

การประเมินการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยมีไข้ที่มารับการตรวจ
ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 จังหวัดตาก
โดยปฎิภิรยาตุกโซโพลีเมอร์เรส



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

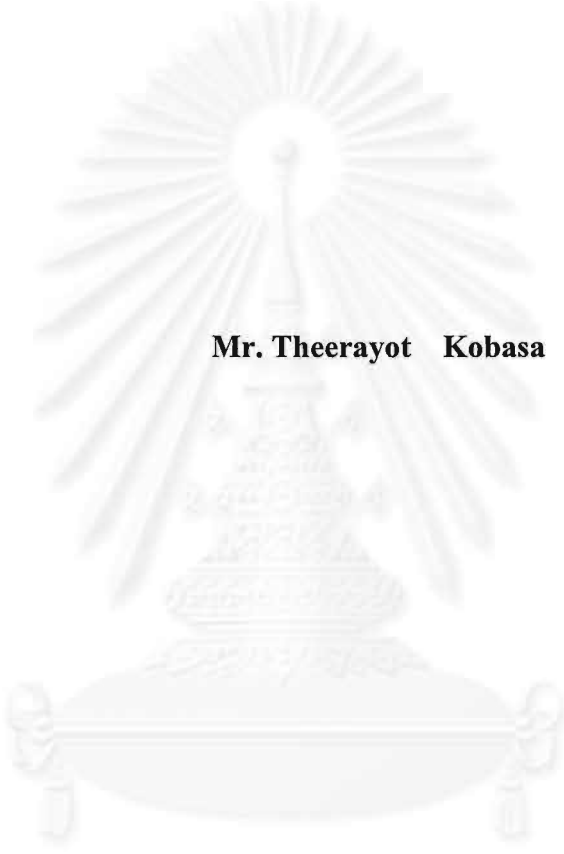
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-332-753-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EVALUATION OF MALARIA SPECIES DETECTION AMONG FEBRILE
PATIENTS ATTENDING THE VECTOR BORNE DISEASES CONTROL
UNIT 4 IN TAK PROVINCE BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION**



Mr. Theerayot Kobasa

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

Department of Parasitology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic year 1999

ISBN 974-332-753-3

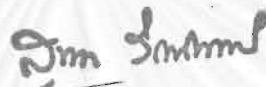
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การประเมินการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยมีไข้ที่มารับการตรวจ
ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 จังหวัดตาก
โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

โดย นายธีระยศ กอบอาษา

ภาควิชา ประสาทวิทยา

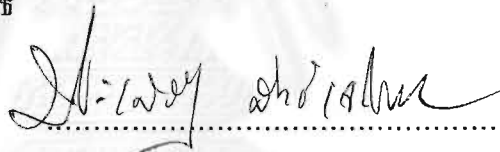
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

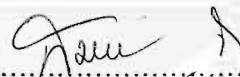


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันท์)

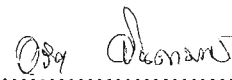
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. ประเสริฐ สัทธีเจริญชัย)



.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อริยา จินดามพร)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อระยะ กอบอาษา : การประเมินการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยมีไข้ที่มารับการตรวจ ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงที่ 4 จังหวัดตาก โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (EVALUATION OF MALARIA SPECIES DETECTION AMONG FEBRILE PATIENTS ATTENDING THE VECTOR BORNE DISEASES CONTROL UNIT 4 IN TAK PROVINCE BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. นพ.สมชาย จงวุฒิเวศย์, 86 หน้า. ISBN 947-332-753-3

การตรวจหาชนิดเชื้อมาลาเรียโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (semi-nested polymerase chain reaction, PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของยีน small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) ในผู้ป่วยมีไข้ที่มารับการตรวจเลือด ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงที่ 4 จังหวัดตาก ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2539 ถึง มีนาคม 2540 จำนวน 150 ราย กลุ่มประชากรศึกษาส่วนใหญ่ประกอบด้วยชาวเมียนมาร์และกะเหรี่ยง (ร้อยละ 73.3) รองลงมาคือชาวไทย (ร้อยละ 17.3) และชาวไทยภูเขา (ร้อยละ 9.4) พบผู้ที่มีดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดจำนวน 127 ราย เป็นเชื้อชนิด *Plasmodium falciparum* จำนวน 33 ราย *P. vivax* จำนวน 75 ราย การติดเชื้อชนิด *P. falciparum* ร่วมกับ *P. vivax* จำนวน 17 ราย การติดเชื้อชนิด *P. vivax* ร่วมกับ *P. malariae* จำนวน 2 ราย ในทางตรงกันข้ามการตรวจฟิล์มเลือดหนาและบางที่ย้อมสียิมซาสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียจำนวน 84 และ 105 รายตามลำดับ อัตราส่วนการตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PCR กับการตรวจจากฟิล์มเลือดบางและฟิล์มเลือดหนา เท่ากับ 1.38 : 1 และ 1.22 : 1 ตามลำดับ นอกจากนี้วิธี PCR มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียในรายที่มีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ได้ดีกว่าวิธีตรวจจากฟิล์มเลือด ดังนั้นการใช้วิธี PCR ในการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย ทำให้ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา
สาขาศึกษา
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4075224830 MEDICAL PARASITOLOGY
: MAJOR
KEY WORD: MALARIA SPECIES/ POLYMERASE CHAIN REACTION/ GIEMSA-STAINED/

THICK BLOOD FILM

THEERAYOT KOBASA : EVALUATION OF MALARIA SPECIES DETECTION AMONG
FEBRILE PATIENTS ATTENDING THE VECTOR BORNE DISEASES CONTROL UNIT 4
IN TAK PROVINCE BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, PhD 86 pp.

ISBN 974-332-753-3

A semi-nested polymerase chain reaction (PCR)-based detection targetting small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) genes of the human malaria parasites was exploited for malarial species identification among 150 isolates collected from febrile patients attending the Vector Borne Diseases Control Unit 4 at Tak Province during July 1996 and March 1997. The studied population comprised Myanmar and Karen people as the major ethnic groups (73.3%), followed by Thai (17.3%) and hill-tribe people (9.4%). Results revealed that 127 individuals (84.7%) harboured malarial DNA in circulation. Of these, 33 isolates gave positive results for *Plasmodium falciparum*, 75 for *P. vivax*, 17 for *P. falciparum* mixed with *P. vivax* and 2 *P. vivax* mixed with *P. malariae*. On the other hand, giemsa-stained thin blood film and thick blood film could detect malarial parasites in 84 and 105 isolates, respectively. The ratios of positive results from the PCR-based method to thin blood film and to thick blood film were 1.38 : 1 and 1.22 : 1, respectively. Furthermore, the PCR-based method could identify mixed infections with different malarial species more efficiently than traditional blood film examinations. Therefore, the PCR-based method provides a more accurate epidemiological data regarding malarial detection.

ภาควิชา.....ปรสิตวิทยา.....
สาขาวิชา.....ปรสิตวิทยาทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา.....2542.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งในความกรุณาของ
รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์จตุรงค์
พุทธพรทิพย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ประเสริฐ
สิทธิเจริญชัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน ให้คำแนะนำและข้อคิด ตลอดจนการแก้ไข
จุดบกพร่องต่างๆ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ นายแพทย์สราวุธ สุวัฒน์ทัฬหะ รักษาการผู้อำนวยการกองโรคเท้าช้าง
ที่สนับสนุนการลาศึกษาต่อในครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณมาลี เจริญกร และคุณสุทิน เย็นท่าข้าม ที่กรุณา
ให้คำแนะนำฝึกฝนเพิ่มทักษะในงานตรวจวินิจฉัยมาลาเรีย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก The Asahi Glass Foundation and The Hitachi
Scholarship Foundation และทุนงานวิจัยจากบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ และพี่ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนและเป็น
กำลังใจมาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
 บทที่	
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
2. สอบสวนเอกสาร.....	4
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
4. ผลการทดลอง.....	48
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	68
6. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	75
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	84
ประวัติผู้เขียน.....	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงยีนต่างๆ ที่พบบน โครโมโซมของ <i>Plasmodium falciparum</i> (Dd2 clone)	16
2. Primer ที่จำเพาะสำหรับ <i>Plasmodium vivax</i>	28
3. Primer ที่จำเพาะสำหรับ <i>Plasmodium ovale</i>	29
4. Primer ที่จำเพาะสำหรับ <i>Plasmodium malariae</i>	29
5. Primer ที่จำเพาะสำหรับ <i>Plasmodium falciparum</i>	30
6. แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง	48
7. สรุปข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง	51
8. แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า	51
9. แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า	51
10. แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ่า	52
11. แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ่า	52
12. แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR	54
13. แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR	54
14. แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจำแนกตามวิธีการตรวจ	55
15. แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด จำแนกตามวิธีการตรวจ	55
16. การเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาจำแนกตาม ระยะเวลาที่ใช้คือ 10 นาที และ มากกว่า 20 นาที.....	56
17. การเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียระหว่าง 3 วิธี	57
18. การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดบางและหนา...	58
19. การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดบางและวิธี PCR	59
20. การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดหนาและวิธี PCR	60
21. การเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR และการตรวจจาก ฟิล์มเลือด	61

22. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ปัจจัยด้านประชากรกับการตรวจพบเชื้อมาลาเรีย ...	63
23. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียจำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรีย.....	64
24. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรที่เคยป่วยด้วยมาลาเรียจำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรีย	65
25. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ไม่เคยป่วยด้วยมาลาเรียจำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรีย	66
26. เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR จากการใช้ primer ต่างๆ และการย้อมฟิล์มเลือดด้วย acridine orange	74



สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย	8
2. แผนที่ระบาดโรคมาลาเรียทั่วโลก	12
3. กราฟแสดงอัตราป่วยและอัตราตายด้วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2520- 2542	14
4. แสดงสัดส่วนการตรวจพบเชื้อมาลาเรียในชาวต่างชาติที่เข้ามาในประเทศไทย...	14
5. <i>Plasmodium falciparum</i> chromosome	15
6. แสดง rRNA gene transcription ของเชื้อมาลาเรีย.....	18
7. แสดง SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรีย.....	19
8. หลักการของ polymerase chain reaction	27
9. แสดงลำดับเบสบางส่วนของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรีย.....	42
10. แสดงลักษณะของเชื้อมาลาเรียจากการย้อมฟิล์มเลือดบางด้วยสียิมซ่า.....	45
11. แสดงลักษณะของเชื้อมาลาเรียจากการย้อมฟิล์มเลือดบางด้วยสียิมซ่า.....	45
12. แสดงลักษณะของเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> จากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมด้วย สียิมซ่า	46
13. แสดงลักษณะของเชื้อ <i>P. vivax</i> จากการย้อมฟิล์มเลือดหนาคด้วยสียิมซ่า.....	46
14. แสดงผลิตภัณฑ์ PCR รอบแรก บนอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.....	53
15. แสดงผลิตภัณฑ์ PCR รอบที่ 2 บนอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.....	53

คำย่อ

bp	=	basepair
°C	=	degree celsius
DNA	=	deoxyribonucleic acid
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
Kda	=	Kilodalton
Kb	=	Kilobase
Mb	=	Megabase
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
PCR	=	polymerase chain reaction
RNA	=	ribonucleic acid
S	=	Svedberg unit
sp.	=	species
SSU rRNA	=	small subunit ribosomal RNA
UV	=	ultraviolet
μl	=	microlitre



ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

มาลาเรียหรือไข้จับสั่นเป็นโรคติดต่ออันตรายที่คุกคามชีวิตและเศรษฐกิจของมนุษย์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน แม้ว่าองค์การอนามัยโลกได้พยายามควบคุมโรคมาลาเรียโดยประสานงานกับประเทศต่างๆ อย่างต่อเนื่อง มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2498 ทำให้มาลาเรียหมดไปจากหลายประเทศ เช่น ในทวีปยุโรป เกาหลีและญี่ปุ่น เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมาลาเรียยังเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศต่างๆ ในเขตร้อน องค์การอนามัยโลกได้ประมาณว่าในแต่ละปีมีประชากรทั่วโลกกว่า 200 ล้านคนป่วยด้วยโรคมาลาเรีย และประมาณว่าเด็กในแอฟริกากว่า 2 ล้านคนเสียชีวิตจากภาวะแทรกซ้อนของโรคมาลาเรีย (Trigg & Kondrachine, 1998)

สำหรับประเทศไทยมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศมาโดยตลอด แม้ว่าการดำเนินโครงการควบคุมและกำจัดมาลาเรียตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก ได้ทำให้แนวโน้มของโรคลดลงโดยลำดับ จากรายงานมาลาเรียประจำปี พ.ศ. 2540 พบผู้ป่วยชาวไทยจำนวน 99,679 ราย (1.78 ต่อแสนประชากร) เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2539 ร้อยละ 19.0 และพบผู้ป่วยชาวต่างชาติจำนวน 66,620 ราย เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2539 ร้อยละ 8.2 สำหรับชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบส่วนใหญ่เป็น *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* โดยคิดเป็นร้อยละ 50.7 และ 48.7 ตามลำดับ *P. malariae* พบเพียงร้อยละ 0.01 ส่วนที่เหลือร้อยละ 0.6 เป็นผู้ป่วยมาลาเรียที่มีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด (mixed infections) การที่สถานการณ์มาลาเรียมีแนวโน้มลดลงโดยลำดับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 – 2539 นั้น มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง เช่น การปิดพรมแดนระหว่างไทยกับกัมพูชา ทำให้คนไทยข้ามแดนไปประกอบอาชีพลดลงอย่างมาก การเกิดภาวะฝนแล้งติดต่อกันหลายปี การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม การทำลายป่าไม้ และผลการดำเนินมาตรการต่างๆ เช่น การใช้ยารักษามาลาเรียหลายชนิดร่วมกัน เพื่อการรักษาให้หายขาดในพื้นที่ที่มีปัญหาเชื้อมาลาเรียรุนแรง การนำมุ้งชุบสารเคมีมาใช้ในประชาชนกลุ่มเสี่ยง เป็นต้น (กองมาลาเรีย, 2541) แต่ในปี พ.ศ. 2540 มีการตรวจพบผู้ป่วยจำนวนมากขึ้น สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งเนื่องจากการอนุญาตให้แรงงานต่างชาติ (พม่า ลาวและกัมพูชา) สามารถขึ้นทะเบียนผ่อนผันค้าแรงงานได้ในประเทศไทย แรงงานเหล่านี้ส่วนหนึ่งที่ยังคงมีเชื้อมาลาเรียในร่างกาย เมื่อเข้ามาอาศัยอยู่ในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มียุงพาหะนำโรคจึงมีโอกาสนำพาโรคมาลาเรียสู่ชุมชน

ปัญหาและอุปสรรคในการควบคุมโรคมาลาเรียมีสาเหตุสำคัญ คือ ภาวะที่เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* คือต่อยาที่ใช้รักษา (Karbwang et al., 1997) ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลงหลายชนิด ตลอดจนการอพยพย้ายถิ่นฐานของกลุ่มคนจากแหล่งระบาดของมาลาเรีย ทำให้การนำเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาจากท้องถิ่นหนึ่งไปสู่อีกท้องถิ่นหนึ่ง

จากการประชุม Ministerial Conference on Malaria ที่เมืองอัมสเตอร์ดัม ประเทศเนเธอร์แลนด์ เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ. 2535 องค์การอนามัยโลก ได้ประกาศมุ่งเน้นหลักการใหญ่ 4 ประการ ในการควบคุมโรคมาลาเรีย ได้แก่

1. ดำเนินการให้มีการตรวจวินิจฉัย และรักษามาลาเรียอย่างรวดเร็วเพื่อลดอัตราการตาย
2. วางแผนและคัดเลือกใช้มาตรการควบคุม โรคมาลาเรียอย่างเหมาะสมและสามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่อง
3. ดำเนินการให้สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็วป้องกัน ขยายการระบาดของโรคมาลาเรีย
4. พัฒนาขีดความสามารถของประเทศต่างๆ ในการศึกษาวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยเชิงประยุกต์เพื่อแก้ปัญหาการควบคุม โรคมาลาเรีย (Kidson, 1992)

สำหรับประเทศไทยนั้น หลักการใหญ่ทั้ง 4 ประการมีการดำเนินการและพัฒนาไปค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยมาลาเรีย ตลอดจนการจำแนกชนิดของเชื้อในปัจจุบันที่ใช้ในหน่วยงานควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงอาศัยการตรวจด้วยฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ่า (thick blood film examination) นับเป็นวิธีที่ดี นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากมีความสะดวกและราคาไม่แพง ผู้ตรวจที่มีประสบการณ์สามารถตรวจฟิล์มเลือดหนาพบเชื้อที่ระดับความหนาแน่นต่ำประมาณ 100 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการตรวจดังกล่าว ขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ตรวจเป็นสำคัญ (Barker et al., 1989; Bruce-Chwatt, 1993)

สำหรับข้อผิดพลาดและข้อจำกัดในการตรวจด้วยวิธีดังกล่าว ได้แก่

1. ในกรณีที่ผู้ป่วยมีเชื้อมีน้อย ซึ่งมักพบในภาวะต่อไปนี้
 - 1.1 ผู้ป่วยกินยาป้องกันมาลาเรียก่อนเข้าไปในเขตปรากฏโรค เนื่องจากไม่มียาที่ป้องกันมาลาเรียที่ได้ผลอย่างสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย ยาที่ให้จึงมีผลเพียงกดอาการของมาลาเรียเอาไว้ไม่ให้ผู้ป่วยมีอาการขณะกินยา (suppressive drug) เท่านั้น ทำให้ระยะฟักตัวของโรคนานขึ้นและการตรวจพบเชื้อมากขึ้น
 - 1.2 ผู้ป่วยที่เป็น โรคมาลาเรียในระยะแรกจะมีเชื้อมีจำนวนน้อย ดังนั้นในรายสงสัยต้องมาตรวจซ้ำอีกครั้ง
 - 1.3 ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* นั้น อัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือด

แดง (parasitemia) ใน peripheral blood อาจพบได้น้อยมากในบางสภาวะ โดยที่ผู้ป่วยยังมีเชื้อ มาลาเรียในร่างกายปริมาณมาก เนื่องจากเชื้อในระยะตั้งแต่ late trophozoite เป็นต้นไป จะอยู่ใน หลอดเลือดฝอยและหลอดเลือดดำขนาดเล็กใน visceral blood (sequestration)

2. เทคนิคการย้อม เช่น สีมิตะกอนมาก น้ำยาย้อมเก่า ปนเปื้อนด้วยเชื้อราหรือแบคทีเรีย ทำให้มองเห็นเชื้อไม่ชัดเจน

3. การติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด พบว่าเชื้อชนิดหนึ่งมักมีความหนาแน่นมากกว่าอีก ชนิดหนึ่ง เช่น การติดเชื้อชนิด *P. falciparum* ร่วมกับ *P. vivax* โดยระยะวงแหวน (ring stage) ของ *P. vivax* คล้ายกับระยะวงแหวนของ *P. falciparum* ทำให้มีโอกาสพลาดในการตรวจได้ เช่น การศึกษาที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าจากการตรวจครั้งแรกพบเชื้อ มาลาเรียชนิด *P. falciparum* เพียงชนิดเดียว เมื่อทำการรักษาและติดตามผลการรักษา โดยผู้ป่วยนั้น ไม่ได้ไปในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมมาลาเรียอีก ปรากฏว่าตรวจพบเชื้อ *P. vivax* จากผู้ป่วยกลุ่ม ดังกล่าวภายในเวลา 2 เดือนต่อมาและตรวจพบถึงร้อยละ 33 (Looareesuwan et al., 1987) แสดงว่า การติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดมีโอกาสเกิดขึ้นบ่อย แต่ด้วยข้อจำกัดของวิธีการตรวจจากฟิล์ม เลือด จึงไม่พบเชื้อในครั้งแรก

4. ในการตรวจฟิล์มเลือดหนาบางครั้ง ไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้ถูกต้อง โดยเฉพาะเชื้อ *P. ovale* และ *P. malariae* ต้องใช้การจำแนกจากฟิล์มเลือดบาง (thin blood film) ซึ่งมีข้อจำกัด คือ ความไวในการตรวจพบเชื้อต่ำกว่าการตรวจด้วยฟิล์มเลือดหนาประมาณ 1 ใน 3 เท่า (Bruce-Chwatt, 1993)

ในการประเมินประสิทธิภาพการควบคุมโรคมมาลาเรีย จำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานทาง ระบาดวิทยาในด้านการกระจายและชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ถูกต้อง ดังนั้นวิธีการตรวจอื่นๆ ที่มีความไวและความจำเพาะมากกว่าวิธีการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาย้อมสีย้อมซ่าเป็นสิ่งที่จะต้อง อย่างยิ่ง มีผู้ทำการศึกษาโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา เช่น การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) เป็นต้น ผลจากการตรวจด้วยวิธี PCR สามารถจำแนกชนิดของ เชื้อมาลาเรียได้ถูกต้องและมีความไวในการตรวจวินิจฉัย ดังนั้นถ้ามีการศึกษาด้านระบาดวิทยาของ เชื้อมาลาเรียในประเทศไทย ในพื้นที่ที่มีปัญหาในการควบคุมโรคซึ่งมีสาเหตุที่สำคัญส่วนหนึ่งมา จากการวินิจฉัยไม่ถูกต้องครบถ้วน การประยุกต์ใช้วิธี PCR ในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจะ ทำให้ข้อมูลที่ได้รับความนิยมมากขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนป้องกันและรักษาโรค มาลาเรียให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

อนุกรมวิธานเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวชนิด eukaryote ซึ่งมี nuclear membrane แยก nucleus ออกจาก cytoplasm ชัดเจน สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานจากคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยา ตลอดจนปรสิตวิทยา ดังนี้

Kingdom *Protista*

Subkingdom *Protozoa*

Phylum *Apicomplexa*

Class *Sporozoa*

Subclass *Coccidia*

Order *Eucoccidiida*

Suborder *Haemosporina*

Family *Plasmodiidae*

Genus *Plasmodium*

Genus *Plasmodium* แบ่งเป็น sub-genus group และ species ดังนี้

Sub-genus: *Plasmodium*

Group: *Vivax*, Species: *P. vivax*, *P. cynomolgi*, *P. eylesi*, *P. gonderi*,
P. hylobati, *P. jefferyi*, *P. pitheci*, *P. schwetzi*,
P. simium, *P. sylvaticum*, *P. youngi*

Group: *Ovale*, Species: *P. ovale*, *P. fieldi*, *P. simiovale*

Group: *Malariae*, Species: *P. malariae*, *P. brazilianum*, *P. inui*

Group: *Uncertain*, Species: *P. coatneyi*, *P. fragile* (both with tertian periodicity)
P. knowlesi (quotidian periodicity)

Sub-genus: *Laverania*

Species: *P. falciparum*, *P. reichenowi*

Sub-genus: *Vinckeia*

Species: Large number of species (some of them of uncertain taxonomic status) infecting lemurs, rodents, bats and animals

ในธรรมชาติพบว่าเชื้อมาลาเรียมีมากกว่า 120 species โดยพบว่าเชื้อมาลาเรียประมาณ 20 species ทำให้เกิดโรคในลิง ประมาณ 19 species ทำให้เกิดโรคในหนู ค้างคาวและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และอีกมากกว่า 70 species ทำให้เกิดโรคในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีเพียง 4 species เท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคในคนโดยทั่วไป ซึ่งได้แก่

P. malariae (Laveran, 1881)

P. vivax (Grassi and Feletti, 1890)

P. falciparum Welch, 1897

P. ovale Stephens, 1922

แต่อย่างไรก็ตามเชื้อมาลาเรียในสัตว์บางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในคนได้เช่นกัน เช่น

P. knowlesi *P. simium* และ *P. cynomolgi* เป็นต้น (Marquardt & Demaree, 1985; Bruce-Chwatt, 1993)

วงชีวิต (Life cycle)

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียประกอบด้วยวงชีวิตในคนและในยุงก้นปล่องเพศเมีย (*Anopheles* sp.) กระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของยุง ส่วนกระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับในคน

เมื่อยุงก้นปล่องที่มีเชื้อระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายกัดคน sporozoite จะถูกปล่อยสู่กระแสเลือดภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง sporozoite จะเข้าไปเจริญอยู่ในเซลล์ตับด้วยกระบวนการ endocytosis เยื่อหุ้มเซลล์ตับบางส่วนจะถูกนำไปเป็นถุงหุ้ม (parasitophorous vacuolar membrane) เมื่อ sporozoite เข้าสู่ภายในเซลล์ตับจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นกลมหหรือรี แล้วพัฒนาต่อไปเป็นระยะ trophozoite ระยะ schizont และระยะ merozoite ตามลำดับ จากกระบวนการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า schizogony หรือ merogony โดย nucleus จะมีการแบ่งตัวแบบ mitosis ซ้ำๆ กัน จนได้ nucleus จำนวนมาก ขณะเดียวกัน cell membrane จะมีการยืดตัวแทรกเข้ามาใน cytoplasm ทำให้ cytoplasm แยกออกเป็นส่วนย่อยๆ เรียกว่า cytomere จากนั้น nucleus จะเคลื่อนที่เข้าไปใน cytomere และสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใหม่ โดยแต่ละหน่วยจะแยกตัวออกเป็นเซลล์รุ่นใหม่เรียกว่า merozoite เมื่อการแบ่งตัวเสร็จสมบูรณ์จะได้ merozoite ประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัวจาก sporozoite เพียง 1 ตัวของเชื้อ *P. falciparum* ในขณะที่ sporozoite ของ *P. ovale* หรือ

P. malariae 1 ตัว จะทำให้เกิด merozoite ประมาณ 15,000 ตัว และ *P. vivax* ประมาณ 10,000 ตัว ระยะเวลาที่ sporozoite เจริญเป็น merozoite ในตับต่างกันตามชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยใช้เวลา ประมาณ 5-15 วัน ซึ่ง *P. falciparum* ใช้เวลาน้อยที่สุดประมาณ 5-7 วัน และ *P. malariae* ใช้เวลามากที่สุดประมาณ 14-15 วัน

ระยะ schizont ของ *P. falciparum* และ *P. malariae* ในเซลล์ตับจะเจริญเป็น merozoite และออกจากเซลล์โดยแตกไม่มีเชื้อแฝงในตับ แต่สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* จะมีเชื้อส่วนหนึ่งหยุดพักการเจริญในเซลล์ตับชั่วคราวระยะเวลาหนึ่งเรียกว่า hypnozoite (Krotoski et al., 1982) และจะกลับมาเจริญต่อไปเป็นระยะต่างๆ ดังกล่าวได้อีก โดยการกลับมาเจริญต่อไปใหม่อาจเกิดขึ้นไม่พร้อมกันซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้กลับ (relapse)

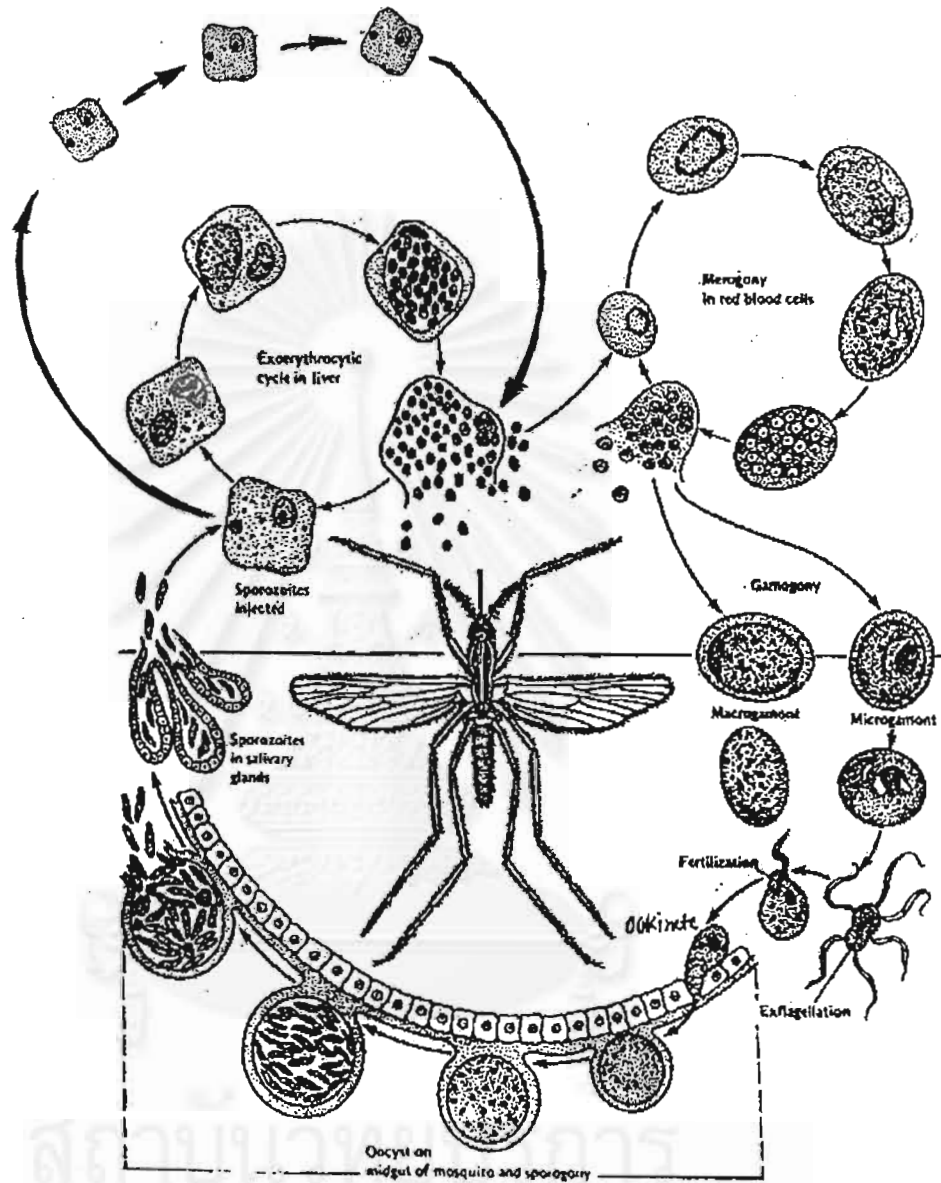
ระยะ merozoite ที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนั้น เริ่มต้นที่การรับรู้และการเกาะติดเซลล์เม็ดเลือดแดง (recognition and attachment) จากนั้น merozoite จะหันด้านที่มี apical complex ในแนวตั้งฉากกับผิวของเม็ดเลือดแดง (orientation) (Duorak et al., 1974) โดยอาศัยตัวจับจำเพาะ (specific receptor) บนผิวเม็ดเลือดแดง เมื่อ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้แล้ว โครงสร้างจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการสลายตัวของเยื่อหุ้มชั้น microtubule และ apical complex เซลล์จะมีรูปร่างกลมตรงกลางมี vacuole ขนาดใหญ่ซึ่งจะดัน nucleus และ cytoplasm ไปอยู่ที่ขอบของเซลล์ ทำให้เซลล์มีรูปร่างคล้ายวงแหวน (ring stage หรือ young trophozoite) จากนั้นเชื้อมาลาเรียจะเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณ cytoplasm ทำให้ vacuole มีขนาดเล็กลงเปลี่ยนเป็น growing trophozoite เชื้อมาลาเรียจะแบ่งตัวโดยไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง เมื่อ nucleus แบ่งตัวเต็มที่แล้ว nucleus จะเคลื่อนที่ไปบริเวณขอบเซลล์ที่เกิด cytomere จากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการคอดตัวมาชิดกันทำให้เกิดเซลล์ใหม่ หรือ merozoite กระบวนการที่เชื้อเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงหรือ erythrocytic schizogony ใช้เวลาประมาณ 56-72 ชั่วโมง เม็ดเลือดแดงที่ schizont มีการแบ่งตัวอย่างสมบูรณ์แล้วจะแตกออก ทำให้ merozoite ถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือด จากนั้นจะลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และเจริญเป็นวัฏจักรต่อไป การแตกตัวของเม็ดเลือดแดงมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไข้หนาวสั่นในผู้ป่วย เรียกระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตและแบ่งตัวในเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดว่า asexual erythrocytic stage

การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงจำเป็นต้องใช้สารอาหารจาก host cell เช่น กลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน และฮีโมโกลบิน เป็นต้น โดยที่ฮีโมโกลบินซึ่งอยู่ใน cytoplasm ของเม็ดเลือดแดงที่ถูกกินและย่อยเพื่อนำกรดอะมิโนไปใช้นั้น เชื้อมาลาเรียไม่อาจย่อยสลาย heme ได้ และ heme นี้มีพิษต่อเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นจึงถูกกำจัดในรูปของกากอาหาร (malarial pigment หรือ hemozoin) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของ heme (Slater et al., 1991) มีลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลาวเพราะมีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้ขนาด ปริมาณและสีของ malarial pigment จะแตกต่างกันเล็กน้อยตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ภายหลังจากเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศประมาณ 2-3 รอบ จะมี merozoite จำนวนหนึ่งเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และเจริญเป็นระยะมีเพศเรียกว่า gametocyte โดย gametocyte เพศผู้เรียกว่า microgametocyte หรือ male gametocyte และ gametocyte เพศเมีย เรียกว่า macrogametocyte หรือ female gametocyte สำหรับกระบวนการสร้างระยะมีเพศนี้เรียกว่า gametogenesis ปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น gametocyte ยังไม่ทราบแน่นอน แต่อาจเกี่ยวข้องกับอัตราการติดเชื้ออย่างมากของเม็ดเลือดแดง (high parasitemia) ภาวะที่ host มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อใน asexual erythrocytic stage หรืออาจเกิดจากผลของยาบางชนิด (Sinden, 1983)

เมื่อ merozoite เข้าไปในเม็ดเลือดแดงแล้ว เชื้อมาลาเรียจะเพิ่มจำนวน nucleus และ cytoplasm จน cytoplasm ขยายเกือบเต็มเม็ดเลือดแดงจะพบปริมาณ malarial pigment มากกว่าใน ระยะ schizont พร้อมกับมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยใน *P. falciparum* เมื่อเจริญเต็มที่ gametocyte จะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) หรือกล้วยหอม male gametocyte จะมีลักษณะอ้วนสั้นกว่า female gametocyte ส่วน *P. vivax* *P. malariae* และ *P. ovale* gametocyte จะมีลักษณะกลมรีแต่ female gametocyte จะมีขนาดใหญ่กว่าใน male gametocyte และ gametocyte ของเชื้อทั้ง 4 ชนิด เมื่อย้อมด้วยสียิมซ่าจะพบว่า nucleus ของเพศเมียจะติดสีแดงเข้มอัดแน่น (compact) บริเวณส่วนกลางของเซลล์ ส่วน nucleus ของ male gametocyte จะติดสีแดงอยู่ค่อนข้างกระจาย โดย gametocyte สามารถอยู่ในกระแสเลือดได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง จนกว่าจะถูกกินเลือดเพื่อเจริญเติบโตต่อไปหรือสลายตัว

เมื่อยุกันปล่องเพศเมียมากัดกินเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรีย ยุงจะได้รับเชื้อทุกระยะซึ่งจะถูกย่อยในกระเพาะอาหารของยุง ยกเว้นระยะ gametocyte จะเจริญเติบโตต่อไปเป็นระยะ gamete เรียกกระบวนการนี้ว่า gametogony สำหรับ male gametocyte จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยการแบ่งตัวแบบ mitosis 3 ครั้ง ได้ male gamete 8 ตัว และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยการเกิดกระบวนการสร้างแฟลกเจลลา (exflagellation) โดย male gamete แต่ละตัวจะมีแฟลกเจลลา 1 เส้นและเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) กับ female gamete ภายในกระเพาะอาหาร (stomach lumen) ของยุงได้ zygote จากนั้นมีการสร้างเท้าเทียมเพื่อจะไต่ผ่านเซลล์เยื่อกระเพาะอาหารแล้วไปเจริญที่ผิวหนังนอกของกระเพาะอาหารยุงเรียกระยะนี้ว่า ookinete หลังจากนั้นจะพัฒนาต่อไปเป็น oocyst ซึ่งภายในจะมี sporozoite จำนวนมากประมาณ 1,000 ถึง 2,000 ตัว (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991) เมื่อ oocyst เจริญเต็มที่ ผนัง oocyst จะแตกเชื้อระยะ sporozoite จะถูกปล่อยแพร่มาสู่ช่องอก (thoracic cavity) และไซสุต่อมน้ำลาย (salivary gland) ของยุง เรียกกระบวนการเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงโดยอาศัยการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจนเกิดการสร้าง sporozoite ว่า sporogony ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 8-21 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียและชนิดของยุงพาหะ ตลอดจนสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิภายนอก เป็นต้น



สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย (ดัดแปลงจาก Marquardt & Demaree, 1985)

ยุงพาหะนำเชื้อมาลาเรีย

ไข้มมาลาเรียมียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค สำหรับในประเทศไทยมียุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคมมาลาเรียที่สำคัญสามารถจำแนกตามกลุ่ม ดังนี้

1. ยุงพาหะหลัก (primary vectors) มีบทบาทสูงในการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ป่าเขา สวนยาง และสวนผลไม้ ยุงในกลุ่มนี้ได้แก่

- *Anopheles dirus* เป็นยุงที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการแพร่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทย ชอบเพาะพันธุ์ตามแหล่งน้ำขังที่มีร่มเงา มีนิสัยชอบกัดกินเลือดคนและเกาะพักนอกบ้าน ออกหากินเวลาตั้งแต่ 18.00-04.00 น. ยุงในกลุ่มนี้เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าสามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ชนิดที่พบในประเทศไทย คือ A B C และ D (Green et al., 1992) ส่วนชนิด E และ F พบในต่างประเทศ (Panyim et al., 1988) โดยชนิด A และ D ที่พบในประเทศไทยมีความสามารถในการนำเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ได้ดีเท่าเทียมกัน (Baimai et al., 1988)

- *An. minimus* พบได้ทั่วไปในพื้นที่แถบเชิงเขา ชอบเพาะพันธุ์ตามแหล่งน้ำไหล และน้ำซับ ชอบกัดกินเลือดคนและเกาะพักในบ้าน จะออกหากินเวลาตั้งแต่ 18.00-22.00 น.

- *An. maculatus* เป็นยุงพาหะสำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทยและมาเลเซียเพาะพันธุ์ในลำธารน้ำไหลที่แสงแดดส่องถึง มีนิสัยที่ชอบกัดกินเลือดสัตว์และคน ออกหากินเวลา ตั้งแต่ 18.00-21.00 น.

2. ยุงพาหะรอง (secondary vectors) ได้แก่

- *An. sudaicus* พบในพื้นที่ชายทะเลและเกาะแก่งต่างๆ ทางภาคตะวันออกและ ภาคใต้ เพาะพันธุ์ในน้ำกร่อยและชอบกัดคนนอกบ้าน

- *An. aconitus* พบทั่วไปในพื้นที่ป่าเขาและที่ราบทุ่งนาทั่วประเทศ มีนิสัยชอบกัดสัตว์และคนนอกบ้าน และมีความชุกชุมสูงในช่วงฤดูฝน

- *An. pseudowillmori* เป็นยุงในกลุ่ม *An. maculatus* เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* ในท้องที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

นอกจากนี้ ยังพบว่ามียุงบางชนิดที่ค้นพบว่าสามารถเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียได้จากการตรวจหา circumsporozoite protein (CSP) โดยวิธี ELISA ได้แก่ *An. sawadwongporni* *An. nivipes* และ *An. hyrcanus group* (Rattarithikul et al., 1996)

การติดต่อของเชื้อมาลาเรียสู่คน

1. ติดต่อโดยถูกยุงก้นปล่องที่มีเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายกัด วิธีนี้เป็นวิธีการติดต่อทางธรรมชาติที่พบมากที่สุด
2. ติดต่อจากแม่ที่มีเชื้อมาลาเรียในร่างกายและถ่ายทอดทางรกไปสู่ทารกในครรภ์ วิธีนี้พบไม่มากนักในพื้นที่ที่มีมาลาเรียชุกชุม
3. ติดต่อโดยการให้เลือด จะพบในผู้บริจาคเลือดที่มีความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดระดับต่ำและไม่มีอาการ ซึ่งหากไม่ได้ทำการตรวจหาเชื้อมาลาเรียก่อน ผู้ป่วยที่รับเลือดจะป่วยเป็นมาลาเรียได้

ภูมิตอบสนองต่อเชื้อมาลาเรีย

เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีวงจรชีวิตที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่แตกต่างกันทั้งในคนและในยุง ซึ่งในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดและมีความจำเพาะในแต่ละระยะ นอกจากนี้โปรตีนชนิดเดียวกันอาจมีความหลากหลายในองค์ประกอบของกรดอะมิโนแตกต่างกันไปตาม species และสายพันธุ์ (clone) ของเชื้อมาลาเรีย องค์ประกอบของโปรตีนที่มีมากมายหลายชนิดตามขั้นตอนของการเจริญเติบโตนั้น เชื่อว่าอาจมีผลให้รอดพ้นจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของ host โดยทั่วไป host เมื่อได้รับเชื้อมาลาเรียจะมีภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การมี circulating antigen ของเชื้อมาลาเรีย การกระตุ้นการสร้าง antibody การเกิด immune complex และการเพิ่มขึ้นของปริมาณ IgG และ IgM เป็นต้น

ความสามารถในการตอบสนองต่อ antigen ของเชื้อแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน เมื่อมีการติดเชื้อมาลาเรีย ร่างกายจะถูกกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral immunity และ cell-mediated immunity ภูมิคุ้มกันเหล่านี้ส่วนใหญ่ไม่มีความจำเพาะต่อการทำลายเชื้อมาลาเรีย การสร้าง antibody ต่อเชื้อมาลาเรียในร่างกายคนมีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อในกระแสโลหิต โดย antibody จะถูกสร้างอย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 สัปดาห์หลังการติดเชื้อและจะคงอยู่ในระดับสูง (ค่า titer อาจสูงถึงระดับ 1:2,560) จนถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยจะลดลงสู่ระดับต่ำ (ค่า titer ระดับ 1:20-1:40) ภายในเวลา 4-6 เดือน และส่วนใหญ่จะหายไปภายในเวลา 6 เดือน (Kuvin et al., 1961)

อย่างไรก็ตาม ในการติดเชื้อมาลาเรีย ร่างกายจะสร้าง antibody แบบจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียทั้งชนิด IgM และ IgG ซึ่งภูมิคุ้มกันเหล่านี้จะไม่มีผลในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำ แต่จะมีผลในทางป้องกันอาการและการแสดงของโรค รวมทั้งป้องกันความรุนแรงของโรค ดังนั้นจึงมักพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียในบางรายอาการรุนแรง ในขณะที่บางรายจะแสดงอาการไม่มากนัก ขึ้นอยู่กับภูมิตอบสนองของบุคคลเหล่านั้น (Warren, 1993)

สำหรับ antigen และ circulating antigen ที่สามารถตรวจพบได้ในช่วงที่มีการติดเชื้อ มาลาเรียที่มีบทบาทในการช่วยวินิจฉัยโรคมาลาเรีย ได้แก่

1. **Histidine rich protein (HRP) *P. falciparum*** ที่เข้าไปเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดง จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ให้เป็นตุ่มยื่นออกมา (knob) ซึ่งเป็นปัจจัยประการหนึ่งในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงจากการอุดตันของหลอดเลือดขนาดเล็กที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะสมอง HRP เป็น polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 KDa (Kilejian, 1984) โดยสามารถจำแนก HRP ได้เป็น 3 ชนิด คือ (Panton et al., 1989)

1.1 HRP I หรือ knob protein (KP) หรือ knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) ประกอบด้วย histidine ร้อยละ 8 พบแทรกอยู่ใน cytoskeleton ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ในบริเวณส่วนที่เป็นฐานของ knob

1.2 HRP II หรือ Soluble histidine-alanine rich protein (Soluble HARP) หรือ *P. falciparum* HRP II (PfHRP II) ประกอบด้วย histidine ร้อยละ 35 alanine ร้อยละ 37 และ aspartic acid ร้อยละ 10 ถูกสังเคราะห์และขนส่งออกนอกเซลล์ในช่วงการเจริญแบบไม่อาศัยเพศ ลักษณะที่สำคัญของ HRP II คือ ถูกผลิตออกมาจำนวนมาก มี amino acid sequence ซ้ำกันถึง 12 ชุด (tandem repeat) มีความสามารถในการจับกับ metal ion และที่สำคัญ คือ สามารถกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้าง antibody

1.3 HRP III หรือ Small histidine-alanine rich protein (SHARP) ประกอบด้วย histidine ร้อยละ 30 alanine ร้อยละ 29 มีการสร้างในระยะที่มีการเจริญแบบไม่อาศัยเพศเช่นกัน

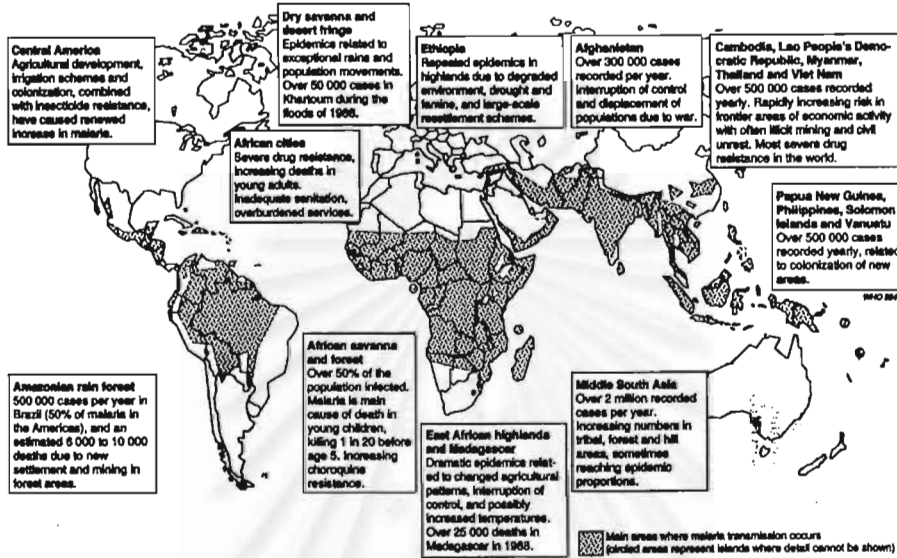
2. **Lactate dehydrogenase (LDH)** ประกอบด้วย polypeptide 4 หน่วยย่อย ที่มีการจัดเรียงตัวได้เป็นเอ็นไซม์ที่ต่างชนิด (isoenzyme) โมเลกุล LDH มีน้ำหนักประมาณ 35 KDa จะพบ LDH ในเซลล์ที่ต้องการพลังงานซึ่งจะได้จากปฏิกิริยา glycolysis โดยไม่ใช้ออกซิเจน LDH จะช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายเพื่อเปลี่ยน pyruvate ให้เป็น acetic acid และพลังงาน (Krap, 1996) LDH ของเชื้อมาลาเรียมีความจำเพาะสำหรับแต่ละ species และมีความแตกต่างจาก LDH ของคน (Kaushal et al., 1988)

การกระจายทางภูมิศาสตร์

การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย ขึ้นอยู่กับการมี host ที่เหมาะสม โดยเฉพาะเชื้อมาลาเรียจำเป็นต้องอาศัยยุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค จึงทำให้การแพร่โรคมาลาเรียอยู่ในวงจำกัดที่มีแหล่งเพาะพันธุ์ยุงพาหะนำโรค มาลาเรียมีขอบเขตการแพร่กระจายของโรคอยู่ในพื้นที่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 64° เหนือ ถึงเส้นรุ้งที่ 32° ใต้ และครอบคลุมพื้นที่ซึ่งอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำทะเล

400 เมตร จนถึงสูงกว่าระดับน้ำทะเล 2,600 เมตร อุณหภูมิระหว่าง 16-38°C ความชื้นสัมพัทธ์ สูงกว่าร้อยละ 60 จึงเหมาะสำหรับการแพร่กระจาย โดยเชื้อมาลาเรียในคนพบในพื้นที่ต่างๆ ดังนี้

Figure 1. Malaria distribution and problem areas



รูปที่ 2 แผนที่ระบาดโรคมาลาเรียทั่วโลก (WHO, 1993)

P. falciparum จะพบได้ทั่วไปในเขตร้อนและอบอุ่น ไม่พบเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ในท้องถิ่นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 21.1°C เชื้อชนิดนี้พบมากในเขตร้อนของแอฟริกา อเมริกา และเอเชีย ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะพื้นที่บริเวณชายแดน

P. vivax พบได้กว้างขวาง การแพร่เชื้อจะเกิดในฤดูร้อนของเขตอบอุ่น การแพร่ระบาดขึ้นอยู่กับฤดูกาล โดยทั่วไปมาลาเรียจะแพร่กระจายมากหลังฤดูฝน โดยมีอัตราการแพร่กระจายสูงสุดของโรคประมาณ 1 เดือนหลังจากช่วงที่ยุงกินปล่องหนาแน่นที่สุด ในทวีปแอฟริกาด้านตะวันตกจะพบผู้ที่ติดเชื้อชนิดนี้ไม่มากนัก เพราะชาวแอฟริกาหลายพื้นที่ที่ไม่มี Duffy blood factor ดังนั้น

P. vivax จึงเข้าเม็ดเลือดแดงไม่ได้

P. malariae มีการแพร่กระจายในพื้นที่จำกัด พบในแอฟริกากลางและตะวันตก ศรีลังกา และบางส่วนของประเทศมาเลเซีย

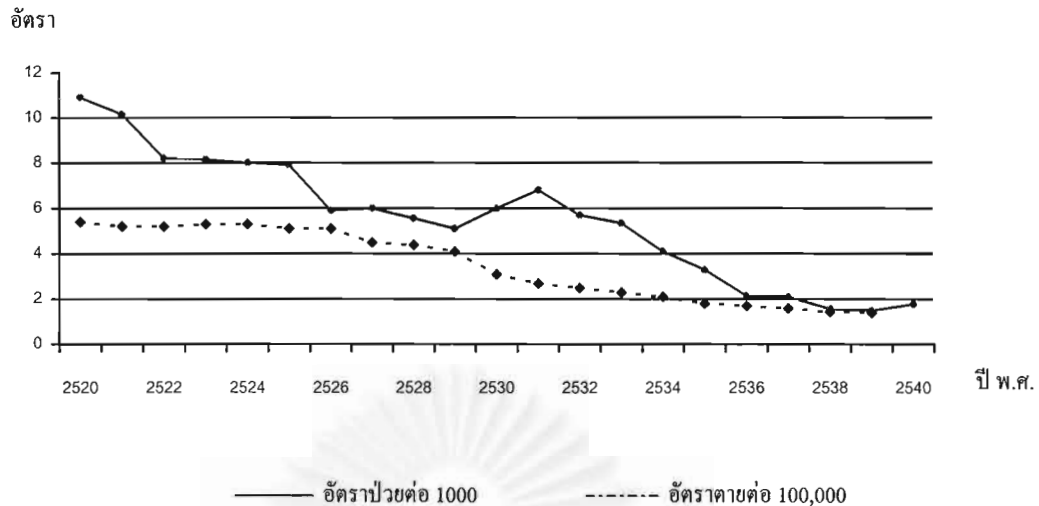
P. ovale พบมากในแอฟริกาตะวันตก มีรายงานการพบในฟิลิปปินส์ บอร์เนียว ออสเตรเลียเหนือ และหมู่เกาะโซโลมอน สำหรับประเทศไทยพบเพียงปีละ 4-5 รายเท่านั้น (Marquardt & Demaree, 1985)

ระบาดวิทยาของมาลาเรียในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทย โรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศมาโดยตลอด นอกจากนี้มาลาเรียยังมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศโดยรวม ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ปี พ.ศ. 2484 อัตราตายด้วยโรคมาลาเรียสูงกว่า 350 ต่อแสนประชากร ซึ่งเป็นสาเหตุการตายในอันดับแรกในขณะนั้น ต่อมาในปี พ.ศ. 2492 รัฐบาลไทยร่วมกับองค์การอนามัยโลก ทดลองควบคุมโรคมาลาเรียด้วยการพ่นคิตีทีในพื้นที่อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ปีละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 2 ปี พบว่าสามารถหยุดการแพร่เชื้อในอำเภอนี้ได้ ในปี พ.ศ. 2494 จึงเริ่มขยายโครงการควบคุมโรคมาลาเรียโดยใช้การพ่นคิตีทีเป็นหลักในพื้นที่ที่มีอัตราการแพร่เชื้อสูงทั่วประเทศ ต่อมาพบว่านโยบายดังกล่าวไม่สามารถกำจัดโรคมาลาเรียให้หมดไปได้และพบว่าบางประเทศไม่มีงบประมาณเพียงพอที่จะดำเนินการได้ ในปี พ.ศ. 2521 องค์การอนามัยโลกจึงมีนโยบายให้กลับมาใช้โครงการควบคุมโรคมาลาเรียแบบผสมผสานกับโครงการกำจัดโรคมาลาเรียตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 เป็นต้นมา

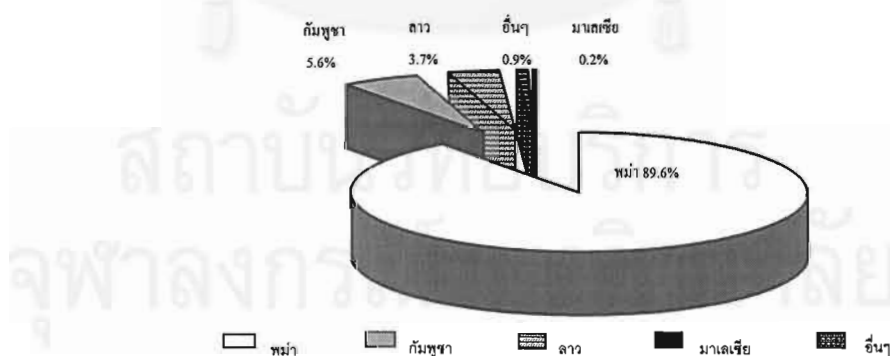
ในปัจจุบันปัญหาการแพร่เชื้อมาลาเรียจะมีสูงมากในบริเวณท้องที่ชายแดน 30 จังหวัดที่ติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน คือ พม่า ลาว กัมพูชา และมาเลเซีย ในปี พ.ศ. 2540 พบว่าท้องที่ดังกล่าวมีผู้ป่วยมาลาเรียสูงถึง 66,620 ราย เพิ่มขึ้นจากปีงบประมาณ 2539 ร้อยละ 8.2 ซึ่งจังหวัดชายแดนที่พบผู้ป่วยมาลาเรียมากที่สุด คือ จังหวัดชายแดนไทย-เมียนมาคิดเป็นร้อยละ 80.56 ของจำนวนผู้ป่วยชายแดนทั้งหมด และจังหวัดที่พบผู้ป่วยมากที่สุด 10 จังหวัดแรก ได้แก่ ตาก กาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน ตราด เชียงใหม่ ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี จันทบุรี เชียงราย และชุมพร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 กราฟแสดงอัตราป่วยและอัตราตายด้วยโรคมาลาเรียในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520-2540 (กองมาลาเรีย, 2541)

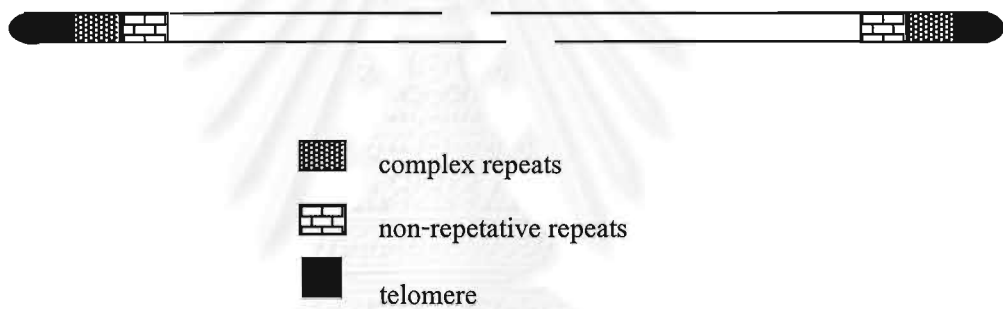
นอกจากนี้พบว่า แรงงานต่างชาติที่ลักลอบเข้ามาประมาณ 500,000–700,000 คน กระจายอยู่ทั่วประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียสูงและมักพบว่าบุคคลเหล่านี้มีเชื้อมาลาเรียในร่างกายไม่ว่าจะมีอาการของโรคหรือไม่ก็ตาม จึงทำให้การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียเกิดมากยิ่งขึ้น รวมทั้งมีการอพยพเคลื่อนย้ายประชากรสูงในพื้นที่ป่าเขาที่เหมาะสมต่อการเพาะพันธุ์ยุงพาหะและการแพร่เชื้อ ส่งผลกระทบต่อสถานการณ์โรคมาลาเรียของประเทศไทย



รูปที่ 4 แสดงสัดส่วนการตรวจพบเชื้อมาลาเรียในชาวต่างชาติที่เข้ามาในประเทศไทย (กองมาลาเรีย, 2541)

พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

การศึกษาทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค pulsed field gradient gel electrophoresis และ southern blot hybridization (Kemp et al., 1985) ทำให้ทราบว่า *P. falciparum* มีโครโมโซมขนาดแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 650 Kb ถึง 3.4 Mb โดยการจัดเรียงโครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดเป็นโครโมโซมที่ 1 เรียงลำดับตามขนาดขึ้นมาจากโครโมโซมที่ 14 มีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมที่ปลายทั้งสองข้าง (telomere) ของสิ่งมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสจะมีความคล้ายกันประกอบด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกันเป็นชุดเรียงติดต่อกัน (tandem repeated sequence) มีหน้าที่ช่วยให้ดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณตอนปลายของโครโมโซมเกิดการจำลองตัวเองอย่างสมบูรณ์และรักษาให้มีสภาพเป็นเส้นอยู่ได้ (Blackburn, 1984)



รูปที่ 5 *Plasmodium falciparum* chromosome

เชื้อมาลาเรียทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน และจากการทำ hybridization ด้วย probe ชนิดต่างๆ ที่มีความจำเพาะกับ gene ที่สร้างโปรตีนของเชื้อ *P. falciparum* ได้แก่ glucose phosphate isomerase (*pfpgi*) thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) histidine-rich proteins-II และ III (HRP-II และ HRP III) acidic basic repeat antigen (ABRA) exported protein 1 (Exp-1) apical membrane antigen-1 (AMA-1) M_r 25,000 sexual stage-specific antigen (Pfs25) S-antigen (SAg) liver-stage-specific antigen (LSA) M_r 130,000 putative glycophorin-binding protein (GBP-130) merozoite surface antigens (gp195) glucose-regulated protein (grp) mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) falciparum interspersed repeat antigen (FIRA) dihydrofolate reductase/thymidylate synthase (DHFR/TS) circumsporozoite protein (CSP) knob-

associated histidine-rich protein I (KAHRP) serine repeat antigen (SERA) clustered-asparagine-rich protein (CARP) M_r 45,000 merozoite surface protein antigen (Ag513) และ ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) สำหรับ pH9.45 pS590.7 และ pSc11.63 เป็น probe ที่จำเพาะกับโครโมโซมที่ 8 ที่ 7 และที่ 6 ตามลำดับ ทำให้ทราบตำแหน่งของ gene ต่างๆ บนโครโมโซม (chromosome mapping) (Wellems et al., 1991) (รายละเอียดดังตารางที่ 1) และเชื่อว่า gene ซึ่งควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมที่เรียงอยู่บนโครโมโซมจะมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (crossing-over) ระหว่างการปฏิสนธิในยุง ทำให้เชื้อมาลาเรียรุ่นต่อมาอาจมีลักษณะพันธุกรรมใหม่ที่ต่างไปจากเดิม (Walliker et al., 1987) ในบางครั้งนิวคลีโอไทด์อาจถูกแทรกเพิ่ม (insertion) หรือหายไป (deletion) ซึ่งอาจนำมาสู่การเปลี่ยนแปลงแบบผ่าเหล่า (mutation)

chromosome	size(Mb)	chromosome identification probe
1	0.8	RESA
2	1.1	KAHRP, SERA, CARP, Ag513
3	1.4	CSP
4	1.4	DHFR/TS
5	2.1	<i>pfmdr1</i> , MESA, FIRA
6	1.6	pSc11.63
7	1.7	pS590.7
8	1.6	HRP-II, pH 9.45
9	1.7	gp195, grp
10	2.1	Pfs25, SA _g , LSA, GBP-130
11	2.5	Exp-1, AMA1
12	2.7	ABRA
13	3.2	TRAP, HRP-III
14	3.5	<i>pfmdr2</i> , <i>Pfpgi</i>

ตารางที่ 1 : แสดงยีนต่างๆ ที่พบบนโครโมโซมของ *P. falciparum* (Dd2 clone)
(Wellems et al., 1991)

ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียจะมีการจัดเรียงอย่างมีระเบียบจากลำดับของ nucleic acid บนสายดีเอ็นเอ การแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรม (gene expression) โดยผ่านทาง RNA

ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการสร้างโปรตีนที่จำเพาะ ลักษณะเฉพาะที่ปรากฏของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด นั้นเป็นผลการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายชนิด

การสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นจากองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ amino acid ribosome ribonucleic acid (RNA) adenosine triphosphate (ATP) เป็นแหล่งพลังงาน guanosine triphosphate เป็นแหล่งพลังงานในการสังเคราะห์ peptide bond นอกจากนี้ยังต้องการไอออนชนิดต่างๆ เช่น Mg^{++} NH_4^+ และ K^+

ในระหว่างการสังเคราะห์โปรตีน ข้อมูลทางพันธุกรรมจะถูกส่งผ่านมาในรูปของ mRNA แต่การสังเคราะห์โปรตีนจะเกิดขึ้นบน intracellular particle ที่เรียกว่า ribosome ซึ่งเป็น nucleoprotein ประกอบด้วยเอ็นไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีน ribosome จะประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย และถูกกำหนดชนิดจากตัวเลขที่แสดงถึงระดับความเร็วที่ใช้ในการ ตกตะกอน ribosome ของ prokaryotic cell และ eukaryotic cell นั้นมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ ribosome ของ prokaryotic cell จะมีขนาด 70S ซึ่งจะประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ส่วน คือ 30S และ 50S เมื่อนำหน่วยย่อยแต่ละหน่วยมาทำการแยกในสภาวะที่เหมาะสม จะพบ ribosome หน่วยย่อย (small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA) ขนาดต่างๆ และโปรตีน คือ

30S ประกอบด้วย 16S rRNA และ โปรตีน 21 ชนิด

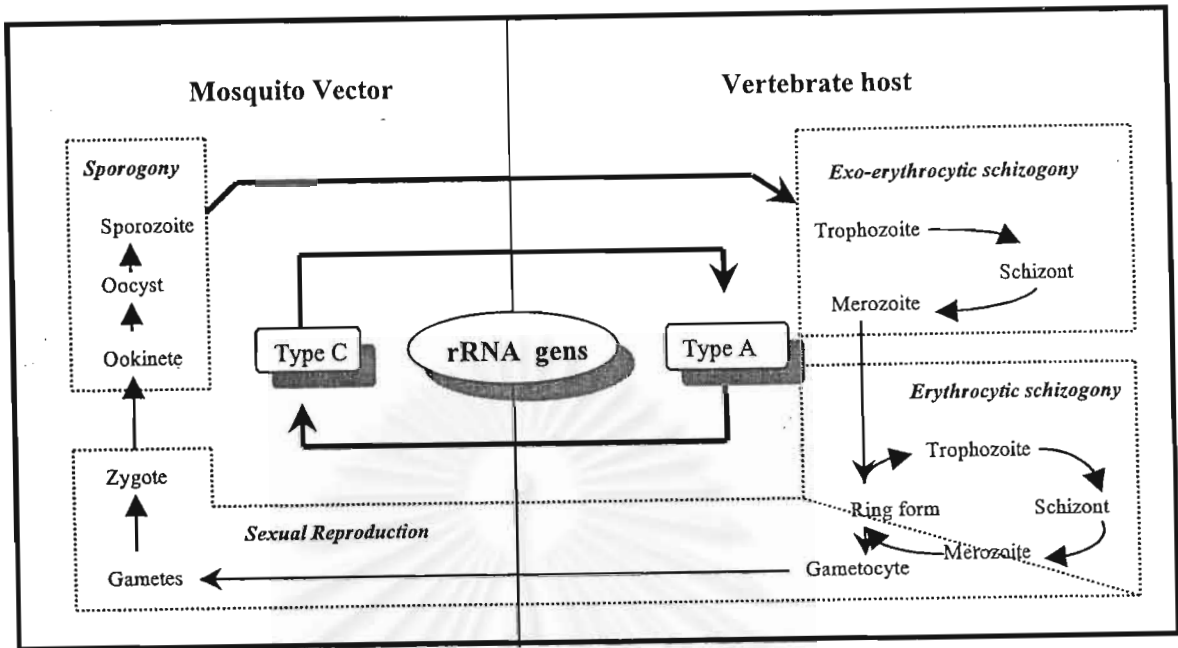
50S ประกอบด้วย 5S rRNA 23S rRNA และ โปรตีน 32 ชนิด

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

40S ประกอบด้วย 18S rRNA และ โปรตีน 30 ชนิด

60S ประกอบด้วย 5S rRNA 5.8S rRNA 28S rRNA และ โปรตีน 50 ชนิด

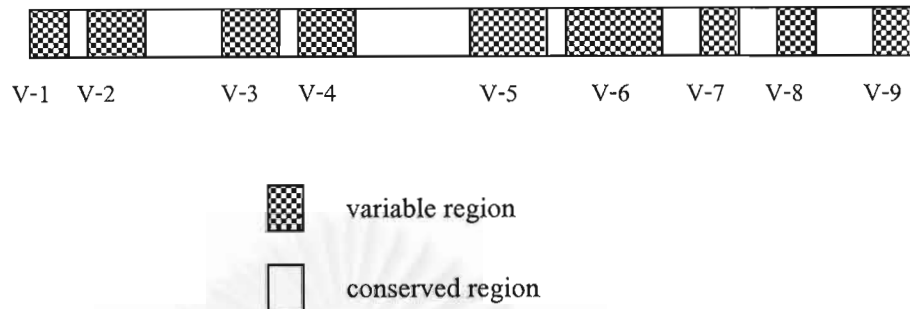
SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียมีความยาวประมาณ 2 Kb มีการสร้าง ribosomal RNA อย่างเป็นระเบียบในแต่ละช่วงของชีวิต SSU rRNA gene ชนิด A ของเชื้อมาลาเรียจะทำหน้าที่ใน ระยะที่เชื้ออาศัยอยู่ในเลือด (asexual blood stage) ใน host ที่มีกระดูกสันหลัง (vertebrate host) ส่วน ยีนชนิด C จะทำหน้าที่ในช่วงที่อาศัยอยู่ในยุง การที่กลุ่มยีนทั้ง 2 ชนิดมีการแสดงออกอย่างสัมพันธ์กันในแต่ละช่วงของวงชีวิต อาจเกี่ยวข้องกับผลของสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น ความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความชื้น หรือลักษณะทางพันธุกรรมของ host (Li et al., 1993)



รูปที่ 6 แสดง rRNA gene transcription ของเชื้อมาลาเรีย (Waters & McCutchan, 1989)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อมาลาเรีย species ต่างๆ ในส่วนของ SSU rRNA gene พบว่าประกอบด้วยส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสสูง (conserved regions) และส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับเบส (variable regions) ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (eukaryotic organisms) จะพบการเรียงตัวซ้ำกันของลำดับเบสใน SSU rRNA gene (repetitive and tandem arrays) ในวงจำกัดเพียง 1-3 แห่งในโครโมโซม 1 ชุด (genome) ส่วนเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีลักษณะดังกล่าว 4-7 gene ซึ่งกระจายอยู่ในโครโมโซมต่างๆ ในเซลล์พบว่าความแตกต่างของ gene นี้สามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย (Gunderson et al., 1995) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ส่วนของยีนดังกล่าวในการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย (Waters & McCutchan, 1989; Lal et al., 1989; Li et al., 1995)

Plasmodium small subunit rRNA



รูปที่ 7 แสดง SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรีย (Li et al., 1995)

ประเด็นที่มีการศึกษา rRNA gene และนำไปใช้ประโยชน์ คือ (Waters, 1994)

1. ด้านอณูชีวภาพ (Molecular biology) เกี่ยวข้องโดยตรงกับหน้าที่หลักของ rRNA gene รวมถึงความเข้าใจในกลไกการทำงานของ gene ที่มีบทบาทในการสังเคราะห์โปรตีนและเอ็นไซม์ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาของ rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียอาจนำไปสู่การควบคุมและป้องกัน โรคมาลาเรีย
2. สายวิวัฒนาการระดับอณูชีววิทยา (Molecular phylogeny) จาก sequence analysis ที่แสดงออกในลักษณะความคงที่ในการทำงานในรูปของ conserved structure ของ SSU rRNA เป็นข้อมูลที่สำคัญส่วนหนึ่งในการศึกษาสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย
3. ด้านการช่วยวินิจฉัย (Diagnostics) โดย rRNA gene มีขนาดใหญ่ มีหลาย copy มีส่วนที่มีลักษณะเฉพาะที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือ ในการตรวจวินิจฉัย โรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพสูง

วิธีการตรวจเพื่อการวินิจฉัยมาลาเรียสามารถจำแนกออกได้เป็น

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

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังเป็นวิธีที่ดีที่สุด ซึ่งนิยมใช้กันอยู่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน จำแนกตามชนิดสีที่ใช้ย้อม ดังนี้

1. การย้อมด้วยสียิมซ่า จำแนกเป็น

1.1 การตรวจด้วยฟิล์มเลือดบาง โดยการไถเลือดผู้ป่วยเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนแผ่นสไลด์และย้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อ โดยการนับเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย คิดอัตราเป็นร้อยละของเม็ดเลือดที่ติดเชื้อ

1.2 วิธีการตรวจด้วยฟิล์มเลือดหนา โดยการหยดลงบนสไลด์ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้วปล่อยให้เชื้อมาลาเรียออกมาในระหว่างการย้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อ โดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 200 ตัว

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการย้อมฟิล์มเลือดด้วยสียิมซ่ามีข้อดี คือ

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

- มีความจำเพาะสูง สามารถจำแนกชนิดเชื้อ เป็นวิธีที่เหมาะสมในทางปฏิบัติเพื่อวินิจฉัยโรคทางคลินิก ส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที

- เป็นวิธีที่ตรวจได้ง่ายและยังสามารถบอกได้ว่าเชื้อมาลาเรียที่พบมีรูปร่างอย่างไร

(Bruce-Chwatt, 1993)

2. การย้อมด้วยสีอคริดีน ออเรนจ์ (Acridine orange stain) จำแนกเป็น

2.1 เนื่องจากการย้อมฟิล์มเลือดด้วยสียิมซ่านั้นมีข้อเสีย คือ ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ตรวจเป็นสำคัญ เพื่อให้การตรวจหาเชื้อมาลาเรียง่ายขึ้น จึงใช้สี acridine orange ย้อมฟิล์มเลือด ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับแสงที่มีช่วงคลื่นสั้นแต่มีพลังงานสูง เช่น แสง ultra violet และเปล่งแสงที่มีช่วงคลื่นยาวกว่า ดังนั้นต้องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มี interference filter ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นกระจกเคลือบสีเรืองแสงไว้ได้คอนเดนเซอร์ และใส่ barrier filter SD-54 ซึ่งมีแสงสีเหลืองไว้ได้เลนส์ตา ใช้แหล่งกำเนิดแสงจาก halogen light source ข้อดีของวิธีนี้ คือ เชื้อมาลาเรียที่ถูกย้อมด้วยสีดังกล่าวสามารถเรืองแสงได้ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังกล่าว ทำให้สามารถมองเห็นส่วนประกอบของเชื้อมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงชัดเจนยิ่งขึ้น สามารถตรวจเชื้อมาลาเรียที่ความหนาแน่นประมาณ 5 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร แต่ก็มีข้อเสีย คือ acridine orange มีพิษต่อเยื่อผิวหนังต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต และไม่สะดวกในการนำมาใช้ในภาคสนามเพราะต้องใช้อุปกรณ์ประกอบกล้องจุลทรรศน์และเครื่องกำเนิดแสง ซึ่งต่อมาสามารถพัฒนาใช้เลนส์พิเศษขึ้นเดียวในการ

กรองแสงแดดให้เหลือเฉพาะแสงที่ทำให้เชื้อมาลาเรียเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) เมื่อย้อมด้วยสี acridine orange (Kawamoto, 1991)

2.2 Quantitative buffy coat (QBC) เป็นการนำ acridine orange มาเคลือบที่ผิวด้านในของ capillary tube เมื่อบรรจุเลือดลงในหลอดดังกล่าว เชื้อมาลาเรียที่ถูกย้อมจะเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้เลนส์พิเศษขึ้นเดียวในการกรองแสงแดดให้เหลือเฉพาะแสงที่ทำให้เกิดฟลูออเรสเซนซ์ (Anthony et al., 1992)

การตรวจหา antibody ในซีรัม

การศึกษาวิจัยเพื่อตรวจหา antibody ที่มีความเฉพาะต่อเชื้อมาลาเรียมีประโยชน์สำหรับงานทางด้านระบาดวิทยาของมาลาเรีย วิธีการตรวจดังกล่าว ได้แก่

1. Indirect immunofluorescent antibody test (IFA) (Voller et al., 1977) เป็นวิธีการตรวจหา antibody โดยนำเอาซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียหรือตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาเจือจางที่ระดับต่างกันโดยลำดับ แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่ทำเป็นแผ่นฟิล์มบนสไลด์ หลังจากนั้นนำไปล้างซีรัมส่วนเกินออก นำ antihuman-immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC) เป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง นำไปตรวจหา antibody ในซีรัมจากการเรืองแสงบนตัวของเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ antigen ที่ใช้ในการตรวจเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน ซึ่งเตรียมจากเลือดผู้ป่วยมาลาเรียหรือเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ วิธีนี้จะให้ผลบวกในผู้ป่วยมาลาเรียโดยตรวจพบ antibody เมื่อเริ่มมีเชื้อมาลาเรียในเลือดและระดับ antibody จะสูงขึ้นเรื่อยๆ ในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์แรก ต่อมาระดับ antibody จะลดต่ำลง antibody ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างนี้ ส่วนใหญ่จะเป็น antibody ชนิด IgG และ IgM โดย antibody ชนิด IgM จะอยู่ไม่นาน แต่ IgG จะอยู่ได้นานกว่า ข้อดีของวิธีการนี้คือการเตรียม antigen สะดวก เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากพอสมควร ซึ่งสัมพันธ์กับการเคยติดเชื้อมาลาเรีย ส่วนข้อเสีย คือ ใช้ได้แต่ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือ เช่น กล้องจุลทรรศน์-ฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้การอ่านผลในห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งอาจให้ผลสรุปต่างกันและโดยทั่วไปไม่สามารถแยกผู้ที่เคยติดเชื้อมาลาเรียออกจากผู้ที่กำลังมีเชื้ออยู่ภายในร่างกายได้ เนื่องจากระดับ antibody ยังคงอยู่ยาวนานหลังจากเชื้อได้หมดไปจากร่างกายแล้ว

2. Indirect hemagglutination test (IHA) (Tharavanij et al., 1984) เป็นวิธีการตรวจที่อาศัยเม็ดเลือดแดงเป็นตัวกลาง โดยให้ antigen ของเชื้อมาลาเรียที่ไปเกาะเชื่อมโยงกับ antigen ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง โดยใช้ tannic acid หรือ chromic chloride เป็นตัวช่วย หลังจากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับซีรัมที่มี antibody ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อจะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจน สามารถอ่านระดับความเข้มข้นของ antibody จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น วิธีนี้มีคุณค่าและประโยชน์ใน

การตรวจหา antibody คล้ายคลึงกับวิธี IFA ข้อดีของวิธี IHA คือ เป็นวิธีที่กระทำง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สามารถเก็บ antigen ของเชื้อมาลาเรียในรูปแห้ง (lyophilized) ได้เป็นระยะเวลานานและใช้ตรวจซีรัมได้คราวละจำนวนมาก สามารถประยุกต์ใช้ได้ในทุกพื้นที่ที่มีความไวสูงกว่าวิธี IFA ส่วนข้อจำกัดของวิธี IHA คือ การเตรียมและการทำ antigen ให้ได้มาตรฐานนั้นยุ่งยากกว่าการเตรียม antigen ที่ใช้ในวิธีของ IFA ดังนั้นจึงเตรียมได้เฉพาะห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น และเมื่อนำมาทดสอบผู้ป่วยมาลาเรียระยะเฉียบพลันหรือได้รับเชื้อเป็นครั้งแรก พบว่ามีความไวต่ำกว่าวิธี IFA นอกจากนี้วิธี IHA ไม่สามารถระบุชนิดของ antibody ได้

3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Voller et al., 1986) เป็นปฏิกิริยาที่นำเอา antigen ที่จำเพาะที่ต้องการจะทดสอบมาเกาะติดกับ solid phase เช่น ผิวของ microtiter plate หรือหลอดทดลอง ซึ่งอาจทำมาจากพลาสติกจำพวก polypropylene polystyrene polyvinyl หรือ nylon หลังจากนั้นเติมซีรัมที่ต้องการจะทดสอบลงไปโดยให้ความเข้มข้นที่ระดับต่างกันหรือใช้ความเข้มข้นของซีรัมระดับเดียวลงไป ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา แล้วล้างเอาซีรัมส่วนเกินออก เติม anti-human immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase หรือ alkaline phosphatase ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไปเพื่อให้เกิดสี ตรวจวัดระดับ antibody ที่จำเพาะ โดยดูจากสีของ substrate ที่เปลี่ยนไปด้วยตาเปล่า ในกรณีที่ตรวจ ซีรัมที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันอาจใช้เครื่องอ่านผลช่วย (ELISA reader) วิธี ELISA นี้มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ค่อนข้างง่าย จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจในภาคสนาม เพื่อนำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมาก (Arruda, 1996) อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้ ELISA reader จะเพิ่มความถูกต้องในการอ่านผลมากขึ้น นอกจากนี้วิธี ELISA ยังเป็นวิธีที่มีความไวสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IHA และการตรวจหาระดับ antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียยังสามารถบอกระดับและความจำเพาะของ antibody ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และชนิดของ antigen ที่ใช้ตรวจสอบ รวมทั้งอาจใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นมาลาเรียที่มีอยู่ในพื้นที่ที่ไม่มีภาวะระบาดของมาลาเรีย ข้อจำกัดคือ การเตรียม antigen ที่ไม่สามารถเตรียมได้ทุกห้องปฏิบัติการและการทดสอบอาจให้ผลลบในผู้ป่วยมาลาเรียระยะเฉียบพลันหรือเพิ่งติดเชื้อมาครั้งแรก ตลอดจนระดับ antibody อาจคงอยู่นานแม้ว่าจะหายจากโรคมาลาเรียแล้ว

การตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรีย

1. Radioimmunoassay (RIA) และ Immunoradiometric assay (IRMA) การตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรียในเลือด โดยหา antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ของเชื้อมาลาเรียทำการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นตัวทดสอบโดยวิธี RIA และ IRMA หลักการของวิธี RIA คือ solid phase antibody binding inhibition test สามารถตรวจหาเชื้อที่มีอยู่ตั้งแต่ 1-10 ตัวต่อเม็ดเลือดแดง 1 ล้านตัว

(Khusmith, 1988) ทั้งนี้ความไวและความจำเพาะขึ้นอยู่กับ antibody ที่ใช้ ส่วนวิธี IRMA โดยวิธี two-site sandwich วิธี IRMA นี้มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 0.67 ตัวต่อเม็ดเลือดแดง 1 ล้านตัว (Khusmith et al., 1987) แต่เนื่องจากการพัฒนาวิธีการตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรียโดยใช้สารกัมมันตรังสี มีความยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในภาคสนามหรือทางคลินิก และอาจเป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง

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

2.1 Two-site sandwich ELISA หลักการคือ เคลือบผิวของ solid phase ด้วย antibody และเติม antigen ที่ต้องการทดสอบ ล้าง antigen ที่เป็นส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติม antibody ชนิดเดียวกับที่ใช้เคลือบ solid phase ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ ซึ่งจะไปจับกับ antigen ที่ทำปฏิกิริยากับ antibody บน solid phase หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไป ถ้ามี antigen ที่ต้องการตรวจสอบในตัวอย่าง เอ็นไซม์จะเปลี่ยนสี substrate สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า หรือวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นค่า optical density (OD) โดยใช้ ELISA reader เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับเลือดคนปกติ (Khusmith et al., 1992)

2.2 Dot ELISA โดยการนำตัวอย่างเลือดที่ต้องการทดสอบ ไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตก แล้วหยดลงบนแผ่น membrane หลังจากนั้นใส่ IgG ซึ่งเป็น monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนของเชื้อมาลาเรียซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ alkaline phosphatase เมื่อเติม substrate ที่เหมาะสม เอ็นไซม์จะเปลี่ยนสี substrate เกิดจุดสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า วิธีนี้มีความไวสามารถตรวจหาเชื้อได้ที่ระดับความหนาแน่นร้อยละ 0.001 (Londner et al., 1987) เมื่อนำวิธีการนี้มาทดสอบกับเลือดของผู้ป่วยมาลาเรีย พบว่ามีความไวคิดเป็นร้อยละ 82-90 และมีความจำเพาะร้อยละ 100 โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม species ของเชื้อมาลาเรีย

2.3 Dye-conjugated monoclonal antibody-based assay (dipstick assay) เป็นวิธีการตรวจที่รวดเร็ว สะดวก สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ สามารถทราบผลภายในเวลา 10-15 นาที โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า ParaSight®-F test (Shiff et al., 1994) และ Immunochromatographic (ICT) test (Garcia et al., 1996) การตรวจมีหลักการดังนี้ โดยแผ่นทดสอบ (nitrocellulose membrane) ประกอบด้วยแถบที่มี monoclonal antibody ต่อ *P. falciparum* histidine-rich protein (PfHRP) -2 ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดย PfHRP-2 เป็น antigen ที่ถูกสร้างจาก *P. falciparum* ระยะ trophozoite เมื่อนำแผ่นทดสอบจุ่มในเลือดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้ว ถ้าเลือดตัวอย่างมีเชื้อระยะดังกล่าว PfHRP-2 จะทำปฏิกิริยากับ dye-conjugated anti PfHRP-2 monoclonal antibody จะปรากฏ

แถบสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การทดสอบมีความไวร้อยละ 80-90 ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อมากกว่า 80 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร และการตรวจด้วยวิธีทั้งสองยังให้ผลตรวจว่าติดเชื้อ 28 วันหลังจากได้รักษา

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการตรวจที่คล้ายคลึงกับวิธีนี้ คือ OptiMal test ที่สามารถตรวจได้ทั้ง *P. falciparum* และ *P. vivax* ในแผ่นตรวจเดียวกัน เป็นการตรวจหา lactate dehydrogenase (pLDH) ที่สร้างจากเชื้อมาลาเรียที่ยังมีชีวิตและมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในเชื้อแต่ละชนิด วิธีนี้มีความไวร้อยละ 88 และมีความจำเพาะร้อยละ 99 แต่ที่ระดับความหนาแน่นของเชื่อน้อยกว่า 100 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร พบว่ามีความไวร้อยละ 50 และความจำเพาะเพียงร้อยละ 75 (Palmer et al., 1998)

การตรวจหา Nucleic acid

1. Nucleic acid hybridization เป็นวิธีสำหรับการตรวจหา nucleic acid เป้าหมายของเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) เริ่มต้นจากการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่สูญเสียสภาพโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมี เช่น formamide หรือค่าง ดีเอ็นเอสายคู่จะแยกเป็นสายเดี่ยว และถ้าลดอุณหภูมิดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะมาจับคู่ (hybridization) กับสายเดิม โดยลักษณะการจับคู่จะเป็นแบบ antiparallel นอกจากนี้หลักการของ hybridization สามารถใช้ได้สำหรับ RNA กับ RNA ที่มีลำดับเบสตรงคู่กัน (complementary) โดยจำแนกวิธีการตรวจที่ใช้ ดังนี้

1.1 Solid phase hybridization โดยการแยกสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งที่ต้องการส่งตรวจ นำมาตรึงบนแผ่นค้ำจุน ซึ่งอาจทำมาจาก nylon หรือ nitrocellulose membrane หลังจากนั้นนำมา hybridize ในสารละลายของ probe ซึ่งเป็น nucleotide สายสั้นที่มีลำดับเบส complementary กับ nucleotide เป้าหมาย สามารถตรวจปฏิกิริยาที่เกิดบนแผ่นค้ำจุนหรือบนที่ผลบนแผ่นฟิล์ม X-ray

1.1.1 Dot blot hybridization สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก ทำได้ง่ายโดยการแยกสกัด nucleic acid แล้วนำมาถ่ายโอน (transfer) บนแผ่นค้ำจุน หลังจากนั้นจึงนำมา hybridize ในสารละลายของ probe ซึ่งแยกออกตามชนิด probe คือ

1.1.1.1 DNA probe เตรียมจากสายดีเอ็นเอในส่วนที่จำเพาะกับชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยการทำ DNA cloning จากนั้นเลือกสายดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือเอ็นไซม์ (Barker et al., 1989; Barker et al., 1992) การตรวจด้วยวิธี DNA probe โดยทั่วไปใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง มีความไวของการทดสอบประมาณ ร้อยละ 80-85 และมีความจำเพาะประมาณร้อยละ 90-100 การใช้ DNA probe ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี พบว่ามีความไวมากกว่าวิธีการที่ใช้เอ็นไซม์ โดยจำนวนเชื้อมาลาเรียที่ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจะแตกต่างกันแล้วแต่วิธีการและความจำเพาะของ DNA probe ที่ใช้สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรีย ตั้งแต่ 40-500 ตัวต่อเลือด 1

ไมโครลิตร อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด เช่น ความไวของการตรวจไม่ดีไปกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีเชื้อในเลือดจำนวนต่ำ และวิธี DNA probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นวิธีที่ยุ่ยาก มีอายุการใช้งาน (half life) สั้น ราคาแพง

1.1.1.2 RNA probe ใช้หลักการเช่นเดียวกับ DNA probe โดยใช้ RNA probe ที่จำเพาะต่อสาย RNA ของเชื้อมาลาเรียเป็นตัวตรวจ สาเหตุที่มีการพัฒนาวิธีการนี้มาเพื่อใช้แทน DNA probe เนื่องจาก RNA probe น่าจะมีความไวสูงกว่า DNA probe โดยทฤษฎีแล้วเชื้อมาลาเรียแต่ละตัวจะมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 0.02 พิโคกรัม แต่จะมีปริมาณ RNA มากถึง 0.21 พิโคกรัม ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่า และในห้องปฏิบัติการสามารถให้ผลบวกได้แม้ว่ามีเชื่อน้อยเพียงร้อยละ 0.00046 ค่าที่อ่านได้จาก RNA probe มีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อมาลาเรียในเลือดที่ได้จากการอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Waters & McCutchan, 1989) ซึ่ง RNA probe ควรจะให้ผลดีกว่า แต่ในทางปฏิบัตินั้นยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับการเตรียม probe นอกจากนั้นการพัฒนาเทคนิค PCR ขึ้นมาใช้เป็นเทคโนโลยีที่มีความไวและความจำเพาะ จึงทำให้ไม่ได้มีการพัฒนา RNA probe ขึ้นมาจนถึงระดับที่นำมาใช้กันแพร่หลาย

1.1.2 Southern blot hybridization ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่แยกสกัดจากตัวอย่างแล้วนำไปตัดด้วย restriction endonuclease ที่เหมาะสม นำไปแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis ทำการขนถ่ายดีเอ็นเอจากเจลสู่แผ่นค้ำจุน ซึ่งอาจเป็นแผ่น nitrocellulose หรือ nylon จากนั้น จึงนำไป hybridize กับ probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เอ็นไซม์ หรือสาร chemiluminescence

1.1.3 Northern blot hybridization ขั้นตอนการทำคล้ายกับ Southern blot hybridization จุดแตกต่างที่สำคัญเป็นการตรวจหา RNA

1.2 Liquid phase hybridization ในหลักการของ hybridization วิธีนี้ nucleotide ที่สกัดจากตัวอย่างและ probe จะต้องติดฉลากด้วย acridinium ester แล้วนำไป hybridize กับตัวอย่างตรวจ และเมื่อเติมค่า hydrogen peroxide ลงไปจะทำปฏิกิริยากับ acridinium ester ที่อยู่บนตัว probe และจะปลดปล่อยพลังงานแสงออกมา ส่วน acridinium ester ของ probe ที่ไม่ทำปฏิกิริยาจะถูก hydrolysis ไม่สามารถปลดปล่อยพลังงานได้ ซึ่งสามารถวัดปริมาณแสงได้โดยใช้ luminator วิธีของ liquid phase hybridization จะมีความไวมากกว่า solid phase hybridization 7-10 เท่า (Oliveira et al., 1995)

2. DNA amplification โดยทั่วไปดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นสายคู่ ซึ่งแต่ละสายจะจับคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่มีความจำเพาะต่อกัน (complementary) โดยเบสชนิด thymine (RNA จะเป็น uracil) สามารถจับคู่กับเบสชนิด adenine และเบสชนิด cytosine มีความจำเพาะกับเบสชนิด guanine ความสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายดีเอ็นเอแบบจำเพาะนี้ ทำให้สามารถสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยลอกแบบดีเอ็นเอต้นแบบได้เหมือนกับสายเดิมทุกประการ วิธี PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้อย่างมาก ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (Saiki et al., 1988) โดยใช้

ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนเล็กน้อยเท่านั้น วิธี PCR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 2^n โดย n เท่ากับจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ภายหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ดีเอ็นเอจำนวน 3.4×10^{10} สาย จากสายดีเอ็นเอต้นแบบเพียงสายเดียว ซึ่งได้มีการประยุกต์วิธีการให้เหมาะสมกับลักษณะงาน คือ

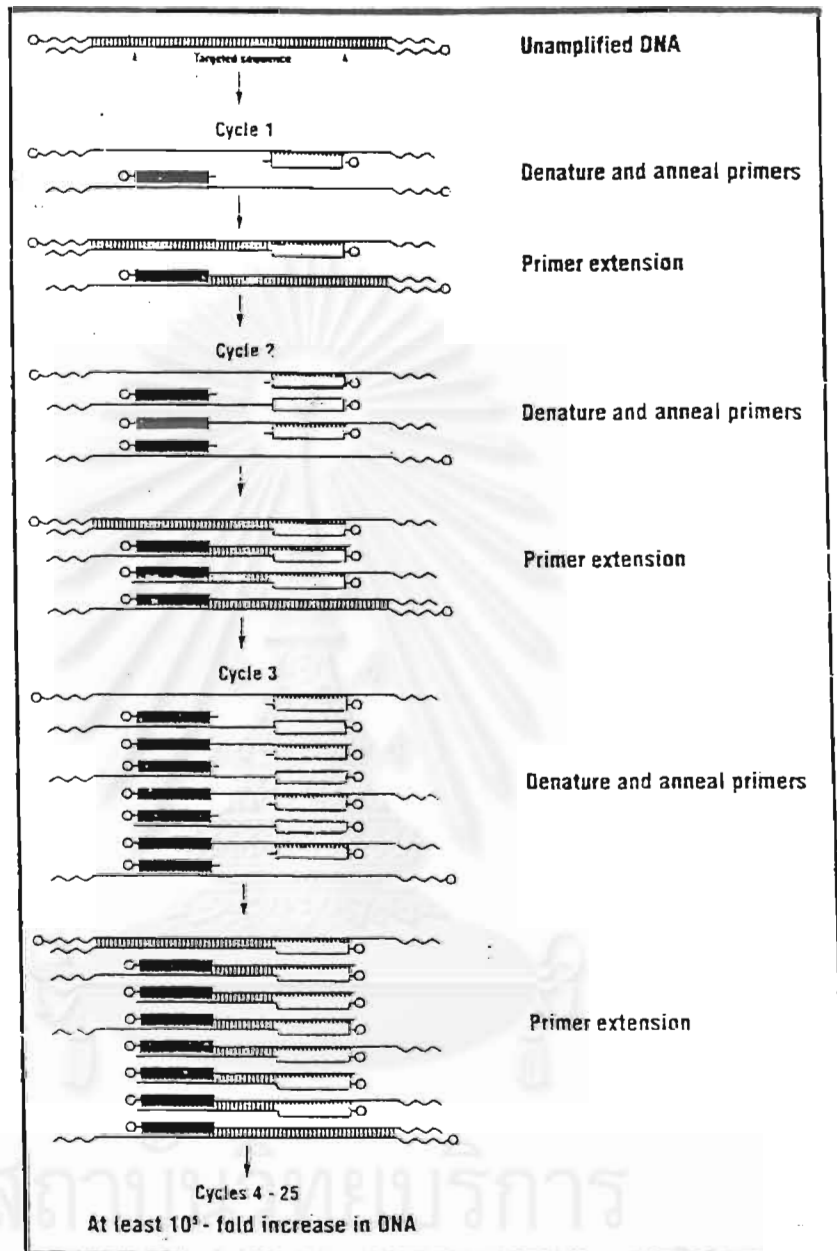
2.1 Polymerase chain reaction หลักการของวิธีนี้โดยเริ่มจากการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงในระดับที่ primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวมาจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่ complementary กับ primer และอาศัยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ที่มีลำดับเบสเหมือนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติพิเศษคือ ทนความร้อนและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงประมาณ $65-75^\circ\text{C}$ โดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ได้จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* (Brock & Freeze, 1969) นอกจากนี้การประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อเพิ่มและลดอุณหภูมิโดยอัตโนมัติ (automated thermal cycler) ทำให้วิธี PCR ได้รับการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง

เทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ

1. ดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA)
2. Thermostable DNA polymerase
3. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)
4. Oligonucleotide primer 1 คู่
5. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1. ขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ อุณหภูมิ $90-95^\circ\text{C}$
2. ขั้นตอนที่ oligonucleotide primer จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (primer annealing) ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสที่ complementary กัน โดยต้องมีการลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับเหมาะสม
3. ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจาก primer (primer extension) สร้างในทิศทาง $5'$ ไปทาง $3'$ โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase ปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิระหว่าง $70-74^\circ\text{C}$



รูปที่ 8 หลักการของ polymerase chain reaction (Saiki et al., 1985)

Primer สิ่งที่สำคัญในการเลือกใช้ primer ต้องคัดเลือกหรือออกแบบ primer โดยต้องคำนึงถึงความยาวของ primer ควรยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยเบสชนิด guanine และ cytosine ประมาณร้อยละ 50-60 หลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypyrimidine หรือ polypurine การเรียงลำดับของ nucleotide ต้องมีความจำเพาะไม่พบในดีเอ็นเออื่นๆ และตรงบริเวณปลาย 3' ของ primer ทั้งคู่ไม่ควรจะเป็นเบสมีลำดับ complementary กัน เพื่อป้องกันการเกิดจับคู่กันเองของ primer (primer-dimer) การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรมีลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่ออ่านจากทิศทาง 5'-3' และ 3'-5' (palindromic sequence) เพื่อป้องกันปลาย 3' งอมาจับกับ primer สายเดียวกันเกิดเป็น โครงสร้างทุติยภูมิของ primer อุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature, Tm) ของ primer ควรใกล้เคียงและอยู่ในช่วง 55-80° C ค่า Tm สามารถคำนวณโดยใช้สูตรง่ายๆ โดยแต่ละ adenine และ thymine แต่ละอันคิด 2° C ส่วน guanine และ cytosine คิด 4° C สุดท้ายเป็นการปรับระดับความเข้มข้นของ primer ให้เหมาะสมซึ่งควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 ไมโครโมล ถ้ามากเกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้นหรือทำให้เกิดผลผลิตจากวิธี PCR ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นและยังเพิ่มโอกาส primer-dimer ให้สูงขึ้นด้วย สุดท้ายจะได้ผลผลิตจากวิธี PCR ที่ต้องการลดลง โดยมีผู้ที่ออกแบบ primer เพื่อใช้ในวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียหลายแบบ รายละเอียดดังตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2 Primer ที่จำเพาะสำหรับ *Plasmodium vivax*

ลำดับ	Primer	gene	product length (bp)	หมายเหตุ
1	PV11A: 5'-TCACTCTGCCTCCTCCTCCGTTG-3' PV11B: 5'-TAAAACACGCTCGCATTTCGTAA-3'			Leserson et al., 1993
2	PV1: 5'-GGTGAAAATCGAAGGTATCGA-3' PV2: 5'-TCCCTGCCCCGCTGTTGC-3'		183	Tirasophon et al., 1994
3	rPV1: 5'-CCGAATTCAGTCCCACGT-3' rPV2: 5'-GCTTCGGCTTGGAAGTCC-3'	SSU rRNA	697	Snounou et al., 1993
4	P1: 5'-CAGATACCGTCGTAATCTTA-3' Pv Primer: 5'-TAAACTCCGAAGAGAAAATTC-3'	SSU rRNA	136	Kimura et al., 1995
5	semi-nested PCR P1: 5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3' P2: 5'-GAACCCAAAGACTT TGATTCTCAT-3' V1:5'- CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA-3'	SSU rRNA	103	Kimura et al., 1997

ตารางที่ 3 Primer ที่จำเพาะสำหรับ *Plasmodium ovale*

ลำดับ	Primer	gene	product length (bp)	หมายเหตุ
1	rPO1: 5'-CACATTAATTGTATCCTAGTG-3'	SSU rRNA	554	Snounou et al., 1993
	PLUb: 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'			
2	P1: 5'-CAGATACCGTCGTAATCTTA-3'	SSU rRNA	144	Kimura et al., 1995
	PO primer: 5'-AATTCCCGAAAGGAATTTTC-3'			
3	semi-nested PCR	SSU rRNA	114	Kimura et al., 1997
	P1: 5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3'			
	P2: 5'-GAACCCAAAGACTT TGATTTCTCAT-3'			
	O2: 5'- ACTGAAGGAAGCAATCTAAGAAATT-3'			

ตารางที่ 4 Primer ที่จำเพาะสำหรับ *Plasmodium malariae*

ลำดับ	Primer	gene	product length (bp)	หมายเหตุ
1	rPM1: 5'-CGTACAACATATGTTATAAATATACAA-3'	SSU rRNA	519	Snounou et al., 1993
	rPM2: 5'-CTCTTAATTCTTATGTTTTT-3'			
2	P1: 5'-CAGATACCGTCGTAATCTTA-3'	SSU rRNA		Kimura et al., 1995
	Pm primer: 5'-ACTCATATATAAGAATGTCTC-5'			
3	semi-nested PCR	SSU rRNA	114	Kimura et al., 1997
	P1: 5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3'			
	P2: 5'-GAACCCAAAGACTT TGATTTCTCAT-3'			
	M1: 5'- GGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCATAT-3'			

ตารางที่ 5 Primer ที่จำเพาะสำหรับ *Plasmodium falciparum*

ลำดับ	Primer	gene	product length (bp)	หมายเหตุ
1	PF186: 5'-AGGTC(TC)TAATT(TC)T(GAC)(GCT)			Barker et al., 1989
	TA(TA)CC-3'			
	PF187: 5'-T(TA)GT(TA)AG(GAT)AA(GA)(TA)			
	TAGA(GA)CCT-3'			
2	Mahidol primer		206	Tirasophon et al., 1991
	M1: 5'-GCTACATATGCTTAGTGCCAGAC-3'			
	M2: 5'-CGTGTACCATAACATCCTACCAAC-3'			
3	rPf1: 5'-AGAAATAGAGTAAAAAA	SSU rRNA	1,494	Snounou et al., 1991
	CAATTA-3'			
	rPf2: 5'-GTAAC TATTCTAGGGGAACTA.3'			
4	P1: 5'-CAGATACCGTCGTAATCTTA-3'	SSU rRNA	144	Kimura et al., 1995
	Pf primer: 5'-GTCACCTCGAAAGATGACTT-3'			
5	BIO1: 5'-ATCAGCTTTTGATGTTAGGGTATTG-3'	SSU rRNA	678	Oliveira et al., 1995
	AL553: 5'-TCCTATTAATCGTAACTAAGC-3'			
6	nested PCR	DHFR-TS		Wataya et al., 1993
	รอบแรก : 5'-TGTTAGCGATGTATATACTAGTAAC-3'		410	
	5'-TTCGATCACTTTGTTTATTCCATT-3'			
	รอบสอง: 5'-AATGATGACAAAGATACATG-3'		226	
	5'-ATTGGTATTCAGGATGATAT-3'			
7	nested PCR	Pf155/RESA	246	Seesod et al., 1997
	รอบแรก			
	RIT405: 5'-CACAGC TTAAATGCCGCTGAAC-3'			
	RIT406: 5'-ATCATGTTCTACCATTTCCTCAGC-3'			
	รอบสอง			
	RIT371: 5'-AATTGTTGTCAGATAATTCAGTAGATG-3'			
	RIT372: 5'-AATTGTTATCCGCTCACAATTGTTGTA			
	CATGTTCTGGTACATTTTC-3'			

ตารางที่ 5 Primer ที่จำเพาะสำหรับ *Plasmodium falciparum* (ต่อ)

ลำดับ	Primer	gene	product length (bp)	หมายเหตุ
8	semi-nested PCR	SSU rRNA	101	Kimura et al., 1997
	P1: 5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3'			
	P2: 5'-GAACCCAAAGACTT TGATTTCTCAT-3'			
	F2: 5'- CAATCT AAAAGTCACCTCGAAAGATG -3'			

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

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

บัฟเฟอร์สำหรับ PCR ที่นิยมใช้คือ 10-15 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8 และ KCl มีความเข้มข้นประมาณ 50 mM KCl จะทำหน้าที่เร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้ามี KCl มากเกินไปจะไปลดการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

การเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้น primer annealing ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของ primer อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า T_m ประมาณ 5°C และควรคำนึงถึง *Taq* DNA polymerase สามารถทำงานได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ $60-85^{\circ}\text{C}$ อุณหภูมิไม่ควรต่ำเกินไป ถึงแม้ว่าจะเกิด primer annealing ได้ แต่อาจจะก่อให้เกิด mispriming หรือ misextension ได้ สำหรับระยะเวลาของการ annealing ใช้ระยะเวลาเพียงไม่กี่วินาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิ 72°C เนื่องจากเป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ *Taq* DNA polymerase โดยอัตราการสร้างสาย จะอยู่ในช่วง 35-100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย ความเข้มข้นของเกลือ และระดับความเป็นกรดค้างของบัฟเฟอร์

การตั้งอุณหภูมิต่ำหรือใช้ระยะเวลาสั้นไป ในขั้นตอนการแยกสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะเกิดไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ปริมาณผลผลิตจาก PCR ที่ควรได้ลดลง แต่ถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงและเวลาที่ยาวเกินไปจะทำให้เอ็นไซม์เสียสภาพ ช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมประมาณ $90-95^{\circ}\text{C}$ เวลา 30 วินาทีแต่ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบมี guanine และ cytosine จำนวนมากอาจต้องใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น

ปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถมีผลกระทบต่อ PCR เช่น ความสะอาดของอุปกรณ์ น้ำที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูง ในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ ถ้ามี ethanol ปนเปื้อนจะมีผลยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase โดย ethanol ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 จะสามารถยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ได้ร้อยละ 100

2.2 Nested PCR เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR จำนวน 2 ครั้ง โดยในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 จะแบ่งผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาในครั้งแรกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ primer ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอในบริเวณที่ถัดเข้ามาด้านในจาก primer คู่แรก ผลผลิตที่ได้จะมีความจำเพาะมากขึ้นและสามารถลดผลผลิตที่ไม่มีความจำเพาะ (non-specific product)

2.3 Semi-nested PCR เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR 2 ครั้งเช่นกัน โดยในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 primer แรกใช้ primer เดิมที่ใช้ในครั้งแรก ส่วน primer ที่สองใช้ primer ที่สามารถจับถัดเข้ามาด้านในจาก primer ในปฏิกิริยาครั้งแรก

2.4 Reverse transcription PCR (RT-PCR) เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจาก mRNA โดยต้องมีการศึกษาทราบว่า gene มี expression ที่อวัยวะและช่วงเวลาใด แล้วจึงสกัด mRNA ที่จะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) โดยใช้ reverse transcriptase หลังจากนั้นจึงดำเนินปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธี PCR โดยทั่วไป

3. Microtiter plate hybridization (MPH) เป็นวิธีการที่นำเอาวิธี PCR มาใช้เพิ่มความไวในการตรวจและ hybridization เทคนิคเพื่อช่วยให้การอ่านผลง่ายขึ้น

การนำวิธี PCR มาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียได้มีการศึกษา โดยใช้ gene ของดีเอ็นเอเป้าหมายที่แตกต่างกัน ได้แก่ การใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น gene ที่มี 1 ชุดต่อ genome เช่น dihydrofolate reductase (DHFR) gene และ circumsporozoite protein (CSP) gene (Tahar et al., 1998) เป็นต้น และการใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีหลายชุดต่อ genome (multicopy gene) เช่น rRNA gene (Snounou et al., 1993; Miyake et al., 1995; Kimura et al., 1997) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็น multicopy gene จะให้ผลดีกว่าการใช้ gene ที่มีเพียง 1 ชุดต่อ 1 genome

Snounou และคณะ 1993 ได้นำวิธี PCR มาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR เมื่อใช้ SSU rRNA gene เป็นดีเอ็นเอต้นแบบพบว่ามี ความไว (sensitivity) มากกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนา 1.23 เท่าและมีความจำเพาะ (specificity) มากกว่า 1.41 เท่า แต่ขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยาค่อนข้างยาว (510-960 คู่เบส) จึงใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาดังกล่าว แม้ primer ที่ใช้จะมีความไวและไม่ทำปฏิกิริยข้ามชนิดของเชื้อมาลาเรีย แต่มีผลลบปลอม (false negative) 5 ราย จากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 196 ตัวอย่าง (Snounou et al., 1993) และในปีเดียวกัน Snounou ได้ปรับปรุงขั้นตอนในการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหาจำแนก

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

Roper และคณะ ใช้เทคนิค nested PCR ที่พัฒนาโดย Snounou ศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *P. falciparum* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเชื้อแต่ไม่ปรากฏอาการ (asymptomatic infection) และผู้ป่วยที่ปรากฏอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ (submicroscopically patent infection) ในประเทศซูดานสามารถใช้วิธีนี้ตรวจพบเชื้อมากกว่าการตรวจด้วยฟิล์ม โลหิต ทั้งที่อยู่ในช่วงฤดูกาลที่ไม่เหมาะสมต่อการแพร่เชื้อ มาลาเรีย จึงนับว่าวิธี PCR มีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจหาเชื้อที่มีความหนาแน่นต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Roper et al., 1996)

Miyake และคณะ (1995) ได้ประยุกต์วิธี PCR เข้ากับวิธี hybridization ใน microtiter plate เพื่อทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียในคน เรียกว่าวิธีนี้ว่า microtiter plate hybridization (MPH) โดยการใช้วิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ SSU rRNA gene ทำการศึกษา 435 ตัวอย่างที่ได้จากญี่ปุ่น เกาหลี โคลอมเบียและเวียดนาม และใช้การติดฉลากด้วย probe ที่จำเพาะกับชนิดของเชื้อมาลาเรีย (species-specific probes) เพื่อสะดวกในการแปลผล พบว่าผลการตรวจด้วยเทคนิค MPH มีความสอดคล้องกับผลการตรวจจากฟิล์มเลือดหนา แต่พบ *P. ovale* 1 ราย ที่สามารถตรวจพบจากฟิล์มเลือดแต่ตรวจไม่พบเมื่อใช้เทคนิค MPH เนื่องจากดีเอ็นเอบริเวณที่จะจับอย่างจำเพาะกับ primer ของ *P. ovale* รายดังกล่าวมีเบสหายไป 1 อัน ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ (Miyake et al., 1995)

ในปี พ.ศ. 1997 Kimura และคณะ ได้ปรับปรุงขั้นตอนในการใช้วิธี PCR เพื่อตรวจจำแนกเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดในคน จากการใช้เทคนิค semi-nested PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ SSU rRNA gene มาทดสอบกับ 35 ตัวอย่างที่มาจากประเทศจีนและเวียดนาม พบว่า primers ชุดดังกล่าวมีความจำเพาะกับชนิดของเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามชนิดของเชื้อ มาลาเรีย นอกจากนี้ผลผลิตจากปฏิกิริยามีความยาวเพียงประมาณ 110 คู่เบสเท่านั้น ทำให้ระยะเวลาตรวจสอบลดลง (Kimura et al., 1997)

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียมีหลายวิธี เช่น การตรวจหา circulating histidine-rich protein 2 โดยวิธี ParaSight[®]-F หรือวิธี immunochromatographic (ICT) test เป็นต้น ซึ่งอยู่ในระหว่างการพัฒนา เนื่องจากยังมีความจำเพาะไม่มากสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อเฉียบพลันอย่างไรก็ตามการใช้วิธี PCR นี้เหมาะสมสำหรับการตรวจในรายที่มีเชื้อจำนวนน้อย การตรวจในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมากกว่า 1 ชนิด การประเมินผลการรักษาประเมินผลการใช้วัคซีนหรือการจำแนกชนิดเชื้อในบางระยะที่มีความคล้ายคลึงกันมากจนยากต่อการจำแนกจากรูปร่างลักษณะของเชื้อ การที่ดีเอ็นเอเป้าหมายถูกเพิ่มปริมาณอย่างมากและจำเพาะจึงง่ายต่อการตรวจสอบ เมื่อพิจารณาแล้ว

พบว่าวิธีการของ Kimura ให้ผลผลิตดีเหนือจากปฏิกิริยามีขนาดสั้นที่สุด ทำให้ใช้ระยะเวลาในการตรวจน้อยกว่าวิธีของ Snounou นอกจากนี้ยังให้ผลการตรวจที่ถูกต้องสอดคล้องกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ และมีความถูกต้องมากกว่าการตรวจจากเทคนิค MPH อย่างไรก็ตาม Kimura และคณะได้ทำการทดสอบจากเลือดที่เก็บจากผู้ป่วยประเทศจีนและเวียดนาม เพียงจำนวน 35 ราย ควรมีการทดสอบเพิ่มเติม ดังนั้นการศึกษานี้เพื่อประเมินความไว และความจำเพาะของวิธีดังกล่าว (Kimura et al., 1997) โดยนำมาวินิจฉัยจำแนกเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดในแหล่งระบาดของจังหวัดตาก ซึ่งมีอัตราการตรวจพบเชื้อมากที่สุดในประเทศไทย ในพื้นที่รับผิดชอบของหน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 อำเภอพบพระ เป็นพื้นที่ที่มีปัญหาในการควบคุมโรคและมีอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียสูงเป็นอันดับสองรองจากอำเภอแม่สอด แต่มีการเคลื่อนย้ายของประชากรไม่มาก และจากผลการศึกษาทำให้ทราบอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดได้ชัดเจนขึ้น ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนางานขั้นสูงตรโรคมาลาเรียและควบคุมโรคมาลาเรียต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษาการประเมินเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบเพื่อวินิจฉัยโรค (diagnostic study)

การให้คำนิยามในเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ผู้ป่วยที่มีอาการไข้ที่มารับการตรวจรักษา ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงที่ 4 อ.พพระ จ.ตาก ซึ่งรับผิดชอบพื้นที่ 3 ตำบล คือ พพระ รวมไทยและวาเลย์ ในช่วงเดือน กรกฎาคม 2539 – มีนาคม 2540

ไข้ หมายถึง ภาวะผิดปกติของร่างกายมีผลทำให้อุณหภูมิสูงมากกว่า 37.8°C เมื่อใช้เครื่องวัดอุณหภูมิ (thermometer) วัดทางปาก ส่วนในเด็กการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของร่างกายจะขึ้นสูงกว่าผู้ใหญ่ เช่น ถ้าอุณหภูมิในเด็กมีไข้ $40.0-40.6^{\circ}\text{C}$ จะเท่ากับผู้ใหญ่มีไข้ที่อุณหภูมิ $38.4-38.9^{\circ}\text{C}$ เป็นต้น นอกจากนี้อุณหภูมิจะขึ้นลงตามกิจกรรมอยู่ในช่วง $\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Hobson, 1975)

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ ตัวอย่างเลือด (whole blood) เก็บจากประชากรเป้าหมาย

ความหนาแน่นของเชื้อ หมายถึง จำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียในเลือด 1 ไมโครลิตร ซึ่งสามารถคำนวณ โดยประมาณจากปริมาณเม็ดเลือดขาวหรือเม็ดเลือดแดง

ในกรณีที่ประเมินจากฟิล์มเลือดหนา

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเชื้อ} \times \text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับ}}$$

ในกรณีที่ประเมินจากฟิล์มเลือดบาง

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ} \times \text{จำนวนเม็ดเลือดแดงในเลือด 1 ไมโครลิตร}}{\text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงต่อ 1 วงกลีอง} \times \text{จำนวนวงกลีอง}}$$

(ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 ตัว/ไมโครลิตร และเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 5×10^6 ตัว/ไมโครลิตร)
(Emerson & Farnen, 1994)

ขนาดของประชากร (sample size)

โดยการนำผลการศึกษานำร่องจากเลือดตัวอย่างที่นำมาจากจังหวัดตากจำนวน 29 ตัวอย่าง ทำการตรวจด้วยเทคนิค PCR และตรวจฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ่า โดยเจ้าหน้าที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 อัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียเท่ากับร้อยละ 89.65 และ 72.41 ตามลำดับมา คำนวณขนาดประชากรตัวอย่างโดยใช้สูตร (Ingelfinger et al., 1987)

$$N = \frac{[Z_{\alpha}(P_1Q_1)^{1/2} + Z_{\beta} (P_2Q_2)^{1/2}]^2}{[P_1+P_2]^2}$$

โดย N = ขนาดตัวอย่าง

α = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR

β = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้โดยการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ่า

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

Z_{β} = 1.96, the two-tailed Z value ที่ระดับ 0.05 โดยการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ่า

P_1 = อัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากการใช้เทคนิค PCR

Q_1 = $1 - P_1$

P_2 = อัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียโดยการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสียิมซ่า

Q_2 = $1 - P_2$

ดังนั้นขนาดของกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 124 คนเป็นอย่างน้อย สำหรับการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างทั้งหมด 150 ตัวอย่าง

อุปกรณ์

Automatic thermal cycler (Perkin Elmer)
 High speed refrigerated microcentrifuge (Tomy)
 Magnetic stirrer (Thermolyne)
 Vortex mixer (Scientific Industries)
 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดอ่านได้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Bosh)
 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Cyberscan 500)
 ชุดอุปกรณ์สำหรับแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Mupid-II)
 ตู้เย็น 4 °C (Hitachi)
 ตู้เย็น -20 °C (Puffer Hubbard)
 ตู้เย็น -80 °C (Forma Scientific)
 ตู้อบแห้ง (Mettler)
 ไมโครปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette) ขนาด 10 100 และ 1000
 ไมโครลิตร (Eppendorf)
 หม้อน้ำปลอกเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (Hirayama)
 เครื่องอ่านผลแถบดีเอ็นเอจากเจล (Bio Rad)

วัสดุ

กระบอกสไลด์ (ขนาด 2.5 x 7.5 ซม.)
 กระจกบอกลีติน้ำ
 กระจกบอกลวด ขนาด 10 50 100 และ 1,000 มล.
 กล้องไฟมใส่น้ำแข็ง
 ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี
 ถุงมือยาง (latex gloves)
 ที่วางหลอดทดลองขนาด 0.1 1.0 และ 1.5 มล. (microtube rack)
 เทอร์โมมิเตอร์
 นาฬิกาจับเวลา
 บีกเกอร์ขนาด 50 100 200 500 และ 1,000 มล.
 ปากคีบ (forcep)

ปิเปตต์ทึป (pipette tip) ขนาด 10 100 และ 1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf)

พาราฟิล์ม (parafilm)

พาสเจอร์ปิเปตต์ (pasteur pipette)

หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาดความจุ 0.5 และ 1.5 มล. (Elkay)

สารเคมี

1. สารเคมีทั่วไป

Absolute ethanol (Merck)

Absolute methanol (Mallinkrot)

Acetic acid (100%, Merck)

Agarose (Funakoshi)

Bromophenol blue (Sigma)

Cleaning solution (ICN Biomedicals)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 , May & Baker)

Double distilled water

Ethidium Bromide (Sigma)

Ficoll, type 400 (Pharmacia)

Hydrochloric acid (HCl fuming 37%, Merck)

Potassium chloride (May & Baker)

Potassium di-hydrogen orthophosphate (KH_2PO_4 , Ajax Chemicals)

Sodium chloride (Sigma)

Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)

Tris hydroxymethyl amino methane (Merck)

Xylene cyanol FF (Sigma)

2. สารเคมีที่เป็น Reagent kit

Wizard™ Genomic DNA Purification System (Promega)

3. เอ็นไซม์

Taq DNA polymerase (Promega)

4. Oligonucleotides (Kimura et al., 1997)

ลำดับเบสจากส่วนของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียได้แก่

Oligonucleotide ที่เป็น inter-species primers

P1 5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3'

P2 5'-GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT-3'

Oligonucleotide ที่เป็น species-specific primers

P. falciparum (F₂) 5'-CAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATG-3'

P. malariae (M₁) 5'-GGAAGCTATCTAAAAGAAACTCATAT-3'

P. ovale (O₂) 5'-ACTGAAGGAAGCAATCTAAGAAATTT-3'

P. vivax (V₁) 5'-CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA-3'

การเก็บตัวอย่าง

โดยการเก็บเลือดจากผู้ป่วยที่มาตรวจที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 อ.พบพระ จ.ตาก โดยใช้เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำจำนวน 300 ไมโครลิตร เก็บในหลอดไร้เชื้อที่มีสาร EDTA เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ตัวอย่างเลือดทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -20°C ก่อนนำไปสกัด DNA ใช้ส่วนที่เหลือหยดลงบนแผ่นแก้วสำหรับทำฟิล์มเลือดชนิดหนา 2 แผ่นและชนิดบาง 2 แผ่น นำไปย้อมด้วยสีย้อมซ์ความเข้มข้นร้อยละ 5 แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

การสกัด DNA จากเลือดผู้มาตรวจหาเชื้อมาลาเรีย ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 อ.พบพระ จ.ตาก โดยใช้ Wizard™ Genomic DNA Purification System (Promega) Kit

1. นำเลือดตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ใช้ไมโครปิเปตต์วัด โนมิตีคูดเลือด (whole blood) ขึ้นแล้วปล่อยให้แยกชั้นเลือดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เลือดปริมาณ 300 ไมโครลิตร ใส่ใน microtube ขนาด 1.5 มล. สำหรับสกัด DNA
2. เติม cell lysis solution 0.9 มล. เขย่าให้เข้ากันหรือใช้ vortex mixer ความเร็วระดับต่ำสุดนาน 10 นาที
3. นำไปปั่นด้วย High speed refrigerated microcentrifuge ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
4. ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง หลังจากนั้นเติม phosphate buffered saline (PBS) 1.0 มล. ปิดฝาหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที ให้ตะกอนกระจายเพื่อล้าง haemoglobin ออกไป

5. นำไปปั่นเพื่อให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที
6. ศึกษาระลายส่วนบนทิ้ง แล้วทำการปั่นล้าง haemoglobin ใหม่ โดยเริ่มต้นเหมือนขั้นตอนที่ 4 และ 5 ทำอีก 1-2 ครั้ง จนเห็นว่าหลังปั่นตกตะกอนแล้วสารละลายส่วนบนค่อนข้างใส
7. หลังจากปั่นล้าง haemoglobin แล้วศึกษาระลายส่วนบนออก ตะกอนที่เหลือจะเป็น nucleus ของเชื้อมาลาเรียและเม็ดเลือดขาว เติม nuclei lysis solution 0.3 มล. ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง 5-6 ครั้ง จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ได้สารละลายค่อนข้างเหนียว แต่ถ้าหากพบว่ายังมีตะกอนอยู่ ให้เติม nuclei lysis solution อีก 0.1 มล. และตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
8. เติม protein precipitation 0.1 มล. แล้วนำไปเขย่าให้เข้ากันนาน 10 - 20 วินาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
9. ศึกษาระลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ นำไปตกตะกอน DNA โดยเติม absolute ethanol 1.0 มล. (ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C นานประมาณครึ่งชั่วโมง
10. เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง จะได้ตะกอนของดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด
11. ล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม ethanol 80% ปริมาณ 0.8 มล. แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะอยู่ที่ก้นหลอด คว่ำหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องจนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอโดยเติม TE buffer จำนวน 20 ไมโครลิตรและนำดีเอ็นเอเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ไว้เป็น DNA ดัชนีแบบ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification)

องค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 2 ไมโครลิตร inter-species primers (P1 และ P2) ความเข้มข้น $0.28\ \mu\text{M}$ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร nucleotide substrate (dATP dTTP dCTP และ dGTP) ความเข้มข้น $1.25\ \mu\text{M}$ ปริมาณ 3.2 ไมโครลิตร MgCl_2 ความเข้มข้น 25 mM ปริมาณ 1.6 ไมโครลิตร 10 x PCR reaction buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 mM Tris.HCl 500mM KCl 10mM MgCl_2 และ gelatin ร้อยละ 0.01 (W/V) ปริมาณ buffer ที่ใช้คือ 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 8.7 ไมโครลิตรและเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นำ PCR reaction mixture นี้ไปทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 92°C เป็นเวลา 2 นาทีในรอบแรก จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแยกสายโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 92°C เป็นเวลา 30

วินาที ขั้นตอนต่อไปทำให้ primer จับคู่กับดีเอ็นเอ (primer template annealing) และขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 60° C เป็นเวลา 90 วินาที ปฏิบัติการจะดำเนินไปจนครบ 35 รอบ โดยในรอบที่ 35 ในขั้นตอน primer extension จะเพิ่มเวลา 5 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์

สำหรับ primers ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ P1 primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-ACGATCAG ATACCGTCGTAATCTT-3' ซึ่งตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,062 ถึง 1,085 ใน SSU rRNA gene ของ *P. falciparum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,272 ถึง 1,295 ของ *P. malariae* ตำแหน่งเบสที่ 1,174 ถึง 1,197 ของ *P. ovale* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,393 ถึง 1,416 ของ *P. vivax* สำหรับ P2 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5'-GAACCCAAAGACTTTGATTCTCAT-3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,180 ถึง 1,204 ใน SSU rRNA gene ของ *P. falciparum* หรือตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,398 ถึง 1,422 ของ *P. malariae* ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,194 ถึง 1,218 ของ *P. ovale* และตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,513 ถึง 1,537 ของ *P. vivax* การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาอาศัยขนาดความยาวของ DNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 140 -160 คู่เบส ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ในการทำ PCR รอบสอง แบ่งผลผลิตจากการทำ PCR ในรอบแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย P1 primer และ species-specific primers ได้แก่ F2 M1 O1 และ V1 ความเข้มข้น 0.28 μ M ปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยแยกปฏิกิริยาสำหรับแต่ละ species เป็น 4 หลอด ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ เช่นเดียวกับการทำ PCR รอบแรก ขั้นตอนอุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับการทำ PCR ในรอบแรก ยกเว้นขั้นตอนที่ทำให้ primer จับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ และขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 60° C เป็นเวลา 60 วินาที โดยปฏิกิริยาจะดำเนินไปจนครบ 18 รอบ โดยในรอบที่ 18 ในขั้นตอนสร้างสายดีเอ็นเอจะเพิ่มเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ การเพิ่มจำนวน DNA ในรอบนี้เกิดจาก species-specific primer โดยใน *P. falciparum* ใช้ F2 primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'- CAATCTAAAA GTCACCTCGAAAGATG -3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,138 ถึง 1,163 ส่วน *P. malariae* ใช้ M1 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5'- GGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCATAT-3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,359 ถึง 1,386 *P. ovale* ใช้ O2 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5'ACTGAAGGAAGCAATCTAAGA AATTT-3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,163 ถึง 1,188 และ *P. vivax* ใช้ V1 primer มีลำดับเบสดังนี้ 5'- CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA-3' ตรงกับตำแหน่งเบสที่ 1,469 ถึง 1,496 ผลผลิตของปฏิกิริยาจะได้สายดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 110 คู่เบส ตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

Pf-ssu 952:GTATTCAGATGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTTCTGGAGACGAA-CAACTGCGAAAGC 1010
 Pm-SSU 1162:GTATTCAGATGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTTCTGGAGAC-AAGCAACTGCGAAAGC 1220
 Po-SSU 964:GTATTCAGATGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTTCTGGAGAC-AAACAACGCGAAACGC 1022
 Pv-SSU 1283:GTATTCAGAAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTTCTGGAGAC-AAACAACGCGAAAGC 1341

primer-1

Pf-SSU 1011:ATTTGTCTAAAATACTTCCATTAATCATGAACGAAAGTTAAGGGAGAGAAGACCGATCAGA 1070
 Pm-SSU 1221:ATATGCCTAAAATACTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGAGTGAAGACCGATCAGA 1280
 Po-SSU 1023:ATTTGCCTAAAATACTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGAGTGAAGACCGATCAGA 1082
 Pv-SSU 1342:ATTTGCCTAAAATACTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGAGTGAAGACCGATCAGA 1401

Pf-SSU 1071:TACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGG-TGTTGGATGAAAG-T-----G 1123
 Pm-SSU 1281:TACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGG-TGTTGGATGATAG-T-----G 1333
 Po-SSU 1083:TACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGTT-TTGGATGAAAGAT----- 1135
 Pv-SSU 1402:TACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGCT-TTGGATGAAAG-T----- 1454

species-specific primer

Pf-SSU 1124:TTAAAAAT-AA-A---AGTCA---TC--T-T-CG-A-G----GTGACTTTTAG-ATT 1162
 Pm-SSU 1334:TAATAAATAAA-A-G-AGACA--TTCT-TATATATG-A-G---TGTTTCTTTTAG-ATA 1380
 Po-SSU 1136:TTTTAAAT--A-A-G-A---AAATC-CT-T-TCGG--GGAAAT-T--TCTTAG-ATT 1176
 Pv-SSU 1455:TTTTAAAT--A-A-G-A---ATTTTCTC--T-TCGG-A-GTTA--T--TCTTAG-ATT 1495

primer-2

Pf-SSU 1163:GTCTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCGAGTATTCGCGC 1222
 Pm-SSU 1381:GTCTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCGAGTATTCGCGC 1440
 Po-SSU 1163:GTCTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCGAGTATTCGCGC 1236
 Pv-SSU 1163:GTCTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCGAGTATTCGCGC 1555

Pf-SSU 1223:AAGCGAGAAAGTTAAAAGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCTTGCGGCTTA 1282
 Pm-SSU 1441:AAGCGAGAAAGTTAAAAGAACCAGCAGGAAGGGGA-CA-CAGGCGTGGAGCTTGCGGCTTA 1498
 Po-SSU 1237:AAGCGAGAAAGTTAAAAGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCTTGC-GCTTA 1295
 Pv-SSU 1556:AAGCGAGAAAGTTAAAAGAATT--CGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCTTGCGGCTTA 1613

Pf-SSU 1283:ATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACTAGTTTAAGACAAGAGTAGCATTGACAGATTAAT 1342
 Pm-SSU 1499:ATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACTAGTTTAAGACAAGAGTAGCATTGACAGATTAAT 1558
 Po-SSU 1296:ATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACTAGTTTAAGACAAGAGTAGCATTGACAGATTAAT 1355
 Pv-SSU 1614:ATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACTAGTTTAAGACAAGAGTAGCATTGACAGATTAAT 1673

Pf-SSU 1343:AGCTCTTCTTGATTTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTAGTTTCGTGAATATGATT 1402
 Pm-SSU 1559:AGCTCTTCTTGATTTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTAGTTTCGTGAATATGATT 1618
 Po-SSU 1356:AGCTCTTCTTGATTTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTAGTTTCGTGAATATGATT 1415
 Pv-SSU 1674:AGCTCTTCTTGATTTCTTGGATGGTGATGCATGGCCGTTTTAGTTTCGTGAATATGATT 1733

Pf-SSU 1403:TGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCGAGTACACT 1462
 Pm-SSU 1619:TGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGG-TAATACACT 1677
 Po-SSU 1416:TGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGCGAATACGTT 1475
 Pv-SSU 1734:TGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGG--A-A---- 1786

รูปที่ 9 แสดงลำดับเบสบางส่วนของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียที่จำเพาะกับชนิดเชื้อ

P. falciparum (Pf) *P. malariae* (Pm) *P. ovale* (Po) และ *P. vivax* (Pv) เพื่อใช้ใน

การวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการศึกษากรดนิวคลีอิกในแง่ของโครงสร้าง ขนาด ปริมาณ จากการใช้กรดนิวคลีอิกจำนวนเล็กน้อย โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลีอิกที่มีโครงสร้างประกอบด้วย หมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) ทำให้มีประจุเป็นลบ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยวิ่งผ่านตัวกลางคือเจลที่ใช้ เช่น

อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เตรียมโดยการชั่งอะกาโรส 2.5 กรัม ละลายใน TAE buffer 100 มล. นำไปอุ่นให้ร้อนจนเจลละลายหมดแต่ไม่ควรให้เดือด ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60°C นำไปเทในถาดพลาสติกที่เตรียมไว้ขนาด 5.5 x 10.5 เซ็นติเมตร จากนั้นใส่หวี (comb) ลงไปในช่องที่เตรียมเพื่อทำร่องสำหรับหยอดผลผลิตจาก PCR ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ให้เจลแข็งตัว เท TAE buffer ลงไปให้ท่วมผิวหน้าเจลแล้วจึงค่อย ๆ ดึงหวีออกจากเจล จากนั้นยกถาดไปวางใน chamber (horizontal electrophoresis) ที่มี TAE buffer โดยให้ปริมาณของบัฟเฟอร์ท่วมเจลประมาณ 1 เซ็นติเมตร

นำผลผลิตจาก PCR ที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 7:2 แล้วหยอดลงไปในหลุมบนเจล โดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (50 base ladder) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ศึกษา เปิด power supply ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านเจลจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 50 นาที หรือจนกระทั่งสีของ bromphenol blue เคลื่อนที่ไปได้ 2 ใน 3 ของเจล จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (1µg/ml) ใน TAE buffer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำสะอาดประมาณ 10 นาที ตรวจสอบแถบ DNA จากการเรืองแสงภายใต้แสง UV

การวิเคราะห์ผลการตรวจฟิล์มโลหิต

ฟิล์มเลือดในรายที่พบเชื้อมาลาเรียจะบันทึกผลการตรวจถึงชนิดและระดับความหนาแน่นของเชื้อ สำหรับการประเมินความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียจากตรวจนับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อ 200 เม็ดเลือดขาวในการตรวจฟิล์มเลือดหนา และตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียใน 100 วงกลิ้งสำหรับตรวจฟิล์มเลือดบาง ที่กำลังขยายเลนส์ objective 100 เท่าใน oil immersion

ลักษณะของเชื้อมาลาเรียในคน (Marquardt & Demaree, 1985)

P. falciparum เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีขนาดเท่าเดิม พบแต่ระยะวงแหวนและ gametocyte ในกระแสเลือด ระยะวงแหวนบางมักพบโครมาติน 2 จุด (double chromatin) และพบเชื้อระยะวงแหวน ทาบอยู่ที่ขอบเม็ดเลือดแดง (marginal form) นอกจากนี้ในหนึ่งเม็ดเลือดแดงมักพบระยะวง

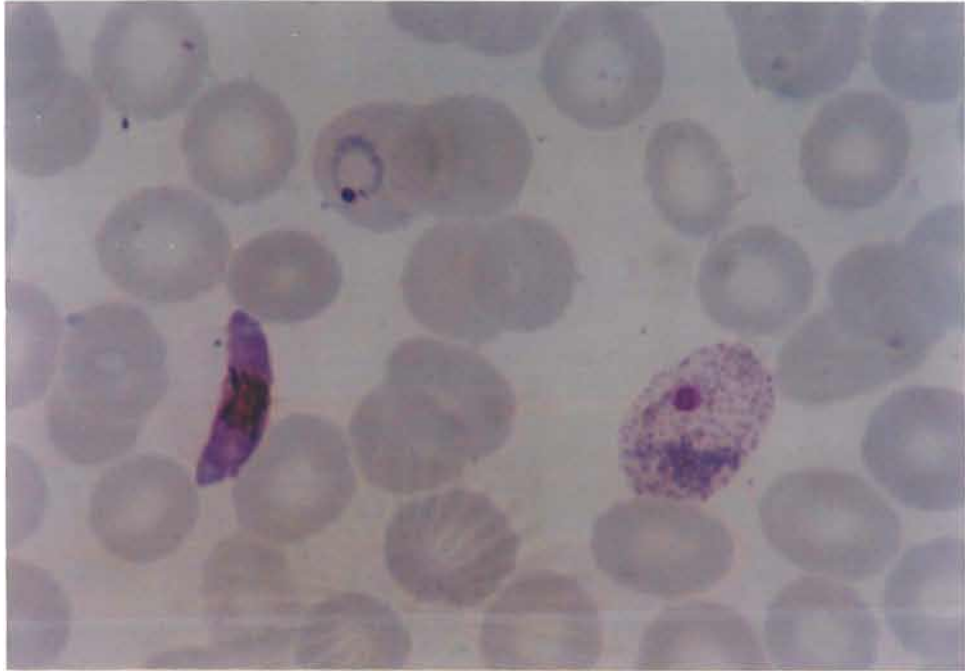
แหวนหลายตัว (multiple infection) ไม่ค่อยพบระยะ amoeboid form และ schizont แต่พบได้ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง merozoite มีจำนวน 16-32 ตัว มี pigment เป็นก้อนสีดำ โดย merozoite ของ *P. falciparum* จะเข้าไปเจริญในเม็ดเลือดแดงไม่แตกอายุ มีเม็ดสีน้อยและหายาเรียกว่า Maurer's dots gametocyte จะมีรูปร่างหรือพระจันทร์เสี้ยวหรือกล้วยหอม ในฟิล์มบางมักไม่เห็นขอบของเม็ดเลือดแดง

P. vivax เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น ยกเว้นระยะวงแหวนที่เม็ดเลือดแดงยังคงขนาดเท่าเดิม พบเชื้อได้ทุกระยะในกระแสเลือด ลักษณะการเจริญของเชื้อในเม็ดเลือดแดงจะยื่น cytoplasm บางส่วนออกไป ทำให้มีลักษณะเป็น amoeboid form ตัวเชื้อจะมีขนาดใหญ่เห็น vacuole ชัด โดยทั่วไประยะวงแหวนของ *P. vivax* จะมีขนาดใหญ่กว่าของ *P. falciparum* ระยะ mature schizont จะมี merozoites ประมาณ 12-24 ตัว โดย merozoites ของ *P. vivax* ชอบเม็ดเลือดแดงอายุน้อย (reticulocyte) มีเม็ดสีจำนวนมากละเอียดเรียกว่า Schuffner's dots ลักษณะ gametocyte กลมหรือค่อนข้างกลม

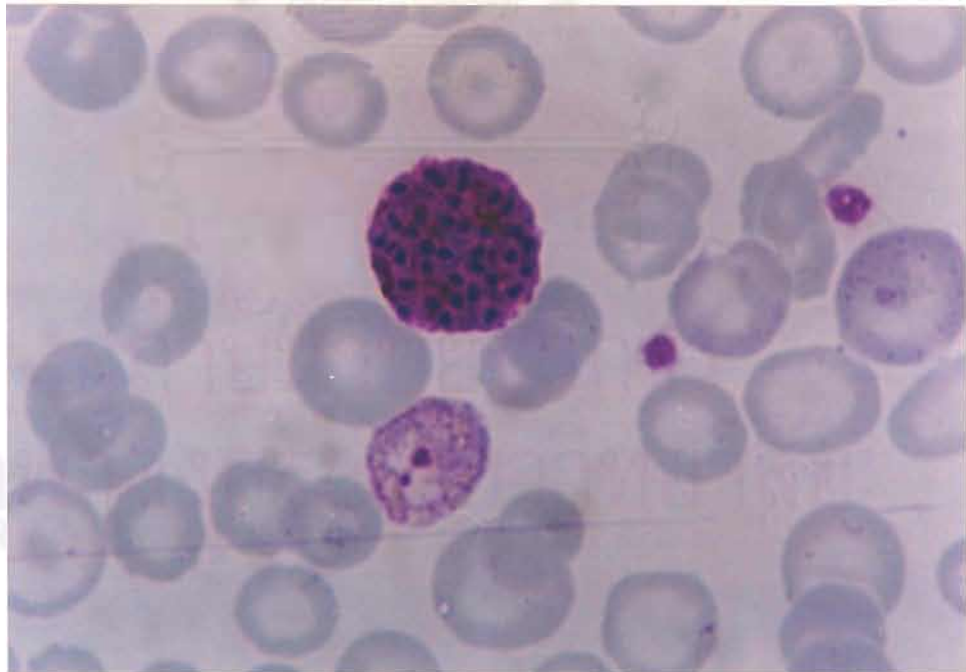
P. malariae เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีขนาดปกติ มีเม็ดสีเกิดขึ้นเร็วค่อนข้างหายาติดสีเข้มพบได้ตั้งแต่ ระยะแรกของวงแหวน พบเชื้อได้ทุกระยะในกระแสเลือด ระยะ mature schizont จะมี merozoites ประมาณ 6-12 ตัว (8 ตัว) มีเม็ดสีอยู่ตรงกลางดูคล้ายดอก daisy หรือ rosette โดย merozoites ของ *P. malariae* ชอบเม็ดเลือดแดงอายุค่อนข้างแก่ เม็ดสีจำนวนน้อยบางครั้งมองไม่ค่อยเห็น เรียกว่า Ziemann's dots gametocyte มีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม

P. ovale เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจะ โตขึ้นเล็กน้อย ยกเว้นระยะวงแหวนซึ่งพบเม็ดเลือดแดงขนาดเท่าเดิม บางครั้งจะพบเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีรูปร่างเป็นรูปไข่ หรือมีการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดง โดยขอบของเม็ดเลือดแดงมักมีรูปรี่หรือขอบเป็นหยักข้างเดียวหรือสองข้าง พบเชื้อได้ทุกระยะในกระแสเลือด ระยะ mature schizont มี merozoite ประมาณ 6-12 ตัว (8 ตัว) แต่ไม่เรียงตัวเป็น rosette form มีเม็ดสีลักษณะหายาเกิดขึ้นเร็วและมีจำนวนมากเห็นชัดเจน พบได้ตั้งแต่ระยะแรกๆ เรียกว่า Schuffner's dots ลักษณะ gametocyte กลมหรือ ค่อนข้างกลมคล้าย *P. vivax* และ *P. malariae*

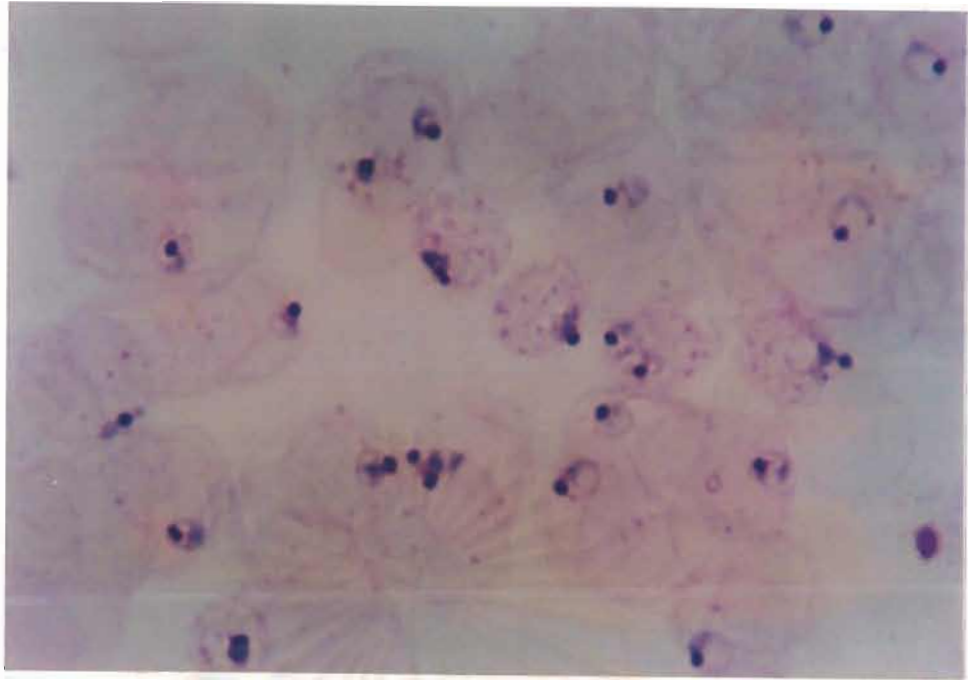
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



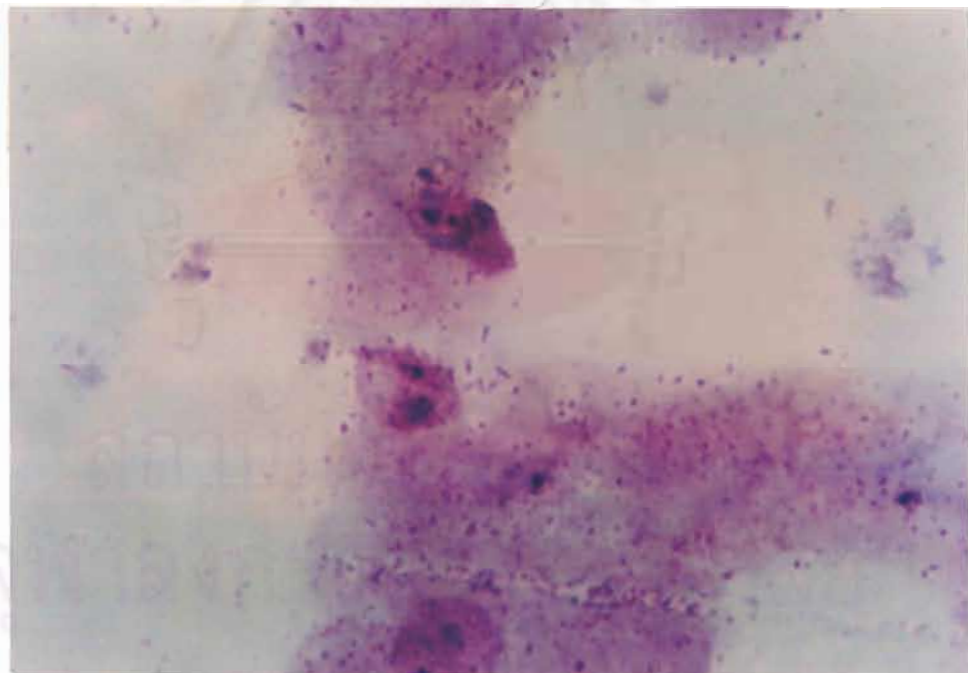
รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเชื้อมาลาเรียจากการย้อมฟิล์มเลือดบางด้วยสียิมซ่า ด้านบนจะเป็นเชื้อ *Plasmodium* ระยะวงแหวน cytoplasm ตืดสีแดง-ม่วง เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อระยะนี้ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง เชื้อมาลาเรียด้านล่างซ้ายที่มีรูปร่างคล้ายกล้วยหอมหรือพระจันทร์เสี้ยวคือ ระยะ gametocyte ของเชื้อ *P. falciparum* ส่วนด้านล่างขวาจะเป็นระยะ growing trophozoite ของเชื้อ *P. vivax* เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อระยะนี้จะมีขนาดใหญ่ขึ้นสีซีดลงกว่าปกติ และมีจุดขนาดเล็กที่ติดสีชมพูจำนวนมาก (Schuffner's dot)



รูปที่ 11 แสดงลักษณะของเชื้อมาลาเรียจากการย้อมฟิล์มเลือดบางด้วยสียิมซ่า ด้านบนแสดงลักษณะของเชื้อ *P. vivax* ระยะ late schizont ซึ่งจะมีการแบ่งตัวทั้ง chromatin และ cytoplasm เกิดเป็น merozoite จำนวนมากกว่า 20 ตัว ส่วนด้านล่างเป็นระยะ late trophozoite



รูปที่ 11 แสดงลักษณะของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมด้วย สียิมซ่า พบระยะวงแหวน และ young trophozoite



รูปที่ 12 แสดงลักษณะของเชื้อ *P. vivax* จากการย้อมฟิล์มเลือดหนาด้วยสียิมซ่า เชื้อระยะ growing trophozoite นั้น chromatin จะเป็นจุดสีแดงอยู่รวมกันเป็นก้อน ส่วน cytoplasm จะติด สีฟ้า-ม่วง

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

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

1. ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น เพศ เชื้อชาติ แหล่งที่อยู่ ประวัติการเป็นมาลาเรีย และอาการสำคัญวิเคราะห์ในรูปแบบของความถี่และร้อยละ ส่วนลักษณะข้อมูลทั่วไปที่เป็นเชิงปริมาณ เช่น อายุ เชื้อชาติ จำนวนปีที่เข้ามาอยู่ในประเทศไทย จำนวนครั้งที่เป็นมาลาเรีย อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเลือด (hematocrit) วิเคราะห์ในรูปแบบความถี่ ร้อยละ ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. เก็บรวบรวมข้อมูลชนิดเชื้อมาลาเรียและความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย โดยอาศัยการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาและบาง
3. เก็บข้อมูลชนิดของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจากการตรวจด้วยวิธี PCR โดยอ่านผลจากภาพถ่ายแถบ DNA
4. เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจากการตรวจจากฟิล์มเลือดและวิธี PCR
5. นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียจากการตรวจฟิล์มเลือดหนาและบาง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กับการตรวจด้วยวิธี PCR เพื่อเปรียบเทียบและประเมินผลในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย ดังนี้
 - 5.1 ความไว (sensitivity) เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR ที่จะบอกถึงอัตราส่วนของผลบวกในการตรวจผู้ป่วยมาลาเรีย
 - 5.2 ความจำเพาะ (specificity) เป็นคุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค PCR ที่จะบอกถึงอัตราส่วนของผลลบในการตรวจคนปกติ
 - 5.3 ความเที่ยงตรง (likelihood ratio) เป็นคุณสมบัติของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียที่จะบอกจำนวนที่เป็นโรคมมาลาเรียเมื่อได้ผลบวก และไม่เป็นโรคมมาลาเรียเมื่อได้ผลลบเป็นสัดส่วนเท่าใดในประชากรที่มาตรวจ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผู้ป่วยมีไข้ที่มารับบริการตรวจเลือด ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 อำเภอพบพระ จังหวัดตาก จำนวน 150 คน ที่มารับบริการในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2539 - กุมภาพันธ์ 2540 เป็นเพศชายร้อยละ 66.7 และเพศหญิงร้อยละ 33.3 อายุเฉลี่ย 37.8 ปี ช่วงอายุที่มีประชากรมากที่สุด คือ 16-25 ปี ผู้ป่วยที่มารับบริการตรวจเลือกร้อยละ 82.7 ชาวต่างชาติซึ่งส่วนใหญ่เป็นชาวพม่าที่เข้ามาอยู่ในเขตอำเภอพบพระมากกว่า 1 ปีร้อยละ 87.8 ผู้ป่วยเคยเป็นมาลาเรียมาก่อนคิดเป็นร้อยละ 51.7 โดยเฉลี่ยเคยเป็นมาลาเรีย 2 ครั้ง ป่วยด้วยโรคมลาเรียครั้งสุดท้ายประมาณ 1 เดือนก่อนมาตรวจร้อยละ 53.95 โดยผู้ป่วยจะมาตรวจเลือดด้วยอาการสำคัญคือไข้ ไข้หนาวสั่นร่วมกับปวดศีรษะ มีอาการไข้ก่อนมารับการตรวจเลือด 3 วัน ระดับความเข้มข้นของเลือดยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ (ค่า hematocrit เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 35.2) (ตารางที่ 6-7)

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

ข้อมูล	จำนวน	ร้อยละ
1. เพศ		
- ชาย	100	66.7
- หญิง	50	33.3
2. กลุ่มอายุ		
- 1 - 15 ปี	23	15.3
- 16 - 25 ปี	80	53.3
- 26 - 45 ปี	41	27.3
- 46 - 60 ปี	5	3.3
- 60 ปีขึ้นไป	1	0.7

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง (ต่อ)

ข้อมูล	จำนวน	ร้อยละ
3.แหล่งที่อยู่		
- ใน อ.พบพระ จ.ตาก	140	93.3
- นอก อ.พบพระ แต่ใน จ.ตาก	1	0.7
- นอก จ.ตาก	4	2.7
- ประเทศเมียนมาร์	5	3.3
4. เชื้อชาติ		
- ไทย	26	17.3
- พม่า	65	43.3
- กะเหรี่ยง	45	30
- ชาวไทยภูเขา และอื่นๆ	14	9.4
5. ระยะเวลาที่ชาวต่างชาติที่มาอาศัยอยู่		
ใน อ.พบพระ จ.ตาก		
- น้อยกว่า 6 เดือน	9	7.3
- 6 - 12 เดือน	2	1.6
- 1 - 3 ปี	96	77.4
- 4 - 5 ปี	6	4.8
- มากกว่า 5 ปี	7	5.6
- ไม่มีข้อมูล	4	3.2
6. ประวัติการป่วยด้วยโรคมาลาเรีย		
6.1 ป่วยด้วยโรคมาลาเรีย		
- เคยป่วย	79	52.7
- ไม่เคยป่วย	71	47.3

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง (ต่อ)

ข้อมูล	จำนวน	ร้อยละ
6.2 จำนวนครั้งที่ป่วยด้วยโรคมาลาเรีย		
- 1 ครั้ง	36	45.6
- 2 ครั้ง	26	32.9
- 3 ครั้ง	4	5.1
- 4 ครั้ง	3	3.8
- มากกว่า 4 ครั้ง	5	6.3
- ไม่มีข้อมูล	5	6.3
6.3 ป่วยด้วยมาลาเรียครั้งสุดท้าย		
- 1 เดือน	41	51.9
- 2 เดือน	13	16.5
- 3 เดือน	1	1.3
- 4 - 6 เดือน	9	11.4
- 7 - 12 เดือน	1	1.3
- มากกว่า 1 ปี	11	13.9
- ไม่มีข้อมูล	3	3.8
7. อาการป่วยปัจจุบัน		
7.1 อาการสำคัญ		
- ไข้อย่างเดียว	6	4
- ไข่นานวันและปวดศีรษะ	79	52.7
- ไข้และปวดศีรษะ	47	31.3
- ไข่นานวันปวดศีรษะและอาเจียน	5	3.3
- ไข้ร่วมกับอาการอื่นๆ	13	8.7
7.2 จำนวนวันที่เป็นไข้		
- 1 - 2 วัน	92	61.3
- 3 - 4 วัน	42	28
- 5 วันขึ้นไป	16	10.7

ตารางที่ 7 สรุปข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

ข้อมูล	Mean	Minimum	Maximum	Std. Deviation
1. อายุ	23.7	5	66	10.01
2. อุณหภูมิ	37.8	35.4	40.7	1.11
3. จำนวนครั้งที่เคยเป็นมาลาเรีย	2	1	9	1.38
4. จำนวนวันที่เป็นไข้	2.7	1	10	1.6
5. hematocrit	35.2	20	52.03	6.41

ผลการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดบางที่ข้อมือซ้าย อัตราการตรวจพบเชื้อ ร้อยละ 56 จำแนกเป็นเชื้อชนิด *P. falciparum* ร้อยละ 17.3 *P. vivax* ร้อยละ 32.7 *Plasmodium* sp. ร้อยละ 0.7 และ *P. falciparum* ร่วมกับ *P. vivax* ร้อยละ 5.3 (ตารางที่ 8-9)

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดบางที่ข้อมือซ้าย

ผลการตรวจ	จำนวน (คน)	ร้อยละ
positive	84	56
negative	66	44
รวม	150	100

ตารางที่ 9 แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดบางที่ข้อมือซ้าย

ชนิดของเชื้อ	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบเชื้อ (%)
<i>P. falciparum</i>	26	17.3
<i>P. vivax</i>	49	32.7
<i>P. falciparum</i> และ <i>P. vivax</i>	8	5.3
<i>Plasmodium</i> sp.	1	0.7
รวม	84	56

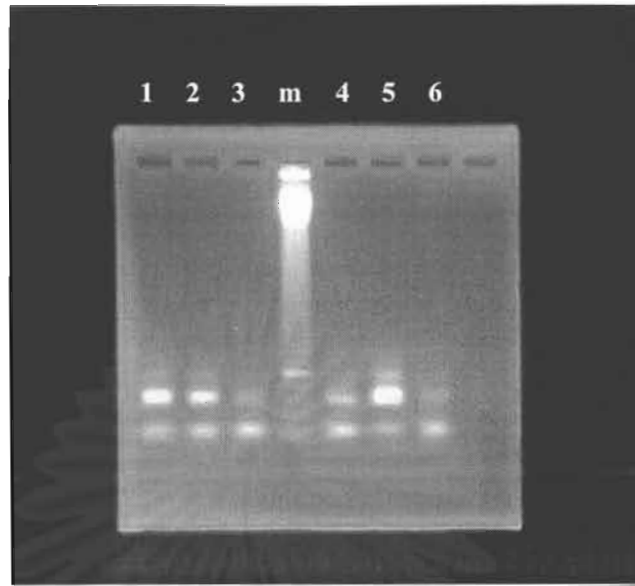
ผลการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาที่ข้อมสี่ยมซ่า อัตราการตรวจพบเชื้อ ร้อยละ 68.7 จำแนกเป็นการติดเชื้อชนิด *P. falciparum* ร้อยละ 21.3 *P. vivax* ร้อยละ 44.7 และ *P. falciparum* ร่วมกับ *P. vivax* ร้อยละ 2.7 (ตารางที่ 10-11)

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาที่ข้อมสี่ยมซ่า

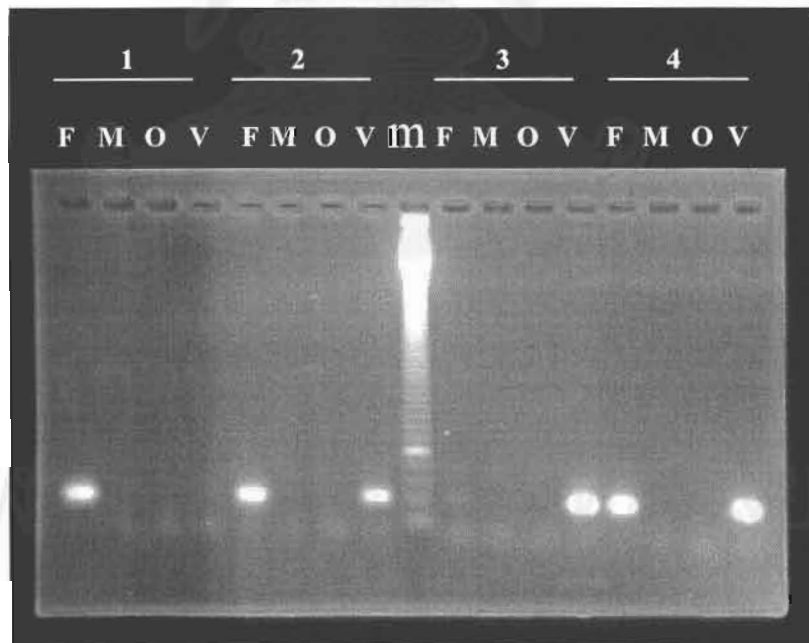
ผลการตรวจ	จำนวน (คน)	ร้อยละ
positive	103	68.7
negative	47	31.3
รวม	150	100

ตารางที่ 11 แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาที่ข้อมสี่ยมซ่า

ชนิดของเชื้อ	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบเชื้อ (%)
<i>P. falciparum</i>	32	21.3
<i>P. vivax</i>	67	44.7
<i>P. falciparum</i> และ <i>P. vivax</i>	4	2.7
รวม	103	68.7



รูปที่ 10 แสดงผลผลิต PCR รอบแรกจากการใช้ inter-species primers ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งมีความยาวประมาณ 140-160 คู่เบส โดย m คือ 50 base ladder



รูปที่ 11 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองจากการใช้ species-specific primers ในส่วน SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งมีความยาวประมาณ 110 คู่เบส โดย m คือ 50 base

ผลการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR อัตราการตรวจพบเชื้อร้อยละ 84.7 จำแนกเป็นการติดเชื้อชนิด *P. falciparum* ร้อยละ 22 *P. vivax* ร้อยละ 50 *P. falciparum* ร่วมกับ *P. vivax* ร้อยละ 11.3 และ *P. vivax* ร่วมกับ *P. malariae* ร้อยละ 1.3 (ตารางที่ 12-13)

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR

ผลการตรวจ	จำนวน (คน)	ร้อยละ
positive	127	84.7
negative	23	15.3
รวม	150	100

ตารางที่ 13 แสดงผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR

ชนิดของเชื้อ	จำนวน (คน)	อัตราการตรวจพบเชื้อ (%)
<i>P. falciparum</i>	33	22
<i>P. vivax</i>	75	50
<i>P. falciparum</i> และ <i>P. vivax</i>	17	11.4
<i>P. vivax</i> และ <i>P. malariae</i>	2	1.3
รวม	127	84.7

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อจากทั้ง 3 วิธี คือ การตรวจจากวิธี PCR ฟิล์มเลือดหนา และบาง พบว่าวิธี PCR ให้ผลอัตราการตรวจพบเชื้อแตกต่างกับอีกสองวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.0003$) (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียจำแนกตามวิธีการตรวจ

วิธีการตรวจ	ร้อยละ (%)	p-value
1. ฟิล์มเลือดบาง	56	
2. ฟิล์มเลือดหนา	68.7	
3. วิธี PCR	84.7	0.0003

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมากกว่า 1 ชนิด จากทั้ง 3 วิธี คือ วิธี PCR ฟิล์มเลือดหนา และบาง พบว่าวิธี PCR ให้ผลอัตราการตรวจพบเชื้อมากกว่า 1 ชนิด แตกต่างกับอีกสองวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.0011$) (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดจำแนกตามวิธีการตรวจ

วิธีการตรวจ	ร้อยละ (%)	p-value
1. ฟิล์มเลือดบาง	5.33	
2. ฟิล์มเลือดหนา	2.66	
3. วิธี PCR	12.67	0.0011

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อจากฟิล์มเลือดหนาจำแนกตามระยะเวลาที่ใช้ คือ 10 นาที และ 20 นาที

ระยะเวลาที่ใช้ ในการตรวจ	ฟิล์มเลือดหนา	
	พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ
มากกว่า 20 นาที	103	47
10 นาที	83	67

Odd ratio = 1.77

95% confidence limit = 1.07 – 2.92

Chi-square = 0.0238

จากตารางที่ 16 พบว่าสัดส่วนของการตรวจพบเชื้อจากฟิล์มเลือดหนาที่ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 20 นาทีมากกว่าการตรวจที่ใช้เวลาประมาณ 10 นาที คิดเป็นสัดส่วนเท่ากับ 1.77 และจากการคาดคะเนทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าสัดส่วนของการตรวจพบเชื้อที่ใช้เวลาในการตรวจ 20 นาที จะตรวจพบเชื้อมากกว่าการตรวจที่ใช้เวลา 10 นาที คิดเป็นอัตราส่วนตั้งแต่ 1.07–2.92 เท่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเปรียบเทียบอัตราตรวจพบเชื้อ (efficiency ratio) ระหว่าง 3 วิธี พบว่าวิธี PCR ให้ผลการตรวจพบเชื้อมากกว่าอีก 2 วิธี 1.22-1.38 เท่า (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียระหว่าง 3 วิธี คือ วิธี PCR फिल्मเลือดหนาและ फिल्मเลือดบาง

วิธี	อัตราตรวจพบเชื้อ (%)	Efficiency ratio		
		PCR : Thick	PCR : Thin	Thick : thin
PCR	84.7			
Thick blood film (Thick)	70.7			
Thin blood film (Thin)	61.3			
		1.22 : 1	1.38 : 1	1.15 : 1

การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาและบาง พบว่าผลการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียมีความสอดคล้องกันร้อยละ 76.7 และไม่สอดคล้องกันร้อยละ 23.3 (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดบางและหนา

Examination		Thick blood film					Total
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	negative	
Thin blood film	<i>P. falciparum</i>	24	2	0	0	0	26
	<i>P. vivax</i>	1	45	1	0	2	49
	<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	0	4	3	0	1	8
	<i>Plasmodium</i> sp.	0	0	0	0	1	1
	negative	7	16	0	0	43	66
Total		32	67	4	0	47	150

ผลการเปรียบเทียบการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย จากฟิล์มเลือดบางและวิธี PCR พบว่าผลการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียมีความสอดคล้องกันร้อยละ 55.33 และไม่สอดคล้องกันร้อยละ 46.67 (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดบางและวิธี PCR

Examination		วิธี PCR						Total
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> & <i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	negative	
Thin blood film	<i>P. falciparum</i>	18	3	5	0	0	0	26
	<i>P. vivax</i>	2	41	3	1	0	2	49
	<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	2	3	3	0	0	0	8
	<i>P. falciparum</i> & <i>P. malariae</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Plasmodium</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
	negative	11	27	6	1	0	21	66
Total		33	75	17	2	0	23	150

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเปรียบเทียบการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดหนาและวิธี PCR พบว่าผลการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียมีความสอดคล้องกันร้อยละ 66.7 และไม่สอดคล้องกันร้อยละ 33.3 (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 การเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดหนาและวิธี PCR

Examination		วิธี PCR						Total
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> & <i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium</i> sp.	negative	
Thick blood film	<i>P. falciparum</i>	23	2	8	0	0	0	33
	<i>P. vivax</i>	1	57	6	1	0	3	68
	<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	0	1	1	0	0	0	2
	<i>P. falciparum</i> & <i>P. malariae</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Plasmodium</i> sp.	1	2	0	0	0	0	3
	negative	6	16	3	0	0	19	44
Total		31	78	18	1	0	22	150

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 การเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR และการตรวจจากฟิล์มเลือด

		Blood film		Total
		positive	negative	
PCR	positive	116 (a)	11 (b)	127 (a + b)
	negative	3 (c)	20 (d)	23 (c + d)
Total		119 (a + c)	31 (b + d)	150 (a+b+c+d)

จากตารางที่ 21 พบว่าการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดและวิธี PCR ให้ผลดังนี้ คือ

ผลบวกจริง (true-positive; เซลล์ a) = 116 ราย

ผลบวกเท็จ (false-positive; เซลล์ b) = 11 ราย

ผลลบเท็จ (false-negative; เซลล์ c) = 3 ราย

ผลลบจริง (true-negative; เซลล์ d) = 20 ราย

ผลจากตารางที่ 21 เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยการคำนวณ จะได้คุณสมบัติของการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิดด้วยวิธี PCR จากการเปรียบเทียบกับผลการตรวจจากฟิล์มเลือดที่ย้อมสีิมซ่า ดังนี้

$$\begin{aligned}
 1. \text{ ความไวของการตรวจ} &= (a / a+c) \times 100 \\
 &= (116 / 119) \times 100 \\
 &= 97.48 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \text{ ความจำเพาะของการตรวจ} &= (d / b+d) \times 100 \\
 &= (20 / 31) \times 100 \\
 &= 64.52 \%
 \end{aligned}$$

3. ความสามารถในการทำนายผลการตรวจหาเชื้อ ถ้าผลทดสอบเป็นบวก (positive predictive value)

$$\begin{aligned}
 &= (a / a+b) \times 100 \\
 &= (116 / 127) \times 100 \\
 &= 91.34 \%
 \end{aligned}$$

4. ความสามารถในการทำนายผลการตรวจหาเชื้อ ถ้าผลทดสอบเป็นลบ (negative predictive value)

$$\begin{aligned}
 &= (d / c+d) \times 100 \\
 &= (20 / 23) \times 100 \\
 &= 86.96 \%
 \end{aligned}$$

5. โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบ ถ้าผลทดสอบเป็นบวก (post-test likelihood if test positive)

$$\begin{aligned}
 &= (a / a+b) \times 100 \\
 &= (116 / 127) \times 100 \\
 &= 91.34 \%
 \end{aligned}$$

6. โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อหลังการทดสอบ ถ้าผลทดสอบเป็นลบ (post-test likelihood if test negative)

$$\begin{aligned}
 &= (c / c+d) \times 100 \\
 &= (3 / 23) \times 100 \\
 &= 13.04 \%
 \end{aligned}$$

7. ความถูกต้อง (accuracy) หรือประสิทธิภาพของการตรวจ (efficiency of test)

$$\begin{aligned}
 &= (a+d) \times 100 / (a+b+c+d) \\
 &= (136 \times 100) / 150 \\
 &= 90.67 \%
 \end{aligned}$$

8. Likelihood ratio

$$\begin{aligned}
 &= \text{sensitivity} / \text{specificity} \\
 &= 97.49 / 64.52
 \end{aligned}$$

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ปัจจัยด้านประชากรกับการตรวจพบเชื้อมาลาเรีย

ปัจจัย	ตรวจพบเชื้อ		ตรวจไม่พบเชื้อ		OR	95% CI	p-value (Chi-square)
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ			
เพศ							
ชาย	85	85	15	15	1.08	0.38-2.99	0.936
หญิง	42	84	8	16			
กลุ่มอายุ							
1-20 ปี	70	84.34	13	15.66	0.94	0.35-2.51	0.917
20 ปีขึ้นไป	57	85.07	10	14.93			
เชื้อชาติ							
ไทย	22	84.61	4	15.38	1.12	0.28-4.72	1.0
ต่างชาติ	105	84.7	2	15.3			

หมายเหตุ : CI = confidence interval

OR = Odd ratio

จากตารางที่ 22 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านประชากรกับการตรวจพบเชื้อมาลาเรีย ดังนี้

เพศ พบว่าสัดส่วนการตรวจพบเชื้อทั้งในเพศชายและหญิงมีความใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบความสัมพันธ์พบว่า เพศไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อหรือการป่วยด้วยโรคมมาลาเรีย

อายุ ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงวัยทำงาน 16-25 ปี เมื่อทดสอบความสัมพันธ์พบว่า กลุ่มอายุไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อมาลาเรีย

เชื้อชาติ ส่วนใหญ่เป็นชาวต่างชาติเชื้อชาติเมียนมาร์ แต่มีสัดส่วนการตรวจพบเชื้อที่ใกล้เคียงกับคนไทย เมื่อทดสอบความสัมพันธ์พบว่า เชื้อชาติไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อมาลาเรีย

ตารางที่ 23 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียจำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ปัจจัย	จำนวน	Mean	Mean rank	Sum of ranks	p-value
เพศ					
ชาย	82	12,428	59.01	4,839	0.642 *
หญิง	37	13,942	62.19	2,301	
อายุ					
1-20 ปี	66	12,382	64.59		0.016 **
21-40 ปี	44	7,760	49.18		
> 40 ปี	9	41,741	79.22		
เชื้อชาติ					
ไทย	17	5,519	43.59	741	0.034 *
เมียนมาร์	102	14,123	62.74	6,399	
ประวัติการป่วยด้วยโรคมาลาเรีย					
เคยป่วย	58	11,553	56.80	3,294.5	0.324 *
ไม่เคยป่วย	69	14,168	63.04	3,845.5	
จำนวนครั้งที่เคยเป็นมาลาเรีย					
ไม่เคยป่วย	69	14,168	61		0.229 **
1-2 ครั้ง	45	13,577	45		
มากกว่า 2 ครั้ง	13	4,546	13		
ป่วยด้วยโรคมาลาเรียครั้งสุดท้ายเมื่อ					
1-3 เดือน	55	50,737	30.95	1,238	0.330 *
มากกว่า 3 เดือน	21	4,814	26.28	473	
ชนิดเชื้อ					
<i>P. falciparum</i>	32	26,983	61.81		0.678 **
<i>P. vivax</i>	65	8,009	55.56		
<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	17	6,297	56.79		

หมายเหตุ : * The Wilcoxon Mann Whitney Test

** The Kruskal Wallis One Way ANOVA Test (Significance = 0.05)

จากตารางที่ 23 เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในการตรวจนับจากฟิล์มเลือดหน้ากับตัวแปรอิสระคือ เพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยโรคมมาลาเรีย และชนิดของเชื้อมาลาเรีย พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อกับเพศ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในแต่ละกลุ่มอายุและเชื้อชาติ คือ ไทยและเมียนมาร์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.016$ และ 0.034 ตามลำดับ)

ตารางที่ 24 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มตัวประชากรที่เคยป่วยด้วยมาลาเรียจำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ปัจจัย	จำนวน	Mean	Mean rank	Sum of ranks	p-value
เพศ					
ชาย	40	12,696	28.21	1,128.5	0.387 *
หญิง	18	9,010	32.36	582.5	
อายุ					
1-20 ปี	24	8,813	33.27		0.041 **
21-40 ปี	27	3,900	23.76		
> 40 ปี	7	50,464	38.74		
เชื้อชาติ					
ไทย	13	6,762	22.81	296.5	0.105 *
เมียนมาร์	102	14,123	31.43	1,414.5	
จำนวนครั้งที่เคยเป็นมาลาเรีย					
1-2 ครั้ง	45	13,577	31.10	1,399.5	0.179 *
มากกว่า 2 ครั้ง	13	4,546	23.96	311.5	
ชนิดเชื้อ					
<i>P. falciparum</i>	20	22,882	29.23		0.969 **
<i>P. vivax</i>	29	4,766	28.03		
<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	7	5,799	28.36		

หมายเหตุ : * The Wilcoxon Mann Whitney Test

จากตารางที่ 24 เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรตัวอย่างที่เคยป่วยด้วยโรคมาลาเรียกับตัวแปรอิสระคือ เพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรีย พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในแต่ละกลุ่มของตัวแปรอิสระได้แก่ เพศ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มที่เคยป่วยด้วยโรคมาลาเรียในแต่ละกลุ่มอายุมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.041)

ตารางที่ 25 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ไม่เคยป่วยด้วยมาลาเรียจำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียและชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ปัจจัย	จำนวน	Mean	Mean rank	Sum of ranks	p-value
เพศ					
ชาย	42	12,174	31.45	1,312	0.767 *
หญิง	19	18,579	30	570	
อายุ					
1-20 ปี	42	14,422	32.04		0.486 **
21-40 ปี	17	13,890	27.32		
> 40 ปี	2	12,210	40.50		
เชื้อชาติ					
ไทย	4	1,480	20.75	83	0.249*
เมียนมาร์	57	15,059	31.75	1,808	
ชนิดเชื้อ					
<i>P. falciparum</i>	12	33,819	35.46		0.385 **
<i>P. vivax</i>	36	10,621	27.74		
<i>P. falciparum</i> & <i>P. vivax</i>	6	6,647	28.70		

หมายเหตุ : * The Wilcoxon Mann Whitney Test

** The Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance Test

จากตารางที่ 25 เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากร ตัวอย่างที่ไม่เคยป่วยด้วยมาลาเรียมาก่อนกับตัวแปรอิสระคือ เพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ และชนิดของเชื้อ มาลาเรีย พบว่าค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในแต่ละกลุ่มของตัวแปรอิสระดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความความเชื่อมั่นร้อยละ 95



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะพื้นที่ของอำเภอพบพระ จังหวัดตาก ส่วนใหญ่เป็นภูเขาที่มีพื้นที่ราบขนาดเล็กจำนวนมากกระจายทั่วไป พื้นที่ราบที่กว้างที่สุดเป็นที่ตั้งของสำนักงานอำเภอพบพระ โรคมาลาเรียที่ระบาดจะพบกระจายเป็นจุดๆ มีความสัมพันธ์กับแหล่งเพาะพันธุ์ยุงพาหะ ซึ่งไม่สะดวกต่อการควบคุม โดยเฉพาะการควบคุมยุงพาหะ อำเภอพบพระเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียตลอดปี การแพร่ระบาดของโรคสูงในช่วงเดือนพฤศจิกายน-มกราคม (Luxemburger et al., 1996) ยังไม่มีการศึกษาถึงอัตราการกัดของยุงที่มีเชื้อของประชากรในพื้นที่ (inoculation rate) ชัดเจน แต่พบว่าจังหวัดแม่ฮ่องสอนซึ่งมีพื้นที่ติดกับจังหวัดตากมี inoculation rate เท่ากับ 0.005-0.009 infective bites ต่อคนต่อคืน (Somboon et al., 1998) ซึ่งจังหวัดแม่ฮ่องสอนมีอัตราการตรวจพบเชื้อ 38 คนต่อหนึ่งพันประชากร ในขณะที่จังหวัดตากมีอัตราการแพร่เชื้อสูงถึง 62 ต่อหนึ่งพันประชากร และโอกาสที่จะเป็นโรคมาลาเรียยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่เสี่ยงต่อการเป็นมาลาเรีย ซึ่งในการศึกษานี้ได้นำปัจจัยด้านประชากรที่เป็นข้อมูลทั่วไปและประวัติการป่วยด้วยมาลาเรียจากประชากรตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพบว่า

อัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียในเพศชายจะมากกว่าเพศหญิงเท่ากับ 2.02 : 1 แต่จากการทดสอบทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 1.0$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fungladda (1987) แต่เหตุที่พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง เนื่องจากเพศชายทำงานนอกบ้านมีโอกาสสัมผัสกับปัจจัยเสี่ยงมากกว่าเพศหญิง เช่น การเข้าป่าจะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคมาลาเรียมากกว่าคนที่ไม่เข้าป่าถึง 12.75 เท่า (95% CI = 4.74-34.33) (Somboon et al., 1998)

เมื่อแบ่งกลุ่มอายุของประชากรตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่ม คือ 1-15 ปี 16-25 ปี 26-45 ปี 46-60 ปีและ 60 ปีขึ้นไป พบว่ากลุ่มผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียจะมีจำนวนน้อยเมื่ออายุน้อยและเพิ่มมากขึ้นตามอายุ แต่พบมากในช่วงอายุ 16-25 ปี ซึ่งอยู่ในช่วงวัยทำงาน สอดคล้องกับการศึกษาที่จังหวัดกาญจนบุรี (Kanjapan et al., 1983; Fungladda et al., 1987) โดยมีค่าเฉลี่ยอายุผู้ป่วย 23.68 ปี แม้ว่าจะพบโรคมาลาเรียมากในคนวัยทำงาน แต่อายุไม่มีความสัมพันธ์กับการป่วยเป็นโรคมาลาเรียอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.654$) คำนึงการศึกษาของ Funglada (1987) ที่พบว่าอายุมีความสัมพันธ์กับการป่วยด้วยโรคมาลาเรียซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าป่า และ *P. vivax* จะพบมากในเด็กและ

พบได้น้อยลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น ส่วน *P. falciparum* จะพบมากเมื่ออายุมากขึ้นแต่พบมากที่สุดในช่วงอายุ 20-29 ปี (Luxemburger et al., 1996)

กลุ่มประชากรที่ศึกษาเป็นชาวต่างชาติร้อยละ 82.7 และอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียร้อยละ 84 สถานการณ์โรคมาลาเรียในชาวต่างชาติถือว่าเป็นอุปสรรคต่อการควบคุมโรคอย่างยิ่ง โดยในปี พ.ศ.2535-2540 จำนวนผู้มีเชื้อมาลาเรียชาวต่างชาติอยู่ในช่วง 57,648-66,622 ราย ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้น (กองมาลาเรีย, 2540) และจำนวนมากกว่าผู้ป่วยชาวไทย ผู้ป่วยชาวต่างชาติซึ่งส่วนใหญ่เป็นชาวพม่า ในเขตพื้นที่อำเภอพบพระชาวต่างชาติจะไม่ค่อยอพยพย้ายที่อยู่บ่อย ชนิดเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่ที่พบคือ *P. falciparum* และ *P. vivax* ส่วน *P. malariae* พบเพียงร้อยละ 1.3 ในพื้นที่ตามแนวชายแดนไทยเมียนมาร์เหมือนกัน เช่น จังหวัดระนอง พบเชื้อชนิด *P. malariae* สูงร้อยละ 23.33 และ *P. ovale* ร้อยละ 3.33 ส่วนจังหวัดแม่ฮ่องสอน พบเชื้อชนิด *P. malariae* ในอัตราร้อยละ 17.95 และเชื้อชนิด *P. ovale* ร้อยละ 0.64 (Zhou et al., 1999) ในขณะที่อัตราการตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ชนิดในอำเภอพบพระพบเชื้อชนิด *P. malariae* เพียงร้อยละ 1.33 และไม่พบเชื้อ *P. ovale* นั้น ความแตกต่างกันน่าจะมีความสัมพันธ์กับการย้ายถิ่นฐาน ซึ่งผู้ป่วยในทั้ง 3 พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นชาวเมียนมาร์ แต่ผู้ป่วยในอำเภอพบพระกว่าร้อยละ 90 อยู่ในพื้นที่มากกว่า 1 ปี การป่วยน่าจะเป็นการติดเชื้อในพื้นที่ (indigenous cases) ส่วนในพื้นที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนและระนองเป็นการเก็บตัวอย่างชาวต่างชาติที่มีการอพยพบ่อยมากการติดเชื้อน่าจะเป็นการติดเชื้อนอกพื้นที่และจากต่างประเทศ (imported cases) นอกจากนี้ยังพบว่าการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้คือต่อยารักษาที่มีความสัมพันธ์กับการอพยพของผู้ลี้ภัยสงครามในพื้นที่ชายแดนด้านตะวันตกของประเทศไทย (Luxemburger et al., 1996)

ในกลุ่มศึกษาผู้ป่วยที่มีไข้แต่ไม่เคยป่วยด้วยโรคมาลาเรีย จำนวนร้อยละ 47.3 ตรวจพบเชื้อมาลาเรียร้อยละ 87.3 ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อในกลุ่มที่ไม่เคยเป็นมาลาเรียเท่ากับ 11,261 ตัวต่อไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียกับตัวแปรอิสระคือ เพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติและชนิดของเชื้อมาลาเรีย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการจัดแบ่งกลุ่มอายุเป็น 3 กลุ่มคือ น้อยกว่า 20 ปี 21-40 ปี และมากกว่า 40 ปี เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของการติดเชื้อในแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่มอายุมากกว่า 40 ปี มีความหนาแน่นของเชื้อมากกว่ากลุ่มอายุอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.041) แนวโน้มค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อเพิ่มเมื่ออายุเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีปัจจัยจากภูมิคุ้มกันทางคลินิก (clinical immunity) ทำให้อาการป่วยไม่รุนแรง (McGergor IA, 1987) ผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวจึงใช้เวลาหลายวันก่อนที่จะมารับการตรวจ ดังนั้นปริมาณเชื้อจึงมาก นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด พบในกลุ่มคนที่ไม่เคยเป็นมาลาเรียมากกว่าเคยเป็นมาลาเรีย 2.2 เท่า

สำหรับข้อมูลการป่วยในอดีต พบว่าประชากรที่ศึกษาเคยป่วยด้วยโรคมาลาเรียในอัตรา ร้อยละ 52.7 จำนวนครั้งที่เคยป่วยตั้งแต่ 1-9 ครั้ง ค่าเฉลี่ยที่เคยเป็นมาลาเรีย 2 ครั้ง ตรวจพบเชื้อ

ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อระหว่างกลุ่มที่เคยป่วยและไม่เคยป่วยด้วยโรคมาลาเรียพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อในเพศชายและหญิงที่เคยป่วยด้วยโรคมาลาเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.234) การตรวจพบเชื้อในชาวไทยและชาวต่างชาติที่เคยป่วยด้วยโรคมาลาเรียไม่พบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.455) และจากการแบ่งกลุ่มผู้ที่เคยเป็นมาลาเรียออกเป็น 3 กลุ่มคือ เคยเป็นมาแล้ว 1 ครั้ง 2 ครั้ง และมากกว่า 2 ครั้ง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อที่ตรวจพบในกลุ่มคนทั้ง 3 กลุ่มดังกล่าว ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.856) ดังนั้นแม้ว่าการติดเชื้อซ้ำหลายครั้งสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันทางคลินิกซึ่งพบได้ชัดเจนในทวีปแอฟริกาซึ่งมีการระบาดของเชื้อมาลาเรียสูงกว่าในประเทศไทยมาก การที่ไม่พบความแตกต่างในความหนาแน่นของเชื้อดังกล่าว อาจเป็นเครื่องชี้โดยอ้อมว่าภูมิคุ้มกันทางคลินิกอาจพบได้ไม่ชัดเจนในประเทศไทย ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเชื้อที่ตรวจพบจำแนกเป็น 3 กลุ่มคือ *P. falciparum* *P. vivax* และ *P. falciparum* ร่วมกับ *P. vivax* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.062) คนที่เคยป่วยด้วยโรคมาลาเรียมาก่อนจะมีภูมิคุ้มกันมากกว่าคนที่ไม่เคยป่วย ดังนั้นเมื่อเป็นโรคครั้งหลังอาการจะรุนแรงน้อยลง (Deloron et al., 1992) ดังนั้นคนที่มิใช่เชื้อมาลาเรียจำนวนมากอาจจะมีอาการไม่รุนแรง

จากการศึกษาที่นำวิธี PCR มาใช้ในการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยมีไข้ที่มารับบริการตรวจเลือด ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงที่ 4 อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2539 - มีนาคม พ.ศ.2540 จำนวน 150 คน พบว่าผู้ป่วยที่ผลการตรวจด้วยวิธี PCR ตรวจพบเชื้อจำนวน 103 คน เป็นเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ร้อยละ 22 *P. vivax* ร้อยละ 50 *P. falciparum* ร่วมกับ *P. vivax* ร้อยละ 11.3 สำหรับเชื้อ *P. malariae* ตรวจพบเพียง 2 ราย ไม่พบเชื้อ *P. ovale*

การตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ในพื้นที่จังหวัดตากซึ่งเป็นจังหวัดที่มีอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียมากที่สุดในประเทศ แต่จากการตรวจฟิล์มเลือดในช่วงปี พ.ศ. 2538-2540 พบอัตราการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดอยู่ในช่วงอัตราร้อยละ 0.07-0.08 (กองมาลาเรีย, 2541) แต่การตรวจด้วยวิธี PCR ในการศึกษาที่เลือดตัวอย่างที่เก็บมีทั้งอยู่ในช่วงที่มีการแพร่กระจายของโรคสูง (เดือนตุลาคม) และต่ำ (เดือนกุมภาพันธ์) อัตราการตรวจพบเชื้อมากกว่า 1 ชนิด สูงถึงร้อยละ 12.7 และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมากกว่า 1 ชนิดด้วยวิธี PCR กับวิธีตรวจฟิล์มเลือด (efficiency ratio) เท่ากับ 4.67 : 1 ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ควรมีการทำฟิล์มเลือดบางด้วยซึ่งอาจใช้สไลด์แผ่นเดียวกันกับฟิล์มเลือดหนา เพื่อใช้ตรวจสอบประกอบการตัดสินใจในรายที่พบเชื้อมีลักษณะที่ไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ไม่ชัดเจน เพราะการตรวจจากฟิล์มเลือดบางสามารถเห็นลักษณะเม็ดเลือดแดงและลักษณะสัณฐานของเชื้อได้ชัดเจนมากกว่า

การเปรียบเทียบเพื่อหาค่าความถูกต้องของเครื่องมือวินิจฉัยโรคดังกล่าว จะได้ผลถูกต้องในกรณีที่วิธีมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบมีความถูกต้องแม่นยำกว่าวิธีที่จะนำมาเปรียบเทียบ แต่ในการศึกษาครั้งนี้วิธี PCR มีความถูกต้องในการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียมากกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือด ซึ่งในการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x100 ตรวจนับเชื้อมาลาเรียต่อ 200 เม็ดเลือดขาวเท่ากับการตรวจจากเลือด 0.025 ไมโครลิตร เหมือนกับการตรวจที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงซึ่งผู้ตรวจ 1 คนจะตรวจฟิล์มเลือดหนาวันละ 50-60 แผ่นใช้เวลาแผ่นละ 5-10 นาที ซึ่งผลการตรวจพบเชื้อจากกลุ่มตัวอย่าง โดยหน่วยงานดังกล่าวในอัตราร้อยละ 55.3 และเมื่อนำมาตรวจใหม่ ใช้เวลาในการตรวจ 10-20 นาทีต่อแผ่น โดยใน 1 วันตรวจ 30-40 ฟิล์มเลือดตรวจพบเชื้อมาลาเรียในอัตราร้อยละ 70.7 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.0238$) แสดงว่าแม้แต่วิธีเดียวกันแต่ใช้เวลาต่างกันจะให้จำนวนผลการตรวจพบเชื้อแตกต่างกันอยู่ในช่วง 1.07-2.92 เท่า และวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อมากกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาและบางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.0003$) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อ (efficiency ratio) ด้วยวิธี PCR กับการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาเท่ากับ 1.2 : 1 และเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PCR กับการตรวจจากฟิล์มเลือดบางเท่ากับ 1.38 : 1 ส่วนการตรวจจำแนกรายที่ติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจพบเชื้อแตกต่างจากการตรวจฟิล์มเลือดทั้ง 2 วิธี อย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.0011$)

เมื่อนำผลการตรวจจากวิธีทั้งสองมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี PCR พบว่ามีผลการตรวจที่ไม่มีความสอดคล้องกันจำนวน 53 ตัวอย่าง (ร้อยละ 35.33) และได้ทำการตรวจซ้ำในตัวอย่าง ดังกล่าวจากฟิล์มเลือดบาง โดยตรวจนับเชื้อใน 500 วงกล้อง ส่วนฟิล์มเลือดหนาตรวจนับเชื้อต่อ 1,000 เม็ดเลือดขาวใช้เวลาในการตรวจโดยเฉลี่ยมากกว่า 3 ชั่วโมง ต่อการตรวจ 1 ตัวอย่าง พบว่ามี 20 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.4) ที่ผลการตรวจระหว่างวิธี PCR กับการตรวจจากฟิล์มเลือด (หนาและบาง) มีความสอดคล้องกัน ผลการตรวจจำนวน 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.64) ที่มีการตรวจพบเชื้อมากกว่า 1 ชนิดด้วยวิธี PCR แต่ผลการตรวจฟิล์มเลือดพบเชื้อเพียงชนิดเดียว อาจมีสาเหตุมาจากเชื้ออีกชนิดมีความหนาแน่นของเชื้อต่ำ (น้อยกว่า 1 ตัวต่อ 1,000 เม็ดเลือดขาว) หรือเชื้อที่พบในฟิล์มเลือดเป็นระยะที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เช่น ระยะวงแหวน จำนวน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.09) ที่ตรวจพบเชื้อชนิดเดียวจากวิธี PCR แต่ผลการตรวจฟิล์มเลือดไม่พบเชื้อ อาจมีสาเหตุมาจากความหนาแน่นของเชื้อต่ำ และส่วนที่เหลือจำนวน 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.32) ที่ผลการตรวจจากฟิล์มเลือดพบเชื้อในระยะวงแหวนเท่านั้นซึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้และพบที่ความหนาแน่นของเชื้อต่ำมาก (8-24 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร) เพียงสามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อใน Genus *Plasmodium* เท่านั้น 1 ราย แต่ด้วยวิธี PCR สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจนว่าเป็นเชื้อชนิด *P. falciparum* และจากการตรวจด้วยวิธี PCR ที่พบว่ามี การติดเชืชนิด *P. vivax* ร่วมกับ *P. malariae* จำนวน 2 ราย แต่จาก

สามารถจำแนกชนิดเชื้อ *P. malariae* ได้ คือ ระบุ band form และ rosette form จึงทำการตรวจสอบ อีกด้วยวิธี PCR แต่ใช้ primer ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วน *P. malariae* circumsporozoite protein gene (Tahar et al., 1998) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธี PCR เบื้องต้น แล้วใช้ผลการตรวจฟิล์มเลือดทั้งหมดมาเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อนำมาใช้ประเมินคุณค่าของวิธี PCR ที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียในคนทั้ง 4 ชนิดกับการตรวจด้วยฟิล์มเลือด พบว่าวิธี PCR มีความไวร้อยละ 97.48 และความจำเพาะร้อยละ 64.52 ดังนั้นวิธี PCR จึงเป็นวิธีที่ประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียดีกว่าวิธีการตรวจจากฟิล์มเลือดที่ให้ทั่วไปและสามารถจำแนกได้ชัดเจนว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อจริง

การนำเอาวิธี PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียในคนทั้ง 4 ชนิดในบางพื้นที่ แม้ว่าในแต่ละการทดลองจะศึกษาในกลุ่มตัวอย่างจำนวนไม่มากพอที่จะเป็นตัวแทนประชากรทั้งหมดในพื้นที่ แต่ก็พอจะทำให้มองเห็นสภาพปัญหาและสามารถนำมาอธิบายระบาดวิทยาของเชื้อแต่ละชนิดได้ในระดับหนึ่ง ในพื้นที่ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 26 กล่าวคือ อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด ประชากรในพื้นที่ศึกษานี้จะมีการเคลื่อนย้ายสูง จากการค้าขาย การทำอาชีพขุดพลอย โดยสัดส่วนของการตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* จะมากกว่า *P. vivax* 7.5 เท่า อัตราการตรวจพบเชื้อมากกว่า 1 ชนิดร้อยละ 12.24 ซึ่งการตรวจจากฟิล์มเลือดพบเพียงร้อยละ 0.51 เท่านั้น ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* พบเพียงร้อยละ 1.53 (Snounou et al., 1993) ส่วนจังหวัดแม่ฮ่องสอน ประชากรในพื้นที่ที่มีการเคลื่อนย้ายสูงเช่นกัน สัดส่วนการตรวจพบเชื้อ *P. vivax* มากกว่า *P. falciparum* ประมาณ 3 เท่า แต่อัตราการตรวจพบ *P. malariae* และ *P. ovale* สูงมากคือ อัตราการตรวจพบเชื้อร้อยละ 24.3 และ 3.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 26) ในทางตรงข้ามการตรวจในกลุ่มประชากรพื้นที่ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก พบว่าสัดส่วนการตรวจพบเชื้อ *P. vivax* มีมากกว่า *P. falciparum* ส่วนพื้นที่ชายแดนไทยกับกัมพูชาจะพบเชื้อ *P. falciparum* มากกว่า *P. vivax* ในพื้นที่ที่มีการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่าง 2 ประเทศสูงจะมีการตรวจพบเชื้อ *P. malariae* และ *P. ovale* มากกว่าพื้นที่ที่มีการเคลื่อนย้ายของประชากรต่ำ ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดผู้ป่วยมีโอกาสที่ได้รับเชื้อมากกว่า 1 ชนิดในระดับที่สูงพอสมควร แต่การตรวจจากฟิล์มเลือดพบการติดเชื้อดังกล่าวไม่เกินร้อยละ 1 ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี PCR พบว่าใน 3 พื้นที่คือ จังหวัดตราด ระนอง กาญจนบุรีและตาก มีอัตราการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดสูงประมาณร้อยละ 10-12 ซึ่งผลการตรวจแตกต่างกันอย่างมากกับการตรวจจากฟิล์มเลือดที่พบไม่เกินร้อยละ 1 (กองมาลาเรีย, 2541 ; Luxemburger et al., 1996 ; Zhou et al., 1998)

ส่วนเชื้อ *P. malariae* และ *P. ovale* แม้ว่าจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพไม่รุนแรงเท่ากับเชื้อ *P. vivax* และ *P. falciparum* แต่ *P. malariae* มักถูกตรวจวินิจฉัยว่าเป็น *P. vivax* โดยเฉพาะการตรวจจากฟิล์มเลือดหน้า *P. malariae* ใช้การรักษาเหมือนกันกับ *P. vivax* แต่ไม่ต้องให้ยาไพรมาคิว

ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง เช่น การขาด glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) ควรจะพิจารณาชนิดของเชื้อให้ชัดเจนก่อนให้การรักษาและผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. malariae* และ *P. ovale* มักพบว่าความหนาแน่นของเชือน้อยมากจึงยากแก่การตรวจ โดยเฉพาะเชื้อ *P. ovale* ที่มีระยะแฝงในตับ ซึ่งรายงานมีผู้ป่วยติดเชื้อนี้จากการผ่าตัดเปลี่ยนตับ (Talabiska et al., 1996) โดยผู้ติดเชื้อ ไม่มีอาการแสดงที่ชัดเจนให้เห็นมาก่อน

จากเหตุผลดังกล่าวสามารถบ่งบอกอย่างชัดเจน ถึงปัญหาในการควบคุมโรคมาลาเรีย ส่วนหนึ่งมาจากข้อจำกัดของวิธีการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียจากวิธีมาตรฐาน จึงทำให้ไม่สามารถตัดวงจรการแพร่โรคได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากผู้ที่มีปริมาณเชื้อในร่างกายต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจจากฟิล์มเลือด อาจได้รับการวินิจฉัยว่าไม่เป็นมาลาเรียและไม่ได้รับการรักษาจึงเป็นแหล่งแพร่โรคต่อไปได้ นอกจากนี้ ผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชือน้อยหรือมีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด อาจไม่ได้รับยาหรือได้รับยาไม่ครบ เพราะเชื้อแต่ละชนิดให้การรักษาต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน แต่ต่างพื้นที่อาจต้องให้การรักษาต่างกัน ได้ เพราะมีสาเหตุมาจากปัญหาเชื้อคือยารักษา จำเป็นต้องมีการศึกษารูปแบบการให้การรักษาที่เหมาะสมกับสภาพปัญหาต่อไป

อย่างไรก็ตามการจะนำวิธี PCR มาใช้แทนวิธีมาตรฐาน ควรคำนึงถึง เครื่องที่ใช้ในงาน PCR มีความละเอียด ดังนั้นผู้ปฏิบัติต้องผ่านการฝึกฝนการใช้เครื่องมือมาก่อน มีโอกาสปนเปื้อนสูง เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวมาก ต้องมีการระวังในทุกขั้นตอน ควรแยกพื้นที่ และเครื่องมือ ราคาค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีมาตรฐานประมาณ 20 เท่า เครื่องมือมีราคาแพง อาจไม่เหมาะสมนักที่จะจัดห้องชั้นสูตรเคลื่อนที่ที่จะใช้ในภาคสนามวิธี PCR มีข้อดีที่เห็นได้ชัด คือ มีความไวของการทดสอบสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ในขณะเดียวกันความไวก็เป็นจุดอ่อน เนื่องจากทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนและผลบวกปลอมได้ง่าย หากมาตรฐานการปฏิบัติการและบุคลากรนั้นๆ ไม่สูงเพียงพอ อย่างไม่ปฏิบัติตามปัญหาจำเป็นต้องป้องกันและแก้ไขให้สำเร็จ ต้องมีการกระตุ้นผู้ที่เกี่ยวข้องให้สนใจ และพัฒนามาตรฐานของห้องปฏิบัติการและบุคลากรในงาน PCR อยู่ตลอดเวลา และควรมีการควบคุมคุณภาพของงาน PCR ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR จากการใช้ primer ต่างๆ และการย้อมฟิล์มเลือดด้วย acridine orange

จังหวัด	วิธี	ปี พ.ศ.	ผลการตรวจ (ราย)													Total			หมายเหตุ	
			F	V	M	O	FV	FM	FO	VM	VO	FVM	FVO	VMO	FMOV	Positive	Negative	Total		
ตราด	PCR	2536	89 45.41%	12 6.12%	2 1.02%	1 0.51%	24 12.40%	1 0.51%	0	0	0	0	0	0	0	0	129 65.82%	67 34.18	196	Snounou et al., 1993
แม่ฮ่องสอน	Acridine orange	2538-2539	82 27.15%	54 17.88%	1 0.33%	0	111 36.75%	15 4.97%	0	20 6.62%	1 0.33%	19 6.29%	0	0	1 0.33%	294 97.35%	8 3.65	312	Zhou et al., 1998	
กาญจนบุรี	"	"	34 51.51	18 27.27	0	0	8 12.12	0	0	3 4.54	0	1 1.15%	0	0	0	64 96.97	2 3.03%	66	"	
ระนอง	"	"	51 28.33%	18 10%	2 1.11%	0	63 35%	9 5.00%	1 0.55%	16 8.89%	1 0.55%	12 6.67%	1 0.55%	2 1.11%	1 0.55%	177 98.34%	3 1.66%	180	"	
ตาก	PCR	2539-2540	33 22%	75 50%	0	0	17 11.33%	0	0	2 1.33%	0	0	0	0	0	127 84.67%	23 15.33%	150	Kobasa, 1999	

หมายเหตุ:

F = *P. falciparum*

M = *P. malariae*

O = *P. ovale*

V = *P. vivax*

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การประยุกต์วิธี PCR มาเป็น nested PCR เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนที่มีลักษณะเฉพาะและเป็น multicopy gene ของ SSU rRNA gene กับตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจากผู้ป่วยมีไข้ที่มารับการตรวจ โรคมาลาเรีย ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4 อำเภอพบพระ จังหวัดตาก จำนวน 150 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และใช้ผลการตรวจจากฟิล์มเลือดบางเพื่อช่วยยืนยันผลการตรวจทั้งสองในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 110 คู่เบสเท่านั้น ทำให้ประหยัดเวลานำมาใช้ในเกิดปฏิกิริยา PCR เพื่อจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียจากเลือดพบว่ามีความถูกต้องดีกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมสีิมชาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้การจำแนกชนิดของเชื้อจากลักษณะ รูปร่าง โดยความไวในการตรวจหาเชื้อ *P. vivax* และ *P. falciparum* เท่ากับร้อยละ 98.27 และ 91.43 ตามลำดับ สามารถตรวจเชื้อแม้จะมีความหนาแน่นที่ระดับร้อยละ 0.0032 สัดส่วนความสามารถในการตรวจพบเชื้อเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธี PCR กับวิธีมาตรฐาน เท่ากับ 1.22 : 1 วิธี PCR มีความไวอย่างมากในการตรวจรายที่มีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานควบคุมโรคมาลาเรีย และสามารถใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรียต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถนำวิธี PCR มาเสริมการตรวจวิธีมาตรฐาน ในรายที่มีอาการหรือประวัตินำสงสัยที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยเสี่ยงต่อการป่วยด้วยโรคมาลาเรีย และควรพัฒนาให้ใช้เลือดในการตรวจลดลง
2. นำวิธี PCR มาประยุกต์ใช้ในงานกักกันเพื่อหาชนิดของยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะ
3. ในช่วงที่มีการแพร่เชื่อน้อยมักเป็นฤดูร้อน การที่จะดำเนินมาตรการต่างๆ ในการควบคุมโรคจะให้ผลดีที่สุดเพราะเป็นช่วงยุงพาหะมีน้อยจากการขาดแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ดังนั้นจึงใช้งบประมาณน้อยในการควบคุมยุงพาหะ และจำนวนผู้ป่วยก็ไม่มากถ้านำวิธี PCR มาใช้ในการ

ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจเลือดส่วนหนึ่งของผู้ป่วยที่มีไข้ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2540 ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี PCR ร้อยละ 71.88 พบเชื้อจากการตรวจฟิล์มเลือดในอัตราร้อยละ 46.88 (วิธี PCR : วิธีมาตรฐาน เท่ากับ 1.53 : 1) ซึ่งเลือดตัวอย่างดังกล่าวหน่วยควบคุมมาลาเรียในพื้นที่ตรวจไม่พบเชื้อโดยมาลาเรีย ดังนั้นวิธี PCR ทำให้ทราบขนาดปัญหาของโรคมาลาเรียชัดเจนขึ้น

4. พัฒนาวิธี PCR จากการศึกษาครั้งนี้ต้องใช้ 4 หลอดในการจำแนกเชื้อมาลาเรีย 4 ชนิด โดยทดสอบในหลอดเดียว



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ. รายงานประจำปี 2540. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตร
แห่งประเทศไทย, 2541.

อำนาจ เลิศชยันตรี. สถิติอนพารามตริก. กรุงเทพฯ: ศิลปสนองการพิมพ์, 2539.

ภาษาอังกฤษ

Anthony RL, Bangs MJ, Anthony JM, Purnomo A. On-site diagnosis of *Plasmodium falciparum*,
P. vivax, and *P. malariae* by using the Quantitative Buffy Coat system. **J Parasitol.** 1992; 78:
994-998.

Arruda ME. A seroprevalence and descriptive epidemiology study of malaria among India tribes of
the Amazon Basin of Brazil. **Ann Trop Med Parasitol.** 1996; 90: 135-143.

Baimai V, Kijchalao U, Sawadwongporn P, Green CA. Geographic distribution and biting behaviour
of four species of the *Anopheles dirus* complex (*Diptera: Culicidae*) in Thailand. **Southeast
Asian J Trop Med Public Health.** 1988; 19: 151-161.

Barker RH, Brandling-Bennett AD, Koeck DH, Mugambi M, Khan B, David R, et al. *Plasmodium
falciparum*: DNA probe diagnosis of malaria in Kenya. **Exp Parasitol.** 1989; 69: 226-233.

Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K, Wirth DF.
A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the
polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg.** 1992; 46: 416-426.

Blackburn EH. Telomers: do the ends justify the mean? **Cell.** 1984; 37: 7-8.

Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gene n. and sp. n., a nonsporulating extreme
thermophile. **J Bacteriol.** 1969; 98: 289-297.

- Bruce-Chwatt LJ. **Essential malariology**. 3rd ed. London: Edward Arnold, 1993.
- Deloron P, Chougnet C. Is immunity of malaria really short-lived? **Parasitol Today**. 1992; 8: 375-378.
- Duorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, et al. Invasion of erythrocytes by malaria merozoite. **Science**. 1975; 187: 748-750.
- Emerson SG, Farnen JP. Hematopoiesis and the hematopoietic growth factors. In: McClatchey KD, editor. **Clinical laboratory medicine**. 1st ed. Maryland: William & Wilkins, 1994: 837-839.
- Fungladda W, Sormani S, Klongkamnuankarn K, Hungsapruet T. Sociodemographic and behavioural factors associated with hospital malaria patients in Kanchanaburi, Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth**. 1987; 90: 233-237.
- Garcia M, Kirimoama S, Marlborough D, Leafasia J. Immunochromatographic test for malaria diagnosis. **Lancet**. 1996; 34: 1549.
- Green CA, Munstermann LE, Tan SG, Panyim S, Baimai V. Population genetic evidence for species A, B, C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs. **Med Vet Entomol**. 1992; 61: 29-36.
- Gunderson JH, Wollet G, Sogin ML, Hollingdale M, Cruz VF, et al., Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. **Science**. 1986; 238: 933-937.
- Hobson LB. **Examination of the patient**. 17th ed. New York: McGraw-Hill, 1975.
- Hulier E, Petour P, Snounou G, Nivez MP, Miltgen F, Mazine D, et al. A method for the quantitative assessment of malaria parasite development in organs of the mammalian host. **Mol Biochem Parasitol**. 1996; 77: 127-135.
- Ingelfinger JA, Mosteller F, Thibodeau LA, Ware JH. **Biostatistics in clinical medicine**. 2nd ed. New York: Macmillan, 1987.
- Kain K, Lanar DE. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by oligonucleotide probe. **Mol Cell Probes**. 1990; 4: 409-414.
- Kanjanapan W. Health effect of labor mobility: A study of malaria in Kanchanaburi province, Thailand. **South-east Asian J Trop Med Pub Hlth**. 1983; 14: 54-57.
- Karbwang J, Na-bangchang K, Bunnag D. Update on antimalarial. **J Trop Med Parasitol**. 1997; 20: 1-14.

- Karp G. **Cell and molecular biology: concepts and experiments.** New York: Von Hoffmann Press, 1996.
- Kaushal DC, Watts R, Haider S, Singh N, Kaushal NA, Dutta GP. Antibodies to lactate dehydrogenase of *Plasmodium knowlesi* are specific to *Plasmodium* species. **Immunol Invest.** 1988; 17: 507-516.
- Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. **Lancet.** 1991; 337: 200-202.
- Kemp DJ, Corcoran LM, Coppel RL, Stahi HD, Bianco AE, Brown AE, et al. Size variation in chromosomes from independent culture isolate of *Plasmodium falciparum*. **Nature.** 1985; 315: 247-350.
- Khusmith S, Tharavanij S, Kasemsuth R, Vejvongvarn C, Bunnag D. Two-site immunoradiometric assay for detection of *Plasmodium falciparum* antigen in blood using monoclonal and polyclonal antibodies. **J Clin Microbiol.** 1987; 25: 1467-1471.
- Khusmith S. Development of immunoradiometric assay for detection of *Plasmodium falciparum* antigen in blood using monoclonal antibody. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 1988; 19: 21-26.
- Khusmith S, Intapan P, Tharavanij S, Tuntrakul S, Indravijit KA, Bunnag D. Two-site sandwich ELISA for detection of *Plasmodium vivax* blood stage antigens using monoclonal and polyclonal antibodies. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 1992; 23: 745-751.
- Kidson C. Global malaria challenge: the Amsterdam Summit. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 1992; 23: 635-640.
- Kilejian A. The biosynthesis of the knob protein and a 65,000 dalton histidine-rich polypeptide of *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol.** 1984; 2: 185-194.
- Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitol International.** 1997; 46: 91-95.
- Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Kawai S, et al., Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. **J Clin Microbiol.** 1995; 33: 2342-2346.

- Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PCC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. **Am J Trop Med Hyg.** 1982; 31: 1291-1293.
- Kuvin SF, Tobie JE, Evans CB, Coatney GR, Contances PG. Antibody production in human malaria as determined by the fluorescent antibody technique. **Science.** 1961; 135: 1130-1131.
- Lal AA, Changkasiri S, Hollingdale MR, McCutchan TF. Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. **Mol Biochem Parasitol.** 1989; 36: 67-72.
- Laserson KF, Petralanda I, Hamlin DM, Almera R, Fuentes M, Carrasquel A, et al. Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. **Am J Trop Med Hyg.** 1993; 50: 169-180.
- Li J, Wirtz RA, Schneider I, Muratova OV, McCutchan TF, Appiah A, et al. *Plasmodium falciparum*: stage-specific ribosomal RNA as a potential target for monitoring parasite development in *Anopheles stephensi*. **Exp Parasitol.** 1993; 76: 32-38.
- Li J, Wirtz RA, McConkey GA, Sattabongkot J, Waters AP, Rogers MJ, et al. *Plasmodium*: genus-conserved primers for species identification and quantitation. **Exp Parasitol.** 1995; 81: 182-190.
- Looareesuwan S, White NJ, Chittamas S, Bunnag D, Harinasuta T. High rate of *Plasmodium vivax* relapse following treatment of *falciparum* malaria in Thailand. **Lancet.** 1987; 7: 1052-1054.
- Londner MV, Rosen G, Sintov A, Spira DT. The feasibility of a dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* antigens and antibodies. **Am J Trop Med Hyg.** 1987; 36: 240-245.
- Luxemburger C, Thwai KL, White NJ, Webster HK, Kyle DE, Maelankirri L, et al. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg.** 1996; 90: 105-111.
- McGregor IA. Malaria immunity: current trends and prospects. **Ann Trop Med Parasitol.** 1987; 81: 647-656.
- Marquardt WC, Demaree RS. **Parasitology.** 1st ed. New York: Macmillan, 1985.

- Miyake H, Kim HS, Kawai S, Yamane A, Kimura M, Wataya Y. DNA diagnosis of malaria using microtiter plate hybridization. **Nucleic Acids Res.** 1995; 34: 241-242.
- Oliveira DA, Holloway BP, Durigon EL, Collins WE, Lal AA. Polymerase chain reaction and a liquid-phase, nonisotopic hybridization for species-specific and sensitive detection of malaria infection. **Am J Trop Med Hyg.** 1995; 52: 139-144.
- Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, et al. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. **J Clin Microbiol.** 1998; 36: 203-206.
- Panton LJ, McPhie P, Maloy WL, Wellem TE, Taylor DW, Howard RJ. Purification and partial characterization of an unusual protein of *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II. **Mol Biochem Parasitol.** 1989; 53: 149-160.
- Panyim S, Yasothornsrikul S, Tungpradubkul SV, Baimai V, Rosenberg R, Andre RG, et al. Identification of isomorphic malaria vector using DNA probe. **Am J Trop Med Hyg.** 1988; 38: 47-49.
- Rattanarithikul R, Konishi E, Linthicum KJ. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* circumsporozoite antigen in anopheline mosquitoes collected in southern Thailand. **Am J Trop Med Hyg.** 1996; 54: 114-121.
- Roper C, Elhassan IM, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, et al. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. **Am J Trop Med Hyg.** 1996; 54: 325-331.
- Rosenberg R, Rungsiwongse J. The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. **Am J Trop Med Hyg.** 1991; 45: 574-577.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharh SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science.** 1988; 230: 1350-1354.
- Seesod N, Nopparat P, Hedrum A, Holder A, Thaithong S, Uhlen M, et al. An integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. **Am J Trop Med Hyg.** 1997; 56: 322-328.

- Shiff CJ, MinJas J, Premji Z. The ParaSight®-F test: a simple rapid manual dipstick test to detect *Plasmodium falciparum* infection. **Parasitol Today**. 1994; 10: 494-495.
- Sinden RE. The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. **Parasitology**. 1983; 86: 7-28.
- Slater AFG, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A, et al. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1991; 88: 325-329.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Mol Biochem Parasitol**. 1993; 58: 283-292.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Pinheiro L, Rosario VE, Thaithong S, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol Biochem Parasitol**. 1993; 61: 315-320.
- Somboon P, Aramrattana A, Lines J, Webber R. Entomological and epidemiology investigation of malaria transmission in relation to population movements in forest areas of north-west Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 1998; 29: 3-9.
- Talabiska DG, Komar MJ, Wytick DH, Rubin RA. Post-transfusion acquired malaria complicating orthotopic liver transplantation. **Am J Gastroenterol**. 1996; 91: 376-379.
- Tahar R, Ringwald P, Basco LK. Heterogeneity in the circumsporozoite protein gene of *Plasmodium malariae* isolates from sub-Saharan Africa. **Mol Biochem Parasitol**. 1998; 92: 71-78.
- Tartular IS, Iwai K, Lin K, Basuki S, Horie T, Htay HH, et al. Field trials of a rapid test for G6PD deficiency in combination with a rapid diagnosis of malaria. **Trop Med Int Health**. 1999; 4: 245-250.
- Tirasophon W, Ponglikitmongkol M, Wilairat P, Boonsaeng V, Panyim S. A novel detection of a single *Plasmodium falciparum* infected blood. **Biochem Biophys Res Commun**. 1991; 175: 175-184.
- Tirasophon W, Rajkulchai P, Ponglikitmongkol M, Wilairat P, Boonsaeng V. A highly sensitivity, rapid, and simple polymerase chain reaction-based method to detect human malaria (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*). **Am J Trop Med Hyg**. 1994; 51: 308-313.

- Tharavanij S, Warrell MJ, Tantivanich S, Tapchaisri P, Chongsa-Nguan M, et al. Factors contributing to the development of cerebral malaria. I. Humoral immune responses. **Am J Trop Med Hyg.** 1984; 33: 1-11.
- Trigg PI, Kondrachine AV. Commentary: malaria control in the 1990s. **Bull WHO.** 1998; 76: 11-16.
- Voller A, Bidwell D. **Enzyme-Linked immunosorbent Assay. In: manual of clinical laboratory immunity, 3rd ed.** Washington DC: American Society for Microbiology, 1986: 99-109.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Edwards R. A comparison of isotopic and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1977; 715: 431-437.
- Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Science.** 236; 1987: 1661-1666.
- Wataya Y, Arai M, Kubochi F, Mizukoshi C, Kakutani T, Ohta N, et al. DNA diagnosis of *falciparum* malaria using a double PCR technique: a field trial in the Solomon Islands. **Mol Biochem Parasitol.** 1993; 58: 165-168.
- Waters AP, McCutchan T. Rapid, sensitive detection of malaria based on ribosomal RNA. **Lancet.** 1989; 17: 1343-1346.
- Waters AP. The ribosomal RNA genes of *Plasmodium*. **Advances in Parasitology.** 1994; 34: 33-79.
- Warren KS. **Immunology and molecular biology of parasitic infections.** 3rd ed. Michigan: Book Crafters, 1993.
- Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1991; 88: 3382-3386.
- World Health Organization. **A global strategy for malaria control.** Geneva: WHO graphics, 1993.
- Zhou M, Liu Q, Wongsrichanalai C, Suwonkerd W, Panat K, Prajakwong S, et al. High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. **Trop Med Int Health.** 1998; 3: 304-312.

ภาคผนวก

การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1	g.
double distilled water	800	ml.

ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH = 8.0 และ ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร ด้วย double distilled water นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียม TAE buffer (50x)

Tris-base	242	g.
glacial acetic acid	57.1	ml.
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	ml.

ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตรด้วย double distilled water

การเตรียม TE (อัตราส่วน 1:0.1)

1 M Tris	800	ml.
0.5 M EDTA	200	ml.

ผสมกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

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

bromophenol blue	0.25	g.
xylene cyano FF	0.25	g.
ficoll (type 400; Pharmacia)	15	g.

ละลายใน double distilled water ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 ml.

การเตรียม phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8	g.
KCl	0.2	g.
Na ₂ HPO ₄	1.44	g.
KH ₂ PO ₄	0.24	g.
ละลายใน double distilled water	800	ml.

ปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH = 7.4 และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตรด้วย double distilled water นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายธีระยศ กอบอาษา เกิดวันที่ 21 กันยายน พ.ศ. 2508 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาพยาบาลและผดุงครรภ์ระดับต้น วิทยาลัยพยาบาลบาราศนราดรุ ในปีการศึกษา 2530 เข้ารับราชการในปีเดียวกัน ณ ศูนย์โรคเท้าช้างเขต 8 จังหวัดตาก สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ในปีการศึกษา 2538 และเข้ารับการศึกษต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2540 (ภาคการศึกษาต้น) ปัจจุบันดำรงตำแหน่งนักวิชาการควบคุมโรค ปฏิบัติงานในสังกัดกองโรคเท้าช้าง กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย