อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2559C236

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ การเปรียบเทียบการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี Multiplex PCR และ Microscopic examination

คณะผู้วิจัย สังกัด

ดร. ทิพวรรณ สังขพงษ์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

คณะสหเวชศาสตร์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 1 ส.ค. 2562
เลขทะเบียน 1019945
เลขเรียกหนังสือ 2 RA 644 .M2 ท478ร 2559

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2559

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การเปรียบการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี Multiplex PCR และ Microscopic examination

(ภาษาอังกฤษ) Comparison of Multiplex PCR and Microscopic examination for malaria diagnosis

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อปรสิตชนิดหนึ่ง ปัจจุบันโรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของหลายประเทศทั่วโลก จากการรายงานโดยสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย ณ วันที่ 1 มกราคม – 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยมาลาเรียสะสมรวม 13,497 คน โดยจังหวัดที่พบผู้ป่วยมาลาเรีย 10 อันดับแรกในประเทศไทย ได้แก่ อุบลราชธานี ตาก กาญจนบุรี ยะลา ศรีสะเกษ แม่ฮ่องสอน สุราษฎร์ธานี ระนอง นราธิวาส และสุรินทร์ ตามลำดับ (สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2015)

เชื้อมาลาเรียที่สามารถติดต่อสู่คนได้ ได้แก่ *Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae*, และ *P. ovale* นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อมาลาเรียที่สามารถก่อโรคในคนอีกหนึ่งชนิด ได้แก่ *P. knowlesi* อาการป่วยด้วยโรคมาลาเรียจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย (White *et al.*, 2014) อาการทั่วไปของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย คือมีไข้ หนาวสั่น เหงื่อออก ปวดหัว เมื่อยตัว คลื่นไส้ อาเจียน ซึ่งเป็นอาการไม่รุนแรง แต่จะมีบางส่วนของผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียจึงมีความสำคัญทางคลินิกอย่างมาก วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการได้แก่ วิธี microscopic examination โดยการเตรียมฟิล์มเลือดชนิดหนา และชนิดบาง ข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี microscopic examination คือต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ และมีความชำนาญในการดูเชื้อมาลาเรีย อีกวิธีที่นิยมทำให้ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลคือ วิธี rapid diagnosis test หรือการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วย ชุดตรวจสำเร็จรูป เป็นการตรวจหาโปรตีนของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้ อาศัยความชำนาญของผู้ทำการทดสอบน้อยกว่าวิธี microscopic examination แต่มีราคาแพงกว่า (Murphy *et al.*, 2013)

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคมาลาเรียซึ่งมีความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) ที่สูง ได้แก่ วิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเริ่มต้นโดยการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียแล้วนำมาเพิ่มจำนวนของ DNA โดยการออกแบบ primer ต่อยีนที่มีความจำเพาะของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด และใช้ primer ดังกล่าวในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธีการทำ PCR ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denature, annealing และ extension จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มา run gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR เพื่อให้มีความไว และความจำเพาะมากขึ้นดังนี้

ปี ค.ศ. 1993 Snounou และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี standard PCR กับวิธี microscopic examination โดยการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดจำนวน 5 µL จำนวน 196 ตัวอย่าง และนำ DNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR จากการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ small subunit ribosomal RNA (ssRNA) ของเชื้อมาลาเรีย พบว่าให้ผล positive จากการตรวจด้วยวิธี PCR มากกว่าวิธี microscopic examination จำนวน 23 ตัวอย่าง และนอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี PCR ยังช่วยในการวินิจฉัยในกรณีที่มีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดได้ดีกว่าวิธี microscopic examination ด้วย (Snounou *et al.*, 1993) และเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี PCR มีความไวและความจำเพาะที่สูงขึ้น มีการทำ nested PCR ซึ่งผลพบว่าเพิ่มความไว และความจำเพาะที่สูงขึ้น (Snounou *et al.*, 1996)

ปี ค.ศ. 2006 Johnton และคณะ ได้ศึกษาการเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR กับวิธี microscopic examination โดยการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดจำนวน 200 µL จำนวน 348 ตัวอย่าง โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับยีน 18s rRNA ซึ่งเป็นคู่ primer ที่ได้ทำการศึกษามาแล้วโดย Snounou และคณะ ในปี 1996 แต่มีการปรับ PCR condition เล็กน้อย จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกชนิดของมาลาเรียได้ดีกว่า วิธี microscopic examination (Johnston *et al.*, 2006)

ปี ค.ศ. 2011 Oguike และคณะ ได้ศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี PCR โดยมีการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อ sub-species diversity ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. ovale* ได้แก่ *P. ovale wallikeri* และ *P. ovale curtesi* พบว่าสามารถวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียสองชนิดนี้ได้ (Oguike *et al.*, 2011)

ปี ค.ศ. 2013 Anthony และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบการวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR กับวิธี microscopic examination โดยออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ 18s rRNA พบว่า ให้ค่า sensitivity เท่ากับ 91.9%

และ specificity เท่ากับ 100 % และ dihydrofolate reductase-thymidylate synthease linker region (dhfr-ts) พบว่า ให้ค่า sensitivity เท่ากับ 51.4% และ specificity เท่ากับ 100% ตามลำดับ (Anthony *et al.*, 2013)

ปี ค.ศ 2014 Mekonen และคณะ ได้นำตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมาลาเรียโดยวิธี microscopic examination จำนวน 314 ตัวอย่าง มาวินิจฉัยใหม่ด้วยวิธี PCR พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลเป็น *P. falciparum* จำนวน 180 ตัวอย่างด้วยวิธี microscopic examination ให้ผลเป็น *P. falciparum* เพียง 111 ตัวอย่าง ให้ผลเป็น *P. vivax* จำนวน 44 ตัวอย่าง และให้ผลเป็น mixed infection ระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* จำนวน 18 ตัวอย่าง และ ให้ผลเป็น mixed infection ระหว่าง *P. falciparum* และ *P. malariae* จำนวน 2 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อมาลาเรียจำนวน 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด จากผลการทดลองแสดงให้ว่า มีความผิดพลาดที่เกิดจากการวินิจฉัยโดยวิธี microscopic examination จำนวนมาก (Mekonen *et al.*, 2014)

ปี ค.ศ 2015 Sheng และคณะ ได้ทำ Multiplex PCR โดยออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อ 18s rRNA ต่อเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ซึ่งจะให้ PCR product ที่ขนาด 268 bp, 323 bp, 394 bp, และ 446 bp ต่อ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* และ *P. malariae* ตามลำดับ โดยใช้ plasmids ที่มีส่วนของ 18S rDNA gene มาเป็น DNA ต้นแบบในการศึกษา พบว่าสามารถแยกมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดได้ (Sheng *et al.*, 2015)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าวิธีการตรวจเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR จะมีความไว และความจำเพาะสูง โดยที่ผ่านมาได้มีการเปรียบเทียบผลวิธีการตรวจวิเคราะห์โรคมาลาเรียด้วยวิธี standard PCR, nested PCR หรือวิธี multiplex PCR กับวิธีมาตรฐาน ซึ่งวิธี nested PCR เป็นวิธีการทดสอบที่มีความจำเพาะ และความไวที่สูง แต่ใช้เวลานานเมื่อเทียบกับวิธี PCR วิธีอื่น ส่วนวิธี multiplex PCR เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบชนิดของมาลาเรีย ที่พัฒนาขึ้นมาภายหลัง เนื่องจากมีความยุ่งยากในการทำการทดสอบน้อยกว่าวิธี PCR อื่นๆ แต่จะต้องออกแบบ primer ให้เหมาะสม โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาได้ใช้ plasmids ที่มีส่วนของยีน 18S rDNA เป็น DNA ต้นแบบในการศึกษา และ PCR product มีขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะทำให้สับสนในการแปลผลได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการทำวิจัยนี้คือ การวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี multiplex PCR ด้วย primer คู่ใหม่ต่อยีน 18s rDNA โดยใช้ ตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมาลาเรียด้วยวิธี microscopic examination และประเมินคุณภาพของสีย้อม Giemsa เมื่อใช้เวลาและความเข้มข้นของสีย้อมที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบวิธีการวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ ระหว่างวิธี Multiplex PCR และ วิธี Microscopic examination ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และเปรียบเทียบคุณภาพการติดสีของสีย้อม Giemsa เมื่อใช้เวลาและความเข้มข้นของสีย้อมที่แตกต่างกัน

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

วิธีการวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Multiplex PCR ให้ผลการตรวจที่มีความจำเพาะ และความไวในการตรวจวินิจฉัยมากกว่า วิธี Microscopic examination

การย้อมสี Giemsa ของเชื้อมาลาเรียทำให้มีคุณภาพแตกต่างกันเมื่อใช้ความเข้มข้นและเวลาในการย้อมสีที่แตกต่างกัน

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อปรสิตชนิดหนึ่ง ปัจจุบันโรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของหลายประเทศทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2556 มีพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียมากถึง 97 ประเทศ โดยมีผู้ที่อยู่ในพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 3.2 พันล้านคน มีรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียประมาณ 198 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิต 584,000 คน โดยผู้ที่เสียชีวิตส่วนใหญ่เป็นเด็ก ที่อยู่ใต้ทะเลทรายสะฮารา ทวีปแอฟริกา (WHO: Global Health Observatory (GHO) data, 2015) จากการรายงานโดยสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย ณ วันที่ 1 มกราคม – 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยมาลาเรียสะสมรวม 13,497 คน โดยจังหวัดที่พบผู้ป่วยมาลาเรีย 10 อันดับแรกในประเทศไทย ได้แก่ อุบลราชธานี ตาก กาญจนบุรี ยะลา ศรีสะเกษ แม่ฮ่องสอน สุราษฎร์ธานี ระนอง นราธิวาส และสุรินทร์ ตามลำดับ (สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2015)

เชื้อมาลาเรียเป็นโพรโตซัว (protozoa) ชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ใน phylum Apicomplexa, class Sporozoea, subclass Coccidia, order Eucoccidiida, suborder Haemosporina และ family *Plasmodiidae* โดยพบเชื้อมาลาเรียในเลือดของสัตว์จำพวกนก สัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีการติดต่อโดยมียุงก้นปล่องเพศเมียเป็นพาหะนำโรค ซึ่งในยุงก้นปล่องมีการ

สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้น โดยพบว่าเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนจัดอยู่ใน genus *Plasmodium* ซึ่งมีช่วงชีวิตที่มีการเพิ่มจำนวนโดยไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นครั้งแรกในเซลล์ตับของคนเรียกว่า exo-erythrocytic schizogony

เชื้อมาลาเรียที่พบในคน ลิงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถแยกได้เป็น 3 subgenus ได้แก่

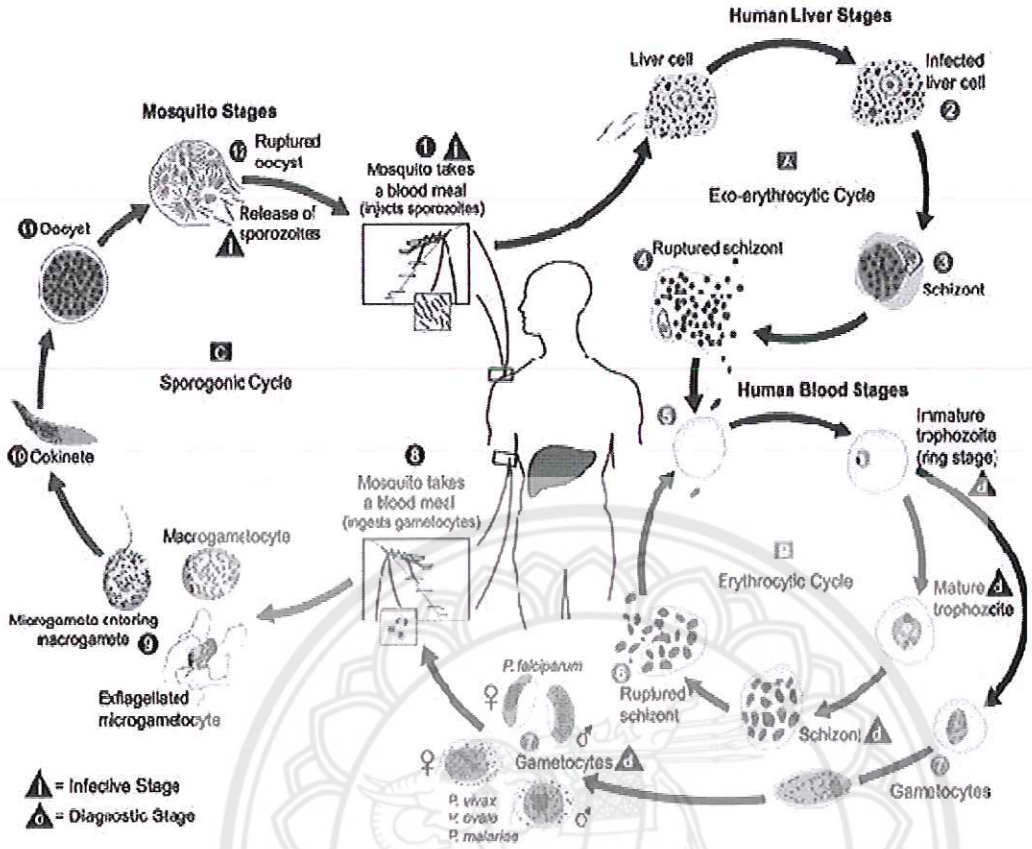
1. Subgenus *Plasmodium* ชนิดที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *P. vivax, P. ovale, P. malariae* และ *P. knowlesi*
2. Subgenus *Laverania* ประกอบด้วย *P. falciparum* ซึ่งเป็นมาลาเรียที่ก่อโรครุนแรงที่สุดในคน
3. Subgenus *Vinckeia* ประกอบด้วย เชื้อมาลาเรียที่พบในลีเมอร์ หนู ค้างคาวและสัตว์อื่นๆ

เชื้อมาลาเรียใน genus *Plasmodium* ประกอบด้วย ชนิด (species) ต่างๆ ประมาณ 120 ชนิด แต่ชนิดที่พบและก่อโรคในคนมี 5 ชนิดได้แก่ *P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale* และ *P. knowlesi* (White *et al.*, 2014)

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียมีวงจรชีวิตที่ต้องอาศัยตัวกลาง 2 ชนิดในการเจริญเติบโตได้แก่ ยุงก้นปล่องและคน โดยยุงก้นปล่องเป็น definitive host หมายถึง คนหรือสัตว์ที่มีเชื้อโรคนั้นๆ อยู่ในร่างกายแล้วสามารถเจริญเป็นตัวแก่และมีการผสมพันธุ์ ขยายพันธุ์ได้ ซึ่งเชื้อมาลาเรียจะมีการเจริญแบบอาศัยเพศ เรียกว่า sporogony และสำหรับคนเป็น intermediate host หมายถึง คนหรือสัตว์ที่มีเชื้อโรคอาศัยอยู่และเชื้อโรคนั้นอยู่ในระยะฟักตัวอ่อนหรือยังไม่มีการสืบพันธุ์ เชื้อโรคนี้ยังสามารถติดต่อสู่คนอื่นและทำให้เกิดโรคได้ ซึ่งเชื้อมาลาเรียจะมีการเพิ่มจำนวนโดยไม่อาศัยเพศ เรียกว่า schizogony เชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิดมีวงจรชีวิตเหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันในเรื่องรูปร่างและการเจริญเติบโตของเชื้อในตัวกลางของเชื้อมาลาเรียบางระยะเท่านั้น โดยแบ่งการเจริญเติบโตเป็น 2 ระยะ คือ

1. การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในยุง (Sporogony)
2. การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในคน (Schizogony) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ระยะ ดังแสดงในภาพที่ 1 คือ
   2.1 วงจรชีวิตไม่มีเพศในเซลล์ตับ (exo-erythrocytic หรือ tissue schizogony)
   2.2 วงจรชีวิตในเม็ดเลือดแดง (erythrocytic schizogony) ซึ่งมีทั้งระยะไม่มีเพศและระยะมีเพศ (gametocyte)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตมาลาเรีย (http://www.cdc.gov/malaria/about/biology)

การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในยุง (Sporogony) (ภาพที่ 1C)

เมื่อยุงก้นปล่องตัวเมียชนิดที่สามารถทำหน้าที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียไปสู่คนได้คือ *Anopheles dirus, Anopheles minimus, Anopheles maculatus* และ *Anopheles sundaicus* กัดและดูดเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียระยะ gametocyte ที่มีช่วงที่เหมาะสมที่จะผสมพันธุ์กันได้ไปเป็นจำนวนมากพอที่จะผสมพันธุ์ในตัวยุงต่อไปได้ เมื่อเชื้อมาลาเรียเข้าสู่กระเพาะอาหารของยุง เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียระยะไม่มีเพศและระยะ gametocyte ที่อยู่ในช่วงไม่เหมาะสมแก่การผสมพันธุ์จะถูกทำลายไป ส่วนเชื้อมาลาเรียระยะ gametocyte ที่มีอายุเหมาะสมแก่การผสมพันธุ์ จะสามารถเจริญต่อไปได้ โดยเชื้อตัวผู้ (microgametocyte) จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเรียกว่า exflagellation ขึ้น โดยมีการแบ่งนิวเคลียสออกเป็น 8 อัน ซึ่งแต่ละอันมีไซโทพลาซึมรูปร่างยาวคล้ายเส้นด้าย ขนาด 20 - 25 ไมโครเมตร (µm) เรียกว่า flagellum ถ้าย้อมด้วยสี Giemsa จะเห็นส่วนตรงกลางมีจุดเล็กๆ ย้อมติดสีแดงและเส้นที่อยู่ข้างๆ ทั้ง 2 ข้างจะย้อมติดสีน้ำเงิน การเกิด exflagellation นี้ ใช้เวลาสั้นประมาณ 10 นาที ในอุณหภูมิที่เหมาะสม คืออุณหภูมิที่ต่ำกว่าในร่างกายคน 5 °C ดังนั้นในเลือดที่เจาะจากผู้ป่วยใหม่ก็อาจจะพบ microgametocyte ในระยะนี้ได้ซึ่งเรียกว่า exflagellated microgamete ในขณะเดียวกันเชื้อตัวเมีย (macrogametocyte) ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงตัวเองสู่ระยะพร้อมผสมพันธุ์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง microgametocyte จะเคลื่อนเข้าไปใน macrogametocyte อย่างรวดเร็ว เป็นการผสมพันธุ์ของ gamete ทั้งสองชนิด โดยการผสมในส่วนของโครมาตินเกิดระยะ zygote และเริ่มเข้าสู่ระยะ sporogony ซึ่ง zygote จะมีรูปร่างกลมและเคลื่อนไหวอยู่ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นประมาณ 18 - 24 ชั่วโมง zygote จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยยืดตัวออกยาวขึ้นและสามารถเคลื่อนไหวได้ จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ ookinete ซึ่งมีขนาดยาวประมาณ 18 - 24 µm ookinate จะเคลื่อนตัวช้าๆ แทรกผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารด้านในไปอยู่ที่ผิวด้านนอกของกระเพาะอาหารของยุง จากนั้นจะสร้างผนังล้อมรอบตัวเกิดเป็นก้อนกลมๆ มีผนังที่ยืดหยุ่นได้ระยะนี้ เรียกว่า oocyst ที่ติดอยู่บนกระเพาะอาหารของยุง จะแตกต่างกันมีตั้งแต่จำนวนเล็กน้อยจนถึงหลายร้อยตัว oocyst ซึ่งเป็นก้อนกลมโปร่งแสงจะโตขึ้นเรื่อยๆ มีขนาดประมาณ 40 - 80 µm ส่วนของนิวเคลียสใน oocyst จะแบ่งตัวเป็นนิวเคลียสเล็กๆ จำนวนมากมาย ต่อมาจะมีไซโทพลาซึมมาล้อมรอบ แต่ละนิวเคลียสเกิดเป็น daughter cell เรียกว่า sporozoite ซึ่งมีรูปร่างยาวคล้ายเข็มมีขนาดยาว

ประมาณ 10 - 15 µm และกว้าง 1 µm ปลายแหลมและมีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง sporozoite จะเจริญอยู่ใน mature oocyst เมื่อจำนวนและขนาดเพิ่มมากขึ้น ผนังที่หุ้ม oocyst จะแตกออก sporozoite จะกระจายเข้าสู่ hemocoel ของยุงและไหลเวียนไปตาม hemolymph สู่ส่วนต่างๆ ของยุง โดยประมาณร้อยละ 2 ของ sporozoite จะเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุงซึ่งเป็นระยะที่ยุงจะถ่ายทอดเชื้อได้ขณะที่ยุงกัดคนส่วน proboscis ของยุงจะชอนไชไปดูดเลือดคนจากเส้นเลือดฝอยใต้ผิวหนังของคน พร้อมกับปล่อย sporozoite เข้าสู่กระแสเลือดของคนและเป็นจุดเริ่มต้นของ human phase เชื้อระยะ sporozoite ก็จะเจริญเป็นวงจรชีวิตแบบไม่มีเพศในคนและทำให้เกิดอาการไข้ รวมทั้งการผลิตเชื้อระยะ gametocyte ต่อไปด้วยวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย ระยะที่อยู่ในยุงตั้งแต่ระยะ gametocyte ถึงระยะ sporozoite จะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับชนิดของยุง อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น

การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในคน (Schizogony) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ

1. เชื้อมาลาเรียระยะในเซลล์ตับ (Tissue schizogony) (ภาพที่ 1A)

ระยะนี้เกิดภายในร่างกายของคนจึงอาจเรียกว่า intrinsic phase เป็นการสืบพันธุ์ด้วยวิธีแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยไม่มีการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ เริ่มตั้งแต่ยุงก้นปล่องตัวเมียที่มีเชื้อระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายมากัดคนและปล่อย sporozoite เข้าไปในกระแสเลือดของคน เมื่อ sporozoite เข้าสู่กระแสเลือดของคน บางตัวจะถูกทำลายโดยเม็ดเลือดขาว ส่วนที่เชื้อที่ไม่ถูกทำลายจะเข้าสู่เซลล์ตับและมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนโดยขบวนการที่เรียกว่า exo - erythrocytic schizogony นิวเคลียสของ sporozoite จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ เข้าสู่ระยะ schizont และมีขนาดโตขึ้น จนมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 45 - 60 µm ส่วนนิวเคลียสจะมีไซโทพลาซึมล้อมรอบกลายเป็น merozoite ซึ่งมีจำนวนหลายพันตัวแตกต่างกัน ซึ่งแต่ละตัวมีขนาดประมาณ 1.0 - 1.8 µm ระยะในการเจริญเติบโต ขนาดของ schizont และจำนวน merozoite จะแตกต่างกัน แล้วแต่ชนิดของเชื้อมาลาเรีย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดเปรียบเทียบความแตกต่างของมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด (White *et al.*, 2014)

	P. falciparum	*P. vivax*	*P. ovale*	*P. malariae*	*P. knowlesi*
ระยะฟักตัว (วัน)	5 - 7	6 - 8	9	12 - 16	9 - 12
ขนาด schizont (µm)	60	45	70	45	ข้อมูลไม่แน่ชัด
จำนวน merozoite ในเซลล์ตับ (ตัว)	40,000	10,000	15,000	2,000	ข้อมูลไม่แน่ชัด
วงจรชีวิตไร้เพศในเม็ดเลือดแดง (ชม.)	36 - 48	48	48	72	24
การเกิดไข้กลับ	ไม่มี	มี	มี	ไม่มี	ไม่มี
จำนวน merozoite ในเม็ดเลือดแดง (ตัว)	18 - 32	12 - 24	6 - 12	6 - 12	6 - 16

ภายหลังจากที่คนได้รับเชื้อประมาณ 6 - 16 วัน เซลล์ตับจะแตกออกและปล่อย merozoite ออกไปโดยเชื้อส่วนใหญ่จะเข้าไปอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงและบางส่วนถูกทำลายโดยเม็ดเลือดขาว merozoite ของ *P. falciperum* และ *P. malariae* ที่อยู่ในเซลล์ตับนั้นเชื้อจะแตกพร้อมๆ กันและไม่มีตกค้างอยู่ในเซลล์ตับเลย จึงไม่เกิดไข้กลับ (relapse) แต่จะมีปรากฏการณ์ของการเป็นไข้ซ้ำ (recurrent parasitemia) เรียกว่า recrudescence เกิดเนื่องมาจากการเจริญแบ่งตัวของเชื้อมาลาเรียชนิดเดิมในเม็ดเลือดแดงที่ทำลายไม่หมดออกมาในกระแสเลือด เนื่องจากร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกันทำลายเชื้อในกระแสโลหิต ทำให้เชื้อมีปริมาณลดลงแต่ไม่หมดไปทีเดียว เมื่อเชื้อจำนวนลดลงภูมิต้านทานก็จะลดลงตามไปด้วย ทำให้เชื้อกลับเจริญแบ่งตัวขึ้นมาอีกจนทำให้เกิด recrudescence ขึ้น และอาจมีการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียทำให้มีการทำลายเชื้อไม่หมดจึงเกิดการแบ่งตัวของเชื้อชนิดเดิมเกิดขึ้น สำหรับการติดเชื้อ *P. vivax* และ *P. ovale* เชื้อระยะ sporozoite บางส่วนที่เข้าไปอยู่ในเซลล์ตับจะพักตัวอยู่ในเซลล์ตับเรียกว่า hypnozoites โดยไม่มีการเจริญหรือแบ่งตัวนานเป็นสัปดาห์หรือเดือนจนกระทั่งเป็นปีๆ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ ก่อนจะเจริญแบ่งตัวแล้วทำให้เกิดไข้กลับ (relapse) (White *et al.*, 2014)

2. เชื้อมาลาเรียระยะในเม็ดเลือดแดง (Erythrocytic schizogony) (ภาพที่ 1B)

เมื่อ merozoite ถูกปล่อยออกจากตับและเข้าไปอาศัยอยู่ในเม็ดเลือดแดงแล้วจะเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไป ซึ่ง merozoite ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* และ *P. ovale* มักจะเจริญในเม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงปกติโดยทั่วไป ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิด *P. malariae* ชอบเจริญในเม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก ซึ่งมีขนาดเล็ก และสำหรับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สามารถเจริญในเม็ดเลือดแดงได้ทุกอายุ แต่ส่วนใหญ่จะพบในเม็ดเลือดแดงขนาดปกติ และ *P. knowlesi* สามารถเจริญได้ในเม็ดเลือดแดงทุกอายุเช่นเดียวกับ *P. falciparum*

พยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยาของโรคมาลาเรีย

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียจะมีอาการในช่วงที่เชื้อมาลาเรียอยู่ในกระแสเลือด อาการจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย (White *et al.*, 2014) โรคมาลาเรียเป็นโรคที่มีลักษณะอาการแบบไม่จำเพาะ โดยอาการแสดงของโรคในระยะเริ่มแรกของการเป็นไข้จะคล้ายกับโรคเขตร้อนหลายๆ โรค เช่น ไข้หวัดใหญ่ ไข้เลือดออก ไวรัสตับอักเสบและอื่นๆ โดยทั่วไปผู้ป่วยจะมีไข้ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดกล้ามเนื้อ ตับและม้ามโต เป็นต้น ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงหรือมีภาวะแทรกซ้อน อาจพบความผิดปกติของอวัยวะหลายอย่าง ดังนั้นการวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยอาศัยอาการทางคลินิกอย่างเดียวอาจจะไม่ถูกต้อง เนื่องจากโรคมาลาเรียไม่มีอาการและอาการแสดงที่จำเพาะ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อมาลาเรียและบอกว่าเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดใด เนื่องจากเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดมีระยะฟักตัวในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ทำให้การแสดงออกของอาการต่างกันด้วย ระยะฟักตัวในผู้ป่วย คือ ระยะตั้งแต่ถูกยุงกัดจนกระทั่งผู้ป่วยเริ่มมีอาการป่วย ระยะนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยทั่วไปประมาณ 10 - 14 วัน แต่อาจนานหลายสัปดาห์หรือหลายเดือนขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันหรือการได้รับยาป้องกันเชื้อมาลาเรียมาก่อน โดยระยะฟักตัวจะแตกต่างกันแต่ละชนิดดังตารางที่ 1 การจับไข้ในคนที่ได้รับเชื้อเป็นครั้งแรกจะเกิดขึ้นทันทีหลังระยะฟักตัวในผู้ป่วย โดยในระยะแรกที่เริ่มมีไข้ ไข้ยังไม่จับเป็นเวลา ผู้ป่วยอาจมีเพียงอาการไม่สบายในระยะ 2 - 3 วันแรก ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตัว อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร หลังจากนั้นในปลายสัปดาห์ไข้จึงจับเป็นเวลาโดยมีเวลาไข้ขึ้นและลงเป็นพักๆ เรียกว่ามี periodicity เนื่องจากเชื้อระยะที่แตกออกจากเซลล์ตับเข้าสู่วงจรในเม็ดเลือดแดงเริ่มจัดตัวให้มีการเจริญพร้อมกัน โดยการจับไข้ตรงกับระยะที่เชื้อในเม็ดเลือดแดงเจริญเต็มที่กลายเป็น mature schizont แล้วเม็ดเลือดแดงแตกออกแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ

1 ระยะหนาวสั่น (cold stage) เป็นเวลา 15 - 60 นาที ผู้ป่วยมักมีอาการหนาวสั่น อุณหภูมิร่างกาย จะสูงขึ้น ชีพจรเต้นเร็ว ความดันเลือดเพิ่มขึ้น ผิวหนังเย็นชืด ซึ่งเป็นผลมาจากการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย

2 ระยะร้อน (hot stage) ระยะนี้กินเวลาประมาณ 2 - 6 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีไข้สูง 39 - 41 ℃ ชีพจรเต้นแรง ในเด็กอาจชักได้ รู้สึกร้อน ลมหายใจร้อน หน้าและผิวหนังแดงและแห้ง ระยะท้ายเหงื่อเริ่มออกเป็นการเข้าสู่ระยะเหงื่อออก

3 ระยะเหงื่อออก (sweating stage) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ในระยะนี้อาการไข้ของผู้ป่วยจะลดลง แต่มีเหงื่อท่วมตัว เหงื่อออกมากบริเวณขมับ ชีพจรและความดันเลือดค่อยๆ ลดลงเป็นปกติและหายไปในที่สุด เมื่อมีการแตกของเม็ดเลือดแดงชุดใหม่ อาการเหล่านี้ก็จะปรากฏอีกครั้ง

4 ระยะพัก คือ ระยะไม่มีอาการจับไข้ ผู้ป่วยจะรู้สึกสบายดีในช่วงเวลา 1 - 2 วัน แล้วแต่ชนิดของเชื้อแล้วจะจับไข้อีก ดังนั้นระยะพักจึงกินเวลานานเท่ากับเวลาของวงจรชีวิตไร้เพศในเม็ดเลือดแดง

ผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในระยะแรกของการติดเชื้อ จะมีอาการไข้ ปวดเมื่อยตามตัว คลื่นไส้หรืออาเจียน ปวดท้องหรือท้องเดินได้ โดยใน 4 - 5 วันแรกของโรค ไข้สูงลอยตลอดเวลา เนื่องจากการแตกของเม็ดเลือดแดงแต่ละชุดไม่พร้อมกัน แต่หลังจากเชื้อมาลาเรียเจริญอยู่ในระยะเดียวกันแล้ว เม็ดเลือดแดงจะแตกพร้อมกันทุก 48 ชั่วโมงจึงทำให้เกิดไข้วันเว้นวัน เรียกว่า tertian malaria และผู้ป่วยมักมีอาการรุนแรงและอันตรายสูงเสี่ยงต่อการเสียชีวิตหากไม่ได้รับการรักษา เนื่องจาก *P. falciparum* สามารถบุกรุกเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ทุกระยะใช้เวลาการแบ่งตัวเพียง 48 ชั่วโมงซึ่งเหมือนกับ *P. vivax* และ *P. ovale* แต่เชื้อมาลาเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการบุกรุกเซลล์เม็ดเลือดแดงในระยะตัวอ่อนเท่านั้น สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* มีระยะฟักตัวประมาณ 6 - 9 วัน เชื้อมาลาเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แม้จะมีอันตรายและความรุนแรงน้อยกว่า P. falciparum แต่สามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ หรือที่เรียกว่า relapse เนื่องจากมีระยะ hypnozoite หลบซ่อนอยู่ในเซลล์ตับ การจับไข้บางครั้งจะมีช่วงเวลาสม่ำเสมอทุก 48 ชั่วโมงจึงเรียกว่า tertian malaria โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่เกิดจากภาวะไข้กลับ สำหรับ *P. malariae* มีระยะฟักตัวประมาณ 12 - 16 วัน เชื้อมาลาเรียชนิดนี้เป็นชนิดที่มีความรุนแรงน้อยที่สุด เชื้อ *P. malariae* สามารถเกิดไข้กลับได้แต่ไม่ได้มีสาเหตุมาจาก hypnozoite โดยเกิดจากเชื้อในร่างกายลดต่ำลงจนไม่มีอาการ เมื่อเชื้อมาลาเรียมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงขึ้นจะทำให้เกิดอาการทางคลินิกอีกครั้ง ซึ่งผู้ป่วยมีไข้ทุก 72 ชั่วโมงหรือวันเว้น 2 วัน ซึ่งเรียกว่า quartan malaria (สมชาย และคณะ 2554)

เชื้อมาลาเรียที่มักจะก่อให้เกิดโรคมาลาเรียรุนแรงได้แก่ *P. falciparum* โรคมาลาเรียรุนแรง เช่น โรคมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะโลหิตจางรุนแรง (severe anemia) ภาวะกรดจากเมตาบอลิซึม (metabolic acidosis) โดยจะพบผู้ป่วยที่จะเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงประมาณ 1-2% โดยกลไกการเกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงแต่ละชนิดนั้นค่อนข้างซับซ้อน (Wassmer *et al.*, 2015) โดยมักจะพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียครั้งแรก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อมาลาเรียจะสามารถสร้างแอนติบอดี ซึ่งสามารถลดความรุนแรงของโรคและลดปริมาณของเชื้อมาลาเรียได้ (Persson *et al.*, 2010) สาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย เป็นมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ได้แก่ การที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียมาเกาะติดกับตัวรับที่อยู่ในหลอดเลือดขนาดเล็กในอวัยวะต่างๆ ทำให้เม็ดเลือดแดงไหลผ่านได้ไม่ดี ส่งผลให้ขาดออกซิเจน นอกจากนี้ยังทำให้มีการกำจัดสารพิษต่างๆ ได้น้อย ทำให้อวัยวะนั้นทำงานได้ไม่เป็นปกติ และเสียการทำงานไปได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ามีปริมาณของสาร lactate เพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง (van der Heyde *et al.*, 2006, Berendt *et al.*, 1994) นอกจากจะมีการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียในหลอดเลือดขนาดเล็กแล้ว ยังพบว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียและเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียจะเสีย deformability ซึ่งการมี deformability ของเม็ดเลือดปกตินั้น จะทำให้เม็ดเลือดสามารถเคลื่อนที่ผ่านหลอดเลือดขนาดเล็กได้ แต่การที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียและไม่ติดเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียมีคุณสมบัติในการ deformability เสียไปนี้ ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงเหล่านี้ไปอุดตันหลอดเลือดขนาดเล็กได้ (Dondorp *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดมาลาเรียชนิดรุนแรงเนื่องมาจากการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยเชื้อมาลาเรีย โดยสารที่สร้างจากเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ glycophosphoidositol จะไปจับกับตัวรับคือ pattern recognition receptor ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เซลล์ที่อยู่ใน innate immune system หลั่งสารไซโตไคน์ชนิด pro-inflammatory ได้แก่ interleukin (IL)-1, IL-6, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF) และ lymphotoxin (LT) และมีการสร้าง superoxide และ nitric oxide (NO) ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อไป โดยส่งผลให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่พบว่า ไซโตไคน์ชนิด TNF และ IFN-γ จะไปทำหน้าที่กระตุ้นให้มีการ upregulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญที่สมองที่จะไปจับกับลิแกนด์ ของเชื้อมาลาเรียที่มีชื่อว่า PfEMP-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ส่งผลให้มีการอุดตันของหลอดเลือดขนาดเล็กได้เช่นกัน (van der Heyde *et al.*, 2006)

การรักษาโรคมาลาเรีย

วัตถุประสงค์ในการรักษาโรคมาลาเรียคือ การกำจัดเชื้อมาลาเรียออกจากกระแสเลือดของผู้ป่วยให้เร็วที่สุด และเพื่อป้องกันการที่ผู้ป่วยจะกลายเป็นโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงการที่เชื้อมาลาเรียจะไม่พัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาและป้องกันการแพร่ของเชื้อมาลาเรียต่อไปด้วย ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกแนะนำให้รักษาด้วยการใช้ยา artemisinin-based combination therapies (ACTs) สำหรับรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* แบบไม่รุนแรง โดยการใช้ยาในกลุ่ม artemisinin ร่วมกับยาชนิดอื่น ที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียที่มีกลไกในการทำลายเชื้อที่ต่างจากกลุ่มยา artemisinin ซึ่งการจะเลือกยาชนิดใดร่วมกับกลุ่มของยา artemisinin ก็ขึ้นอยู่กับการศึกษาเกี่ยวกับ efficacy ของยาของการรักษาในพื้นที่นั้น

สำหรับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* แนะนำให้ใช้ยา chloroquine สำหรับพื้นที่ที่ยังไม่มีรายงานการดื้อยาตัวนี้ แต่สำหรับในพื้นที่ที่มีการดื้อยาต่อเชื้อมาลาเรียชนิดนี้แล้วแนะนำให้ใช้การรักษาโดยใช้ยาในกลุ่ม artemisinin ร่วมกับยาตัวอื่น

สำหรับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย แล้วเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรง แนะนำให้รักษาด้วยยา artesunate โดยการฉีดยาเข้าในชั้นกล้ามเนื้อหรือหลอดเลือดดำ (intramuscular or intravenous) หลังจากนั้นก็รักษาต่อโดยการให้กินยาในกลุ่ม artemisinin ร่วมกับยาชนิดอื่น (WHO: Overview of malaria treatment, 2015)

ปัจจุบันทั่วโลกได้พยายามกำจัดและควบคุมโรคมาลาเรีย ด้วยการรักษาด้วยยาที่เหมาะสม แนะนำให้ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ระบาดใช้มุ้งที่มีสารเคมี เพื่อป้องกันยุงมากัดคน รวมถึงมีการฉีดยาฆ่ายุงในในพื้นที่ระบาดของโรคมาลาเรีย เพื่อกำจัดพาหะของโรคมาลาเรีย ซึ่งได้แก่ยุงก้นปล่อง โดยปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การรักษาโรคมาลาเรีย ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียจึงมีความสำคัญทางคลินิกอย่างมาก โดยผู้ป่วยโรคมาลาเรียจะมีอาการเป็นไข้ หนาวสั่น และเหงื่อออก และมีประวัติไปในบริเวณที่เป็นแหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งแพทย์ก็จะส่งตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ โดยหน่วยงาน Malaria Laboratory Network (MLN) ได้แนะนำวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการไว้ทั้งหมด 4 วิธี ได้แก่ 1) microscopic examination 2) rapid diagnosis test 3) serologic test และ วิธีทาง molecular (Murphy *et al.*, 2013)

101945

สำนักหอสมุด
- 1 ส.ค. 2562

วิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการได้แก่ วิธี microscopic examination โดยการเตรียมฟิล์มเลือดชนิดหนา และชนิดบาง แล้วย้อมฟิล์มเลือดด้วยสีย้อม Giemsa ซึ่งเป็นสีย้อมมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยโรคมาลาเรีย การตรวจด้วยวิธีนี้ จะสามารถรายงานชนิด ปริมาณของเชื้อมาลาเรียได้ จึงเป็นวิธีที่มีประโยชน์มากในแง่ของการติดตามการรักษา นอกจากนี้ยังมีความแม่นยำสูงเนื่องจากเป็นการพบมาลาเรียในฟิล์มเลือด โดยการวินิจฉัยแยกชนิดจะได้จากฟิล์มเลือดบาง ในส่วนของการนับจำนวนของเชื้อมาลาเรียสามารถนับได้ทั้งในฟิล์มเลือดบางหนา โดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียเทียบกับปริมาณเม็ดเลือดแดง และฟิล์มเลือดหนา โดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียเทียบกับเม็ดเลือดขาว ค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้ค่อนข้างต่ำ สำหรับความไวในการตรวจเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี microscopic examination นั้นมีความเท่ากับ 4-100 เซลล์ต่อไมโครลิตร ซึ่งถือว่าค่อนข้างสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูเชื้อมาลาเรียของเจ้าหน้าที่ ในด้านข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี microscopic examination คือต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ และมีความชำนาญในการดูเชื้อมาลาเรีย ต้องมีการควบคุมคุณภาพของการเตรียมฟิล์มเลือดให้ได้มาตรฐาน และเจ้าหน้าที่จะต้องมีความรู้ความชำนาญในการตรวจวินิจฉัย โดยถ้าในตัวอย่างเลือดมีจำนวนเชื้อมาลาเรียน้อย จะทำให้วินิจฉัยผิดพลาดได้ง่ายยิ่งขึ้น ทำเกิดผลลบลวง และในกรณีที่มีการติดเชื้อหลายชนิดในผู้ป่วยคนเดียวกัน (mixed infection) ก็จะวินิจฉัยผิดพลาด โดยรายงานว่าผู้ป่วยรายนั้นติดเชื้อเพียงชนิดเดียว ซึ่งการวินิจฉัยผิดพลาดดังกล่าว ส่งผลให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษา ทำให้ผู้ป่วยกลายเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงได้ (Murphy *et al.*, 2013, White *et al.*, 2014) ในกรณีที่วินิจฉัยผิดพลาด เป็นผลบวกลวง คือวินิจฉัยว่าผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาเป็นโรคมาลาเรีย ทำให้ผู้ป่วยรายนั้นซึ่งป่วยเป็นโรคอื่น ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อมาลาเรีย ส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับยาโดยไม่จำเป็น ทำให้เสียค่าใช้จ่าย และได้รับผลข้างเคียงจากการรับประทานยารักษาโรคมาลาเรียได้

การทำฟิล์มเลือด มีขั้นตอนและวิธีทำดังนี้ (พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ และคณะ 2552)

วิธีทำฟิล์มเลือดแบบบาง

1. ใช้เลือดหนึ่งหยดโดยใช้ syringe หรือหลอด capillary ห่างจากปลายขอบฝ้าประมาณ 1 เซนติเมตร (ซม.) โดยสไลด์แก้วต้องสะอาด ไม่มีไขมัน

2. ใช้สไลด์ตัวไถ (spreader) ที่มีขอบเรียบวางและถอยหลังมาแตะหยดเลือดเมื่อเลือดแผ่กระจายไปเต็มหน้ากระจกตัวไถเอียงกระจกตัวไถให้ทำมุม 30 - 45 องศากับกระจกสไลด์ที่มีหยดเลือด (ขึ้นกับขนาดของหยดเลือด)

3. ไถ spreader ไปข้างหน้าด้วยน้ำหนักและความเร็วสม่ำเสมอ การจัดมุมระหว่างกระจกสไลด์ทั้งสองทำมุมกว้างหรือไถเร็วเกินไป จะทำให้ฟิล์มนั้นหนาเกินไป ในทางตรงกันข้าม ถ้าทำมุมแคบและไถช้า จะทำให้ฟิล์มนั้นบางเกินไป

4. สำหรับฟิล์มเลือดบางก่อนย้อมสีต้องตรึง (fixation) ด้วย methyl alcohol ก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดแดงแตกขณะย้อมสี

วิธีทำฟิล์มเลือดแบบหนา

1. ใช้เลือดหนึ่งหยด โดยใช้กระจกสไลด์ไปแตะเลือด เช่นเดียวกับการทำฟิล์มบาง แล้วใช้กระจกสไลด์อีกแผ่นหนึ่งหรือปลายเข็มที่ใช้เจาะเลือดเกลี่ยกระจายหยดเลือดนั้นออกไป ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ที่มีขนาด 1 x 1 ซม. หรือเป็นรูปวงกลมตามแต่ถนัดควรให้มีความหนาพอที่จะมองเห็นตัวเลขบนหน้าปัดนาฬิกาข้อมือได้ หรือทาบบนตัวหนังสือพิมพ์หมึกดำพออ่านได้ และฟิล์มหนามาตรฐาน ควรจะมีเม็ดเลือดขาวโดยเฉลี่ย 10 - 20 เซลล์ / 1 วงกล้อง

2. วางสไลด์ช่วยให้แห้งเร็วได้โดยการอังความร้อนอ่อนๆ แต่ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับความร้อนสูงหรือความชื้นและควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับแอลกอฮอล์โดยตรงหรือแม้แต่ไอระเหยของแอลกอฮอล์ เพราะจะไปตรึงสีของฮีโมโกลบินมีผลทำให้ฟิล์มเลือดนั้นวินิจฉัยยาก นอกจากนี้ไม่ควรตั้งฟิล์มเลือดหนาทิ้งไว้เป็นเวลาโดยที่ยังไม่ได้ย้อมสีเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด autofixation เนื่องจากออกซิเจนในอากาศ

การย้อมสีฟิล์มเลือด

สีที่ใช้ย้อมฟิล์มเลือดมีหลายชนิด ซึ่งมีพื้นฐานจากสี Romanovsky เช่น สี Giemsa, สี Leishman's, Wright stain หรือ Wright - Giemsa stain เป็นต้น ซึ่งสีในกลุ่มนี้จัดเป็นสีประกอบ คือมีส่วนผสมของ basic dye และ acid dye เกิดเป็น neutral stains โดย Basic dye เป็น cationic dye แตกตัวให้อนุมูลประจุบวก จึงย้อมติดส่วนที่มีประจุลบหรือบริเวณที่เป็นกรดภายในเซลล์ ได้แก่ DNA เป็นต้น Acid dye เป็น anionic dye แตกตัวให้อนุมูลประจุลบ จึงย้อมติดส่วนที่มีประจุบวกหรือบริเวณที่เป็นเบสภายในเซลล์ ได้แก่ ฮีโมโกลบิน เป็นต้น

สำหรับห้องปฏิบัติการมาลาเรียหรือมาลาเรียคลินิก เทคนิคการตรวจหาเชื้อมาลาเรียของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จะใช้สี Giemsa เป็นหลักในการย้อมฟิล์มเลือด อีกทั้งสี Giemsa ถือเป็นสีมาตรฐานในการย้อมสีฟิล์มเลือดเพื่อวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย ส่วนสีที่ใช้กันมากตามสถานพยาบาลอื่น ๆ ก็คือสี Wright's หรือ Wright - Giemsa

วิธี rapid diagnosis test หรือการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วย ชุดตรวจสำเร็จรูป เป็นการตรวจหาโปรตีนของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดโดยอาศัยหลักการ immuno- chromatography โดยนำเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียมาหยดใส่ชุดตรวจสำเร็จรูป และดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยจะเกิดแถบสีขึ้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียที่มีอยู่ในเลือดของผู้ป่วยกับแอนติบอดีที่อยู่ในชุดตรวจสำเร็จรูป ซึ่งบ่งบอกว่ามีเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด ปัจจุบันมีการวินิจฉัยโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ การตรวจ histidine-rich protein II (HRP II), plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) และ aldolase

1. Histidine - rich protein II (HRP - II) เป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ สามารถพบในพลาสมาของผู้ติดเชื้อ *P. falciparum* ดังนั้นจึงใช้ตรวจหา เชื้อ *P. falciparum* เท่านั้น (Wilson *et al.*, 2008)

2. Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) เป็นเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อมาลาเรีย โดยสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อมาลาเรียโดยอาศัยความแตกต่างของ isoform ของ pLDH ในปัจจุบันสามารถแยก pLDH ของ *P. falciparum* กับเชื้อมาลาเรียที่ไม่ใช่ *P. falciparum* (Keluskar *et al.*, 2014)

3. Aldolase เป็น glycolytic enzyme ที่พบในเนื้อเยื่อของ host และเชื้อมาลาเรีย เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการสร้าง dihydroxyacetone phosphate และ glyceraldehydes - 3 phosphate จาก fructose 1, 6 - bisphosphatealdolase และ PfHRP - 2 สามารถใช้ในการระบุชนิดของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ non - *P. falciparum* โดยพบว่า aldolase มีความไวต่อเชื้อ *P. falciparum* ถึงร้อยละ 80 และ มีความไวต่อ *P. vivax* ร้อยละ 37.5 แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อ *P. ovale* และ *P. malariae* (Dzakah *et al.*, 2013)

โดยองค์การอนามัยโรคได้เข้ามาดูแลในด้านของการควบคุมคุณภาพ เพื่อให้การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มามาตรฐานมากขึ้น โดยได้มีการจัดทำเอกสารแนะนำวิธีการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป และตรวจสอบคุณภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธีนี้มีความไวเท่ากับ 500-5,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับบริษัทและยี่ห้อที่ทำการผลิต (Murphy et al., 2013) ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธีนี้ อาศัยความชำนาญของผู้ทำการทดสอบน้อยกว่าวิธี microscopic examination แต่มีราคาแพงกว่า

การวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วย PCR ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนยีน หรือบางส่วนของยีนที่เราสนใจโดยการใช้คู่ของ primer ที่ออกแบบให้จับได้อย่างจำเพาะกับบริเวณยีนดังกล่าว ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denature annealing และ extension ทำซ้ำหลายๆ รอบ โดยอาศัยเอนไซม์ (DNA polymerase) จนได้ PCR product ซึ่งคือบริเวณของยีนที่เราสนใจจำนวนมาก จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มา run gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป โดยสิ่งสำคัญในการทำ PCR คือการออกแบบ primer เพื่อให้การทำ PCR มีประสิทธิภาพ (Saiki *et al.*, 1992, Green and Sambrook, 2012) การออกแบบ primer ต้องคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

1. Base composition ควรจะมีจำนวนของนิวคลีโอไทด์ชนิด GC ประมาณ 40-60 % โดยกระจายอยู่ใน primer นั้นอย่างสม่ำเสมอ และ ควรหลีกเลี่ยง primer ที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เป็น polypurines, polypyrimidines หรือ unusual sequences ต่อกันเป็นจำนวนมาก
2. ความยาวของ primer ควรอยู่ระหว่าง 18-25 bp ซึ่ง primer ทีมีความยาวมากจะมีความจำเพาะสูง แต่จะมีประสิทธิภาพในการจับกับ DNA ต้นแบบ หรือยีนที่เราสนใจได้น้อยลง ดังนั้นจึงควรออกแบบ primer ให้มีความยาวที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทำ PCR นั้นๆ โดยคู่ primer ที่ออกแบบควรมีความยาวแตกต่างกันไม่เกิน 3 bp เนื่องจากความยาวของ primer เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ซึ่งคู่ primer ควรออกแบบให้มี Melting temperature (Tm) แตกต่างกันไม่เกิน 5% นอกจากนี้ควรออกแบบ primer ให้มีอุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing มีอุณหภูมิอย่างน้อย 50°C ซึ่งอุณหภูมิในขั้นตอน annealing โดยทั่วไปจะต่ำกว่า Tm ประมาณ 5°C
3. หลีกเลี่ยงการออกแบบ primer ที่มีคู่สม (complementary) ในสาย primer ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิด secondary structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณด้าน 3' ของ primer เนื่องจากจะทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า hair pin ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR ลดลง
4. หลีกเลี่ยงการออกแบบ primer ที่มีคู่สม ของคู่ primer โดยเฉพาะทางด้าน 3' ซึ่งจะก่อให้เกิด primer dimer ได้

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR โดยการออกแบบ primer ต่อยีนหลายชนิด เพื่อให้มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) มากขึ้นดังนี้

ปี ค.ศ. 1993 Snounou และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี standard PCR กับวิธี microscopic examination โดยการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดจำนวน 5 µL จำนวน 196 ตัวอย่าง และนำ DNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR จากการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อบริเวณ small subunit ribosomal RNA (ssRNA) ของเชื้อมาลาเรีย พบว่าให้ผล positive จากการตรวจด้วยวิธี PCR มากกว่าวิธี microscopic examination จำนวน 23 ตัวอย่าง และนอกจากนี้ การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี PCR ยังช่วยในการวินิจฉัยในกรณีที่มีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดได้ดีกว่าวิธี microscopic examination ด้วย (Snounou *et al.*, 1993) และเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี PCR มีความไวและความจำเพาะที่สูงขึ้น มีการทำ nested PCR ซึ่งผลพบว่าเพิ่มความไว และความจำเพาะที่สูงขึ้น (Snounou *et al.*, 1996)

ปี ค.ศ. 2006 Johnton และคณะ ได้ศึกษาการเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR กับวิธี microscopic examination โดยการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดจำนวน 200 µL จำนวน 348 ตัวอย่าง โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับยีน 18s rRNA ซึ่งเป็นคู่ primer ที่ได้ทำการศึกษามาแล้วโดย Snounou และคณะ ในปี 1996 แต่มีการปรับ PCR condition เล็กน้อย จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกชนิดของมาลาเรียได้ดีกว่า วิธี microscopic examination (Johnston *et al.*, 2006)

ปี ค.ศ. 2011 Oguike และคณะ ได้ศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี PCR โดยมีการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อ sub-species diversity ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. ovale* ได้แก่ *P. ovale wallikeri* และ *P. ovale curtesi* พบว่าสามารถวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียสองชนิดนี้ได้ (Oguike *et al.*, 2011)

ปี ค.ศ. 2013 Anthony และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบการวินิจฉัยมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR กับวิธี microscopic examination โดยออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ 18s rRNA พบว่า ให้ค่า sensitivity เท่ากับ 91.9% และ specificity เท่ากับ 100 % และ dihydrofolate reductase-thymidylate synthease linker region (dhfr-ts) พบว่า ให้ค่า sensitivity เท่ากับ 51.4% และ specificity เท่ากับ 100% ตามลำดับ (Anthony *et al.*, 2013)

ปี ค.ศ 2014 Mekonen และคณะ ได้นำตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมาลาเรียโดยวิธี microscopic examination จำนวน 314 ตัวอย่าง มาวินิจฉัยใหม่ด้วยวิธี PCR พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลเป็น *P. falciparum* จำนวน 180 ตัวอย่างด้วยวิธี microscopic examination ให้ผลเป็น *P. falciparum* เพียง 111 ตัวอย่าง ให้ผลเป็น *P. vivax* จำนวน 44 ตัวอย่าง และให้ผลเป็น mixed infection ระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* จำนวน 18 ตัวอย่าง และ ให้ผลเป็น mixed infection ระหว่าง *P. falciparum* และ *P. malariae* จำนวน 2 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อมาลาเรียจำนวน 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด จากผลการทดลองแสดงให้ว่า มีความผิดพลาดที่เกิดจากการวินิจฉัยโดยวิธี microscopic examination จำนวนมาก (Mekonen *et al.*, 2014)

ปี ค.ศ 2015 Sheng และคณะ ได้ทำ Multiplex PCR โดยออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อ 18s rRNA ต่อเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ซึ่งจะให้ PCR product ที่ขนาด 268 bp, 323 bp, 394 bp, และ 446 bp ต่อ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* และ *P. malariae* ตามลำดับ โดยใช้ plasmids ที่มีส่วนของ 18S rDNA gene มาเป็น DNA ต้นแบบในการศึกษา พบว่าสามารถแยกมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดได้ (Sheng *et al.*, 2015)

เก็บตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ด้วยวิธี microscopic examination และเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* เพื่อนำมาประเมินการติดสีย้อมจากสี Giemsa

ผลการวิจัย

การออกแบบ oligonucleotide primer

การออกแบบ oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum จาก Genbank No. AF145334.1 และนำไปตรวจสอบความจำเพาะของ primer โดยนำไป blast ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งพบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum และใช้ oligonucleotide primer ที่ออกแบบโดย Snounou และคณะซึ่งจากการศึกษาโดย Sounnou และคณะพบว่า oligonucleotide primer ดังกล่าวมีความจำเพาะและความไวที่สูง

เชื้อมาลาเรียที่มักจะก่อให้เกิดโรคมาลาเรียรุนแรงได้แก่ *P. falciparum* โรคมาลาเรียรุนแรง เช่น โรคมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะโลหิตจางรุนแรง (severe anemia) ภาวะกรดจากเมตาบอลิซึม (metabolic acidosis) โดยจะพบผู้ป่วยที่จะเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรงประมาณ 1-2% โดยกลไกการเกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงแต่ละชนิดนั้นค่อนข้างซับซ้อน (Wassmer *et al.*, 2015) โดยมักจะพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียครั้งแรก จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อมาลาเรียจะสามารถสร้างแอนติบอดี ซึ่งสามารถลดความรุนแรงของโรคและลดปริมาณของเชื้อมาลาเรียได้ (Persson *et al.*, 2010) สาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย เป็นมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ได้แก่ การที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียมาเกาะติดกับตัวรับที่อยู่ในหลอดเลือดขนาดเล็กในอวัยวะต่างๆ ทำให้เม็ดเลือดแดงไหลผ่านได้ไม่ดี ส่งผลให้ขาดออกซิเจน นอกจากนี้ยังทำให้มีการกำจัดสารพิษต่างๆ ได้น้อย ทำให้อวัยวะนั้นทำงานได้ไม่เป็นปกติ และเสียการทำงานไปได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ามีปริมาณของสาร lactate เพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง (van der Heyde *et al.*, 2006, Berendt *et al.*, 1994) นอกจากจะมีการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียในหลอดเลือดขนาดเล็กแล้ว ยังพบว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียและเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียจะเสีย deformability ซึ่งการมี deformability ของเม็ดเลือดปกตินั้น จะทำให้เม็ดเลือดสามารถเคลื่อนที่ผ่านหลอดเลือดขนาดเล็กได้ แต่การที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียและไม่ติดเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยที่เป็นโรคมาลาเรียมีคุณสมบัติในการ deformability เสียไปนี้ ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงเหล่านี้ไปอุดตันหลอดเลือดขนาดเล็กได้ (Dondorp *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดมาลาเรียชนิดรุนแรงเนื่องมาจากการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยเชื้อมาลาเรีย โดยสารที่สร้างจากเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ glycophosphoidositol จะไปจับกับตัวรับคือ pattern recognition receptor ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เซลล์ที่อยู่ใน innate immune system หลั่งสารไซโตไคน์ชนิด pro-inflammatory ได้แก่ interleukin (IL)-1, IL-6, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF) และ lymphotoxin (LT) และมีการสร้าง superoxide และ nitric oxide (NO) ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อไป โดยส่งผลให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่พบว่า ไซโตไคน์ชนิด TNF และ IFN-γ จะไปทำหน้าที่กระตุ้นให้มีการ upregulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญที่สมองที่จะไปจับกับลิแกนด์ ของเชื้อมาลาเรียที่มีชื่อว่า PfEMP-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ส่งผลให้มีการอุดตันของหลอดเลือดขนาดเล็กได้เช่นกัน (van der Heyde *et al.*, 2006)

การรักษาโรคมาลาเรีย

วัตถุประสงค์ในการรักษาโรคมาลาเรียคือ การกำจัดเชื้อมาลาเรียออกจากกระแสเลือดของผู้ป่วยให้เร็วที่สุด และเพื่อป้องกันการที่ผู้ป่วยจะกลายเป็นโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงการที่เชื้อมาลาเรียจะไม่พัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาและป้องกันการแพร่ของเชื้อมาลาเรียต่อไปด้วย ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกแนะนำให้รักษาด้วยการใช้ยา artemisinin-based combination therapies (ACTs) สำหรับรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* แบบไม่รุนแรง โดยการใช้ยาในกลุ่ม artemisinin ร่วมกับยาชนิดอื่น ที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียที่มีกลไกในการทำลายเชื้อที่ต่างจากกลุ่มยา artemisinin ซึ่งการจะเลือกยาชนิดใดร่วมกับกลุ่มของยา artemisinin ก็ขึ้นอยู่กับการศึกษาเกี่ยวกับ efficacy ของยาของการรักษาในพื้นที่นั้น

สำหรับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* แนะนำให้ใช้ยา chloroquine สำหรับพื้นที่ที่ยังไม่มีรายงานการดื้อยาตัวนี้ แต่สำหรับในพื้นที่ที่มีการดื้อยาต่อเชื้อมาลาเรียชนิดนี้แล้วแนะนำให้ใช้การรักษาโดยใช้ยาในกลุ่ม artemisinin ร่วมกับยาตัวอื่น

สำหรับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย แล้วเป็นมาลาเรียชนิดรุนแรง แนะนำให้รักษาด้วยยา artesunate โดยการฉีดยาเข้าในชั้นกล้ามเนื้อหรือหลอดเลือดดำ (intramuscular or intravenous) หลังจากนั้นก็รักษาต่อโดยการให้กินยาในกลุ่ม artemisinin ร่วมกับยาชนิดอื่น (WHO: Overview of malaria treatment, 2015)

ปัจจุบันทั่วโลกได้พยายามกำจัดและควบคุมโรคมาลาเรีย ด้วยการรักษาด้วยยาที่เหมาะสม แนะนำให้ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ระบาดใช้มุ้งที่มีสารเคมี เพื่อป้องกันยุงมากัดคน รวมถึงมีการฉีดยาฆ่ายุงในในพื้นที่ระบาดของโรคมาลาเรีย เพื่อกำจัดพาหะของโรคมาลาเรีย ซึ่งได้แก่ยุงก้นปล่อง โดยปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การรักษาโรคมาลาเรีย ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียจึงมีความสำคัญทางคลินิกอย่างมาก โดยผู้ป่วยโรคมาลาเรียจะมีอาการเป็นไข้ หนาวสั่น และเหงื่อออก และมีประวัติไปในบริเวณที่เป็นแหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งแพทย์ก็จะส่งตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ โดยหน่วยงาน Malaria Laboratory Network (MLN) ได้แนะนำวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการไว้ทั้งหมด 4 วิธี ได้แก่ 1) microscopic examination 2) rapid diagnosis test 3) serologic test และ วิธีทาง molecular (Murphy *et al.*, 2013)

กว่าการวินิจฉัยด้วยวิธี microscopic examination ประมาณ 100 เท่า[10] สำหรับการวินิจฉัยโรคมาลาเรียชนิด P. vivax ดังแสดงในตารางที่ 1

Standard PCR

ทดสอบความไวของ oligonucleotide primer สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี standard PCR โดยผสมสารสำหรับทำการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3.75 mM dNTP ความเข้มข้น 156 µM oligonucleotide primer ความเข้มข้น 625 nM และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 0.4 unit (Takara, Japan) จากนั้นใส่ DNA ต้นแบบของเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum จำนวน 1 µL ซึ่งถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2.29 ng/mL, 0.229 ng/mL, 0.029 ng/mL และ 0.0029 ng/mL ตามลำดับ ลงในหลอดทดลอง ทำเช่นเดียวกับเชื้อมาลาเรียชนิด P. vivax โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2.26 ng/mL, 0.226 ng/mL, 0.0226 ng/mL และ 0.0026 ng/mL ตามลำดับ จากนั้นนำสารที่ผสมเรียบร้อยแล้ว ไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ หรือ Thermal cycler (Bio-Active Co., Ltd) และใช้ PCR condition ดังแสดงในตารางที่ 2

Multiplex PCR

ทดสอบความไวของ oligonucleotide primer สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียด้วยวิธี Multiplex PCR โดยผสมสารสำหรับทำการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3.75 mM dNTP ความเข้มข้น 156 µM oligonucleotide primer ต่อ P. falciparum และ P. vivax ความเข้มข้น 625 nM และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 0.4 unit (Takara, Japan) จากนั้นใส่ DNA ต้นแบบของเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิดคือ P. falciparum และ P. vivax ชนิดละ 1 µL ซึ่งถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นจากความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 2.29 ng/mL, 0.229 ng/mL, 0.029 ng/mL และ 0.0029 ng/mL ตามลำดับ สำหรับ P. falciparum และ 2.26 ng/mL, 0.226 ng/mL, 0.0226 ng/mL และ 0.0026 ng/mL ตามลำดับ สำหรับ P. vivax และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control จากนั้นนำสารที่ผสมกันเข้าดีแล้ว ไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ หรือ Thermal cycler (Bio-Active Co., Ltd) และใช้ PCR condition ดังแสดงในตารางที่ 2

Agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้จากการทำ Standard PCR และ Multiplex PCR มาตรวจวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ด้วย 2% agarose gel โดยนำ PCR product จากการทำ Standard PCR หรือ Multiplex PCR จำนวน 10 µL ผสมกับ loading dye แล้วนำไปใส่ในหลุมของ 2% agarose gel ที่แข็งตัวสมบูรณ์แล้ว และแยก PCR product โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงย้อม PCR product ที่ได้ด้วยสาร ethidium bromide และนำไปดูผลด้วยแสง Ultra Violet (UVITEC , Cambridge) เปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ marker (SibEnzyme, USA)

Standard PCR

จากการนำ DNA ต้นแบบ ของเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้ 2.29 ng/mL, 0.229 ng/mL, 0.029 ng/mL และ 0.0029 ng/mL มาทำการทดสอบด้วย standard PCR พบว่าเกิด PCR product ที่มีขนาด 526 bp ซึ่งตรงกับ P. falciparum โดยพบ PCR product ที่ชัดเจนที่ความเข้มข้น 2.29 ng/mL, 0.229 ng/mL และ 0.029 ng/mL และพบแถบจางที่ความเข้มข้น 0.0029 ng/mL ดังแสดงในภาพที่ 1 และสำหรับเชื้อมาลาเรียชนิด P. vivax ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิธี Standard PCR โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้ 2.26 ng/mL, 0.226 ng/mL, 0.026 ng/mL และ 0.0026 ng/mL พบ PCR product ที่ขนาด 120 bp ซึ่งตรงกับ P. vivax ที่ชัดเจนที่เข้มข้น 2.26 ng/mL, 0.226 ng/mL และ 0.026 ng/mL และพบแถบจางที่ความเข้มข้น 0.0026 ng/mL ดังแสดงในภาพที่ 1

Multiplex PCR

จากการนำ DNA ต้นแบบของเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum และ P. vivax ที่ทำการเจือจางแบบ 10 fold dilution มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาที่เรียกว่า Multiplex PCR โดยใช้ Oligonucleotide primers ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการศึกษาพบแถบ PCR product ของเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum ที่ขนาด 526 bp และ แถบของ PCR product ของเชื้อมาลาเรียชนิด P. vivax ที่ขนาด 120 bp ดังแสดงในภาพที่ 2 จากการใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum ที่ความเข้มข้นดังนี้ 2.29 ng/mL, 0.229 ng/mL, 0.029 ng/mL และ 0.0029 ng/mL ซึ่งพบแถบจางที่ความเข้มข้น 0.029 ng/mL และ 0.0029 ng/mL และจากการใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อมาลาเรียชนิด P. vivax ที่ความเข้มข้นดังนี้ 2.26 ng/mL , 0.226 ng/mL, 0.0226 ng/mL และ 0.0026 ng/mL

Table 1 Oligonucleotide primers for P. falciparum and P. vivax identification

Plasmodium species		Oligonucleotide primer	PCR product (bp)
P. falciparum	Forward	ACTGGTTTGGGAAAACCAAA	526
	Reverse	GTCACCTAGAAAGATGACTT	
P. vivax [10]	Forward	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120
	Reverse	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	

Table 2 PCR condition

Step	Temperature (°C)	Time (minutes)
1. Initial denature	95	5
2. Denature	95	1
3. Annealing	58	2
4. Extension	72	2
5. Final extension	72	5
	Step 2-4=40 Cycles	

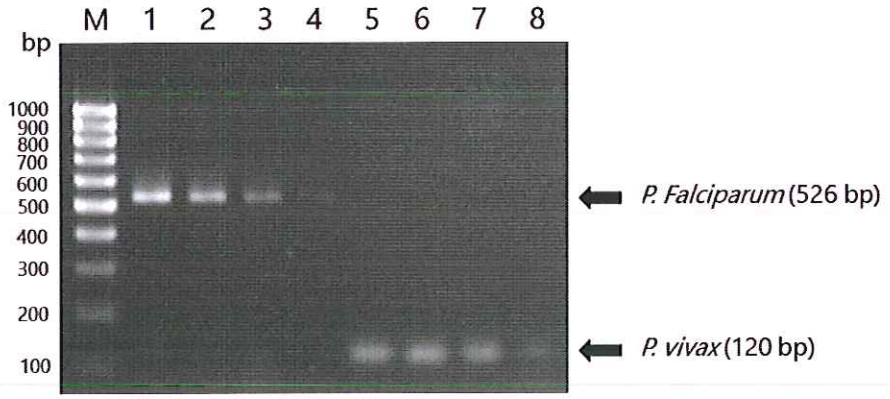


Figure 1 Standard PCR for P. falciparum and P. vivax DNA template; M: Marker 100-1,000 bp, Lane 1, 2, 3 and 4 are P. falciparum DNA at concentration 2.29 ng/mL, 0.229 ng/mL, 0.029 ng/mL, and 0.0029 ng/mL respectively, Lane 5, 6, 7, and 8: P. vivax DNA at concentration 2.26 ng/mL, 0.226 ng/mL, 0.026 ng/mL, and 0.0026 ng/mL respectively.

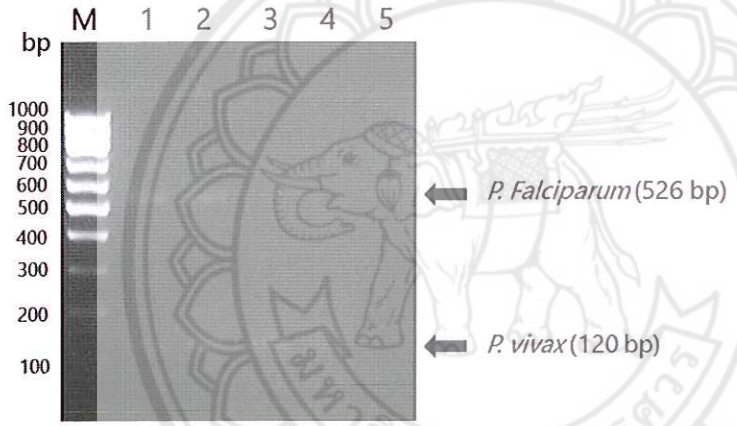


Figure 2 Multiplex PCR to identify P. falciparum and P. vivax; M: Marker 100-1,000 bp, Lane 1: DNA concentration at 2.29 ng/mL (Pf) and 2.26 ng/mL (Pv), Lane 2 DNA concentration at 0.229 ng/mL (Pf) and 0.226 ng/mL, Lane 3 DNA concentration at 0.0229 ng/mL (Pf) and 0.0226 ng/mL, Lane 4 DNA concentration at 0.00229 ng/mL (Pf) and 0.00226 ng/mL (Pv), Lane 5 negative control

การหาผลกระทบของการย้อมสี Giemsa จากความเข้มข้นและเวลาที่แตกต่างกันในการย้อม

เมื่อนำเชื้อมาลาเรียมาย้อมสี Giemsa ที่ความเข้มข้น ต่างๆ และเวลาที่แตกต่างกัน ในช่วง 2.5% -30% และเวลาที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5-60 นาที ความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการย้อมเชื้อมาลาเรียคือ ที่ความเข้มข้น 3% เวลา 30 นาที โดยเป็นระยะเวลาที่สีติดเชื้อมาลาเรียดี และมีตะกอนสีในปริมาณที่น้อยที่สุด

เอกสารอ้างอิง

Anthony C, Mahmud R, Lau YL, Syedomar SF, Sri La Sri Ponnampalavanar S. Comparison of two nested PCR methods for the detection of human malaria. Trop Biomed. 2013 Sep;30(3):459-66.

Berendt AR, Tumer GD, Newbold CI. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. Parasitol Today. 1994 Oct;10(10):412-4.

Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. Parasitol Today. 2000 Jun;16(6):228-32.

Dzakah E E , Kang K, Ni C, Wang H, Wu P, *et al. Plasmodium vivax* aldolase-specific monoclonal antibodies and its application in clinical diagnosis of malaria infections in China. Malaria Journal. 2013;12:199.

Green MR and Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

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 Mar;44(3):1087-9.

Keluskar P,Singh V, Gupta P,Ingle S. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* specific lactate dehydrogenase: Genetic polymorphism study from Indian isolates. Infect Genet Evol. 2014;26:313-22.

Malaria of biology [Internet]. [cited 2015 Nov 20]. Available from http://www.cdc.gov/malaria /about /biology

Mekonnen SK, Aseffa A, Medhin G, Berhe N, Velavan TP. Re-evaluation of microscopy confirmed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria by nested PCR detection in southern Ethiopia. Malar J. 2014 Feb 6;13:48.

Murphy SC, Shott JP, Parikh S, Etter P, Prescott WR, Stewart VA. Malaria diagnostics in clinical trials.Am J Trop Med Hyg. 2013 Nov;89(5):824-39.

Murphy SC, Shott JP, Parikh S, Etter P, Prescott WR, Stewart VA. Malaria diagnostics in clinical trials. Am J Trop Med Hyg. 2013 Nov;89(5):824-39.

Oguike MC, Betson M, Burke M, Nolder D, Stothard JR, Kleinschmidt I, et al. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. Int J Parasitol. 2011 May;41(6):677-83.

Persson KE. Erythrocyte invasion and functionally inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria. Acta tropica. 2010;114(3):138-43.

Saiki RK. The Design and Optimization of the PCR. In: Erlich HA, editor. PCR Technology principles and applications for DNA Amplification. New York: W.H. Freeman and Company; 1992.

Samuel C. Wassmer, Terrie E. Taylor, Pradipsinh K. Rathod, Saroj K. Mishra, Sanjib Mohanty, Myriam Arevalo-Herrera, Manoj T. Duraisingh, and Joseph D. Smith. Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2015;93:42–56.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol. 1993 Apr; 58(2):283-92.

Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. Methods Mol Biol. 1996;50:263-91.

van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. Trends Parasitol. 2006 Nov;22(11):503-8.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet. 2014 Feb 22;383(9918):723-35.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet. 2014 Feb 22;383(9918):723-35.

WHO: Global Health Observatory (GHO) data [Internet] Geneva2011 [cited 2015 Nov 20]. Available from: http://www.who.int/gho/malaria/en/

WHO: Overview of malaria treatment [Internet] Geneva2011 [cited 2015 Nov 20]. Available from: http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/

Wilson NO, Adjei AA, Anderson W, Baidoo S, Stiles JK. Detection of *Plasmodium falciparum* histidine - rich protein II in saliva of malaria patients. Am J Trop Med Hyg. 2008 May;78(5):733-5.

พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ คะนึงนิจ คงพ่วง เชิดชัย แก้วปา ฑิตถากร รอดนาค, ผู้รวบรวม.คู่มือการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ.พิมพ์ครั้งที่ 1.กรุงเทพฯ:ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง; 2552.

สมชาย จงวุฒิเวศย์, โอหาร พรหมาลิขิต, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, อุษา ทิสยากร. วัคซีนป้องกันโรคปรสิต. กรุงเทพฯ: บริษัท นพชัยการพิมพ์ จำกัด; 2554.

สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์โรคมาลาเรียรายสัปดาห์ [Internet] 2558 [cited 2015 Dec 2]. Available from: http://www.thaivbd.org/)