีเส้นใยโอบกอดอยู่ข้างๆ ซึ่งในปัจจุบันนี้ คือ เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgamete) ของเชื้อ *P. falciparum* และเชื่อว่าสิ่งที่เห็นนี้คือสาเหตุของโรคมาลาเรีย แต่ยังไม่มียุคใดให้ความเชื่อถือต่อการค้นพบดังกล่าว ต่อมาในปี ค.ศ. 1884 Marchiafara และ Celli (Marchiafara, E., Celli, A., 1885) พบว่าเชื้อมาลาเรียมีทั้งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย (microgamete และ macrogamete) สามารถผสมพันธุ์กันได้ ต่อมาใน ค.ศ. 1885 Galgi (Cox, FEG., 1996) ได้ศึกษาลักษณะการเกิดไข้ต่างกันของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งพบเชื้อ *P. vivax* ทำให้เกิดไข้วันเว้นวัน ส่วนเชื้อ *P. malariae* ทำให้เกิดไข้วันเว้นสองวัน หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1891 Romanowsky (Romanowsky, D.L., 1891) ได้พัฒนาวิธีการย้อมเชื้อมาลาเรียให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยนำเลือดผู้ป่วยมาย้อมสีพบว่านิวเคลียสของเชื้อติดสีแดง ส่วนไซโตพลาสซึม

ติดสีน้ำเงินเป็นผลให้สามารถแยกเชื้อมาลาเรียในสัตว์ออกจากเชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุในคนได้ง่ายขึ้น ต่อมา Machiafawa และ Bignami ค้นพบเชื้อ *P. falciparum* (Cox, FEG., 1996) และ Stephens พบเชื้อ *Plasmodium ovale* (Stephens, J.W.W., 1922) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1897 Ross (Ross, R., 1897) ได้ค้นพบยุงที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียคือ ยุงก้นปล่อง

อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งมีองค์ประกอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) แยกนิวเคลียสออกจากไซโตพลาสซึมอย่างชัดเจน สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรียได้ดังนี้

Kingdom Protista

Subkingdom Protozoa

Phylum Apicomplexa

Class Sporozoa

Subclass Coccidia

Order Eucoccidiida

Suborder Haemosporina

Family Plasmodiidae

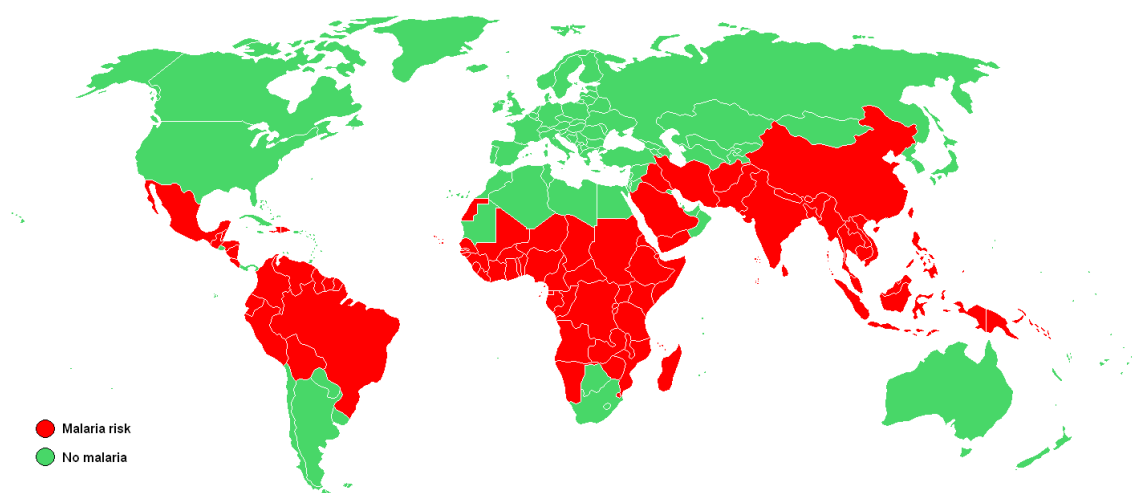
Genus *Plasmodium*

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อมาลาเรียใน genus *Plasmodium* ประกอบด้วยสปีชีส์ (species) ประมาณ 120 ชนิด โดยพบในสัตว์ปีก สัตว์ฟันแทะหรือในลิง แต่เชื้อมาลาเรียชนิดที่พบและทำให้เกิดโรคในคนมี 4 ชนิดคือ *Plasmodium malariae* (Feletti and Grassi, 1889), *Plasmodium vivax* (Grassi and Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) และ *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Plasmodium* ที่พบในลิง primate หลายชนิดสามารถติดต่อสู่คน เช่น *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* และ *Plasmodium simium* เป็นต้น (Knowles and Das Gupta, 1932; Coatney et al., 1961; Deane et al., 1966)

การกระจายทางภูมิศาสตร์

การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียนั้นพบได้ทั่วโลกระหว่างเส้นรุ้งที่ 64 องศาเหนือถึงเส้นรุ้ง 32 องศาใต้ โดยเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรคได้บ่อย ซึ่งการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ในพื้นที่ต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 เชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุของโรคส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* ในแต่ละปีมีผู้ป่วยมาลาเรียประมาณ 350-500 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 1 ล้านคน (Hay et al., 2010) โดยเฉพาะในทวีปแอฟริกา ซึ่งพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* มากกว่าร้อยละ 75 ส่วนมากเป็นเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี โดยเสียชีวิตประมาณ 0.7-2.7 ล้านคน (Bremner, 2001) ส่วนเชื้อที่พบมารองลงมา คือเชื้อ *P. vivax* พบมากในเขตร้อนและกึ่งร้อน เช่น ทวีปเอเชีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ ยุโรป และแอฟริกาเหนือ ซึ่งแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อ *P. vivax* ประมาณ 130-145 ล้านคน (Price et al., 2007) สำหรับเชื้อ *P. malariae* พบการแพร่กระจายได้ทั่วไปในแอฟริกาและตะวันตก ศรีลังกา และพื้นที่บางส่วนของมาเลเซียซึ่งมีอุบัติการณ์พบเชื้อต่ำ และเชื้อ *P. ovale* พบได้น้อยเช่นกัน แต่มักพบมากในทวีปแอฟริกาตะวันตก

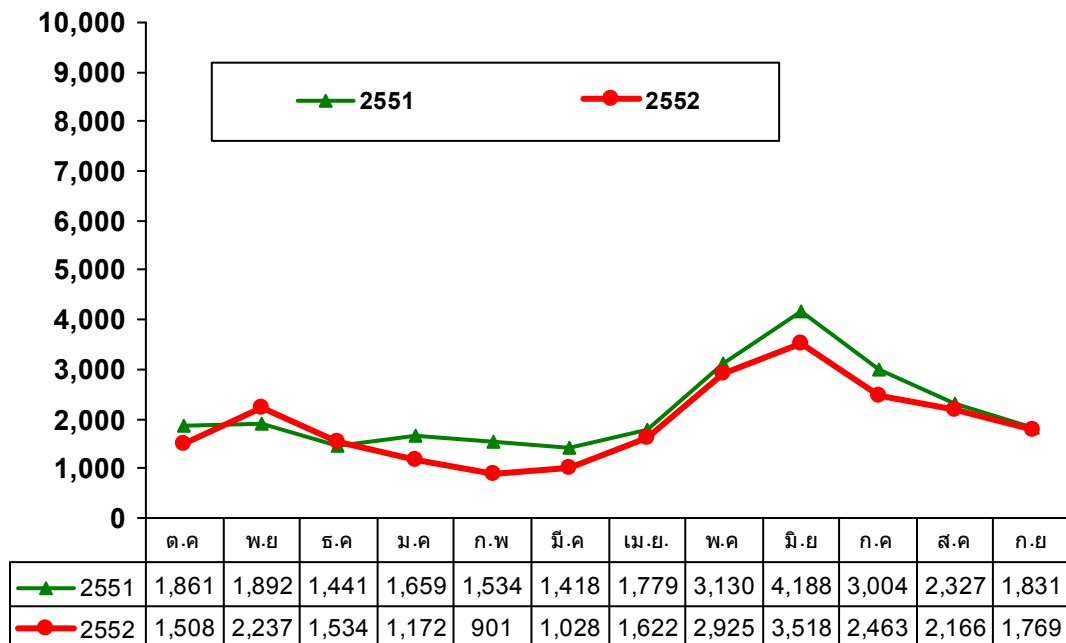
สำหรับสถานการณ์โรคมาลาเรียในประเทศไทย จากการรายงานของสำนักระบาดวิทยา พ.ศ. 2552 จำนวนผู้ป่วยมาลาเรียทั้งประเทศในเดือน มกราคม-ตุลาคม พ.ศ. 2552 พบผู้ป่วยไทยจำนวน 18,740 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 0.29 ต่อประชากรหนึ่งพันคน และอัตราส่วนระหว่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ เชื้อ *P. vivax* เท่ากับ 1:1 นอกจากนี้ยังมีการจัดอันดับ 10 จังหวัดสูงสุดในผู้ป่วยชาวไทยที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรีย ได้แก่ จังหวัดตาก จำนวน 6,603 ราย ยะลา 1,439 ราย แม่ฮ่องสอน 1,306 ราย กาญจนบุรี 983 ราย นราธิวาส 758 ราย ชุมพร 728 ราย ศรีสะเกษ 723 ราย สุรินทร์ 616 ราย ประจวบคีรีขันธ์ 581 ราย และจันทบุรี 530 ราย (ภาพที่ 2) นอกจากนี้สำนักระบาดวิทยาทำการเปรียบเทียบจำนวนผู้ป่วยโรคมาลาเรียในช่วง 10 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2552 กับปี พ.ศ. 2551 (ภาพที่ 1) พบว่าจำนวนผู้ป่วยชาวไทยลดลงถึงร้อยละ 16 แต่จำนวนผู้ป่วยชาวต่างชาติซึ่งส่วนใหญ่เป็นชาวพม่าลดลงแค่ร้อยละ 3 ทั้งนี้แนวโน้มของโรคมาลาเรียมีโอกาสสูงขึ้นได้ เนื่องจากพบแรงงานต่างชาติในบางจังหวัดสูงขึ้นในจังหวัดตาก ชุมพร และศรีสะเกษ ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีชายแดนติดต่อกับพม่าและกัมพูชา นอกจากนี้ยังมีการเคลื่อนย้ายของประชากรข้ามพรมแดน จึงต้องมีการเฝ้าระวังผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าวสูงขึ้น



ภาพที่ 1 แสดงการกระจายตัวของเชื้อมาลาเรีย (en.wikipedia.org/wiki/File:Malaria_map.PNG)



ภาพที่ 2 แสดงจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยในประเทศไทยปี พ.ศ. 2552 ได้แก่ 1) ตาก 2) ยะลา 3) แม่ฮ่องสอน 4) กาญจนบุรี 5) นครราชสีมา 6) ชุมพร 7) ศรีสะเกษ 8) สุรินทร์ 9) ประจวบคีรีขันธ์ และ 10) จันทบุรี (สำนักโรคติดต่ออันตราย กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2552)



กราฟที่ 1 แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคมาลาเรียในช่วง 10 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2552 กับปี พ.ศ. 2551
 หมายเหตุ: จำนวนผู้ป่วยปีงบประมาณ 2551 = 26,064 ราย ปีงบประมาณ 2552 = 22,843 ราย
 (สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2552)

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีการเจริญเติบโต 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) เกิดขึ้นในยุงก้นปล่องเพศเมียที่เป็น invertebrate host และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) หรือ ชิโซโกนี (schizogony) เกิดขึ้นในคนที่เป็น vertebrate host แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ การเจริญในเซลล์ตับ (exoerythrocytic stage) และเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage) ตามลำดับ (ภาพที่ 3)

1. วงชีวิตการเจริญเติบโตในยุง (sexual reproduction)

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อมาลาเรียซึ่งปะปนกันหลายระยะเข้าไป แต่มีเพียงระยะแกมีโตไซต์เท่านั้นที่สามารถเจริญต่อไปในกระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้นแกมีโตไซต์เพศเมีย (macrogametocyte) จะเจริญเป็นแกมีตเพศเมีย (macrogamete) ส่วน แกมีโตไซต์เพศผู้ (microgametocyte) จะเกิดกระบวนการ exflagellation ได้เป็นแกมีตเพศผู้ (microgamete) จำนวน 8 ตัว เมื่อแกมีตเพศเมียเกิดการปฏิสนธิกับแกมีตเพศผู้ กลายเป็นไซโกต (zygote) ต่อมาไซโกตจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายเท้าเทียมเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหารของยุง เรียกระยะนี้ว่าโอโอไคเน็ต (ookinete) เนื่องจากปลายด้านหนึ่งของโอโอไคเน็ตจะมี apical organelle เพื่อใช้ในการลุกลามผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร ระยะโอโอไคเน็ตจะเดินทางผ่านสารที่พบในกระเพาะอาหารของยุงที่เป็น chitinous peritrophic matrix ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันกระเพาะอาหารของยุงจากการติดเชื้อ (Huber et al, 1991) จากนั้นโอโอไคเน็ตจะไปเกาะติดส่วนไมโครวิลไล (microvilli) ของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (Zieler and Dvorak, 2000) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุง เช่น circumsporozoite protein (csp) (Trottein et al, 1995) อย่างไรก็ตามโอโอไคเน็ตจะเคลื่อนที่ไปยัง basal membrane ของเซลล์ซึ่งบุผนังด้านนอกของกระเพาะอาหารแล้วเจริญเป็นโอโอซิสต์ (oocyst) การเพิ่มจำนวนของโอโอซิสต์จะมีหลายนิวเคลียส ในระยะนี้ apical organelle จะสลายตัวไปแต่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และกอลจีแอฟพาราตัส (golgi apparatus) จะเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้โอโอซิสต์มีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 40 ถึง 50 ไมครอน (Canning and Sinden, 1973) และเรียกระยะเชื้อที่อยู่ภายในโอโอซิสต์ที่ยังไม่สร้างสปอโรซอइट (sporozoite) ว่าสปอโรบลาส (sporoblast) การเจริญเป็นระยะสปอโรซอइट เริ่มต้นจากการเกิดร่องในส่วนหนึ่งของ endoplasmic reticulum โดยแต่ละสปอโรซอइटจะมีนิวเคลียส (nucleus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และเอพิโคพลาส (apicoplast) อย่างละอัน

(Sinden and Strong, 1978) เมื่อโอโอซิสต์เจริญเติบโตจะมีสปอโรซอยต์หลายพันตัว (Rosenberg and Rungsiwongse, 1991) หลังจากนั้นผนังโอโอซิสต์จะแตกออกทำให้สปอโรซอยต์ออกสู่ช่องอกของยุงแล้วเดินทางไปยังต่อมน้ำลายเพื่อรอเวลาในการเข้าสู่คนต่อไป ซึ่งระยะสปอโรซอยต์มีรูปร่างคล้ายตัวหนอนมีความยาวประมาณ 10 ถึง 15 ไมครอนและกว้าง 1 ไมครอน ที่ปลายด้านหนึ่งมี apical organelle เพื่อใช้ในการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ ระยะเวลาตั้งแต่การเจริญจากระยะแกมีโตไซต์จนถึงระยะสปอโรซอยต์ใช้เวลาแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและชนิดของเชื้อมาลาเรีย เช่น อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 9 ถึง 10 วัน ใกล้เคียงกับเชื้อ *P. vivax* ใช้เวลา 8 ถึง 10 วัน ในขณะที่เชื้อ *P. malariae* และเชื้อ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 14 ถึง 16 วัน และ 12 ถึง 14 วัน ตามลำดับ อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้การเจริญเร็วขึ้น (Sinden and Gilles, 2002)

2. การเจริญของเชื้อมาลาเรียในคน (asexual reproduction)

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในคนประกอบด้วย的增加จำนวนแบบไม่อาศัยเพศ โดยแบ่งการเจริญเป็น 2 ช่วง คือ การเจริญในเซลล์ตับและการเจริญในเม็ดเลือดแดง ในช่วงหนึ่งของการเจริญในเม็ดเลือดแดงจะเริ่มมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

2.1 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับ

เมื่อยุงที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคน ยุงจะปล่อยเชื้อที่อยู่ในระยะสปอโรซอยต์ เข้าสู่กระแสเลือดภายในระยะเวลาประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ระยะสปอโรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับโดยอาศัยกระบวนการที่ซับซ้อนและเกิดขึ้นรวดเร็วประมาณ 2 นาที เมื่อลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการสร้าง parasitophorous vacuole ล้อมรอบเชื้อมาลาเรียซึ่งระยะนี้โครงสร้างที่เป็น cytoskeleton รวมทั้ง apical organelle จะสลายตัวไปทำให้เชื้อมาลาเรียเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลมหรือทรงรี โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ถึง 5 ไมครอน เรียกระยะที่อยู่ในเซลล์ตับว่า hepatic stage หรือ exoerythrocytic stage ระยะนี้จะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) อันเดียวกันทำให้เกิดระยะไซซอนต์ (schizont) ที่มีหลายนิวเคลียส เมื่อมีการแบ่งไซโตพลาสซึมในแต่ละเซลล์จะมีนิวเคลียสเดียวเรียกว่าระยะเมอริซอซอยต์ (merozoite) สำหรับกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยไม่อาศัยเพศดังกล่าวเรียกว่า ชิโซโกนี (schizogony) ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โปรตีนบนผิวของมาลาเรียจะเปลี่ยนไปด้วยเช่นกัน ระยะไซซอนต์ที่เจริญเต็มที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 45 ถึง 60 ไมครอน ภายในไม่มีองค์ประกอบของ malaria pigment หรือ hemozoin เนื่องจากระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญในตับไม่ได้อาศัยฮีโมโกลบินเป็นอาหาร เชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันจะมีจำนวนเมอริซอซอยต์แตกต่างกัน เช่น เชื้อ *P. falciparum*

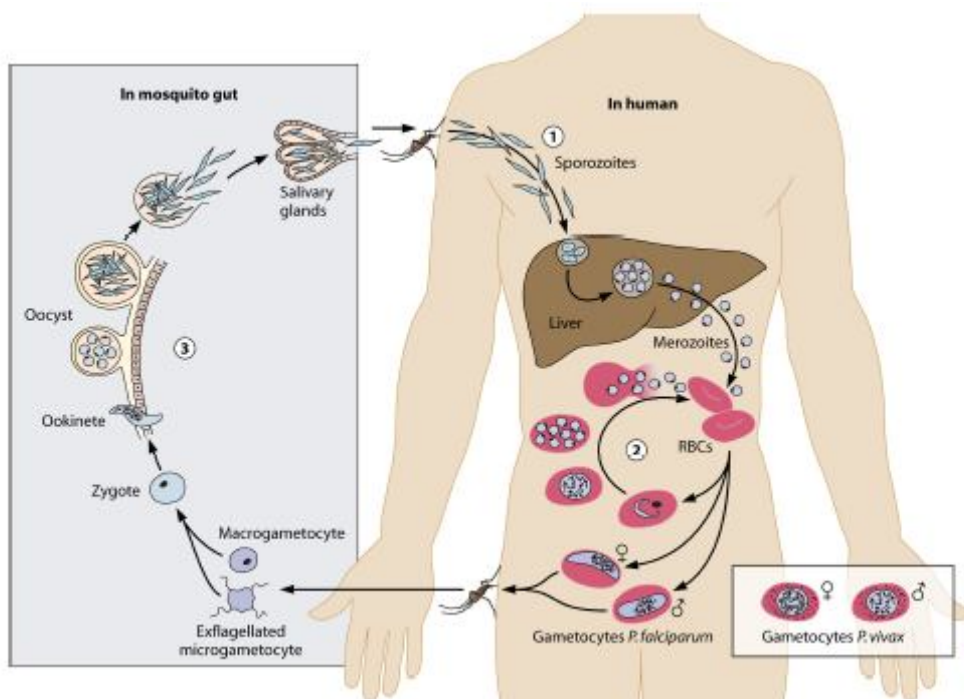
มีจำนวนเมอริโซยต์ที่เกิดจากสปอโรซอยต์เพียงตัวเดียว ประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัว ในขณะที่สปอโรซอยต์ของเชื้อ *P. ovale* และเชื้อ *P. malariae* จะเจริญเป็นเมอริโซยต์ประมาณ 15,000 ตัว ส่วนเชื้อ *P. vivax* มีประมาณ 10,000 ตัว (สมชาย จงวุฒิวินัย และอุษา ทิสยากร, 2549) นอกจากนี้ระยะเวลาที่สปอโรซอยต์เจริญจนเป็นเมอริโซยต์ในตับจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยเชื้อ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 5.5 ถึง 7 วัน เชื้อ *P. vivax* ใช้เวลาประมาณ 6 ถึง 8 วัน เชื้อ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 9 วัน และเชื้อ *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 14 ถึง 16 วัน (Bray and Garnham, 1982) เมื่อเมอริโซยต์เจริญเต็มที่จะมีรูปร่างเป็นทรงกลมหรือทรงรี ที่ปลายด้านหนึ่งประกอบด้วย apical organelle ซึ่งภายในมีโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ apical membrane antigen 1 (AMA-1) รวมทั้ง rhoptry และ microneme protein หลายชนิด สำหรับบริเวณผิวของระยะเมอริโซยต์นั้นจะถูกปกคลุมด้วย merozoite surface protein-1 (MSP-1) เป็นส่วนใหญ่ (Holder, 1994) โดยมีเมอริโซยต์จำนวนมากที่สามารถเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงต่อไป กระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใช้เวลาเพียงประมาณ 30 ถึง 60 นาที (Frevet, 2004)

2.2 การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดง

เมอริโซยต์มีรูปร่างเป็นทรงรีคล้ายหยดน้ำตาโดยปลายด้านหนึ่งจะมนและด้านตรงข้ามมีปลายยื่นออกเล็กน้อย เรียกว่าส่วน apex หรือด้านหน้าซึ่งเป็นด้านที่มี apical organelle สำหรับเมอริโซยต์ของเชื้อ *P. falciparum* มีขนาดกว้างประมาณ 1 ไมครอนและยาว 1.6 ไมครอน ในขณะที่เมอริโซยต์ลุกลามเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีกลไกประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการเกาะติดกับเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยใช้ปลายด้านใดด้านหนึ่งของเมอริโซยต์สัมผัสกับผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific attachment) หลังจากนั้นจะเกิดการเกาะติดที่เหนียวแน่นมากขึ้นจากการจับกันระหว่างผิวเมอริโซยต์กับเม็ดเลือดแดงอย่างจำเพาะ (Mason et al, 1977) สำหรับการเกาะติดผิวเม็ดเลือดแดงของเมอริโซยต์ของเชื้อ *P. vivax* นั้นอาศัย Duffy-binding protein ซึ่งอยู่ที่ผิวของระยะเมอริโซยต์กับ Duffy antigen ซึ่งเป็น chemokine receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง (Gelpi and King, 1976; Miller et al, 1976) หลังจากนั้นเมอริโซยต์จะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงโดยมีการเคลื่อนตัวของรอยเชื่อมต่อด้านหน้าไปด้านหลังหรือด้านตรงข้ามกับ apical organelle จนในที่สุดจะมีการเชื่อมปิด (sealing) ของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงพร้อมกับการเกิดเยื่อหุ้มแวคิวโอล (vacuole membrane) ล้อมรอบเมอริโซยต์ (Aikawa, 1978) ภายหลังจากเมอริโซยต์เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วจะมีการเจริญต่อไปเป็นระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) โดยมีการสลายตัวของ apical organelle และ cytoskeleton ทำให้ โทรโฟซอยต์ ระยะแรกมีรูปร่างเป็นทรง

กลมหรือทรงรีคล้ายวงแหวน โดยไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินและนิวเคลียสหรือโครมาติน (chromatin) ติดสีม่วง เมื่อนำมาย้อมด้วยสียิมซ่า (Giemsa) ส่วนกลางมีลักษณะเป็นวงไม่ติดสี เรียกว่า ระยะเวลาวงแหวน (ring stage) หรือโทรโฟซอยต์ระยะเริ่มแรก (young trophozoite) ต่อไป ระยะเวลาวงแหวนจะเปลี่ยนไปเป็นระยะโทรโฟซอยต์ที่กำลังเจริญเติบโต (growing trophozoite) โดยมีไซโตพลาสซึมแผ่ขยายออกอย่างไม่เป็นระเบียบและมีลักษณะเป็นเท้าเทียม (pseudopod) ระยะนี้เชื้อจะมีการเจริญเติบโตรวดเร็วโดยอาศัยฮีโมโกลบินจากเม็ดเลือดแดงเป็นอาหาร ระยะนี้มี นิวเคลียสเดี่ยวเมื่อเจริญต่อไปจะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งภายในไซโตพลาสซึมเดิม ทำให้เกิด ระยะไซซอนต์ เรียกกระบวนการนี้ว่า ชิโซโกนี (schizogony) เมื่อไซซอนต์เจริญเต็มที่ จะมีการแบ่ง ไซโตพลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดี่ยวเรียกระยะดังกล่าวว่าไซซอนต์ระยะตัวเต็มวัย (mature schizont) โดยเรียกแต่ละเซลล์ภายในว่าเมอริโรซอยต์ ในช่วงนี้ malaria pigment จะถูก กำจัดออกนอกเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย จำนวนเมอริโรซอยต์ที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันตามชนิดของ เชื้อมาลาเรีย โดยเชื้อ *P. falciparum* จะมีจำนวนเมอริโรซอยต์ตั้งแต่ 8 ถึง 26 ตัว ส่วนเชื้อ *P. vivax* มีจำนวน 12 ถึง 24 ตัว ส่วนเชื้อ *P. ovale* และเชื้อ *P. malariae* มีจำนวน 6 ถึง 12 ตัว (Sinden and Gilles, 2002)

เมื่อเมอริโรซอยต์ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมากทำให้เกิดอาการจับไข้ เมอริโรซอยต์จะเป็นอิสระในกระแสเลือดชั่วคราวและพร้อมเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป จะมีการเจริญเป็นระยะต่างๆ ดังกล่าวซ้ำต่อไปเป็นวัฏจักร เรียกระยะที่มีการเจริญและเพิ่มจำนวน โดยไม่อาศัยเพศภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงว่า asexual erythrocytic cycle เมื่อเกิดขึ้นหลายรอบ แล้วเมอริโรซอยต์บางส่วนจะมีการเจริญต่อไปเป็นระยะแกมีโตไซต์ซึ่งเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในม้าม ไชกระดุก และอวัยวะภายในอื่นๆ (Sinden, 1983)



ภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่องและในคน (Bousema and Drakeley., 2011)

พาหะนำเชื้อมาลาเรีย

ยุงพาหะที่สำคัญของเชื้อมาลาเรีย คือ ยุงก้นปล่องเพศเมีย จัดอยู่ใน genus *Anopheles* เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียสู่คน การสืบทอดแบบอาศัยเพศของเชื้อมาลาเรียจะเกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของยุง หลังจากที่เชื้อมาลาเรียเจริญเป็นระยะต่างๆ จนเป็นระยะสปอโรซอยต์เรียบร้อยแล้ว สปอโรซอยต์จะเดินทางผ่านช่องอกและเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุง เพื่อแพร่เชื้อมาลาเรียสู่โฮสต์อื่นๆ ต่อไป จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่ายุงก้นปล่องมีประมาณ 500 ชนิด และมี 72 ชนิด ที่ตรวจพบระยะสปอโรซอยต์ (Collins and Paskewitz, 1995) และนำมาสู่การเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียได้ โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ ได้แก่ การแพร่กระจายชนิดของยุง นิสัยการกัด อายุขัยของยุง และความหนาแน่นของยุงในแต่ละฤดูกาล สามารถจำแนกได้ดังนี้

1. ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะหลัก (primary vector) ในการนำเชื้อมาลาเรีย และได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความพร้อมต่อการรับเชื้อมาลาเรียสูง โดยสามารถตรวจพบระยะสปอโรซอยต์ในต่อมน้ำลายยุงในประเทศไทยพบได้ 3 ชนิด คือ

1.1 *Anopheles minimus* เป็นยุงที่พบได้มากบริเวณชายป่าเชิงเขา ชอบเพาะพันธุ์ตาม ลำธารที่มีน้ำใส ไหลช้า มีแสงแดดส่องถึง อาจพบตามน้ำพุ ซึ่งพบมากในช่วงปลายฤดูฝน ออกหากินในช่วงเวลา 18.00 น. ถึง 22.00 น. (Somboon et al., 2001)

1.2 *Anopheles dirus* พบได้ทั่วไปในพื้นที่ป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้ ชอบเพาะพันธุ์ในแอ่งน้ำขังในบริเวณที่มีร่มเงา ลักษณะน้ำใสและมีใบไม้ทับถม ออกหากินในช่วงเวลา 18.00 น. ถึง 04.00 น.

1.3 *Anopheles maculatus* เป็นยุงพาหะที่พบได้ทั่วโลก แต่พบมากในพื้นที่ภาคใต้ สามารถเพาะพันธุ์ได้ในแอ่งน้ำขัง น้ำไหล ที่มีลักษณะใสและสะอาด พบในป่าดิบและป่าโปร่ง ลำธารมีต้นไม้อปกคลุมริมฝั่งมีแสงแดดส่องถึง ออกหากินตั้งแต่เวลา 18.00 น. ถึง 21.00 น.

2. ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะรอง (secondary vector) คือยุงที่สงสัยว่าเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรีย มีความพร้อมต่อการรับเชื้อปานกลาง แต่มีบทบาทในการแพร่เชื้อน้อยกว่ายุงพาหะหลักในประเทศไทยมี 3 ชนิด ได้แก่

2.1 *Anopheles sundaicus* อยู่บริเวณชายทะเล ชอบวางไข่ในแอ่งหินที่มีน้ำกร่อยตามริมทะเล เกาะแก่งต่างๆ

2.2 *Anopheles aconitus* เป็นยุงที่อาศัยอยู่บริเวณนาข้าว

2.3 *Anopheles pseudowillmori* พบตามบริเวณป่าเขาตอนเหนือของประเทศ ลักษณะนิสัยของยุงคล้าย *Anopheles minimus*

อาการและลักษณะแสดงทางคลินิก

ภายหลังที่ยุงก้นปล่องเพศเมียกัดคน เชื้อมาลาเรียระยะสปอโรซอยต์ที่อยู่ภายในต่อมน้ำลายจะถูกปล่อยออกมาเข้าสู่กระแสเลือดในคน จากนั้นเชื้อมาลาเรียจะเจริญเติบโตในเซลล์ตับซึ่งเป็นระยะที่ผู้ที่ติดเชื้อมิปรากฏอาการของโรค ส่วนใหญ่มีอาการคล้ายไข้หวัด คือ มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ ปวดตามตัวและกล้ามเนื้อ อาจมีอาการคลื่นไส้ เบื่ออาหาร โดยจะเป็นเพียงระยะสั้น เป็นวันหรือหลายวัน ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการพักตัวของเชื้อ ชนิดของเชื้อ และจำนวนของสปอโรซอยต์ ที่ผู้ป่วยได้รับเข้าไป ภาวะภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียของผู้ป่วย ภาวะที่ผู้ป่วยได้รับยาป้องกันมาลาเรียมาก่อน หรือได้รับยารักษามาลาเรียมาบ้างแล้ว เป็นต้น เมื่อระยะเมอโรซอยต์

มีการเพิ่มจำนวนอย่างมากในเซลล์ตับออกมาสู่กระแสเลือดและลูกกลมเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดง ตลอดจนมีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมากจนถึงระดับหนึ่งจะทำให้ผู้ที่ติดเชื้อเริ่มมีอาการของโรค คือ มีไข้หนาวสั่น มักแสดงออกเป็นช่วงระยะค่อนข้างสม่ำเสมอ ประกอบด้วย 3 ระยะ คือ

1. ระยะหนาวสั่น (cold stage) ผู้ป่วยมีอุณหภูมิร่างกายลดลง มีอาการหนาวสั่นนานประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
2. ระยะไข้ตัวร้อน (hot stage) ผู้ป่วยมีไข้สูง เป็นเวลาประมาณ 1-4 ชั่วโมง
3. ระยะเหงื่อออก (sweating stage) เป็นช่วงที่ผู้ป่วยไม่มีอาการไข้ มีเหงื่อออก และมีอาการอ่อนเพลียในระยะนี้

ดังนั้นเมื่อครบรอบการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงจะทำให้มีอาการไข้หนาวสั่น โดยเชื้อ *P. falciparum* จะทำให้เกิดอาการไข้ทุกๆ 36 ถึง 48 ชั่วโมง เชื้อ *P. vivax* และเชื้อ *P. ovale* ทำให้เกิดอาการไข้ทุก ๆ 48 ชั่วโมงหรือมีไข้วันเว้นวัน ส่วนเชื้อ *P. malariae* ทำให้เกิดอาการไข้ทุกๆ 72 ชั่วโมงหรือมีไข้วันเว้นสองวัน แม้ว่าเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ทำให้เกิดอาการไข้หนาวสั่นคล้ายกัน แต่เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทำให้เกิดพยาธิสภาพและภาวะแทรกซ้อนที่พบได้แก่ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะดีซ่าน (jaundice) ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) และภาวะน้ำท่วมปอดที่ไม่ได้เกิดจากหัวใจวาย (noncardiac pulmonary edema) เป็นต้น

หลังจากที่อาการไข้มาลาเรียหายไปแล้ว แต่เชื้อมาลาเรียยังอยู่ในร่างกายโดยอาจมีระดับที่ต่ำเกินกว่าที่จะตรวจพบได้ ซึ่งเชื้ออาจหลบซ่อนอยู่ในเซลล์ตับจะทำให้มีโอกาสที่จะกลับมาเป็นไข้ได้อีกแม้ไม่ได้รับเชื้อมาลาเรียใหม่ การเกิดอาการไข้กลับมีสาเหตุจากเชื้อมาลาเรียมีระยะพักตัวในตับหรือระยะฮิปโนซอยต์ (hypnozoite) และเชื้อสามารถออกสู่กระแสเลือดได้อีกครั้ง อาการไข้กลับชนิดนี้สามารถพบได้ในเชื้อ *P. vivax* และเชื้อ *P. ovale* (Warrell et al, 1990; Marsh et al, 1996)

การป้องกันโรค

ประเทศไทยประสบปัญหาเชื้อดื้อต่อยาในหลายพื้นที่ จึงแนะนำให้หลีกเลี่ยงการใช้ยาป้องกัน โดยใช้มาตรการป้องกันตนเองจากการถูกยุงกัดซึ่งทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้มุ้งลวด การนอนในมุ้ง สวมเสื้อผ้าให้มิดชิดและมีความหนาพอสมควร การใช้ยาจุดกันยุง หรือยาทากันยุง ปัจจุบันได้มีการพัฒนายาทากันยุงให้มีหลายรูปแบบทั้งชนิดน้ำ ครีม โลชั่น สบู่ กระจายหอมหรือแป้งทาตัว

ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการวางแผนควบคุมโรค โดยปัญหาที่เป็นอุปสรรค ได้แก่ การที่ยุงเปลี่ยนชีวนิสัย กัดคนนอกบ้านมากขึ้นทำให้การวางแผนควบคุมด้วยสารเคมีทำได้ยาก หรือการที่ความร่วมมือของประชาชนลดลงตามสถานการณ์โรคที่ลดน้อยลง โดยเฉพาะต่อกิจกรรมควบคุมยุงพาหะ เช่น การพ่นสารเคมี การชูปมุ้ง หรือการที่ประชาชนมีพฤติกรรมเสี่ยงต่อโรคตามวิถีอาชีพที่เปลี่ยนไปเช่น ปลูกไร่กาแฟ การอพยพเคลื่อนย้ายของแรงงานต่างด้าวในบางฤดูกาล สิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการควบคุมโรคในแต่ละพื้นที่แต่ที่สำคัญต้องอาศัยความร่วมมือจากทุกภาคส่วน

ยาด้านเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด

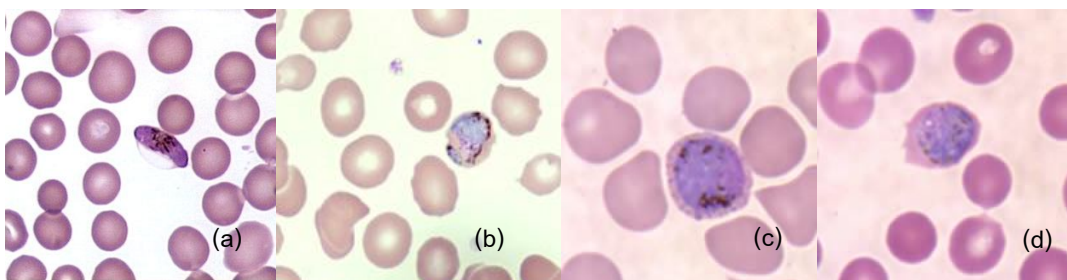
ระยะเวลาของแกมีโตไซต์ที่อยู่ในกระแสเลือดจะลดลงหลังจากได้รับยาด้านมาลาเรียที่ใช้กันทั่วไป จากการศึกษาของ Baird ซึ่งมีผลต่อแกมีโตไซต์ระยะเริ่มแรกและแกมีโตไซต์ระยะตัวเต็มวัยของเชื้อ *P. vivax* (Baird, 2009; Nacher et al., 2004) พบว่าแกมีโตไซต์จะถูกทำลายภายในเวลา 24 ชั่วโมง และถูกกำจัดออกจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ภายใน 4 วันหลังจากการให้ยาด้านมาลาเรีย (Pukrittayakamee et al., 2008) บางการศึกษาสามารถอธิบายว่าบุคคลที่ติดเชื้อเมื่อได้รับการรักษาด้วยยาดังต่อไปนี้แล้วมีจำนวนเชื้อลดลงภายในไม่กี่ชั่วโมงหลังจากการรักษา ได้แก่ การรักษาด้วยยาคลอโรควิน (chloroquine, CQ) เพียงอย่างเดียว หรือการรักษาด้วยยาคลอโรควินใช้ร่วมกับยาไพโรมาควิน (primaquine, PQ) สามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์หลังจากการรักษาประมาณ 2 วัน (Klein et al., 1992) และการรักษาด้วยยาอาร์ทีซูนิน (Artemisinin combination therapies, ACT) ในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของเชื้อ *P. vivax* และเชื้อ *P. falciparum* (Douglas et al., 2010) ซึ่งคล้ายกับกรณีของเชื้อ *P. falciparum* จากการให้ยาคลอโรควินร่วมกับยาอาร์ทีซูนินจะช่วยลดระยะเวลาของแกมีโตไซต์ได้เร็วกว่าเมื่อเทียบการ

รักษาด้วยยาคลอโรควินเพียงอย่างเดียว (Batty et al., 1998) ถึงแม้ว่ายาไพโรมาควินอาจไม่มีผลในประสิทธิภาพพิเศษกับแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* แต่ยาไพโรมาควิน ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรียเชื้อ *P. vivax* เพราะสามารถทำลายระยะชิปโนซอยต์ในเซลล์ตับได้ นอกจากนี้ยังลดระยะเวลาในการทำลายแกมีโตไซต์ โดยยาคลอโรควินให้ผลกับเชื้อมาลาเรียระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ในกรณีที่ยาให้ผลการรักษาช้า และเชื้อมาลาเรียระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศถูกยาปฏิชีวนะทำลายไม่สมบูรณ์ อาจส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในระยะแกมีโตไซต์ได้ สำหรับการรักษาด้วยยาซัลฟาไดออกซิน (sulphadoxine-pyrimethamine, SP) ในเชื้อ *P. vivax* สามารถต้านเชื้อในระยะแกมีโตไซต์ได้ในระดับสูง ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะได้ผลมากขึ้น (Leslie et al., 2007) หลังการรักษาอาจใช้เป็นข้อสังเกตในการเกิดกลับมาเป็นซ้ำของเชื้อมาลาเรียระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในภายหลัง (Pukrittayakamee et al., 2008)

พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

องค์ความรู้เกี่ยวกับต้นกำเนิดของเชื้อมาลาเรียช่วยให้ทราบถึงความเป็นไปได้หรืออุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นจากมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ต้นกำเนิดจนถึงปัจจุบันมีระยะเวลายาวนาน ทำให้เกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จากการผ่าเหล่าเพิ่มสูงขึ้น ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของเชื้อมาลาเรียที่เพิ่มขึ้น อาจส่งผลต่อการออกแบบวัคซีนและการควบคุมโรค เช่น การดื้อยา เนื่องจากตำแหน่งการแทนที่ของ codon ในจีโนมของเชื้อมาลาเรียมีมากขึ้น ซึ่งจากการวิเคราะห์ mitochondrial DNA (mtDNA) ของเชื้อ *P. falciparum* พบว่ามีต้นกำเนิดจากทวีปแอฟริกา (Joy et al, 2003; Hedges , 2000) และมีการแพร่กระจายไปตามภูมิภาคต่างๆ ของโลก ขณะเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์ mtDNA ของเชื้อ *P. vivax* พบว่าต้นกำเนิดอยู่ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Jongwutiwes et al, 2005) โดยวิเคราะห์จากข้อมูลดีเอ็นเอ เพื่อหาต้นกำเนิดของเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิดซึ่งมีที่มาแตกต่างกัน ดังนั้นการออกแบบวัคซีนหรือยารักษาโรคมาลาเรียให้มีประสิทธิภาพนั้นต้องประสบปัญหากับความซับซ้อนจากการผ่าเหล่าจำนวนมากในจีโนมของเชื้อมาลาเรีย

สำหรับสายใยพันธุกรรม (phylogeny) ของเชื้อมาลาเรียอาจหาความสัมพันธ์จากข้อมูลทางชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียชนิดต่างๆ เช่น ระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยวหรือกล้วยหอมซึ่งคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. reichenowi* ในขณะที่แกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax*, *P. ovale* และ *P. malariae* มีรูปร่างเป็นทรงกลมหรือทรงรี (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะรูปร่างแกมีโตไซต์ในเชื้อ *P. falciparum* (a), *P. malariae* (b), *P. vivax* (c), *P. ovale* (d) ตามลำดับ (www.gotoknow.org/blogs/posts/190755)

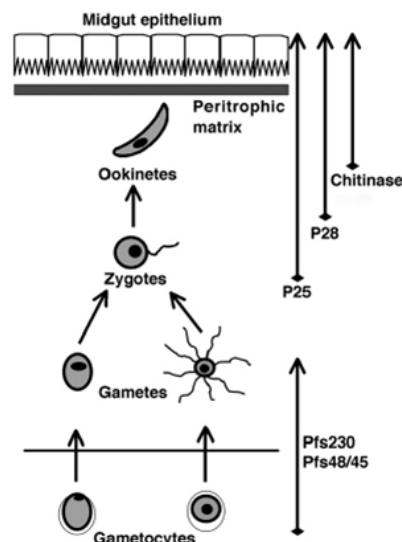
ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากพื้นฐานของแกมีโตไซต์เพียงอย่างเดียวเชื้อ *P. falciparum* จึงมีความใกล้ชิดทางสายพันธุกรรมกับเชื้อ *P. reichenowi* มากกว่าเชื้อ *P. vivax* (Coatney et al, 2003) อย่างไรก็ตามการใช้คุณลักษณะการเจริญของเชื้อมาลาเรียไม่สามารถจัดกลุ่มความเชื่อมโยงของสายวิวัฒนาการระหว่างชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อแก้ไขจำกัดดังกล่าว เช่น จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน cytochrome b พบว่าเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ในสายใยพันธุกรรมที่แยกเป็นหลายกลุ่ม (polyphyletic group) โดยเชื้อ *P. vivax* มีความใกล้ชิดกับเชื้อ *P. simium*, *P. simiovale*, *P. fieldi*, *P. inui*, *P. knowlesi*, *P. hylobati*, *P. cynomolgi* และ *P. gonderi* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่พบในลิง จัดอยู่ในสายพันธุกรรมในกลุ่มเดียวกัน (monophyletic group) ทั้งนี้เชื้อมาลาเรียในกลุ่มดังกล่าวมีความใกล้ชิดกับเชื้อ *P. malariae* และ *P. ovale* มากกว่ากลุ่มเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. reichenowi* (Escalante et al, 1998)

ระบบภูมิคุ้มกันและวัคซีนป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ *P. vivax*

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียสามารถปรากฏในช่วงเวลาสั้นๆ แต่ในคนที่ยังไม่เคยเป็นโรคมาลาเรียจะปรากฏเป็นเวลาหลายเดือน โดยอาจมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในระยะสี่พันธุแบบอาศัยเพศของผู้ที่มีการติดเชื้อครั้งแรก ซึ่งให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันครั้งล่าสุดของการสัมผัสกับแอนติเจน การทำงานต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันการแพร่กระจายมีความสัมพันธ์กับแอนติบอดีไทเทรต (antibody titer) จากการตรวจสอบโดยวิธี indirect immunofluorescence assay แต่อาจขึ้นอยู่กับการติดเชื้อที่

อยู่ภายในของแกมีโตไซต์ (Gamage-Mendis et al., 1992)

การติดเชื้อ *P. vivax* ตามธรรมชาติ ได้ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย จึงมีการศึกษาเพื่อการพัฒนาวัคซีน Transmission blocking vaccine (MTBV) เพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ *P. vivax* โดยใช้แอนติเจนที่อยู่บนผิวของโอโอโคไนต์เป็นเป้าหมาย ได้แก่ Pvs25 และ Pvs28 (ภาพที่ 5) ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันค่อนข้างสูงในสายพันธุ์ทั่วโลก (Tsuboi et al., 1998) ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ที่ตอบสนองต่อแอนติเจนในยุง อย่างไรก็ตามความหลากหลายใน Pvs25 และ Pvs28 ของเชื้อ *P. vivax* สูงกว่าในเชื้อ *P. falciparum* โดยโครงสร้างโครโมโซมของยีสทั้งสองมีลักษณะเป็นคู่กัน (homologs) โดยเฉพาะ Pvs28 (Tsuboi et al., 2003)



ภาพที่ 5 แสดงโปรตีนของระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *P. vivax* ในยุงพาหะ (Tsuboi et al., 2002)

จากผลการวิจัยปี ค.ศ. 2010 ซึ่งให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วทางพันธุกรรมใน Pvs25 และ Pvs28 ของสายพันธุ์ในประเทศเกาหลีใต้ (Han et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้ recombinant ของแอนติเจนทั้งสองเป็นวัคซีนทดลองในหนูและถึงพบว่าสามารถเหนี่ยวนำแอนติบอดีในการป้องกันขั้นตอนการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้ และแอนติบอดีที่เกิดโดยฉีดวัคซีนหนูและกระต่ายที่มี recombinant Pvs25 หรือ Pvs28 การพัฒนาของโอโอซิสต์จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญของการติดเชื้อ *P. vivax* ในธรรมชาติของ

สายพันธุ์ในประเทศไทย (Miyata et al., 2010) ที่ระดับการทดสอบก่อนการรักษาอาสาสมัครที่มี Pvs25 จะได้รับวัคซีน MTBV และการทดสอบการรักษาในระยะที่ 1 (phase I) เพื่อศึกษาความหลากหลายของตัวเสริมสร้างให้วัคซีนมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (adjuvants) (Lobo et al., 1999) จากการทดลองระยะที่ 1 ในมนุษย์ โดยใช้ alum ซึ่งเป็นตัวเสริมสร้างให้วัคซีนมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (adjuvant) พบว่าวัคซีนได้รับการยอมรับอย่างดี และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแอนติบอดีที่ดี โดยการทำงานของแอนติบอดีขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่ใช้เป็น adjuvant โดยทั่วไปในอาสาสมัครซึ่งฉีดวัคซีนต่ำ ซึ่งมีความเข้มข้นของแอนติบอดีสูงที่สุด ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อในยูงได้ร้อยละ 20 ถึง 30 (Malkin et al., 2005) adjuvant ที่ใช้กันมากในการศึกษา Pvs25 คือ Montanide ISA 51 (Wu et al., 2008) ซึ่งเป็นทางเลือกสำหรับการพัฒนาวัคซีน Pvs25 หรือ Pvs28 ที่ได้รับการพัฒนาวัคซีน (Kongkasuriyachai et al., 2004)

ชีววิทยาของแกมีโตไซต์

1. ชีววิทยาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax*

แกมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมียของเชื้อ *P. vivax* มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเกือบเต็มเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (Sinden and Gilles, 2002) การผลิตแกมีโตไซต์เริ่มต้นจากระยะเมอโรโซยอต์ของเชื้อ *P. vivax* และสามารถตรวจพบแกมีโตไซต์ได้ภายใน 3 วันหลังจากการตรวจพบเชื้อมาลาเรียครั้งแรก (Boyd and Kitchen, 1937; Boyd et al., 1935; McKenzie et al., 2007) การศึกษาของนักวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการรักษาโรคมาลาเรียแสดงให้เห็นว่าการปรากฏตัวครั้งแรกของแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ที่บริเวณระบบประสาทส่วนกลางที่เกี่ยวข้องกับไขสันหลัง (neurosyphilis) อาจพบการผลิตแกมีโตไซต์อย่างต่อเนื่องในช่วงเดือนแรกของการติดเชื้อ (McKenzie et al., 2002) และไม่มีเซลล์ที่ยึดเกาะ (cytoadherence) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. vivax* หรือแกมีโตไซต์และการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียทุกระยะสามารถตรวจพบในกระแสเลือด แม้ว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. vivax* จะมีขนาดเพิ่มขึ้นแต่เซลล์เม็ดเลือดแดงยังคงมีความยืดหยุ่นอยู่ การเพิ่มความยืดหยุ่นนี้จะช่วยลดระยะเวลาจากการอาศัยอยู่ในม้ามน้อยลง เมื่อยุงดูดเลือดคนที่มียาระยะแกมีโตไซต์เข้าไป แกมีโตจะออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกิดภาวะการกระตุ้นซึ่งมีการเปรียบเทียบและยืนยันแล้วว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *P. falciparum* (Ihalamulla and Mendis, 1987) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานการเปลี่ยนแปลงใน

ระดับโปรตีนที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการต่างๆ (Westenberger et al., 2010) เมื่อได้รับ Sporogony จะเกิดการพัฒนานิอูณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อ *P. falciparum* คือ นิอูณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ช่วงระยะเวลา 8 ถึง 10 วัน และเชื้อ *P. vivax* ที่นิอูณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ช่วงระยะเวลา 16 วัน แต่เชื้อ *P. vivax* ยังมีข้อจำกัดของการพัฒนาที่ นิอูณหภูมิ 14.5 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. falciparum* ที่นิอูณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส (Guerra et al., 2006)

2. ชีววิทยาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum*

แกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* จะแตกต่างจากระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆ สามารถจำแนกได้ 250-300 ยีน ที่มีความจำเพาะในระดับ mRNA ในระหว่างการพัฒนาแกมีโตไซต์ (Silvestrini et al., 2005; Young et al., 2005) และโปรตีนในแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* มีมากกว่า 900 ชนิด แต่สามารถตรวจสอบได้เพียง 315 ชนิด (Lasonder et al., 2002) นอกจากนี้ Khan ทำการศึกษาโปรตีนที่จำเพาะใน ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในเชื้อ *P. berghei* โดยใช้หนูทดลองชี้ให้เห็นว่าโปรตีนเหล่านี้ จะแสดงออกทั้งในแกมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมีย (Khan et al., 2005) ผลการวิจัยนี้สะท้อนให้เห็นถึงลักษณะและบทบาททั้งแกมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมีย การพัฒนารูปร่างของแกมีโตไซต์สามารถแบ่งออกเป็น 5 ระยะ (ภาพที่ 5) (Hawking et al., 1971) ระหว่างที่แกมีโตไซต์เจริญเติบโตและค่อยๆ ยืดยาวออกจนครอบคลุมพื้นที่ส่วนใหญ่ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Baker, 2010) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแกมีโตไซต์สามารถปรากฏใน subpellicular microtubule-based cytoskeleton และพื้นที่โดยรอบของผนังเนื้อเยื่อสองชั้น มีลักษณะคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (Meszoely et al., 1987; Talman et al., 2004) ซึ่งลักษณะความแตกต่างระหว่างแกมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมียจะชัดเจนมากที่สุดในระยะที่ 4 เป็นต้นไป เมื่อแกมีโตไซต์มีลักษณะรูปร่างยาว ปลายแหลม แกมีโตไซต์เพศเมียมีลักษณะนิวเคลียสขนาดค่อนข้างเล็ก นิวคลีโอลัสและเม็ดสีเข้ม ส่วนแกมีโตไซต์เพศผู้จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่และกระจัดกระจาย เมื่อนำฟิล์มเลือดมาข้อมด้วย สียิมซ่า นิวเคลียสติดสีชมพูขณะที่แกมีโตไซต์เพศเมียติดสีม่วง ซึ่งระยะวงแหวนและแกมีโตไซต์ ระยะที่ 5 จะมีความสัมพันธ์กัน คือ สามารถตรวจพบทั้งสองระยะได้พร้อมกันในเลือดของคน (Schneider et al., 2004) การพัฒนาของแกมีโตไซต์พบได้ในไขกระดูกและม้าม (Smalley et al., 1981; Thompson and Robertson, 1935) และยังสามารถหมนเวียนอยู่ในกระแสเลือดของโฮสต์ได้

ช่วงชีวิตของแกมีโตไซต์

ระยะเวลาที่แกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดสามารถตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ประมาณ 3.4 ถึง 6.4 วัน (Eichner, 2001) ระยะเวลาที่แท้จริงของแกมีโตไซต์จะขึ้นอยู่กับยีนที่ผลิตแกมีโตไซต์จากระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และผู้ที่ติดเชื้อแต่ได้รับการรักษาซ้ำอาจทำให้ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศอยู่ได้นานหลายเดือน (Nassir et al., 2005) จากการวิจัยของ Miller พบว่าการผลิตแกมีโตไซต์จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายเดือนในการติดเชื้อตามธรรมชาติ (Miller, 1958) และการผลิตแกมีโตไซต์จะเกิดขึ้นจากการติดเชื้อในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หลังจากนั้นจะถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดและอยู่ได้นานสูงสุดประมาณ 22.2 วัน โดยเฉลี่ย 6.4 วัน (Eichner, 2001) ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการตรวจหาระยะเวลาที่แกมีโตไซต์อยู่ในกระแสเลือด พบว่าสามารถอยู่ให้นานหลังจากการให้ยาไปแล้วเกินกว่า 1 เดือน และยังไม่พบหลักฐานแสดงถึงอัตราการอยู่รอดหรืออัตราการตายของแกมีโตไซต์ในเชื้อ *P. falciparum* (van et al., 2003) แต่ในปี ค.ศ. 2003 Reece ได้ทำการทดลองในเชื้อ *P. chabaudi* พบว่าแกมีโตไซต์เพศเมียอาจตายไปจากกระแสเลือดในอัตราที่สูงกว่าแกมีโตไซต์เพศผู้ (Reece et al., 2003)

ระบาดวิทยาของแกมีโตไซต์

ระบาดวิทยาและการควบคุมโรคมาลาเรียในเชื้อ *P. vivax* ซึ่งปรากฏระยะฮิปโนซอยต์ (hypnozoites) มีอิทธิพลอย่างมาก เนื่องจากระยะนี้สามารถอยู่ได้นานเป็นสัปดาห์ เดือน หรือปี หลังจากการติดเชื้อ ผู้ที่มีเชื้อสามารถเกิดโรคมาลาเรียชนิดนี้ซ้ำ (relapses) ได้ตามฤดูกาล (Hulden and Heliovaara, 2008; Mueller et al., 2009) การเกิดเชื้อมาลาเรียและแกมีโตไซต์ขึ้นกับอัตราความหนาแน่นของเชื้อ (parasitemia) ตามฤดูกาล จากการสังเกตแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จะพบได้มากกว่าเชื้อ *P. falciparum* (Karl et al., 2009) และมีการตรวจพบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นส่วนใหญ่ของการติดเชื้อทั้งหมด (McKenzie et al., 2006) ที่ความหนาแน่นน้อยกว่าร้อยละ 10 ของเชื้อมาลาเรีย (Huh et al., 2011) อย่างไรก็ตามความทนทานของแกมีโตไซต์ในเชื้อ *P. vivax* จะสั้นกว่าในเชื้อ *P. falciparum* ในกรณีที่ไม่ได้รับการรักษา แกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จะอยู่ในกระแสเลือดได้นาน 3 วัน เนื่องจากอัตราการผลิตแกมีโตไซต์สูงโดยเชื้อมาลาเรียระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีช่วงชีวิตที่สั้นกว่าแกมีโตไซต์ ระบาดวิทยาของแกมีโตไซต์ในเชื้อ *P. vivax* มีความใกล้ชิดกับเชื้อมาลาเรียระยะการสืบพันธุ์

แบบไม่อาศัยเพศ ในการรักษาเชื้อมาลาเรียบางครั้งพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* มีความหนาแน่นสูงกว่าเชื้อมาลาเรียระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (McKenzie et al., 2006) ระดับฮีโมโกลบินต่ำกว่าจำนวนเกล็ดเลือด และกรณีที่ไม่ใช่เชื้อ *P. vivax* จะมีลักษณะคล้ายกันกับเชื้อ *P. falciparum* การให้การรักษามักพบมากที่สุดหลังจากฤดูฝน แต่แกมีโตไซต์จะพบบ่อยที่สุดในช่วงฤดูแล้งได้มีการตั้งสมมติฐานว่าการแพร่กระจายของระยะนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนเวกเตอร์น้อยลงซึ่งอยู่ภายใต้อิทธิพลของฤดูกาลหรือลักษณะทางภูมิคุ้มกัน (Nacher et al., 2004)

การติดเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติในผู้ป่วยที่มีระยะแกมีโตไซต์ โดยใช้วิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์ต่ำ (Barnes et al., 2008; Bousema et al., 2006) และการติดเชื้อที่มีความหนาแน่นน้อยอาจจะตรวจไม่พบแกมีโตไซต์ อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของแกมีโตไซต์ยังมีความสัมพันธ์กับระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สังเกตได้จากผู้ป่วยโรคมาลาเรียพบว่าแกมีโตไซต์ 1 ตัวต่อระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 156 ตัว (Eichner, 2001) และการหลบหลีกของระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่มีเชื้อในระดับต่ำจะส่งผลต่อการเหนี่ยวนำหรือผลกระทบของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อแกมีโตไซต์และแกมีต (Piper et al., 1999) ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของคนมีผลต่ออายุของแกมีโตไซต์ ถือเป็นข้อจำกัดในการลดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของการตอบสนองในการเปลี่ยนแปลงในแกมีโตไซต์ (antigametocyte) ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างกลุ่มอายุ รูปแบบของการแพร่กระจาย ฤดูกาล และบทบาทของยีนในแกมีโตไซต์ที่มีในมนุษย์และในกรณีผู้ป่วยที่มีอาการ (symptomatic) เพื่อดูความหนาแน่นของเชื้อ (parasitemia) และอาการ ประกอบกับการศึกษาความชุกและความหนาแน่นของแกมีโตไซต์ที่เพิ่มขึ้น (Dunyo et al., 2006) สามารถแสดงออกในเด็กที่มีอาการได้ถึงร้อยละ 40 จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Barnes et al., 2008) นอกจากนี้แกมีโตไซต์ยังสามารถพบได้ในผู้ที่ไม่มีอาการ (asymptomatic) ในอัตราการติดเชื้อต่ำ (Ouedraogo et al., 2007)

ความหนาแน่นของแกมีโตไซต์กับช่วงฤดูกาล

การติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีอาการโรคมาลาเรียพบบ่อยในช่วงฤดูฝน (Ouedraogo et al., 2008) จากการศึกษาของ Boudin ในปี ค.ศ. 1991 พื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของเชื้อแตกต่างกันอย่างชัดเจนในประเทศบูร์กินาฟาโซ (Burkina Faso) พบว่าการแพร่กระจายของแกมีโตไซต์และระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงที่มีการแพร่กระจายของเชื้อ (Boudin et al., 1991) และจำนวนของแกมีโตไซต์จะต่ำสุดอย่างเห็นได้ชัดในช่วงฤดูแล้ง แสดงให้เห็นถึงการผลิต

แกมีโตไซต์มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในช่วงฤดูแล้ง (Drakeley et al., 2006) และ Biswas (2000) ทำการศึกษาสายพันธุ์ (isolates) จากการเพาะเลี้ยงแกมีโตไซต์ที่จุดเวลาแตกต่างกัน ในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง พบว่าการผลิตแกมีโตไซต์ในฤดูกาลทั้งสองไม่แตกต่างกันและในช่วงระหว่างเดือนที่มีการแพร่กระจายสูงของเชื้อมาลาเรีย พบว่าเชื้อที่มีความหนาแน่นมากจะมีแนวโน้มการผลิตแกมีโตไซต์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ข้อจำกัดในการผลิตแกมีโตไซต์ คือ ระหว่างพื้นที่ที่แตกต่างกันของการแพร่กระจาย หรือหลังจากการแพร่กระจายอัตราของเชื้อลดลง อย่างไรก็ตาม การแพร่กระจายของแกมีโตไซต์โดยทั่วไปจะพบมากในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายสูง (Mabunda et al., 2008) จากการศึกษาของ Mwangi และคณะ (2005) ในประเทศเคนยา พบการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียต่ำเพียงร้อยละ 18 ของผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดของประชากรที่ติดเชื้อมาลาเรีย 10 คนต่อปี และมีแกมีโตไซต์ ร้อยละ 11 ของผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดของประชากรที่ติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 20 ถึง 50 คนต่อปี ในปีต่อมา Drakeley และคณะ (2006) ทำการศึกษาในประเทศแทนซาเนียพบความชุกของแกมีโตไซต์ร้อยละ 17 ในผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดของประชากรที่ติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 100 คนต่อปี เปรียบเทียบกับร้อยละ 24 ของผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดของประชากรที่ติดเชื้อมาลาเรีย 1 คนต่อปี จากการศึกษาของ Molineaux และคณะ (1980) พบว่าความชุกของแกมีโตไซต์เพิ่มขึ้นในบางกลุ่มอายุหลังจากใช้โปรแกรมการควบคุม (control program) การแพร่กระจายของเชื้อลดลง ในทำนองเดียวกับการฉีดพ่นยาฆ่าแมลงและการให้ยาต้านมาลาเรีย (mass drug administration, MDA) ในประเทศเนเธอร์แลนด์ทำให้อัตราของเชื้อมาลาเรียลดลงในปี ค.ศ. 1950 แต่อัตราการรอดตายของแกมีโตไซต์มีแนวโน้มสูงทำให้การผลิตแกมีโตไซต์เพิ่มขึ้นตามมาด้วย (Metselaar, 1960)

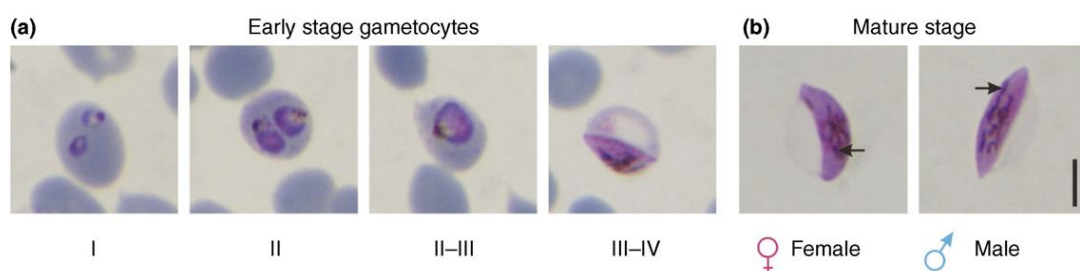
อัตราการแพร่กระจายของแกมีโตไซต์

ความหนาแน่นของแกมีโตไซต์และอัตราการติดเชื้อในยุงของเชื้อ *P. vivax* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *P. falciparum* (Bharti et al., 2006) จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้ยังมีความไวในการตรวจพบแกมีโตไซต์ต่ำ แต่การตรวจฟิล์มเลือดในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียในระยะเริ่มต้นที่ยังไม่พบระยะแกมีโตไซต์ อาจถูกตรวจพบในกระแสเลือดในวันถัดไป (Jeffery, 1952) นอกจากนี้ในผู้ที่มีความหนาแน่นของเชื้อต่ำหรือตรวจไม่พบแกมีโตไซต์จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัย (Bharti et al., 2006; Boyd and Kitchen., 1937) ซึ่งความสำเร็จของการแพร่กระจายของเชื้ออาจขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการติดเชื้อ คือ การพัฒนาแกมีโตไซต์และสัดส่วนของแกมีโตไซต์เพศผู้ ปัจจัยของเชื้อ *P. vivax* เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. falciparum* พบว่าเชื้อ

P. vivax อาจจะมีประสิทธิภาพในการแพร่กระจายมากกว่าเชื้อ *P. falciparum* เมื่อเกิดการติดเชื้อในยุ้งและมีจำนวนของแกมีโตไซต์ต่ำ (Boyd and Kitchen., 1937; Pukrittayakamee et al., 2008) ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการตรวจหาแกมีโตไซต์ที่ติดเชื้อในมนุษย์สำหรับเชื้อ *P. vivax* จากการศึกษาของ Beurskens และคณะ ใช้วิธี QT-NASBA ในการตรวจสอบแกมีโตไซต์ โดยใช้ยีนเป้าหมาย คือ Pvs25 พบว่าอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Beurskens et al., 2009) สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแกมีโตไซต์และความรุนแรงของการติดเชื้อในยุ้งได้ดีขึ้น แทนการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Bharti et al., 2006)

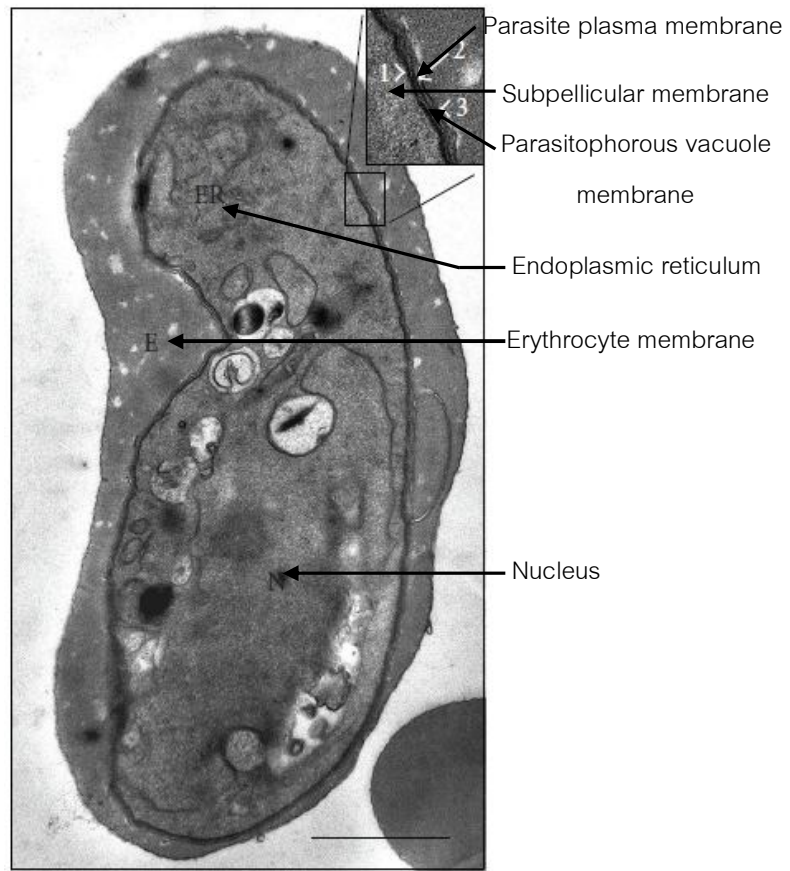
แกมีโตไซต์ในคน

ระยะแกมีโตไซต์เป็นเพียงระยะเดียวในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียที่มีความสามารถในการแพร่กระจายจากโฮสต์ที่เป็นคนไปสู่โฮสต์ที่เป็นแมลงได้ การพัฒนาของระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศไปจนถึงการพัฒนาของระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เรียกว่า gametocytogenesis เริ่มต้นประมาณ 7 ถึง 15 วัน หลังจากการปรากฏของเชื้อมาลาเรียในเลือดของคน ในขณะที่เชื้อ *Plasmodium* ส่วนใหญ่มีระยะแกมีโตไซต์ที่เป็นตัวเต็มวัยอยู่ในระยะน้อยกว่า 2 วัน การพัฒนาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* ในคนจะใช้เวลาประมาณ 10 วัน (Sinden, 1998) การเจริญเติบโตของระยะแกมีโตไซต์สามารถแบ่งรูปร่างทางสัณฐานวิทยาได้เป็น 5 ขั้นตอน (Hawking et al., 1971) (ดังภาพที่ 6)

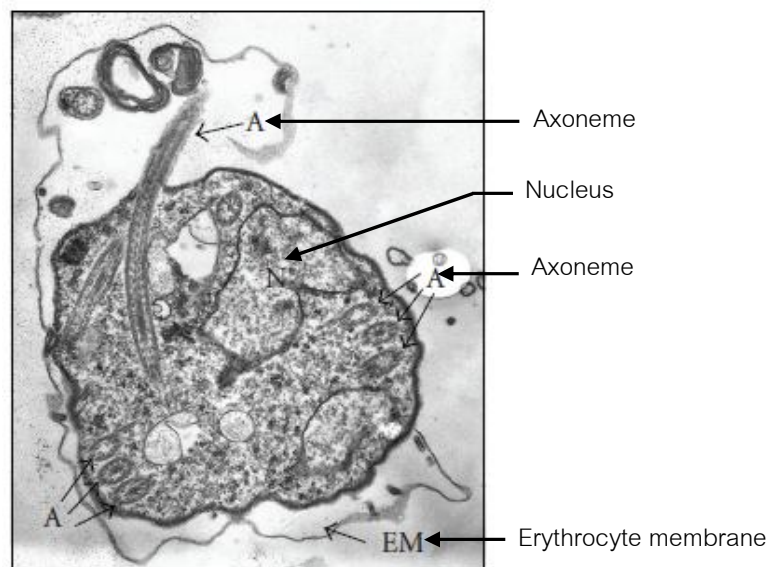


ภาพที่ 6 แสดงลักษณะรูปร่างของแกมีโตไซต์ระยะที่ 1-5 ของเชื้อ *P. falciparum* (Dixon et al., 2008)

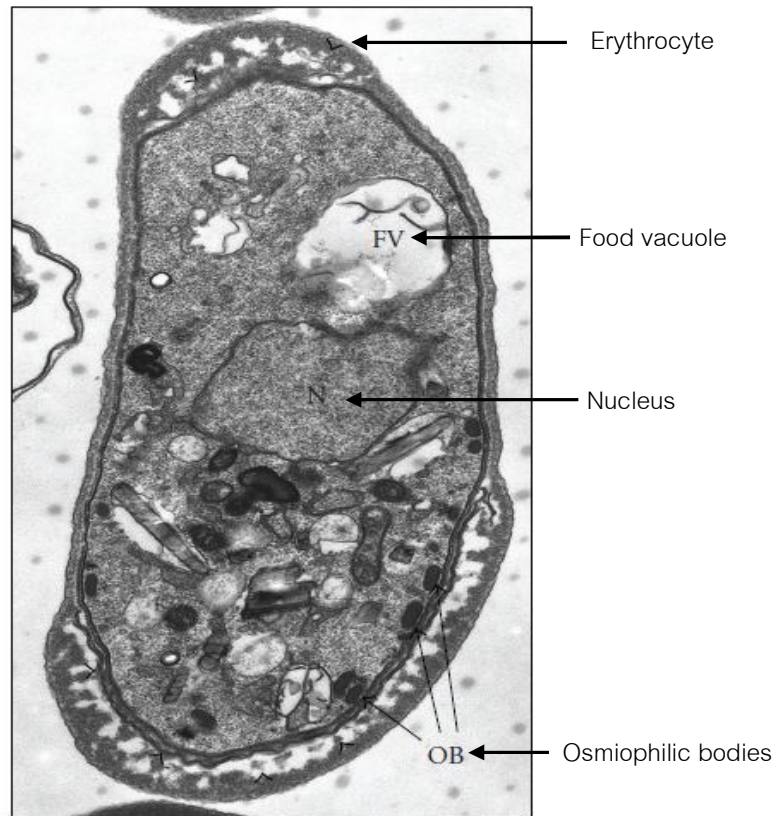
โดยแกมีโตไซต์ซึ่งเป็นระยะที่ 5 ของการเจริญของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีรูปร่างคล้ายกับพระจันทร์เสี้ยว (crescent shape) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงจะลดรูปลงไปปิดล้อมนิวเคลียสเล็กๆ ของแกมีโตไซต์ (intraerythrocytic) มี parasitophorous vacuole (PV) ซึ่งเป็นเกราะป้องกันไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยถุง parasitophorous vacuole membrane (PVM) ที่อยู่ติดกับชั้น parasite plasma membrane (PPM) ภายใต้อัน PPM เป็นลักษณะทั่วไปของแกมีโตไซต์ซึ่งประกอบด้วยแผ่นบางๆ หรือเยื่อหุ้ม subpellicular membrane (SPM) มีการขยายออกแบบตามยาวของไมโครทิวบูล (Sinden, 1982) โครงสร้างเหล่านี้จะสร้างความแข็งแรงให้แกมีโตไซต์และอเล็กตรอนที่หนาแน่นของ SPM จะหายไปในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) (ภาพที่ 7-10)



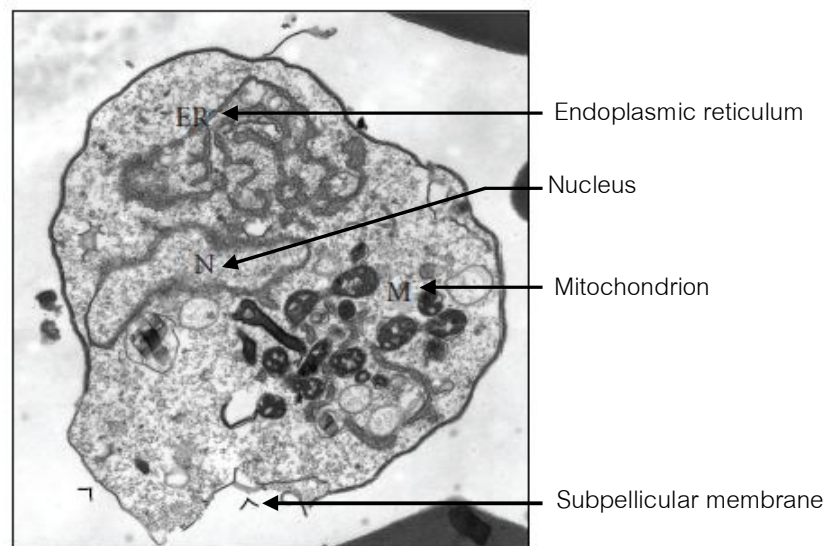
ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างภายในของแกมีโตไซต์เพศผู้ระยะที่ 5 (Kuehn and Pradel, 2010)



ภาพที่ 8 แสดง Axoneme ของแกมีโตไซต์เพศผู้ระยะที่ 5 (Kuehn and Pradel, 2010)



ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างภายในของแกมีโตไซต์เพศเมียระยะที่ 5 (Kuehn and Pradel, 2010)



ภาพที่ 10 แสดง subpellicular membrane ของแกมีโตไซต์เพศเมียระยะที่ 5 (Kuehn and Pradel, 2010)

นอกจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการปรับตัวขึ้นอย่างรวดเร็วจนเพื่อเข้าไปสู่ภาวะยูง เช่น การสังเคราะห์ mRNA จำนวนมากและเก็บไว้ในไซโตพลาสซึมของแกมีโตไซต์เพศเมียหรือ การสังเคราะห์โปรตีนในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เช่น โปรตีนบนผิว Pbs25 และ Pbs28 ของเชื้อมาลาเรีย *P. berghei* ในหนู (Mair et al., 2006) ซึ่งจะมีการถ่ายทอดเฉพาะในยุงก้นปล่อง เพศเมียที่เป็นพาหะและความจำเพาะเพศของแกมีโตไซต์จะถูกกำหนดไว้ตั้งแต่ระยะไซซอนต์ เพื่อพัฒนาเป็น gametocytogenesis (Smith et al., 2000) และพบอัตราส่วนการจับคู่ของ แกมีโตไซต์เพศเมียประมาณ 5 ตัว ต่อแกมีโตไซต์เพศผู้ 1 ตัว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ มาลาเรีย ความแตกต่างนี้มีการอธิบายโดยความจริงที่ว่าแกมีโตไซต์เพศผู้ 1 ตัว สามารถสร้าง แกมีโตไซต์เพศผู้ได้ 8 ตัว ดังนั้นการสร้างแกมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมียในภาวะยูงเป็นไป ในอัตราส่วน 1: 1 จึงนำไปสู่การปฏิสนธิที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (Paul., 2002) อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนการติดเชื้อจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของแกมีโตไซต์ที่พบ (Mitri et al., 2009) ระยะ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีโครโมโซม 1 ชุดเดียว (haploid) สามารถพัฒนาเป็นแกมีโตไซต์ เพศผู้และเมียได้ โดยไม่มีโครโมโซมเพศ ในการกำหนดเพศของแกมีโตไซต์ซึ่งจะเป็นไปตามการ แสดงออกของยีน (Alano and Carter, 1990) จากการศึกษาแกมีโตไซต์ระยะที่ 1 ถึง 4 พบใน ไชกระดุกและม้าม ในขณะที่แกมีโตไซต์ระยะที่ 5 พบในกระแสเลือด (Smalley et al., 1981) และมีเพียงระยะที่ 5 ที่อยู่ในกระแสเลือดประมาณ 2 หรือ 3 วัน สามารถติดเชื้อสู่ยุงได้ แกมีโตไซต์ใน กระแสเลือดอาจจะไม่แพร่กระจายโดยรูปแบบการรวมกันอย่างมีนัยสำคัญที่พบในภาวะของยุง ที่มีเชื้อ *P. falciparum* (Pichon et al., 2000)

แกมีโตไซต์ในยุงพาหะ

หลังจากที่ยุงดูดเลือดคนที่มีเชื้อมาลาเรียระยะแกมีโตไซต์เพศผู้และเมียเข้ามาใน ภาวะพาหะอาหาร แกมีโตไซต์จะปรับตัวให้มีลักษณะกลมเพื่อออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ห่อหุ้มตัว ไว้ ภายในเวลาประมาณ 10 นาที แกมีโตไซต์เพศผู้จะมีการแบ่งเซลล์ซ้ำจำนวน 3 ครั้งเพื่อสร้าง แกมีโตไซต์เพศผู้ (Pradel, 2007) และการออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของแกมีโตไซต์เพศเมียจะ เกี่ยวข้องกับการปรากฏของ osmiophilic bodies ซึ่งจะปรากฏครั้งแรกในแกมีโตไซต์ระยะที่ 4 จากการตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ภาพที่ 8) (Sinden, 1982; Aikawa et al., 1984) และพบเฉพาะในแกมีโตไซต์เพศเมียนั้น โดย osmiophilic bodies จะเคลื่อนย้ายไปที่ parasite plasma membrane (PPM) ในช่วงการกระตุ้นและหายไปภายในไม่กี่นาทีหลังจากการ

กระตุ้น พร้อมกับการแตกออกของ parasitophorous vacuole membrane (PVM) (ภาพที่ 7) osmiophilic bodies มีโปรตีนที่จำเพาะต่อแกมีโตไซต์ คือ โปรตีน Pfg377 (Alano et al., 1995; Severini et al., 1999) และมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ โดยการใช้การตรวจสอบด้วยวิธีทางโมเลกุล พบว่าการแพร่กระจายของยีนอยู่ในแกมีโตไซต์เพศเมียของเชื้อ *P. falciparum* และถ้าโปรตีนชนิดนี้มีจำนวนลดลงใน osmiophilic bodies การออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของแกมีโตไซต์ล้มเหลว ซึ่งให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ในการออกจากแกมีโตไซต์ (Koning-Ward et al., 2008)

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนชนิดอื่น เช่น male development-1 (MDV-1) หรือ protein of early gametocyte 3 (Peg3) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการออกจากแกมีโตไซต์ในเชื้อ *P. falciparum* เริ่มแสดงออกในแกมีโตไซต์ระยะที่ 1 ร่วมกับโครงสร้างเนื้อเยื่อของ parasitophorous vacuole membrane (PVM) จากการศึกษาพบว่าโปรตีนชนิดนี้จะเพิ่มความคงทนให้กับแกมีโตไซต์ (Silvestrini et al., 2005; Lanfrancotti et al., 2007) และเป็นตัวชี้ให้เห็นถึงบทบาทของโปรตีนที่พบหลังการกระตุ้นของแกมีโตไซต์ (Lal et al., 2009) และมีการศึกษาการปรากฏของโปรตีน MDV-1 หรือ Peg3 ในแกมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมียในเชื้อ *P. berghei* พบว่ามีความสำคัญในการพัฒนาของโอโอโคเนิส ซึ่งแกมีโตไซต์ที่ขาดโปรตีนชนิดนี้จะประสบความล้มเหลวในการออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง จึงทำให้การปฏิสนธิเกิดน้อยลง ดังนั้นโปรตีน MDV-1 หรือ Peg3 จึงมีบทบาทสำคัญในการแตกออกของ parasitophorous vacuole membrane (PVM) และผนังของเซลล์เม็ดเลือดแดง (EM)

การออกจากวงชีวิตที่อิสระของแกมีโตไซต์จากเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความเกี่ยวข้องกับการแตกออกของถุง parasitophorous vacuole membrane (PVM) และผนังของเม็ดเซลล์เม็ดเลือดแดง ปัจจุบันได้มีการศึกษาพบว่า parasitophorous vacuole membrane (PVM) จะเกิดการแตกออกก่อนที่ผนังของเม็ดเซลล์เม็ดเลือดแดงจะแตกตาม (Wickham et al., 2003) และรูปแบบภายนอกในผนังของเม็ดเซลล์เม็ดเลือดแดงจะเกิดการสลายตัวครั้งแรก (Salmon et al., 2001; Soni et al., 2005) ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้จะไม่เกิดขึ้นกับระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน MDV-1 หรือ Peg3 มีส่วนร่วมในการแตกออกของ parasitophorous vacuole membrane (PVM) และผนังของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pradel (Pradel, 2007) พบว่า parasitophorous vacuole membrane (PVM) จะหายไปภายในไม่กี่นาที่หลังจากเกิดการกระตุ้นแกมีโตไซต์และการแตกของผนังของเม็ดเซลล์เม็ดเลือดแดงในหลายนาที่ต่อมาจึงเป็นการกระตุ้นให้แกมีโตไซต์ออกมา

นอกจากนี้การออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของแกมีโตไซต์ต้องอาศัยเอนไซม์ช่วยในการย่อยโปรตีน เรียกว่า โปรติเอส (protease) จากการศึกษาของ Blackman พบว่าโปรติเอสจะเกิดขึ้นในระยะเมอโรโซยต์ (Blackman et al. 2008) และโปรตีนที่ถูกค้นพบอีกชนิด คือ serine-rich antigen (SERA) พบใน parasitophorous vacuole (PV) ของระยะไซซอนต์ (Miller et al., 2002; Aoki et al., 2002) ซึ่งเกี่ยวข้องกับแตกของ parasitophorous vacuole membrane (PVM) ในขณะที่ไม่มีการศึกษารายละเอียดโปรตีนเหล่านี้ที่เกี่ยวข้องกับแกมีโตไซต์ (Rosenthal, 2004)

หลังจากการพัฒนาแกมีโตไซต์ประมาณ 6 วัน ในการสังเคราะห์โปรตีนและการย่อยฮีโมโกลบิน (Baker, 2010) แกมีโตไซต์จะปรากฏการพัฒนาที่ระยะ G₀ ของวงจรชีวิต (Sinden et al., 1996) มีการจำลองแบบจีโนม (Raabe et al., 2009) และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกในแกมีโตไซต์ โดยมีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ซึ่งการจำลองแบบจีโนมและการแยกนิวคลีอัสจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเพียงครั้งเดียวเมื่อถูกกระตุ้นในกระเพาะอาหารของยุง (Baker, 2010) สำหรับการกระตุ้น mRNA เพื่อสร้างโปรตีน จำเป็นต้องใช้อาศัยการกินเลือดของยุง เช่น โปรตีน P25 และ P28 เริ่มมีการสังเคราะห์ในแกมีโตไซต์และ mRNA ของโปรตีนหลายชนิดที่จำเพาะต่อระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถพบในแกมีโตไซต์ (Babiker et al., 1999; Menegon et al., 2000; Schneider et al., 2006; Sinden et al., 2004) เช่น โปรตีน Pfs16 เป็นโปรตีนเริ่มต้นของการพัฒนาระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ พบการแสดงออกในแกมีโตไซต์ตั้งแต่วัยที่ 1 ถึง 5 ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะอยู่บน parasitophorous vacuole membrane จนกว่าจะมีการสูญหายในระหว่างการกระตุ้นในแกมีโตไซต์ (Baker et al., 1994) ส่วนโปรตีนชนิดอื่นในแกมีโตไซต์ ได้แก่ โปรตีน Pfpeg3 และ protein of early gametocyte 4 (Pfpeg4) ที่สร้างขึ้นในแกมีโตไซต์ ระยะที่ 2 (Silvestrini et al. 2005) รวมทั้งโปรตีน Pf14 (Eksi et al., 2005) และ Pfg27 จะเกิดการสังเคราะห์โปรตีนเหล่านี้ประมาณ 30 ชั่วโมง หลังจากรุกรานของเมอโรโซยต์ (Carter et al., 1989)

Babiker ได้ทำการศึกษาบทบาทและระยะเวลาของการพัฒนาแกมีโตไซต์ โดยใช้โปรตีน Pfs25 เป็นเป้าหมายของแกมีโตไซต์ระยะที่ 5 ในเชื้อ *P. falciparum* (Babiker et al., 1999) เมื่อแกมีโตไซต์ระยะที่ 5 ปะปนมาในเลือดที่ถูกกินโดยยุงก้นปล่อง แกมีโตไซต์จะถูกกระตุ้นเพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการปฏิสนธิในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายใน 20 นาทีหลังจากที่แกมีโตไซต์ถูกนำเข้าสู่กระเพาะยุง ซึ่งปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ การลดอุณหภูมิลงประมาณ 5 องศาเซลเซียสของเลือดคนเข้าสู่กระเพาะอาหารของยุง ค่า pH ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 7.4 ถึง 8.2 และกรดแซนทูรีนิก โดยแกมีโตไซต์จะถูกกระตุ้นด้วยกรดแซนทูรีนิก (Billker et al., 1998; Billker et al., 1997) ให้มีรูปร่างพัฒนาเป็นเซลล์ทรงกลมเพื่อออกจาก

เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยในระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เกิดการแบ่งดีเอ็นเอ 3 ครั้ง เพื่อได้เป็นแกมมาตเพศผู้จำนวน 8 ตัว หลังจากนั้นแกมมาตเพศผู้จะเคลื่อนที่เข้าไปผสมพันธุ์กับแกมมาตเพศเมีย (Hirai et al., 2010)

แกมมาโตไซต์ถูกกระตุ้นให้ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนในยุงพาหะ ในขณะที่ยุงก้นปล่องตัวเมียดูดเลือดของคนที่ติดเชื้อมาลาเรียโดยมีระยะแกมมาโตไซต์ปะปนมากับเลือด สิ่งแวดล้อมที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงจากเลือดของคนไปยังพาหะที่เป็นแมลงซึ่งเป็นการเริ่มต้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ รวมถึงอุณหภูมิภายในเลือดคนที่ลดลงประมาณ 5 องศาเซลเซียสเมื่อเข้ามาในยุง (Billker et al., 1997) และการแสดงออกของกรดแซนทุรีนิก (xanthurenic) ที่ได้จากการสังเคราะห์คีตาของยุง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดแกมมาโตไซต์ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งรวมถึงค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจาก 7.2 เป็น 8 (Kawamoto et al., 1991) จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแกมมาตเพศผู้ ในขณะที่กรดแซนทุรีนิกจะปรากฏเพื่อส่งสัญญาณเริ่มต้นของการกำเนิดแกมมาต โดยการกระตุ้นแกมมาโตไซต์เพศผู้ให้ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อให้เกิดการสร้างแกมมาตเพศผู้ (exflagellation) ในช่วงนี้ประมาณ 15 นาที (Sinden et al., 1978) เนื่องจากการสร้างแกมมาตเพศผู้สามารถตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์และสามารถนับจำนวนของแกมมาตเพศผู้ได้ โดยกระบวนการ exflagellation เกิดขึ้นเมื่อกระตุ้นแกมมาโตไซต์เพศผู้ให้เป็นแกมมาตเพศผู้ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagellar) ซึ่งแยกออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหลือ จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำของ exflagellation เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจากปริมาณแคลเซียมและ guanosine cyclic monophosphate (cGMP) ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ (Kawamoto et al., 1993) การเริ่มต้นในการส่งสัญญาณของ guanylyl cyclases (GC α และ GC β) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญของเชื้อ *P. falciparum* จะถูกกระตุ้นโดยกรดแซนทุรีนิก (Muhia et al., 2001.) นอกจากนี้การกระจายของ GC β ในเชื้อ *P. berghei* ยังส่งผลให้การ exflagellation เป็นปกติ แต่การเคลื่อนที่ของโอโอไคนิตต่อออนแอลง แสดงให้เห็นว่าบทบาทของ GC β ไม่ได้เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการกระตุ้นแกมมาโตไซต์ (Hirai et al., 2006) แต่การเพิ่มขึ้นของ cGMP เป็นเป้าหมายในการกระตุ้นโปรตีนไคเนสให้เกิดปฏิกิริยา cGMP-dependent protein kinase (PKG) เพื่อนำไปสู่การกระตุ้นแกมมาโตไซต์ จากปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น (McRobert et al., 2008) ทำให้เกิดการ exflagellation ซึ่งพบการแสดงออกของ diacylglycerol และ inositol triphosphate (IP₃) ที่เป็นผลผลิตของ phospholipase C (Martin et al., 1994) หลังจากการปล่อยแคลเซียมออกจากเอนโดพลาสมิสม เรติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER)

แกมมาโตไซต์ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนในยุงพาหะ แกมมาโตไซต์ระยะที่ 1 ถึง 4 ของเชื้อ *P. falciparum* จะแยกออกจากกระแสเลือดเพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายของภูมิคุ้มกันในม้าม

เมื่อแกมีโตไซต์ระยะที่ 5 ถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือด ยุงจะดูดเลือดเข้าไปในกระเพาะอาหาร เพื่อเจริญเติบโตเป็นแกมีตต่อไป อย่างไรก็ตามอาจใช้เวลา 2 ถึง 3 วัน ก่อนที่จะหมุ่นเวียนอยู่ในกระแสเลือด (Lensen et al., 1999) ซึ่งแกมีโตไซต์ระยะที่ 1 ถึง 2 จะมี CD36 ซึ่งเป็นลิแกนด์สำหรับการยึดเกาะแกมีโตไซต์ (Day et al., 1998; Hayward et al., 1999; Smith et al., 2003) และมี ICAM-1, CD49c, CD166, CD164 เป็นตัวรับที่อยู่ในเยื่อบุผิวกระดูกของคน และ stromal cell lines ทำหน้าที่ในการเป็นลิแกนด์สำหรับแกมีโตไซต์ระยะที่ 3 และ 4 (Dixon et al., 2008) ซึ่งเป็นสื่อกลางในการยึดเกาะ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนบนผิวของเชื้อมาลาเรียอีกหลายชนิด เช่น โปรตีน PfEMP-1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (Sharp et al., 2006), RIFIN (repetitive interspersed family) (Wang et al., 2010) และ STEVOR (subtelomeric variable open reading frame) (Sutherland, 2001) จากการศึกษาของ Sharp ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน PfEMP-1 สามารถพบได้ตลอดของการพัฒนาระยะแกมีโตไซต์ จากพีโนไซปของระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Sharp et al., 2006) และจะแสดงออกในโครงสร้างปุ่มเล็ก ๆ (knob) บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อของแกมีโตไซต์ระยะที่ 1 ถึง 2 (Day et al., 1998) ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกแกมีโตไซต์ในวันแรกของการพัฒนาในเซลล์เม็ดเลือดที่มีแกมีโตไซต์ จะไม่ยาวกว่า โดยโครงสร้างของ knob จะปรากฏในไซโตพลาสซึมของเชื้อมาลาเรีย (Hayward et al., 1999) ต่อมาโปรตีน STEVOR ซึ่งพบมากที่สุดแกมีโตไซต์ระยะเริ่มต้นและพบว่ามีการสร้างโปรตีนบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในช่วงแกมีโตไซต์ระยะที่ 5 (McRobert et al., 2004) ซึ่งมีความสอดคล้องกับบทบาทในการแยกออกของแกมีโตไซต์ (sequestration) และการปรากฏของโปรตีน STEVOR บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อกับ nonsequestering ในแกมีโตไซต์ระยะที่ 5 ทำให้มีบทบาทในการ cytoadhesion และในปี ค.ศ. 2008 Petter พบว่าโปรตีน RIFINs มีบทบาทในการยึดเกาะในแกมีโตไซต์เช่นเดียวกัน (Petter et al., 2008)

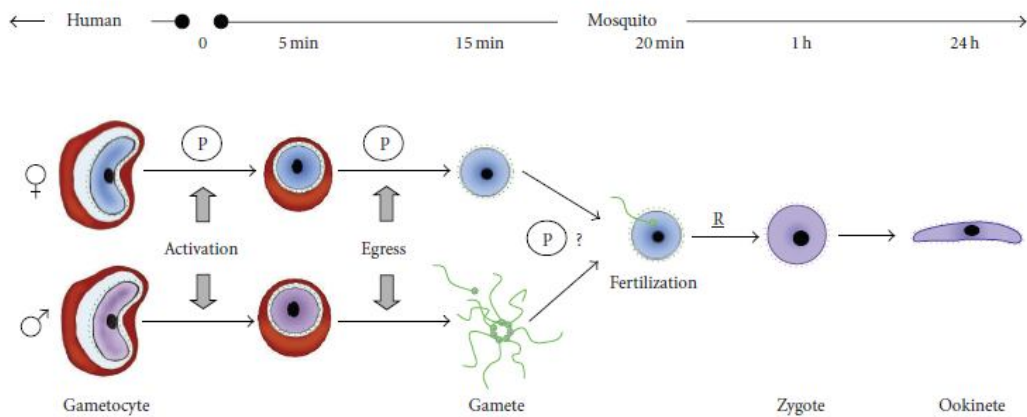
การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เกิดขึ้นโดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะเป็นวงกลม (Rosettes form) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เรียกว่า การเกิด exflagellation แล้วออกจากแกมีโตไซต์เพศผู้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยกรดเซียลิก (sialic) และไกลโคโพริน (glycophorin) จากผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Templeton et al., 1998) และมีโปรตีนเป็นสื่อกลางที่ช่วยในการเกาะติดบนผิวของแกมีต คือ โปรตีน Pfs230 ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Pfs230 มีความจำเป็นสำหรับการเกาะติดบนผิวของแกมีตเพศผู้ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Eksi et al., 2006)

ความก้าวหน้าของการศึกษาโปรตีนในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *Plasmodium* สามารถจำแนกได้ดังนี้ คือ ชนิดของโปรตีนที่ไม่จำเป็นต่อการสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียและลักษณะการทำงานของโปรตีน สามารถหาได้จาก การวิเคราะห์พีโนไทป์ของเชื้อและยีนที่แสดงออกในระยะดังกล่าว จีโนมที่มีการสร้างกันอย่างแพร่หลายของเชื้อมาลาเรีย เช่น โปรตีนไคเนส (kinases) ซึ่งตรวจพบในเชื้อ *P. falciparum* (Ward et al., 2004) ความหลากหลายของโปรตีนไคเนสเหล่านี้ของเชื้อ *P. berghei* มีการศึกษาพบว่าการเพิ่มปริมาณของแคลเซียมขึ้นอยู่กับโปรตีน calcium-dependent protein kinase 4 (PbCDPK4) ซึ่งโปรตีนไคเนสจะถูกกระตุ้นโดยกรดแซนโทรีนิกเป็นผลให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้ในแกมีโตไซต์เพศผู้ (Billker et al., 2004) นอกจากนี้มีการศึกษาโปรตีน calcium-dependent protein kinase 4 (PfCDPK4) ของเชื้อ *P. falciparum* พบว่ามีความจำเพาะต่อระยะแกมีโตไซต์ซึ่งถูกกระตุ้นโดย phospholipase C (Ranjan et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีโปรตีน mitogen activated protein kinase 2 (Pbmap-2) จะเป็นตัวควบคุมการสร้างแกมีตเพศผู้ในขั้นตอนไซโทไคเนซิส (cytokinesis) (Tewari et al., 2005) และเมื่อเกิดการปฏิสนธิระหว่างแกมีตเพศผู้และเพศเมียจะไดไซโกตและเกิดการสังเคราะห์โปรตีน serine หรือ threonine-protein kinase Nek-2 (Pbnek-2) และ protein kinase Nek-4 (Pbnek-4) ในระยะไซโกต (Reininger et al., 2009) และโปรตีน calcium-dependent protein kinase 3 ของเชื้อ *P. berghei* (PbCDPK3) ใช้ในการเคลื่อนที่ของระยะโอโอไคไนต์เพื่อไซฟานเยื่อหุ้มผิวกระเพาะยุง (Ishino et al., 2006)

โดยจากการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของระยะแกมีโตไซต์ในยุงเพื่อเตรียมความพร้อมในการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมเพื่อเข้าสู่กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งมีผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกบนผิวโปรตีนของแกมีโตไซต์และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ รวมถึง EGF-domain ซึ่งมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) เช่น โปรตีน Pfs25, Pfs28, Pfs230, Pfs48, Pfs45 และ PfCCp โปรตีนเหล่านี้มีศักยภาพในการเป็นเป้าหมายเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียได้ (Pradel, 2007) โดยมีคุณสมบัติในการยึดเกาะผิวโปรตีนและสามารถแบ่งโปรตีนออกเป็น 2 ระดับ คือ การแสดงออกของโปรตีนระดับที่ 1 ซึ่งอยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศก่อนการปฏิสนธิ เช่น Pfs230, Pfs48, Pfs45 และ six Pf CCp จะแสดงออกภายใน parasitophorous vacuole (PV) ของแกมีโตไซต์และมีการพัฒนาต่อมาจนถึงระยะแกมีต แต่การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ มักสิ้นสุดลงในระหว่างการปฏิสนธิ (ภาพที่ 11) การแสดงออกของโปรตีนระดับที่ 2 ซึ่งอยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหลังการปฏิสนธิ เช่น โปรตีน Pfs25 และ Pfs28 ที่แสดงออกจนถึงระยะโอโอไคไนต์ (Pradel, 2007)

การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้จะอยู่ระหว่างการปฏิสนธิ คือ การขนส่ง messenger RNA เพื่อสร้างเป็นโปรตีน และในปี ค.ศ. 2009 Yuda ทำการศึกษาในเชื้อ *P. berghei* พบการแสดงออกของโปรตีน Pbs25 และ Pbs28 ในการยับยั้งการพัฒนาของระยะไซโกต (RNA helicase DOZI) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของสารประกอบเชิงซ้อนไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein) และยังมีโปรตีน Apetala2 (AP2-O) ที่แสดงออกในแกมีโตไซต์เพศเมียและจะสังเคราะห์โปรตีนในระยะโอโอไคเนต เมื่อเกิดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการยึดเกาะโปรตีนในกระเพาะอาหารของยุง (Yuda et al., 2009)

โปรตีนที่ยึดเกาะในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อมาลาเรียมีหลายชนิด แต่จากการศึกษาของ Simon พบว่าโปรตีน six PfCCp ซึ่งมีลักษณะพิเศษ คือ มีจำนวนโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะสูงจากโปรตีนที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (multi protein complexes) เกิดขึ้นในระหว่างการแสดงออกใน parasitophorous vacuole และจะปรากฏออกมาบนผิวของแกมีตเพศเมีย (Simon et al., 2009) นอกจากนี้ Scholz ทำการศึกษาโปรตีน Pfs48 และ Pfs45 ซึ่งพบว่ามีที่ยึดเกาะร่วมกันบนผิวของแกมีต (Scholz et al., 2008) จากสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนที่ครอบคลุมแกมีตเพศเมียมีรูปแบบของการยึดเกาะกันที่เหนียวแน่นมาก รวมทั้งกระบวนการขนส่งเชื้อมาลาเรียในยุง อาจมีบทบาทในการส่งเสริมการติดต่อบริเวณการสร้างแกมีตในสภาพแวดล้อมที่อยู่ภายในกระเพาะของยุง เป็นที่น่าสังเกตว่าแกมีตและไซโกตเป็นระยะที่มีชีวิตอยู่ภายนอกเซลล์ของโฮสต์ได้มากกว่า 1 วัน ซึ่งมีปัจจัยของอาหารในเลือดได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่กระเพาะและเอนไซม์ย่อยอาหาร และ จากการพิสูจน์ของ Vaughan พบว่าในระหว่างที่มีการขนส่งเชื้อมาลาเรียในกระเพาะเลือดไปยังยุงก้นปล่อง จำนวนเชื้อจะลดลงประมาณ 300 เท่า ทำให้เกิดสภาวะคอขวด (bottleneck) ในวงชีวิตของยุง (Vaughan et al., 1994)



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของแกมีโตไซต์ ในระหว่างการส่งจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนไปสู่ยุงพาหะ (Kuehn and Pradel, 2010)

โดยแกมีโตไซต์ระยะที่ 5 ซึ่งอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนถูกนำเข้ามาสู่กระเพาะอาหารของยุงก้นปล่องตัวเมียพร้อมอาหารในเลือด โดยแกมีโตไซต์จะถูกกระตุ้นและเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้มีลักษณะกลม (ภาพที่ 11) ก่อนที่จะออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ห่อหุ้ม โดยมีเอนไซม์โปรตีเอส (proteases, P) ที่เกี่ยวข้องในระหว่างการสร้างแกมีตเพศเมีย ขณะที่แกมีตเพศผู้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากแกมีโตไซต์ ซึ่งสามารถผลิตแกมีตได้ถึง 8 ตัว ภายในเวลาประมาณ 20 นาที หลังจากเกิดการกระตุ้น แกมีตเพศผู้จะเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิกับแกมีตเพศเมีย (fertilizes macrogamete) ได้เป็นไซโกต และภายใน 1 วันจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นโอโอไคนีตที่พบการแสดงออกของโปรตีนระดับที่ 2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับโปรตีนบนผิวของระยะไซโกตและโอโอไคนีต (สีชมพู) ที่ปล่อยออกมาจากแกมีโตไซต์ในระหว่างการปฏิสนธิ (R) และการแสดงออกของโปรตีนยังคงมีอยู่ในระยะโอโอไคนีต ส่วนการแสดงออกของโปรตีนระดับที่ 1 (สีเขียว) จะแสดงออกใน parasitophorous vacuole ของการพัฒนาแกมีโตไซต์และโปรตีนบางส่วนมีความสามารถในการยึดเกาะโปรตีนหลายชนิด (multi protein complexes) มีการแสดงออกของโปรตีนหลังจากที่แกมีตออกมา แต่การแสดงออกจะสิ้นสุดลงในระหว่างการปฏิสนธิ

การวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากอาการทางคลินิกของโรคมาลาเรียมีความคล้ายคลึงกับโรคอื่น ๆ เช่น มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ ปวดตามตัวและกล้ามเนื้อ มีอาการคลื่นไส้ เบื่ออาหาร ซึ่งคล้ายกับโรคหลายชนิด เช่น โรคไข้หวัดใหญ่ ไข้เลือดออก และตับอักเสบ เป็นต้น รวมทั้งการรักษาโรคมาลาเรียมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ เช่น เชื้อ *P. falciparum* ที่ติดต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิดและมีภาวะที่แทรกซ้อนอย่างรุนแรง ส่วนเชื้อ *P. vivax* และ *P. ovale* ต้องให้ยาไพริมาควิน (primaquine) เพื่อกำจัดระยะของเชื้อที่หยุดพักการเจริญในเซลล์ตับหรือระยะฮิปโนซอยต์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดไข้กลับ (relapse) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อทราบชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค จึงมีความจำเป็นในการวินิจฉัยซึ่งมีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เช่น การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหาตัวเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด การตรวจทางอิมมูโนวิทยาเพื่อหาแอนติบอดีที่จำเพาะและการตรวจหาโปรตีนหรือแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อมาลาเรีย และการตรวจทางอณูชีววิทยาเพื่อหาดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอของเชื้อมาลาเรียซึ่งวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป คือ การตรวจหาชนิดและระยะของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงโดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากการย้อมสียิมซ่า การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป สามารถมีประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยา แต่มีข้อจำกัดด้านการวินิจฉัยโรคเพื่อการรักษา (Makler et al, 1998) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการวินิจฉัยโดยการตรวจดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่จำเพาะต่อเชื้อซึ่งเป็นเทคนิคทางโมเลกุลมีความไวและความจำเพาะสูงจึงสามารถตรวจในผู้ป่วยที่มีปริมาณเชื้อมาลาเรียต่ำ

1. การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่ดี ง่ายและประหยัด ซึ่งเป็นวิธีที่จำเพาะและเหมาะสมสำหรับการใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ในการเตรียมแผ่นฟิล์มเลือดสำหรับตรวจหาเชื้อมาลาเรียมี 2 วิธี คือ

1.1 แผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin blood film) ใช้เลือดประมาณ 1 ถึง 2 ไมโครลิตร หยดเลือดอยู่ห่างปลายด้านหนึ่งของสไลด์ ทำการไถเลือดด้วยความเร็วสม่ำเสมอในทิศทางตรงข้ามกับตำแหน่งที่หยดเลือดไว้ จากนั้นย้อมด้วยสียิมซ่าแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะฟิล์มเลือดที่ดีควรเลือกบริเวณที่เหมาะสมซึ่งเป็นบริเวณใกล้ปลายฟิล์ม ในบริเวณนี้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีขนาดปกติไม่ใหญ่เกินไปและการกระจายของเม็ดเลือดเรียงตัวเป็นชั้นเดียวไม่ห่างและไม่ซ้อนกัน ควรตรวจอย่างน้อย 100 วงกล้อง นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์

1.2 แผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film) ใช้เลือดประมาณ 3 ถึง 5 ไมโครลิตร หยดเลือดตรงศูนย์กลางของสไลด์ เกลี่ยเลือดให้เป็นวงกลม ย้อมด้วยสียิมซาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วนับจำนวนเชื้อมาลาเรียสามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อ โดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 200 ตัว (Chiodini and Moody, 1989)

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการใช้ทั้งวิธีตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดบางและชนิดหนา โดยฟิล์มเลือดชนิดหนามีความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียสูงกว่าฟิล์มเลือดชนิดบาง ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียปริมาณต่ำสุดจากฟิล์มเลือดชนิดหนาประมาณ 20 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ส่วนฟิล์มเลือดบางแม้จะมีความไวต่ำกว่าเนื่องจากปริมาณเลือดที่ใช้้น้อยกว่าฟิล์มเลือดชนิดหนาแต่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้แม่นยำกว่า ดังนั้นความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจด้วยฟิล์มเลือดชนิดบางจึงสูงกว่า

นอกจากการตรวจหาปริมาณและการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียแล้ว การตรวจหาระยะของเชื้อยังมีความสำคัญทางคลินิก เช่น การตรวจพบระยะแกมมาโตไซม์ อาจวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยมีเชื้อในร่างกายมาอย่างน้อยเป็นระยะเวลา 5 วัน และระยะดังกล่าวสามารถแพร่เชื้อสู่ยุงพาหะได้ (Silamut and White, 1993; Ebisawa et al, 1971; Nguyen et al, 1995)

2. การตรวจหาแกมีโตไซต์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ในกระแสเลือดของผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่นของแกมีโตไซต์ต่ำจะไม่สามารถตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากวิธีนี้มีความไวในการตรวจพบต่ำ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ถือเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการตรวจวัดความหนาแน่นของแกมีโตไซต์ได้ในช่วงช่วงต้นของทศวรรษที่ 1930 ซึ่งตรวจพบได้ว่ายุงเป็นพาหะที่นำไปสู่การติดเชื้อ *P. falciparum* (Jeffery et al., 1955; Muirhead-Thomson., 1998) และเชื้อ *P. vivax* (Boyd, 1937) จากการศึกษาในพื้นที่ที่มีโรคมาลาเรียเป็นโรคประจำถิ่น โดยใช้วิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าการปรากฏของแกมีโตไซต์แล้วค่อยๆ หายไปและจะเกิดขึ้นอีกครั้งในภายหลัง (Bousema., et al. 2004; Drakeley et al., 2006) ซึ่งให้เห็นว่าแกมีโตไซต์ที่หมุนเวียนในกระแสเลือดมีความหนาแน่นมากพอกับการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทั่วไปการตรวจสอบด้วยฟิล์มเลือดชนิดหนาที่ 100 วงกล้องและใช้กำลังขยาย 100 เท่าและใช้เลือดปริมาณ 0.16 - 1 ไมโครลิตร (Bejon et al., 2006; Greenwood et al., 1991; Karl et al., 2009) แต่สำหรับความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบความหนาแน่นของเชื้อต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ปริมาณเลือดต้องไม่น้อยกว่า 3 ไมโครลิตร (Karl et al., 2009) จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตรวจสอบประมาณ 100 วงกล้องอาจตรวจพบความหนาแน่นของ

แกมีโตไซต์สูงประมาณ 20 ถึง 50 ของแกมีโตไซต์ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร (Dowling et al., 1966; Karl et al., 2009; Moody, 2002) และสามารถตรวจพบลักษณะของแกมีโตไซต์จากเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยวและอาจมีลักษณะคล้ายกับระยะอื่นๆ ของวงจรชีวิตซึ่งอาจเป็นอุปสรรคในการตรวจหาแกมีโตไซต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Colbourne และคณะ (1956) พบว่าเทคนิคนี้มีความไวในการตรวจพบต่ำ ส่งผลให้ความชุกของแกมีโตไซต์เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 60 การตรวจสอบด้วยฟิล์มเลือดชนิดหนาที่กำลังขยาย 100 เท่า นอกจากนี้มีการนำเทคนิคเชิงปริมาณ (Quantitative Buffy coat, QBC) ซึ่งใช้เลือดปริมาณ 55 ไมโครลิตร โดยการย้อมด้วยสีอะครีดีน (acridine) เคลือบในหลอดทดลอง (Spielman et al. 1988) พบความชุกของแกมีโตไซต์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.6 เป็นร้อยละ 19.1 (Mulder et al., 1998) ต่อมา Karl และคณะ (2008) นำวิธี Magnetic deposition microscopy (MDM) มาพัฒนาใช้ในการทดสอบความเข้มข้นของเชื้อมาลาเรียในเลือดที่มีสารสีดำที่เกิดจากการแตกตัวของฮีโมโกลบิน (hemozoin) (Zimmerman et al., 2006) MDM เป็นวิธีที่ใช้ปริมาณเลือดมากขึ้นจึงช่วยเพิ่มความไวของการตรวจสอบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพิ่มความชุกของแกมีโตไซต์ในเชื้อ *P. falciparum* ในการตรวจสอบ 200 วงกล้อจากฟิล์มเลือดชนิดหนาร้อยละ 7.3 (ปริมาณเลือดที่ใช้ 0.4 ถึง 4 ไมโครลิตร) แต่เมื่อใช้วิธี MDM พบการตรวจสอบร้อยละ 45 (ปริมาณเลือดที่ใช้ 40 ไมโครลิตร) จากผู้ที่มีอาการของโรคมาลาเรียในประเทศปาปัวนิวกินี (Karl et al., 2008) ดังนั้นความไวที่เพิ่มขึ้นของวิธีการเหล่านี้จะช่วยให้การยืนยันว่าการแพร่กระจายของแกมีโตไซต์ยังเป็นอุปสรรคอย่างมากในกรณีที่ไม่สามารถตรวจพบระยะนี้ได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การตรวจโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดชนิดบางมีความเหมาะสมในการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ดี แต่มีข้อจำกัดในกรณีที่ผู้ป่วยติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพิ่มขึ้น เพื่อประเมินสถานการณ์ของโรคมาลาเรียในปัจจุบัน เนื่องจากในกระแสเลือดของผู้ป่วยนั้นมีทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย ทำให้การตรวจด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยามีความสัมพันธ์กับการพบเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความจำเพาะและความไวสูงกว่าวิธีอื่นๆ รวมทั้งสามารถแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้อย่างถูกต้องมากขึ้น การวินิจฉัยดังกล่าวมีหลายวิธี คือ

1. Nucleic acid hybridization เป็นวิธีการตรวจหากรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยอาศัยหลักการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวแล้วกลับมาจับคู่กับสายเดิม (hybridization) นอกจากนี้ยังสามารถใช้สำหรับอาร์เอ็นเอกับอาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสตรงคู่กัน (complementary) โดยการใส่โพรบ (probe) ที่

ติดฉลากเพื่อเป็นตัวติดตาม ซึ่งวิธีการตรวจมีหลายวิธี เช่น Solid phase hybridization เป็นการตรวจหานิวคลีโอไทด์โดยมีดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียเป็นเป้าหมายนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจมาตรึงบนแผ่นค้ำจุนซึ่งอาจทำมาจากไนลอน จากนั้นนำมาไฮบริได (hybridize) ในสารละลายของโพรบซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาบนแผ่นค้ำจุน หลังจากนั้นทำการแยกขนาดโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วจึงขนถ่ายสู่แผ่นค้ำจุน ดังนั้นดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกตัดให้มีขนาดสั้นลงและมีขนาดจำเพาะ อย่างไรก็ตามแม้ว่าในปัจจุบันการพัฒนาระบบการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี hybridization เพื่อการวินิจฉัยอย่างมีข้อจำกัดด้านวิธีการและความเหมาะสมในการนำไปใช้ แต่วิธีการดังกล่าวยังมีประโยชน์ในการตรวจจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในการศึกษาพันธุกรรมประชากรที่เป็นพื้นฐานของการพัฒนาวัคซีน นอกจากนี้ยังมีวิธี Liquid phase hybridization ซึ่งวิธีนี้เป็น การตรวจจับกันระหว่างนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยหลักการ hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายกับนิวคลีโอไทด์โพรบ (oligonucleotide probe) ที่ติดฉลากร่วมกับหลักการของ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) วิธีนี้เมื่อใช้หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีความไวสูงโดยสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียในระดับที่มีอัตราการติดเชื้อต่ำถึงร้อยละ 0.0001 (Oliveira et al, 1995)

2. Polymerase chain reaction (PCR) เทคนิคนี้ได้มีการคิดค้นโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1986 เป็นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากขึ้นในช่วงเวลาอันสั้น โดยอาศัยสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้นๆ เรียกว่า ไพรเมอร์ (primer) และสมบัติพิเศษของเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้กว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรสให้สูงต่ำตามความต้องการโดยไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป หลักการของปฏิกิริยานี้เป็นกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยให้มากขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์จากดีเอ็นเอต่อไป ประสิทธิภาพของการทำพีซีอาร์สามารถวัดได้จาก 3 ปัจจัย คือ ความจำเพาะ (specificity) ประสิทธิภาพ (efficiency) หรือผลผลิตที่ได้และความถูกต้องของผลผลิต (fidelity) การทำพีซีอาร์ที่ประสิทธิภาพสูง อาจหมายถึงพีซีอาร์ที่มีความจำเพาะสูงจะได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีปริมาณมากในการทำที่จำนวนรอบน้อย ส่วนพีซีอาร์ที่มีความแม่นยำสูงจะได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความผิดพลาดน้อยมาก โดยปกติการทำพีซีอาร์ที่มีความแม่นยำสูงมักส่งผลให้ผลผลิตพีซีอาร์น้อยลง หรือน้อยกว่าที่ความแม่นยำต่ำ ดังนั้นการทำพีซีอาร์จึงจำเป็นต้องทราบปัจจัยหรือตัวแปรที่สำคัญเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของการทำพีซีอาร์ ได้แก่

3.2 ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบมีผลต่อประสิทธิภาพการทำพีซีอาร์ค่อนข้างมาก ดีเอ็นเอแม่แบบ ที่คุณภาพไม่ดีพอมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอมาก จะไปแย่งจับกับแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ทำให้ เกิดผลผลิตที่น้อย หรือดีเอ็นเอปนเปื้อนตัวยับยั้ง (inhibitor) จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสทำให้ผลผลิตลดลง หรือปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอหยุดลงได้ ดังนั้น การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบจากสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจำเป็นต้องให้ความระมัดระวังต่อการ ปนเปื้อนจากดีเอ็นเออื่นๆ อย่างมาก ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ขึ้นอยู่กับ ชนิดของดีเอ็นเอ เช่น genomic DNA, complementary DNA

3.3 ไพรมเมอร์ (primers) ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5' และปลาย 3' จัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญมากในการทำพีซีอาร์ซึ่งขึ้นอยู่กับการเลือกหรือการ ออกแบบให้เหมาะสมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งมีหลักเกณฑ์ในการออกแบบไพรมเมอร์ คือ

1. มีความยาวระหว่าง 18 ถึง 24 เบส ประกอบด้วยเบสกวานีน (Guanine, G) และไซโตซีน (Cytocine, C) ประมาณร้อยละ 40 ถึง 60
2. ไม่มีโครงสร้าง internal secondary structure ในสายซึ่งทำให้เกิด การงอตัวของสายไพรมเมอร์ และการจับกันเองของเบสคู่สม ทำให้เกิดรูปร่างคล้ายกิ๊บติดผม (hairpin shape)
3. การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของไพรมเมอร์ทั้งคู่ไม่ควร มีเบสคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer dimers
4. ค่า Melting temperature (T_m) ของไพรมเมอร์ควรอยู่ในช่วง 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส และค่า T_m ของทั้งคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกัน

ความเข้มข้นของไพรมเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.6 ไมโครโมล หาก ใช้ปริมาณไพรมเมอร์มากเกินไปจะทำให้เกิดการจับกันเองของเบสคู่สมบริเวณปลาย 3' ของ นิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์ (primer dimer) และความไม่จำเพาะของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (non-specific amplified product) เพิ่มสูงขึ้น ในทางกลับกันหากใช้ไพรมเมอร์น้อยเกินไปจะทำให้ไพรมเมอร์ถูกใช้ หมดไปก่อนที่จะจํานวนวงรอบของการทำปฏิกิริยาจะสิ้นสุดลง

3.4 ดีโออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP

3.5 เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ชนิดที่สามารถกระตุ้น ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้ทั้งอุณหภูมิสูงหรือต่ำ

3.6 โคแฟกเตอร์ (co-factor) ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ได้แก่ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} ปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ซึ่งจะวนซ้ำกันใน 3 ขั้นตอนจนกว่าจะได้ ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นอย่างเพียงพอ มีขั้นตอนหลักคือ

1. การสูญเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (DNA denaturation) เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงพอที่จะทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบสูญเสียสภาพธรรมชาติโดยทำให้มีการแยกสายโพลินิวคลีโอไทด์สองสายที่พันกันเป็นเกลียวดีเอ็นเอแยกจากกันประมาณ 90 องศาเซลเซียส

2. การเข้าสู่ของสายดีเอ็นเอแม่แบบกับดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่เป็นไพรเมอร์ (Annealing) เมื่อสายดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นสายเดี่ยวแล้ว จึงมีการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าสู่ (annealing) กับสายดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองสาย โดยทั่วไปขั้นตอนนี้มีอุณหภูมิประมาณ 52 ถึง 58 องศาเซลเซียส

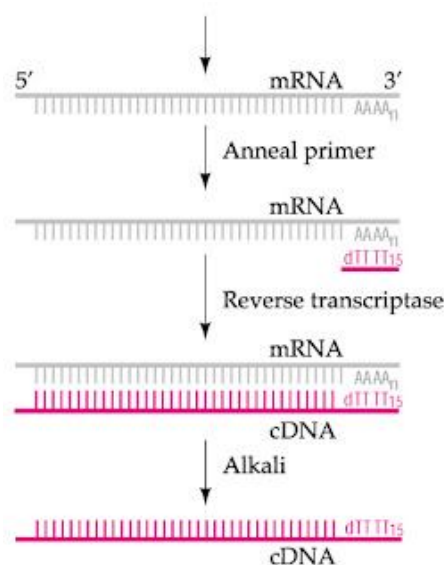
3. การต่อสายยาวของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (Extension) เมื่อไพรเมอร์เข้าสู่กับสายดีเอ็นเอแม่แบบแล้วที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระทำให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสสามารถดำเนินการต่อสายไพรเมอร์โดยเลือกใช้นิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตชนิดที่มีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ เข้าเชื่อมกับไพรเมอร์ที่ปลาย 3' โดยพันธะพอสฟอไดเอสเทอร์ ทำให้ได้โพลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ยาวขึ้นและมีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอเดิม การสังเคราะห์ทั้ง 3 ขั้นตอนจะทำซ้ำกันเป็นจำนวน 20 ถึง 45 รอบ ทำให้ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจำนวนมาก ผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ เรียกว่า Amplicon หรือ PCR product เครื่องมือที่เป็นตัวควบคุมให้เกิดปฏิกริยาดังกล่าวจะเป็นเครื่องมือที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิให้เป็นวงรอบ เรียกว่าเครื่อง Thermocycler

ปัจจุบันได้มีการเพิ่มเทคนิคเพื่อให้ความถูกต้องแม่นยำของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ เช่น การทำพีซีอาร์ 2 รอบ (Nested-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่แรกเป็นการทำพีซีอาร์ในวงกว้างเพื่อจำกัดพื้นที่ให้แคบลง จากนั้นจึงใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ซึ่งจะอยู่บริเวณคู่เบสที่แคบลงทำให้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ได้มีความแม่นยำ ถูกต้องและชัดเจนมากขึ้น

สำหรับการประยุกต์การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีพีซีอาร์เป็นวิธีที่ให้ความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยอื่นๆ โดยหลักการสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างที่มีเชื้อเพียงตัวเดียว (Snounou et al, 1993) เมื่อมีการประยุกต์การตรวจโดยทำพีซีอาร์ซ้ำ 2 ครั้งหรือ Nested PCR โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ในรอบแรกเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำพีซีอาร์ในรอบถัดไป ร่วมกับการออกแบบไพรเมอร์สำหรับพีซีอาร์ในรอบที่ 2 เพื่อให้มีความจำเพาะและครอบคลุมเชื้อมาลาเรียของคนและของลิงที่พบในคนได้ (Kimura et al, 1995) แต่วิธีพีซีอาร์ยังมีข้อจำกัด คือ สามารถตรวจสอบยีนที่เกิดขึ้นในดีเอ็นเอได้เท่านั้น และไม่สามารถตรวจสอบ

อาร์เอ็นเอได้ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาและนำเทคนิคที่สามารถตรวจสอบยีนที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอได้ เช่น เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction หรือ RT-PCR มาใช้ในการวิเคราะห์คู่กับเทคนิคพีซีอาร์

4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) ผลิตมาจากไวรัส (retroviruses) ที่นิยมใช้กัน 2 ตัว คือ Avian myeloblastosis virus (AMV) และ Moloney murine leukemia virus (MMIV) ซึ่งมีประสิทธิภาพคล้ายคลึงกัน โดยมีหลักการ คือ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากนั้นใช้เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทสเพื่อเปลี่ยน messenger ribonucleic acid (mRNA) ให้เป็นดีเอ็นเอโดยถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก mRNA (complement DNA, cDNA) เรียกว่า กระบวนการรีเวิร์สทรานสคริปชัน (reverse transcription) จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีจำเพาะกับยีน เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการจะได้สายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวนมากที่ได้มาจากสายอาร์เอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเทคนิคนี้นิยมใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาโมเลกุล (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงการสร้างสาย cDNA จากแม่แบบที่เป็น mRNA (maipoonsap.blogspot.com/2007_07_01_archive.html)

RT-PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงในยีนที่มี copy number ต่ำของโมเลกุลอาร์เอ็นเอ สามารถตรวจพบด้วยเทคนิค RT-PCR ปัจจุบันนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมของโมเลกุลอาร์เอ็นเอที่จำเพาะการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ และการวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot จะใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนของอาร์เอ็นเอต่อไป นอกจากนี้เทคนิค RT-PCR ยังมีประโยชน์มากในการแทรกยีนของเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic) เข้าไปในเซลล์โปรคาริโอต (prokaryotes) เนื่องจากยีนของเซลล์ยูคาริโอตส่วนใหญ่มีอินทรอน (introns) อยู่ในจีโนม แต่ไม่ได้อยู่ใน mRNA และ cDNA ที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งมีลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แน่นอน และจะแปลไปเป็นโปรตีนโดยตรง หลังจากการถอดรหัส เมื่อยีนเหล่านี้แสดงออกในเซลล์โปรคาริโอต เพื่อการผลิตโปรตีนที่บริสุทธิ์จากอาร์เอ็นเอที่ผ่านกระบวนการถอดรหัส (transcription) ไม่จำเป็นต้องมีกลไกในการกำจัดอินทรอน (splicing) เนื่องจากมีเพียงเอ็กซอน (exons) เท่านั้น ซึ่งการทำ RT-PCR ในรอบแรกสามารถดำเนินการได้โดยผสมทุกองค์ประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นนำมาใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermocycle) จะเริ่มเกิดปฏิกิริยา

ถึงแม้ว่า RT-PCR เป็นขั้นตอนที่มีความเรียบง่ายและสะดวก แต่ต้องระวังการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นได้ ทำให้ไม่สามารถนำยีนที่ต้องการศึกษามาทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 การปนเปื้อนดีเอ็นเอ อาจจะทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกว่าที่เกิดขึ้นจริงจาก cDNA เช่น เมื่อออกแบบไพรเมอร์จากเอ็กซอน (exons) ที่เหมือนกัน สิ่งแรกที่ต้องเตรียม คือ กระบวนการเพิ่มปริมาณ mRNA จากอาร์เอ็นเอ โดยใช้ Oligo-DT-affinity และการทำ negative control จะเป็นสิ่งที่ดีในการทดลองเพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยการเติมองค์ประกอบของปฏิกิริยาทุกตัวลงไป ในหลอดทดลองยกเว้นเอนไซม์ ใช้ cDNA เป็นแม่แบบ ซึ่งเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาผลผลิตพีซีอาร์ไม่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ แต่ถ้าผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นแสดงว่ามีดีเอ็นเอปนเปื้อนจากการทำพีซีอาร์ และถ้าไพรเมอร์ของพีซีอาร์อยู่ในตำแหน่งที่ตรงข้ามกับอินทรอนแล้ว ไม่จำเป็นต้องมีตัวควบคุมนี้ในการทดลอง

การเตรียมอาร์เอ็นเอแม่แบบให้ประสบความสำเร็จต้องมีคุณภาพสูงเพื่อลดปฏิกิริยาของเอนไซม์ RNase ซึ่งจะออกมาในช่วงระหว่างย่อยเซลล์ รวมถึงสารยับยั้ง RNase ในขั้นตอนการย่อย หรือขั้นตอนการกระตุ้นให้เซลล์แตกและยับยั้งปฏิกิริยาของ RNase ในขั้นตอนดังกล่าวซึ่งเป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อน RNase เช่น จากแก้ว พลาสติก สารเคมี ต้องใช้ผลิตภัณฑ์ที่ออกแบบมาเฉพาะสำหรับการทำให้กรดนิวคลีอิกบริสุทธิ์เพื่อเตรียมอาร์เอ็นเอแม่แบบ โดยใช้ mRNA บริสุทธิ์เป็นแม่แบบมากกว่าอาร์เอ็นเอทั้งหมด เริ่มต้นด้วยการเพิ่ม Poly-A tail จะช่วยเพิ่ม mRNA ของยีนที่หายากเนื่องจากสัดส่วนของ mRNA ในการเตรียมอาร์เอ็นเอรวมค่อนข้างต่ำ

หากใช้ mRNA เป็นแม่แบบให้ตรวจสอบความสมบูรณ์ของ mRNA โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ก่อนที่จะใช้ใน RT-PCR ซึ่งขนาดของ mRNA ที่ปรากฏอยู่ระหว่าง 500 คู่เบส และ 8 กิโลเบส

ขั้นตอนการดำเนินของเทคนิค RT-PCR สามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 การสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA จะต้องเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม เช่น ไพรเมอร์ Oligo (dT), random hexamers หรือไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (gene specific primer) สำหรับทำพีซีอาร์ เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการใช้งานที่เฉพาะเจาะจง นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาจะดำเนินภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลผลิตจากวิธี RT-PCR จะต้องมีขนาดไม่เกิน 14 กิโลเบส (ขึ้นกับความเหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้) ในขั้นตอนนี้เป็นการเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA ซึ่งมีองค์ประกอบต่างๆ เช่น แมกนีเซียม (Mg^{2+}) ความเข้มข้นของ dNTPs และไพรเมอร์ ทั้งที่จำเพาะเจาะจงหรือไม่จำเพาะเจาะจง (Oligo dT) วิธีการนี้จะเป็นประโยชน์เมื่อ cDNA มีอย่างจำกัด

เนื่องจากปฏิกิริยา RT-PCR ทั้งหมดจะถูกนำมาใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ ในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งข้อดีของการทำสองขั้นตอน คือ การทำ RT-PCR และพีซีอาร์ จะช่วยปรับสภาพการเกิดปฏิกิริยา ทั้งการเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA และการถอดรหัสดีเอ็นเอที่ดำเนินการภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้มั่นใจว่าการเพิ่มปริมาณเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและถูกต้อง ช่วยให้ผลผลิตของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์อื่นหลายๆ ยีน เป็นประโยชน์สำหรับการใช้งานโดยเฉพาะ เช่น การเพิ่มปริมาณของ cDNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ เป็นวิธีที่มีความไวสูง ช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนเนื่องจากขั้นตอนการดำเนินปฏิกิริยาจะน้อย นอกจากนี้วิธีการนี้ช่วยในการวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งสองขั้นตอน อย่างไรก็ตามปฏิกิริยา RT-PCR ในขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิที่สูง (50 ถึง 72 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะช่วยลดสิ่งแปลกปลอมและเพิ่มความจำเพาะของการเกิดปฏิกิริยาโดยการกำจัดโครงสร้าง mRNA

ข้อดีของ RT-PCR เพิ่มความไวและความจำเพาะของยีน ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อน

ขั้นตอนที่มีการปนเปื้อนของตัวอย่างด้วยวิธีพีซีอาร์ เช่น สถานที่ทดลอง สองลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาขั้นตอนเดียวให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นและมีประสิทธิภาพ ปฏิกิริยา cDNA จะดำเนินการที่อุณหภูมิสูง เพื่อขจัดโครงสร้างของอาร์เอ็นเอและตัวอย่าง cDNA ทั้งหมดจะถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการทำพีซีอาร์

5. ตรวจสอบแกมีโตไซต์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล จากการศึกษาความชุกและความหนาแน่นที่ต่ำของแกมีโตไซต์ได้มีการพัฒนาเทคนิคทางโมเลกุลเพื่อความสะดวกในการตรวจหาปริมาณและลักษณะทางพันธุกรรมของแกมีโตไซต์ ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานของการเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอที่แสดงออกเฉพาะในแกมีโตไซต์ (Babiker and Schneider, 2008; Menegon et al., 2000)

อาร์เอ็นเอจะต้องมีความจำเพาะสำหรับแกมีโตไซต์ โดยเฉพาะยีน Pfs25 ซึ่งเป็นพื้นฐานในการตรวจสอบและการหาปริมาณแกมีโตไซต์โดยวิธีการต่างๆ เช่น เทคนิค RT-PCR การเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA (complementary DNA) (Abdel-Wahab et al., 2002; Babiker and Schneider., 2008; Mlambo et al., 2008) เทคนิค quantitative nucleic acid sequence-based amplification (QT-NASBA) (Schneider et al., 2004) และเทคนิค RT loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) โดยเฉพาะยีน Pfg377 ที่มีความจำเพาะต่อแกมีโตไซต์ระยะที่ 2 ถึง 5 สามารถสังเคราะห์โปรตีนในระยะดังกล่าวได้ (Alano et al., 1995) และมีความไวที่ใกล้เคียงกับการตรวจจับแกมีโตไซต์ของยีน Pfs25 (Menegon et al., 2000) แต่มีความหลากหลายทางด้านรูปแบบ (polymorphic) มากกว่ายีน Pfs25 (Babiker and Schneider, 2008) ซึ่งยีน Pfg377 มีรูปแบบความหลากหลายแบบ Single-nucleotide และขนาดที่แตกต่างอย่างน้อย 21 ตำแหน่งของอัลลีล (Nwakanma et al., 2008) นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวจะใช้ในการจำแนกโคลนที่ผลิตแกมีโตไซต์จากการติดเชื้อเพียงชนิดเดียว (Abdel-Wahab et al., 2002) ซึ่งเทคนิคทางโมเลกุลจะมีความไวในการตรวจสอบแกมีโตไซต์ในช่วง 0.02 ถึง 0.1 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร (Schneider et al., 2006) หรือบางครั้งอาจตรวจสอบได้ 0.002 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร หรือ แกมีโตไซต์ 2 ตัวต่อ 1 มิลลิลิตร (Buates et al., 2010) ความไวของการตรวจพบจะถูกจำกัดโดยปริมาณของตัวอย่างเลือดที่เก็บรวบรวม

โดยสัดส่วนความชุกของแกมีโตไซต์จะเพิ่มขึ้นพบในประชากรที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของเชื้อ ไม่มีอาการแสดงออกของโรคมาลาเรีย และในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อที่ต่ำ อาทิในทวีปแอฟริกา ดังเช่น การศึกษาของ Shekalaghe ในประเทศแทนซาเนียและซูดานสามารถพบแกมีโตไซต์ร้อยละ 0 ถึง 6 ของประชากรโดยใช้วิธีการตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีทางโมเลกุลสามารถตรวจพบร้อยละ 12 ถึง 52 ของประชากร (Abdel-Wahab et al., 2002; Nassir et al., 2005; Shekalaghe et al., 2007) ในปีต่อมา Nwakanma ทำศึกษาในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของเชื้อที่รุนแรงมากขึ้นตามฤดูกาลในประเทศแกมเบียและประเทศบูร์กินาฟาโซพบความชุกของแกมีโตไซต์ร้อยละ 3 ถึง 30 โดยใช้วิธีการตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจพบโดยวิธีทางโมเลกุลร้อยละ 49 ถึง 70 (Nwakanma et al. 2008; Ouedraogo et al., 2007)

การติดเชื้อมาลาเรียแสดงถึงการทำให้เกิดการผลิตแกมีโตไซต์โดยจากการศึกษาของ Abdel-Wahab ทำการเปรียบเทียบอัลลีลของ Pfg377 ในเชื้อ *P. falciparum* ที่ได้จากการสกัด

อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอของเชื้อชนิดเดียวกัน พบว่ามีความผันแปรในการผลิตแกมีโตไซต์ระหว่างสายพันธุ์ (Abdel-Wahab et al., 2002) นอกจากนี้การติดเชื้อที่เรื้อรัง (chronic) และไม่มีอาการแสดงออกของโรคมาลาเรียอาจจะยังผลิตแกมีโตไซต์ในกรณีที่ไม่มียุงในช่วงฤดูแล้ง (Abdel-Wahab et al., 2002; Babiker et al., 1998; Nassir et al., 2005)

ดังเช่น Maeno และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 ทำการศึกษาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* ในเลือดคนโดยใช้วิธี RT-PCR ใช้ตัวอย่างจากเลือดที่เก็บบนกระดาษกรอง วิเคราะห์ความจำเพาะของวิธี RT-PCR โดยใช้ยีน Pfg377 ในผู้ป่วย 67 ราย จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 131 คน พบผู้ป่วยที่ให้ผลบวกของจำนวนแกมีโตไซต์น้อยที่สุด คือ 0.03 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร และอัตราส่วนของแกมีโตไซต์ที่ให้ผลบวกจะไม่ขึ้นกับ เพศ อายุ และความถี่ของการเกิดแกมีโตไซต์ นอกจากนี้ในผู้ที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เพียงชนิดเดียวจะมีจำนวนแกมีโตไซต์สูงกว่าผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียหลายชนิด ($P < 0.01$) ในการศึกษาที่พบผู้ป่วยจำนวน 47 คนจากผู้ป่วยทั้งหมด ที่ไม่แสดงอาการ พบการแสดงออกของยีน Pfg377 ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าสามารถนำวิธีการเก็บเลือดบนกระดาษกรองมาใช้ประโยชน์ทางด้านโมเลกุล ด้านระบาดวิทยา ด้านการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย และเป็นเป้าหมายในการศึกษาแกมีโตไซต์ต่อไป นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2009 Beurskens และคณะ ได้ศึกษาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบความไวในการตรวจสอบเชื้อ *P. vivax* ต่ำมาก จึงนำเทคนิค real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification (QT-NASBA) มาใช้ทดสอบหาปริมาณแกมีโตไซต์โดยใช้ยีน Pvs25 เป็นเป้าหมาย โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ทดสอบความจำเพาะในกลุ่มที่ 1 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* และ *P. ovale* โดยใช้วิธี QT-NASBA พบว่าให้ผลบวกร้อยละ 69 จาก 104 คน และในกลุ่มที่ 2 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* โดยวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบให้ผลบวกร้อยละ 8 จาก 136 คน และในกลุ่มเดียวกันแต่ตรวจสอบแกมีโตไซต์โดยใช้วิธี QT-NASBA พบความชุกของแกมีโตไซต์ร้อยละ 66 จากข้อมูลสรุปได้ว่าในคนที่มีแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* แต่ไม่แสดงอาการสามารถตรวจพบด้วยวิธี QT-NASBA ซึ่งได้ผลดีกว่าวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และสรุปได้ว่าความไวในการตรวจพบแกมีโตไซต์จากยีน Pvs25 ด้วยวิธี QT-NASBA สูงกว่าวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ประมาณ 800 เท่า

นอกจากนี้ Nakazawa และคณะ (2009) ทำการศึกษาดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียและดูความจำเพาะของ mRNA ในยุงชนิด *Anopheles dirus* ที่จับมาจากป่า โดยใช้วิธีการเก็บ

ต่อมน้ำลายยุงบนกระดากกรอง (dried mosquito salivary glands) และใช้เทคนิคพีซีอาร์ ธรรมดาในการหาข้อมูลทางโมเลกุลพบว่าสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* ได้ และต้องการตรวจสอบความจำเพาะ mRNA ของยีน Pfg377 และ pfs16 ในแกมีโตไซต์ ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. knowlesi* และศึกษาความจำเพาะของ mRNA ในยีน circumsporozoite protein (CSP) และ sporozoite surface protein 2 (SSP2) ของเชื้อ *P. vivax* โดยใช้วิธี RT-PCR ซึ่งเทคนิคนี้สามารถยืนยันการ แสดงออกของเชื้อ *P. vivax*, *P. falciparum* และ *P. knowlesi* ในยุงที่จับมา จากการศึกษารูป ได้ว่าการเก็บรักษาต่อมน้ำลายยุง ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของต่อมน้ำลายยุงไว้บนกระดากกรองได้ และผลการสกัดให้ผลดีเป็นวิธีทางโมเลกุลที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของ เชื้อมาลาเรียได้เป็นอย่างดี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study) และการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ (Objectives)

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจังหวัดตากในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความชุกของระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ในผู้ที่ติดเชื้ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2554
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโดยใช้วิธีการเก็บในหลอดที่มีสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ (RNA later) และเก็บบนกระดาษกรอง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรตัวอย่าง (Population sample) คือ ตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจากกลุ่มประชากรเป้าหมาย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส รีเวอร์ส ทรานสคริปชัน (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) คือ การเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และใช้ Oligo dT เป็น primer หลังจากนั้นใช้เอนไซม์ RNase H ย่อยสลาย mRNA ตามด้วยการทำ PCR ตามปกติ ทำให้ได้ cDNA เกลียวคู่ ซึ่งสามารถนำไปตรวจสอบยีนที่จำเพาะได้

การตรวจฟิล์มเลือดหนา (thick blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ การวินิจฉัยเชื้อ *P. vivax* จะพบระยะวงแหวน โทรโฟซอइट และแกมีโตไซต์

การตรวจฟิล์มเลือดบาง (thin blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ ซึ่งก่อนย้อมสีต้องตรึงสภาพด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ การวินิจฉัยเชื้ออาจพบระยะวงแหวน โทรโฟซอइट และแกมีโตไซต์

สารคงสภาพอาร์เอ็นเอ (RNA later) คือ สารละลายที่ปลอดภัยสำหรับใช้ในการรักษาสภาพอาร์เอ็นเอของตัวอย่างไม่ให้ถูกทำลาย

ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

ประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax*

Inclusion criteria

คือกลุ่มคนไข้ที่สงสัยว่ามีเชื้อมาลาเรียที่ศูนย์มาลาเรียในจังหวัดตากและผู้ที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีพีซีอาร์

Exclusion criteria

คือกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นที่ไม่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีพีซีอาร์

ขนาดของประชากร (Sample size)

การคำนวณตัวอย่างอาศัยข้อมูลด้านระบาดวิทยาจากรายงานประจำปี พ.ศ. 2552 ของสำนักงานโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตากร้อยละ 1.60 ดังนั้นจึงกำหนดให้

โอกาสตรวจพบแกมีโตไซต์ในผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* ในจังหวัดตาก % ($P = 0.016$)

และกำหนดให้มีค่าความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 5 % ($D = 0.05$)

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล 95 %

$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96$ (two tail)

$P =$ โอกาสตรวจพบแกมีโตไซต์ = 0.016

$Q =$ โอกาสตรวจไม่พบแกมีโตไซต์ = $1 - 0.0037 = 0.984$

$D =$ acceptable error = 0.05

$N =$ ขนาดตัวอย่าง

$$\text{สูตร } N = Z^2 \alpha_2 PQ / D^2$$

$$N = (1.96)^2 (0.016)(0.984) / (0.05)^2$$

$$N = 24 \text{ คน}$$

แต่เนื่องจากเพื่อการใช้วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องมากขึ้น จึงทำการศึกษาตัวอย่างประชากรผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* ไม่ต่ำกว่า 50 ตัวอย่าง

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดเครื่องมือ

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ
(PCR cycle รุ่น TP650)

เครื่องให้ความร้อน (Heat block) รุ่น dry thermo unit

เครื่องปั่นตกสาร (Spin down)

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

ไมโครปิเปต ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

เครื่องปั่นความเร็วสูง (Centrifuge) รุ่น MX-301

เครื่องซั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น FY-300

ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง

(High pressure steam sterilizer รุ่น ES-315)

เครื่อง Molecular Image Gel Doc XR &

ChemiDoc XRS system

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง

กล้องถ่ายภาพดิจิทัล

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

บริษัทผู้ผลิต

TAKARA, JAPAN

JAPAN

Prouge 6K, KOREA

EPPENDORF, U.S.A.

TOMY, JAPAN

DIETHELM&CO.,LTD, JAPAN

ENGLAND

MUPID-EXU, JAPAN

TOMY, JAPAN

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

SCHOTT, GERMANY

OLYMPUS, JAPAN

OLYMPUS, JAPAN

Hitachi, JAPAN

BRANDT, ENGLAND

PUFFER HUBBARD, U.S.A.

วัสดุและอุปกรณ์

หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิดปลอดเอนไซม์ Ribonuclease (microtube)

ขนาด 0.2, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร

ปิเปตต์ทิพ (pipette tip) ขนาด 10, 100, 1,000 ไมโครลิตร

ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

กระบอกฉีดน้ำ

บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

กระจกสไลด์ ขนาด 2.5 x 7.5 เซนติเมตร

ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมีขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

แท่งแก้วสำหรับคนสาร

ปากคีบ (forceps)

เข็มนัดสารเคมีและกระดาษขังสาร

แม่เหล็ก (magnetic) สำหรับผสมสาร

กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง

นาฬิกาจับเวลา

พาราฟิล์ม

ถุงมือยางไม่มีแป้ง

ถุงพลาสติก

ปากกาเขียนเครื่องหมาย

เคมีภัณฑ์ : รายชื่อสารเคมีและแหล่งที่มา

ชื่อสารเคมี

บริษัทผู้ผลิต

Agarose powder	1 st BASE, SINGAPORE
50 bp DNA ladder (Maker VI)	FERMENTAS, U.S.A.
Boric acid	Sigma
Bromophenol blue dye	PHARMACIA, SEWEDEN
Cleaning solution	ICN Biomedicals
Double distilled water	MERCK, GERMANY
Ethanol (absolute)	MERCK, GERMANY
Ethidium bromide solution	BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	PROMEGA, U.S.A.
<i>Ex-Taq</i> DNA polymerase	TaKaRa, Japan
Giemsa stain	MERCK, GERMANY
InnuPREP Blood DNA Mini Kit	Analytik jena, GERMANY
Methanol (absolute)	MERCK, GERMANY
QIAamp RNA blood mini kit	QIAGEN, GERMANY
RNA ^{later} TM	Ambion, USA
RT-PCR kit (AMV) version 3	TaKaRa, Japan
Tris Base (molecular biology grade)	PROMEGA, U.S.A.
Tris-EDTA buffer solution	FLUKA, SWITZERLAND
Whatman 3M paper	BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.
Xylene	MERCK, GERMANY

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาลาเรียอายุตั้งแต่ 7 ปีขึ้นไป ในพื้นที่จังหวัดตากในช่วงฤดูฝน และช่วงฤดูแล้งตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 โดยทำการซักประวัติผู้ป่วย เช่น เพศ อายุ เชื้อชาติ ภูมิลำเนา อาการ และประวัติการรักษา จำนวนผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* ไม่ต่ำกว่า 50 ตัวอย่าง ทำการเจาะเลือดเฉพาะรายที่ผลตรวจฟิล์มเลือดให้ผลบวก โดยเจาะบริเวณหลอดเลือดดำที่แขนของผู้ป่วยโดยแพทย์หรือนักเทคนิคการแพทย์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งเก็บใส่หลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (Ethylene diamine tetra acetic acid, EDTA) และหยดเลือดบนแผ่นกระดาษกรอง (Whatman filter paper) ประมาณ 100 ไมโครลิตร และประมาณ 100 ไมโครลิตรเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ (RNA later) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำเลือดที่เก็บใส่หลอดที่มีสารคงสภาพอาร์เอ็นเอเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจหาเชื้อ *P. vivax* โดยผู้เชี่ยวชาญ ด้วยวิธีฟิล์มเลือดหนาและฟิล์มเลือดบางซึ่งย้อมด้วยสียิมซ่าเพื่อประเมินความหนาแน่นของแกมีโตไซต์และความหนาแน่นของเชื้อในแต่ละตัวอย่าง

2. การตรวจเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มเลือด

2.1 วิธีการตรวจฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film) การย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนามีวิธีคล้ายกับการย้อมฟิล์มเลือดชนิดบาง แต่ไม่มีขั้นตอนการตรึงด้วย absolute methanol เนื่องจากต้องการให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในระหว่างการย้อม ซึ่งมีขั้นตอน คือ หยดเลือดประมาณ 3 ถึง 5 ไมโครลิตร ลงที่จุดศูนย์กลางของสไลด์ ทำการเกลี่ยเลือดให้เป็นวงโดยใช้มุมของสไลด์เปล่าเกลี่ยหยดเลือดออกเป็นวงกลมให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 ถึง 2 เซนติเมตร โดยต้องเกลี่ยเลือดไม่ให้หนาจนเกินไปเมื่อเลือดแห้งสนิทแล้วจึงนำไปย้อมด้วยสียิมซ่าในอัตราส่วนเช่นเดียวกับวิธีการย้อมสีชนิดบาง ซึ่งต้องระวังไม่ให้ฟิล์มเลือดนั้นหนามากจนเกินไป เพราะจะทำให้การติดสีไม่ดี และอาจหลุดลอกออกจากสไลด์ในขั้นตอนการย้อมสี แต่ถ้าฟิล์มเลือดบางเกินไปจะทำให้เสียเวลาในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการนับจำนวนเชื้อ ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (objective lens 40x) เลื่อนหาเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แล้วเปลี่ยนกำลังขยายเป็น 100 เท่า (objective lens 100x) นับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว 200 ตัว แล้วสามารถคำนวณหาเชื้อต่อเลือด 1 มิลลิลิตร โดยค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 เซลล์ต่อเลือด 1 ไมโครลิตร

วิธีการประเมินจากฟิล์มเลือดชนิดหนา

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้} \times \text{ค่าเฉลี่ยเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับได้}}$$

ตัวอย่าง เช่น นับจำนวนเชื้อมาลาเรียในแต่ละวงกลองพบจำนวนเชื้อมาลาเรีย 25 ตัวต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว 200 ตัว ถ้าประมาณว่าเลือด 1 ไมโครลิตร มีเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยประมาณ 8,000 ตัว ดังนั้นความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในเลือด มีจำนวนประมาณ 1,000 ตัวต่อ 1 ไมโครลิตร

2.2 วิธีการตรวจฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin blood film) หยดเลือดประมาณ 3-5 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด โดยหยดเลือดอยู่ห่างจากปลายด้านหนึ่งของสไลด์ ทำการไถเลือดที่หยดไว้ด้วยปลายสไลด์อีกแผ่นหนึ่งที่มีขอบเรียบโดยแตะปลายสไลด์ตัวไถทำมุมกับหยดเลือดประมาณ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส เลื่อนสไลด์ตัวไถถอยหลังเล็กน้อยให้ขอบด้านหนึ่งแตะกับหยดเลือด แล้วเลื่อนสไลด์ตัวไถไปในทิศทางตรงข้ามกับหยดเลือดให้สุดแผ่นสไลด์ด้วยความเร็วต่อเนื่องอย่าให้สะดุด ปล่อยให้ฟิล์มเลือดแห้งสนิท แล้วนำไปตรึงด้วย absolute methanol เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสไลด์ให้แห้งสนิทเพื่อป้องกันเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกและคงสภาพให้เชื้อไม่หลุดออกจากสไลด์ขณะทำการย้อม แล้วนำไปย้อมด้วยสียิมซาต่อไป

วิธีการนับจำนวนเชื้อ ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เลื่อนหาบริเวณที่เซลล์เม็ดเลือดแดงมีการกระจายตัวสม่ำเสมอและเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว โดยปกติแล้วจะพบในบริเวณส่วนปลายของฟิล์มเลือด จากนั้นเปลี่ยนกำลังขยายเป็น 100 เท่า นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบใน 3 วงกลอง คำนวณหาจำนวนวงกลองที่จะพบเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ แล้วนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ โดยนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียที่พบในวงกลองเท่ากับจำนวนวงกลองที่คำนวณได้แล้ว คำนวณเป็นค่าร้อยละ

วิธีการประเมินจากฟิล์มเลือดชนิดบาง

ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย = $\frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ} \times \text{จำนวนเม็ดเลือดแดงในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงต่อ 1 วงกล้อง} \times \text{จำนวนวงกล้อง}}$

(ค่าเฉลี่ยเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากับ 5×10^6 ตัว) ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงในวงกล้อง 3 วงกล้องได้เท่ากับ 990 เซลล์ จำนวนวงกล้องที่จะพบเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์เท่ากับ $10,000 \times 3/990$ เท่ากับ 30 วงกล้อง ดังนั้นจะต้องนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อที่พบใน 30 วงกล้อง ตัวอย่างเช่น นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเท่ากับ 50 เซลล์ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 10,000 เซลล์ คิดเป็นอัตราการติดเชื้อในเลือดของผู้ป่วยรายนี้เท่ากับร้อยละ 0.50

3. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

1. ทำการสกัดโดยใช้ ชุดสกัดดีเอ็นเอ innuPREP Blood DNA Mini Kit โดยนำเลือดตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร มาเติมน้ำกลั่นให้ครบ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติม BLB buffer 300 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
2. เติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที
3. นำหลอดที่ปั่นไว้มาเติม SBS buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. ดูดสารละลายในหลอด ใส่ลงใน Spin Filter Column แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงนำ Spin Filter Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
5. ล้างดีเอ็นเอด้วย AS buffer 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ Spin Filter Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
6. เติม MS buffer 650 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกรอบ
7. จากนั้นจึงนำ Spin Filter Column มาใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด

1.5 มิลลิลิตร ที่ตัดฝาออก นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

8. นำ Spin Filter Column มาใส่ใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

9. คูดดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดกลาง 0.5 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นตัวเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับทำพีซีอาร์ (PCR) ต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Amplification)

ไพรเมอร์อ้างอิงจากงานวิจัยของ Putaporntip และคณะ (2009) คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ สำหรับแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียในยีน small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) ด้วยวิธี nested-PCR

ไพรเมอร์คู่นอก Forward primer M18SFO:
(inter-species primers) 5'-CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGG-3'

Reverse primer M18SRO:
5'-TGTTGTTGCCTTAACTTCCTTG-3'

Size 600 bp

ไพรเมอร์คู่ใน PF18SF - PF18SR, PV18SF - PV18SR, PM18SF - PM18SR,
(species-specific primers) PO18SF - PO18SR, PK18SF - PK18SR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาใช้เป็นแม่แบบเพื่อทำพีซีอาร์รอบแรกโดยมีองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด (PCR reaction mixture) ในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.2 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

DNA template	2.00	ไมโครลิตร
Forward primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล	1.00	ไมโครลิตร
Reverse primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล (M18SF0 และ M18SR0)	1.00	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	2.00	ไมโครลิตร

dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.40	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.10	ไมโครลิตร
double distilled water	13.50	ไมโครลิตร

ส่วนประกอบทั้งหมดนี้เรียกว่า PCR reaction mixture จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของการทำพีซีอาร์ไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอนทำให้ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 0.3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 0.3 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ จนถึงขั้นตอนการสังเคราะห์ขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำมาตรวจจสอบผลผลิต (PCR product) โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ด้วยอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบสอง (nested PCR) มีองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด (PCR reaction mixture) ในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ขนาด 0.2 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

DNA template (รอบแรก)	2.00	ไมโครลิตร
Forward primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล	1.00	ไมโครลิตร
Reverse primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล	1.00	ไมโครลิตร

(PF18SF และ PF18SR), (PV18SF และ PV18SR), (PK18SF และ PK18SR), (PO18SF และ PO18SR), (PM18SF และ PM18SR)

10X PCR Buffer	2.00	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.40	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.10	ไมโครลิตร
double distilled water	13.50	ไมโครลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอนทำให้ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 0.3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 0.3 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ จนกระทั่งการสังเคราะห์ขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำมาตรวจจสอบผลผลิต (PCR product) โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจลเข้มข้นร้อยละ 2

5. การตรวจผลผลิตพีซีอาร์ โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการศึกษากรดนิวคลีอิกปริมาณเล็กน้อย นำมาศึกษาโครงสร้างขนาดและปริมาณของกรดนิวคลีอิกที่มีความยาวที่เหมาะสม โดยอาศัยคุณสมบัติโครงสร้างทางเคมีของกรดนิวคลีอิกที่มีองค์ประกอบของหมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นประจุลบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะมีการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปหาขั้วบวก โดยอาศัยอะกาโรสเจลเป็นตัวกลางในการแยกขนาดของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ขณะที่เคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ซึ่งมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน 1X TBE (Tris, Borate, EDTA) จากนั้นนำเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่เติมสารละลาย TBE ปริมาณ 400 มิลลิลิตร ซึ่งใช้ TBE ต่อ น้ำ ในอัตราส่วน 9:1 ในปริมาตร 400 มิลลิลิตร เพื่อให้ปริมาตรของสารละลาย TBE ท่วมผิวหน้าเจล ประมาณ 1 เซนติเมตร นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เตรียมไว้ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตหยอดลงในหลุมเจล ซึ่งใช้ Ladder 50 คู่เบส เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด เพื่อเปรียบเทียบขนาดโดยประมาณของดีเอ็นเอที่ศึกษา ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งสีของ loading dye เคลื่อนไปได้ 2 ใน 3 ส่วนของเจล นำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide, EtBr) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจากแหล่งกำเนิดแสง (UV transilluminator) และบันทึกภาพไว้เพื่อนำมาวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอบอกขนาด

6. การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA Extraction)

ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

1. ทำการสกัดโดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ QIAamp RNA blood mini kit ของยี่ห้อ QIAGEN โดยนำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีเชื้อ *P. vivax* มา 100 ไมโครลิตร เติม EL buffer 5 เท่าของเลือดตัวอย่างที่ต้องการเติม ผสมให้เข้ากัน
2. นำหลอดที่เก็บตัวอย่างเลือดไว้มาแช่บนน้ำแข็งประมาณ 10 ถึง 15 นาที และผสมสารละลายและเลือดให้เข้ากันประมาณ 2 ครั้ง ในระหว่างแช่หลอดในน้ำแข็ง

3. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลายใส่ส่วนบนออก
 4. เติม EL buffer ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเลือดที่ใช้ในข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน
 5. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลายใส่ส่วนบนออก
 6. เติม RLT buffer 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
 7. ดูดสารละลายที่ได้จากหลอด ใส่ใน QIAshredder spin column ที่มี collection tube นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ QIAshredder spin column ออก
 8. เติม 70% ethanol 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
 9. ดูดสารละลายที่ได้ ใส่ใน QIAamp spin column ใหม่ นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที
 10. นำ QIAamp spin column มาใส่ collection tube หลอดใหม่ จากนั้นทำการล้างด้วย RW1 buffer 700 ไมโครลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที
 11. นำ QIAamp spin column มาใส่ collection tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม RPE buffer 500 ไมโครลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที
 12. เติม RPE buffer 500 ไมโครลิตร และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
 13. นำ QIAamp spin column มาใส่ collection tube หลอดใหม่ นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
 14. นำ QIAamp spin column มาใส่หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม RNase-free water 30 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
 15. จากนั้นดูดสารละลาย mRNA ที่สกัดได้ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้เป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบ (RNA template) สำหรับทำ reverse transcription ต่อไป หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- หมายเหตุ: การสกัดอาร์เอ็นเอต้องทำในสภาวะที่ปลอด RNase

7. การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA (cDNA synthesis)

ทำการสังเคราะห์ mRNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ชุด RT-PCR kit (AMV) version 3 ของยี่ห้อ TaKaRa โดยเตรียมองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ cDNA โดยกำหนดปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร ในหลอด microtube ซึ่งประกอบด้วย

1. Oligo dT-Adaptor primer ความเข้มข้น 2.5 pmol ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
2. dNTP Mixture ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร
3. 10X RT buffer ความเข้มข้น 20 pmol ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร
4. $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมล ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร
5. AMV Reverse Transcriptase XL ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
6. RNase Inhibitor ความเข้มข้น 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร
7. Template RNA ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร
8. RNase free dH_2O ปริมาตร 2.75 ไมโครลิตร
9. ผสม mixture ในหลอดทดลองขนาด 0.2 ไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 30, 42, 99 และ 5 องศาเซลเซียส บ่มในแต่ละอุณหภูมิเป็นเวลา 10, 30, 5 และ 5 นาที ตามลำดับ เมื่อครบเวลานำมาแช่บนน้ำแข็งทันที

8. การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) สำหรับใช้เป็น PCR primers

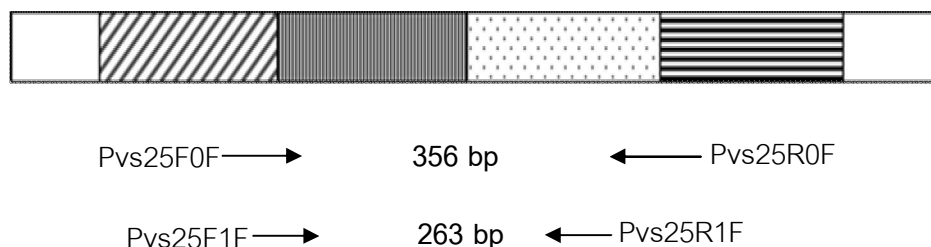
ทำการออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอต้นแบบของยีน Pvs25 จาก Genbank Data base accesses number GU256271, AY639972, AF083502 และ EU810766 คัดเลือกบริเวณที่เหมาะสม แล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยเลือกบริเวณ conserved region ของยีน Pvs25 ทั้งด้านปลาย 5' และด้านปลาย 3' ขึ้นอยู่กับการเลือกหรือการออกแบบให้เหมาะสมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ ซึ่งมีหลักเกณฑ์ในการออกแบบไพรเมอร์ คือ

1. มีความยาวระหว่าง 18 ถึง 24 เบส ประกอบด้วยเบสกวีนีน (Guanine, G) และไซโตซีน (Cytocine, C) ประมาณร้อยละ 40 ถึง 60
2. ไม่มีโครงสร้าง internal secondary structure ในสายซึ่งทำให้เกิดการงอตัวของสายไพรเมอร์ และการจับกันเองของเบสคู่สม ทำให้เกิดรูปร่างคล้ายกิ๊ฟติดผม (hairpin shape)

3. การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ทั้งคู่ไม่ควรมีเบสคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer dimers

4. ค่า Melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์ควรอยู่ในช่วง 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส และค่า Tm ของทั้งคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกัน

ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.6 ไมโครโมล หากใช้ปริมาณไพรเมอร์มากเกินไปจะทำให้เกิดการจับกันเองของเบสคู่สมบริเวณปลาย 3' ของนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (primer dimer) และความไม่จำเพาะของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (non-specific amplified product) เพิ่มสูงขึ้น ในทางกลับกันหากใช้ไพรเมอร์น้อยเกินไปจะทำให้ไพรเมอร์ถูกใช้หมดไปก่อนที่จำนวนวงรอบของการทำปฏิกิริยาจะสิ้นสุดลง



ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

การออกแบบ Primer โดยค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแกมิโตไซตีในเชื้อ *P. vivax* (*Pvs25*) จากฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) หมายเลข GU256271, AY639972, AF083502 และ EU810766 เป็นต้นแบบซึ่งไม่ตรงกับเชื้อชนิดอื่นใดในฐานข้อมูล (ภาพที่ 13)

Pvs25F0F: 5'-TAAGTGATGTGTAACGAAGGG-3' (22 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 126 ถึง 147 ใน *Pvs25* ของ *P. vivax*)

Pvs25R0F: 5'-ATTGACAAGCAGTTTCTCCC-3' (20 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 463 ถึง 482 ใน *Pvs25* ของ *P. vivax*)

Pvs25F1F: 5'-CTTTCCGAAAA ACATGTGAAG-3' (22 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 157 ถึง 178 ใน *Pvs25* ของ *P. vivax*)

Pvs25R1F: 5'-CCAATAGCACATGAGCAACCT-3' (21 เบส) (ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 400 ถึง 420 ใน *Pvs25* ของ *P. vivax*)

9. การเพิ่มปริมาณ cDNA (complimentary DNA Amplification)

การเพิ่มปริมาณ cDNA ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยนำ cDNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบเพื่อทำพีซีอาร์รอบแรกโดยมีองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด (PCR reaction mixture) ในปริมาตรสุทธิ 15 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.2 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

cDNA template	1.00	ไมโครลิตร
Forward primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล	0.0975	ไมโครลิตร
Reverse primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล (PVS25F0F และ PVS25R0F)	0.0975	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	1.50	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.20	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.075	ไมโครลิตร
double distilled water	11.03	ไมโครลิตร

ส่วนประกอบทั้งหมดนี้เรียกว่า PCR reaction mixture จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของการทำพีซีอาร์ไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอนทำให้ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส 0.3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 0.3 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จนกระทั่งการสังเคราะห์ขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำมาตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจลเข้มข้นร้อยละ 2

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในรอบสอง (nested PCR) มีองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด (PCR reaction mixture) ในปริมาตรสุทธิ 15 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.2 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

DNA template (รอบแรก)	1.00	ไมโครลิตร
Forward primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล	0.0975	ไมโครลิตร
Reverse primer ความเข้มข้น 30 พิโคโมล (PVS25F1F และ PVS25R1F)	0.0975	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	1.50	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	1.20	ไมโครลิตร

Taq DNA polymerase	0.075	ไมโครลิตร
double distilled water	11.03	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วย ขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอแยกสายที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอนทำให้ไพรเมอร์ จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส 0.3 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์ สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 0.3 นาที ซึ่งทำปฏิกิริยาทั้งหมด 25 รอบ จนกระทั่ง การสังเคราะห์ขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำมา ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจลเข้มข้นร้อยละ 2

10. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. ทำการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น เพศ เชื้อชาติ ประวัติการเป็นมาลาเรียและอาการสำคัญวิเคราะห์ในรูปแบบของควมถี่ ร้อยละ ส่วนลักษณะข้อมูลทั่วไปที่เป็นเชิงปริมาณ เช่น อายุ จำนวนครั้งที่เป็นมาลาเรีย อุณหภูมิร่างกาย
2. เก็บรวบรวมข้อมูลชนิดและความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย โดยวิธีการตรวจสอบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากฟิล์มเลือดชนิดหนาและชนิดบาง
3. ตรวจวินิจฉัยความหนาแน่นของระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ในตัวอย่างเลือด โดยวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากฟิล์มเลือดชนิดหนาและชนิดบาง
4. เก็บรวบรวมข้อมูลชนิดของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจากการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยอ่านผลจากภาพถ่ายแถบดีเอ็นเอ
5. เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการตรวจวินิจฉัยระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ในตัวอย่างเลือด โดยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับผลการตรวจจากจากฟิล์มเลือดและประเมิน ที่ให้ความไวสูง
6. ความไว (sensitivity) เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่บอกถึงอัตราส่วนของผลบวกในการตรวจผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax*
7. ความจำเพาะ (specificity) เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยระยะแกมีโตไซต์ของ เชื้อ *P. vivax* ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่บอกถึงอัตราส่วนของผลลบในการตรวจคนปกติ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ลักษณะทั่วไป และข้อมูลทางคลินิกของประชากรตัวอย่าง

การศึกษาในครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 2 ครั้ง คือ ช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน ของจำนวนตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อ *P. vivax* จากผู้ป่วยที่มารับการรักษามาลาเรียคลินิกใน จังหวัดตาก ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ในช่วงฤดูฝน จำนวน 49 ราย และในช่วงฤดูแล้งในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2554 จำนวน 57 ราย รวมทั้งหมด 106 ราย ประกอบด้วยตัวอย่างผู้ป่วยเพศชาย 65 ราย คิดเป็นร้อยละ 61.32 และ เพศหญิงจำนวน 41 ราย คิดเป็นร้อยละ 38.68 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ประชากรที่ศึกษามี อายุตั้งแต่ 7 ถึง 51 ปี มีอายุเฉลี่ย 16.39 ปี ช่วงอายุที่มีจำนวนตัวอย่างมากที่สุดคือ 11 ถึง 20 ปี มีจำนวน 38 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.85 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ประชากรที่ศึกษาส่วนใหญ่ มีเชื้อชาติพม่ามากที่สุด จำนวน 91 คน คิดเป็นร้อยละ 85.85 ส่วนที่เหลือเป็นประชากรที่มี เชื้อชาติไทย จำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 14.15 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ประชากรที่ศึกษา มีช่วงอุณหภูมिर่างกายตั้งแต่ 34 ถึง 39.7 องศาเซลเซียส อุณหภูมिर่างกายเฉลี่ยประมาณ 36.22 องศาเซลเซียส มีอาการไข้ก่อนมารับการตรวจเลือด 1 วัน คิดเป็นร้อยละ 100 และใน ประชากรที่ถูกวินิจฉัยว่าติดเชื้อ *P. vivax* จากศูนย์มาลาเรียคลินิกของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคมาลาเรีย

	ข้อมูล	จำนวน	ร้อยละ
1. เพศ			
	ชาย	65	61.32
	หญิง	41	38.68
2. อายุ (ปี)			
	7 - 10	35	33.02
	11 - 20	38	35.85
	21 - 30	22	20.75
	31 - 40	6	5.66
	41 - 50	3	2.83
	51 - 60	2	1.89
3. เชื้อชาติ			
	ไทย	15	14.15
	พม่า	91	85.85
4. คุณหม้อมีร่างกาย (องศาเซลเซียส)			
	34.00 - 35.00	26	24.53
	35.01 - 36.00	23	21.70
	36.01 - 37.00	33	31.13
	37.01 - 38.00	13	12.26
	38.01 - 39.00	10	9.43
	39.01 - 40.00	1	0.95
5. จำนวนวันที่เป็นไข้			
	1 วัน	106	100

ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *P. vivax* จากมาลาเรียคลินิกในจังหวัดตาก จากแผ่นฟิล์มเลือดที่ ย้อมด้วยสียิมซ่าในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน โดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าผลการ วินิจฉัยสามารถตรวจพบตัวอย่างเชื้อ *P. vivax* จำนวน 92 ราย จากตัวอย่างประชากรทั้งหมด 106 ราย คิดเป็นร้อยละ 86.79 และตัวอย่างประชากรที่สงสัยว่ามีเชื้อมาลาเรียอีกจำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 13.21 (ตารางที่ 2) มีอัตราความหนาแน่นของเชื้อตั้งแต่ 40 - 225,560 ตัวต่อ ไมโครลิตร ซึ่งพบระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อ เช่น ระยะวงแหวน (ring stage) ระยะ growing trophozoite ระยะ early schizont ระยะ developing schizont ระยะ mature schizont ส่วนระยะ free merozoites พบแค่ 2 ราย ของประชากรที่ติดเชื้อ *P. vivax* จำนวน 92 ราย และตรวจไม่พบเชื้อ *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* จาก แผ่นฟิล์มเลือด

ตารางที่ 2 แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *P. vivax* จากฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (จำนวนตัวอย่าง N = 106)

ชนิดของเชื้อ	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบเชื้อ (ร้อยละ)
<i>P. vivax</i>	92	86.79
Negative	14	13.21
รวม	106	100

ผลการตรวจหาแกมีโตไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากแผ่นฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน โดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากประชากรที่ติดเชื้อ *P. vivax* ซึ่ง ในช่วงฤดูฝนตรวจพบระยะแกมีโตไซต์จำนวน 22 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.38 และตรวจไม่พบระยะ ดังกล่าวจำนวน 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.62 ของประชากรที่ติดเชื้อจำนวน 42 ราย และในช่วง ฤดูแล้งตรวจพบระยะแกมีโตไซต์จำนวน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 56 และตรวจไม่พบจำนวน

22 ราย คิดเป็นร้อยละ 44 ของประชากรจำนวน 50 ราย ซึ่งจากการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ทั้ง 2 ฤดูกาล พบประชากรที่มีระยะแกมีโตไซต์ในกระแสเลือดจำนวน 50 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.35 และตรวจไม่พบจำนวน 42 ราย คิดเป็นร้อยละ 45.66 ของประชากรที่ติดเชื้อ *P. vivax* จำนวน 92 ราย (ตารางที่ 3) และมีอัตราความหนาแน่นของระยะแกมีโตไซต์ตั้งแต่ 7 - 621 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร

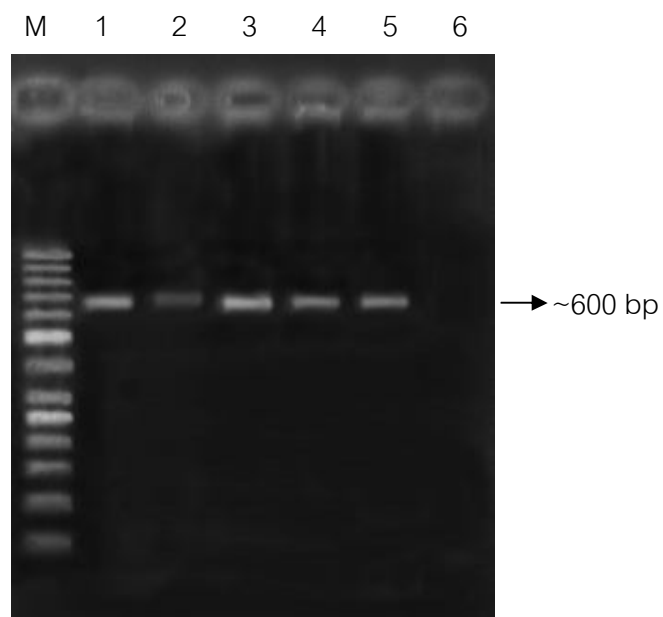
ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจหาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง จากฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซ่า

เชื้อ <i>P. vivax</i>	ฤดูฝน (N = 42)		ฤดูแล้ง (N = 50)		รวม (N = 92)	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
แกมีโตไซต์	22	52.38	28	56	50	54.34
ระยะอื่นๆ	20	47.62	22	44	42	45.66
รวม	42	100	50	100	106	100

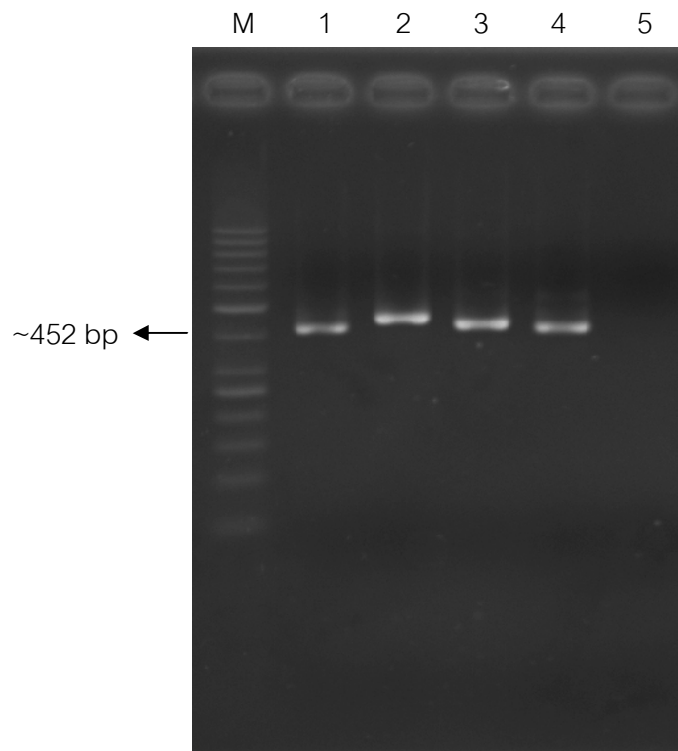
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับแยกชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ผลการศึกษาเพื่อตรวจหาเชื้อ *P. vivax* จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนขงยีน small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* จากการทำพีซีอาร์รอบที่ 2 (nested PCR) วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากตัวอย่างเลือดจำนวน 106 ตัวอย่างด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาด คือ ladder 50 คู่เบส พบว่าผลพีซีอาร์บวกของเชื้อมาลาเรียจากไพรเมอร์คู่นอกมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 14 และไพรเมอร์คู่นอกของเชื้อ *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* ดังภาพที่ 15 แสดงผลการตรวจของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีพีซีอาร์ จากตัวอย่างเลือดจากไพรเมอร์คู่นอกอัตราการพบเชื้อมาลาเรียจำนวน 92 ราย คิดเป็นร้อยละ 86.80 จากจำนวนผู้ป่วย 106 ราย และเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่นอกชนิดของเชื้อพบเชื้อ *P. vivax* จำนวน 77 ราย คิดเป็นร้อยละ 72.64 เชื้อ *P. falciparum* จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.94 เชื้อ *P. malariae* จำนวน 2 ราย

คิดเป็นร้อยละ 1.89 และเชื้อ *P. ovale* จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.94 นอกจากนี้พบการติดเชื้อมาร่วมกันระหว่างเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *P. vivax* จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.50 และพบการติดเชื้อมาร่วมกันระหว่างเชื้อ *P. vivax* และเชื้อ *P. malariae* จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.94 และยังพบการติดเชื้อมาร่วมกันถึง 3 ชนิดร่วมกันคือเชื้อ *P. falciparum*, *P. vivax* และ *P. malariae* จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.94 (ตารางที่ 4) และจากตัวอย่างประชากรที่สงสัยว่ามีเชื้อมาลาเรียซึ่งตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรียจำนวน 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 13.21



ภาพที่ 14 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 ของตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย จากการใช้ inter-species primers ในส่วน SSU rRNA gene ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดย M = 50 bp ladder, 1-5 = ตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย, 6 = Negative control



ภาพที่ 15 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 2 ของตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย จากการใช้ species-specific primer ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดย M = 50 bp ladder, 1 = *P. vivax*, 2 = *P. falciparum*, 3 = *P. malariae*, 4 = *P. ovale*, 5 = Negative control

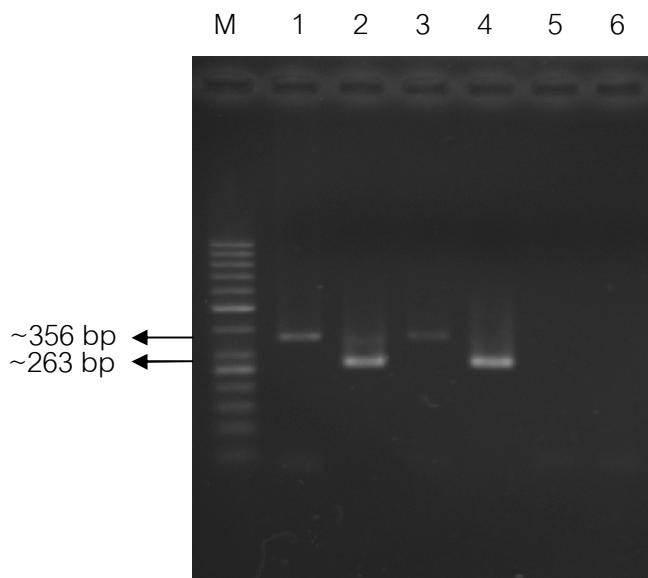
ตารางที่ 4 แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดด้วยวิธีพีซีอาร์ จากยีน SSU rRNA

ผลการวินิจฉัยด้วยวิธีพีซีอาร์	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบเชื้อ (ร้อยละ)
<i>P. vivax</i>	77	72.64
<i>P. falciparum</i>	1	0.94
<i>P. malariae</i>	2	1.89
<i>P. ovale</i>	1	0.94
<i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i>	9	8.5
<i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>	1	0.94
<i>P. vivax</i> + <i>P. malariae</i>	1	0.94
Negative	14	13.21
รวม	106	100

จากผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *P. vivax* โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ยีน SSU rRNA โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. vivax* พบจำนวนประชากรที่ติดเชื้อ *P. vivax* ทั้งที่ติดเชื้อชนิดเดียวและติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด มีจำนวน 88 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับ การดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งพบการติดเชื้อจำนวน 92 ราย ดังนั้นจึง นำตัวอย่างที่จำแนกชนิดของเชื้อ *P. vivax* โดยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 88 ราย และตัวอย่างประชากร ที่สงสัยว่ามีเชื้อมาลาเรียจำนวน 14 ราย มาทำการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์โดยใช้เทคนิค RT-PCR เพื่อศึกษาความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของเทคนิคนี้ในการ ตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ต่อไป

เปรียบเทียบความจำเพาะของไพรเมอร์ Pvs25 โดยใช้ gDNA และ cDNA

นำ gDNA ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีระยะแกมีโตไซต์ในเลือดผู้ป่วย มาทำ positive control และ cDNA ที่ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างที่มีระยะแกมีโตไซต์ มาทดสอบและใช้ gDNA จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียแต่ไม่มีระยะแกมีโตไซต์มาทำ Negative control เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน Pvs25 ที่จำเพาะต่อระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธี RT-PCR วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้กะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ ladder 50 คู่เบส พบว่า gDNA และ cDNA ที่ใช้เป็น positive control ให้ผลพีซีอาร์บวกของแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีขนาดประมาณ 356 คู่เบส และไพรเมอร์คู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F มีขนาดประมาณ 263 คู่เบส ส่วน gDNA ในผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียแต่ไม่มีระยะแกมีโตไซต์ซึ่งใช้เป็น Negative control ไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งไพรเมอร์คู่นอกและคู่ใน ดังภาพแสดงที่ 16 นอกจากนี้ นำไพรเมอร์ที่พัฒนามาทดสอบโดยใช้ gDNA ของตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ ที่มีระยะแกมีโตไซต์ ได้แก่ เชื้อ *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* ผลการทดสอบ พบว่าไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งไพรเมอร์คู่นอกและคู่ใน จากตัวอย่างของเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ

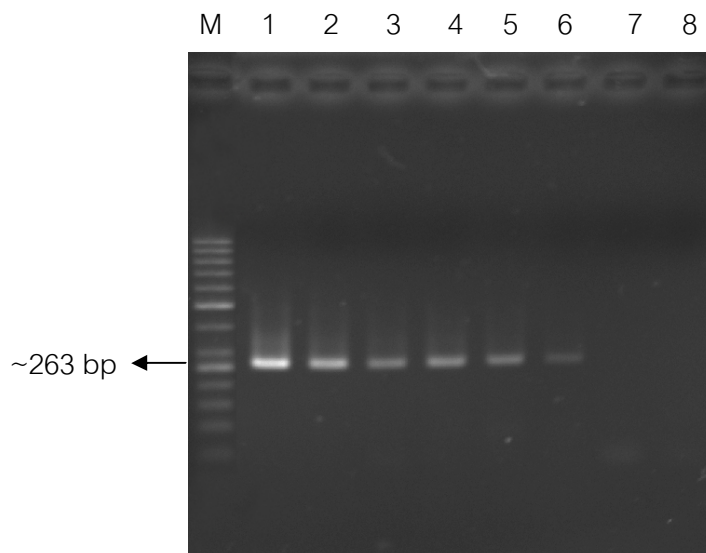


ภาพที่ 16 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 และ 2 ของ gDNA และ cDNA จากการใช้ไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F และคู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วนยีน Pvs25 ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดย M = 50 bp ladder, 1 - 2 = ผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 และ 2 ของ gDNA ที่มีระยะแกมีโตไซต์, 3 - 4 = ผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 และ 2 ของ cDNA ที่มีระยะแกมีโตไซต์, 5 - 6 = ผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 และ 2 ของ gDNA ไม่มีระยะแกมีโตไซต์

ผลการตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ Pvs25 ด้วยวิธี RT-PCR

การตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ Pvs25 โดยใช้ cDNA ที่ได้จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่มีระยะแกมีโตไซต์จำนวน 2 ตัวอย่าง มาทำ RT-PCR (เปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA) จากไพรเมอร์ Pvs25F0 (5' – ATGAACTCCTACTACAGCCTC – 3') และ Pvs25R0 (5' – TTATATGACGTACGAAGGGAC – 3') มีขนาดประมาณ 660 คู่เบส และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6.94×10^{-19} กิโลดาลตัน นำมาเจือจางที่ 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, 1 และ 0.1 copy/ μ l แล้วนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำพีซีอาร์รอบที่ 2 และ 3 ต่อไป โดยใช้ไพรเมอร์ Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีขนาดประมาณ 356 คู่เบส และไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F ขนาดประมาณ 263 คู่เบส ตามลำดับ และทดลองซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อความถูกต้องและน่าเชื่อถือของงานวิจัย ผลการตรวจสอบพบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ให้ผลบวกถึง 10 copy/ μ l และที่

1 และ 0.1 copy/ μ l ไม่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากยีน Pvs25 สามารถตรวจพบได้ที่ 10 copy/ μ l ดังภาพที่ 17



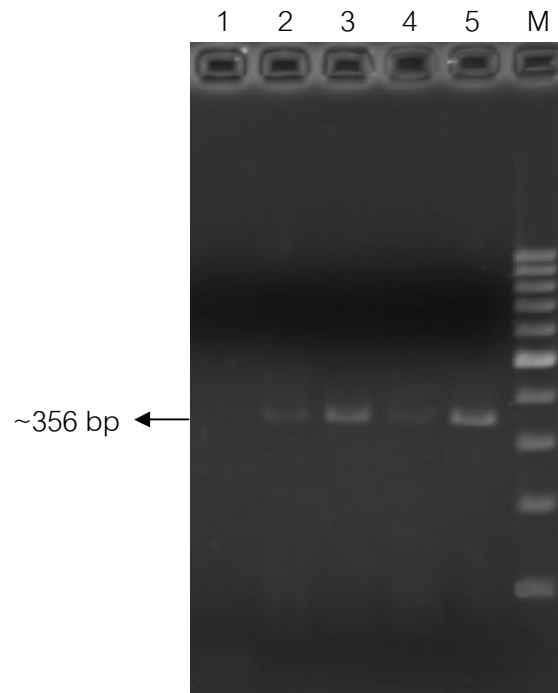
ภาพที่ 17 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 3 ของ cDNA เจือจางที่ 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, 1 และ 0.1 copy/ μ l จากไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วนยีน Pvs25 ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดย M = 50 bp ladder, 1 - 8 = ผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 3 ของ cDNA เจือจางที่ 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, 1 และ 0.1 copy/ μ l ตามลำดับ

ผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax*

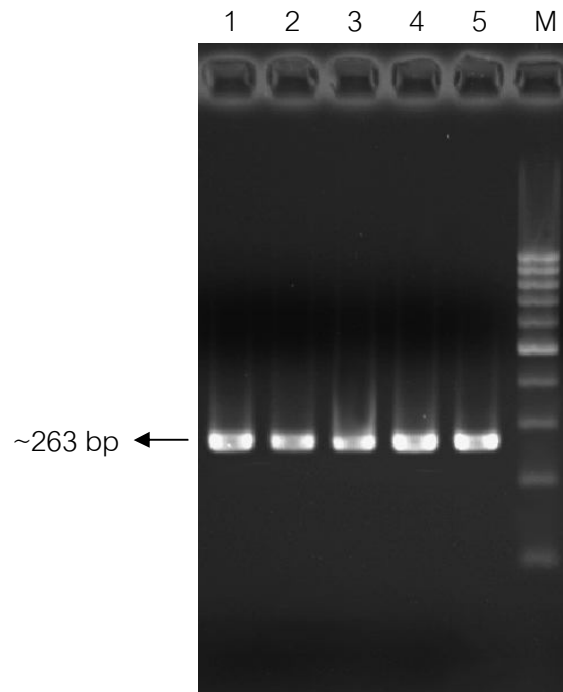
1. ผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

ผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ในตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ (RNA later) ส่วนของยีน Pvs25 โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เลส รีเวอร์สทรานสคริปชัน (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) จากการทำ nested RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อระยะดังกล่าว วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากตัวอย่างเลือด จำนวน 88 ตัวอย่าง ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ ladder

50 คู่เบส พบว่าให้ผลพีซีอาร์บวกของเชื้อ *P. vivax* จากไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีขนาดประมาณ 356 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 18 และไพรเมอร์คู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F มีขนาดประมาณ 263 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 19 ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธี RT-PCR ในรอบแรกจากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีอัตราการพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ร้อยละ 34.09 (30 ตัวอย่างจาก 88 ตัวอย่าง) และมีอัตราการพบแกมีโตไซต์เพิ่มขึ้นในรอบที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F เป็นร้อยละ 93.18 (82 ตัวอย่างจาก 88 ตัวอย่าง) ผลการตรวจพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอในระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553 ถึง มกราคม พ.ศ. 2554 อัตราการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จำนวน 82 ราย คิดเป็นร้อยละ 93.18 และไม่พบระยะดังกล่าวเป็นจำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.82 ของตัวอย่างประชากรที่ติดเชื้อ *P. vivax* ดังตารางที่ 5 และตรวจไม่พบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากประชากรที่สงสัยว่าติดเชื้อมาลาเรียทั้ง 14 ราย



ภาพที่ 18 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 ของตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและมีเชื้อ *P. vivax* จากการใช้ไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F ในส่วนยีน Pvs25 ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดย M = 100 bp ladder, 1 = Negative control, 2-5 = ตัวอย่างเลือดที่มีแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax*



ภาพที่ 19 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 2 ของตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและมีเชื้อ *P. vivax* จากการใช้ไพรเมอร์คู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วนยีน Pvs25 ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดย M = 100 bp ladder, 1-5 = ตัวอย่างเลือดที่มีแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax*

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดที่เก็บใน
 สारคองสภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

ตัวอย่างเลือดที่เก็บใน สารคองสภาพอาร์เอ็นเอ	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ (ร้อยละ)
<i>P. vivax</i>	82	93.18
Negative	6	6.82
รวม	88	100

2. ผลเปรียบเทียบการตรวจพบแกมีโตไซต์ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน

จากการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ในช่วงฤดูฝนจากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคองสภาพอาร์เอ็นเอ ส่วนของยีน Pvs25 โดยวิธี RT-PCR จากการทำ nested RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อระยะดังกล่าว วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดจำนวน 39 ตัวอย่าง ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ ladder 50 คู่เบส ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธี RT-PCR ในรอบที่ 1 จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคองสภาพอาร์เอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีอัตราการพบเชื้อร้อยละ 38.46 (15 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่าง) และมีอัตราการพบเชื้อเพิ่มขึ้นในรอบที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F เป็นร้อยละ 94.87 (37 ตัวอย่างจาก 39 ตัวอย่าง) ผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคองสภาพอาร์เอ็นเอ ในช่วงฤดูฝนทำการเก็บตัวอย่างเลือดระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2553 พบอัตราการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จำนวน 37 ราย คิดเป็นร้อยละ 94.87 และไม่พบระยะดังกล่าวเป็นจำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.13

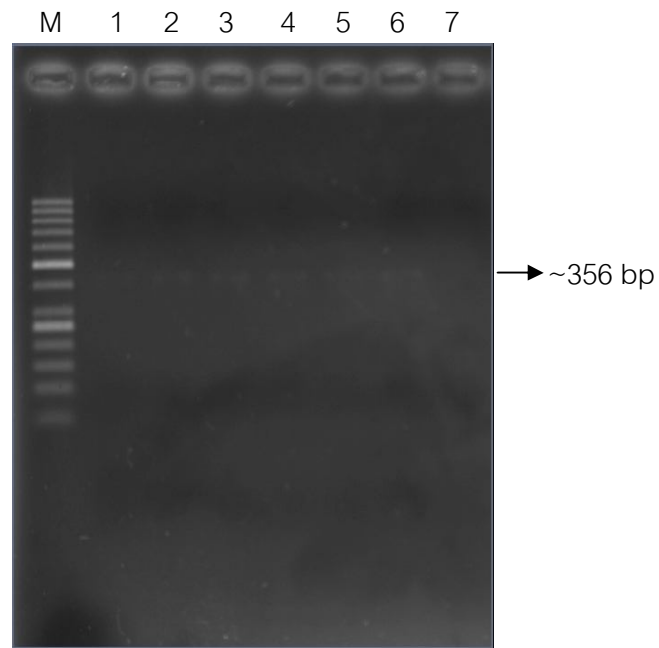
และในช่วงฤดูแล้งทำการเก็บตัวอย่างเลือดระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือน มกราคม พ.ศ. 2554 ในรอบที่ 1 จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคองสภาพอาร์เอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีอัตราการพบเชื้อร้อยละ 30.61 (15 ตัวอย่างจาก 49 ตัวอย่าง) และมีอัตราการพบเชื้อเพิ่มขึ้นในรอบที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F เป็นร้อยละ 91.84 (45 ตัวอย่างจาก 49 ตัวอย่าง) ผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี RT-PCR จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคองสภาพอาร์เอ็นเอ และไม่พบระยะดังกล่าวเป็นจำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.16 ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจหาแกมีโตไซต์ในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้งจากตัวอย่างเลือดที่เก็บใน
สารคงสภาพอาร์เอ็นเอ

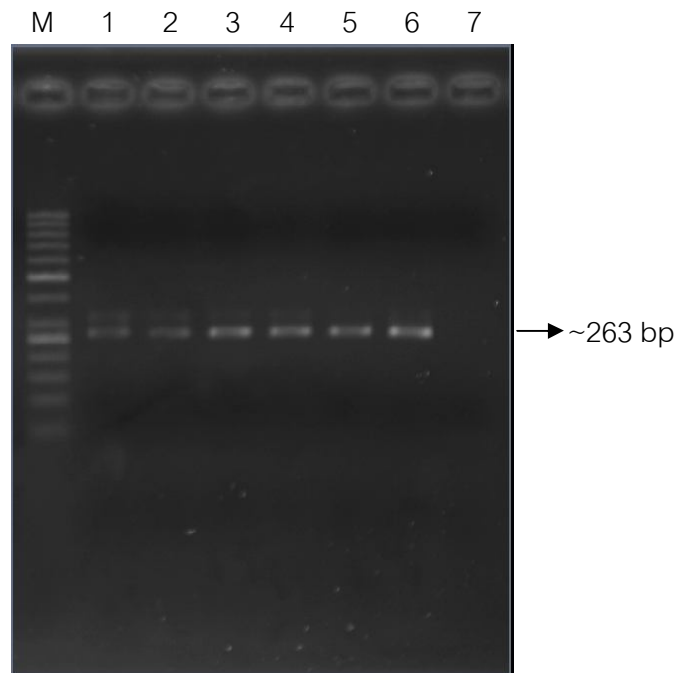
เชื้อ <i>P. vivax</i>	ฤดูฝน (N = 39)		ฤดูแล้ง (N = 49)		รวม (N = 88)	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
แกมีโตไซต์	37	94.87	45	91.84	82	93.18
Negative	2	5.13	4	8.16	6	6.82
รวม	39	100	49	100	88	100

3. ผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองด้วย วิธี RT-PCR

การตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง (Whatman filter paper) ในส่วนของยีน Pvs25 โดยวิธี RT-PCR จากการทำ nested RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อระยะดังกล่าว วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองจำนวน 88 ตัวอย่าง ด้วยวิธีเจลิอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาด คือ ladder 50 คู่เบส พบว่าให้ผลพีซีอาร์บวกของเชื้อ *P. vivax* จากไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีขนาดประมาณ 356 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 20 และไพรเมอร์คู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F มีขนาดประมาณ 263 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 21 ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธี RT-PCR ในรอบที่ 1 จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองโดยใช้ไพรเมอร์ Pvs25F0F และ Pvs25R0F มีอัตราการพบแกมีโตไซต์ร้อยละ 11.36 (10 ตัวอย่างจาก 88 ตัวอย่าง) และมีอัตราการพบระยะดังกล่าวเพิ่มขึ้นในรอบที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F เป็นร้อยละ 89.77 (79 ตัวอย่างจาก 88 ตัวอย่าง) ผลการตรวจพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองในระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553 ถึง มกราคม พ.ศ. 2554 อัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จำนวน 79 ราย คิดเป็นร้อยละ 89.77 และไม่พบระยะดังกล่าวจำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.23 ดังตารางที่ 7 และตรวจไม่พบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากประชากรที่สงสัยว่าติดเชื้อมาลาเรียทั้ง 14 ราย



ภาพที่ 20 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 1 ของตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองและมีระยะแกมมาโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากการใช้ไพรเมอร์คู่นอก Pvs25F0F และ Pvs25R0F ในส่วนยีน Pvs25 ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดย M = 50 bp ladder, 1-6 = ตัวอย่างเลือดที่มีระยะแกมมาโตไซต์เชื้อ *P. vivax*, 7 = Negative control



ภาพที่ 21 แสดงผลผลิตพีซีอาร์รอบที่ 2 ของตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองและมีระยะแกมมาโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากการใส่ไพรเมอร์คู่ใน Pvs25F1F และ Pvs25R1F ในส่วนยีน Pvs25 ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดย M = 50 bp ladder, 1-6 = ตัวอย่างเลือดที่มีระยะแกมมาโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax*, 7 = Negative control

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองด้วยวิธี RT-PCR

ตัวอย่างเลือดที่หยดบน กระดาษกรอง	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ (ร้อยละ)
<i>P. vivax</i>	79	89.77
Negative	9	10.23
รวม	88	100

เปรียบเทียบความไวของวิธีการเก็บอาร์เอ็นเอที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR

จากผลการศึกษาพบว่ามี 82 ตัวอย่างที่ใช้วิธีเก็บเลือดในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ ให้ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* และจากตัวอย่างเดียวกันแต่เก็บโดยวิธีหยดบนกระดาษกรอง (Whatman filter paper) ให้ผลการตรวจพบจำนวน 79 ตัวอย่าง จากตัวอย่างประชากร 88 ราย ที่ติดเชื้อ *P. vivax* ซึ่งให้ผลการสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาโดยพบว่าวิธีการเก็บรักษาอาร์เอ็นเอทั้งสองวิธีสามารถตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ได้ แต่ความไวในการตรวจพบระยะดังกล่าวมีความแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณเลือดที่เก็บต่างกัน ซึ่งวิธีการเก็บเลือดในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ จะเก็บเลือดประมาณ 300 ไมโครลิตร ส่วนการเก็บเลือดโดยวิธีหยดบนกระดาษกรองใช้เลือด เพียง 20 ไมโครลิตรเท่านั้นดังนั้นผลที่ได้จึงมีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากวิธีการเตรียมอาร์เอ็นเอของตัวอย่างเลือดและวิธีเก็บตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง โดยวิธี RT-PCR (N = 88 ตัวอย่าง)

วิธีการเตรียมอาร์เอ็นเอของตัวอย่างเลือด	พีซีอาร์รอบที่ 1 (First PCR)	พีซีอาร์รอบที่ 2 (Second PCR)
ตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ	Primer : Pvs25F0F, Pvs25R0F	Primer : Pvs25F1F, Pvs25R1F
Positive	30 (34.09 %)	82 (93.18 %)
Negative	58 (65.91 %)	6 (6.82 %)
รวม	88	88
ตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง	Primer : Pvs25F0F, Pvs25R0F	Primer : Pvs25F1F, Pvs25R1F
Positive	10 (11.36 %)	79 (89.77 %)
Negative	78 (88.64 %)	9 (10.23 %)
รวม (จำนวนตัวอย่าง)	88	88

ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือด (ตารางที่ 8) โดยวิธีการเก็บเลือดในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ ให้ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากไพรเมอร์ Pvs25F0F และ Pvs25R0F ด้วยวิธี RT-PCR รอบที่ 1 ร้อยละ 34.09 (30 ตัวอย่าง) และให้ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F ด้วยวิธี RT-PCR รอบที่ 2 ร้อยละ 93.18 (82 ตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองให้ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากไพรเมอร์ Pvs25F0F และ Pvs25R0F ด้วยวิธี RT-PCR รอบที่ 1 ร้อยละ 11.36 (10 ตัวอย่าง) และให้ผลการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F ด้วยวิธี RT-PCR รอบที่ 2 ร้อยละ 89.77 (79 ตัวอย่าง)

เปรียบเทียบความไวของการตรวจหาแกมีโตไซต์ด้วยวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี RT-PCR

จากผลการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของประชากรจำนวน 88 ราย พบว่ามีแกมีโตไซต์ในกระแสเลือดจำนวน 50 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.35 แต่เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้วิธีเก็บเลือดในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและจากตัวอย่างเดียวกันแต่เก็บโดยวิธีหยดบนกระดาษกรอง (Whatman filter paper) พบความไวในการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* สูงกว่าวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 82 ราย คิดเป็นร้อยละ 93.18 และ 79 ราย คิดเป็นร้อยละ 89.77 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาโดยทั้ง 2 วิธีสามารถเก็บรักษาอาร์เอ็นเอได้ และนำมาตรวจหาระยะแกมีโตไซต์โดยใช้เทคนิค RT-PCR ได้ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบแกมีโตไซต์โดยใช้วิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี RT-PCR

ชนิดของเชื้อ	Microscopy	RT-PCR		RT-PCR	
		(RNA/arter)		(Filter paper)	
		Positive	Negative	Positive	Negative
<i>P. vivax</i>					
Gametocyte	50 (54.35%)	82 (93.18%)	6	79 (89.77%)	9
Asexual blood stage	38	-	-	-	-
-	ไม่สามารถทดสอบได้				

ตารางที่ 10 แสดงผลการเปรียบเทียบแอมปีโตไซต์ด้วยวิธี nested RT-PCR โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองกับวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

nested RT-PCR	Microscopy (%)	
	เชื้อ <i>P. vivax</i> (N = 88)	
	Positive gametocyte (N = 50)	Negative gametocyte (N = 38)
Blood in RNA/ater		
Positive gametocyte	50 (100)	32 (84.21)
Negative gametocyte	0	6 (15.79)
Dried blood on filter		
Positive gametocyte	50 (100)	29 (76.32)
Negative gametocyte	0	9 (23.68)

จากตารางที่ 10 ผลการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถตรวจพบระยะแอมปีโตไซต์จำนวน 50 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจสอบด้วยวิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง สามารถตรวจพบระยะดังกล่าวได้วิธีละ 50 ราย จากจำนวนตัวอย่าง 50 ราย และไม่พบระยะแอมปีโตไซต์โดยการตรวจดูด้วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 38 ราย แต่ผล nested RT-PCR ที่ได้จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองนั้นพบได้ 32 และ 29 ราย ตามลำดับ จากจำนวนตัวอย่าง 38 ราย

ตารางที่ 11 แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียและอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์โดยใช้วิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ

Sample	Parasites/ μ l	No. positive gametocytes of <i>P. vivax</i> by nested RT-PCR (%)
Blood in RNAlater	1-100	0/1 (0)
	101-1,000	4/4 (100.0)
	1,001-10,000	39/40 (97.50)
	10,001-100,000	38/41 (92.68)
	100,001-250,000	1/2 (50.0)

จากตารางที่ 11 แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียและอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ ต่อจำนวนที่สามารถตรวจพบแกมีโตไซต์ได้โดยใช้วิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดพบว่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่ 101 ถึง 1,000, 1,001 ถึง 10,000, 10,001 ถึง 100,000, 100,001 ถึง 250,000 ตัวต่อไมโครลิตร สามารถตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอในอัตราร้อยละ 100, 97.50, 92.68 และ 50.0 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียและอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์โดยใช้วิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง

Sample	Parasites/ μ l	No. positive gametocytes of <i>P. vivax</i> by nested RT-PCR (%)
Dried blood on filter	1-100	0/1 (0)
	101-1,000	3/4 (75.0)
	1,001-10,000	39/40 (97.50)
	10,001-100,000	36/41 (87.80)
	100,001-250,000	1/2 (50.0)

จากตารางที่ 12 แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียและอัตราการตรวจพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง ต่อจำนวนที่สามารถตรวจพบแกมีโตไซต์ได้โดยใช้วิธี nested RT-PCR จากตัวอย่างเลือดพบว่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่ 101 ถึง 1,000, 1,001 ถึง 10,000, 10,001 ถึง 100,000, 100,001 ถึง 250,000 ตัวต่อไมโครลิตร สามารถตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอในอัตราร้อยละ 75.0, 97.50, 87.80 และ 50.0 ตามลำดับ

เมื่อนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าความไว (จากสูตร a หารด้วย a บวก c คูณด้วย 100) และความจำเพาะ (จากสูตร d หารด้วย b บวก d คูณด้วย 100) ในการตรวจพบ แกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากการเก็บตัวอย่างเลือดทั้ง 2 วิธี จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง จากตำแหน่งของยีน Pvs25 ด้วยวิธี nested RT-PCR โดยพบว่าไพรเมอร์ Pvs25F1F และ Pvs25R1F (ตารางที่ 13) ให้ผลความไวสูงสุดจากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอ ร้อยละ 93.18 และความจำเพาะ ร้อยละ 100 ส่วนตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองพบว่าให้ผลความไวสูงสุดที่ร้อยละ 89.77 และความจำเพาะ ร้อยละ 100 ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลความไว และความจำเพาะของการวินิจฉัยด้วยวิธี nested RT-PCR และวิธีการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสวรงค์สภาพอาร์เอ็นเอและตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง

Sample		nested RT-PCR (N=102)			Sensitivity, Specificity (%)
		Positive	Negative	Total	
Blood in RNAlater	Positive	82 (80.40) a	0 (0.00) b	82 (80.40)	Sens.= 93.18
	Negative	6 (5.88) c	14 (13.72) d	20 (19.60)	Spec.= 100
Dried blood on filter	Positive	79 (77.45) a	0 (0.00) b	79 (77.45)	Sens.= 89.77
	Negative	9 (8.83) c	14 (13.72) d	23 (22.55)	Spec.= 100

Sensitivity = $a / (a + c) \times 100$; Specificity = $d / (b + d) \times 100$

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

โรคมาลาเรียชนิด *P. vivax* ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะพื้นที่เขตร้อนรวมถึงประเทศไทย โดยพบว่าเมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มียะเยแกมีโตไซต์เข้าไป เชื้อจะสามารถเจริญต่อไปในยุงได้ ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อ *P. vivax* ต่อไป แม้ว่าการวินิจฉัยโรคมาลาเรียสามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยฟิล์มเลือดหนาและฟิล์มเลือดบางจากการย้อมสียิมซ่า เนื่องจากวิธีนี้มีความจำเพาะในการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในเรื่องการตรวจหาในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Karl et al., 2009) ซึ่งการใช้เลือดในปริมาณน้อยอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในระยะนี้ได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการตรวจหาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* โดยใช้วิธี QT-NASBA จากยีน Pvs25 เช่นเดียวกัน ผลการตรวจสอบพบว่าวิธี QT-NASBA มีความไวในการตรวจพบแกมีโตไซต์ 100 copy/µl (Beurskens et al., 2009) และเมื่อผู้วิจัยทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) มาตรวจหาแกมีโตไซต์โดยใช้ยีน Pvs25 พบว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบมีความไวในการตรวจพบแกมีโตไซต์ 10 copy/µl ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมในการตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากยีน Pvs25 ที่จำเพาะต่อระยะดังกล่าวมากกว่า และสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแกมีโตไซต์และความรุนแรงของการติดเชื้อในยุงก้นปล่องได้ดีกว่าการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Bharti et al., 2006)

ในปัจจุบันการแพร่กระจายของเชื้อของมาลาเรียขึ้นอยู่กับการปรากฏของแกมีโตไซต์ในกระแสเลือดซึ่งอาจมีความหนาแน่นต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ อาจทำให้เกิดการขนส่งแกมีโตไซต์จากคนที่ติดเชื้อสู่ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะต่อไปได้ ดังเช่นการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศบูร์กินาฟาโซ (Burkina Faso) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เกิดการระบาดของเชื้อมาลาเรีย พบว่าความหนาแน่นของแกมีโตไซต์มีความสัมพันธ์กับอัตราการติดเชื้อมาลาเรียเพิ่มสูงขึ้น (Ouedraogo et al., 2007) และสายพันธุ์ของยุงที่เป็นพาหะหลักในการขนส่งแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* ในประเทศไทย คือ *Anopheles dirus* (Sattabongkot et al., 1991) ในทางตรงกันข้ามการศึกษาในประเทศเปรูพบว่ายุงสายพันธุ์ *An. Darlingi* เป็นพาหะหลักในการขนส่งแกมีโตไซต์ของเชื้อ

P. vivax (Bharti et al., 2006) ซึ่งมีความแตกต่างในด้านชนิดของยุงที่เป็นพาหะของแต่ละพื้นที่ และทำให้เกิดปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการพัฒนาระยะโอโอซิสต์ เช่น ความแตกต่างของจำนวน แกมีโตไซต์ในตัวอย่างทางคลินิกและความสามารถที่แตกต่างกันของผู้วินิจฉัยจากการตรวจสอบ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลต่อการจำแนกชนิดของเชื้อในการศึกษา ทั้งนี้จึงนำ วิธีการทางโมเลกุลมาใช้เพื่อตรวจหาแกมีโตไซต์เป็นที่น่าสังเกตว่า ยีน Pvs25 ถูกสร้างขึ้นจาก mRNA ของแกมีโตไซต์ในช่วงที่เป็นตัวเต็มวัยและสามารถเป็นตัวบ่งชี้ของการให้ผลบวกจากการ ตรวจสอบทั้งชนิดและระยะของแกมีโตไซต์ได้ ถึงแม้ว่าแกมีโตไซต์ที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ของเชื้อ *Plasmodium* ส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ในไขกระดูกและม้ามของผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย (Bousema and Drakeley, 2011) และอาจพบแกมีโตไซต์ที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่อยู่ภายในกระแสเลือดของผู้ป่วย โรคมาลาเรียได้ (Smalley et al., 1981) นอกจากนี้การตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง แกมีโตไซต์ระยะที่ 4 และระยะที่ 5 ของเชื้อ *P. falciparum* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อาจไม่ชัดเจน แต่อาจสังเกตได้จากปลายแหลมทั้งสองข้างของแกมีโตไซต์ระยะที่ 4 และปลายโค้งมนของ แกมีโตไซต์ระยะที่ 5 แต่คุณสมบัติดังกล่าวไม่สามารถนำไปใช้กับการตรวจสอบแกมีโตไซต์ของ เชื้อ *P. vivax* เนื่องจากแกมีโตไซต์ระยะที่ 4 และระยะที่ 5 ของเชื้อ *P. vivax* มีรูปร่างกลมแตกต่างกันเพียงขนาดเท่านั้น (Bousema and Drakeley, 2011) ดังนั้นการพัฒนาวิธี RT-PCR ใน การศึกษาครั้งนี้เพื่อให้สามารถหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าวของการตรวจสอบโดยใช้กล้อง จุลทรรศน์ในด้านความไวของการตรวจสอบแกมีโตไซต์และการจำแนกของระยะของแกมีโตไซต์ ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ความชุกของแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นถึงอัตราการแพร่กระจายที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงฤดูแล้งซึ่งสูงกว่าในช่วงฤดูฝนจาก ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในพื้นที่ของประเทศไทย (Nacher et al., 2004) อย่างไรก็ตามการศึกษา ในครั้งนี้ได้พิสูจน์แล้วว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* จำนวน 88 ราย มีระยะแกมีโตไซต์ในกระแสเลือด คิดเป็นร้อยละ 93.18 จากตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและร้อยละ 89.77 จาก ตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษกรอง ตามเวลาของการเก็บตัวอย่างเลือดทั้ง 2 ฤดูกาล ดังนั้นอาจ ไม่มีความจำเป็นในการสังเกตความชุกของแกมีโตไซต์ตามฤดูกาลมากนัก เนื่องจากมีวิธีการ ตรวจสอบแกมีโตไซต์ที่สามารถตรวจพบได้เร็วมากขึ้นนำมาใช้กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* ซึ่ง ในการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อและมีอาการไข้ 1 วันก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด ระยะแกมีโตไซต์ อาจเกิดขึ้นระหว่างช่วงต้นของการติดเชื้อมาทำให้เกิด gametocytogenesis ที่สมบูรณ์ในทำนอง เดียวกันกับการศึกษาของ Nakazawa และคณะ แสดงให้เห็นถึงการตรวจสอบด้วยกล้อง จุลทรรศน์ที่ตรวจพบแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* คิดเป็นร้อยละ 16.2 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ

ในจังหวัดตาก ในขณะที่ผู้ป่วยเหล่านี้ทั้งหมดตรวจสอบพบว่ามี mRNA ของยีน Pfs25 แสดงให้เห็นความชุกของแกมีโตไซต์ระยะตัวเต็มวัยในกระแสเลือดจากประชากรที่ศึกษา (Nakazawa et al., 2011) การปรากฏระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* สามารถตรวจพบได้จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการตรวจพบระยะแกมีโตไซต์ถือเป็นจุดเริ่มต้นของการเจ็บป่วยสามารถแพร่กระจายเชื้อมาลาเรียไปสู่คนอื่นได้ ก่อนที่จะถูกกำจัดให้หมดโดยยาต้านเชื้อมาลาเรียหรือถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ภายในกระแสเลือด (Bousema et al., 2010)

การเก็บตัวอย่างเลือดที่ต้องการเก็บรักษาสภาพอาร์เอ็นเอยังเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งอาจจะถูกทำลายในบางสถานการณ์ในพื้นที่ที่มีโรคมมาลาเรียและมีทรัพยากรอย่างจำกัด การเก็บตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเก็บรักษาสภาพอาร์เอ็นเอไว้ได้จากการศึกษาของ Maeno ในการตรวจจับ mRNA ของเชื้อ *P. yoelii* จากตัวอย่างเลือดหนู ใช้ยีน cytokine ชนิดต่างๆ เป็นยีนเป้าหมาย ทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่า ประสบความสำเร็จในการตรวจพบ mRNA จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง (Maeno et al., 2003) ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 เขาได้ทำการศึกษา mRNA ที่จำเพาะต่อยีน Pfg377 ของระยะแกมีโตไซต์ในผู้ที่ติดเชื้อ *P. falciparum* จากตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง ซึ่งให้ผลสำเร็จเช่นเดียวกัน (Maeno et al., 2008)

ในการศึกษานี้โดยใช้วิธี RT-PCR สามารถตรวจสอบ mRNA ของยีน Pvs25 จากเลือดที่หยดบนกระดาษกรองได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* จำนวน 79 จาก 88 ในขณะที่ตัวอย่างเลือดเดียวกันเก็บรักษาไว้ใน RNA later พบให้ผลบวกเพิ่มเติม 3 ตัวอย่าง (ความแตกต่าง 3.41% ในอัตราบวกแกมีโตไซต์) ดังนั้นจากการศึกษานี้แสดงถึงหลักฐานที่สนับสนุนว่าการเก็บเลือดที่หยดบนกระดาษกรองมีผลลัพธ์ที่น่าพอใจและสามารถเทียบเคียงกับตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอในการตรวจหา mRNA ของเชื้อ *P. vivax*

จากการตรวจหาความไวและความจำเพาะของวิธี RT-PCR สำหรับการตรวจหาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* โดยมีเป้าหมายคือ Pvs25 และใช้ cDNA เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดในภาคสนามได้และทำให้เก็บตัวอย่างได้จำนวนมากของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. vivax* และมีระยะแกมีโตไซต์อยู่ในกระแสเลือด วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการเก็บตัวอย่างเลือดทั้ง 2 วิธีคือ เก็บไว้ในสารคงสภาพอาร์เอ็นเอและหยดเลือดบนกระดาษกรอง

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อเป็นการพัฒนาความไวและความจำเพาะในการตรวจหาแกมีโตไซต์ของเชื้อ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดโดยวิธี RT-PCR ควรเลือกใช้ยีนเป้าหมายชนิดอื่นที่มีความสำคัญเท่าเทียมกันกับการศึกษานี้
2. ควรพัฒนาวิธี RT-PCR จากการศึกษาครั้งนี้ให้เป็นแบบ multiplex PCR สามารถตรวจหาระยะแกมีโตไซต์ของเชื้อ *Plasmodium* ชนิดอื่นๆ พร้อมกันได้ เพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวินิจฉัย
3. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้จำนวนตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษกรองเพิ่มมากขึ้น เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีในการเก็บรักษาสภาพอาร์เอ็นเอ
4. ควรทำการศึกษาในพื้นที่อื่นๆ ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย เพื่อควบคุมและป้องกันโรคต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สมชาย จงวุฒิเวศย์ และอุษา ทิสยากร. 2549. มาลาเรีย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ธนาพรส.

ภาษาอังกฤษ

- Abdel-Wahab, A., et al. 2002. Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. J Infect Dis. 185: 1838–1842.
- Aikawa, M., Carter, R., Ito, Y., and Nijhout, M.M. 1984. New observations on gametogenesis, fertilization, and zygote transformation in *Plasmodium gallinaceum*. J Protozool. 31: 403–413.
- Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J Cell Biol. 77: 72-82.
- Alano, P. and Carter, R. 1990. Sexual differentiation in malaria parasites. Annu Rev Microbiol. 44: 429–449.
- Alano, P. Read, D. Bruce, M. et al. 1995. COS cell expression cloning of *Pfg377*, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen associated with osmiophilic bodies. Mol Biochem Parasitol. 74: 143–156.
- Alano P, Roca L, Smith D, Read D, Carter R, Day K. 1995. *Plasmodium falciparum*: Parasites Defective in Early Stages of Gametocytogenesis. Exp Parasitol. 81: 227-235.
- Aoki, S., Li, J., Itagaki, S., et al. 2002. Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *Plasmodium falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth.

- J Biol Chem. 277: 47533–47540.
- Babiker, A., Abdel-Muhsin, A. A., Ranford-Cartwright, L. C., Satti, G., and Walliker, D. 1998. Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. Am J Trop Med Hyg. 59: 582–590.
- Babiker, A., et al. 1999. Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 99: 143–148.
- Babiker, H. A., and Schneider, P. 2008. Application of molecular methods for monitoring transmission stages of malaria parasites. J Biomed Mater. 3: 034007.
- Baird, J. K. 2009. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. Clin Microbiol Rev. 22: 508–534.
- Baird, J.K., Wiady, I., Fryauff, D.J., Sutanihardja, M.A., Leksana, B., Widjaya, H., Kysdarmanto, Subianto, B. 1997. In vivo resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* at Nabire, Irian Jaya, Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 56: 627-31.
- Baker, D. A. 2010. Malaria gametocytogenesis. Mol Biochem Parasitol. 172: 57–65.
- Baker, D. A., Daramola, O., McCrossan, M. V., Harmer, J., and Targett, G. A. 1994. Subcellular localization of Pfs16, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen. Parasitol Res. 108: 129–137.
- Barnes, K. I., et al. 2008. Increased gametocytemia after treatment: an early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *falciparum* malaria. J Infect Dis. 197: 1605–1613.
- Batty, K.T., et al. 1998. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of artesunate for *vivax* malaria. Am J Trop Med Hyg. 59: 823–827.
- Bejon, P., et al. 2006. Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. Malar J. 5: 104.

- Beurskens, M., et al. 2009. Quantitative determination of *Plasmodium vivax* gametocytes by real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification in clinical samples. Am J Trop Med Hyg. 81: 366–369.
- Bharti, A. R., et al. 2006. Experimental infection of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 75: 610–616.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke- Fayard, B., and Brinkmann, V. 2004. Calcium and a calciumdependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. Cell. 117: 503–514.
- Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G., and Sinden, R. E. 1997. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. Parasitol Res. 115: 1–7.
- Billker, O., et al. 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. Nature. 392: 289–292.
- Biswas, S. 2000. Formation of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vivo and in vitro relates to transmission intensity. Ann Trop Med Parasitol. 94: 437–446.
- Blackman, M. J. 2008. Malarial proteases and host cell egress: an emerging cascade. Cell Microbiol. 10: 1925–1934.
- Blagborough, A. M., Yoshida, S., Sattabongkot, J., Tsuboi, T., and Sinden, R. E. 2010. Intranasal and intramuscular immunization with baculovirus dual expression system-based Pvs25 vaccine substantially blocks *Plasmodium vivax* transmission. Vaccine. 28: 6014–6020.
- Bray RS, and Garnham PC. 1982. The life-cycle of primate malaria parasites. Br Med Bull. 38: 117-122.
- Breasted, J.H. 1930. The Edwin Smith Surgical Papyrus. Chicago, Illinois: University of Chicago Press,
- Boudin, C., Lyannaz, J., Bosseno, M. F., Carnevale, P., and Ambroise-Thomas, P. 1991. Epidemiology of *Plasmodium falciparum* in a rice field and a savanna area in Burkina Faso: seasonal fluctuations of gametocytaemia and malarial infectivity. Ann Trop Med Parasitol. 85: 377–385.

- Bousema, J. T., et al. 2004. *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. Malar J. 3: 18.
- Bousema, J. T., et al. 2006. Moderate effect of artemisinin-based combination therapy on transmission of *Plasmodium falciparum*. J Infect Dis. 193: 1151–1159.
- Bousema, J.T., et al. 2010. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. Malar J. 9: 136.
- Bousema, T and Drakeley, C. 2011. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. Clin Microbiol Rev. 377-410.
- Boyd, M.F., and Kitchen, S. F. 1937. On the infectiousness of patients infected with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 17: 253–262.
- Boyd, M. F., Stratman-Thomas, W. K., and Muench, H. 1935. The occurrence of gametocytes of *Plasmodium vivax* during the primary attack. Am J Trop Med Hyg. 16: 133–138.
- Boyd, M.R., ed. 1949. Malariology. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders.
- Breman, J.G. 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. Am J Trop Med Hyg. 64: 1-11.
- Buates, S., et al. 2010. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes. Parasitol Int. 59: 414–420.
- Canning, E.U., Sinden, R.E. 1973. The organization of the ookinete and observations on nuclear division in the oocysts of *Plasmodium berghei*. Parasitol Res. 67: 29-40.
- Carter, R., et al. 1989. *Plasmodium falciparum*: an abundant stage-specific protein expressed during early gametocyte development. Exp Parasitol. 69: 140–149.
- Chiodini, P.L., and Moody, A.H. 1989. Techniques for the detection of malaria parasites. J R Soc Med. 82: 95-97.

- Coatney, G.R., et al. 1961. Transmission of the M strain of *Plasmodium cynomolgi* to man. Am J Trop Med Hyg. 10: 673-678.
- Colbourne, M. J. 1956. The effect of prolonged examination of blood films on the parasite rate. West Afr Med J. 5: 26-30.
- Collins, F.H., and Paskewitz, S.M. 1995. Malaria current and future prospect for control. Annu Rev Entomol. 40: 195-219.
- Cox, F.E. 2002. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev. 15: 595-612.
- Cox, F.E.G. 1996. Illustrated history of tropical diseases. London: The Wellcome Trust,
- Dowling, M. A., and Shute, G. T. 1966. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. Bull. World Health Organ. 34:249-267.
- Day, K. P., Hayward, R. E., and Dyer, M. 1998. The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. Parasitol Res. 116: 95-109.
- Day, K.P., Hayward, R.E., Smith, D., and Culvenor, J.G. 1998. CD36-dependent adhesion and knob expression of the transmission stages of *Plasmodium falciparum* is stage-specific. Mol Biochem Parasitol. 93: 167-177.
- Deane, L.M., Deane, M.P., and Ferreira Neto, J. 1966. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. Bull WHO. 35: 805-808.
- Dixon, M. W., Thompson, J., Gardiner, D. L., and Trenholme, K. R. 2008. Sex in *Plasmodium*: a sign of commitment. Trends Parasitol. 24: 168-175.
- Douglas, N. M., Anstey, N. M., Angus, B. J., Nosten, F., and Price, R. N. 2010. Artemisinin combination therapy for vivax malaria. Lancet Infect Dis. 10: 405-416.
- Drakeley, C. J., Flobbe, K., Greenwood, B. M., and Targett, G. A. 2000. *Plasmodium falciparum* gametocytes in Gambian adults. Ann Trop Med Parasitol. 94: 399-401.
- Drakeley, C., Sutherland, C., Bousema, J. T., Sauerwein, R. W., and Targett, G. A. 2006. The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. Trends Parasitol. 22: 424-430.

- Duffy EP, Kaslow DC. 1997. A novel Malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as *falciparum* malaria Transmission-Blocking Vaccines. Infect Immun. 65: 1109-1113.
- Dunyo, S., et al. 2006. Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic *Plasmodium falciparum*. PloS Clin Trials. 1: e20.
- Ebisawa, I., Muto, T., Komoriya, T. 1971. Peripheral schizontaemia in falciparum malaria. Jpn J Exp Med. 41: 253-256.
- Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R. W., Eling, W., and Williamson, K. C. 2006. Malaria transmission-blocking antigen, *Pfs230*, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. Mol Microbiol. 61: 991–998.
- Eksi, S., et al. 2005. Identification of a subtelomeric gene family expressed during the asexual-sexual stage transition in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 143: 90–99.
- Escalante, A.A., Freeland, D.E., Collins, W.E., and Lal, A.A. 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 8124-8129.
- Frevert, U. 2004. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. Trends Parasitol. 20: 417-424.
- Fryauff, D.J., Purnomo, Sutamihardja M.A., Elyazar, I.R., Susanti, I., Krisin, Subianto B., Marwoto, H. 2000. Performance of the OptiMAL assay for detection and identification of malaria infections in asymptomatic residents of Irian Jaya, Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 63: 139-45.
- Gamage-Mendis, A. C., Rajakaruna, J., Carter, R., and Mendis, K. N. 1992. Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an endemic population in Kataragama, Sri Lanka. Parasite Immunol. 14: 385–396.
- Gelpi AP, King, M.C. 1976. Duffy blood group and malaria. Science. 191: 1284.
- Greenwood, B. M., and Armstrong, J. R. 1991. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. Trans R Soc Trop Med Hyg. 85: 186–188.

- Guerra, C. A., Snow, R. W., and Hay, S. I. 2006. Defining the global spatial limits of malaria transmission in 2005. Adv Parasitol. 62: 157–179.
- Han, E. T., et al. 2010. Sequence polymorphisms of *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins (Pvs25 and Pvs28) from clinical isolates in Korea. Trop Med Int Health. 9: 1072–1076.
- Hawking, F., Wilson, M. E., and Gammage, K. 1971. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 65: 549–559.
- Hawking, F., Wilson, M.E., and Gammage, K. 1971. Evidence for cyclic development and short lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 65: 549-559.
- Hay, I.S., et al. 2010. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. PLoS Med. 7: e1000290.
- Hay, I.S., Guerra, A.C., Tatem, J.A., Noor, M.A., Snow, W.R. 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Infect Dis. 4: 327-336.
- Hayward, R. E., Tiwari, B., Piper, K. P., Baruch, D. I., and Day, K. P. 1999. Virulence and transmission success of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 4563–4568.
- Hedges, S.B. 2000. Human evolution. A start for population genomics. Nature. 408: 652-653.
- Hirai, M., and Mori, T. 2010. Fertilization is a novel attacking site for the transmission blocking of malaria parasites. Acta Trop. 114: 157–161.
- Hirai, M., Arai, M., Kawai, S., and Matsuoka, H. 2006. PbGCbeta is essential for *Plasmodium* ookinete motility to invade midgut cell and for successful completion of parasite life cycle in mosquitoes. J Biochem. 140: 747–757.
- Holder, A. A. 1994. Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. Parasitol Res. 108: 5-18.
- Huber, M., Cabib, E., Miller, L.H. 1991. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 2807-2880.

- Huh, A. J., et al. 2011. Parasitemia characteristics of *Plasmodium vivax* malaria patients in the Republic of Korea. J Korean Med Sci. 26: 42–46.
- Hulden, L., and Heliovaara, K. 2008. Natural relapses in vivax malaria induced by *Anopheles* mosquitoes. Malar J. 7: 64.
- Ihلامulla, R. L., and Mendis, K. N. 1987. *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation. Trans R Soc Trop Med Hyg. 81: 25–28.
- Ishino, T., Orito, Y., Chinzei, Y., and Yuda, M. 2006. A calciumdependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. Mol Microbiol. 59: 1175–1184.
- Jarcho, S. 1847. Some observations on disease in prehistoric North America. Bull Hist Med. 38: 1-18.
- Jeffery, G. M., and Eyles, D. E. 1955. Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* as related to gametocyte density and duration of infection. Am J Trop Med Hyg. 4: 781–789.
- Jeffery, G. M. 1952. The infection of mosquitoes by *Plasmodium vivax* (Chesson strain) during the early primary parasitemias. Am J Trop Med Hyg. 1: 612–617.
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Ferreira, M.U., Kanbara, H., and Hughes, A.L. 2005. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. Mol Biol Evol. 22: 1733-1739.
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T., Kanbana, H. 2004. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human in Thailand. Emerg Infect Dis. 10: 2211-2213.
- Joy, D. A., et al. 2003. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. Science. 300: 318-321.
- Karl, S., Davis, T. M., and Pierre, T. G. St. 2009. A comparison of the sensitivities of detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by magnetic fractionation, thick blood film microscopy, and RT-PCR. Malar J. 8: 98.

- Karl, S., et al. 2008. Enhanced detection of gametocytes by magnetic de position microscopy predicts higher potential for *Plasmodium falciparum* transmission. Malar J. 7: 66.
- Kawamoto, F., Alejo-Blanco, R., Fleck, S. L., and Sinden, R. E. 1991. *Plasmodium berghei*: ionic regulation and the induction of gametogenesis. Exp Parasitol. 72: 33–42.
- Kawamoto, F., Fujioka, H., Murakami, R.-I., et al. 1993. The roles of Ca²⁺/calmodulin- and cGMP-dependent pathways in gametogenesis of a rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. Eur J Cell Biol. 60: 101–107.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., et al. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. Nature. 5: 74-76.
- Khan, S. M., et al. 2005. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. Cell. 121: 675–687.
- Kimura, M., Kaneko, O., Inoue A, Ishii, A., Tanabe, K. 1995. Amplification by polymerase chain reaction of *Plasmodium falciparum* DNA from Giemsa-stained thin blood smears. Mol Biochem Parasitol. 70: 193-197.
- Klein, T. A., Lima, J. B., and Toda Tang, A. 1992. Vector incrimination and effects of antimalarial drugs on malaria transmission and control in the Amazon basin of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 87: 393–397.
- Knowles, R., and Das Gupta, B.M. 1932. A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man. Ind Med Gaz. 67: 301-320.
- Kocken, M.H.C, Jansen, J., Kaan, M. A., Beckers, A.J.P., Ponnudurai, T., Kaslow, C.D., Konings, N. H. R., Schoenmakers, G. G. J. 1993. Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 61: 59-68.
- Kongkasuriyachai, D., et al. 2004. Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28

- evaluation of homologous and heterologous antigen-delivery prime-boost strategy. Vaccine. 22: 3205–3213.
- Koning-Ward, T. F. de., Olivieri, A., Bertuccini, L., et al. 2008. The role of osmiophilic bodies and *Pfg377* expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 67: 278–290.
- Krotoski, W. A., et al. 1982. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. Am J Trop Med Hyg. 31: 1291-1293.
- Kuehn, A., and Pradel, G. 2010. The coming-out of malaria gametocytes. J Biomed Biotechnol. 2010: 1-11.
- Lal, K. Delves, M. J., Bromley, E., Wastling, J. M., Tomley, F. M., and Sinden, R. E. 2009. *Plasmodium* male development gene-1 (*mdv-1*) is important for female sexual development and identifies a polarised plasma membrane during zygote Development. Int J Parasitol. 39: 755–761.
- Lanfrancotti, A., Bertuccini, L. Silvestrini, F., and Alano, P. 2007. *Plasmodium falciparum*: mRNA co-expression and protein co-localisation of two gene products upregulated in early gametocytes. Exp Parasitol. 116: 497–503.
- Lasonder, E., et al. 2002. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. Nature. 419: 537–542.
- Laveran, A. 1884. Traite des fievres palustres. Palustres. Paris: Doin,
- Lensen, A., et al. 1999. *Plasmodium falciparum*: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. Exp Parasitol. 91: 101–103.
- Leslie, T., et al. 2007. Sulfadoxine-pyrimethamine, chlorproguanil-dapsone, or chloroquine for the treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Afghanistan and Pakistan: a randomized controlled trial. JAMA. 297: 2201–2209.
- Lobo, C. A., Dhar, R., and Kumar, N. 1999. Immunization of mice with DNA-based Pfs25 elicits potent malaria transmission-blocking antibodies. Infect Immun. 67: 1688–1693.

- Mabunda, S., Casimiro, S., Quinto, L., and Alonso, P. 2008. A country-wide malaria survey in Mozambique. I. *Plasmodium falciparum* infection in children in different epidemiological settings. Malar J. 7: 216.
- Maeno, Y., Nakazwa, S., Dao, L.D., Yamamoto, N., Giang, N.D., Hanh, T.V., Thuan, L.K., Taniguchi, K. 2008. A dried blood sample on filter paper is suitable for detecting *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription polymerase chain reaction. Acta Trop. 107:121-127.
- Maeno, Y., et al. 2003. Utility of the dried blood on filter paper as a source of cytokine mRNA for the analysis of immunoreactions in *Plasmodium yoelii* infection. Acta Trop. 87: 295-300.
- Mair, G. R., Braks, J. A. M., Garver, L. S., et al. 2006. Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. Science. 313: 667–669.
- Makler, M.T., Palmer, C.J., Ager, A.L. 1998. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. Ann Trop Med Parasitol. 92: 419-433.
- Malkin, E. M., et al. 2005. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. Vaccine. 23: 3131–3138.
- Marchiafara, E., Celli, A. 1885. Nuove ricerche sulla infezione malarica. Arch Sci Med. 9: 311-340.
- Marsh, K., English, M., Crawley, J., and Peshu, N. 1996. The pathogenesis of severe malaria in African children. Ann Trop Med Parasitol. 90: 395-402.
- Mason, S.J., Aikawa. M., Shiroishi, T., Miller, L.H. 1977. Further evidence for the parasitic origin of the surface coat on malaria merozoites. Am J Trop Med Hyg. 26: 195-197.
- Martin, S. K., Jett, M., and Schneider, I. 1994. Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. J Parasitol. 80: 371–378.
- McKenzie, F. E., Jeffery, G. M., and Collins, W. E. 2007. Gametocytemia and fever in human malaria infections. J. Parasitol. 93: 627–633.
- McKenzie, F. E., Jeffery, G. M., and Collins, W. E. 2002. *Plasmodium vivax* blood-stage dynamics. J Parasitol. 88: 521–535.

- McKenzie, F. E., et al. 2006. Gametocytemia in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections. J Parasitol. 92: 1281–1285.
- McRobert, L., et al. 2004. Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the *Plasmodium falciparum* life cycle. Infect Immun. 72: 6597–6602.
- McRobert, L., Taylor, C. J., Deng, W., et al. 2008. Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. PLoS Biol. 6: article e139.
- Meckel, H. 1847. Über Schwarzer Pigment in der Milz und im Blute einer Geisteskranker. Z Psychiatr. 4: 198-225.
- Menegon, M., Severini, C., Sannella, A., Paglia, M.G., Sangare, D., Wahab, A.A., Muhsin, A. M. A. A., Babiker, H., Walliker, D., Alano, P. 2000. Genotyping of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 111: 153-161.
- Metselaar, D. 1960. Relative increase in the prevalence of *Plasmodium falciparum* some years after the beginning of a house-spraying campaign in Netherlands New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg. 54: 523–528.
- Meszoely, C. A., Erbe, E. F., Steere, R. L., Trosper, J., and Beaudoin, R. L. 1987. *Plasmodium falciparum*: freeze-fracture of the gametocyte pellicular complex. Exp Parasitol. 64: 300–309.
- Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F., McGinniss, M.H. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med. 295: 302-304.
- Miller, M. J. 1958. Observations on the natural history of malaria in the semi-resistant West African. Trans R Soc Trop Med Hyg. 52: 152–168.
- Miller, S. K., Good, R. T., Drew, D. R., et al. 2002. A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. J Biol Chem. 277: 47524–47532.
- Mitri, C., Thiery, I., Bourguoin, C., and Paul, R. E. L. 2009. Density-dependent impact of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratio on mosquito infection rates. Proc Biol Sci. 276: 3721–3726.

- Miyata, T., et al. 2010. *Plasmodium vivax* ookinete surface protein Pvs25 linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization. Infect Immun. 78: 3773–3782.
- Mlambo, G., Vasquez, Y., LeBlanc, R., Sullivan, D., Kumar, N. 2008. A filter paper method for the detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription-polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 78: 114-116.
- Moelans, I.M.D.I., Klaassen, W.H.C., Kaslow, C.D., Konings, H.N.R., Schoenmakers G.G.J. 1991. Minimal variation in Pfs16, a novel protein located in the membrane of gametes and sporozoites of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 46: 311-314.
- Molineaux, L., Storey, J., Cohen, J. E., and Thomas, A. 1980. A longitudinal study of human malaria in the West African savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. Am J Trop Med Hyg. 29: 725–737.
- Moody, A. 2002. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol.Rev. 15: 66–78.
- Mueller, I., et al. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. Lancet Infect Dis. 9: 555–566.
- Muhia, D. K., Swales, C. A., Deng, W., Kelly, J. M., and Baker, D. A. 2001. The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 42: 553–560.
- Muirhead-Thomson, R. C. 1998. Where do most mosquitoes acquire their malarial (*Plasmodium falciparum*) infection From adults or from children. Ann Trop Med Parasitol. 92: 891–893.
- Mulder, B., van der Ligt, W., Sauerwein, R., and Verhave, J. P. 1998. Detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes with the OBC test and Giemsa-stained thick blood films for malaria transmission studies in Cameroon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 92: 395–396.

- Mwangi, T. W., Ross, A., Snow, R. W., and Marsh, K. 2005. Case definitions of clinical malaria under different transmission conditions in Kilifi District, Kenya. J Infect Dis. 191: 1932–1939.
- Nacher, M., et al. 2004. Risk factors for *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 71: 693–695.
- Nacher, M., et al. 2004. Seasonal fluctuations in the carriage of *Plasmodium vivax* gametocytes in Thailand. Ann Trop Med Parasitol. 98: 115–120.
- Nakazawa, S., Culleton, R., Maeno, Y. 2011. In vivo and in vitro gametocyte production of *Plasmodium falciparum* isolates from Northern Thailand. Int J Parasitol. 41: 317–323.
- Nakazawa, S., Marchand, R.P., Quang, N.T., Culleton, R., Manh, N.D., Maeno, Y. 2009. Anopheles dirus co-infection with human and monkey malaria parasites in Vietnam. Int J Parasitol. 39: 1533-1537.
- Nassir, E., Abdel-Muhsin, A., Suliaman, S., Kenyon, F., Kheir, A., Geha, H., et al. 2005. Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. Int J Parasitol. 35: 49-55.
- Naotunne, T. S., Karunaweera, N. D., Mendis, K. N., and Carter, R. 1993. Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. J Immunol. 78: 555–562.
- Nguyen, P.H., Day, N., Pram, T.D., Ferguson, D.J., White, N.J. 1995. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 89: 200-204.
- Nwakanma, D., et al. 2008. High gametocyte complexity and mosquito infectivity of *Plasmodium falciparum* in the Gambia. Int J Parasitol. 38: 219–227.
- Oliveira, D.A., Holloway, B.P., Durigon, E.L., Collins, W.E., Lal, A.A. 1995. Polymerase chain reaction and a liquid-phase, nonisotopic hybridization for species-specific and sensitive detection of malaria infection. Am J Trop Med Hyg. 52: 139-144.

- Ouedraogo, A. L., et al. 2007. Age-dependent distribution of *Plasmodium falciparum* gametocytes quantified by Pfs25 real-time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg. 76: 626–630.
- Ouedraogo, A. L., et al. 2008. Seasonal patterns of *Plasmodium falciparum* gametocyte prevalence and density in a rural population of Burkina Faso. Acta Trop. 105: 28–34.
- Paul, R.E.L., Brey, P.T., and Robert, V. 2002. *Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes. Trends Parasitol. 18: 32–38.
- Peiris, J. S., et al. 1988. Monoclonal and polyclonal antibodies both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria. Am J Trop Med Hyg. 39: 26–32.
- Petter, M., Bonow, I., and Klinkert, M.Q. 2008. Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. PLoS One. 3: e3779.
- Pichon, G., Awono-Ambene, H. P., and Robert, V. 2000. High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host. Parasitol Res. 121: 115–120.
- Piper, K. P., Hayward, R. E. Cox, M. J., and Day, K. P. 1999. Malaria transmission and naturally acquired immunity to PfEMP-1. Infect Immun. 67: 6369–6374.
- Pradel, G. 2007. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. Parasitol Res. 134: 1911–1929.
- Price, N.R., Tjitra, E., Guerra, A.C., Yeung, S., White, J.N., Anstey, M.N. 2007. Vivax malaria. Am J Trop Med Hyg. 77: 79-87.
- Ponnudurai, T., Lensen, A.H., Meis, J. F., and Meuwissen, J.H. 1986. Synchronization of *Plasmodium falciparum* gametocytes using an automated suspension culture system. Parasitol Res. 93: 263-274.
- Putaporntip, C., Hongsrimuang, T., Seethamchai, S., Kobasa, T., Limkittikul, K., Cui, L., Jongwutiwes, S. 2009. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and

- cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. J Infect Dis. 199: 1143-50.
- Pukrittayakamee, S., et al. 2008. Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in *P. vivax* malaria. Am J Trop Med Hyg. 79: 378–384.
- Raabe, A. C., Billker, O. Vial, H. J., and Wengelnik, K. 2009. Quantitative assessment of DNA replication to monitor microgametogenesis in *Plasmodium berghei*. Mol Biochem Parasitol. 168: 172–176.
- Ranjan, R., Ahmed, A., Gourinath, S., and Sharma, P. 2009. Dissection of mechanisms involved in the regulation of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4. J Biol Chem. 284: 15267–15276.
- Rawlings, J.D., Fujioka, H., Fried, M., Keister, B.D., Aikaawa, M., Kaslow, C.D. 1992. α -Tubulin II is a male-specific protein in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 56: 239-250.
- Reece, S. E., Duncan, A. B., West, S. A., and Read, A. F. 2003. Sex ratios in the rodent malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*. Parasitol Res. 127:419–425.
- Reininger, L., Tewari, R., Fennell, C., et al. 2009. An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. J Biol Chem. 284: 20858–20868.
- Romanowsky, D.L. 1891. Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. St. Petersburg Med Wochenschr. 16: 297-707.
- Rosenthal, P. J. 2004. Cysteine proteases of malaria parasites. Intl J Parasitol. 34: 1489–1499.
- Rosenberg, R., and Rungsiwongse, J. 1991. The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. Am J Trop Med Hyg. 45: 574-577.
- Ross, R. 1897. On some peculiar pigmented cells found in mosquitoes fed on malarial blood. Br Med J. 2: 1786-1788.
- Salmon, B. L., Oksman, A., and Goldberg, D. E. 2001. Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 271–276.

- Sattabongkot, J., Maneechai, N., Rosenberg, R. *Plasmodium vivax*: gametocyte infectivity of naturally infected Thai adults. 1991. Parasitol Res. 102: 27-31.
- Schneider, P., et al. 2004. Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. Mol Biochem Parasitol. 137: 35–41.
- Schneider, P., et al. 2006. (Sub) microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. Int J Parasitol. 36: 403–408.
- Scholz, S. M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M.-A., Templeton, T. J., and Pradel, G. 2008. *PfCCp* proteins of *Plasmodium falciparum*: gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. Int J Parasitol. 38: 327–340.
- Severini, C., Silvestrini, F., Sannella, A., Barca, S., Gradoni, L., Alano, P. 1999. The production of the osmiophilic body protein Pfg377 is associated with stage of maturation and sex in *Plasmodium falciparum* gametocytes. Mol Biochem Parasitol. 100: 247-252.
- Sharp, S., et al. 2006. Programmed transcription of the var gene family, but not of stevor, in *Plasmodium falciparum* gametocytes. Eukaryot. Cell. 5: 1206-1214.
- Shekalaghe, S. A., et al. 2007. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania. Trop Med Int Health. 12: 547–553.
- Silamut, K., and White, N.J. 1993. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe *falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 87: 436-443.
- Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., et al. 2005. Genomewide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 143: 100–110.
- Simon, N., Scholz, S. M., Moreira, C. K., et al. 2009. Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem. 284: 14537–14546.

- Sinden, R. E. 2004. A proteomic analysis of malaria biology: integration of old literature and new technologies. Int J Parasitol. 34: 1441–1450.
- Sinden, R. E. 1982. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. Parasitol Res. 84: 1–11.
- Sinden, R. E. 1998. Gametocytes and sexual development in Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. 25-48. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Sinden RE. 1983. The cell biology of sexual development in Plasmodium. Parasitol Res. 86: 7-28.
- Sinden, R. E., Butcher, G. A., Billker, O., and Fleck, S. L. 1996. Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. Adv Parasitol. 38: 53–117.
- Sinden, R. E., Canning, E. U., Bray, R. S., and Smalley, M. E. 1978. Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. Proc Biol Sci. 201: 375–399.
- Sinden, R.E., and Strong, K. 1978. An ultrastructural study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 72: 477-491.
- Singh, B., Sung, K.L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, G.S.S., Cox-Singh, J., Thomas, A. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet. 363: 1017-1024.
- Smalley, M. E., Abdalla, S., and Brown, J. 1981. The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 75: 103-105.
- Smith, T. G., Lourenco, P., Carter, R., Walliker, D., and Ranford-Cartwright, L. C. 2000. Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res. 121: 127–133.
- Smith, T. G., et al. 2003. CD36-mediated nonopsonic phagocytosis of erythrocytes infected with stage I and IIA gametocytes of *Plasmodium falciparum*. Infect Immun. 71: 393–400.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., et al. 1993. Sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 61: 315-320.

- Somboon, P., Walton, C., Sharpe, R.G., et al. 2001. Evidence for a new sibling species of *Anopheles minimus* from the Ryukyu Archipelago, Japan. J Am Mosq Control Assoc. 17: 98-113.
- Soni, S., Dhawan, S., Rosen, K. M., Chafel, M., Chishti, A. H., and Hanspal, M. 2005. Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell. Blood Cells Mol Dis. 35: 201–211.
- Spielman, A., et al. 1988. Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. Am J Trop Med Hyg. 39: 337–342.
- Stephens, J.W.W. 1922. A New malaria parasite of man. Ann Trop Med Parasitol. 16: 383-388.
- Sutherland, C. J. 2001. Stevor transcripts from *Plasmodium falciparum* gametocytes encode truncated polypeptides. Mol Biochem Parasitol. 113: 331–335.
- Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Ariey, F., and Robert, V. 2004. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. Malar J. 3: 24.
- Templeton, T. J., Keister, D. B., Muratova, O., Procter, J. L., and Kaslow, D. C. 1998. Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycophorins. J Exp Med. 187: 1599–1609.
- Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C., and Billker, O. 2005. An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. Mol Microbiol. 58: 1253–1263.
- Thompson, J., and Robertson, A. 1935. The structure and development of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the internal organs and peripheral circulation. Trans R Soc Trop Med Hyg. 29: 31-40.
- Tomas, M.A., Margos, G., Dimopoulos, G., van Lin, M.H.L., Koning-Ward, F.de.T., Sinha, R., et al. 2001. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. EMBO J. 20: 3975-3983.
- Trottein, F., Triglia, T., Cowman, A.F. 1995. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. Mol Biochem Parasitol. 74: 129-141.

- Tsuboi, T., Kaslow, D.C., Gozar, M.M.G., Tachibana, M., Cao, Y.M., Torii, M. 1998. Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. Mol Med. 4: 772-782.
- Tsuboi, T., Tachibana, M. Kaneko, O., and Torii, M. 2003. Transmission-blocking vaccine of *vivax* malaria. Parasitol Int. 52: 1-11.
- Van der Kolk, M., et al. 2003. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaounde', Cameroon, is seasonal and age-dependent. Trans R Soc Trop Med Hyg. 97: 375-379.
- Van Dijk, R.M., Janse, J.C., Thompson, J., Waters, P.A., Braks, M.A.J., Dodemont, J.H., et al. 2001. A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility. Cell. 104: 153-164.
- Vaughan, J. A., Noden, B. H., and Beier, J. C. 1994. Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 51: 233-243.
- Wang, C. W., et al. 2010. Identification of a major rif transcript common to gametocytes and sporozoites of *Plasmodium falciparum*. Malar J. 9: 147.
- Ward, P., Equinet, L., Packer, J., and Doerig, C. 2004. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. BMC Genomics. 5: article 79.
- Warrell, D.A., Molyneux, M.E., and Beale, P.F. 1990. Severe and complicated malaria. Tran Roy Soc Trop Med Hyg. 84: 1-65.
- Westenberger, S. J., et al. 2010. A systems-based analysis of *Plasmodium vivax* lifecycle transcription from human to mosquito. PLoS Negl Trop Dis. 4: e653.
- Williamson, C.K., Crisciomi, D.M., Kaslow, C.D. 1993. Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen, Pfs230. Mol Biochem Parasitol. 58: 355-358.
- Wickham, M. E., Culvenor, J. G., and Cowman, A. F. 2003. Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. J Biol Chem. 278: 37658-37663.

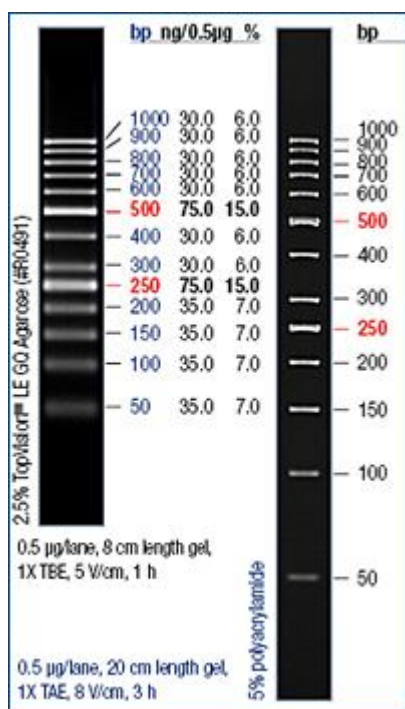
- Wu, Y., et al. 2008. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. PLoS One. 3: e2636.
- Young, J. A., et al. 2005. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. Mol Biochem Parasitol. 143: 67–79.
- Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., et al. 2009. Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. Mol Microbiol. 71: 1402–1414.
- Zieler, H., and Dvorak, J.A. 2000. Invasion in vitro of mosquito midgut cell by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cell. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 11516-11521.
- Zimmerman, P. A., Thomson, J. M., Fujioka, H., Collins, W. E., and Zborowski, M. 2006. Diagnosis of malaria by magnetic deposition microscopy. Am J Trop Med Hyg. 74: 568–572.

ภาคผนวก

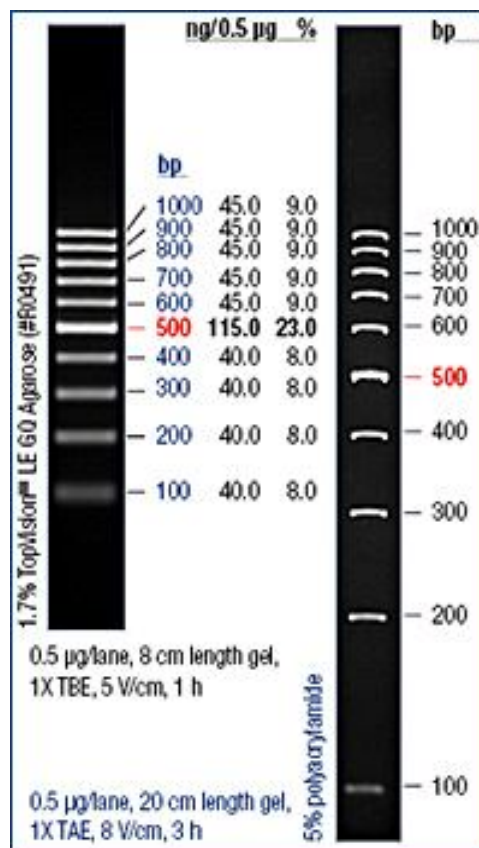
ภาคผนวก ก

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

A) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp ladder



B) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder



ภาพที่ 22 แสดงแผนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐาน A) ดีเอ็นเอของ 50 bp ladder ประกอบด้วย
ชั้นดีเอ็นเอ 13 ชั้น มีขนาด 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 และ
50 bp ตามลำดับ โดยมี reference band ที่ 250, 500 bp (Fermentas Life Science)
B) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ประกอบด้วยชั้นดีเอ็นเอ 10 ชั้น มีขนาด 1000, 900, 800,
700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp ตามลำดับ โดยมี reference band ที่ 500 bp
(Fermentas Life Science)

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1 g
d.H ₂ O	800 ml

นำส่วนผสมทั้ง 2 อย่างนี้มากวนด้วย magnetic stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH = 8 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ

การเตรียมสี Giemsa (stock)

สี Giemsa (ผง)	25 g
Absolute Methanol	1650 ml
Glycerine	1650 ml

บดผงสีก่อน โดยค่อยๆเติม glycerine ไปทีละน้อยๆ จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส พร้อมกับเท glycerine ที่เหลือผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม absolute methanol ลงไปเขย่าให้เข้ากัน และนำเอา stock solution นี้เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลประมาณ 1-3 เดือน ก่อนนำมาใช้จะทำให้การย้อมสีดีกว่าใช้ในขณะที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ

การเตรียม buffer ย้อมสี (stock buffer)

buffer I	Na ₂ H ₂ PO ₄ ·H ₂ O	9.2 g
	น้ำกลั่น	1000 ml
Buffer II	Na ₂ HPO ₄	9.5 g
	น้ำกลั่น	1000 ml

การเตรียม TE buffer (10x)

1 M Tris	800 ml
0.5 M EDTA	200 ml

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อก่อนที่จะใช้

การเตรียม gel-loading buffers

bromophenol blue	0.25 g
xylene cyanol FF	0.25 g
glycerol in water	30 g

ละลายในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

การเตรียม marker

DNA marker	20 μ l
Gel loading buffer	80 μ l
TE buffer	360 μ l

การเตรียม TBE buffer (10x)

Tris base	108 g
Boric acid	55 g
EDTA	7.4 g

ปรับค่า pH และปริมาตรให้เท่ากับ 8.3 และ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – สกุล นางสาวนภาพร กวมทรัพย์
วันเดือนปีเกิด วันที่ 12 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2529
ภูมิลำเนา จังหวัดนครศรีธรรมราช

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ
- พ.ศ. 2552 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย