

Chulalongkorn University

Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2022

การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ และการกลายพันธุ์ของยีนจีอีพีดีชนิดเวียงจันทน์และมอดล

ปวีณสุดา รัตนคช
คณะสัตวศาสตร์

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd>



Part of the [Hematology Commons](#), and the [Medical Sciences Commons](#)

Recommended Citation

รัตนคช, ปวีณสุดา, "การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์และการกลายพันธุ์ของยีนจีอีพีดีชนิดเวียงจันทน์และมอดล" (2022). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 6460.
<https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/6460>

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์และการกลายพันธุ์
ของยีนจีซีจีพีดีชนิดเวียงจันทน์และมณฑล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Development of PCR-HRM For Detection of Human Malaria Infection and G6PD
Variants Viangchan and Mahidol



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Clinical Hematology Sciences

Department of Clinical Microscopy

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์และการกลายพันธุ์ของยีนจีซีจีพีดีชนิดเวียงจันทน์และมณฑล
โดย	น.ส.ปวีณสุตา รัตนคช
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิภัทร ศรีสุธรรม

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ญาณินาถ สุวรรณวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิภัทร ศรีสุธรรม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว ปาละสุวรรณ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.มัลลิกา อิมวงศ์)

ปวีณสุตา รัตนคช : การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาการติดเชื้อ
มาลาเรียในมนุษย์และการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีชนิดเวียงจันทน์และมหิดล. (

Development of PCR-HRM For Detection of Human Malaria Infection and
G6PD Variants Viangchan and Mahidol) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.สุทธิภัทร ศรีสุ
ธรรม

โรคมาลาเรียถือเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ ในปี พ.ศ.2564 องค์การอนามัยโลก
รายงานจำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกกว่า 247 ล้านรายและผู้เสียชีวิตกว่า 627,000 ราย ซึ่งมี
แนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อการควบคุมและการกำจัดโรคมาลาเรีย โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่แสดง
อาการอาจไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและการรักษา จึงสามารถเป็นแหล่งสะสมและแพร่กระจายของ
เชื้อมาลาเรียได้ ในปัจจุบันมีเชื้อพลาสโมเดียมที่ก่อโรคในมนุษย์ 5 สปีชีส์ ได้แก่ *P. falciparum*,
P. vivax, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* ดังนั้นเทคนิคที่มีความไวสูงในการตรวจหา
เชื้อมาลาเรียจึงมีความสำคัญมาก นอกจากนี้การรักษาด้วยยาต้านเชื้อมาลาเรีย เช่น ไพริมาควิน
อาจส่งผลต่อผู้ที่มามีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกได้ งานวิจัยนี้จึงได้
พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาเชื้อมาลาเรียและการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี
รวมทั้งทดสอบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ ความไวและความจำเพาะของ
เทคนิคที่พัฒนาขึ้นพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่มีความหนาแน่นต่ำสุดเท่ากับ 2.354-
3.316 copies/ μ L มีความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum*, *P. malariae*,
P. ovale และ *P. knowlesi* เท่ากับ 100% และ 100% ตามลำดับ ความไวและความจำเพาะใน
การตรวจหาเชื้อ *P. vivax* เท่ากับ 100% และ 99.28% ตามลำดับ สำหรับการตรวจการกลาย
พันธุ์ของยีนจีซิกพีดีพบว่าสามารถตรวจระบุจีซิกพีดีเวียงจันทน์และจีซิกพีดีมหิดลได้อย่างถูกต้อง
ดังนั้นเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการตรวจเชื้อมาลาเรีย
และการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วยมาลาเรียเพื่อให้ได้รับการรักษา
อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2565 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6370011137 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES

KEYWORD: Malaria, detection, PCR, HRM, Plasmodium, G6PD variants

Paweesuda Rattanakoch : Development of PCR-HRM For Detection of Human Malaria Infection and G6PD Variants Viangchan and Mahidol.
Advisor: Asst. Prof. SUTTIPAT SRISUTHAM, Ph.D.

Malaria is a major public health concern. WHO 2021, reported more than 247 million cases of malaria worldwide and more than 627,000 deaths, with the trend of increasing malaria cases affecting malaria control and elimination. Especially the group of asymptomatic malaria not diagnosed and treated. Therefore, it is a reservoir host and spread of malaria. There are five human *Plasmodium* species: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi*. A highly sensitive technique for detecting malaria is important. In addition, antimalarial therapy such as primaquine may be effective in patient with G6PD deficiency causing hemolysis. This research developed a PCR HRM assay for the detection of human malaria and G6PD variants. A primers were designed from the updated nucleotide database and evaluated the limit of detection, sensitivity, and specificity. The limit of detection of PCR-HRM assay was able to detect the targeted genome of five *Plasmodium* lower as 2.354 - 3.316 copies/ μ L. The PCR-HRM method provides 100% sensitivity and specificity of *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi*. Provide 100% sensitivity and 99.28% specificity of *P. vivax*. This assay can accurately identify G6PD viangchan and mahidol. Therefore, the developed assay is an alternative for testing malaria and G6PD variants. This will benefit malaria patients to receive effective treatment.

Field of Study: Clinical Hematology
Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี เนื่องจากได้รับความสนับสนุนจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิภัทร ศรีสุธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำและแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ เพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ของงานจนสำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ญาณินาถ สุวรรณวงศ์ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์และ รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว ปาละสุวรรณ กรรมการวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำแนวทางในการพัฒนางานวิจัย เพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ของงานที่ดียิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ และขอขอบคุณบริษัททาเลโนเมะดีเอ็นเอโปรเฟสชันแนล จำกัด ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือต่างๆในการศึกษาวิจัย ตลอดจนคำแนะนำการใช้เครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.มัลลิกา อิมวงศ์ หัวหน้าภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน หน่วยวิจัยโรคเขตร้อนคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดลที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างดีเอ็นเอมาลาเรียเพื่อการศึกษาในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวปญญาพร บุขบงษ์ และนางสาวแก้วกัณหา กิจประสงค์ โรงพยาบาลสถานพระบารมี จังหวัดกาญจนบุรี ที่สนับสนุนและช่วยเหลือในการจัดหาตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียเพื่อใช้ในการศึกษางานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนายธีระรักษ์ ศรีนวลกราย และนางสาวนันทนซ์ คันธารัตนกุล ที่ได้ให้คำปรึกษา และแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานวิจัยแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณบิดามารดาและครอบครัวเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งได้เปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจเสมอมาจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา ระดับมหาบัณฑิต

ปวีณสุดา รัตนคช

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
บทที่ 1.....	1
บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 คำถามงานวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐานงานวิจัย.....	2
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ของการศึกษา.....	3
บทที่ 2.....	4
ทบทวนเอกสาร	4
2.1 โรคมาลาเรียและสถานการณ์ของโรคมาลาเรีย.....	4
2.2 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย	5
2.3 อาการและอาการแสดงของโรคมาลาเรีย.....	7
2.4 การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย.....	8
2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ.....	9
2.5.1 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	9
2.5.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยชุดทดสอบเร็ว (Rapid diagnostic test; RDT).....	10

2.5.3 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคโพลีโซโทเมรี.....	12
2.5.4 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR).....	13
2.5.4.1 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคเนสเต็ดพีซีอาร์ (nested PCR)	15
2.5.4.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR)	16
2.5.4.3 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR).....	18
2.5.4.4 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคดิจิตอลพีซีอาร์ (Digital PCR).....	20
2.5.4.5 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม (PCR-HRM)	21
2.6 ยารักษาโรคมาลาเรีย (antimalarial drug)	23
2.6.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาไพริมาควิน (primaquine) ในการรักษาโรคมาลาเรีย.....	26
2.7 ผลข้างเคียงของยาไพริมาควินต่อผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	27
2.8 ยีนจีซิกพีดี (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)	28
2.9 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส หรือเอนไซม์จีซิกพีดี	29
2.10 ภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	29
2.11 อุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	30
2.12 การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี	31
2.12.1 การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดเพื่อตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี.....	31
2.12.2 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยการวิเคราะห์การเรืองแสง	32
2.12.3 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยชุดทดสอบเร็ว (Rapid test).....	33
2.12.4 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยวิธีทดสอบเมธฮีโมโกลบินรีดักชัน	33
2.12.5 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR).....	34
2.12.5.1 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม	34
2.12.5.2 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม	34
บทที่ 3.....	36
ระเบียบวิธีวิจัย	36

3.1	แผนการดำเนินการวิจัย	36
3.2	เครื่องมือและนํ้ายาสารเคมี	37
3.2.1	เครื่องมือและอุปกรณ์	37
3.2.2	นํ้ายาและสารเคมี	38
3.3	ขนาดตัวอย่างของเชื้อมาลาเรีย	41
3.4	แหล่งที่มาของตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย	42
3.5	การตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์	42
3.5.1	การย้อมฟิล์มเลือดชนิดบาง	42
3.5.2	การนับจำนวนเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์	42
3.6	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด	43
3.6.1	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood)	43
3.6.2	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง (dried blood spot) ..	43
3.7	การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น	44
3.7.1	การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม ..	44
3.7.2	การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม	45
3.8	การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับเชื้อมาลาเรียและการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี	46
3.9	การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับเชื้อมาลาเรียและการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี	48
3.9.1	การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับเชื้อมาลาเรียทุกสปีชีส์ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม	48
3.9.2	การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม	48
3.10	การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น	49

3.11 การทดสอบหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้ของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น	49
3.12 การทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์	50
3.13 การทดสอบความสามารถของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมของผู้ป่วยมาลาเรีย	51
3.13.1 การทดสอบเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยพลาสมิดีเอ็นเอ	51
3.13.2 การทดสอบเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรีย.....	51
3.14 การตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียจากโรงพยาบาลสถานพระบารมี จังหวัดกาญจนบุรี ด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น.....	51
3.15 การทดสอบความสามารถของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง	53
3.16 การตรวจหาผู้ป่วยมาลาเรียด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองในกลุ่มประชากรบางพื้นที่ของจังหวัดตากและจังหวัดศรีสะเกษ.....	54
3.17 แผนการดำเนินงาน.....	55
บทที่ 4.....	1
ผลการทดลอง	1
4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม.....	1
4.1.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม	1
4.1.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซีจีพีดีด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม	2

4.2 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น.....	2
4.3 ผลการทดสอบหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้ของ เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น	4
4.3.1 ผลการทดสอบหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้ ของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ	4
4.4 ผลการทดสอบความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียของเทคนิคมัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์	5
4.5 ผลการทดสอบความสามารถของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติด เชื้อมาลาเรียแบบผสมของผู้ป่วยมาลาเรีย	6
4.5.1 ผลการทดสอบตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม	6
4.5.2 ผลการทดสอบเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อ มาลาเรียแบบผสมด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรีย	7
4.6 ผลการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่ พัฒนาขึ้นโดยเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสถานพระบารมี จังหวัด กาญจนบุรี.....	7
4.7 ผลการทดสอบความสามารถของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาเชื้อ มาลาเรียของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง	9
4.8 ผลการตรวจหาผู้ป่วยมาลาเรียด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นจาก ตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของประชากรในบางพื้นที่จังหวัดตากและจังหวัดศรี สะเกษ	9
บทที่ 5.....	11
สรุปและอภิปรายผล.....	11
บรรณานุกรม.....	14
ประวัติผู้เขียน.....	22

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคมาลาเรียเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิต ในปี พ.ศ. 2564 องค์การอนามัยโลก (world health organization; WHO) รายงานจำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกกว่า 247 ล้านรายและมีผู้เสียชีวิตกว่า 627,000 ราย ถือเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญและพบว่ามีแนวโน้มของผู้ติดเชื้อมาลาเรียที่เพิ่มสูงขึ้น (1) ในปัจจุบันมีเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ 5 สปีชีส์ ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (*P. falciparum*), พลาสโมเดียมไวแวกซ์ (*P. vivax*), พลาสโมเดียมมาลาเรียอี (*P. malariae*), พลาสโมเดียมโอวาเล (*P. ovale*) และพลาสโมเดียมโนโซ (*P. knowlesi*) การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยเทคนิคที่มีความไวจึงมีความสำคัญอย่างมาก เพื่อนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพ ช่วยลดความรุนแรงของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิต (2) การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (3) สามารถตรวจจำแนกสปีชีส์ และนับปริมาณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียได้ แต่เนื่องจากกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแสดงมีความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงอาจทำได้ยาก ส่งผลให้คนกลุ่มนี้ไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและการรักษา จึงอาจเป็นแหล่งสะสมและแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียที่จะส่งผลกระทบต่อควบคุมและการกำจัดโรคมาลาเรีย (4) จึงจำเป็นต้องตรวจด้วยเทคนิคที่มีความไวสูง เช่น เนสเต็ดพีซีอาร์, เรียลไทม์พีซีอาร์, มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และดิจิตอลพีซีอาร์ เป็นต้น (5) เมื่อตรวจวินิจฉัยพบผู้ป่วยมาลาเรียก็จะนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยด้วยยาต้านเชื้อมาลาเรีย เช่น ยาไพโรมาควิน ซึ่งมีรายงานว่ายาไพโรมาควินมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีร่วมกับผู้ป่วยทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกได้ ดังนั้นจึงควรมีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในผู้ป่วยมาลาเรียก่อนได้รับการรักษาด้วยยาไพโรมาควิน (6)

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอซอร์เอ็มสำหรับตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 สปีชีส์ที่ก่อโรคในมนุษย์ ทั้งในผู้ป่วยที่มีอาการแสดง (symptomatic) และผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแสดง (asymptomatic) เพื่อให้ได้รับการตรวจวินิจฉัยและรับการรักษา นอกจากนี้

ยังได้ทำการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีเวียงจันทน์ และจีซิกพีดีมทิดล ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย เพื่อเป็นการสำรวจเชิงระบาดวิทยาของการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียและเป็นการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจากการกลายพันธุ์ของยีนก่อนการรักษาผู้ป่วยด้วยยาต้านเชื้อมาลาเรียด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจวินิจฉัยระบุสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์และตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี

1.2.2 เพื่อทดสอบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection), ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

1.3 คำถามงานวิจัย

1.3.1 เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์สามารถใช้จำนวนคู่ไพรเมอร์ได้สูงสุดเท่าไร

1.3.2 เทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์หรือไม่

1.3.3 เทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีชนิดเวียงจันทน์และมทิดลได้ถูกต้องหรือไม่

1.4 สมมติฐานงานวิจัย

1.4.1 เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์สามารถใช้จำนวนไพรเมอร์ได้สูงถึง 7 คู่

1.4.2 เทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์

1.4.3 เทคนิคพีซีอาร์เอซอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีชนิดเวียงจันทน์และมhitได้ถูกต้อง

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอซอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาเชื้อมาลาเรียและการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีและได้ทำการทดสอบหาปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection), ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น รวมทั้งนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบกับตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรียแบบเลือดครบส่วนและหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง

1.6 ประโยชน์ของการศึกษา

- 1) เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์และการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี
- 2) เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการสำรวจเชิงระบาดวิทยาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีในผู้ป่วยมาลาเรียและระบาดวิทยาของเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์
- 3) เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองประชากรในชุมชนที่มีอุบัติการณ์ของเชื้อมาลาเรียได้ เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย
- 4) เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการออกหน่วยภาคสนามหรือพื้นที่ที่ห่างไกลได้เนื่องจากขนาดเครื่องมือและอุปกรณ์มีความกะทัดรัดและสะดวกในการเคลื่อนย้าย

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 โรคมาลาเรียและสถานการณ์ของโรคมาลาเรีย

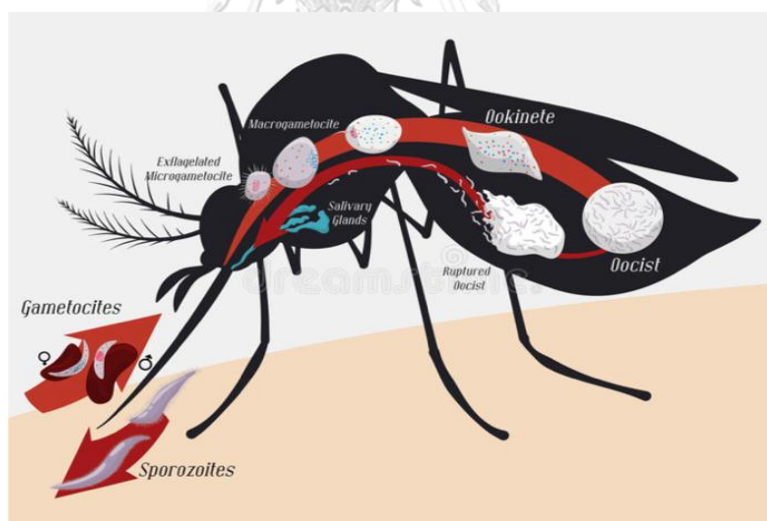
โรคมาลาเรียเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวกลุ่มพลาสโมเดียม ซึ่งสามารถเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ได้โดยการกัดของยุงก้นปล่องเพศเมีย (*Anopheles*) การปนเปื้อนจากเข็มฉีดยาหรือการถ่ายเลือด ซึ่งอาการเริ่มต้นของโรคมาลาเรียมักเป็นอาการแสดงที่ไม่จำเพาะ แต่อาการหลักที่พบได้บ่อยที่สุดคือ มีไข้ ในปัจจุบันเชื้อพลาสโมเดียมที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในมนุษย์มี 5 สปีชีส์ ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโอวาเล และพลาสโมเดียมโนไซ (7) โดยสถานการณ์ของโรคมาลาเรียตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560–2565 ตามรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่สถานการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทยตามรายงานของกระทรวงสาธารณสุขกลับพบว่ามีแนวโน้มลดลงจนกระทั่งปี พ.ศ. 2565 พบว่ามีเริ่มมีจำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สถานการณ์โรคมาลาเรียจากการรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) และกระทรวงสาธารณสุขประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 จนถึง พ.ศ. 2565

ปี พ.ศ.	ผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลก (องค์การอนามัยโลก ; WHO)	ผู้ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย (กระทรวงสาธารณสุข)
2560	216 ล้านราย	11,107 ราย
2561	228 ล้านราย	6,503 ราย
2562	229 ล้านราย	5,327 ราย
2563	227 ล้านราย	3,913 ราย
2564	247 ล้านราย	3,245 ราย
2565	-	10,107 ราย

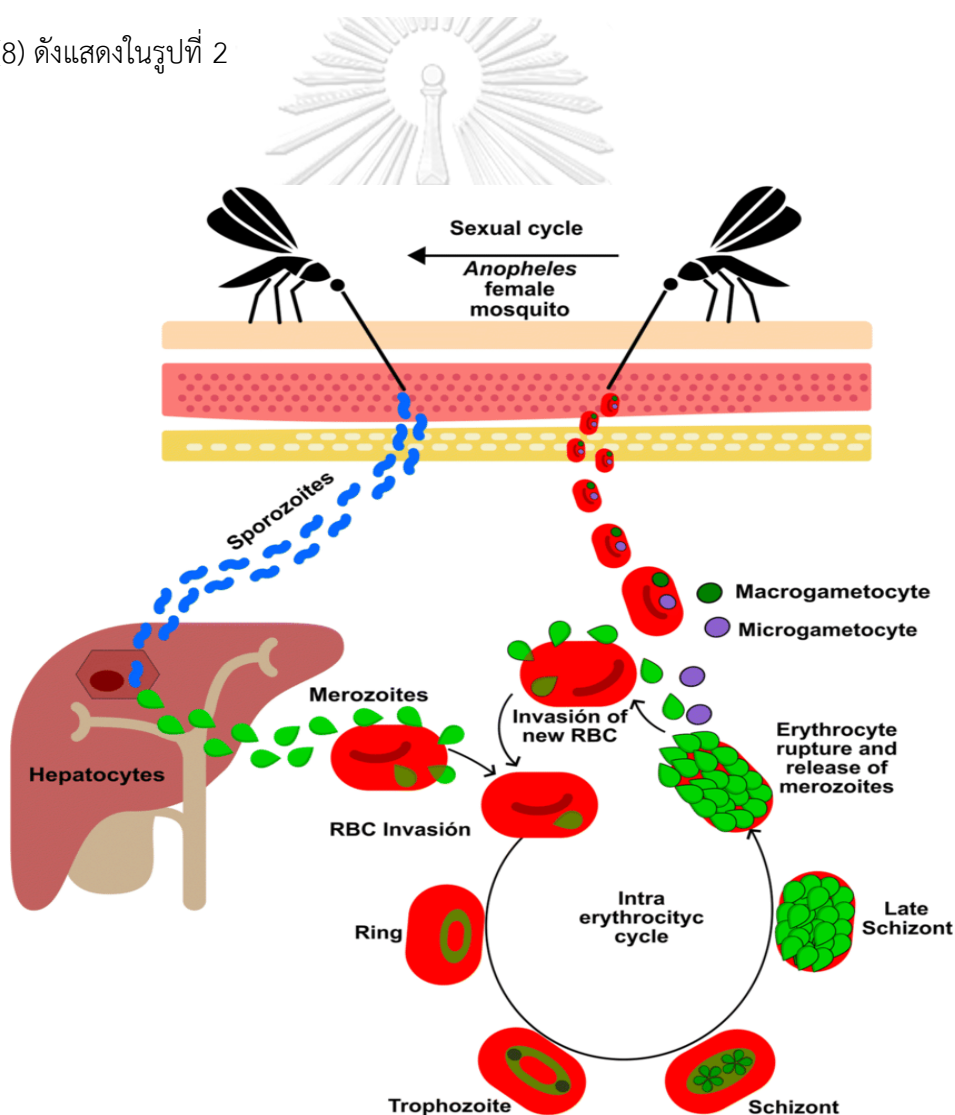
2.2 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อโดยมียุงก้นปล่องเพศเมียเป็นพาหะ (*Anopheles*) วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีทั้งระยะที่อยู่ในยุงพาหะและระยะที่อยู่ในคน สำหรับระยะในยุงพาหะเริ่มจากยุงก้นปล่องเพศเมียกัดและดูดเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อพลาสโมเดียมระยะแกมมีโตไซต์ หลังจากนั้นเชื้อจะเคลื่อนที่ไปยังกระเพาะของยุงเชื้อจะพัฒนาเข้าสู่ระยะที่พร้อมผสมพันธุ์ เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจึงเกิดเป็นไซโกตที่มีรูปร่างกลม หลังจากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เรียวยาวแหลมเรียกว่าโอโอไคนิต เพื่อเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหารของยุงออกมาสู่ผนังด้านนอกและพัฒนาต่อเป็นโอโอซิสต์ โดยภายในหนึ่งโอโอซิสต์จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นสปอโรซอยต์ประมาณ 1,000 ถึง 2,000 ตัว เมื่อโอโอซิสต์แตกออก สปอโรซอยต์ส่วนใหญ่ก็就会被ทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกัน แต่มีสปอโรซอยต์บางส่วนที่สามารถเคลื่อนที่กลับไปยังต่อมน้ำลายของยุง (8) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อพลาสโมเดียมในยุงก้นปล่องเพศเมีย โดยยุงไปกัดและดูดเลือดดูดเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อพลาสโมเดียมระยะแกมมีโตไซต์ ซึ่งเป็นระยะติดต่อสู่ยุง จากนั้นเชื้อมาลาเรียผสมพันธุ์และเจริญเติบโตเป็นระยะติดต่อที่กระเพาะอาหารของยุงและเคลื่อนที่ไปรวมตัวที่ต่อมน้ำลายของยุงและแพร่เชื้อต่อไปมนุษย์ (ที่มา: www.megapixl.com)

สำหรับระยะในคน เริ่มจากยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อระยะสปอโรซอยต์ในต่อมน้ำลายมากัด และปล่อยสปอโรซอยต์เข้าสู่กระแสเลือดของคน เชื้อจะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ตับและเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนพัฒนาเป็นระยะไซซอนต์ จากนั้นมีการแบ่งตัวของนิวเคลียสหรือเรียกว่าเมอโรซอยต์หลายพันตัวทำให้เซลล์ตับแตกและปล่อยเมอโรซอยต์ออกสู่กระแสเลือด เมอโรซอยต์ก็จะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงและเริ่มพัฒนาเป็นลักษณะวงแหวน, โทรโฟซอยต์จนเข้าสู่ระยะไซซอนต์ นิวเคลียสก็แบ่งตัวเป็นเมอโรซอยต์หลายพันตัวจนทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกแล้วปล่อยเมอโรซอยต์ออกสู่กระแสเลือดอีกครั้ง ซึ่งเมอโรซอยต์ที่ปล่อยออกมา ก็จะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวใหม่และมีเมอโรซอยต์บางตัวที่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นระยะแกมมีโตไซด์ ซึ่งเป็นระยะที่สามารถติดต่อกลับไปสู่ยุงได้ (8) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในคน หลังจากยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อระยะติดต่อกำลังปล่อยเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดและเคลื่อนที่เข้าตับ จากนั้นปล่อยสปอโรซอยต์ออกสู่กระแสเลือดเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดแดง ซึ่งเชื้อมาลาเรียบางตัวเจริญเติบโตเป็นเชื้อชนิดมีเพศที่เป็นระยะติดต่อกลับไปสู่ยุง (9)

2.3 อาการและการแสดงของโรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียเป็นโรคที่ไม่มีอาการแสดงจำเพาะ ส่วนใหญ่อาการมักคล้ายไข้หวัดจากเชื้อไวรัส ซึ่งอาการที่พบได้บ่อยที่สุดคือ มีไข้สูงและอาการอื่น ๆ ได้แก่ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ปวดกล้ามเนื้อ หนาวสั่น เหงื่อออก เบื่ออาหาร คลื่นไส้และอาเจียน เป็นต้น ผู้ป่วยบางรายอาจมีภาวะแทรกซ้อน เช่น ตับวาย ไตวาย ไข้มาลาเรียขึ้นสมอง อาจทำให้เสียชีวิตได้ เชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ใช้ระยะเวลาในการฟักตัวที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปประมาณ 1-2 สัปดาห์ ยกเว้นเชื้อพลาสโมเดียมมาลาเรียอี ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่แสดงอาการหรือมีอาการเล็กน้อย จึงอาจไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและการรักษา ส่งผลให้คนกลุ่มนี้กลายเป็นแหล่งสะสมและแพร่กระจายของเชื้อได้ (10)

สำหรับอาการไข้หนาวสั่นจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงเจริญเต็มที่ที่เป็นระยะไซซอนต์และทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกแล้วปล่อยเมอโรซอยต์ออกมา โดยวงจรในการเกิดอาการไข้หนาวสั่นของผู้ป่วยมาลาเรียจะใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรีย ดังนี้

- 1) พลาสโมเดียมฟัลซิพารัมมีอาการไข้หนาวสั่นทุก 36 ชั่วโมง โดยเชื้อมาลาเรียสามารถเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ทุกระยะ จึงทำให้เชื้อมาลาเรียเพิ่มจำนวนในกระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงและอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ เช่น มาลาเรียขึ้นสมอง (11)
- 2) พลาสโมเดียมไวแวกซ์มีอาการไข้หนาวสั่นทุก 48 ชั่วโมง อาการคล้ายกับพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม แต่มีความรุนแรงน้อยกว่าสามารถเกิดไขกลับซ้ำได้ เนื่องจากเชื้อระยะสปอโรซอยต์จะพักและหยุดการพัฒนาในเซลล์ตับระยะฮิโนซอยต์เป็นเวลานาน (12)

- 3) พลาสโมเดียมโอวาเลมีการใช้หนวส้นทุก 48 ชั่วโมง เกิดไขกลับซ้ำเช่นเดียวกับการติดเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์แต่อาการอาเจียนรุนแรงน้อยกว่า (13)
- 4) พลาสโมเดียมมาลาเรียอีมีอาการใช้หนวส้นทุก 72 ชั่วโมง อาการไม่รุนแรงหรืออาจไม่มีอาการ เชื้อสามารถแฝงอยู่ในผู้ป่วยได้นานหลายปี (14)
- 5) พลาสโมเดียมโนโซมีอาการใช้หนวส้นทุก 24 ชั่วโมง เป็นเชื้อก่อโรคมาลาเรียที่พบในลิงแสม (*Macaca fascicularis*) และลิงกัง (*Macaca nemestrina*) มีวงจรในเม็ดเลือดแดงสั้นทำให้ปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (15)

2.4 การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย

2.4.1 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันเกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียแล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกทั้งเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ โดยเฉพาะการติดเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ที่สามารถเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ทุกระยะจึงทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อจะถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย เนื่องจากร่างกายมีการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียที่เกาะบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงทำให้เม็ดเลือดแดงทั้งติดเชื้อและไม่ติดเชื้อถูกกระตุ้นและทำลายไปด้วย นอกจากนี้ยังมีการหลั่งไซโตไคน์บางชนิด เช่น TNF-alpha มีผลไปยับยั้ง ต้นกำเนิดสายเม็ดเลือดแดง (erythroid progenitors) ส่งผลให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง (16)

2.4.2 ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำเกิดจากสารพิษของเชื้อมาลาเรียไปกระตุ้นให้แมคโครฟาจหลั่งสาร pro-inflammatory cytokine บางชนิด และมีผลไปยับยั้งการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาว รวมถึงการสร้างเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ ด้วย (16)

2.4.3 กลไกการแข็งตัวของเลือดผิดปกติเกิดจากปัจจัยการแข็งตัวของเลือดลดลง เนื่องจากตับสูญเสียหน้าที่ทำให้การสร้าง factor V, VII, VIII และ IX หรือสร้างได้ลดลงและมีการสร้าง anti-thrombin ลดลงทำให้ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดถูกนำไปใช้ในการสร้างลิ่มเลือดและเกิดเป็นภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (Disseminated intravascular coagulation; DIC) (17)

2.4.4 ภาวะเกล็ดเลือดต่ำเกิดจากการรบกวนกลไกการแข็งตัวของเลือด ไขกระดูกผิดปกติ ม้ามโต รวมถึงมีการทำลายเกล็ดเลือดเองด้วย (18)

2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่

2.5.1 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

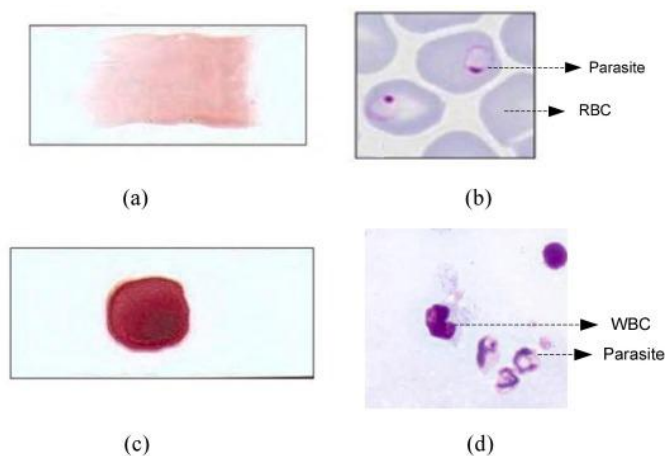
การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถือเป็นวิธีมาตรฐานสามารถตรวจนับ ปริมาณความหนาแน่นและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียได้ โดยการนำเลือดมาไลบนสไลด์และย้อมสี ไรท์-จิมซ่า การใช้ฟิล์มเลือดชนิดหนาเป็นการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดผู้ป่วยโดยอาศัยคุณสมบัติ ของเม็ดเลือดแดงที่ซ้อนทับกันทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้ง่ายและ รวดเร็ว ส่วนการใช้ฟิล์มเลือดชนิดบางใช้สำหรับตรวจเพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรีย ในกรณีที่ไม่สามารถยืนยันได้ด้วยฟิล์มเลือดชนิดหนา เนื่องจากเม็ดเลือดแดงจะเรียงตัวชั้นเดียวและถูกตรึงด้วยเม ทานอลทำให้เห็นรูปร่าง องค์ประกอบของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ซึ่งสามารถวินิจฉัยระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียได้แม่นยำกว่าการใช้ฟิล์มเลือดชนิดหนา ดังแสดงในรูปที่ 3

การนับปริมาณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียด้วยการตรวจฟิล์มเลือดชนิดหนา โดยนับ จำนวนเม็ดเลือดขาวและเชื้อมาลาเรียควบคู่กัน (19) สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้อง จุลทรรศน์พบว่าปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 50 พาราไซต์ต่อเลือดหนึ่ง ไมโครลิตร (20)

สำหรับการตรวจนับปริมาณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียควบคู่กับการนับจำนวนเม็ด เลือดขาว โดยองค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ค่าเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดขาว 8,000 เซลล์ต่อเลือด หนึ่งไมโครลิตร (WHO, 2010) สูตรคำนวณความหนาแน่นของปรสิต ดังนี้

$$\text{Parasitemia}/\mu\text{L} = \frac{\text{จำนวนเชื้อมาลาเรียที่นับได้}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับ}} \times 8000 \text{ WBC}/\mu\text{L}$$

โดยค่าเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดขาว 8,000 คือค่าสมมติฐานของเม็ดเลือดขาวที่ได้มาจากช่วงของค่าอ้างอิง 5,000-10,000 เซลล์ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร (21)



รูปที่ 3 (a) ฟิล์มเลือดชนิดบาง (b) ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ฟิล์มเลือดชนิดบาง
(c) ฟิล์มเลือดชนิดหนา (d) ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ฟิล์มเลือดชนิดหนา (22)

2.5.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยชุดทดสอบเร็ว (Rapid diagnostic test; RDT)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยชุดทดสอบเร็วอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกัน โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนของเชื้อมาลาเรียเคลือบบนชุดตรวจ เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว เหมาะกับการตรวจภาคสนาม พื้นที่ที่ไม่มีไฟฟ้าและขาดแคลนบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญในการตรวจวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ข้อจำกัดของชุดทดสอบเร็วคือสามารถตรวจแยกชนิดของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและไม่ใช่เชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม แต่ไม่สามารถแยกเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมโอวาเลและพลาสโมเดียมมาลาเรียนี้ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งการตรวจด้วยชุดทดสอบเร็วสามารถตรวจพบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 100 พาราไซต์ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร (23)

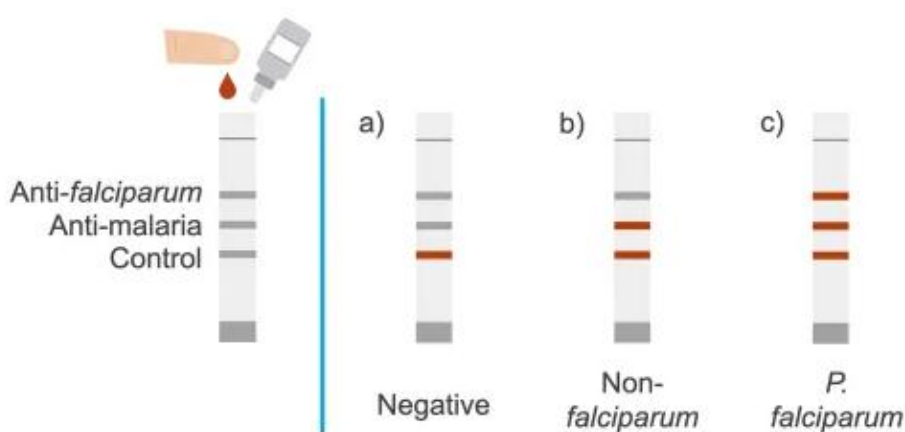
แอนติเจนเป้าหมายของเชื้อมาลาเรียสำหรับการตรวจด้วยชุดทดสอบเร็ว ได้แก่

1) โปรตีนฮิสทีดินรีซ 2 (HPR-2) เป็นแอนติเจนบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อระยะเมอโรซอยต์และไซซอนต์ของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมในรูปโปรตีนที่ละลายน้ำได้ จึงสามารถตรวจ

เชื้อเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม แต่ไม่สามารถตรวจเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโอวาเลและพลาสโมเดียมโนโซไต์ได้และให้ผลการตรวจด้วยชุดทดสอบเร็วเป็นลบ

2) เอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนสที่ผลิตจากเชื้อพาราไซต์ (pLDH) เป็นเอนไซม์ที่พบในกระบวนการสลายน้ำตาลและละลายในน้ำได้ เชื้อมาลาเรียทุกสปีชีส์สามารถผลิตเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนสได้ โดยปริมาณของแลคเตตดีไฮโดรจีเนสจะสัมพันธ์กับความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งชุดตรวจ OptiMAL จะอาศัยหลักการตรวจเอนไซม์แลคเตต ดีไฮโดรจีเนสของเชื้อมาลาเรีย โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 ตัว ประกอบด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ตัวที่ตรวจเชื้อมาลาเรียทุกสปีชีส์และโมโนโคลนอลแอนติบอดี อีก 1 ตัวจะจำเพาะต่อเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ซึ่งสามารถตรวจการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมได้ (24)

3) เอนไซม์อัลโดเลสเป็นเอนไซม์ที่พบในเชื้อมาลาเรียระยะเมอโรซอยต์และระยะไม่มีเพศใช้หลักการโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์อัลโดเลสของเชื้อมาลาเรียทุกสปีชีส์ ดังนั้นเมื่อใช้ร่วมกับ HPR-2 สามารถตรวจแยกเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ใช่เชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมได้ (24)

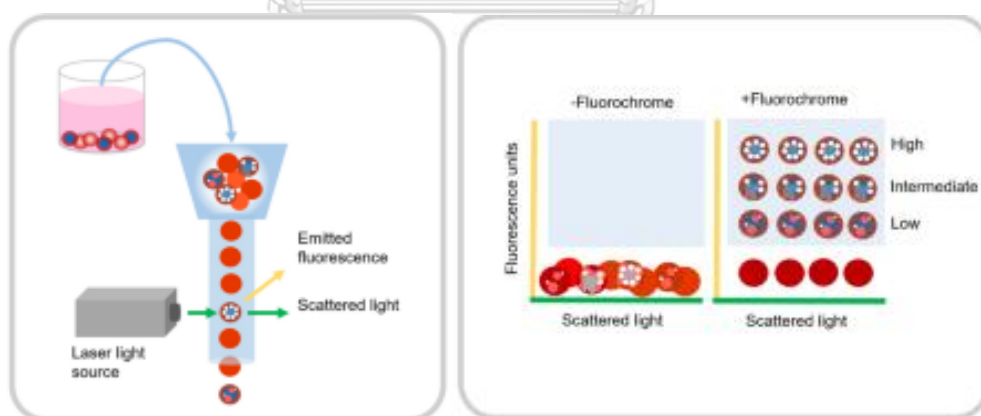


รูปที่ 4 การทดสอบด้วยชุดทดสอบเร็ว โดยใช้สตริปกระดาษกรองที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, แอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียทั่วไปและแอนติบอดีต่อมนุษย์เป็นตัวควบคุม จากนั้นทดสอบโดยใช้ตัวอย่างเซรัมของผู้ป่วยเกิดเป็นแถบสีสามารถอ่านผลได้ a) ผู้ป่วยไม่ติดเชื้อมาลาเรีย b) ผู้ป่วย

ติดเชื่อมมาลาเรียที่ไม่ใช่เชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม c) ผู้ป่วยติดเชื่อมมาลาเรียเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (25)

2.5.3 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยโฟลไซโทเมทรีเป็นการตรวจนับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื่อมมาลาเรียและรายงานผลเป็นปริมาณวิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการที่เม็ดเลือดแดงตัวแก่ ซึ่งไม่มีดีเอ็นเอภายในเซลล์ แต่หากมีการติดเชื่อมมาลาเรียอยู่ในเม็ดเลือดแดงก็จะตรวจพบดีเอ็นเอได้ จึงทำการย่อยสลายอาร์เอ็นเอภายในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนด้วยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสก่อน เนื่องจากสีเรืองแสงสามารถย้อมได้ทั้ง ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ จากนั้นทำการย้อมกรดนิวคลีอิกด้วยสีเรืองแสงและย้อมไกลโคโพรินเอดด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไกลโคโพรินเอดที่ติดฉลากด้วยสารเรืองสี เช่น ฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนต (FITC) หรือไฟโคอีริทริน (PE) เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่พบเฉพาะบนผิวเม็ดเลือดแดงเพื่อแยกเม็ดเลือดแดงออกจากเม็ดเลือดขาวแล้วจึงตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื่อมมาลาเรียด้วยโฟลไซโทเมทรี (26) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 กระบวนการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี โดยใช้สีย้อมที่เรืองแสงเพื่อตรวจหาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื่อมพลาสโมเดียม ซึ่งมีกรดนิวคลีอิกของเชื้อมาลาเรียที่พบได้ทุกระยะ จะถูกย้อมด้วยสารเรืองสี จากนั้นเซลล์จะถูกนำเข้าสู่เครื่องโฟลไซโทเมทรีและเคลื่อนที่ผ่านแบบเรียงเดี่ยวเซลล์ก็จะถูกตรวจวัดด้วยแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน ฟลูออโรโครมที่จับกับกรดนิวคลีอิกจะถูกกระตุ้นและเกิดการเปล่งแสงออกมา (27)

วารี วงศ์โชติกุลและคณะปี พ.ศ. 2547 ได้ศึกษาการใช้เทคนิคโพลีไซโทเมทรีในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย พบว่าเทคนิคโพลีไซโทเมทรีสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรีย โดยมีความไวเท่ากับ 91.26 % ความจำเพาะเท่ากับ 86.28 % และความถูกต้องเท่ากับ 87.42 % เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็พบว่าให้ผลการทดสอบสัมพันธ์กับเทคนิคโพลีไซโทเมทรี (สัมประสิทธิ์การถดถอยเท่ากับ 0.9409) แต่เนื่องจากข้อจำกัดของโพลีไซโทเมทรีคือเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนจะมีผลต่อการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ (28)

จิน วุจันและคณะปี พ.ศ. 2557 ได้พัฒนาเทคนิคโพลีไซโทเมทรีในการตรวจหาเซลล์เพาะเลี้ยงเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมที่ย้อมด้วยสี SYBR Green I และ CD235A เปรียบเทียบกับการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ย้อมด้วยสีจิมซ่า พบว่าเทคนิคโพลีไซโทเมทรีสามารถแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อได้ โดยมีค่าความแม่นยำ CV เท่ากับ 2.2 – 37.2 % และมีความไวเท่ากับ 0.01 % ซึ่งสูงกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ย้อมด้วยสีจิมซ่าที่มีค่าความแม่นยำ CV เท่ากับ 7.2–66.0 % (29)

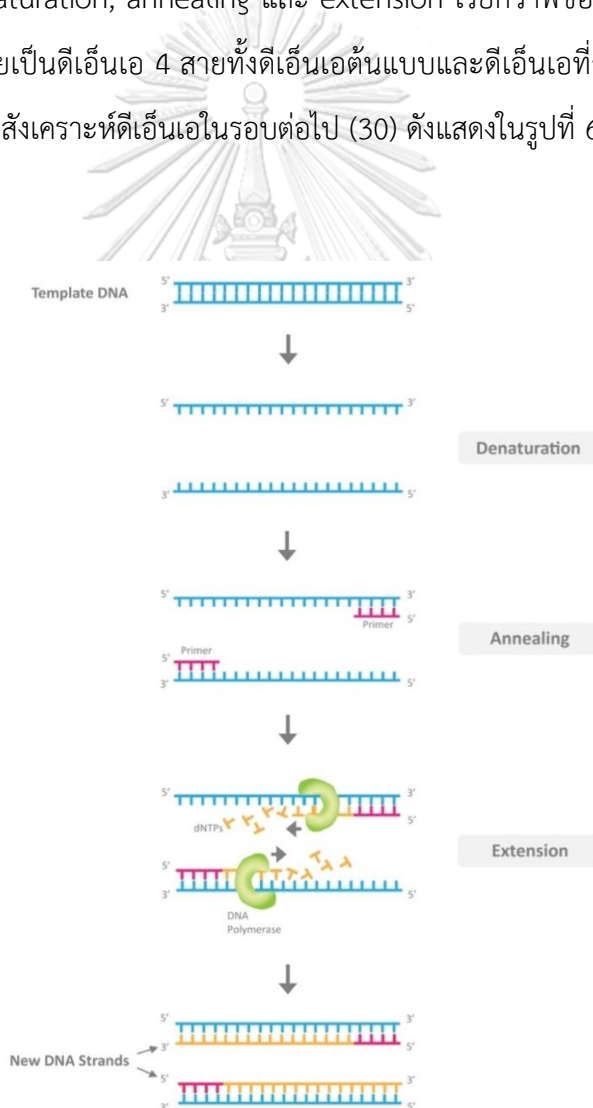
2.5.4 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่เลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยหลักการของพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลองสูงประมาณ 90-95 °C ดีเอ็นเอแม่แบบสองสายที่พันกันเป็นเกลียวคู่จะถูกทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยวและดีเอ็นเอสายเดี่ยวนี้อาจไปเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. Annealing เมื่อลดอุณหภูมิต่ำลง 50-55 °C ทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยเบสที่เป็นคู่สมคือ อะดีนีน (A) จับกับไทมีน (T) และกวานีน (G) จับกับไซโทซีน (C) ซึ่งในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่สามารถเริ่มจากศูนย์ได้เนื่องจากเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสต้องการปลาย -OH ทางด้าน 3' เพื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะมาต่อสาย

3. Extension อุณหภูมิ 70-75 °C เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบสร้างต่อออกไปจากไพรเมอร์ โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีเอนไซม์แทคทีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ทนความร้อนช่วยในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่และมีส่วนประกอบสำหรับการสร้างดีเอ็นเอ ใหม่ คือ dNTP ประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP ไพรเมอร์จะถูกสร้างต่อไปในทิศทาง 5' ไปหา 3' และลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สมกันกับเบสของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ

ขั้นตอน denaturation, annealing และ extension เรียกว่าพีซีอาร์หนึ่งรอบจากดีเอ็นเอต้นแบบ 2 สายจะกลายเป็นดีเอ็นเอ 4 สายทั้งดีเอ็นเอต้นแบบและดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในรอบต่อไป (30) ดังแสดงในรูปที่ 6

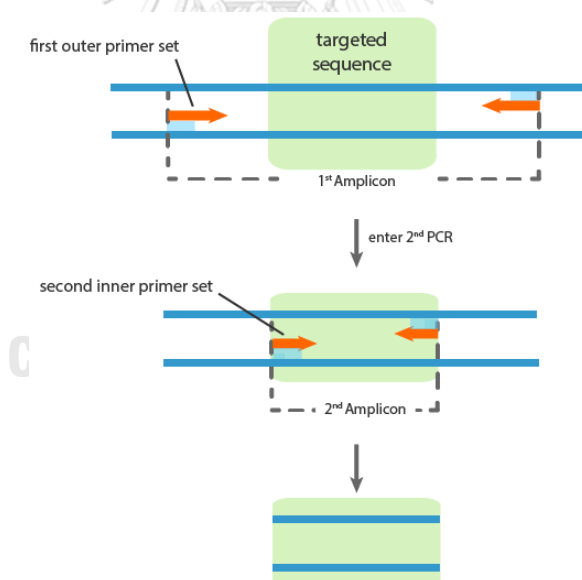


รูปที่ 6 หลักการพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่ denaturation, annealing และ extension เรียกว่าพีซีอาร์ 1 รอบ (ที่มา: www.goldbio.com)

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจพบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 0.02 - 9 พาราไซต์ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร ซึ่งผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีอาการแสดงก็สามารถตรวจวินิจฉัยและรับการรักษาได้ (31) ซึ่งได้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์พื้นฐานมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่หลากหลาย ได้แก่

2.5.4.1 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคเนสต์พีซีอาร์ (nested PCR)

เทคนิคเนสต์พีซีอาร์เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มมากขึ้นและลดจำนวนผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะให้เหลือน้อยที่สุด โดยการทำให้พีซีอาร์ 2 ขั้นตอนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ ปฏิบัติการในช่วงแรกจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่เดียว ในปฏิบัติการช่วงที่สองของเทคนิคเนสต์พีซีอาร์ทำโดยใช้ปฏิบัติการในช่วงแรกเป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์คู่ที่สองให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะสูงและจำนวนเพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 7 หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (32)



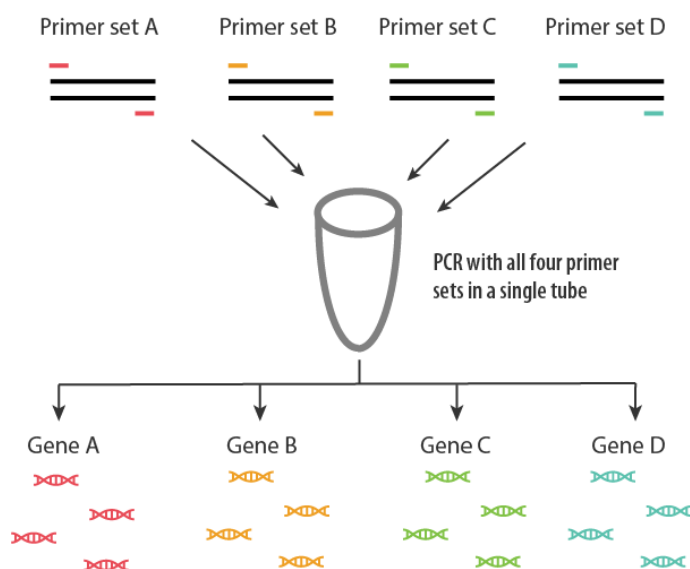
รูปที่ 7 หลักการของเทคนิคเนสต์พีซีอาร์เป็นการทำพีซีอาร์ 2 ขั้นตอนประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกจะเป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมายและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์รอบแรกมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำพีซีอาร์รอบที่สอง โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่สองที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะสูงและจำนวนเพิ่มมากขึ้น (ที่มา: old.abmgood.com)

เพี้ยเพี้ยลีและคณะปีพ.ศ. 2557 ได้ศึกษาการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคเนสเต็ดพีซีอาร์โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองเปรียบเทียบกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดครบส่วนด้วยชุดสกัด พบว่าเทคนิคเนสเต็ดพีซีอาร์ที่ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองสามารถตรวจพบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 0.2 พาราไซต์ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตรและตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดครบส่วนด้วยชุดสกัดสามารถตรวจพบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 1.2 พาราไซต์ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร (33)

เนปี โดนีและคณะปีพ.ศ. 2559 ได้ศึกษาการตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียม โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศตุรกีทำการทดสอบด้วยเทคนิคเนสเต็ดพีซีอาร์เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ย้อมด้วยสีจิมซ่า พบว่าเทคนิคเนสเต็ดพีซีอาร์มีความไวเท่ากับ 100% และความจำเพาะเท่ากับ 97.2% (34)

2.5.4.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR)

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหลายเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวกัน ไพรเมอร์แต่ละคู่ออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เป็นคู่สมกันและให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีความยาวแตกต่างกันเพื่อให้ตรวจวิเคราะห์ได้โดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ต้องปรับสภาวะของปฏิกิริยาให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ประสิทธิภาพใกล้เคียงหรือเท่ากับ (35) ดังแสดงในรูปที่ 8



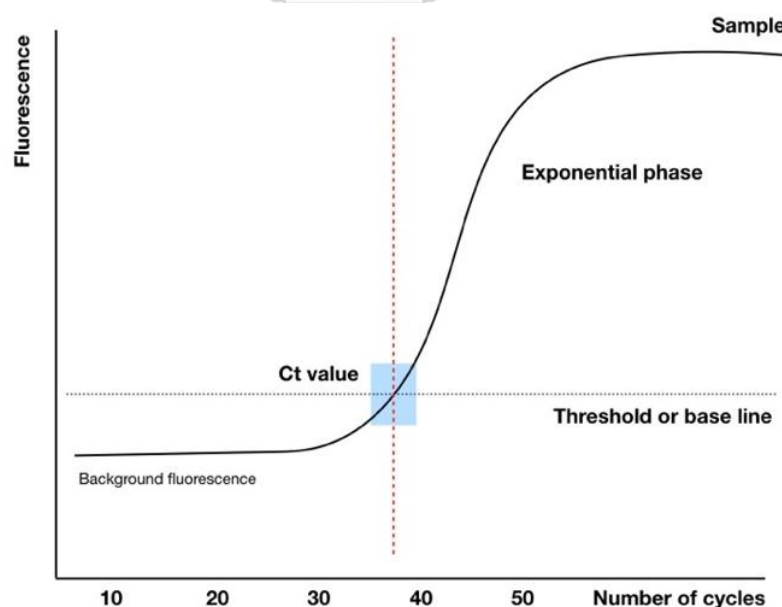
รูปที่ 8 เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหลากหลายเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวกัน (ที่มา: old.abmgood.com)

อปีชา เซลลามอลและคณะปี พ.ศ. 2563 ได้พัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ สำหรับตรวจวินิจฉัยและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียภายในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งตัวอย่างมาลาเรียจะได้รับการตรวจเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิมและเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดและออกแบบไพรเมอร์สำหรับเชื้อพลาสโมเดียมทั้ง 4 สปีชีส์ ได้แก่ universal primer F-5'-TCAGCTTTTGATGTTAGGGTATT-3', *P. vivax* R-5'-TAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-3', *P. falciparum* R-5'-GCATCAAAGATACAAATATAAGC-3', *P. malariae* F-5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC 3'/R-5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3' และ *P. ovale* F-5'-TGTAGTATTC AAACGCA GT -3'/ R-5'-TATGTACTTG TTAAGCCTTT-3' ส่วนประกอบในแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 30 μ L ประกอบด้วย มาสเตอร์มิกซ์ 20 μ L ดีเอ็นเอแม่แบบ 2 μ L ไพรเมอร์สปีชีส์ละ 1 μ L และน้ำกลั่น 1 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์เริ่มจาก initial denaturation 94 °C 10 นาที, denaturation 94 °C 1 นาที, annealing 60 °C 2 นาที, extension 72 °C 2 นาทีและ final extension 72 °C 10 นาที จากนั้นนำผลึกถึงมาวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและดูผลเจลด้วยภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมด 52 ตัวอย่างพบว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมาลาเรียทั้งหมด 34 ตัวอย่าง (65.38 %) และตรวจด้วยเทคนิค

มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์พบเชื้อมาลาเรีย 38 ตัวอย่าง (73.08 %) นั้นหมายความว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มีความไวในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียมากกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (36)

2.5.4.3 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR)

เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกรอบของปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์หนึ่งคู่ร่วมกับโพรบที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งโพรบจะมีการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจากอาศัยการตรวจสัญญาณเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมาปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ ซึ่งการตรวจวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ดีเอ็นเอที่ติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็นการตรวจวัดปริมาณสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่โดยใช้สารฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้ โดยทั่วไปที่นิยมใช้ คือ SYBR Green I และ Probe-based assay เป็นการตรวจวัดปริมาณสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่โดยใช้โพรบ (37) ดังแสดงในภาพที่ 9



รูปที่ 9 กราฟแสดงผลของเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจะเพิ่มเป็นลักษณะกราฟรูปตัว S (sigmoid หรือ exponential curve) โดยแกน Y จะแสดงสัญญาณการเรืองแสงและแกน X แสดงจำนวนรอบการเพิ่มจำนวน วัดผลิตภัณฑ์ในเวลาที่เกิดขึ้นในช่วง exponential phase

ซึ่งเป็นช่วงที่สัญญาณเรืองแสงสูงเหนือระดับ threshold และมีแนวโน้มที่เพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ ซึ่งค่าของ Ct เป็นค่าบอกแนวโน้มของผลิตภัณฑ์และจำเป็นต้องมีกราฟมาตรฐานเพื่อเทียบวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น (ที่มา: geneticeducation.co.in)

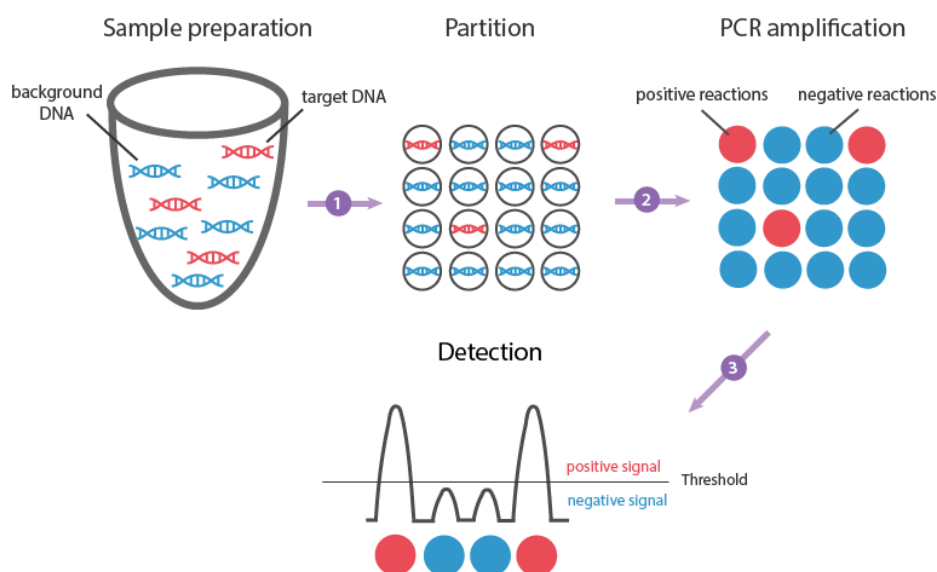
เคทรีเอ แมนโกลและคณะปีพ.ศ. 2548 ได้พัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ในการตรวจหาและแยกสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ 4 สปีชีส์ ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมโอวาเลและพลาสโมเดียมมาลาเรียอี ในปฏิกิริยาเดียวกันและวิเคราะห์ผลด้วย melting curve โดยออกแบบไพรเมอร์จากยีน *18S rRNA* เนื่องจากมีจำนวนหลายยีนบนโครโมโซมของจีโนมพลาสโมเดียม ได้แก่ F -PL1473F18 -5'-TAACgAACgAgATCTTAA-3' และ RPL1679R18 -5'-gTTCCTCTAAgAAgCTTT-3 ส่วนประกอบในแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 20 μ L ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2-5 μ L, 10X FastSTART DNA SYBR Green 2 μ L, 6.5 mM แมกนีเซียมคลอไรด์ 2 μ L และไพรเมอร์สปีชีส์ละ 2 μ L จากนั้นนำเข้าสู่เครื่อง PCR จำนวน 40 รอบ เริ่มจาก initial denaturation 95 °C 10 นาที, denaturation 95 °C 10 วินาที, annealing 50 °C 5 วินาทีและ extension 72 °C 20 วินาที และวิเคราะห์ผลด้วย melting curve 68-95 °C 2 นาที โดยทำการเพิ่มอุณหภูมิ 0.2 °C/sec และตรวจวัดการเรืองแสงทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์จะมีอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ที่จำเพาะแตกต่างกัน พบว่าเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สามารถตรวจเชื้อมาลาเรียแบบผสมได้และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อมาลาเรียของเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์กับการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างที่ให้ผลลบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ (38)

อาร์ฟิล ซาเซทและคณะปีพ.ศ. 2564 ได้พัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ 5 สปีชีส์ ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมโอวาเล, พลาสโมเดียมมาลาเรียอีและพลาสโมเดียมโนโซ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการออกแบบจากงานวิจัยก่อนหน้า ส่วนประกอบในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 μ M ไพรเมอร์สปีชีส์ละ 0.7 μ L, SYBR green supermix 10 μ L, มาสเตอร์มิกซ์ 17 μ L, น้ำ 5.6 μ L และดีเอ็นเอ 3 μ L จากนั้นนำเข้าสู่เครื่อง PCR เริ่มจาก initial denaturation 95 °C 10 นาที ตามด้วย 35 รอบประกอบด้วย denaturation 95 °C 15 วินาที annealing 57 °C 30 วินาที และ elongation 61 °C 30 วินาที และวิเคราะห์ผลด้วย melting curve 60 °C 10 นาที, 68 °C 2 นาที โดยเพิ่มอุณหภูมิทุก ๆ 0.5 °C/sec ตั้งแต่ 65-

85 °C พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 1 พาราไซต์ ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร (39)

2.5.4.4 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคดิจิทัลพีซีอาร์ (Digital PCR)

เทคนิคดิจิทัลพีซีอาร์พัฒนามาจากเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยลดขั้นตอนของการทำกราฟมาตรฐาน โดยอาศัยหลักการแบ่งปฏิกิริยาพีซีอาร์ออกเป็นจำนวนหลายพันปฏิกิริยา ซึ่งมี 2 ระบบ ได้แก่ นาโนเพลทจะเป็นระบบ solid partitioning โดยที่ภายในจะมีห้องย่อย ๆ รองรับหลายหมื่นปฏิกิริยา ซึ่งมีข้อดีคือป้องกันการรบกวนของ partition ที่อาจจะส่งผลต่อจำนวน partition ที่เป็นบวกที่ได้จากการอ่านของเครื่องลดลง ทำให้ค่าความเข้มข้นของยีนเป้าหมายน้อยกว่าความเป็นจริง ส่วนระบบ droplet เป็นการทำปฏิกิริยาจากหนึ่งกลายเป็นหลายหมื่นปฏิกิริยาย่อย โดยใช้หยดน้ำมันห่อหุ้มปฏิกิริยาดิจิทัลพีซีอาร์ไว้โดยอาศัยเครื่อง droplet generator โดยนำดีเอ็นเอเป้าหมายมาเจือจางผสมกับน้ำยาที่ประกอบด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย เพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวของแต่ละ partition หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาจะตรวจวัดสัญญาณแสงในแต่ละ partition ซึ่ง partition ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายจะให้ผลเป็นบวกและนำไปคำนวณตามสถิติปัวซอง (Poisson statistics) (40) ดังแสดงในรูปที่ 10



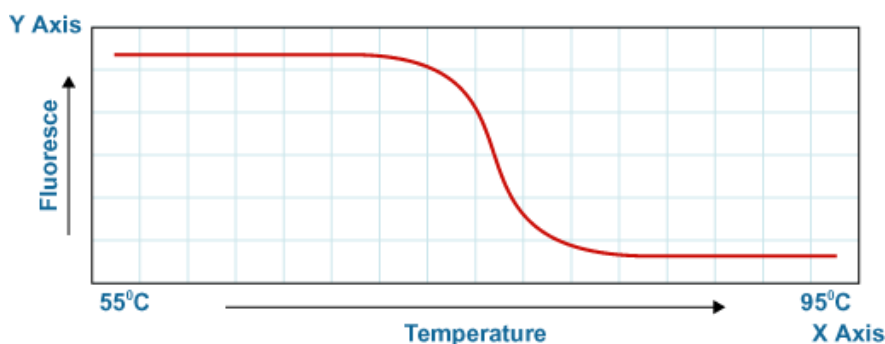
รูปที่ 10 หลักการของเทคนิคดิจิทัลพีซีอาร์เตรียมดีเอ็นเอและส่วนประกอบต่าง ๆ ของปฏิกิริยา โดยจะถูกแบ่งออกเป็นหลายหมื่น partition จากนั้นทำพีซีอาร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอซึ่ง partition ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงกว่า threshold ตรวจพบสัญญาณการเรืองแสงให้ผลเป็นบวก (ที่มา: old.abmgood.com)

สุทธิภัทร ศรีสุธรรมและคณะปีพ.ศ. 2560 ได้พัฒนาเทคนิคดิจิทัลพีซีอาร์สำหรับตรวจหาปริมาณเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ 4 สปีชีส์ ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมมาลาเรียอีและพลาสโมเดียมโอวาเลเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ของยีน *18S rRNA P.falciparum* : FAL-F/5'CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA3' FAL-R/'TATCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA 'FAM/5'TGTTTCATAACAGACGGGTAGTCATGTTTGAGTTCA3', *P.vivax* : VIV-F/5' AC GCTTCTAGATTAATCCACATAACT3' VIV-R/5'ATTTACTCAAAGTAACAAG GACT TCCAAGC3' HEX/5'TTCGTATCGACTTTGTGCGCATTTTGC3', *P. malariae* : PLASMO1/5' GTTAAGGGAG TGAAGACGATCAGA3' PLASMO2/5'TTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT3' FAM/5'ATGAG TGTTCCTTTTAGATAG3', *P.ovale* : OVALEF/5'CCRACTAGGTTTTGGATGAAA VRTTTTT3' PLASMODIUM-R/5'AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA 3' VIC/5'CRAAAGGAATTYTCTTAT T3' ส่วนประกอบในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย Bio-Rad 1X ddPCR supper mix 10 μ L, ไพรเมอร์ 0.9 μ L, โพรบ 0.25 μ L และดีเอ็นเอตัวอย่าง 4 μ L และทำพีซีอาร์โดยเริ่มจาก initial denaturation 95 $^{\circ}$ C 10 นาที ตามด้วย 40 รอบ denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 วินาที annealing 60 $^{\circ}$ C 30 วินาที และตามด้วย 98 $^{\circ}$ C 10 วินาทีพบว่าเทคนิคดิจิทัลพีซีอาร์มีความไวสูงสามารถตรวจพบปริมาณความหนาแน่นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 11 parasites/mL (41)

2.4.4.5 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม (PCR-HRM)

เทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มเป็นการวิเคราะห์ melt curve ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากพีซีอาร์ โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยมีสปีชีส์ที่เป็นสัญญาณในการตรวจวัดเข้าไปจับระหว่าง ดีเอ็นเอสายคู่จนสิ้นสุดปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จะทำการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มเพิ่มอุณหภูมิขึ้นตั้งแต่ 50-95 $^{\circ}$ C ทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำลายแยกออกจากกันเป็นสายคู่ ขณะที่ดีเอ็นเอถูกแยกออกสปีชีส์ที่จับอยู่จะค่อยๆหลุดออกทำให้สัญญาณการตรวจวัดสีลดลง

ด้วย ซึ่งผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะอยู่ในรูปแบบของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของสีและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) ที่จำเพาะต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ high resolution melting curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของสี (Y) และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป (X) (ที่มา: premierbiosoft.com)

เอนเดอร์สัน เมอร์ริลโลและคณะปีพ.ศ. 2562 ได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาและระบุชนิดของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมมาลาเรียอีและการติดเชื้อแบบผสมเปรียบเทียบกับ การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์และเนสเต็ดพีซีอาร์ สำหรับการทำให้พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มแบบไพโรเมอริกจากยีน *18s rRNA* ของเชื้อพลาสโมเดียมสปีชีส์ ได้แก่ Endmal18s F-CCTGGTTGATCTTGCCAGTAG และ Endmal18s R-GCTACAGCTTTTCCGTAG TTATCC ส่วนไพรเมอร์ของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์และพลาสโมเดียมมาลาเรียอี ได้แก่ Amzmal 18s F-GGATAACTACGGAAA AGCTG และ Amzmal 18s RTTAYGTGYRCTTCTTTGTT จากนั้นทำพีซีอาร์ โดยเริ่มจาก initial denaturation 95 °C 5 นาที ตามด้วย 50 รอบ denaturation 95 °C 10 วินาที, annealing 55 °C (Endmal18s) หรือ 52 °C (Amzmal18s) 20 วินาที และ extension 72 °C 20 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มตั้งแต่ 70-85 °C โดยเพิ่มขึ้น 0.1 °C/sec เมื่อเปรียบเทียบผลเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มกับกล้องจุลทรรศน์พบว่า Endmal18s K= 0.373 IC 95% และ Amzmal 18s K= 0.549 IC 95% และเปรียบเทียบเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มกับเนสเต็ดพีซีอาร์พบว่า Endmal18s K= 0.373 IC 95% และ Amzmal18s K= 0.549 IC 95% (42)

2.6 ยารักษาโรคมาลาเรีย (antimalarial drug)

การใช้ยารักษาโรคมาลาเรียตามนโยบายการวินิจฉัยและดูแลรักษาโรคไข้มาลาเรียภายใต้ยุทธศาสตร์การกำจัดโรคมาลาเรีย โดยกระทรวงสาธารณสุขประเทศไทย พ.ศ. 2560-2569 ให้ทำการจ่ายยารักษาโรคมาลาเรียในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการยืนยันทุกรายโดยเร็วที่สุด และติดตามการรักษาเพื่อให้มั่นใจว่าผู้ป่วยได้รับยาถูกต้องตามขนาดยา ไม่มีอาการข้างเคียงจากยาที่ร้ายแรงและหายจากอาการเจ็บป่วย รวมถึงการตรวจไม่พบเชื้อหลังจากได้รับการรักษา

ยารักษาโรคมาลาเรียอาจจำแนกตามฤทธิ์การทำลายเชื้อมาลาเรียระยะต่างๆ ดังนี้

1) ทำลายเชื้อระยะไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงเป็นยากลุ่มที่สำคัญมากที่สุดเนื่องจากระยะนี้เป็นสาเหตุหลักของอาการป่วย จัดเป็นยาหลักในการรักษาโรคมาลาเรีย ได้แก่ ควินิน, โคลโรควิน, เมโฟฟลูควิน, อาร์ทีมิซิโนลและฮาโลแฟนทริน

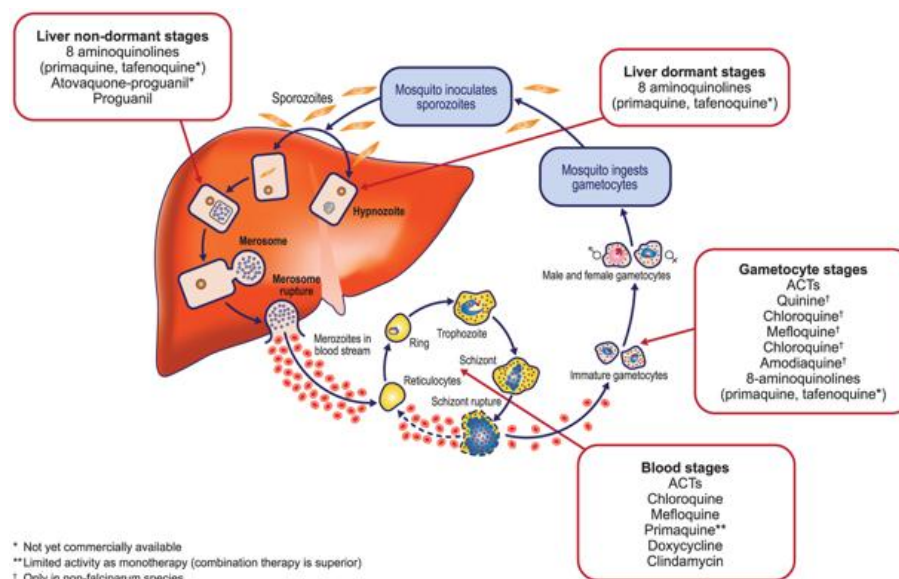
2) ทำลายเชื้อในระยะฮิโพนโซइटหรือระยะพักในตับ ใช้ในการป้องกันภาวะไข้กลับซ้ำของพลาสโมเดียมไวแวกซ์และพลาสโมเดียมโอวาเล ปัจจุบันมีเพียงยาไพโรมาควิน

3) ทำลายเชื้อระยะไม่อาศัยเพศในตับใช้ในการป้องกันเชื้อมาลาเรีย เช่น ยาไพริเมทามีนและไพโรมาควิน ซึ่งสามารถทำลายเชื้อมาลาเรียในตับได้ทุกสปีชีส์

4) ทำลายเชื้อระยะแกมีโตไซต์ ซึ่งเป็นระยะติดต่อกลับไปสู่ยุงพาหะของโรคมาลาเรีย ยาที่ใช้ในการป้องกันการแพร่จากคนไปสู่ยุง ได้แก่ ยาไพโรมาควินสามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อมาลาเรียได้ทุกสปีชีส์

5) ทำลายเชื้อระยะสปอโรซอยต์ในยุง ได้แก่ ยาไพริเมทามีนและไพโรมาควิน

6) ทำลายเชื้อระยะสปอโรซอยต์ในคน เป็นระยะแรกที่เข้าสู่กระแสเลือดในคนมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการป้องกันโรคมาลาเรีย แต่ปัจจุบันยังไม่มียาที่เหมาะสม (43) ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านเชื้อมาลาเรีย โดยยาแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียในระยะต่าง ๆ แตกต่างกัน (ที่มา: journals.plos.org)

สำหรับการใช้ยารักษาผู้ป่วยโรคมาลาเรียมีสูตรในการใช้ยารักษาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2 และกลไกหลักในการออกฤทธิ์ของยาแต่ละชนิดในการรักษาโรคมาลาเรีย ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การให้ยารักษาผู้ป่วยโรคไข้มาลาเรีย (กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564)

เชื้อมาลาเรีย	ยาต้านเชื้อมาลาเรีย
<i>P.falciparum</i>	Dihydroartemisinin-piperaquine ร่วมกับ Primaquine
<i>P.vivax</i> , <i>P.ovale</i>	Chloroquine ร่วมกับ Primaquine
<i>P.malariae</i> , <i>P.knowlesi</i>	Chloroquine
การติดเชื้อแบบผสม	Dihydroartemisinin-piperaquine ร่วมกับ
<i>P.falciparum</i> / <i>P.vivax</i> หรือ <i>P.ovale</i>	Primaquine
<i>P.falciparum</i> / <i>P.malariae</i>	

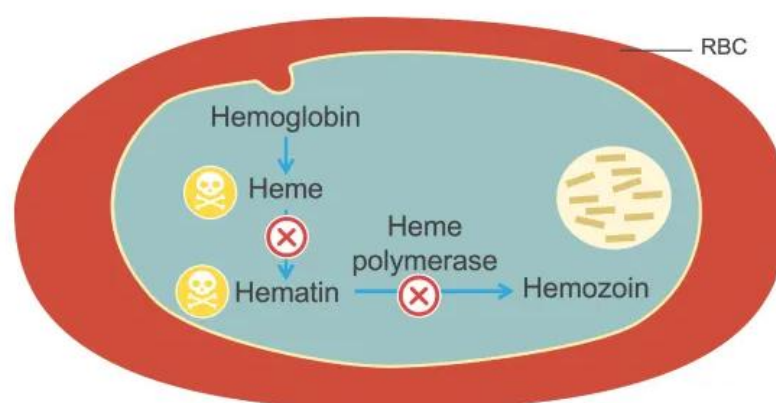
ตารางที่ 3 กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของยาสำหรับการรักษาโรคมาลาเรีย (ที่มา: mutualselfcare)

กลุ่มยา	กลไกการออกฤทธิ์
Chloroquine, Quinine, Mefloquine	ยับยั้งกระบวนการสลายฮีโมโกลบิน
Primaquine, Atovaquone	ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรียของเชื้อ
Sulfadoxide, Pyrimethamine, Proguanil	ยับยั้งการสร้างโฟเลต
Doxycycline, Clindamycin	ยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อ
Artemisinins	สร้างอนุมูลอิสระมาทำลายเชื้อ

2.6.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยาโคลโรควิน (Chloroquine) ในการรักษาโรคมาลาเรีย

การออกฤทธิ์ของยาโคลโรควิน เนื่องจากเชื้อมาลาเรียไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนเองได้ จึงต้องใช้กรดอะมิโนจากฮีโมโกลบินของโฮสต์ ในขณะที่เชื้ออยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนในฟุตแควคโวลจะมีเอนไซม์มาย่อยฮีโมโกลบินเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนและฮีโมโกลิน ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อ แต่สามารถทำลายพิษของฮีโมโกลินได้ด้วยกระบวนการ pH-dependent polymerization กลายเป็นฮีโมโซอิน (hemozoin) หรือ malaria pigment ยาโคลโรควินจึงออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสลายฮีโมโกลินทำให้มีฮีโมโกลินสะสมมากขึ้นจนทำลายตัวเชื้อเอง แต่ยาโคลโรควินไม่มีผลต่อเชื้อระยะพักในตับ ดังแสดงในรูปที่

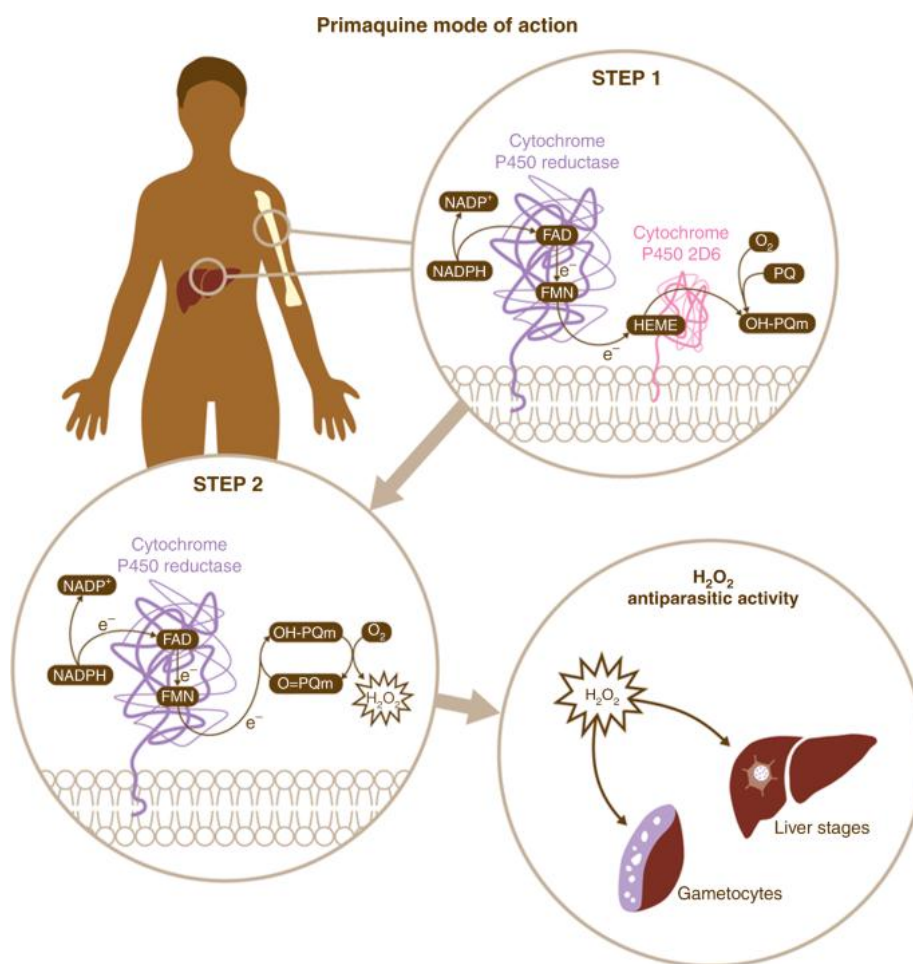
13



รูปที่ 13 กลไกการออกฤทธิ์ของยาโคลโรควิน ในขณะที่เชื้ออยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์มาย่อยฮีโมโกลบินได้เป็นกรดอะมิโนและฮีม ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อจึงทำลายพิษของฮีมด้วยกระบวนการ pH-dependent polymerization กลายเป็นฮีมโซลิน (ที่มา: medmastery)

2.6.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาไพริมาควิน (primaquine) ในการรักษาโรคมาลาเรีย

ยาไพริมาควินเป็นยาต้านเชื้อมาลาเรียมีโครงสร้างเป็น 8-แอมิโนควิโนลีน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *cytochrome bc1 complex* กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนที่สร้างพลังงานในไมโทคอนเดรียของเชื้อมาลาเรียทำให้เชื้อไม่สามารถดำรงอยู่ได้ โดยยาไพริมาควินสามารถทำลายเชื้อในระยะเมอร์โรซอยต์ในตับและระยะแกมีโตไซด์ ซึ่งเป็นระยะที่ติดต่อกลับไปสู่ยุงจึงสามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้และยังสามารถฆ่าเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์และพลาสโมเดียมโอวาเล ในระยะฮิพโนซอยต์หรือระยะพักในตับเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำกลับซ้ำ (44) กลไกการออกฤทธิ์ของยาไพริมาควินแบ่งออกเป็น ขั้นตอนที่ 1 ยาไพริมาควินจะถูกเปลี่ยนเป็นสารไฮดรอกซีเลตเมแทบอลิต์ (OH-PQm) ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมเชิงซัอนระหว่าง *cytochrome P450 reductase* และ *cytochrome P450 2D6* ในขั้นตอนที่ 2 สารไฮดรอกซีเลตเมแทบอลิต์จะถูกออกซิเดชันเป็นควิโนนิน (O=PQm) และสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกัน โดยที่ *cytochrome P450 reductase* ในคนจะได้รับอิเล็กตรอน 2 ตัวจาก NADPH และถ่ายโอนอิเล็กตรอน 1 ตัวอาศัยปัจจัยร่วมของ FAD/FMN ไปยังควิโนนินส่งผลให้ควิโนนินเปลี่ยนกลับไปเป็นสารไฮดรอกซีเลตเมแทบอลิต์ทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตับ ไชกระดูกและอื่น ๆ ซึ่งเชื้อมาลาเรียในบริเวณที่มีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกทำลาย (45) ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 กลไกการออกฤทธิ์ของยาไพราควิน โดยอาศัยเอนไซม์ในการเกิดเมแทบอลิซึม 2 ชนิด ได้แก่ *cytochrome P450 reductase* และ *cytochrome P450 2D6* ในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และทำลายเชื้อระยะฮิพโนซอยต์และแกมีโตไซต์ (45)

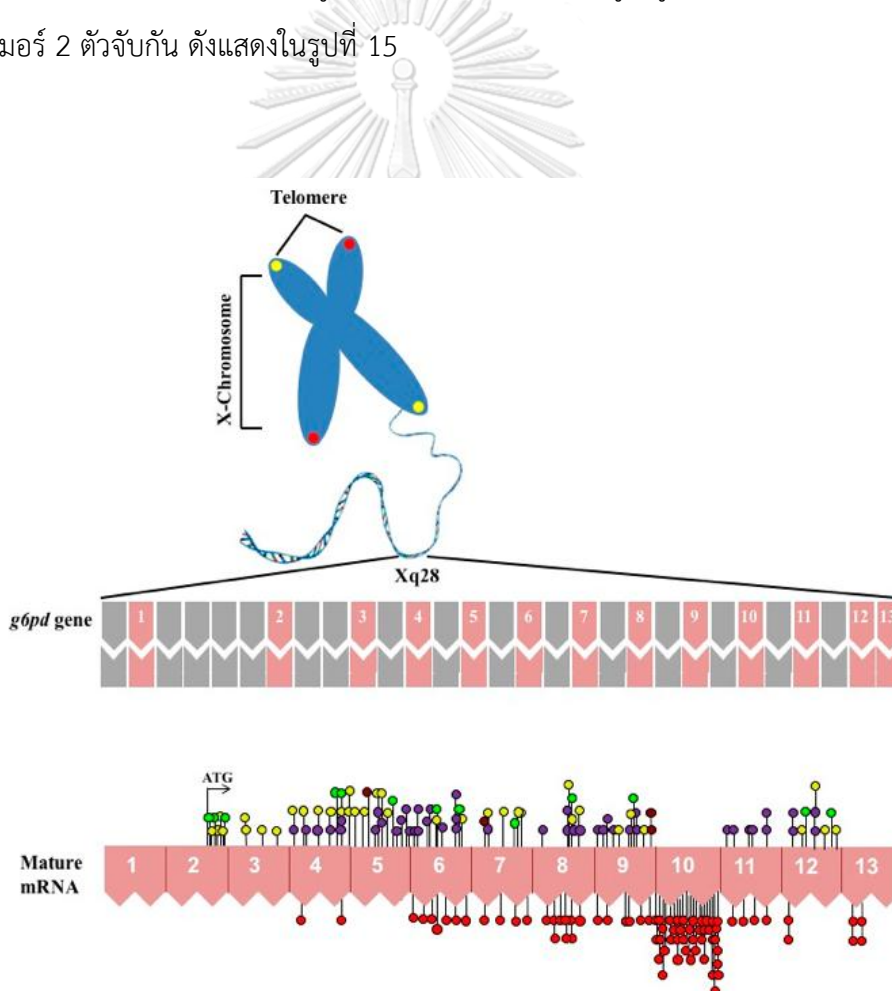
2.7 ผลข้างเคียงของยาไพราควินต่อผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

ยาไพราควินเป็นยามีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีความรู้ที่สามารถระบุขนาดยาที่เหมาะสมและไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยมาลาเรีย โดยเฉพาะผู้ป่วยมาลาเรียที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีร่วมด้วย เนื่องจากยาไพราควินมีคุณสมบัติในการเร่งการเกิดออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อภาวะโลหิตจางจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับระดับของภาวะพร่องเอนไซม์และชนิดของการกลายพันธุ์ ดังนั้นองค์กรอนามัยโลกจึงแนะนำวิธีการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียด้วยยาไพราควิน โดยให้การตรวจค่าการทำงานของเอนไซม์จีซิกพีดีและการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีก่อนการให้ยารักษา เนื่องจากผู้ป่วยแต่ละรายอาจจะทนต่อภาวะออกซิเดชันของยาได้ไม่เท่ากันจึง

จำเป็นต้องตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีเพื่อให้มั่นใจว่าผู้ป่วยมีการกลายพันธุ์ชนิดรุนแรงหรือไม่ (46)

2.8 ยีนจีซิกพีดี (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)

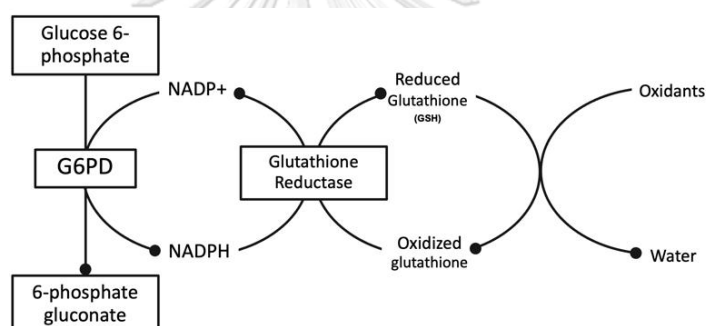
ยีนจีซิกพีดีเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์จีซิกพีดี อยู่บนโครโมโซม X ตำแหน่ง q28 มีความยาว 18.5 กิโลเบส ประกอบด้วย 13 exons และ 12 introns ส่วนยีนทั้งหมดที่เก็บรหัส (coding sequence) มีนิวคลีโอไทด์ 1548 เบสและสร้างเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 515 ตัว น้ำหนัก 59 กิโลดาลตัน รูปแบบที่พร้อมทำงานจะอยู่ในรูปแบบไดเมอร์ ซึ่งเกิดจากจีซิกพีดีโมโนเมอร์ 2 ตัวจับกัน ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 โครงสร้างของยีนจีซิกพีดีบนโครโมโซม X ตำแหน่ง q28 ประกอบด้วย 13 exons และ 12 introns (47)

2.9 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส หรือเอนไซม์จีซีจีพีดี

เอนไซม์จีซีจีพีดีเป็นเอนไซม์สำคัญต่อการรักษาสมดุลปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันภายในเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายและเม็ดเลือดแดง มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างพลังงานของน้ำตาลกลูโคส (pentose phosphate pathway; PPP) โดยเอนไซม์จีซีจีพีดีจะทำหน้าที่สร้างนิโคตินาไมด์ แอดีนินไดนิวคลีโอไทด์ (NADPH) ในรูปรีดิวซ์ด้วยการออกซิไดซ์กลูโคส 6-ฟอสเฟส (G6-P) เป็น 6-ฟอสโฟกลูโคโนแลคโตน (6-PG) นอกจากนี้เอนไซม์จีซีจีพีดียังทำงานร่วมกับเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GSR) และกลูตาไธโอนรีดักเตส (GR) ในการรีดิวซ์กลูตาไธโอนรูปออกซิไดซ์ (GSSG) ให้กลับมามีอยู่ในรูปรีดิวซ์ (GSH) อีกครั้งและกำจัดอนุมูลอิสระอื่นๆภายในเซลล์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้เป็นน้ำ (48) ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 กระบวนการทำงานของเอนไซม์จีซีจีพีดีทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน G-6P ให้เป็น 6-PG และเปลี่ยน NADP ให้เป็น NADPH ซึ่ง NADPH จะเปลี่ยน GSSG เป็น glutathione (48)

2.10 ภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดี

ภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีเป็นความผิดปกติที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโครโมโซม X มีการกลายพันธุ์ของยีนจีซีจีพีดี ถ่ายทอดแบบ X-linked recessive จึงพบความผิดปกติในเพศชาย (Hemizygous) มากกว่าเพศหญิง (Heterozygous หรือ Homozygous) ภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดีส่งผลให้โครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ลดลงทำให้เซลล์มีความไวต่อความเครียดจากออกซิเดชัน โดยปกติผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซีจีพีดี มักจะไม่แสดงอาการ แต่เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น เช่น การติดเชื้อหรือได้รับยาบางชนิดจะส่งผลให้มีอาการต่างๆ เช่น โลหิตจางเฉียบพลันจากเซลล์เม็ดเลือด

แดงแตก ดีซ่าน (48) ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้แบ่งความรุนแรงของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับความรุนแรงของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (WHO)

กลุ่ม	ความรุนแรงของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี
1	รุนแรงมาก มีปริมาณ G6PD น้อยกว่าร้อยละ 10 ของปกติ ร่วมกับภาวะซีดจากเม็ดเลือดแดงแตกแบบเรื้อรัง
2	รุนแรง มีปริมาณ G6PD น้อยกว่าร้อยละ 10 ของปกติ
3	รุนแรงปานกลาง มีปริมาณ G6PD น้อยกว่าร้อยละ 10 – 60 ของปกติ
4	ปกติ มีปริมาณ G6PD น้อยกว่าร้อยละ 60 - 150 ของปกติ
5	มากกว่าปกติ

2.11 อุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

บุญชัย บุญวัฒน์และคณะปีพ.ศ. 2564 ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีของเด็กในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 - 2561 พบการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ได้แก่ เวียงจันทร์ (871G>A) 47.2%, แคนตอน (1376G>T) 15.4%, ไคป์ปิง (1388G>A) 14.4%, มหิดล (487G>A) 8.6%, คิงยาน (392G>T) 3.8% ออเรส (143C>T) 1.9%, คิมบรา (592C>T) 1.9%, สงขลานครินทร์ (196T>A) 1.9%, ยูเนียน (1360C> T) 1.9%, วอลาโดลิด (406C>T) 1.9%, ไชนีส 5 (1024C>T) 1% และเมดิเตอร์เรเนียน (563C>T) 1% (49)

อุษา บุญยีนและคณะปีพ.ศ. 2564 ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย พบจีซิกพีดีมหิดล (487G>A) 94.92%, แคนตอน (1376G>T) 2.03%, เวียงจันทร์ (871G>A) 1.52% และไชนีส 5 (1024C>T) 0.51% (50)

ธัญชนก เขมมณีและคณะปีพ.ศ. 2565 ได้ศึกษาความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในผู้ป่วยมาลาเรีย ภาคใต้ของประเทศไทยย้อนหลัง 8 ปี ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2555 - 2562 พบจีซิกพีดีมหิดล (487G>A) 46.2%, เวียงจันทร์ (871G>A) 42.4%, ไคป์ปิง (1388G>A) 3.8% ยูเนียน (1360C>T) 3.8% และ เมดิเตอร์เรเนียน (563C>T) 3.8% (51)

ตารางที่ 5 การกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีที่พบในประเทศไทย (52)

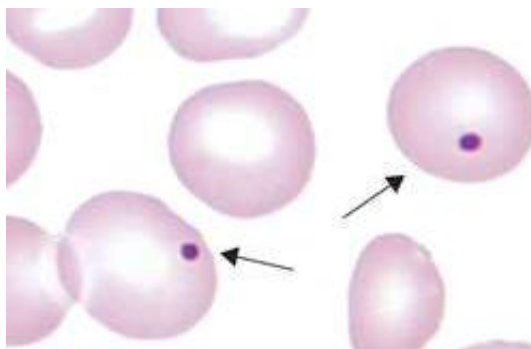
G6PD variant	cDNA Nucleotide Substitution	Genomic Nucleotide Substitution	Amino acid Substitution
Gaohe	95 A>G	95G	32 His > Arg
Chinese 4	392 G>T	10893T	131 Gly > Val
Mahidol	487 G>A	11658A	163 Gly > Ser
Chinese 3	493 A>G	11664G	165 Asn > Asp
Coimbra	592 C>T	11763T	198 Arg > Cys
Viangchan	871 G>A	13031A	291 Val > Met
Chinese 5	1024 C>T	13184T	342 Leu > Phe
Union	1360 C>T	13763T	454 Arg > Cys
Canton	1376 C>T	13884T	459 Arg > Leu
Kaiping	1388 G>A	13896A	463 Arg > His
Aures	143 T>C	10000C	48 Ile > Thr

2.12 การตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

การตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีสามารถทำได้โดยการตรวจวัดระดับเอนไซม์ในเซลล์เม็ดเลือดแดง วิธีการตรวจวัดแบ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณและวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

2.12.1 การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดเพื่อตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

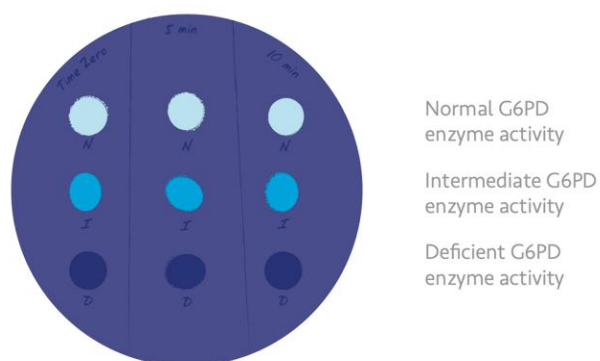
การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดวิเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต ดัชนีเม็ดเลือดแดง ปริมาณของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดและปริมาณเกล็ดเลือด ซึ่งผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะมีความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดไม่ต่างจากคนปกติ แต่ในกรณีที่มีการสัมผัสกับสารหรือปัจจัยที่ทำให้เกิดออกซิเดทีฟสเตรสหรืออนุมูลอิสระ (GSH) จะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นออกซิไดซ์กลูต้าไธโอน (GSSG) และจับกับฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ทำให้ฮีโมโกลบินไม่เสถียรและเสียสภาพตกตะกอนกลายเป็น Heinz body (53)



รูปที่ 17 ฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรและตกตะกอนอยู่ในเม็ดเลือดแดง Heinz body (ที่มา: medicine specifics)

2.12.2 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีด้วยการวิเคราะห์การเรืองแสง

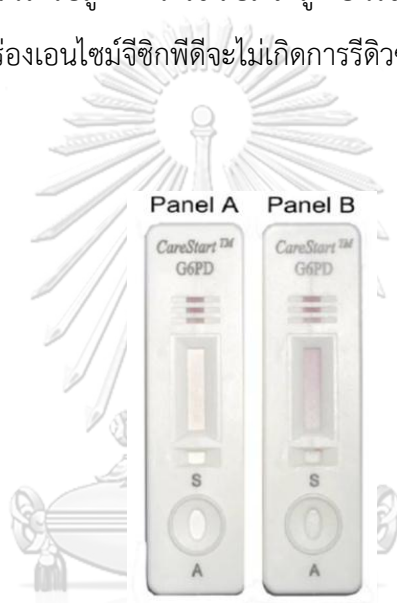
การตรวจวิเคราะห์การเรืองแสงเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตี โดยใช้กลูโคส 6-ฟอสเฟต (G6P) และนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (NADP+) เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา โดยคนปกติเอนไซม์จีซิกพีตีจะเปลี่ยนสารตั้งต้นกลูโคส 6-ฟอสเฟตเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนตและเปลี่ยน NADP+ เป็น NADPH ซึ่ง NADPH สามารถเรืองแสงได้ภายใต้แสงยูวี แต่ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีตีจะไม่พบการเรืองแสง เนื่องจากไม่สามารถเปลี่ยนกลูโคส 6-ฟอสเฟตให้เป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนตและเปลี่ยน NADP+ ให้เป็น NADPH ได้ (53)



รูปที่ 18 การแปลผลการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยการวิเคราะห์การเรืองแสงภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะไม่พบการเรืองแสง เอนไซม์จีซิกพีดีปกติจะพบการเรืองแสง (ที่มา: path.azureedge.net)

2.12.3 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยชุดทดสอบเร็ว (Rapid test)

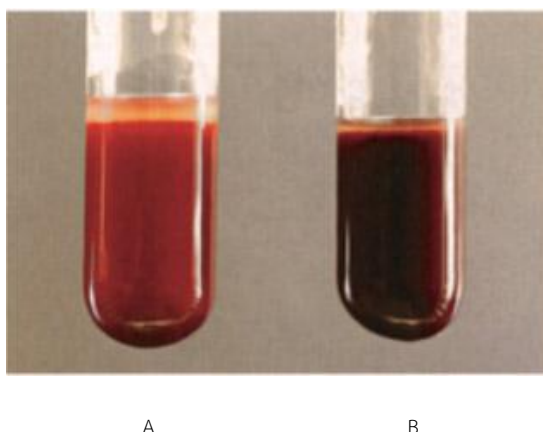
ชุดทดสอบเร็วเป็นการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีที่ให้ผลรวดเร็ว มีขั้นตอนการทดสอบค่อนข้างง่ายและเหมาะกับการตรวจภาคสนามหรือใช้ ณ จุดดูแลผู้ป่วย ซึ่งจะอ่านผลการทดสอบด้วยสีที่เกิดจากสารไนโตรบลูเตตราโซเลียมจะถูกเอนไซม์จีซิกพีดีรีดิวซ์เป็นฟอร์มazan ซึ่งมีสีม่วง แต่ถ้าผู้ป่วยมีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีจะไม่เกิดการรีดิวซ์และไม่เกิดสีม่วง (54)



รูปที่ 19 การอ่านผลชุดทดสอบเร็วในการตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (55) (A) พร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (B) เอนไซม์จีซิกพีดีปกติ

2.12.4 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยวิธีทดสอบเมธฮีโมโกลบินรีดักชัน

การทดสอบเมธฮีโมโกลบินรีดักชันเป็นการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี โดยไนโตรทจะเปลี่ยนฮีโมโกลบินเป็นเมธฮีโมโกลบินเกิดเป็นสีน้ำตาล จากนั้นเติมกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาวิถีเพนโตสฟอสเฟต ในคนปกติกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส 6-ฟอสเฟตและถูกเอนไซม์จีซิกพีดีเปลี่ยนเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนตจนได้ NADPH มีผลทำให้ NADPH สามารถรีดิวซ์เมธฮีโมโกลบินให้กลับเป็นฮีโมโกลบินที่มีสีแดงเหมือนเดิม แต่สำหรับผู้ที่มีการพร่องเอนไซม์ G6PD จะไม่มี NADPH เกิดขึ้นทำให้ไม่มีการรีดิวซ์เมธฮีโมโกลบินสารละลายจึงมีสีน้ำตาลเช่นเดิม (56)



รูปที่ 20 การอ่านผลปฏิกิริยาการทดสอบเมธฮีโมโกลบินรีดักชันในการตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดี (ที่มา: www.rcemlearning.nl) A) ปกติ B) พร่องเอนไซม์จีซิกพีดี

2.12.5 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีสามารถจำแนกชนิดได้ด้วยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีเพิ่มจำนวนของยีนที่ต้องการตรวจหา เกิดจากการทำปฏิกิริยาซ้ำกันหลาย ๆ รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ denaturation, annealing และ extension เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย ซึ่งได้นำพีซีอาร์พื้นฐานมาประยุกต์ใช้ได้แก่

2.12.5.1 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม

เจนิเฟอร์ ชูและคณะปีพ.ศ. 2557 ได้พัฒนา TaqMan probe (G202A และ A376G) สำหรับตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีในเลือดจากสายสะดือ โดยการทำพีซีอาร์ เริ่มจากการบ่ม 50°C 2 นาที initial denaturation 95 °C 10 นาที ตามด้วย 40 รอบของ denaturation 95 °C 15 วินาที, annealing 60 °C 1 นาที สำหรับ G202A และ 62 °C 1 นาที สำหรับ A376G พบว่าความถี่อัลลีลโดยรวมของ G202A เท่ากับ 0.13 และ A376G เท่ากับ 0.32 ซึ่งเป็นอีกหนึ่งเทคนิคสำหรับการตรวจหาเอนไซม์จีซิกพีดี (57)

2.12.5.2 การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม

อุษา บุญยืนและคณะปี พ.ศ. 2564 ได้พัฒนาเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม สำหรับ การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย โดย

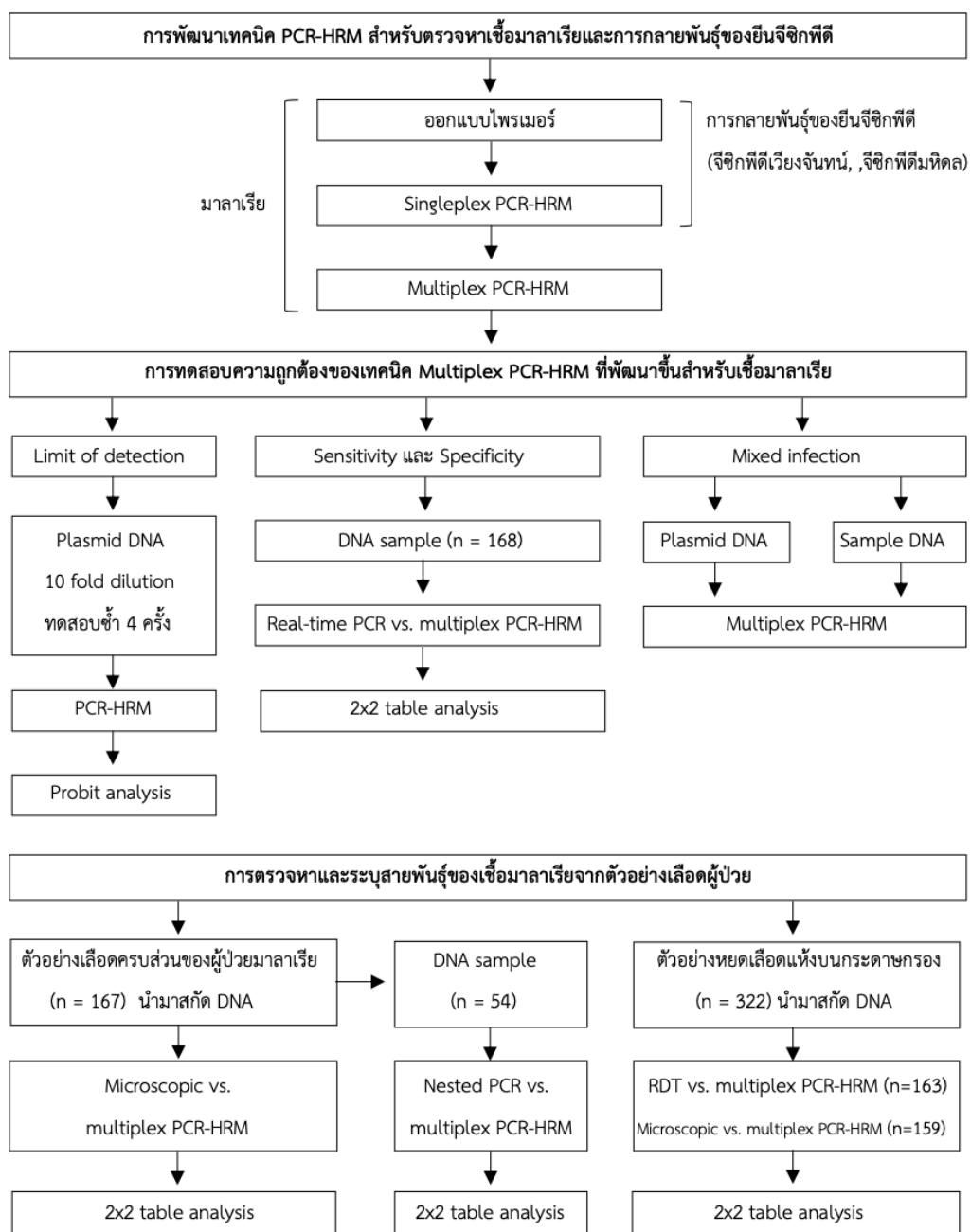
สามารถตรวจกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี 8 ชนิดได้พร้อมกันภายในปฏิกิริยาเดียวกัน ได้แก่ G6PD Gaohe (A95G), G6PD Chinese-4 (G392T), G6PD Mahidol (G487A), G6PD Viangchan (G871A), G6PD Chinese-5 (C1024T), G6PD Union (C1360T), G6PD Canton (G1376T) และ G6PD Kaiping (G1388A) โดยทำพีซีอาร์เริ่มจาก initial denaturation 95°C 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ denaturation 95°C 10 วินาที, annealing 63°C 30 วินาที และ extension 72°C 10 วินาที หลังจากนั้นเข้าสู่การวิเคราะห์เอชอาเอ็ม 75-90 °C โดยเพิ่มขึ้น 0.1°C / 2 sec พบว่ามีความไวเท่ากับ 100% (CI 95) และความจำเพาะเท่ากับ 100% (CI 95) (58)



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 แผนการดำเนินการวิจัย



3.2 เครื่องมือและน้ำยาสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) Q1600 Real-time PCR Bio-gener Company
- 2) *Mini Centrifuges* 4000rpm HuXi Benchtop, China
- 3) *Vortex* Mixers HuXi, China
- 4) Autopipette 0.5–10 ul HuXi, China
- 5) Autopipette 2-20 ul HuXi , China
- 6) Autopipette 20-200 ul HuXi, China
- 7) Autopipette 200-1000 ul HuXi, China
- 8) Micro Tips 10 ul CAPP Denmark, ExPell
- 9) Micro Tips 200 ul CAPP Denmark, ExPell
- 10) Micro Tips 1000 ul CAPP Denmark, ExPell
- 11) Microtube 15 ml CAPP Denmark, ExPell
- 12) Microtube 0.5 ml CAPP Denmark, ExPell
- 13) Heat box HuXi LCD Digital Labotary, USA
- 14) Microcentrifuge Thermo Fisher Scientific, USA
- 15) Gel electrophoresis system Mupid-EXU, Japan
- 16) UV Transilluminator Bio-Rad, USA

17) เครื่องชั่งสาร

Mettler Toledo, Thailand

3.2.2 น้ำยาและสารเคมี

1) Hot start PCR

Apsalagen

2) Midori **Green** Xtra

Nippon Genetics, Europe

3) F/R Primer *P. falciparum*

Bio basic inc, Canada

4) F/R Primer *P. vivax*

Bio basic inc, Canada

5) F/R Primer *P. ovale*

Bio basic inc, Canada

6) F/R Primer *P. malariae*

Bio basic inc, Canada

7) F/R Primer *P. knowlesi*

Bio basic inc, Canada

8) F/R Primer genus *Plasmodium*

Bio basic inc, Canada

9) F/R Primer internal control

Bio basic inc, Canada

10) F/R universal primer

Bio basic inc, Canada

11) Plasmid *P. falciparum*

BBI Life Sciences, China

12) Plasmid *P. vivax*

BBI Life Sciences, China

13) Plasmid *P. ovale*

BBI Life Sciences, China

14) Plasmid *P. malariae*

BBI Life Sciences, China

15) Plasmid *P. knowlesi*

BBI Life Sciences, China

16) Plasmid genus *Plasmodium*

BBI Life Sciences, China

17) Plasmid internal control

BBI Life Sciences, China

18) Distilled water	
19) Oil miracle	
20) GenElute Blood Genomic DNA kit	Sigma-Aldrich
21) Agarose	SERVA, Germany
22) 10X TBE buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
23) 10X Buffer	Vivantis, Malaysia
24) 50mM MgCl ₂	Vivantis, Malaysia
25) 10mM dNTPs	Rabbit Biotech, Germany
26) 10 µM rPLU1	Bio-Basic, Canada
27) 10 µM rPLU5	Bio-Basic, Canada
28) 10 µM rPLU6	Bio-Basic, Canada
29) 10 µM rVIV1	Bio-Basic, Canada
30) 10 µM rVIV2	Bio-Basic, Canada
31) 10 µM rFAL1	Bio-Basic, Canada
32) 10 µM rFAL2	Bio-Basic, Canada
33) 10 µM rOVA1	Bio-Basic, Canada
34) 10 µM rOVA2	Bio-Basic, Canada
35) 10 µM rMAL1	Bio-Basic, Canada

- | | |
|-----------------------|---------------------------------|
| 36) 10 μ M rMAL2 | Bio-Basic,Canada |
| 37) 10 μ M Pmk8 | Bio-Basic,Canada |
| 38) 10 μ M Pmk9 | Bio-Basic,Canada |
| 39) Taq polymerase 5U | A.N.B.laboratories.co, Thailand |
| 40) SERVA DNA stain G | SERVA, Germany |
| 41) DNA Loading Dye | Biotechrabbit, Germany |
| 42) OneMARK 100 RTU | Bio-helix, China |



3.3 ขนาดตัวอย่างของเชื้อมาลาเรีย

การคำนวณขนาดตัวอย่างเชื้อมาลาเรียอ้างอิงจากผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลก โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ปี พ.ศ. 2564 รายงานผลจากประชากรทั่วโลก 7,300 ล้านราย พบว่ามีผู้ติดเชื้อมาลาเรีย 247 ล้านรายและเสียชีวิต 627,000 รายคิดเป็นร้อยละ 3 และคำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้สูตรดังนี้

$$n = \frac{Z^2 PQ}{d^2}$$

เมื่อ	Z^2	แทน	ความเชื่อมั่นที่กำหนด
	P	แทน	สัดส่วนหรือความชุกที่สนใจ (จากข้อมูลในอดีต)
	Q	แทน	1- P
	d	แทน	ค่าความแม่นยำในการประมาณ
	n	แทน	จำนวนประชากรหรือขนาดตัวอย่าง
แทนค่า	$n = \frac{(1.96)^2 (0.03) (1-0.03)}{(0.03)^2}$		
	= 125 ตัวอย่าง		

เพื่อความสมบูรณ์และผลการศึกษาวิจัยที่น่าเชื่อถือ จากการคำนวณขนาดตัวอย่างอ้างอิงจากอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียพบว่าจำนวนตัวอย่างเชื้อมาลาเรียเท่ากับ 125 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากการระบาดของโรคในแต่ละช่วงเวลานั้นขึ้นอยู่กับหลากหลายปัจจัย เช่น ฤดูกาล สภาพอากาศในแต่ละพื้นที่ เป็นต้น ซึ่งอาจส่งผลต่อจำนวนตัวอย่างในช่วงที่ทำการศึกษาวิจัย

3.4 แหล่งที่มาของตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มเพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ทั้ง 5 สปีชีส์ ซึ่งได้รับการสนับสนุนตัวอย่างเชื้อมาลาเรียสำหรับการวิจัย ได้แก่ ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียจากหน่วยวิจัยโรคเขตร้อนคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวนทั้งหมด 66 ตัวอย่าง ประกอบด้วย พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม 20 ตัวอย่าง, พลาสโมเดียมไวแวกซ์ 30 ตัวอย่าง, พลาสโมเดียมโอวาล 3 ตัวอย่าง, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี 3 ตัวอย่าง, พลาสโมเดียมโนโซ 10 ตัวอย่างและตัวอย่างของผู้ไม่ติดเชื้อมาลาเรีย 102 ตัวอย่าง นอกจากนี้ได้รับตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียที่ตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์และชุดทดสอบเร็วจากโรงพยาบาลสถานพระบารมี จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 167 ตัวอย่างและได้รับตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองจากประชากรในบางพื้นที่ของจังหวัดตากจำนวน 163 ตัวอย่างและจังหวัดศรีสะเกษจำนวน 159 ตัวอย่าง

3.5 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.1 การย้อมฟิล์มเลือดชนิดบาง

นำฟิล์มเลือดที่แห้งแล้วมาย้อมสียิมซ่า โดยหยดสีให้ท่วมแผ่นฟิล์มเลือดนาน 10 นาที จากนั้นหยดสารละลายบัพเฟอร์และใช้ลูกยางเป่าเพื่อช่วยให้บัพเฟอร์ผสมเข้ากันกับสีย้อมนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาใช้น้ำสะอาดล้างสียิมซ่าออกให้หมด เช็ดด้านหลังสไลด์ให้สะอาดเป่าลมให้แห้งและนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5.2 การนับจำนวนเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นับจำนวนเชื้อมาลาเรียจบนับเม็ดเลือดขาวได้ 200 เซลล์ และคำนวณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียต่อเลือด 1 ไมโครลิตร หากนับจำนวนเชื้อต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัวได้น้อยกว่า 100 ตัวต้องนับต่อจนได้จำนวนเม็ดเลือดขาว 500 เซลล์ โดยมีสูตรคำนวณหาความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียดังนี้

$$\text{Parasitemia}/\mu\text{l} = \frac{\text{จำนวนเชื้อมาลาเรียที่นับได้}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับ}} \times 8000 \text{ WBC}/\mu\text{l}$$

โดยองค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ค่าเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดขาว 8,000 เซลล์ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร (WHO, 2010) ซึ่งค่าเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดขาว 8,000 คือค่าสมมติฐานของเม็ดเลือดขาวที่ได้มาจากช่วงของค่าอ้างอิง 5,000-10,000 เซลล์ต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร (59)

3.6 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood)

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดครบส่วนด้วยชุดสกัด QIAamp blood mini kit (QIAGEN) โดยนำเลือด 200 μ l เติม QIAGEN protease 20 μ l ตามด้วย buffer AL 200 μ l ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 56°C 10 นาที และเติมเอทานอล (95-100 %) 200 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่น 6,000 \times g นาน 1 นาที แล้วทิ้งน้ำส่วนใสที่ผ่าน spin column จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AW1 500 μ l นำไปปั่น 6,000 \times g นาน 1 นาที แล้วทิ้งน้ำส่วนใสที่ผ่าน spin column หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AW2 500 μ l นำไปปั่น 20,000 \times g นาน 3 นาที แล้วทิ้งน้ำส่วนใสที่ผ่าน spin column และทำการชะดีเอ็นเอออกจาก spin column โดยเติมบัฟเฟอร์ AE 200 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่น 6,000 \times g นาน 1 นาที และนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ 4 °C

3.6.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง (dried blood spot)

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) โดยเริ่มจากการตัดหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติมบัฟเฟอร์ ATL 180 μ l และ Proteinase K 20 μ l ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 56 °C นาน 1-3 ชั่วโมง จนเกิด lysed สมบูรณ์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AL 200 μ l ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 70 °C นาน 10 นาที ตามด้วยการเติมเอทานอล (95-100 %) 200 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสาร mixture ทั้งหมดลงใน spin column นำไปปั่น 6,000 \times g นาน 1 นาที แล้วทิ้งน้ำส่วนใสที่ผ่าน spin column จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AW1 500 μ l นำไปปั่น 6,000 \times g นาน 1 นาที แล้วทิ้งน้ำส่วนใสที่ผ่าน spin column หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AW2 500 μ l นำไปปั่น 20,000 \times g นาน 3 นาที แล้วทิ้งน้ำส่วนใสที่ผ่าน spin column และทำการชะดีเอ็นเอออกจาก spin column โดยเติม บัฟเฟอร์ AE 200 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่น 6,000 \times g นาน 1 นาที และนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ 4 °C

3.7 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น

3.7.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเชื้อมาลาเรียทุกสปีชีส์ใหม่ โดยใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล *NCBI* ที่มีการอัปเดต ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับพลาสมิดเดียวมาลาเรียอีและจีโนมพลาสมิดเดียวได้รับการออกแบบจากยีน *18S rRNA* และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับพลาสมิดเดียวโนโซ, พลาสมิดเดียวโอวาเล, พลาสมิดเดียวฟัลซิพารัมและพลาสมิดเดียวไวแวกซ์ได้รับการออกแบบจากยีน *cytochrome b* โดยนำข้อมูลที่ได้มา alignment ด้วยโปรแกรม Bioedit software version 7.2.5 และออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer design tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) และทำนายอุณหภูมิหลอมเหลวของไพรเมอร์แต่ละสปีชีส์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม uMelt Quartz ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ไพรเมอร์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์สำหรับเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม

Primer	Gene	Sequence (5'-3')	Tm
<i>P. knowlesi</i>	<i>Cyt b</i>	F – TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAtattattattaAGTTATT	78 °C
		GGGGTGCAACTATC	
		R – CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTatattaataataatGTATA	
		TCCT CCACATAACCAAGTG	
<i>P. ovale</i>	<i>Cyt b</i>	F – TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTACTAATTTATTATCTTCAA	79 °C
		TTCCAACC	
		R – CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTCAATACATAATGCAACRA	
		ATGGAGGA	
<i>P. malariae</i>	<i>18s rRNA</i>	F – TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAttattGAAATCTTAGATT	81 °C
		TTCTGGAGACGAT	
		R – CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTCTCATAAGGTAAGG	
		AAACT	
<i>P. falciparum</i>	<i>Cyt b</i>	F – TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAgcgTAACTGCTTTCGTTG	82 °C
		GTTATATC	
		R – CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTgcgctgcggTACAATACAT	
		AATCCAATAAATGGTGAG	

<i>P. vivax</i>	<i>Cyt b</i>	F - TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAgcgcggtgcggcgAATATT CAGTACCAATGATATGGCTC R - CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTgcggtgcggcgCCATATA AAATAAAATATCTTGTGGTAC	84 °C
genus <i>Plasmodium</i>	<i>18s rRNA</i>	F - TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAgccgtgcggcgGCTTAAT TTGACTCAACACGGG R - CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTgccgtgcggcgAAAAAC GGCCATGCATCACCAT	85 °C
Internal control	<i>16s rRNA</i>	F - TCGATAATCACGGGTCGCGGGTTAgtcgCTCACCAAGGC GACGATCGGTA R - CGATTGTAAGCACGATCGCCCGTTCAATCCGAAGACCTT CATCGTTAC	88 °C

3.7.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีจากยีนจีซิกพีดีจะใช้ข้อมูลจากงานวิจัยที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อการกลายพันธุ์แต่ละชนิดและได้ทำการ modification ของไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะมากขึ้น จากนั้นทำนายอุณหภูมิหลอมเหลวด้วยโปรแกรม uMelt Quartz ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ของการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีสำหรับเทคนิคพีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม

Primer	Location	Sequence (5'- 3')	Tm
G6PD viangchan	Exon 9 (G->A)	F - TTGGCTTTCTCTCAGGTCAGGA R - CCCAGGACCACATTGTTGGC	87 °C
G6PD mahidol	Exon 6 (G->A)	F - CTCCGGGCTCCCAGCAAAA R - TGTGGTTGGACAGCCGGTCA	89 °C
Human	Beta-actin gene	F - ACTGGCATCGTGATGGACTC R - CTTTCATGAGGTAGTCAGTCAGG	90 °C
Internal control		F - TCAGGCGTCGACGGAAGACTC R - TCGGCCATCGTACAACGCATCTAT	86 °C

3.8 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับเชื่อมาลาเรียและการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ พลาสโมเดียมโนไซ, พลาสโมเดียมโอวาเล, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, จีโนมพลาสโมเดียมและ internal control และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์, จีซิกพีดีมิดดิล, ยีนจีซิกพีดีปกติ (ไม่มีการกลายพันธุ์) และ *internal control* เพื่อส่งสังเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นการสังเคราะห์ใน pUC57 vector ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 พลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับเชื่อมาลาเรีย

Plasmid	Sequence (5'-3')	ขนาด
<i>P. knowlesi</i>	ATCTCTTGATTTTTATTAACCTATTTACATATTTTAAGAGGATTAAATTATTCATATTTATATCTACCATTCATG GATATCAGGATTAAATCATATTTGCATTATTTATAGTTACAGCTTTATAGGTTATGTTTTACCTGGGGACAAATGA GTTATTGGGGTGCAACTGTCATAACTAATTTATTATCTTCAATTCAGTATTAGTCATTTGGTTATGTGGAGGATAT ACAGTAAGTGATCCAACAATTAAGATTTTTGTATTACATTTTATACCTCTTTGTAGCATTATGTATTGTATTT ATACATATATTTCTTTTACATTTACATGGTAGCACTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCCTCTA TCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAAAGGATTTAATAATATATTTATATTATCTTATTACAAAGTATTTTTGGTAT AATCCATTATCTCATCCAGATAATGCTATATTAG	500 bp
<i>P. ovale</i>	TTTTCTTAACTTATCTACATATTTTAAGAGGATTAAATTTATCTTATTTATATTTACCTTTATCATGGATACAGGT TTAATTATATTTGCATTATTTATAGTAAGTCATTTATGGATATGTATTACCTGGGGACAAATGAGTTATTGGGG TGCAACTGTTATTACTAATTTATTATCTTCAATTCAGCCTTAGTTATATGGTTATGTGGAGGATATACTGTTAGTG ATCCAACATTAAGATTTTCGTACTACATTTTATCTTCCATTTGTTGCATTATGTATTGTATTATACATATAT TCTTCTTACATTTACATGGTAGCACAATCCTTTAGGGTATGATACAGCATTAAAAATACCCCTCTATCCAATCTA TTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAATATCTTTATATTATTTTATTACAAAGTTTATTGGAATAATACCATTA TCTCATCCAGATAATGCAATTATTGTTAATACATA	500 bp
<i>P. malariae</i>	AAACAGTTAAACAGTTTCTGTGTTTGAATACTACAGCATGGAATAACAAATTGAACAAGTCAGAAATTTGTTCTT TTTTCTTATTTGGCTTAGTTACGATTAATAGGAGTAGCTTGGGGCATTGTATTAGATGTCAGAGGTGAAATTC TTAGATTTTCTGGAGACAATCAACTGCGAAAGCATTTGCCTAAAATACTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGG AGTGAAGACGATCAGATACCGTCGTAATCTTAACCATAAATATGCCGACTAGGTGTTGGATGATAGAGTAAAAA TAAAAGGACATTATATATATGAGTGTTTCTTTAGATAGCTTCTTCTTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTG GGTTCTGGGGCGAGTATTGCGCAAGCGAGAAAGTTAAAGAATTGACGGAAGGGCACCACAGGCGTGGAGCTT GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACTAGTTTA	500 bp
<i>P. falciparum</i>	ATGGAGTGGATGGTGTTTATAGATACATGCACGAACAGGTGCTTCTCTGTATTTTATTAACATATCTTCATATTT TAAGAGGATTAAATTAATCATATATGTATTACCATTCATGGATATCTGGATTGATTTTATTTATGATATTTATTG TAACTGCTTTCGTTGGTTATGCTTACCATGGGGTCAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGAATTAATACTTGTGA TCCTCTATTCCAGTAGCAGTAATTTGGATATGTGGAGGATATACTGTGAGTGATCCTACAATAAACGATTTTTGT ACTACATTTTATCTTACCATTTTATGGATTATGTATTGTATTATACATATATTTTCTTACATTTACATGGTAGCAC AAATCCTTTAGGGTATGATACAGCATTAAAAATACCCCTTTTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTAAAGGATTTA	500 bp

	ATAATGTTATAATTTTATTCTAATACAAAGTTTAT	
<i>P. vivax</i>	ATAATCCATTATCTCATCCAGATAATGCTATATTAGTTAATACATATGTTACCAATTCAAATTGTTCTGAATG GTACTTTTACCATTTTATGCAATGTTAAAAACAATACCTAGTAAACAGCAGGTTTATTAAATGTTTATGATCTT TACAATTATTATTTTATTAGCTGAACAAAGAAGTTAACTACTATAATACAATTTAAAATGACATTTGGTGCTAGA GAATATTCAGTACCAATGATATGGTTCATGTGTCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAGTTACCACAAGA TATTTTATTTTATATGGTCGTTTATTATAATATCATTCTCTCTAGTGGATTATTGCACTTGTTCAATTATAAAG AACACATTATGATTACAGCTCCCAAGCAACATTTAAATTACAAGGCTACGATAAGACGATATCTCTGAATATTGAG CAGAACAATACAGACCGTAAGGTTATAATTATGTTAA	500 bp
Genus <i>Plasmodium</i>	ACTATACCGACTAGGTGTTGGATGAATATAAAAAATATATAAATATGTAGCATTCTTAGGGAATGTTGATTTTATA TTAGAATTGCTTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGCTTTTGGGTTCTGGGGCAGATATTCGCGCAAGCGAGA AAGTTAAAGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGAGCTTGC GGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTC ACTAGTTTAAGACAAGAGTAGGATTGACAGATTAATAGCTCTTCTTGATTCTTGATGTTGATGATGCGCGTTT TTAGTTCGTGAATATGATTGTCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGATCTTAACCTGCTAATTAGCGGTAAAGTACA CTATATTTTATTTGAAATTGAATATAGGTAATTATACATGTTTATTCAAGTGTCAAATTAGGATATTTTATTATTA AATATTCTTTCCCTGTTCTACTATAATAATTGTTTTT	500 bp

ตารางที่ 9 พลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับการกลายพันธุ์ยีนจีซีพีดี

Plasmid	Sequence (5'-3')	ขนาด
G6PD Viangchan	TGTTTCATCAGATAGACTCGAGATGGACAGGGTGGTCTGGAGGGCTCTCAGGGAGGGGCCCTGAGCTGGGCTCT GGCAGGGTGAGCAGAGCCAAGCAGGGGCTCTCTGCTGAGGGCTGCACATCTGTGGCCACAGTCATCCCTGCA CCCCAACTCAACACCAAGGAGCCATTCTCTCCCTTGGCTTTCTCTCAGGTCAAGATGTTGAAATGCATCTCAGAGG TGCAGGCCAACAATGTGGTCTGGGCCAGTACGTGGGAACCCGATGGAGAGGGCAGGGCCACCAAGGGTACCTG GACGACCCACGGTGCCCCGGGTCCACCACCGCCACTTTTGACGCGCTGCTCCTATGTGGAGAATGAGAGGTG GGATGGTAGGTGATGCTTCGAGGCCAGCAAGGCAGAACTGGGCATGCCCTGTGTGCGGCACTGGAGCTCCCACT GAGACACTACGCACTGGTCCACACCCTGAGAGAGCT	500 bp
G6PD Mahidol	CATGCCAGCAATGCCACCTGGCACCCAGGGTGGGAAGGCTTCCGGAAGGTGTTGAGCCAGAGGGTCATCTGGGAA CACAAGGCACGGAGGTGGCCACGGGGGCGAGGAGTTCTGGCTCTACTCCCCTGGGAGGGCGTCTGAATGATGCA GCTCTGATCTCACTCCCCGAAGAGGGTTCAAGGGGGTAACGCAGCTCCGGGCTCCAGCAGAAGCTGGAACCGCA TCATCGTGGAGAAGCCCTTCGGGAGGGACCTGCAGAGCTCTGACCGGCTGTCCAACCACATCTTCTCCCTGTCCGTG AGGACCAGATCTACCGCATCGACCACTACCTGGGCAAGGAGATGGTGCAGAACCTCATGGTGCTGAGTGGGGCCAA GCCTGGGCCGGGGACCAGGTGGGGTGGTACTCAGGAGCCTCACTGGCCCACTGCCTCCCCGAGGACGAATTCC TCCAGAACTCAGACAAGGGTGACCCCTCACATGTGGC	500 bp
Human	AATGAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCGCTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGCGA GAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCAGCCATGACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTA CGCCTCTGGCCGTACCACTGGCATCGTATGGAATCCGGTGACGGGTCAACCACTGTGCCATCTACGAGGGT ATGCCCTCCCCATGCCATCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGACCTGACTGACTACCTCATGAAGATCTCACCG AGCGCGGTACAGCTTCAACACCACGGCCGAGCGGAAATCGTGCCTGACATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGCC CTGGAATTCGAGCAAGAGATGGCCACGGTGTCTCCAGCTCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCTGACGGCCA GGTCATCACCATTTGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCC	500 bp
Internal control	TCAGGCGTCGACGGAAGACTCAAAATAGATGCGTTGTACGATGGCCGA	48 bp

3.9 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็มสำหรับเชื้อมาลาเรียและการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี

3.9.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับเชื้อมาลาเรียทุกสปีชีส์ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอเป็นแม่แบบดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย ส่วนประกอบในแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 20 μ L ประกอบด้วย 0.65X Hotstart PCR Master mix (Apsalagen co.ltd., Thailand), 0.25 μ M forward primer, 0.25 μ M reverse primer, Midori **Green** Xtra 0.5 μ L, DNA 1 μ L และเติมน้ำให้ปริมาตรรวม 20 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยใช้สภาวะ initial denature 95°C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 35 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 60°C 30 วินาที และ extension 72°C 30 วินาทีและ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย HRM โดยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 75°C จนถึง 95°C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.3°C ทุก 10 วินาที

3.9.2 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีเวียงจันทน์และมทิดล โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอแม่แบบของการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดี ส่วนประกอบในแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 20 μ L ประกอบด้วย 0.5X Hotstart PCR Master mix (Apsalagen co.ltd., Thailand), 0.25 μ M forward primer, 0.25 μ M reverse primer, Midori **Green** Xtra 0.5 μ L, DNA 1 μ L และน้ำ 11 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยใช้สภาวะ initial denature 95°C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 35 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 60°C 30 วินาที และ extension 72°C 30 วินาทีและ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย HRM โดยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 75°C จนถึง 95°C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.3°C ต่อหนึ่งวินาที

3.10 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาและระบุปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ปริมาตรของสาร อุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยา เป็นต้น โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอความเข้มข้น 1000 copies/ μ L เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยเตรียมไพรเมอร์มิกซ์ประกอบด้วย 86.4 nM F/R-พลาสมิดเดียวโอวาเล, 86.4 nM F/R- พลาสมิดเดียวมาลาเรียอี, 52.8 nM F/R- พลาสมิดเดียวฟลชีปารัม, 86.4 nM F/R- พลาสมิดเดียวไวแวกซ์ , 86.4 nM F/R- พลาสมิดเดียวโนไซ, 201.6 nM F/R- จีโนสพลาสมิดเดียว, 52.8 nM F/R- internal control และน้ำ 22.8 μ L จากนั้นเตรียมมาสเตอร์มิกซ์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 25 μ L ประกอบด้วย 0.64X Hotstart PCR Master mix (Apsalagen co.ltd., Thailand), ไพรเมอร์มิกซ์ 6 μ L, 0.02 μ M F/R- ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์, plasmid internal control (100,000 copies/ μ L) 2.5 μ L, Midori *Green* Xtra 1 μ L, DNA 3 μ L และน้ำ 3.5 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยใช้สภาวะ initial denature 95°C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 37 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, ทดสอบอุณหภูมิของ annealing ระหว่าง 55-60°C 45 วินาที และ extension 72°C 30 วินาที ต่อด้วย 13 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 65°C 30 วินาที และ extension 72°C 30 วินาที และ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเอชอาร์เอ็มโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ตั้งแต่ 75°C จนถึง 95 °C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.3°C ต่อหนึ่งวินาที

3.11 การทดสอบหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้ของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น

การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ โดยนำมาเจือจางความเข้มข้น (10 fold dilution) ตั้งแต่ 100,000, 10,000, 1,000, 100, 10, 1 และ 0.1 copies/ μ L เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทดสอบหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มโดยทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Probit analysis SPSS version 28 เพื่อดูค่าความน่าจะเป็นที่ 95% ของปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้

3.12 การทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาสปิชีส์ของเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

การทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรียและตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติที่ได้รับการตรวจยืนยันด้วยเทคนิค เรียลไทม์พีซีอาร์เพื่อใช้เป็นเทคนิคอ้างอิงในการทดสอบความไวและความจำเพาะเปรียบเทียบกับเทคนิคที่พัฒนาขึ้น (60, 61) จำนวนทั้งหมด 168 ตัวอย่างมาทำการทดสอบด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นและนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความไวและความจำเพาะเปรียบเทียบกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ โดยใช้สูตร 2x2 table ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ตารางในการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะ

		Real-time PCR	
		Positive	Negative
Multiplex PCR-HRM	Positive	True positive (TP)	False positive (FP)
	Negative	False negative (FN)	True negative (TN)

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False negative}} \times 100$$

$$\text{Specificity} = \frac{\text{True negative}}{\text{True negative} + \text{False positive}} \times 100$$

$$\% \text{ Accuracy} = \frac{\text{True positive} + \text{True negative}}{\text{True positive} + \text{False negative} + \text{True negative} + \text{False negative}} \times 100$$

3.13 การทดสอบความสามารถของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมของผู้ป่วยมาลาเรีย

3.13.1 การทดสอบเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยพลาสมิดีเอ็นเอ

การเตรียมตัวอย่างเชื้อมาลาเรียแบบผสม โดยใช้พลาสมิดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียที่มีความเข้มข้น 1,000 copies/ μ L ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโอวาเล, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมโนโซ, จินัสพลาสโมเดียมและ internal control ผสมกัน จากนั้นนำมาทำการทดสอบด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มเพื่อทดสอบดูความสามารถในการตรวจเชื้อมาลาเรียแบบผสม

3.13.2 การทดสอบเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรีย

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรียที่ทราบความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ โดยทำการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอแบบผสมของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ที่ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียต่างกัน ได้แก่ 1000:1000, 1000:100, 1000:10, 1000:1 parasites/ μ L และตัวอย่างดีเอ็นเอแบบผสมของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ที่ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ 1000:1000, 100:1000, 10:1000, 1:1000 parasites/ μ L โดยทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง

3.14 การตรวจหาและระบุปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียจากโรงพยาบาลสถานพระบารมี จังหวัดกาญจนบุรี ด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น

ตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 167 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์และชุดทดสอบเร็ว นำตัวอย่างเลือดมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม จากนั้นวิเคราะห์ผลความไวและความจำเพาะเปรียบเทียบกับกล้องจุลทรรศน์ด้วยสูตร 2x2 table

จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 54 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยเทคนิคเนสต์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็มเพื่อวิเคราะห์ผลความไวและความจำเพาะเปรียบเทียบกับเทคนิคที่พัฒนาขึ้นด้วยสูตร 2x2 table

สำหรับเทคนิคเนสต์พีซีอาร์ได้อ้างอิงโปรแกรมของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโอวาเลและพลาสโมเดียมไวแวกซ์จากงานวิจัยของ Georges Snounou และอ้างอิงโปรแกรมของเชื้อพลาสโมเดียมโนโซจากงานวิจัยของ Fread Anderios ปีพ.ศ. 2551 ดังแสดงในตารางที่ 10 และ 11 ตามลำดับ ในปฏิกิริยาชุดที่ 1 (nest 1) ใช้โปรแกรม rPLU1 และ rPLU 5 สำหรับเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโอวาเล และพลาสโมเดียมไวแวกซ์ และใช้โปรแกรม rPLU6 และ rPLU 5 สำหรับเชื้อพลาสโมเดียมโนโซ โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 1X buffer PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.25 µM forward primer, 0.25 µM reverse primer, 0.05 Unit taq polymerase, DNA 2 µL และ น้ำ 13.8 µL นำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) ใช้สภาวะ initial denature 94 °C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 25 รอบของ denature 94 °C 30 วินาที, annealing 58 °C 30 วินาที และ extension 72 °C 45 วินาที ต่อด้วย final extension 72 °C 7 นาที 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์จากปฏิกิริยาชุดที่ 1 มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาชุดที่ 2 (nest 2) โดยใช้โปรแกรมที่จำเพาะกับเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 1X buffer PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.25 µM forward primer, 0.25 µM reverse primer, 0.05 Unit taq polymerase, DNA 2 µL และน้ำ 13.8 µL จากนั้นนำเข้าเครื่อง Q1600 Real-time PCR (Bio-gener) โดยใช้สภาวะ initial denature 94 °C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 30 รอบของ denature 94 °C 30 วินาที, annealing 64 °C (rFAL1,rFAL2 และ rVIV1,rVIV2), 64 °C (rOVA1,rOVA2 และ rMAL1,rMAL2) และ 55 °C (Pmk8,Pmk9) 30 วินาที และ extension 72 °C 45 วินาที ตามด้วย final extension 72 °C 7 นาที 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยารอบที่ 2 มาวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง UV transilluminator

ตารางที่ 11 ไพรเมอร์สำหรับเทคนิคเนสต์พีซีอาร์ในการตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโอวาเลและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ (Georges Snounou)

Cycle	Species	Primers	Sequences (5' - 3')	Sizes (bp)
Nest 1	<i>Plasmodium</i> sp.	rPLU1	TCAAAgATTAAgCCATgCAAgtgA	1,700
		rPLU5	CCTgTTgTTgCCTTAACTTC	
Nest 2	<i>P. vivax</i>	rVIV1	CgCTTCTAgCTTAATCCACATAACTgATAC	120
		rVIV2	ACTTCCAAgCCgAAgCAAAgAAAgtCCTTA	
	<i>P. falciparum</i>	rFAL1	TTAAACTggTTTgggAAAACCAAATATATT	205
		rFAL2	ACACAATgAACTCAATCATgACTACCCgTC	
	<i>P. ovale</i>	rOVA1	ATCTCTTTgCTATTTTAgTATTggAgA	800
		rOVA2	ggAAAAggACACATTAATTgTATCCTAAT	
	<i>P. malariae</i>	rMAL1	ATAACATAgTTgTACgTTAAgAATAACCGC	144
		rMAL2	AAAATTCCCATgCATAAAAAATTATACAAA	

ตารางที่ 12 ไพรเมอร์สำหรับการตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมโนโซด้วยวิธีเนสต์พีซีอาร์ (Fread Anderios ปีพ.ศ. 2551)

Cycles	Species	Primers	Sequences (5' - 3')	Sizes (bp)
Nest 1	<i>Plasmodium</i> sp.	rPLU6	TTAAATTTgTTgCAgTTAAACg	1,200
		rPLU5	CCTgTTgTTgCCTTAACTTC	
Nest 2	<i>P. knowlesi</i>	Pmk8	gTTAgCgAgAgCCACAAAAAgCgAAT	153
		Pmkr9	ACTCAAgtAACAAATCTTCATA	

3.15 การทดสอบความสามารถของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง

เตรียมตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียมาหยดลงบนกระดาษกรอง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอและทำการทดสอบด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม โดยซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง เพื่อทดสอบคุณภาพการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มเปรียบเทียบกับ การทดสอบด้วยดีเอ็นเอสกัดจากเลือดครบส่วน

3.16 การตรวจหาผู้ป่วยมาลาเรียด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองในกลุ่มประชากรบางพื้นที่ของจังหวัดตากและจังหวัดศรีสะเกษ

ตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของกลุ่มประชากรในพื้นที่จังหวัดตากที่ได้รับการตรวจคัดกรองการติดเชื้อมาลาเรียด้วยชุดทดสอบเร็วจำนวน 163 ตัวอย่างและตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของกลุ่มประชากรในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษที่ได้รับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 159 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นเพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจหาผู้ป่วยมาลาเรียที่ไม่มีอาการแสดง



3.17 แผนการดำเนินงาน

ระยะเวลาทำการวิจัยตั้งแต่เริ่มดำเนินงานถึงสิ้นสุดการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แผนการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงาน	2564		2565				2566	
	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6
1. ทบทวนเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง								
2. ออกแบบและวางแผนการวิจัย								
3. ออกแบบโปรแกรม, เตรียมเครื่องมือ นํ้ายา และสารต่างๆ								
4. Singleplex PCR-HRM								
5. Multiplex PCR-HRM (try condition)								
6. Validate: LOD, Sensitivity, Specificity								
7. การทดสอบตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรีย								
8. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล								
9. จัดทำรายงานและนำเสนอ								

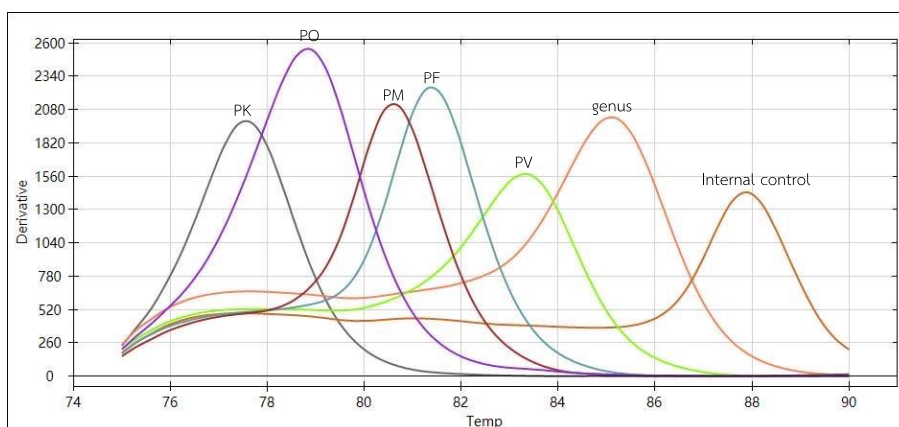
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม

4.1.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม

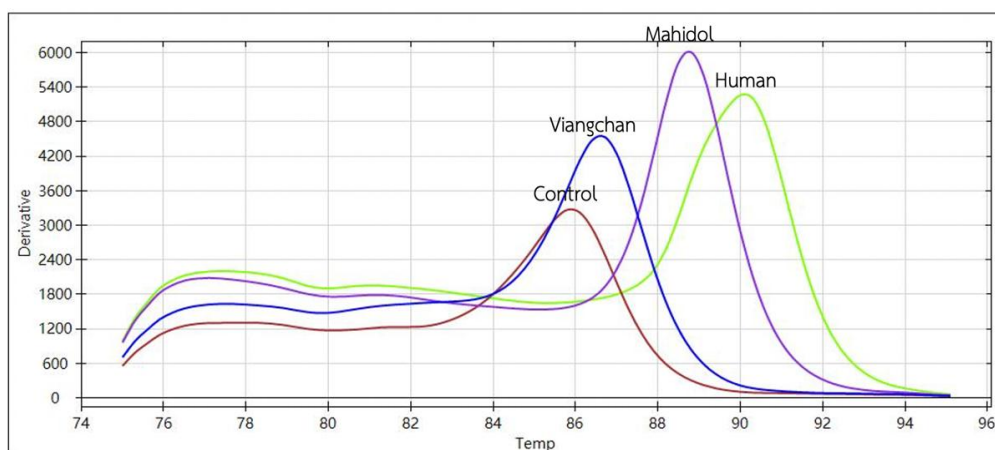
ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reaction) และให้ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มของเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์มีอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ที่แตกต่างกันอย่างจำเพาะ ได้แก่ พลาสโมเดียมโนไซ 78 °C, พลาสโมเดียมโอวาเล 79 °C, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี 81 °C, พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม 82 °C, พลาสโมเดียมไวแวกซ์ 84 °C, จินัสพลาสโมเดียม 85 °C และ internal control 88 °C ดังแสดงในรูปที่ 21



รูปที่ 21 ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มของการทดสอบซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ พลาสโมเดียมโนไซ (PK), พลาสโมเดียมโอวาเล (Po), พลาสโมเดียมมาลาเรียอี (Pm), พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (Pf), พลาสโมเดียมไวแวกซ์ (Pv), จินัสพลาสโมเดียม (genus) และ internal control (control)

4.1.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอร์เอ็ม

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วยเทคนิคซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอร์เอ็มพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนปฏิกิริยาข้ามกันและให้ผลการวิเคราะห์เอซอร์เอ็มของการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีแต่ละชนิด โดยมีอุณหภูมิหลอมเหลวที่แตกต่างกันอย่างจำเพาะ ได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์ 87 °C, จีซิกพีดีมิดล 89 °C, ยีนจีซิกพีดีปกติ (ไม่มีการกลายพันธุ์) 90°C และ internal control 86°C ดังแสดงในรูปที่ 22

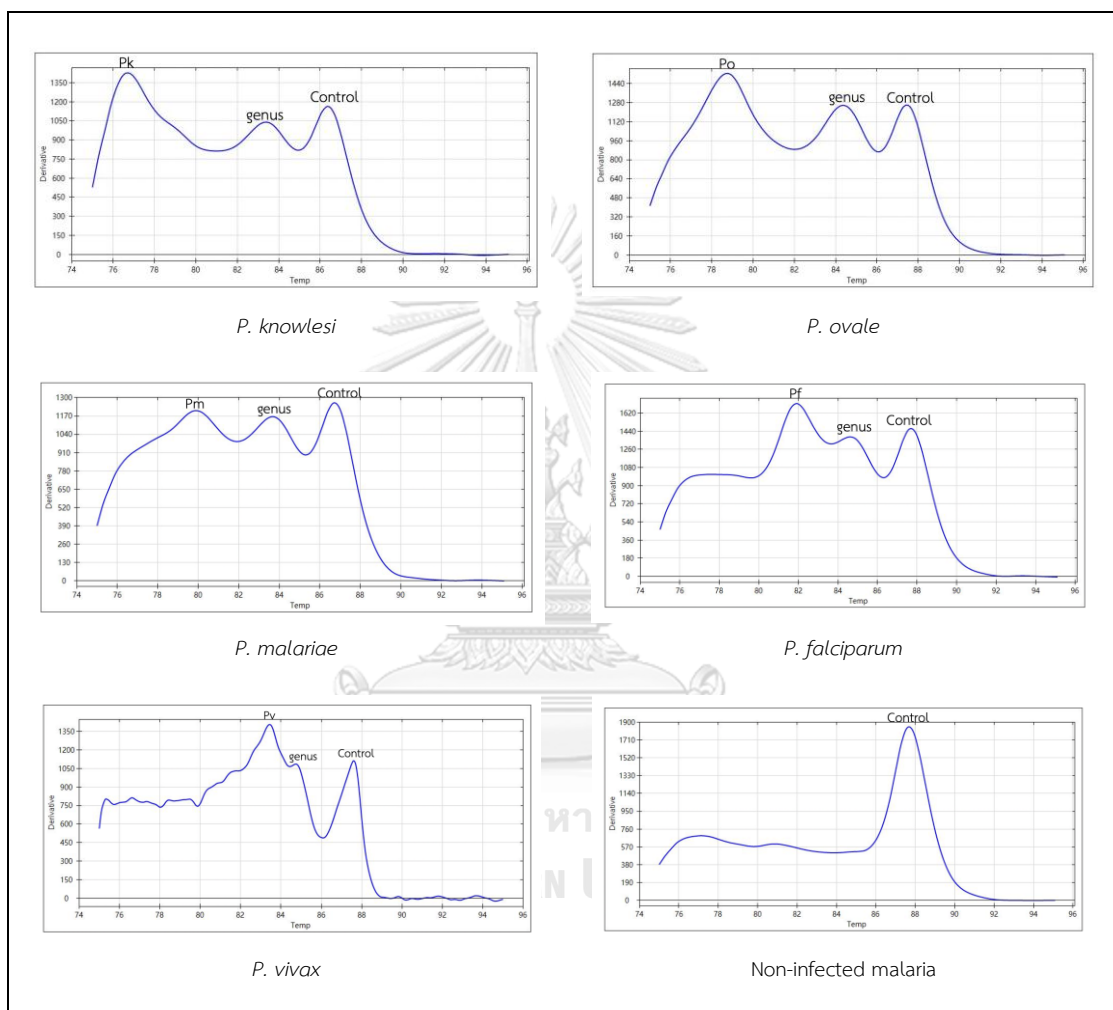


รูปที่ 22 ผลการวิเคราะห์เอซอร์เอ็มของการทดสอบซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ได้แก่ จีซิกพีดีเวียงจันทน์, จีซิกพีดีมิดล, human และ internal control

4.2 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่า annealing temperature ที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ 57 °C เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาเดียวกันและให้ผลการวิเคราะห์เอซอร์เอ็มที่แสดงอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) ของเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ได้ถูกต้อง โดยมีสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ initial denature 95°C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 37 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 57°C 45 วินาที และ

extension 72°C 30 วินาที ต่อด้วย 13 รอบของ denature 95°C 30 วินาที, annealing 65°C 30 วินาที และ extension 72°C 30 วินาที และ final extension 72°C 2 นาที 1 รอบ จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเอซอร์เอ็มตั้งแต่ 75-95 °C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 0.3 °C ต่อหนึ่งวินาที ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์เอซอร์เอ็มที่สามารถแยกสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียได้อย่างจำเพาะ ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลพิล็กซ์ฟิซอร์เอซอร์เอ็มในการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ พลาสโมเดียมโนโซ (Pk), พลาสโมเดียมโอวาเล (Po), พลาสโมเดียมมาลาเรียอี (Pm), พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม (Pf), พลาสโมเดียมไวแวกซ์ (Pv), จินัสพลาสโมเดียม (genus) และไม่ติดเชื้อมาลาเรีย

4.4 ผลการทดสอบความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

ผลการทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรียจากหน่วยวิจัยโรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้รับการตรวจยืนยันสปีชีส์ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์เปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นพบว่าความไวและความจำเพาะในการตรวจเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมโอวาเล, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโนไซและจิ้นสพลาสโมเดียมเท่ากับ 100% และ 100% ตามลำดับ สำหรับพลาสโมเดียมไวแวกซ์ความไวเท่ากับ 100% และความจำเพาะเท่ากับ 99.28% ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับการตรวจหาสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

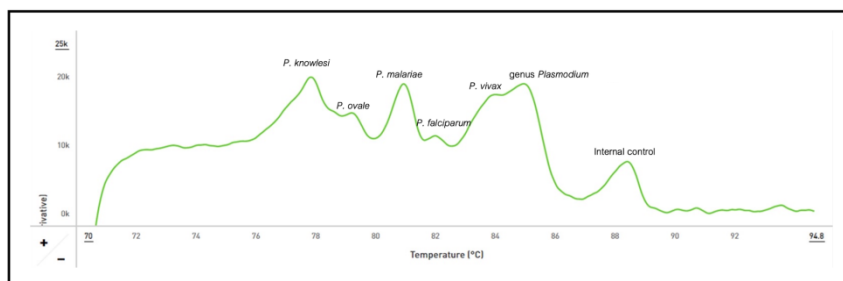
Results	No. of reference samples	
<i>Plasmodium falciparum</i> detection		
	True positive (Real-time PCR positive)	True negative (Real-time PCR negative)
Multiplex PCR positive	20 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	148 (TN)
<i>Plasmodium vivax</i> detection		
	True positive (Real-time PCR positive)	True negative (Real-time PCR negative)
Multiplex PCR positive	30 (TP)	1 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	137 (TN)
<i>Plasmodium ovale</i> detection		
	True positive (Real-time PCR positive)	True negative (Real-time PCR negative)
Multiplex PCR positive	3 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	165 (TN)
<i>Plasmodium malariae</i> detection		
	True positive (Real-time PCR positive)	True negative (Real-time PCR negative)
Multiplex PCR positive	3 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	165 (TN)

<i>Plasmodium knowlesi</i> detection		
	True positive (Real-time PCR positive)	True negative (Real-time PCR negative)
Multiplex PCR positive	10 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	158 (TN)
Genus <i>Plasmodium</i> detection		
	True positive (Real-time PCR positive)	True negative (Real-time PCR negative)
Multiplex PCR positive	66 (TP)	1 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	101 (TN)

4.5 ผลการทดสอบความสามารถของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมของผู้ป่วยมาลาเรีย

4.5.1 ผลการทดสอบตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม

การทดสอบการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียที่มีความเข้มข้น 1,000 copies/ μ L ได้แก่ เชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมมาลาเรียอี, พลาสโมเดียมโอวาเล, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมโนไซ, จินัสพลาสโมเดียมและ internal control ผสมรวมกันและทำการวิเคราะห์ผลด้วยเอชอาร์เอ็มพบว่าสามารถตรวจระบุสปีชีส์เชื้อมาลาเรียแบบผสมได้ ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรีย โดยผสมพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียทุกสปีชีส์ที่มีความเข้มข้น 1,000 copies/ μ L

4.5.2 ผลการทดสอบเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาลาเรีย

ผลของการทดสอบการติดเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มของตัวอย่างดีเอ็นเอแบบผสมของเชื้อของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ได้แก่ 1000:1000, 1000:100, 1000:10, 1000:1 และตัวอย่างดีเอ็นเอแบบผสมของเชื้อของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ได้แก่ 1000:1000, 100:1000, 10:1000, 1:1000 parasites/ μ L ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียแบบผสมด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้น

Artificial mix (parasites/ μ L)		Multiplex HRM results in quadruplicate					
<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.ovale</i>	<i>P.malariae</i>	<i>P.knowlesi</i>	genus
1,000	1,000	+/+/+/+	+/+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+
1,000	100	+/+/+/+	+/+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+
1,000	10	+/+/+/+	+/-/+/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+
1,000	1	+/+/+/+	+/-/+/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+
1,000	1,000	+/+/+/+	+/+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+
100	1,000	+/+/+/+	+/+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+
10	1,000	+/+/+/+	+/+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+
1	1,000	-/+/-	+/+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/+/+

4.6 ผลการตรวจหาและระบุปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นโดยเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสถานพระบารมี จังหวัดกาญจนบุรี

ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดครบส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 167 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้ง 167 ตัวอย่างพบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100%, 100% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม สำหรับตรวจหาสปิซิสเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดครบส่วนเปรียบเทียบกับ การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Results	No. of reference samples	
<i>Plasmodium falciparum</i> detection		
	True positive (Microscopic)	True negative (Microscopic)
Multiplex PCR positive	1 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	166 (TN)
<i>Plasmodium vivax</i> detection		
	True positive (Microscopic)	True negative (Microscopic)
Multiplex PCR positive	166 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	1 (TN)

จากนั้นนำตัวอย่างมาลาเรีย 54 ตัวอย่างมาทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มเปรียบเทียบกับเทคนิคเนสเต็ดพีซีอาร์พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 100% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม สำหรับการตรวจหาสปิซิสของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดครบส่วนเปรียบเทียบกับเทคนิคเนสเต็ดพีซีอาร์

Results	No. of reference samples	
<i>Plasmodium falciparum</i> detection		
	True positive (Nested PCR)	True negative (Nested PCR)
Multiplex PCR positive	1 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	53 (TN)
<i>Plasmodium vivax</i> detection		
	True positive (Nested PCR)	True negative

(Nested PCR)		
Multiplex PCR positive	53 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	1 (TN)

4.7 ผลการทดสอบความสามารถของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง

ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียที่สกัดจากเลือดครบส่วนให้ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มเป็นเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ และเมื่อทดสอบด้วยทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง โดยทำซ้ำทั้งหมด 4 ครั้งพบว่าให้ผลการวิเคราะห์เอชอาร์เอ็มพบเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ นั่นหมายความว่าตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองสามารถทดสอบด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นได้

4.8 ผลการตรวจหาผู้ป่วยมาลาเรียด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของประชากรในบางพื้นที่จังหวัดตากและจังหวัดศรีสะเกษ

ตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของกลุ่มประชากรในพื้นที่จังหวัดตากจำนวน 163 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการตรวจคัดกรองการติดเชื้อมาลาเรียด้วยชุดทดสอบเร็วพบว่าไม่มีผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรีย 2 รายและเมื่อนำตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองมาสกัดดีเอ็นเอและทดสอบด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นพบผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรีย 9 ราย ได้แก่ พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม 2 รายและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ 7 ราย พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 96.89 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 19

ตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของกลุ่มประชากรในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษที่ได้รับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 159 ตัวอย่างพบว่าไม่มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย จากนั้นนำตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นพบว่าไม่มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียและมีความจำเพาะเท่ากับ 100% ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม สำหรับการตรวจหาสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยชุดทดสอบเร็ว

Results	No. of reference samples	
<i>Plasmodium</i> species detection		
	True positive (Rapid diagnosis test)	True negative (Rapid diagnosis test)
Multiplex PCR positive	2 (TP)	5 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	156 (TN)

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิคัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม สำหรับการตรวจหาสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองเปรียบเทียบกับ การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Results	No. of reference samples	
<i>Plasmodium</i> species detection		
	True positive (Microscopic)	True negative (Microscopic)
Multiplex PCR positive	0 (TP)	0 (FN)
Multiplex PCR negative	0 (FP)	159 (TN)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

เทคนิคการตรวจหาเชื้อมาลาเรียถือเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมและกำจัดโรคมาลาเรีย ซึ่งเป็นโรคที่ไม่มีอาการจำเพาะและผู้ป่วยบางรายก็ไม่มีอาการแสดง หากไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัย และการรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจกลายเป็นแหล่งสะสมและแพร่กระจายของเชื้อได้ (4) การตรวจด้วยเทคนิคมาตรฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อยที่สุดได้เพียง 50-500 parasites/ μ L (20) การตรวจด้วยชุดทดสอบเร็วสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อยที่สุดได้เพียง 100 parasites/ μ L (23) ดังนั้นการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการแสดงด้วยเทคนิคเหล่านี้อาจจะตรวจพบได้ยาก เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่แสดงอาการมักมีความหนาแน่นของเชื้อมาก่อนข้างต่ำ 1-1,336 parasites/ μ L ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคทางโมเลกุลที่มีความไวและความจำเพาะสูงจึงมีความจำเป็นอย่างมากในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อมาก่อนข้างต่ำหรือไม่มีอาการแสดง (62) อาทิเช่น เนสเต็ดพีซีอาร์, เรียลไทม์พีซีอาร์และมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็ม สำหรับตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากยีน *18S rRNA* และ *cytochrome b* สำหรับเชื้อพลาสโมเดียมทั้ง 5 สปีชีส์และจีโนมพลาสโมเดียม เนื่องจากเป็นยีนที่มีหลาย copies ในจีโนมของเชื้อพลาสโมเดียม ซึ่งมีความไวในการตรวจพบมากกว่ายีนที่มีเพียง 1 copie นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดี ประกอบด้วย จีซิกพีดีเวียงจันทน์และจีซิกพีดีมิดดิล ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่สุดในประเทศไทย เนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีส่งผลให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีและมีผลข้างเคียงต่อการใช้ยารักษาผู้ป่วยมาลาเรีย รวมถึงการสำรวจความชุกของการกลายพันธุ์ยีนจีซิกพีดีในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งอาจจะมีการนำไปศึกษาพัฒนาต่อสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอชอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 สปีชีส์ ได้แก่ เชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมไวแวกซ์, พลาสโมเดียมโอ

วาล, พลาสโมเดียมมาลาเรียอีและพลาสโมเดียมโนโซ พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ โดยมีอุณหภูมิหลอมเหลวในการวิเคราะห์เอซอาร์เอ็มที่แตกต่างกันและแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พัฒนาการวิเคราะห์เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม (63) ในการตรวจเชื้อมาลาเรีย 5 สปีชีส์ โดยออกแบบไพรเมอร์จากยีน *18S rRNA* เพียงคู่เดียวพบว่าอุณหภูมิหลอมเหลวในการวิเคราะห์เอซอาร์เอ็มของเชื้อมาลาเรียบางสปีชีส์ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมมาลาเรียอีที่มีอุณหภูมิหลอมเหลวต่างกัน 0.5°C จึงมีความยากในการระบุสปีชีส์

เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นสามารถทดสอบปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ โดยพบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจเชื้อพลาสโมเดียมโนโซ, พลาสโมเดียมมาลาเรียอีและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 3.316 copies/ μ L และสามารถตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมโอวาล, พลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและจีนัสพลาสโมเดียมได้น้อยที่สุดเท่ากับ 2.354 copies/ μ L เมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็มร่วมกับ TaqMan probe (64) พบว่ามีความไว 21.47 – 46.43 copies/ μ L และงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็ม (63) สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อยที่สุดได้เท่ากับ 1 - 100 copies/ μ L สำหรับการทดสอบความไวและความจำเพาะของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียพบว่าความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม, พลาสโมเดียมโอวาล, พลาสโมเดียมมาลาเรียอีและพลาสโมเดียมโนโซเท่ากับ 100% และ 100% ตามลำดับ สำหรับการตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 100% และความจำเพาะเท่ากับ 99.28% นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบการตรวจหาการติดเชื้อแบบผสมของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์พบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจพบการติดเชื้อแบบผสมได้ ถือว่าเป็นเทคนิคที่สามารถนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เอซอาร์เอ็มที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะสูงมากในการตรวจหาและระบุสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียสามารถตรวจหาการติดเชื้อที่มีความหนาแน่นต่ำได้ ดังนั้นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้จึงอาจจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย อันจะเป็นประโยชน์ต่อตัวผู้ป่วยในการตรวจวินิจฉัยและการได้รับการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมถึงเป็นประโยชน์ต่อทางด้านสาธารณสุขในการควบคุมและกำจัดโรค

มาลาเรียด้วย นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เอชอาร์เอ็มสำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีด้วย ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการให้ยารักษาผู้ป่วยมาลาเรียเนื่องจากการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียด้วยยาต้านเชื้อมาลาเรีย เช่น ยาไพโรมาควินจะมีผลทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีร่วมด้วย ดังนั้นก่อนให้ยารักษาผู้ป่วยมาลาเรียจึงควรมีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์จีซิกพีดีก่อนเพื่อช่วยป้องกันผลข้างเคียงที่อาจเกิดกับผู้ป่วยได้ (44) อีกทั้งยังเป็นการสำรวจความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีที่พบในผู้ป่วยมาลาเรียได้ด้วย



บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. Kayentao K, Florey LS, Mihigo J, Doumbia A, Diallo A, Koné D, et al. Impact evaluation of malaria control interventions on morbidity and all-cause child mortality in Mali, 2000-2012. *Malar J.* 2018;17(1):424.
2. Pillay E, Khodaiji S, Bezuidenhout BC, Litshie M, Coetzer TL. Evaluation of automated malaria diagnosis using the Sysmex XN-30 analyser in a clinical setting. *Malar J.* 2019;18(1):15.
3. Yoon J, Jang WS, Nam J, Mihn D-C, Lim CS. An Automated Microscopic Malaria Parasite Detection System Using Digital Image Analysis. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(3):527.
4. Quang HH, Chavchich M, Trinh NTM, Manh ND, Edstein MD, Martin NJ, et al. Cross-sectional survey of asymptomatic malaria in Dak Nong province in the Central Highlands of Vietnam for the malaria elimination roadmap. *PLoS One.* 2021;16(10):e0258580-e.
5. Grigg MJ, Lubis IN, Tetteh KKA, Barber BE, William T, Rajahram GS, et al. Plasmodium knowlesi detection methods for human infections-Diagnosis and surveillance. *Adv Parasitol.* 2021;113:77-130.
6. Recht J, Ashley EA, White NJ. Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing: Divergent policies and practices in malaria endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):e0006230-e.
7. Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Jukić M, Včev A. Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms.* 2019;7(6).
8. Schindler T, Robaina T, Sax J, Bieri JR, Mpina M, Gondwe L, et al. Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J.* 2019;18(1):9-.
9. Molina-Franky J, Cuy-Chaparro L, Camargo A, Reyes C, Gómez M, Salamanca DR, et al. Plasmodium falciparum pre-erythrocytic stage vaccine development. *Malar J.* 2020;19(1):56.

10. Tran TM, Crompton PD. Decoding the complexities of human malaria through systems immunology. *Immunol Rev.* 2020;293(1):144-62.
11. Warncke JD, Beck H-P. Host Cytoskeleton Remodeling throughout the Blood Stages of *Plasmodium falciparum*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2019;83(4):e00013-19.
12. De SL, Ntumngia FB, Nicholas J, Adams JH. Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2021;20(2):97-112.
13. Chavatte JM, Tan SB, Snounou G, Lin RT. Molecular characterization of misidentified *Plasmodium ovale* imported cases in Singapore. *Malar J.* 2015;14:454.
14. Lo E, Nguyen K, Nguyen J, Hemming-Schroeder E, Xu J, Etemesi H, et al. *Plasmodium malariae* Prevalence and csp Gene Diversity, Kenya, 2014 and 2015. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(4):601-10.
15. Davidson G, Chua TH, Cook A, Speldewinde P, Weinstein P. Defining the ecological and evolutionary drivers of *Plasmodium knowlesi* transmission within a multi-scale framework. *Malar J.* 2019;18(1):66.
16. Clarke GM, Rockett K, Kivinen K, Hubbart C, Jeffreys AE, Rowlands K, et al. Characterisation of the opposing effects of G6PD deficiency on cerebral malaria and severe malarial anaemia. *Elife.* 2017;6:e15085.
17. Francischetti IM. Does activation of the blood coagulation cascade have a role in malaria pathogenesis? *Trends Parasitol.* 2008;24(6):258-63.
18. Naing C, Whittaker MA. Severe thrombocytopaenia in patients with vivax malaria compared to falciparum malaria: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty.* 2018;7(1):10-.
19. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J Parasitol.* 2009;47(2):93-102.
20. Berzosa P, de Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the

detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malar J.* 2018;17(1):333.

21. Greenwood BM, Armstrong JR. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991;85(2):186-8.
22. de Souza Oliveira A, Guimarães Fernandes Costa M, das Graças Vale Barbosa M, Ferreira Fernandes Costa Filho C. A new approach for malaria diagnosis in thick blood smear images. *Biomedical Signal Processing and Control.* 2022;78:103931.
23. Belachew M, Wolde M, Nega D, Gidey B, Negash L, Assefa A, et al. Evaluating performance of multiplex real time PCR for the diagnosis of malaria at elimination targeted low transmission settings of Ethiopia. *Malar J.* 2022;21(1):9.
24. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(1):66-78.
25. Shambhu S, Koundal D, Das P, Hoang VT, Tran-Trung K, Turabieh H. Computational Methods for Automated Analysis of Malaria Parasite Using Blood Smear Images: Recent Advances. *Comput Intell Neurosci.* 2022;2022:3626726-.
26. Wongchotigul V, Suwanna N, Krudsood S, Chindanond D, Kano S, Hanaoka N, et al. The use of flow cytometry as a diagnostic test for malaria parasites. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004;35(3):552-9.
27. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol.* 2017;47(10):1584-797.
28. Suwanna N, Krudsood S, Chindanond D, Kano S, Hanaoka N, Akai Y, et al. The use of flow cytometry as a diagnostic test for malaria parasites. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health.* 2004;35:552-9.

29. Jang JW, Kim JY, Yoon J, Yoon SY, Cho CH, Han ET, et al. Flow Cytometric Enumeration of Parasitemia in Cultures of *Plasmodium falciparum* Stained with SYBR Green I and CD235A. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:536723.
30. Jones NL. PCR. Principles, procedures, and parameters. *Methods Mol Biol*. 2002;187:37-46.
31. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):1087-9.
32. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(2).
33. Li P, Zhao Z, Wang Y, Xing H, Parker DM, Yang Z, et al. Nested PCR detection of malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological surveys. *Malar J*. 2014;13(1):175.
34. Yentur Doni N, Yildiz Zeyrek F, Seyrek A. Detection of Plasmodium using filter paper and nested PCR for patients with malaria in Sanliurfa, in Turkey. *Malar J*. 2016;15(1):299.
35. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):47-51.
36. Chellammal A, Rompicherla V, Subramaniyan J, Srinivasan C. Identification of Plasmodium Species by Multiplex PCR in a Single Tube Reaction. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. 2020;9:223-6.
37. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
38. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, Jr., et al. Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2435-40.

39. Sazed SA, Kibria MG, Alam MS. An Optimized Real-Time qPCR Method for the Effective Detection of Human Malaria Infections. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(5):736.
40. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018;18(4).
41. Srisutham S, Saralamba N, Malleret B, Rénia L, Dondorp AM, Imwong M. Four human *Plasmodium* species quantification using droplet digital PCR. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175771.
42. Murillo E, Muskus C, Agudelo LA, Vélez ID, Ruiz-Lopez F. A new high-resolution melting analysis for the detection and identification of *Plasmodium* in human and *Anopheles* vectors of malaria. *Sci Rep*. 2019;9(1):1674.
43. White NJ. Drug treatment and prevention of malaria. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1988;34(1):1-14.
44. Popovici J, Tebben K, Witkowski B, Serre D. Primaquine for *Plasmodium vivax* radical cure: What we do not know and why it matters. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2021;15:36-42.
45. Camarda G, Jirawatcharadech P, Priestley RS, Saif A, March S, Wong MHL, et al. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. *Nature Communications*. 2019;10(1):3226.
46. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Geneva: World Health Organization
Copyright © World Health Organization, 2010.; 2010.
47. Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, Serrano-Posada H, Ortega-Cuellar D, González-Valdez A, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
48. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(2):373-93.

49. Boonyawat B, Phetthong T, Suksumek N, Traivaree C. Genotype-Phenotype Correlation of G6PD Mutations among Central Thai Children with G6PD Deficiency. Anemia. 2021;2021:6680925.
50. Boonyuen U, Songdej D, Tanyaratsrisakul S, Phuanukoonnon S, Chamchoy K, Praoparotai A, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in malaria endemic area of Thailand by multiplexed high-resolution melting curve analysis. Malar J. 2021;20(1):194.
51. Khammanee T, Sawangjaroen N, Buncherd H, Tun AW, Thanapongpichat S. Prevalence of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency among Malaria Patients in Southern Thailand: 8 Years Retrospective Study. Korean J Parasitol. 2022;60(1):15-23.
52. Kanchanavithayakul A, Prasittisa K, Kiat-Amornrak P, Chanda M, Kittiwatanasarn P, Nuchprayoon I, et al., editors. PREVALENCE OF GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY AND GENETIC MUTATIONS AMONG KAREN AND LAO POPULATIONS IN THAILAND 2017.
53. Yeung CY, Lai HC, Sin WK, Leung NK. Fluorescent spot test for screening erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn babies. The Journal of Pediatrics. 1970;76(6):931-4.
54. Tantular 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(4):245-50.
55. Kim S, Nguon C, Guillard B, Duong S, Chy S, Sum S, et al. Performance of the CareStart™ G6PD Deficiency Screening Test, a Point-of-Care Diagnostic for Primaquine Therapy Screening. PLoS One. 2011;6:e28357.
56. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. Methaemoglobin reduction test: a new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. Bull World Health Organ. 1960;22(6):633-40.

57. Hsu J, Fink D, Langer E, Carter ML, Bengo D, Ndidde S, et al. PCR-based allelic discrimination for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Ugandan umbilical cord blood. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014;31(1):68-75.
58. Boonyuen U, Songdej D, Tanyaratsrisakul S, Phuanukoonnon S, Chamchoy K, Praoparotai A, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in malaria endemic area of Thailand by multiplexed high-resolution melting curve analysis. *Malar J*. 2021;20(1):194.
59. Adu-Gyasi D, Adams M, Amoako S, Mahama E, Nsoh M, Amenga-Etego S, et al. Estimating malaria parasite density: assumed white blood cell count of 10,000/ μ l of blood is appropriate measure in Central Ghana. *Malar J*. 2012;11(1):238.
60. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1214-9.
61. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5636-43.
62. Grigg MJ, Lubis IN, Tetteh KKA, Barber BE, William T, Rajahram GS, et al. Chapter Three - *Plasmodium knowlesi* detection methods for human infections—Diagnosis and surveillance. In: Drakeley C, editor. *Advances in Parasitology*. 113: Academic Press; 2021. p. 77-130.
63. Chua KH, Lim SC, Ng CC, Lee PC, Lim YAL, Lau TP, et al. Development of High Resolution Melting Analysis for the Diagnosis of Human Malaria. *Sci Rep*. 2015;5(1):15671.
64. Lamien-Meda A, Fuehrer H-P, Leitsch D, Noedl H. A powerful qPCR-high resolution melting assay with taqman probe in *Plasmodium* species differentiation. *Malar J*. 2021;20(1):121.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Paweesuda Rattanakoch
วัน เดือน ปี เกิด	23 July 1996
สถานที่เกิด	Champion
วุฒิการศึกษา	2020 – present Master of Science (Clinical Microscopic) Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University 2015 – 2018 Bachelor of Science (Medical Technology) Faculty of Medical Technology, Rangsit University
ที่อยู่ปัจจุบัน	82/1 M.4 Bankuan, Langsuan, Chumphon, 86110 Thailand

