

ผลงานวิชาการอันดับที่ ๑

ประกอบคำขอประเมินผลงาน

ของ

นายธีระยศ กอบอาษา

นักวิชาการสาธารณสุขชำนาญการ

เรื่อง : ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย

ของชุดตรวจสำเร็จรูปมาลาเรีย

ชนิด Paracheck-Pf และ OptiMAL-IT

(Factors influencing the efficiency of malaria rapid tests;

Paracheck-Pf and OptiMAL-IT)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยของชุดตรวจสำเร็จรูปมาลาเรีย

ชนิด Paracheck-Pf และ OptiMAL-IT

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ประเมินผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อประสิทธิภาพการวินิจฉัยเชื้อของ Malaria Rapid Diagnostic Test (MRDT) 2 ชนิด คือ OptiMAL-IT และ Paracheck – Pf โดย MRDT จะถูกจัดแบ่งกลุ่มเก็บให้อยู่ในสภาวะ 5 แบบ คือ ที่อุณหภูมิ 35°C, 40°C และ 45°C, ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 28-37 และ 80-90 เป็นเวลา 1-5 วัน และกลุ่มควบคุมจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-7°C จากนั้นนำ MRDT มาทดสอบกับตัวอย่างมาตรฐาน 3 กลุ่มคือ 1) พบเชื้อ *Plasmodium falciparum* 2) พบเชื้อ *P. vivax* และ 3) ไม่มีเชื้อมาลาเรีย โดยกลุ่มพบเชื้อจะเลือกที่มีความหนาแน่นเชื้อในช่วง 200 - 500 / μ l ซึ่งมีผลการศึกษาบ่งชี้เป็นระดับความหนาแน่นของเชื่อน้อย แต่ความไวในการวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองมากกว่าร้อยละ 100 และใช้วิธี Semi-nested PCR ในส่วนของ Small-Subunit rRNA gene ในการยืนยันชนิดเชื้อของตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ และจากการผลศึกษาพบว่าร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศไม่มีผลต่อลดประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองชัดเจน ส่วนอุณหภูมิที่สูงจะมีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT มากกว่า Paracheck-Pf ที่อุณหภูมิมากกว่า 40°C โดยพบว่า MRDT ในสภาวะที่อุณหภูมิ 40°C นาน 5 วัน ประสิทธิภาพของ OptiMAL-IT จะลดลงจากร้อยละ 100 เป็น 83.33 ส่วน Paracheck-Pf จะลดลงจากร้อยละ 100 เป็น 94.44 และในสภาวะ MRDT อยู่ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 5 วัน ประสิทธิภาพการตรวจของ OptiMAL-IT จะลดลงจากร้อยละ 96.66 เหลือ 77.78 ส่วน Paracheck-Pf จะลดลงจากร้อยละ 100 เหลือ 88.89 รวมทั้งพบการเกิด false negative, false positive, cross reaction มีความถี่มากขึ้น และค่า sensitivity, specificity ที่ลดลง เมื่อ MRDT เก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสำรองควรอยู่ที่ 4-7°C และระหว่างการขนส่งหรือในที่ทุรกันดารควรหลีกเลี่ยงการเก็บที่อุณหภูมิเกิน 35°C อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในระยะสั้นควรศึกษาผลกระทบต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ปี และควรนำข้อมูลจากการศึกษานี้มาพิจารณาปรับใช้ในการบริหารจัดการระบบ logistic เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุด

Factors influencing the efficiency of malaria rapid tests; Paracheck-Pf and OptiMAL-IT

Abstract

This study evaluated the influence of temperature and humidity to the efficiency of 2 malaria rapid diagnostic tests (MRDT); OptiMal-IT and Paracheck-Pf. Five exposure conditions were 35°C, 40°C, 45°C, 28-37% relative humidity, 80-90% relative humidity and control (4-7°C). In each exposure, 3 standards; positive *Plasmodium falciparum*, positive *P. vivax* and negative were evaluated. The parasite densities of the positive controls were in the range of 500-1,000 /mcL which were confirmed by the previous studies as low density but with high accuracy for 2 types of the diagnostic tests. Semi-nested polymerase chain reaction (PCR) based on the detection of small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) gene was exploited as gold standard for malaria species confirmation. Result revealed that humidity had no influence on the efficiency of 2 diagnostic test kit MRDTs. High temperature of more than 40°C affected the diagnosing efficiency of OptiMAL-IT more than Paracheck-Pf. Storing the test kits at 40°C for 5 days resulted in declining of the efficiency of OptiMAL-IT from 100 to 83.33 compared to from 100 to 94.44% of Paracheck-Pf. The exposure of the test kits to 45°C for 5 days reduced the efficiency of OptiMAL-IT from 96.66 to 77.78 and Paracheck-Pf from 100 to 88.89 with high frequency of false positive, false negative and cross reaction resulting the decline sensitivity and specificity. Storing MRDT at 4-7°C for 5 days resulted the average diagnostic test more than 95%. Our results suggest that suitable storage temperature at 4-7°C. Transportation and storage temperature in fields/remote areas should be less than 35°C. However this study was carried out in short period of time, continuation of the study to 1 year will give strong evidence for improving the logistic system.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จจากความร่วมมือด้วยความเต็มใจของผู้ป่วยที่มารับบริการที่มาลาเรียคลินิกแม่ตะวอ และความเอื้อเฟื้อสถานที่ของมาลาเรียคลินิกแม่ตะวอ ตำบลท่าสองยาง อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำย่อ.....	ช
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	24
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	30
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	35
รายการอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก.....	41

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนชนิดของ Pf HRP II ตามพื้นที่ (Initiative for Quality Assurance Of Malaria Rapid test; WHO 2011)	25
ตารางที่ 2 แสดงปัจจัยด้านอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิด <i>P. falciparum</i> ของชุดตรวจ OptiMAL-IT	32
ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อความไว ความและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ <i>P. vivax</i> ของชุดตรวจ OptiMAL-IT	33
ตารางที่ 4 ผลการเปลี่ยนอุณหภูมิต่อความไว ความและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ <i>P. falciparum</i> ของชุดตรวจ Paracheck –Pf	34
ตารางที่ 5 ผลของสถานะที่ 1: ความชื้นสัมพัทธ์ 26–32 % อุณหภูมิ 28–37 °C และสถานะที่ 2: ความชื้นสัมพัทธ์ 80–90 % อุณหภูมิ 21–29 °C ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิด <i>P. falciparum</i> ของชุดตรวจ OptiMAL-IT	36
ตารางที่ 6 แสดงผลของปัจจัยด้านอุณหภูมิในการเก็บต่อค่าประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ <i>P. falciparum</i> ของชุดตรวจ OptiMAL-IT และ Paracheck-Pf	36
ตารางที่ 7 ผลของสถานะที่ 1: ความชื้นสัมพัทธ์ 26–32% อุณหภูมิ 28–37°C และสถานะที่ 2: ความชื้นสัมพัทธ์ 80–90 % อุณหภูมิ 21–29°C ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิด <i>P. vivax</i> ของชุดตรวจ OptiMAL-IT	37
ตารางที่ 8 แสดงผลของปัจจัยด้านอุณหภูมิในการเก็บต่อค่าประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ <i>P. falciparum</i> ของชุดตรวจ OptiMAL-IT และ Paracheck-Pf	42

สารบัญภาพ

	หน้าที่
ภาพที่ 1 หลักการทำงานของ Rapid diagnostic test ในการตรวจจับแอนติเจน	24
ภาพที่ 2 การเตรียมตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการทดสอบ MRDT	26
ภาพที่ 3 แสดงผลผลิต PCR รอบแรกจากการใช้ inter-species primers ในส่วน of SSUrRNA gene	28
ภาพที่ 4 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองจากการใช้ species-specific primers ในส่วน of SSUrRNA gene	28
ภาพที่ 5 การเตรียม Malaria rapid diagnostic เพื่อการทดลอง	29
ภาพที่ 6 แสดงผลการทดสอบ MRDT ในการตรวจหา HRP II หรือ pLDH ที่ระดับความหนาแน่นต่ำกว่า 200 และ 2,000-5,000 / μ l ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> (ภาพจาก Result of WHO product test of Malaria RDTs : Round 1(2008))	39
ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการตรวจพบ RHR II ของชุดตรวจ 15 ชนิด ที่ถูก นำไปเก็บในที่อุณหภูมิ 35 และ 40° C นาน 60 วัน (ภาพจาก Result of WHO product test of Malaria RDTs : Round 1 (2008))	40

คำย่อ

bp = basepair

°C = degree Celsius

DNA = deoxyribonucleic acid

IgG = Immuneoglobulin G

IgM = Immuneoglobulin M

Kda = Kilodalton

Kb = Kilobase

Mb = Megabase

ml = milliliter

mM = millimolar

PCR = polymerase chain reaction

RNA = ribonucleic acid

S = Svedberg unit

Sp. =Species

ssu rRNA =small subunit ribosomal RNA

UV = ultraviolet

μl = microlitre

MRDT = Malaria rapid diagnostic test

บทที่ 1

บทนำ

1.ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rational)

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาของหลายประเทศในเขตร้อน จากข้อมูลสำนักนโยบายและแผน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขในปีงบประมาณ 2553 รายงานอัตราการเกิดโรคมาลาเรียต่อแสนประชากรเท่ากับ 0.93 ผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 24,847 ราย เพิ่มขึ้นจากปี 2552 จำนวน 2,004 ราย หรือร้อยละ 8.77 และจำนวนผู้ป่วยตายด้วยโรคมาลาเรียในปี 2553 ทั้งหมด 88 ราย เท่ากับ 0.14 ต่อแสนประชากรเพิ่มขึ้นจากปี 2552 ที่อัตราป่วยตายเท่ากับ 0.11 ต่อแสนประชากร ปัจจัยที่ทำให้สถานการณ์โรคมาลาเรียเพิ่มขึ้น เกิดจากการเคลื่อนย้ายของแรงงานต่างชาติ มีทั้งที่ถูกกฎหมายจากการขึ้นทะเบียนผ่านผ่านสำนักงานในประเทศไทยได้ แรงงานเหล่านี้บางส่วนที่ยังคงมีเชื้อมาลาเรียในร่างกายเมื่อเข้ามาอยู่ในเมืองไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีชุมพาหะจึงโอกาสแพร่โรคมาลาเรียสู่ชุมชน ภาวะความไม่สงบของสถานการณ์ทางภาคใต้ทำให้ยากแก่การเข้าไปดำเนินการควบคุมโรคในพื้นที่ รวมทั้งปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยา⁽¹⁾

จากการประชุม Ministerial Conference on Malaria (2007) องค์การอนามัยโลก ได้ประกาศมุ่งเน้นหลักการใหญ่ 4 ประการในการควบคุมโรคมาลาเรีย คือ

1. ดำเนินการตรวจวินิจฉัยและรักษามาลาเรียอย่างรวดเร็วเพื่อลดอัตราการตาย
2. วางแผนการใช้มาตรการที่เหมาะสมและสามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่อง
3. ดำเนินการให้สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็ว เพื่อยับยั้งการระบาดของโรคมาลาเรีย
4. พัฒนาขีดความสามารถในการศึกษาวิจัยเชิงประจักษ์เพื่อแก้ไขปัญหาการควบคุมโรคมาลาเรีย

สำหรับประเทศไทยนั้นหลักใหญ่ทั้ง 4 ประการ มีการดำเนินการและพัฒนาค่อนข้างมาก การตรวจวินิจฉัยและการจำแนกชนิดเชื้อในปัจจุบันใช้การตรวจจากฟิล์มเลือดหนา เนื่องจากความสะดวกและราคาไม่แพง ผู้ตรวจที่มีฝีมือสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่ระดับความหนาแน่นประมาณ 100 ตัวเลือด 100 ไมโครลิตร หรือน้อยกว่า ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ตรวจเป็นสำคัญ มาตรการสำคัญ⁽³⁾ในการควบคุมโรคที่ใช้คือ การเร่งรัดการดำเนินการค้นหาและให้การรักษาผู้ป่วยอย่างรวดเร็ว เพื่อตัดการแพร่เชื้อและรักษา ก่อนที่ผู้ป่วยจะมีการแทรกซ้อนรุนแรง โดยการดำเนินการทั้งเชิงรุกและตั้งรับ (Active and passive case detection) ด้วยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดหนาผ่านกล้องจุลทรรศน์

สำหรับข้อผิดพลาดและข้อจำกัดในการตรวจวิธีดังกล่าว ได้แก่

1. ในกรณีผู้ป่วยที่มีเชือน้อย ซึ่งมักพบในสภาวะ

- ผู้ป่วยกินยาป้องกันมาลาเรียก่อนเข้าเขตปรากฏโรค เนื่องจากไม่มียาป้องกันโรคมาลาเรียที่ได้ผลสมบูรณ์ ยามีผลในการกดอาการของโรค ทำให้ระยะฟักตัวของโรคยาวนานขึ้นและการตรวจพบเชื้อมากขึ้น

- ผู้ป่วยเป็นโรคมาลาเรียระยะแรกจะมีจำนวนเชือน้อย ดังนั้นในรายสงสัยต้องมาตรวจซ้ำอีกครั้ง

- ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* นั้น อัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดบางสภาวะอาจมีน้อย ทั้งที่ผู้ป่วยมีเชื้อในร่างกายจำนวนมาก เนื่องจากเชือดังแต่ระยะ late trophozoite เป็นต้น ไปอยู่ในเส้นเลือดฝอยและและเส้นเลือดดำขนาดเล็ก (Sequestration)

2. เทคนิคการข้อม เช่น สีมิตะกอนมาก น้ำยาข้อมเก่า มีการปนเปื้อนเชื้อราหรือแบคทีเรีย ทำให้มองเห็นไม่ชัด

3. การติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด มีโอกาสเกิดขึ้นบ่อยแต่ด้วยข้อดีของการตรวจจากฟิล์มเลือด จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบในครั้งแรก

4. ในการตรวจฟิล์มหนาบางครั้ง ไม่สามารถจำแนกเชื้อมาลาเรียได้ถูกต้อง โดยเฉพาะเชื้อ *P. ovale* และ *P. malariae* ต้องใช้การจำแนกจากฟิล์มเลือดบาง ซึ่งมีข้อจำกัดคือความไวในการตรวจพบเชื้อ การตรวจจากฟิล์มเลือดบางจะต่ำกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนาประมาณ 1 ใน 3 เท่า

5. ปัจจัยอื่นๆ เช่น ปัจจัยส่วนตัว ปัจจัยสิ่งแวดล้อม การปฏิบัติงาน ภาระงานและปัจจัยด้านความรู้⁽⁴⁾

จากปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจผิดหลายอย่าง จึงมีมาตรการเสริมในพื้นที่ทุรกันดารการสนับสนุนกล้องจุลทรรศน์ไม่ครอบคลุม จึงทำให้มีการประยุกต์ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (malaria rapid Diagnostic test; MRDT) มาใช้ในพื้นที่แหล่งระบาดของโรคมาลาเรียไม่สะดวกหรือไม่มีกล้องจุลทรรศน์ เพื่อเพิ่มจุดการให้บริการให้ครอบคลุมเกิดความคล่องตัวสะดวกรวดเร็ว ซึ่งชุดตรวจเหล่านี้ได้ถูกพัฒนาให้มีความสะดวกในการใช้ง่ายต่อการแปลผล สามารถฝึกให้แก่บุคคลที่ไม่มีทักษะในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ก็สามารถใช้ชุดตรวจได้ โดยผลตรวจสอดคล้องกับการตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์จากผู้มีทักษะ⁽⁵⁾ และถูกนำมาใช้งานมากขึ้น ในปี พ.ศ. 2548 ได้มีการสำรวจการใช้ MRDT ทั่วโลกประมาณพบว่าชุดตรวจถูกใช้กว่า 12 ล้านชุด การใช้แพร่หลายกระจายครอบคลุมสู่ระดับสาธารณสุขชุมชนในพื้นที่ระบาดของโรคมาลาเรีย⁽⁶⁾ ซึ่งส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาในการขนส่งไปยังจุดให้บริการ ชุดตรวจต้องสัมผัสกับอากาศที่เปลี่ยนแปลง มีผลการศึกษาว่าชุดตรวจที่ถูกเก็บในที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C เป็นเวลานาน 60 วัน มีผลทำให้ความถูกต้องในการตรวจพบเชื้อลดลงอาจสูงมากกว่าร้อยละ 25 ในชุดตรวจบางชนิด ดังนั้น WHO จึงได้ออกคำแนะนำให้ทุกหน่วยงานที่ใช้ชุดตรวจควรจัดเตรียมระบบควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการขนส่งและการเก็บ⁽⁷⁾ และจากการออกนิเทศงานมักได้รับข้อมูลปัญหาเกี่ยวกับบางครั้งชุดตรวจที่แปลผลไม่ได้ หรือผลการตรวจไม่สอดคล้องกับผลจากตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ควรต้องมีการศึกษาปัญหาอยู่ที่ชุดตรวจที่เกิดจากขั้นตอนการผลิตหรือ

เกิดจากการเก็บไม่เป็นไปตามที่คำแนะนำกำหนดมีผลลดประสิทธิภาพการตรวจ เนื่องจากพื้นที่แหล่งระบาดของโรคมาลาเรียส่วนมากเป็นพื้นที่ทุรกันดาร บางแหล่งอาจขาดอุปกรณ์การเก็บที่เหมาะสม หรือบางครั้งอาจหลีกเลี่ยงไม่ได้ จึงจำเป็นต้องทราบผลกระทบหากชุดตรวจต้องอยู่ในที่อุณหภูมิความชื้นไม่เหมาะสม แต่ส่วนใหญ่จะชุดตรวจอาจอยู่ในที่อุณหภูมิสูงของแต่ละวันในช่วงไม่เกินวันละ 6 ชั่วโมง ไม่มากเหมือนการศึกษาของ WHO ชุดตรวจที่ถูกเก็บในที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C เป็นเวลานาน 60 วัน

2.วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อ

1.ศึกษาผลกระทบของการเก็บ MRDT ในที่อุณหภูมิ 35°C, 40°C และ 45°C และความชื้นสูง ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 28-37 และ 80-90 ในช่วงเวลา 1 - 5 วันต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย (diagnostic efficiency)

3.ขอบเขตการศึกษา

1.ศึกษาผลกระทบของการเก็บ MRDT: OptiMAL-IT และ Paracheck – Pf ในที่อุณหภูมิ 35°C, 40°C และ 45°C ในระยะเวลา 1-5 วัน ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย (diagnostic efficiency)

2.ศึกษาผลกระทบของการเก็บ MRDT: MRDT OptiMAL-IT และ Paracheck – Pf ในที่มี ความชื้นสูง ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 28-37 และ 80-90ระยะเวลา 1-5 วัน ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย (diagnostic efficiency)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

อนุกรมวิธานเชื้อมาลาเรีย

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

Kingdom *Protista*

Subkingdom *Protozoa*

Phylum *Apicomplexa*

Class *Sporozoa*

Subclass *Coccidia*

Order *Eucoccidiida*

Suborder *Haemosporina*

Family *Plasmodiidae*

Genus *Plasmodium*

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

Sub-genus: *plasmodium*

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

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

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

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

Sub-genus: *Laverania* Species: *P. falciparum*, *p. reichenowi*

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

ในธรรมชาติพบว่าเชื้อมาลาเรียมีมากกว่า 120 species โดยพบว่าเชื้อมาลาเรียประมาณ 20 species ทำให้เกิดโรคในลิง ประมาณ 19 species ทำให้เกิดโรคในหนู ค้างคาวและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดโรคในคนโดยทั่วไป ซึ่งได้แก่

P. malariae (Laveran, 1881)

P. vivax (Grassi and Feletti, 1890)

P. falciparum Welch, 1897

P. ovale Stephens, 1922

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

วงจรชีวิต (Life cycle)

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียประกอบด้วยวงจรชีวิตในคนและในยุงก้นปล่องเพศเมีย (*Anopheles* sp.) กระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของยุง ส่วนกระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับในคน

เมื่อยุงก้นปล่องที่มีเชื้อระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายกัดคน sporozoite จะถูกปล่อยสู่กระแสเลือดภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง sporozoite จะเข้าไปเจริญอยู่ในเซลล์ตับด้วยกระบวนการ endocytosis เชื้อหุ้มเซลล์ตับบางส่วนจะถูกนำไปเป็นถุงหุ้ม (parasitophorous vacuolar membrane) เมื่อ sporozoite เข้าสู่ภายในเซลล์ตับจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นกลมหรือรี แล้วพัฒนาต่อไปเป็นระยะ trophozoite ระยะ schizont และระยะ merozoite ตามลำดับ จากกระบวนการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า schizont หรือ merozoite โดย nucleus จะมีการแบ่งตัวแบบ mitosis ซ้ำๆ กัน จนได้ nucleus จำนวนมาก ขณะเดียวกัน cell membrane จะมีการยึดตัวแทรกเข้ามาใน cytoplasm ทำให้ cytoplasm แยกออกเป็นส่วนย่อยๆ เรียกว่า cytomere จากนั้น nucleus จะเคลื่อนที่เข้าไปใน cytoplasm ทำให้ cytoplasm แยกออกเป็นส่วนย่อยๆ เรียกว่า cytomere จากนั้น nucleus จะเคลื่อนที่เข้าไปใน cytomere และสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้นใหม่ โดยแต่ละหน่วยจะแยกตัวออกไปเป็นเซลล์รุ่นใหม่เรียกว่า merozoite เมื่อการแบ่งตัวเสร็จสมบูรณ์จะได้ merozoite ประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัวจาก sporozoite เพียง 1 ตัวของเชื้อ *P. falciparum* ในขณะที่ sporozoite ของ *P. ovale* หรือ *P. malariae* 1 ตัว จะทำให้เกิด merozoite ประมาณ 15,000 ตัว และ *P. vivax* ประมาณ 10,000 ตัว ระยะเวลาที่ sporozoite เจริญเป็น merozoite ในตับต่างกันตามชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยใช้เวลาประมาณ 5-15 วัน ซึ่ง *P. falciparum* ใช้เวลาน้อยที่สุดประมาณ 14-15 วัน

ระยะ schizont ของ *P. falciparum* และ *P. malariae* .ในเซลล์ตับจะเจริญเป็น merozoite และออกจากเซลล์โดยแตกไม่มีเชื้อแฝงในตับ แต่สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* จะมีเชื้อส่วนหนึ่ง

หยุดพักการเจริญในเซลล์ตับชั่วคราวระยะเวลาหนึ่งเรียกว่า hypnozoite (Krotoski et al., 1982) และจะกลับมาเจริญต่อไปเป็นระยะต่างๆดังกล่าวได้อีก โดยการกลับมาเจริญต่อไปใหม่อาจเกิดขึ้นไม่พร้อมกันซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้กลับ (relapse)

ระยะ merozoite ที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนั้น เริ่มต้นที่การรับรู้และการเกาะติดเซลล์เม็ดเลือดแดง (recognition and attachment) จากนั้น merozoite จะหันด้านที่มี apical complex ในแนวตั้งฉากกับผิวของเม็ดเลือดแดง (orientation)⁽⁸⁾ โดยอาศัยตัวจับจำเพาะ (specific receptor) บนผิวเม็ดเลือดแดง เมื่อ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้แล้ว โครงสร้างจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการสลายตัวของเยื่อหุ้มชั้น microtubule และ apical complex เซลล์จะมีรูปร่างกลมตรงกลางมี vacuole ขนาดใหญ่ซึ่งจะดัน nucleus และ cytoplasm ไปอยู่ที่ขอบของเซลล์ ทำให้เพิ่มปริมาณ cytoplasm ทำให้ vacuole มีขนาดเล็กลงเปลี่ยนเป็น growing trophozoite เชื้อมาลาเรียจะแบ่งตัวโดยไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง เมื่อ nucleus แบ่งตัวเต็มที่แล้ว nucleus จะเคลื่อนที่ไปบริเวณขอบเซลล์ที่เกิด cytomere จากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการคลอດตัวมาชิดกันทำให้เกิดเซลล์ใหม่หรือ merozoite กระบวนการที่เชื้อเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงหรือ erythrocytic schizogony ใช้เวลาประมาณ 56-72 ชั่วโมง เมื่อเม็ดเลือดแดงที่ schizont มีการแบ่งตัวอย่างสมบูรณ์แล้วจะแตกออกทำให้ merozoite ถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือด จากนั้นจะถูกลำเลียงเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และเจริญเป็นวัฏจักรต่อไป การแตกตัวของเม็ดเลือดแดงมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไข้หนาวสั่นในผู้ป่วยระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตและแบ่งตัวในเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดว่า asexual erythrocytic stage

การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงจำเป็นต้องใช้สารอาหารจาก host cell เช่น กลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน และฮีโมโกลบิน เป็นต้น โดยที่ฮีโมโกลบินซึ่งอยู่ใน cytoplasm ของเม็ดเลือดแดงที่ถูกกินและย่อยเพื่อนำกรดอะมิโนไปใช้นั้น เชื้อมาลาเรียไม่อาจย่อยสลาย heme ได้และ heme นี้มีพิษต่อเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นจึงถูกกำจัดในรูปของกากอาหาร (malarial pigment หรือ hemozoin) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของ heme⁽⁹⁾ มีลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลาวเพราะมีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้ขนาด ปริมาณและสีของ malarial pigment จะแตกต่างกันเล็กน้อยตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ภายหลังจากเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศประมาณ 2-3 รอบจะมี merozoite จำนวนหนึ่งที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และเจริญเป็นระยะมีเพศเรียกว่า gametocyte โดย gametocyte เพศผู้เรียกว่า microgametocyte หรือ male gametocyte และ gametocyte เพศเมียเรียกว่า macrogametocyte หรือ female gametocyte สำหรับกระบวนการสร้างระยะมีเพศนี้เรียกว่า gametogenesis ปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น gametocyte ยังไม่ทราบแน่นอน แต่อาจเกี่ยวข้องกับอัตราการติดเชื้ออย่างมากของเม็ดเลือดแดง (high parasitemia) ภาวะที่ host มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อใน asexual erythrocytic stage หรืออาจเกิดจากผลของยาบางชนิด⁽¹⁰⁾

เมื่อ merozoite เข้าไปในเม็ดเลือดแดงแล้ว เชื้อมาลาเรียจะเพิ่มจำนวน nucleus และ cytoplasm จน cytoplasm ขยายเกือบเต็มเม็ดเลือดแดงจะพบปริมาณ malarial pigment มากกว่าในระยะ schizont พร้อมกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยใน *P. falciparum* เมื่อเจริญเต็มที่ gametocyte จะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) หรือกล้วยหอม male gametocyte จะมีลักษณะอ้วนสั้นกว่า female gametocyte ส่วน *P. vivax* *p. malariae* และ *P. ovale* gametocyte จะมีลักษณะกลมรีแต่ female gametocyte จะมีขนาดใหญ่กว่าใน male gametocyte และ gametocyte ของเชื้อทั้ง 4 ชนิด เมื่อข้อมด้วยสียิมซาจะพบว่า nucleus ของ male gametocyte จะติดสีแดงอยู่ค่อนข้างกระจุกกระจายโดย gametocyte สามารถอยู่ในกระแสเลือดได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง จนกว่าจะถูกกินเลือดเพื่อเจริญเติบโตต่อไปหรือสลายตัว

เมื่อขงกันปล่องเพศเมียมากัดกินเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรีย ขงจะได้รับเชื้อทุกระยะซึ่งจะถูกย่อยในกระเพาะอาหารของขง ขงเว้นระยะ gametocyte จะเจริญเติบโตต่อไปเป็นระยะ gamete เรียกกระบวนการนี้ว่า gametocyte สำหรับ male gametocyte จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยการแบ่งตัวแบบ mitosis 3 ครั้ง ได้ male gamete แต่ละตัวจะมีแฟลกเจลล่า 1 เส้น และเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) กับ female gametocyte ภายในกระเพาะอาหาร (stomach lumen) ของขงได้ zygote จากนั้นมีการสร้างเท้าเทียมเพื่อจะไชผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารแล้วไปเจริญที่ผิวหนังนอกของกระเพาะอาหารของขงเรียกระยะนี้ว่า ookinete หลังจากนั้นจะพัฒนาต่อไปเป็น oocyst ซึ่งภายในจะมี sporozoite จำนวนมากประมาณ 1,000 ถึง 2,000 ตัว (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991) เมื่อ oocyst เจริญเต็มที่ ผัง oocyst จะแตกเชื้อระยะ sporozoite จะถูกปล่อยแพร่มาสู่ช่องอก (thoracic cavity) และไขต่อมน้ำลาย (salivary gland) ของขง เรียกระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียในขงโดยอาศัยการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจนเกิดการสร้าง sporozoite ว่า sporogony ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 8-21 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียและชนิดของขงพาหะ ตลอดจน สิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิภายนอก เป็นต้น

พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

การศึกษาทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค pulsed field gradient gel electrophoresis และ south blot hybridization (Kemp et al., 1985) ทำให้ทราบว่า *P. falciparum* มีโครโมโซมขนาดแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 650 Kb ถึง 3.4 Mb โดยการจัดเรียงโครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดเป็นโครโมโซมที่ 1 เรียงลำดับตามขนาดขึ้นมาจนถึงโครโมโซมที่ 14 มีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมที่ปลายทั้งสองข้าง (telomere) ของสิ่งมีชีวิตที่มีเชื้อหุ้มนิวเคลียส จะมีความคล้ายกันประกอบด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกันเป็นชุดเรียงติดต่อกัน (tandem repeated sequence) มีหน้าที่ช่วยให้ดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณตอนปลายของโครโมโซมเกิดการจำลองตัวเองอย่างสมบูรณ์และรักษาให้มีสภาพเป็นเส้นอยู่ได้⁽¹⁾ ชนิดต่างๆ ที่มีความจำเพาะกับ gene ที่สร้างโปรตีน

ของเชื้อ *P. falciparum* ได้แก่ glucose phosphate isomerase (*pfpgi*) thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) histidine-rich proteins-II และ III (HRP-II และ HRP III) acidic basic repeat antigen (ABRA) exported protein 1 (Exp-1) apical membrane antigen-1 (AMA-1) M_r 130,000 putative glycophorin-binding protein (GBP-130) merozoite surface antigens (gp 195) glucose-regulated protein (grp) mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) falciparum interspersed repeat antigen (FIRA) dihydrofolate reductase/thymidylate synthase (DHFR/TS) circumsporozoite protein (CSP) knob-associated histidine-rich protein I (KAHRP) serine repeat antigen (SERA) clustered-asparagine-rich protein (CARP) M_r 45,000 merozoite surface antigen (Ag513) และ ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) สำหรับ pH9.45 pS590.7 และ pSc11.63 เป็น probe ที่จำเพาะกับโครโมโซมที่ 8 ที่ 7 และที่ 6 ตามลำดับ ทำให้ทราบตำแหน่งของ gene ต่างๆ บนโครโมโซม (chromosome mapping)⁽¹²⁾ (รายละเอียดดังตารางที่ 1) และเชื่อว่า gene 1 ซึ่งควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมที่เรียงอยู่บนโครโมโซมจะมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (crossingover) ระหว่างการปฏิสนธิในยุง ทำให้เชื้อมาลาเรียรุ่นต่อมาอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมใหม่ที่ต่างไปจากเดิม⁽¹³⁾ ในบางครั้งนิวคลีโอไทด์อาจถูกแทรกเพิ่ม (insertion) หรือหายไป (deletion) ซึ่งอาจนำมาสู่การเปลี่ยนแปลงแบบผ่าเหล่า (mutation)

วิธีการตรวจเพื่อการวินิจฉัยมาลาเรียสามารถจำแนกออกได้เป็น

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

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังเป็นวิธีที่ดีที่สุด ซึ่งนิยมใช้กันอยู่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน จำแนกตามชนิดที่ใช้ย้อม ดังนี้

1. การย้อมด้วยสีย้อมจำแนกเป็น
 - 1.1 การตรวจด้วยฟิล์มเลือดบาง โดยการไถเลือดผู้ป่วยเป็นแผ่นฟิล์มบางๆบนแผ่นสไลด์ และย้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยการ โดยการนับเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย คิดอัตราเป็นร้อยละของเม็ดเลือดที่ติดเชื้อ

1.2 วิธีการตรวจด้วยฟิล์มเลือดหนา โดยการหยดลงบนสไลด์ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกถ้าปล่อยเชื้อมาลาเรียออกมาในระหว่างการข้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 200 ตัว

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการย้อมฟิล์มเลือดด้วยสีย้อมซามีข้อดี คือ

- การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยฟิล์มเลือดหนา โดยผู้เชี่ยวชาญจะมีความไวสูง สามารถหาเชื้อมาลาเรียได้ แม้มีจำนวนน้อยเพียง 40 ตัวในเลือด 1 ไมโครลิตร หรือสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่มีอยู่ 1-5 ตัวในเม็ดเลือดแดงล้านตัว
- มีความจำเพาะสูง สามารถจำแนกชนิดเชื้อ เป็นวิธีที่เหมาะสมในทางปฏิบัติเพื่อวินิจฉัยโรคทางคลินิก ส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที
- เป็นวิธีที่ตรวจได้ง่ายและยังสามารถบอกได้ว่าเชื้อมาลาเรียที่พบมีรูปร่างอย่างไร (Bruce-Chwatt, 1993)

2. การย้อมด้วยสีย้อมครีดิน ออเรนจ์ (Acridine orange stain) จำแนกเป็น

2.1 เนื่องจากการย้อมฟิล์มเลือดด้วยสีย้อมซามีข้อเสีย คือ ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ตรวจเป็นสำคัญ เพื่อให้การตรวจหาเชื้อมาลาเรียง่ายขึ้น จึงใช้สีย้อม acridine orange ย้อมฟิล์มเลือด ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับแสงที่มีช่วงคลื่นสั้นแต่มีพลังงานสูง เช่น แสง ultraviolet และเปล่งแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นยาวกว่า ดังนั้นต้องตรวจกล้องจุลทรรศน์ที่มี interference filter ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นกระจกเคลือบเรืองแสงไว้ได้คอนเดนเซอร์ และใส่ barrier filter SD-54 ซึ่งมีแสงสีเหลืองไว้ได้เลนส์ตา ใช้แหล่งกำเนิดแสงจาก halogen light source ข้อดีของวิธีนี้ คือ เชื้อมาลาเรียที่ถูกย้อมด้วยสีย้อมดังกล่าวสามารถเรืองแสงได้ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังกล่าว ทำให้มองเห็นส่วนประกอบของเชื้อมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงชัดเจนยิ่งขึ้น สามารถตรวจเชื้อมาลาเรียที่ความหนาแน่นประมาณ 5 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร แต่ก็มีข้อเสีย คือ acridin orange มีพิษต่อเยื่อเมือกต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตและไม่สะดวกในการนำมาใช้ในภาคสนาม เพราะต้องใช้อุปกรณ์ประกอบกล้องจุลทรรศน์และเครื่องกำเนิดแสง ซึ่งต่อมาสามารถพัฒนาเลนส์พิเศษขึ้นเดี่ยวใช้กรองแสงแดดให้เหลือเฉพาะแสงที่ทำให้เชื้อมาลาเรียเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) เมื่อย้อมด้วยสีย้อม acridin orange ⁽¹⁴⁾

2.2 Quantitative buffy coat (QBC) เป็นการนำ acridine orange มาเคลือบที่ผิวด้านในของ capillary tube เมื่อบรรจุเลือดลงในหลอดดังกล่าว เชื้อมาลาเรียที่ถูกย้อมจะเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้เลนส์พิเศษ ⁽¹⁵⁾

การตรวจหา antibody ในซีรัม

การศึกษาวิจัยเพื่อตรวจหา antibody ที่มีความเฉพาะต่อเชื้อมาลาเรียมีประโยชน์สำหรับงานทางด้านระบาดวิทยาของมาลาเรีย วิธีการตรวจดังกล่าว ได้แก่

1. Indirect immunofluorescent antibody test (IFA) ⁽¹⁶⁾ โดยนำเอาซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียหรือตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาเจือจางที่ระดับต่างกันโดยลำดับ แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่ทำเป็นแผ่นฟิล์มบนสไลด์หลังจากนั้นนำไปล้างซีรัมส่วนเกินออก นำ antihuman-immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เช่น Fluorescent isothiocyanate (FITC) เป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกขั้นหนึ่ง นำไปตรวจหา antibody ในซีรัมจากการเรืองแสงบนตัวของเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ antigen ที่ใช้ในการตรวจเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน ซึ่งเตรียมจากจากเลือดผู้ป่วยหรือเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ วิธีนี้จะให้ผลบวกในผู้ป่วยมาลาเรียโดยตรวจพบ antibody เมื่อเริ่มมีเชื้อมาลาเรียในเลือดและระดับ antibody จะสูงขึ้นเรื่อยๆ ในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์แรกต่อมาระดับ antibody จะลดต่ำลง antibody ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างนี้ ส่วนใหญ่จะเป็น antibody ชนิด IgG และ IgM โดย antibody ชนิด IgM จะอยู่ไม่นาน แต่ IgG จะอยู่ได้นานกว่า ข้อดีของวิธีการนี้คือการเตรียม antigen สะดวก เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากพอสมควร ซึ่งสัมพันธ์กับการเคยติดเชื้อมาลาเรีย ส่วนข้อเสียคือใช้ได้แต่ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพร้อม เช่น กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้การอ่านผลในห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งอาจใช้ผลสรุปต่างกันและโดยทั่วไปไม่สามารถแยกผู้ที่เคยติดเชื้อมาลาเรียออกจากผู้ที่กำลังมีเชื้ออยู่ภายในร่างกายได้ เนื่องจากระดับ antibody ยังคงอยู่นานภายหลังจากเชื้อได้หมดไปจากร่างกายแล้ว

2. Indirect hemagglutination test (IHA) ⁽¹⁷⁾ เป็นวิธีการตรวจที่อาศัยเม็ดเลือดแดงเป็นตัวกลาง โดยให้ antigen ของเชื้อมาลาเรียที่ไปเกาะเชื่อมโยกับ antigen ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง โดยใช้ tannic acid หรือ chromic chloride เป็นตัวช่วย หลังจากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับซีรัมที่มี antibody ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อจะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจน สามารถอ่านระดับความเข้มข้นของ antibody จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น วิธีนี้มีคุณค่าและประโยชน์ในการตรวจหา antibody คล้ายคลึงกับวิธี IFA ข้อดีของวิธี IHA คือ เป็นวิธีที่กระทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สามารถเก็บ antigen ของเชื้อมาลาเรียในรูปแห้ง (lyophilized) ได้เป็นระยะเวลานานและใช้ตรวจซีรัมได้คราวละจำนวนมาก สามารถประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่ที่มีความไวสูงกว่าวิธี IFA ส่วนข้อจำกัดของวิธี IHA คือ การเตรียมและการทำ antigen ให้ได้มาตรฐานนั้นยุ่งยากกว่าการเตรียม antigen ที่ใช้ในวิธีของ IFA ดังนั้นจึงเตรียมได้เฉพาะห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น และเมื่อนำมาทดสอบผู้ป่วยมาลาเรียระยะเฉียบพลันหรือได้รับเชื้อเป็นครั้งแรก พบว่ามีความไวต่ำกว่าวิธี IFA นอกจากนี้วิธี IHA ไม่สามารถระบุชนิดของ antibody ได้

3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ⁽¹⁶⁾ เป็นปฏิกิริยาที่นำเอา antigen ที่จำเพาะที่ต้องการจะทดสอบมาเกาะติดกับ solid phase เช่น ผิวของ microtiter plate หรือหลอดทดลอง ซึ่งอาจทำมาจากพลาสติกจำพวก polypropylene polyvinyl หรือ nylon หลังจากนั้นเติมซีรัมที่ต้องการจะทดสอบลงไปโดยให้ความเข้มข้นที่ระดับต่างกันหรือใช้ความเข้มข้นของซีรัมระดับ

เคียวลงไป ปล่อยทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา แล้วล้างเอาซีรัมส่วนเกินออก เติม anti-human immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase หรือ alkaline phosphatase ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไปเพื่อให้เกิดสี ตรวจวัดระดับ antibody ที่จำเพาะโดยดูจากสีของ substrate ที่เปลี่ยนไปด้วยตาเปล่าในกรณีที่ต้องตรวจ ซีรัมที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันไปอาจใช้เครื่องอ่านผลช่วย (ELISA reader) วิธี ELISA นี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ค่อนข้างง่าย จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจในภาคสนาม เพื่อนำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมาก (Arruda, 1996) อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้ ELISA reader จะเพิ่มความถูกต้องในการอ่านผลมากขึ้น นอกจากนี้วิธี ELISA ยังเป็นวิธีที่มีความไวสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IHA และการตรวจหาระดับ antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียยังสามารถบอกระดับและความจำเพาะของ antibody ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และชนิดของ antigen ที่ใช้ตรวจสอบ รวมทั้งอาจใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยที่จะเป็นมาลาเรียที่มีอยู่ในพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของมาลาเรียข้อจำกัดคือ การเตรียม antigen ที่ไม่สามารถเตรียมได้ทุกห้องปฏิบัติการและการทดสอบอาจให้ผลลบในผู้ป่วยมาลาเรียระยะเฉียบพลันหรือเพิ่งติดเชื้อครั้งแรก ตลอดจนระดับ antibody อาจคงอยู่นานแม้ว่าจะหายจากโรคมาลาเรียแล้ว

การตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรีย

1. Radioimmunoassay (RIA) และ Immunoradiometric assay (IRMA) การตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรียในเลือด โดยหา antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ของเชื้อมาลาเรียทำการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นตัวทดสอบโดยวิธี RIA และ IRMA หลักการของวิธี RIA คือ solid phase antibody binding inhibition test สามารถตรวจหาเชื้อที่มีอยู่ตั้งแต่ 1-10 ตัวต่อเม็ดเลือดแดง 1 ล้านตัว ทั้งนี้ความไวและความจำเพาะขึ้นอยู่กับ antibody ที่ใช้ ส่วนวิธี IRMA โดยวิธี two-site sandwich วิธี IRMA นี้มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 0.67 ตัว ต่อเม็ดเลือดแดง 1 ล้านตัว⁽¹⁸⁾ แต่เนื่องจากการพัฒนาวิธีการตรวจหา antigen ของเชื้อมาลาเรียโดยใช้สารกัมมันตรังสี มีความยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในภาคสนามหรือทางคลินิก และอาจเป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง

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

2.1 two-site sandwich ELISA หลักการคือ เคลือบผิวของ solid phase ด้วย antibody และเติม antigen ที่ต้องการทดสอบ ล้าง antigen ที่เป็นส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติม antibody

ชนิดเดียวกับที่ใช้เคลือบ solid phase ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะไปจับกับ antigen ที่ทำปฏิกิริยากับ antibody บน solid phase หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไป ถ้ามี antigen ที่ต้องการตรวจสอบในตัวอย่าง เอนไซม์จะเปลี่ยนสี substrate สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า หรือวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นค่า optical density (OD) โดยใช้ ELISA reader เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับเลือดคนปกติ (Khusmith et al., 1992)

2.2 Dot ELISA โดยการนำตัวอย่างเลือดที่ต้องการทดสอบ ไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้วหยดลงบนแผ่น membrane หลังจากนั้นใส่ IgG ซึ่งเป็น monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนของเชื้อมาลาเรียซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase เมื่อเติม substrate ที่เหมาะสม เอนไซม์จะเปลี่ยนสี substrate เกิดจุดสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า วิธีนี้มีความไวสามารถตรวจหาเชื้อได้ที่ระดับความหนาแน่นร้อยละ 0.001 ⁽¹⁹⁾ เมื่อนำวิธีการนี้มาทดสอบกับเลือดของผู้ป่วยมาลาเรีย พบว่ามีความไวคิดเป็นร้อยละ 82-90 และมีความจำเพาะร้อยละ 100 โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม species ของเชื้อมาลาเรีย

2.3 Dye-conjugated monoclonal antibody-based assay (dipstick assay) เป็นวิธีการตรวจที่รวดเร็ว สะดวก สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ สามารถทราบผลภายในเวลา 10-15 นาที โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า *paraSight*[®]-F test ⁽²⁰⁾ และ Immunochromatographic (ICT) test (Garcia et al., 1996) การตรวจมีหลักการดังนี้ โดยแผ่นทดสอบ (nitrocellulose membrane) ประกอบด้วยแถบที่มี monoclonal antibody ต่อ *P.falciparum* histidine-rich protein (PfHRP) -2 ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* โดย PfHRP-2 เป็น antigen ที่ถูกสร้างจาก *P. falciparum* ระยะ trophozoite เมื่อนำแผ่นทดสอบจุ่มในเลือดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแล้ว ถ้าเลือดตัวอย่างมีเชื้อระยะดังกล่าว PfHRP-2 จะทำปฏิกิริยากับ dye-conjugated anti PfHRP-2 monoclonal antibody จะปรากฏแถบสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การทดสอบมีความไวร้อยละ 80-90 ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อมากกว่า 80 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร และการตรวจด้วยวิธีทั้งสองยังให้ผลตรวจว่าติดเชื้อ 28 วันหลังจากได้รับการรักษา

การตรวจหา Nucleic acid

1. Nucleic acid hybridization เป็นวิธีสำหรับการตรวจหา nucleic acid เป้าหมายของเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) เริ่มต้นจากการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่สูญเสียสภาพโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมี เช่น formamide หรือด่าง ดีเอ็นเอสายคู่จะแยกเป็นสายเดี่ยว และถ้าลดอุณหภูมิดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะมาจับคู่ (hybridization) กับสายเดิมโดยลักษณะการจับคู่จะเป็นแบบ antiparalle นอกจากนั้นหลักการของ hybridization สามารถใช้ได้สำหรับ RNA กับ RNA ที่มีลำดับเบสตรงคู่กัน (complementary) โดยจำแนกวิธีการตรวจที่ใช้ดังนี้

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

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

1.1.1.1 DNA probe เตรียมจากสายดีเอ็นเอในส่วนที่จำเพาะกับชนิดของเชื้อ มาลาเรียโดยการทำให้ DNA cloning จากนั้นเลือกสายดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือเอนไซม์ (Barker et al., 1989; Barker et al., 1992) การตรวจด้วยวิธี DNA probe โดยทั่วไปใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง มีความไวของการทดสอบประมาณ ร้อยละ 80-85 และมีความจำเพาะประมาณร้อยละ 90-100 การใช้ DNA probe ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี พบว่ามีความไวมากกว่าวิธีการที่ใช้เอนไซม์ โดยจำนวนเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจะแตกต่างกันแล้วแต่วิธีการและความจำเพาะของ DNA probe ที่ใช้สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรีย ตั้งแต่ 40-500 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด เช่น ความไวของการตรวจไม่ดีกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีเชื้อในเลือดจำนวนต่ำ และวิธี DNA probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นวิธีที่ยุ่งยาก มีอายุการใช้งาน (half life) สั้น ราคาแพง

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

1.1.2 Southern blot hybridization ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่แยกสกัดจากตัวอย่าง แล้วนำไปตัดด้วย restriction endonuclease ที่เหมาะสม นำไปแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis ทำการขนถ่ายดีเอ็นเอจากเจลสู่แผ่นค้ำจุน ซึ่งอาจเป็นแผ่น nitrocellulose หรือ nylon จากนั้นจึงนำไป hybridize กับ probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เอนไซม์ หรือสาร chemiluminescence

1.1.3 Northern blot hybridization ขั้นตอนการทำคล้ายกับ Southern blot hybridization จุดแตกต่างที่สำคัญเป็นการตรวจหา RNA

1.2 Liquid phase hybridization ในหลักการของ hybridization วิธีนี้ nucleotide ที่สกัดจากตัวอย่างและ probe จะต้องติดฉลากด้วย acridinium ester แล้วนำไป hybridize กับตัวอย่างตรวจ และเมื่อเติมค่าง hydrogen peroxide ลงไปจะทำปฏิกิริยากับ acridinium ester ที่อยู่บนตัว probe และจะปลดปล่อยพลังงานแสงออกมา ส่วน acridinium ester ของ probe ที่ไม่ทำปฏิกิริยาจะถูก hydrolysis ไม่สามารถปลดปล่อยพลังงานได้ ซึ่งสามารถวัดปริมาณแสงได้โดยใช้ laminator วิธีของ liquid phase hybridization จะมีความไวมากกว่า solid phase hybridization 7-10 เท่า⁽²¹⁾

2. DNA amplification โดยทั่วไปดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นสายคู่ ซึ่งแต่ละสายจะจับคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่มีความจำเพาะต่อกัน (complementary) โดยเบสชนิด thymine (RNA จะเป็น uracil) สามารถจับคู่กับเบสชนิด adenine และเบสชนิด cytosine มีความจำเพาะกับเบสชนิด guanine ความสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายดีเอ็นเอแบบจำเพาะนี้ ทำให้สามารถสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยลอกแบบดีเอ็นเอต้นแบบได้เหมือนกับสายเดิมทุกประการ วิธี PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้อย่างมาก ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม⁽²²⁾ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนเล็กน้อยเท่านั้น วิธี PCR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 2^n โดย n เท่ากับจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ภายหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ดีเอ็นเอจำนวน 3.4×10^{10} สาย จากสายดีเอ็นเอต้นแบบเพียงสายเดียว ซึ่งได้มีการประยุกต์วิธีการให้เหมาะสมกับลักษณะงาน

2.1 Polymerase chain reaction หลักการของวิธีนี้โดยเริ่มจากการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงในระดับที่ primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวมาจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่ complementary กับ primer และอาศัยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ได้จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* (Brock & Freeze, 1969) นอกจากนี้การประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อเพิ่มและลดอุณหภูมิโดยอัตโนมัติ (automated thermal cycler) ทำให้วิธี PCR ได้รับการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง

การนำวิธี PCR มาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียได้มีการศึกษา โดยใช้ gene ของดีเอ็นเอเป้าหมายที่แตกต่างกัน การใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายเป็น gene ที่มี 1 ชุดต่อ genome เช่น dihydrofolate reductase (DHFR) gene และ circumsporozoite protein (CSP) gene⁽²³⁾ เป็นต้น และการใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีหลายชุดต่อ genome (multicopy gene) เช่น rRNA gene⁽²⁴⁻²⁶⁾ การใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่เป็น multicopy gene จะให้ผลดีกว่าการใช้ gene ที่มีเพียง 1 ชุดต่อ 1 genome

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียมีหลายวิธีเพื่อมาเสริมการทำงาน แต่วิธีที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายคือการตรวจหา circulating antigen ที่สามารถตรวจพบได้ในช่วงที่มีการติด

เชื้อมาลาเรีย คือการตรวจแบบ Immunochromatographic (ICT) ซึ่ง circulating antigen ที่มีบทบาทมากในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย และผลิตภัณฑ์ตรวจโรคมาลาเรีย (MRDT) ออกเพื่อขายใช้ทั่วไปได้แก่

1. Histidine rich protein (HRP) โดยเชื้อ *P. falciparum* ที่เข้าไปเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดง จะให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นปุ่มยื่นออกมา (knob) ซึ่งเป็นปัจจัยประการหนึ่งที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงจากการไปอุดตันหลอดเลือดที่ไปหล่อเลี้ยงอวัยวะที่สำคัญ เช่น สมอง HRP เป็น polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 KDa⁽²⁷⁾ ซึ่งสามารถแบ่ง HRP ออกเป็น 3 ชนิด⁽²⁸⁾ คือ

1.1 HRPI หรือ knob protein (KP) หรือ knob-associated histidine rich protein (KAHRP) ประกอบด้วย histidine ร้อยละ 8 พบแทรกอยู่ใน cytoskeleton ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื่อในส่วนที่เป็นฐานของ knob

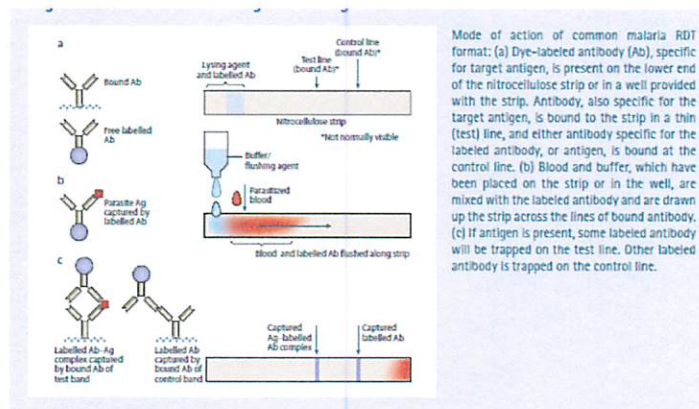
1.2 HRPII เป็น soluble histidine-alanine rich protein (Soluble HARP) หรือ *P. falciparum* HRPII (PfHRPII) ประกอบด้วย histidine ร้อยละ 35 alanine ร้อยละ 37 และ aspartic ร้อยละ 10 ถูกสังเคราะห์และส่งออกนอกเซลล์ในช่วงการเจริญแบบไม่อาศัยเพศ ลักษณะสำคัญของ HRPII คือ

- จะถูกผลิตออกมาเป็นจำนวนมาก
- มี amino acid sequence ซ้ำกัน 12 ชุด
- สามารถจับกับ metal ion
- สามารถกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดี

1.3 HRPIII หรือ Small histidine-alanine protein (SHAP) ประกอบด้วย histidine ร้อยละ 30 alanine ร้อยละ 29 มีการสร้างในระหว่างการเจริญแบบไม่อาศัยเพศ

2. Lactate dehydrogenase (LDH) ประกอบด้วย polypeptide 4 หน่วยย่อย ที่มีการจัดเรียงเป็น enzyme ที่ต่างชนิดกัน (isoenzyme) โดยโมเลกุลของ LDH จะมีน้ำหนักประมาณ 35 KDa จะพบ LDH ในเซลล์ที่ต้องการพลังงาน ซึ่งได้จากปฏิกิริยา glycolysis โดยไม่ใช้ออกซิเจน LDH จะช่วงเร่งการเกิดปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายเพื่อเปลี่ยน pyruvate ให้เป็น acetic acid และพลังงาน⁽²⁹⁾ LDH ของเชื้อมาลาเรียจะมีความจำเพาะสำหรับแต่ละ species และมีความแตกต่าง LDH ของคน⁽³⁰⁾

3. Aldolase มีบทบาทสำคัญของ parasite ในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นพลังงานของ *P. falciparum* และ *P. vivax* ประกอบด้วย 369 amino acids มี sequence ต่างกันน้อยมาก แต่ Meier และคณะได้พบว่า aldolase ที่พบใน *P. berghei* สามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ aldolase-1 และ aldolase-2 ซึ่ง aldolase-1 มีความเหมือนกับ aldolase ที่พบใน *P. falciparum* ระยะ sporozoite ส่วน aldolase-2 จะมี gene sequence ต่างกัน 13 % และพบใน asexual stage



ภาพที่ 1 : หลักการทำงานของ Rapid diagnostic test ในการตรวจจับแอนติเจน

(ภาพจาก Result of WHO product test of Malaria RDTs : Round 1(2008))

WHO ได้ประมาณการว่าประชากรครึ่งหนึ่งของโลกใน 106 ประเทศเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย ในขณะที่มีประชากร 225 ล้านคนป่วยเป็นโรคมาลาเรีย และ 781,000 คนตายด้วยโรคนี้ ความพยายามที่จะเพิ่มศักยภาพในการตรวจหา parasite แม้จะเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังมีผู้สงสัย (suspected case) จำนวนมากที่ได้รับการวินิจฉัยไม่ดีพอ ทำให้มีการใช้ยาเกินความจำเป็นและขาดการควบคุม กำกับการดูแลติดตามผู้ป่วย

WHO แนะนำว่าการดูแลรายที่ป่วยทุกรายต้องใช้การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย แต่การใช้ MRDT ก็มีความจำเป็นโดยเฉพาะพื้นที่ไม่มีกล้องจุลทรรศน์และคนตรวจที่มีประสิทธิภาพ และถูกนำมาใช้มากขึ้นในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา แต่ก็ยังมีข้อจำกัดได้ถูกนำมาเปรียบเทียบเมื่อนำมาใช้ในภาคสนามในความต่างธรรมชาติของเชื้อและการระบาด WHO เห็นว่าสมควรมีการรวบรวมข้อมูล เพื่อใช้ประโยชน์ประกอบการตัดสินใจเลือกใช้และจัดหา ได้ดำเนินการจัด Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) และจัดตั้งกองทุน Foundation for innovation New Diagnostic (FIND) ให้ประเมิน MRDR ที่มีจำหน่าย แม้ว่า Monoclonal antibody ออกแบบเพื่อจับกับแอนติเจนทั้ง 3 คือ PfHRP2 , pLDH, aldolase ชุดตรวจจับกับแอนติเจนตัวเดียวกันแต่ตัว Monoclonal antibody ของแต่ละบริษัทอาจไม่เหมือนกัน โดยเมื่อนำทดสอบพบว่ามีความไวและความถูกต้องสูงมากในพื้นที่หนึ่ง แต่อาจต่ำมากในอีกพื้นที่ เพราะแอนติเจนก็มีความหลากหลาย เช่น PfHRP2 มีการจำแนกออกเป็น 4 ชนิด ตามจำนวนชุดของ amino acid ที่ซ้ำกัน โดยชนิด A มีซ้ำมากกว่า 100, ชนิด B มี 50-100 ชุด ชนิด C มีน้อยกว่า 43 ชุด และชุด borderline มี 44-49 ชุด และเมื่อนำมาหาการกระจายของแต่ละชนิดในแต่ละภูมิภาคพบความแตกต่างดังตารางที่ 1 ⁽³¹⁾

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนชนิดของ Pf HRP II ตามพื้นที่ (Initiative for Quality Assurance Of Malaria Rapid test; WHO 2011)

พื้นที่	จำนวน	ชนิดของ PфHRP II			
		A	B	C	Borderline
แอฟริกา	135	14(10%)	101(75%)	12(9%)	8(6%)
จีน	10	2(20%)	5(50%)	3(30%)	0
แอฟริกา	84	9(11%)	50(77%)	9(11%)	16(19%)
อเมริกาใต้	54	9(16%)	45(83%)	0	0
เอเชีย คอ นต	90	8(9%)	47(52%)	31(34%)	4(4%)
รวม	373	42(11%)	248(66%)	55(15%)	28(8%)

ดังนั้นการเก็บข้อมูลพื้นฐานการใช้งานของชุดตรวจ จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำมาประกอบการเลือกใช้ การซื้อ การขนส่ง และการนำผลสอบทดไปใช้

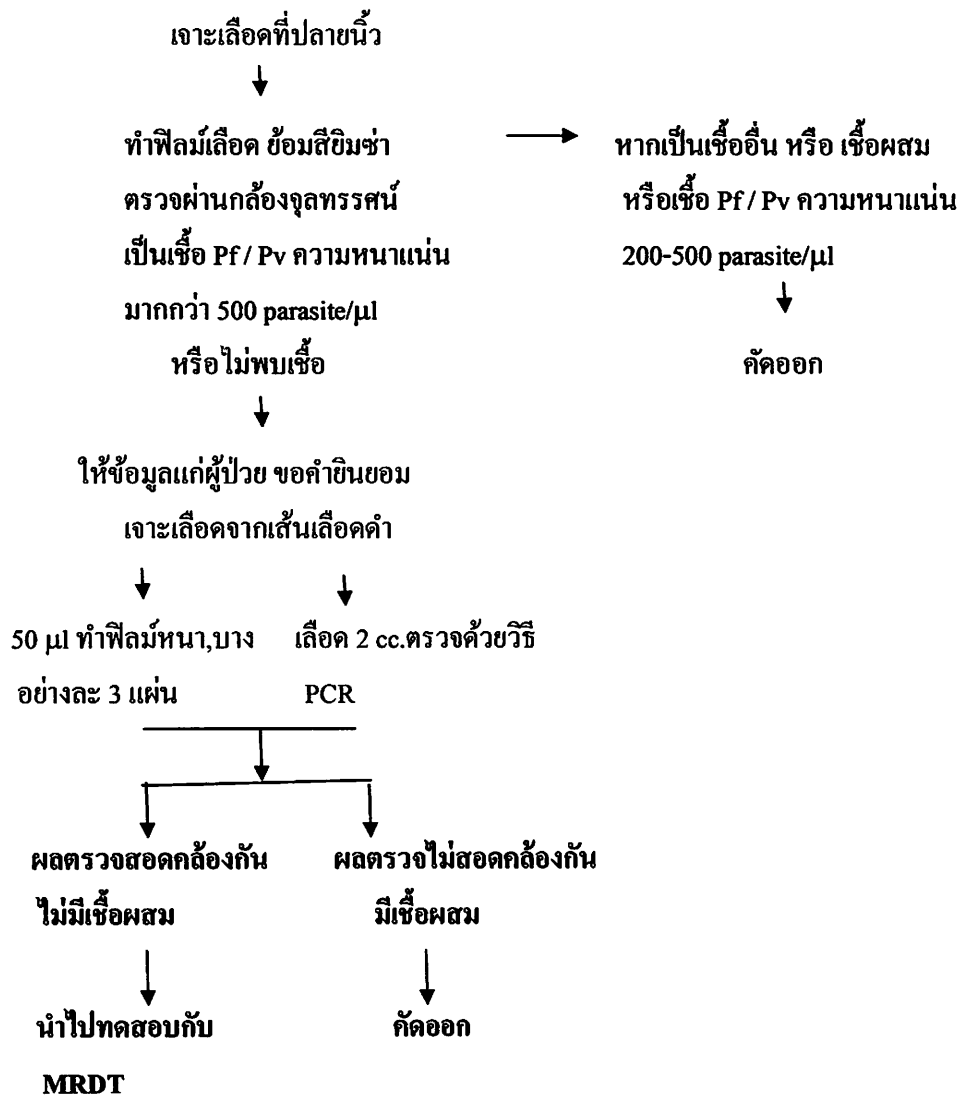
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study) เพื่อศึกษาผลของปัจจัยด้านความร้อนและความชื้นต่อการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยของ MRDT

ภาพที่ 2 การเตรียมตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการทดสอบ MRDT



ตัวอย่างเชื้อมาตรฐาน ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่มามาเรียคลินิกแม่ตะวอ อำเภอสองยาง จังหวัดตาก จำแนกตัวอย่างเลือดที่เก็บออกเป็น 3 ประเภท ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย พบเชื้อชนิด *P. falciparum* และพบเชื้อชนิด *P. vivax*

การตรวจนับความหนาแน่นและการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย ใช้ตรวจจากฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมด้วยสียิมซาความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 10 นาที ตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเจ้าหน้าที่ที่ผ่านการอบรมและมีประสบการณ์ในการตรวจเลือดมาลาเรีย จำนวน 3 คน รายที่ตรวจไม่พบเชื้อต้องตรวจไม่น้อยกว่า 200 กล้อง ในรายพบเชื้อให้จำแนกชนิดเชื้อ และตรวจนับจำนวนเชื้อเพื่อหาความหนาแน่นของเชือดังสูตร :

$$\frac{\text{จำนวนเชื้อมาลาเรีย} \times 8,000 \text{ เม็ดเลือดขาว} / \text{mcL}}{100 \text{ เม็ดเลือดขาว}} = \text{จำนวนเชื้อ} / \text{mcL}$$

การยืนยันผลการจำแนกชนิดเชื้อของตัวอย่างมาตรฐานอีกครั้ง ด้วยวิธี PCR โดยการสกัด DNA โดยใช้ Wizard Genomic DNA Purification System (Promega) kit จากนั้นนำ DNA ที่ได้มาทำ Semi-nested PCR ในส่วนของ SSU r RNA gene ของเชื้อมาลาเรีย⁽⁵⁾ โดยใช้ Oligonucleotide ที่เป็น inter-species primers P1: 5' ACGATCAQTACCGTCQTAATCTT-3, P2: 5'-GAACCCAAAGACTTTGATTTCTC AT-3 และที่เป็น species – specific primers สำหรับ *P. falciparum* (F2): 5'-CAATCTAAAAGTCACCTCGAA AGATG-3, *P. malariae* (M1): 5'-GGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCATAT-3, *P. ovale* (O2): 5'ACTG AA GGAAGCAATCTAAGAAATTT-3, *P. vivax* (V1) 5'-CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAG AAA-3 โดยใช้ Automatic thermal cycle (Perkin Elmer)

การคัดเลือกตัวอย่างมาตรฐาน สำหรับใช้ทดสอบชุดตรวจในการยืนยันชนิดเชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบ โดยใช้ผลจากฟิล์มหนาที่สอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธี Semi-nested PCR เพื่อความชัดเจนในการแปลผลกรณีการเกิด cross-reaction ของชุดตรวจเลือด และคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีความหนาแน่นของเชื้อประมาณ 500-1000/mcL ซึ่งเป็นระดับความหนาแน่นน้อย แต่ความถูกต้องในการตรวจของ MRDT ที่ใช้ RHP-2 หรือ pLDH มีความไวมากกว่าร้อยละ 95 และ จากการศึกษาในประเทศไทยและปรูการตรวจหา Pf ด้วย MRDT พบว่าความไวเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อความหนาแน่นของเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 500 /mcL และความไวในการตรวจจะลดลงอย่างมีนัยสัมพันธ์กับการลดลงของความหนาแน่นของเชื้อในกระแสเลือด⁽⁶⁾ มาใช้ความหนาแน่นของเชื้อเพื่อทดสอบกับ MRDT ที่ถูกจัดเตรียมให้อยู่สภาวะแวดล้อมที่มีปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจ แบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัวอย่าง คือกลุ่มที่ 1 พบเชื้อ *P. falciparum* กลุ่มที่ 2 พบเชื้อ *P. vivax* กลุ่มที่ 3 ไม่พบเชื้อ

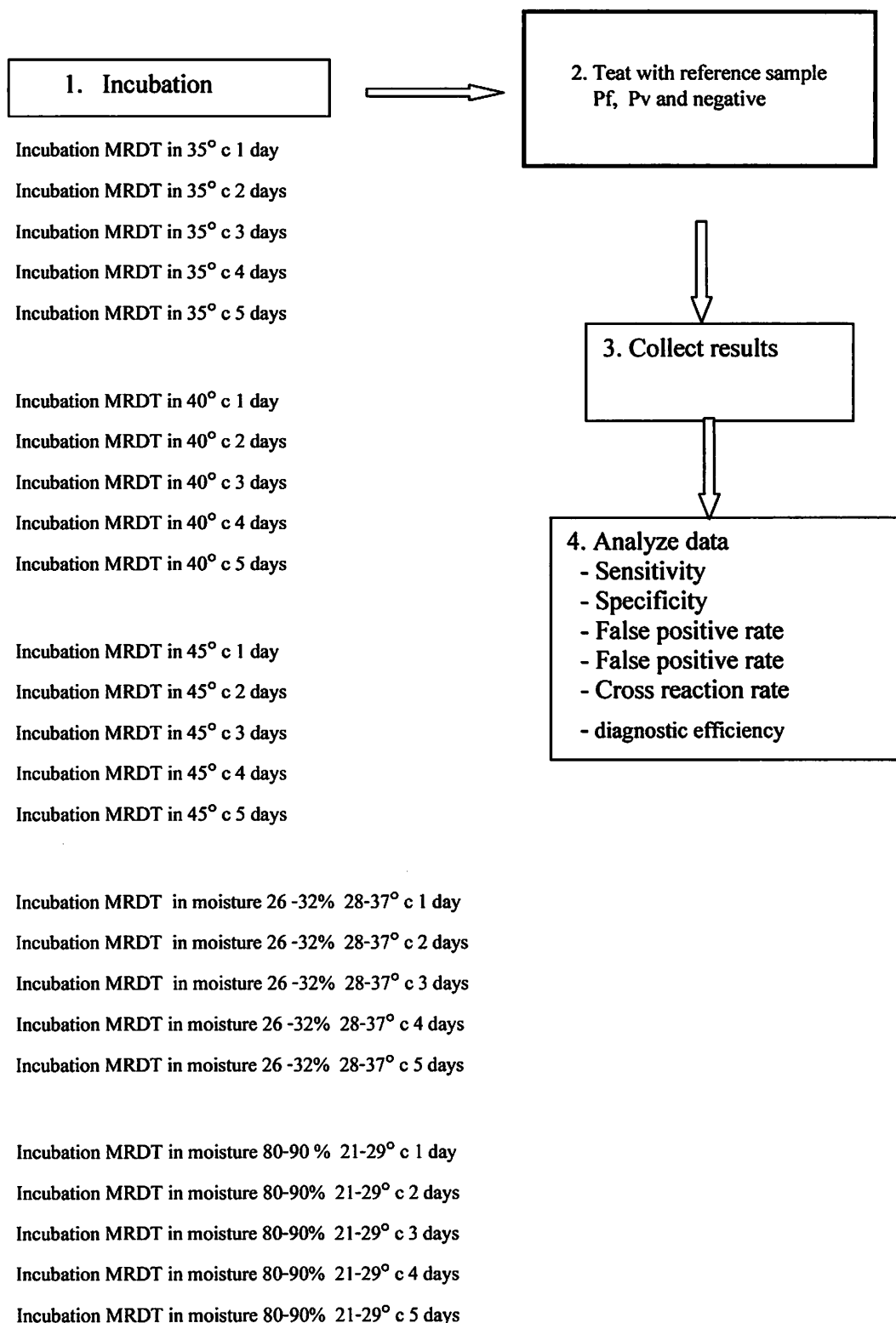


ภาพที่ 3 แสดงผลผลิต PCR รอบแรกจากการใช้ inter-species primers ในส่วนของ SSUrRNA gene



ภาพที่ 4 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองจากการใช้ species-specific primers ในส่วนของ SSUrRNA gene

ภาพที่ 5 การเตรียม Malaria rapid diagnostic เพื่อการทดลอง



Control group: เก็บที่อุณหภูมิ 4-7 ° C

โดยแบ่งสภาวะเก็บชุดตรวจก่อนการนำมาใช้ทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ชุดทดสอบทั้งซองจะถูกเก็บในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 35°C, 40°C และ 45°C ในแต่ละระดับอุณหภูมิจะแบ่งออกเป็นอีก 5 กลุ่มย่อย โดยเก็บที่อุณหภูมิเดียวกันแต่จำนวนวันที่ต่างกันคือ 1, 2, 3, 4 และ 5 กลุ่มย่อย ในแต่ละกลุ่มย่อยจะใช้ชุดทดสอบกลุ่มละ 30 MRDT

กลุ่มที่ 2 ชุดทดสอบจะถูกนำออกจากซองกันชื้นให้สัมผัสกับอากาศภายนอก โดยใช้หน่วยวัดเป็นร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ (Relative Humidity) คือ อัตราส่วนโดยมวลของไอน้ำในอากาศในขณะหนึ่ง(ที่อุณหภูมิหนึ่ง) ต่อ ไอน้ำสูงสุดที่อากาศสามารถแบกรับไว้ได้ในการวัดความชื้นสัมพัทธ์ โดยใช้ Hygrometer วัดทุก 6 ชั่วโมงแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.1 แผ่นทดสอบถูกนำออกจากซองเพื่อสัมผัสกับอากาศช่วงฤดูที่ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศประมาณร้อยละ 20-40 และอุณหภูมิประมาณ 25-40°C เป็นพื้นที่เขตเมือง ทำการบันทึกข้อมูลทุก 6 ชั่วโมง และรายงานค่าสูงสุดและต่ำสุด และระบุในภาวะที่ 1 และแบ่ง MRDT ออกเป็น 5 กลุ่มย่อย โดยเก็บที่ความชื้นและอุณหภูมิเดียวกันแต่จำนวนวันที่คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 กลุ่มย่อยละ 30 ชุดทดสอบ

2.2 นำแผ่นทดสอบถูกนำออกจากซองเพื่อสัมผัสกับอากาศช่วงต้นฤดูหนาวที่ความชื้นในอากาศประมาณร้อยละ 70-90 และอุณหภูมิประมาณ 21-29°C เป็นพื้นที่แหล่งระบาดของโรคช่วงฤดูฝน ทำการบันทึกข้อมูลทุก 6 ชั่วโมง และรายงานค่าสูงสุดและต่ำสุด และระบุในภาวะที่ 2 และแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มย่อย โดยเก็บที่ความชื้นและอุณหภูมิเดียวกันแต่จำนวนวันที่คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มย่อยละ 30 ชุดทดสอบ

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม ชุดทดสอบทั้งซองจะถูกเก็บอุณหภูมิตามคำแนะนำของ WHO คือ 4-7°C เพื่อใช้เป็นกลุ่มมาตรฐานในการเปรียบเทียบ โดยจะนำมาทดสอบในจำนวนที่เท่ากับกับกลุ่มที่ 1 และ 2 มาศึกษาเปรียบเทียบ

วัสดุ

ชุดตรวจ MRT ในรูปแบบหลักการทำงานของ Immunochromatographic test ที่หน่วยงานราชการนิยมนำมาใช้ในงานสำรวจโรคมาลาเรียและงานวิจัย 2 ชนิด คือ

- DiaMed OptiMAL[®] test (Dia Med Cresier Sur Morate, Switzerland) Cat no. REF 710000 batch 04651
- Paracheck Pf[®] test (Orchid biomedical Systems, India) Cat no. 600-000 batch 32122

การวิเคราะห์ข้อมูล จากผลการทดสอบคำนวณค่า sensitivity – specificity. Cross-reaction, False positive, False negative ของชุดตรวจ Paracheck-Pf และ OptiMAL-IT กับตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ Thick film และ PCR เป็น gold standard เพื่อนำมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจ⁽⁷⁾ โดยใช้สูตร

$$\text{Sensitivity} = \frac{(\text{true positive})}{(\text{true positive} + \text{false negative})} \times 100$$

$$\text{Specificity} = \frac{(\text{true negative})}{(\text{false positive} + \text{true negative})} \times 100$$

$$\text{Diagnostic efficiency} = \frac{1 - \frac{\text{False negative} + \text{False Positive}}{\text{Total samples}}}{1} \times 100$$

$$\text{Cross reaction} = \frac{\text{จำนวนชุดตรวจที่แปลผลผิดชนิด} \times 100}{\text{จำนวนชุดตรวจที่ใช้ทดสอบทั้งหมด}}$$

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นจากระดับ 35°C, 40°C และ 45°C ในจำนวนวันที่มากขึ้น มีผลต่อความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT มีค่า diagnostic efficiency ต่ำกว่าระดับร้อยละ 95 ชุดตรวจที่อยู่ในสภาวะระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1 วันและค่า diagnostic efficiency ลดลงจากร้อยละ 100 เหลือร้อยละ 77.78 เมื่อชุดตรวจอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 45°C ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน รวมทั้งพบการเกิด false negative, false positive, cross reaction มีความถี่มากขึ้น และค่า sensitivity, specificity ที่ลดลงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปัจจัยด้านอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิด *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT

ดัชนี (%)	อุณหภูมิ (°C)	วันที่					หมายเหตุ
		1	2	3	4	5	
Sensitivity	control	100	83.33	83.33	100	100	Aver. = 93.33
	35	83.33	100	100	100	100	Aver. = 96.67
	40	100	100	100	100	83.33	Aver. = 96.67
	45	100	100	83.33	100	83.33	Aver. = 93.34
Specificity	control	100	100	100	100	91.67	Aver. = 98.34
	35	91.67	91.67	91.67	100	91.67	Aver. = 93.34
	40	100	91.67	83.33	83.33	83.33	Aver. = 88.34
	45	91.67	83.33	83.33	75	75	Aver. = 65.0
Diagnosis efficiency	control	100	94.44	94.44	100	94.44	Aver. = 96.66
	35	94.44	94.44	94.44	100	94.44	Aver. = 95.56
	40	100	94.44	88.89	77.78	83.33	Aver. = 88.89
	45	94.44	88.89	83.33	83.33	77.78	Aver. = 85.56
Cross-reaction	control	0	16.67	0	0	0	Aver. = 3.34
	35	0	16.67	0	16.67	0	Aver. = 6.67
	40	0	16.67	16.67	16.67	16.67	Aver. = 13.34
	45	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	Aver. = 16.67
False positive	control	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	35	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	40	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	45	0	0	0	0	0	Aver. = 0
False negative	control	0	0	16.67	0	0	Aver. = 3.30
	35	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	40	0	0	16.67	16.67	16.67	Aver. = 10.01
	45	0	16.67	16.67	16.67	33.33	Aver. = 13.34

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นจากระดับ 35°C, 40°C, 45°C และในจำนวนวันที่มากขึ้น มีผลต่อความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *P. vivax* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT โดยค่า diagnostic efficiency ต่ำกว่าระดับร้อยละ 95 โดยชุดตรวจ OptiMAL-IT ที่อยู่ในสภาวะระดับอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 วันค่า diagnostic efficiency อยู่ที่ระดับร้อยละ 94.44 และลดลงอยู่ที่ระดับร้อยละ 83.33 เมื่อชุดตรวจอยู่ในสภาวะ

อุณหภูมิ 45°C ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน รวมทั้งพบการเกิด false negative, cross reaction มีความถี่มากขึ้น และค่า specificity ลดลง ส่วนค่า sensitivity และ false positive เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ *P. vivax* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT

ดัชนี (%)	อุณหภูมิ (°C)	วันที่					หมายเหตุ
		1	2	3	4	5	
Sensitivity	control	100	100	100	83.33	100	Aver.= 96.67
	35	100	100	100	100	100	Aver.= 100
	40	100	83.33	100	100	100	Aver.= 96.67
	45	100	100	100	83.33	83.33	Aver.= 96.67
Specificity	control	100	100	100	100	100	Aver.= 93.34
	35	100	100	100	100	100	Aver.= 100
	40	91.67	100	91.67	83.33	83.88	Aver.= 90.0
	45	83.33	91.67	75	83.33	83.33	Aver.= 83.34
Diagnosis efficiency	control	100	100	100	94.44	100	Aver.= 98.89
	35	100	100	100	100	100	Aver.= 100.0
	40	94.44	94.44	94.44	88.89	88.89	Aver.= 92.22
	45	88.89	94.44	83.33	83.33	83.33	Aver.= 86.67
Cross-reaction	control	0	0	0	0	0	Aver.= 0
	35	0	0	0	0	0	Aver.= 0
	40	16.67	0	16.67	16.67	16.67	Aver.= 13.34
	45	16.67	16.67	16.67	16.67	33.33	Aver.= 20.01
False positive	control	0	0	0	0	0	Aver.= 0
	35	0	0	0	0	0	Aver.= 0
	40	0	0	0	0	0	Aver.= 0
	45	0	0	0	16.67	0	Aver.= 3.34
False negative	control	0	0	0	0	0	Aver.= 0
	35	0	0	0	0	0	Aver.= 0
	40	0	0	16.67	16.67	16.67	Aver.= 10.01
	45	16.67	0	33.33	16.67	16.67	Aver.= 16.67

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นจากระดับ 35°C, 40°C, 45°C และในจำนวนวันที่มากขึ้น มีผลต่อความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ Paracheck Pf โดยค่า diagnostic efficiency ต่ำกว่าร้อยละ 95 เมื่ออยู่ในสภาวะระดับอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 4 วัน ค่า diagnostic efficiency ลดลงจากร้อยละ 94.44 มาอยู่ที่ร้อยละ 83.33 เมื่อชุดตรวจอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 45°C ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน รวมทั้งพบว่าค่า specificity, sensitivity, false negative, false positive และ cross reaction มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการเปลี่ยนอุณหภูมิต่อความไว ความและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ Paracheck -Pf

ดัชนี (%)	อุณหภูมิ (°C)	วันที่					หมายเหตุ
		1	2	3	4	5	
Sensitivity	control	100	100	100	100	100	Aver. = 100
	35	100	100	100	100	100	Aver. = 100
	40	100	100	100	100	94.44	Aver. = 98.89
	45	100	100	100	100	100	Aver. = 100
Specificity	control	100	100	100	91.67	100	Aver.= 98.34
	35	100	100	100	100	91.67	Aver. = 98.34
	40	100	100	100	91.67	91.67	Aver. = 96.67
	45	100	100	91.67	91.67	83.33	Aver. = 93.34
Diagnosis efficiency	control	100	100	100	94.44	100	Aver.= 98.89
	35	100	100	100	100	94.44	Aver. = 98.89
	40	100	100	100	94.44	94.44	Aver. = 97.78
	45	100	100	91.44	91.44	83.33	Aver. = 93.25
Cross-reaction	control	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	35	0	0	0	0	16.67	Aver. = 3.34
	40	0	0	0	16.67	16.67	Aver. = 6.68
	45	0	0	16.67	16.67	33.33	Aver. = 13.34
False positive	control	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	35	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	40	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	45	0	0	0	0	0	Aver. = 0
False negative	control	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	35	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	40	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	45	0	0	0	0	0	Aver. = 0

ชุดตรวจ OptiMAL-IT ที่ถูกแกะออกจากซอง เพื่อให้สัมผัสกับอากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ระดับร้อยละ 26-32 และ 80-90 ระยะเวลา 1-5 วัน ไม่มีผลกระทบมากนักต่อประสิทธิภาพการตรวจพบเชื้อของชุดตรวจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบความถี่ในการเกิด cross reaction มากขึ้นในการตรวจหาเชื้อ *P.falciparum* ในกลุ่มชุดตรวจ OptiMAL-IT ที่สัมผัสกับความชื้นสูง ดังตารางที่ 4 และ 5 ส่วนผลของความชื้นกับเวลาที่สัมผัสในภาวะดังกล่าวไม่ส่งผลที่ชัดเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิด *P. vivax* ของชุดตรวจชนิด Paracheck Pf และไม่พบการเกิด cross reaction (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

ตารางที่ 5 ผลของสภาวะที่ 1: ความชื้นสัมพัทธ์ 26–32 % อุณหภูมิ 28–37 °C และสภาวะที่ 2: ความชื้นสัมพัทธ์ 80–90 % อุณหภูมิ 21–29 °C ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิด *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT

ดัชนี (%)	สภาวะที่	วันที่					หมายเหตุ
		1	2	3	4	5	
Sensitivity	control	100	83.33	100	83.33	100	Aver.=93.33
	1	100	100	100	100	100	Aver. = 100
	2	100	100	100	83.33	100	Aver. = 96.67
Specificity	control	100	100	100	100	100	Aver.= 100
	1	100	100	100	100	100	Aver. = 100
	2	91.67	91.67	100	100	91.67	Aver. = 100
Diagnosis efficiency	control	100	94.44	100	94.44	100	Aver.= 96.67
	1	100	100	100	94.44	100	Aver. = 98.89
	2	94.44	94.44	100	100	94.44	Aver. = 95.01
Cross-reaction	control	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	1	0	0	0	16.67	0	Aver. = 3.34
	2	16.67	16.67	0	0	16.67	Aver. = 10.01
False positive	control	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	1	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	2	0	16.67	0	0	0	Aver. = 3.34
False negative	control	0	16.67	0	16.67	0	Aver. = 6.67
	1	0	0	16.67	0	0	Aver. = 3.34
	2	0	0	0	0	0	Aver. = 100

ตารางที่ 6 ผลของสภาวะที่ 1: ความชื้นสัมพัทธ์ 26–32% อุณหภูมิ 28–37 °C และสภาวะที่ 2: ความชื้นสัมพัทธ์ 80–90 % อุณหภูมิ 21–29 °C ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อชนิด *P. vivax* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT

ดัชนี (%)	สภาวะที่	วันที่					หมายเหตุ
		1	2	3	4	5	
Sensitivity	control	100	100	100	100	100	Aver.= 100
	1	100	100	100	83.33	100	Aver. = 96.67
	2	100	100	100	100	100	Aver. = 100
Specificity	control	100	100	83.33	100	100	Aver.= 96.67
	1	100	100	100	100	100	Aver. = 100
	2	100	100	100	100	91.67	Aver. = 100
Diagnosis efficiency	control	100	100	94.44	100	100	Aver.= 98.89
	1	100	100	100	94.44	100	Aver. = 98.89
	2	100	100	100	100	94.44	Aver. = 98.89
Cross-reaction	control	0	0	0	0	0	Aver. = 0
	1	0	0	0	16.67	0	Aver. = 3.34
	2	0	0	0	0	16.67	Aver. = 3.34
False positive	control	0	0	16.67	0	0	Aver. = 3.34
	1	0	0	0	0	0	Aver. = 100
	2	0	0	0	0	0	Aver. = 100
False negative	control	0	0	0	0	0	Aver. = 100
	1	0	0	0	0	0	Aver. = 100
	2	0	0	0	0	0	Aver. = 100

บทที่ 5

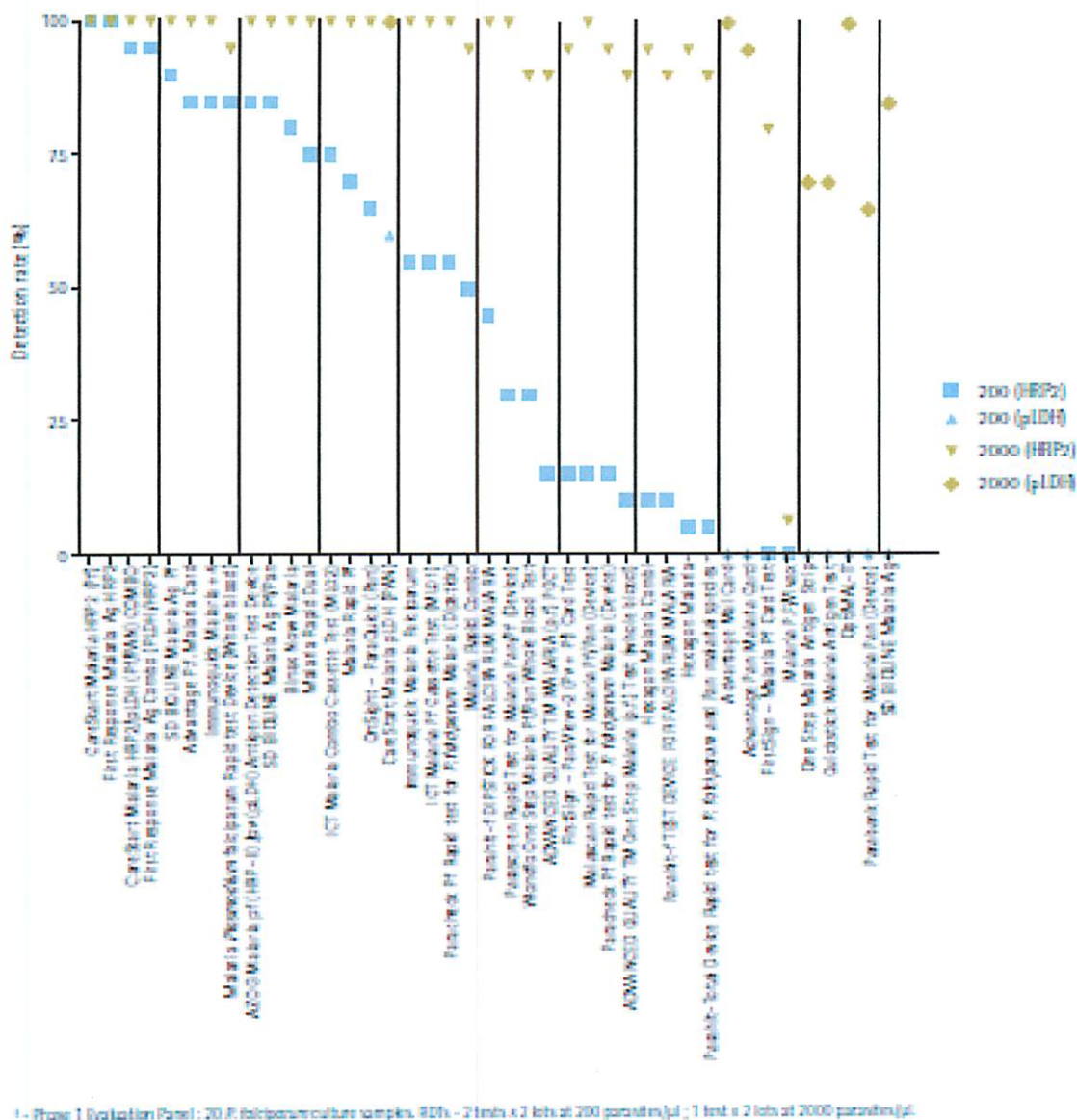
วิจารณ์

MRDT ทำงานโดยใช้หลักการของ Immunochromatographic test ให้ clinical sample ที่เป็นของเหลวเคลื่อนไปบนพื้นผิวของแผ่น nitrocellulose membrane คล้ายหลักการการทำงานของ capillary action โดย target parasite antigen จะจับกับ antibody อย่างจำเพาะ และ antibody ที่มี ความจำเพาะได้รับการยอมรับผ่านการทดสอบนำมาใช้ในชุดตรวจมี 3 ชนิดคือ 1.) Histidine rich protein-2 (HRP-2) เป็น antigen ที่มีความจำเพาะกับ *P. falciparum* specific monoclonal antibody เป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำ พบใน cytoplasm และที่ erythrocyte membrane ที่ติดเชื้อ และพบมากใน asexual stage โดยเฉพาะในช่วงที่เชื้อระยะวงแหวนจะพัฒนาเป็นระยะ trophozoite⁽⁸⁾ และ antigen นี้ยังสามารถพบได้ในเชื้อระยะ young gametocyte⁽³³⁾ 2.) Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) เป็น enzyme ที่พบในช่วงท้ายของขบวนการ malarial parasite glycolytic pathway (การ ปรักิริยาเคมีที่พบทั้งใน prokaryote และ eukaryote โดยใน eukaryote นั้นพบ enzyme นี้ใน cytoplasm ใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุล ATP กับ NADH จากกลูโคส) ซึ่งสามารถพบ antigen นี้ได้ ทั้งในระยะ sexual และ asexual malarial parasite ซึ่ง monoclonal antibody สามารถตรวจหา all human malaria species (panmalarial) และถูกพัฒนาให้จำเพาะกับเชื้อ *P. falciparum* หรือ *P. vivax*⁽³⁴⁾ และ 3.) Aldolase enzyme เป็น key enzyme ใน glycolysis pathway ของ malaria parasite โดย antibody ที่จำเพาะต่อ enzyme นี้ สามารถตรวจหา all human malaria species (panmalarial)⁽³⁵⁾

ผลการศึกษาในช่วงปี พ.ศ. 2545- 2549 พบว่า MDRT ใช้การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. falciparum* ในผู้ป่วยที่มีอาการจะมีความไวในการตรวจพบเชื้อมากกว่าร้อยละ 90 แต่ MDRT ที่ นำเอา aldolase assay เข้าไปร่วมด้วยพบว่าทำให้ความไวลดลง⁽³⁶⁻³⁷⁾ สำหรับ pLDH assay ผลการ ตรวจมีความแม่นยำมากในแต่ละ lot อยู่ในช่วงร้อยละ 80-90 และใช้ได้ดีมีความไวในการตรวจ เท่ากับร้อยละ 100 ในกลุ่ม non- immune traveler โดย HRP-2 สามารถในการตรวจพบเชื้อในผู้ป่วย ที่มีความหนาแน่นของเชื้อได้ดีกว่า aldolase⁽³⁸⁾ HRP-2 ถูกนำมาประเมินผลการใช้ใน 19 ประเทศ ให้ผลที่แตกต่างกัน และมีรายงานประเมินผลการใช้ในพื้นที่ Asia-Pacific พบความไวจะลดลงเหลือ ร้อยละ 84 เมื่อใช้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื่อน้อยกว่า 250 /mcL⁽³⁹⁾

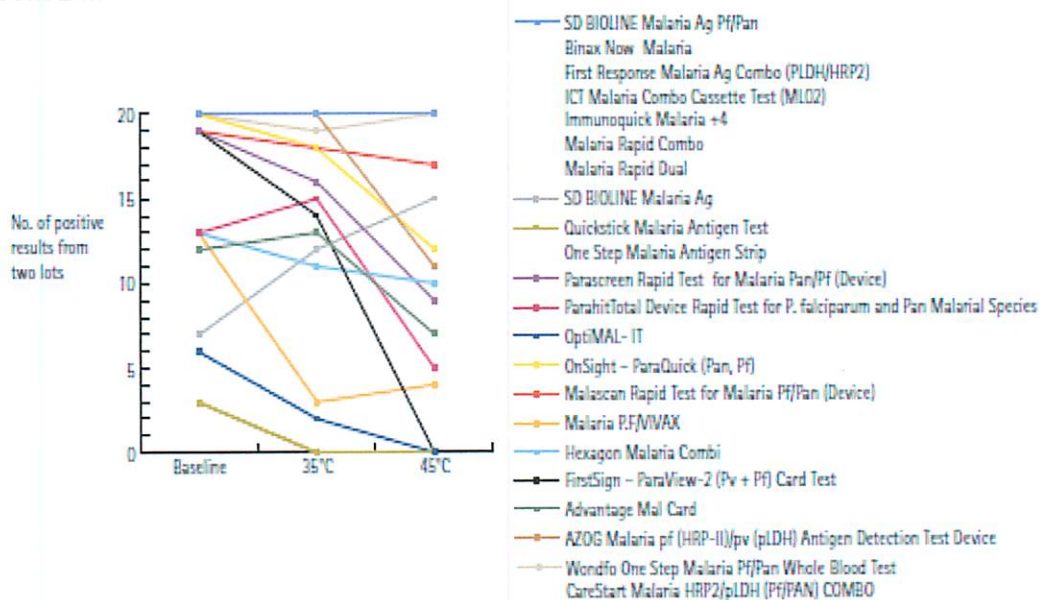
MRDT ได้ถูกพัฒนาเป็นธุรกิจที่เติบโตอย่างรวดเร็ว โดยในปี พ.ศ.2533 มีการผลิต MRDT ออกมา จำหน่ายประมาณ 20 ชนิด แต่ปี พ.ศ.2552 พบว่ามีมากกว่า 200 ชนิด และโดยใช้แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดมา พัฒนารูปแบบต่างกันให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้ใช้ มีการนำ MRDT หลายชนิด เช่น CareStareTM, HiSens Malaria, One Step Maralia, OnsignTM, Onsite Rapid test, First Response Malaria, FirstSignTM, ParaHIT, CareStartTM, Falcivax Rapid Test, Malercan, DD BIOLINE Malaria, Paramax-3

เป็นต้น MRDT ถูกผลิตออกมาเพื่อตรวจหาแอนติเจนตัวเดียวกันแต่ให้ผลการตรวจที่แตกต่างกัน อาจมีสาเหตุจากการออกแบบ Monoclonal antibody ขบวนการผลิต หรือการไม่เสถียรของชุดต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง ดังภาพที่ 4 ชุดตรวจจำนวน 42 ชนิด ให้การตรวจพบแอนติเจนที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในกลุ่มที่ความหนาแน่นของเชื้อน้อยกว่า 200 / μ l ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ความหนาแน่นเชื้อที่ระดับ 200 – 500 μ l มาเป็นตัวอย่างมาตรฐาน เพราะเป็นระดับความหนาแน่นที่น้อยแต่ MRDT ที่เป็นที่ยอมรับสามารถตรวจพบแอนติเจนมากกว่าร้อยละ 95



ภาพที่ 6 แสดงผลการทดสอบ MRDT ในการตรวจหา HRP2 หรือ pLDH ที่ระดับความหนาแน่นต่ำกว่า 200 และ 2,000-5,000 / μ l ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (ภาพจาก Result of WHO product test of Malaria RDTs : Round 1(2008))

ปัจจัยด้านอุณหภูมิคงภาพที่ 5 เริ่มต้นตั้งแต่ baseline อัตราการตรวจพบแอนตอเจนก็มีความต่างกันพอสมควร และเมื่ออยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นเป็นเวลานานถึง 60 วัน ประสิทธิภาพในการตรวจจะลดลง 1-19 % เป็นผลการศึกษาของ WHO แต่จากการศึกษานี้การให้ MRDT อยู่ในที่อุณหภูมิ 40°C นานเพียง 1 วัน ก็ทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อลดลงร้อยละ 4.56 หากนานถึง 4 วัน วัน ก็ทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อลดลงร้อยละ 11.11 จุดที่น่าสังเกตคือที่ baseline ชุดตรวจทุกชนิดถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7°C ในชั้นในอากาศประมาณร้อยละ 75 เหมาะสมที่สุดในการรักษาคุณภาพของชุดตรวจตามที่ WHO แนะนำ แต่เมื่อนำมาทดสอบพบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อมีความแตกต่างกันมากตั้งแต่ร้อยละ 15 – 100 ผลการตรวจที่ต่างกันอาจเป็นผลจากขบวนการผลิต การใช้คุณภาพของวัสดุ ความบริสุทธิ์ในการสังเคราะห์ Monoclonal antibody MDRT ที่ถูกเก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้นความถูกต้องในการตรวจพบเชื้อของ MRDT ที่นำมาทดสอบทุกชนิดลดลงในอัตราที่แตกต่างกัน แสดงถึงทั้งปัจจัยการเก็บที่อุณหภูมิมากกว่า 35°C เวลานาน 60 วัน มีผลต่อความถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย ซึ่งมีผลจากการศึกษาในเรื่องการประเมินความถูกต้องในการตรวจหาเชื้อมากกว่า 100 งานวิจัย ไม่ใช่เรื่องง่ายในการนำมาเปรียบเทียบกันเพราะมีความต่างของแนวทางการศึกษาต่างกัน ลักษณะอาการของผู้ป่วย ปัจจัยทางระบาดวิทยาต่างกัน Reference standard ต่างกัน เครื่องมือ คนต่างกัน ปัจจัยด้านการผลิต ระบบ QA รูปแบบการขนส่งจนถึงการใช้งานก็ต่างกันในแต่ละแหล่งผลิต optimal temperature rang ซึ่งจากการศึกษานี้ MRDT ในกลุ่มควบคุมปัจจัยแวดล้อมผลการทดสอบสมควรถูกต้องร้อยละ 100 แต่พบว่าการร้อยละเฉลี่ยของ sensitivity = 95.84, specificity = 97.51 และ diagnostic efficiency = 97.78 อาจเป็นผลกระทบจากปัจจัยดังกล่าว แต่ผลการตรวจยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการตรวจพบ RHPR II ของชุดตรวจ 15 ชนิด ที่ถูกนำไปเก็บในที่อุณหภูมิ 35 และ 40°C นาน 60 วัน (ภาพจาก Result of WHO product test of Malaria RDTs : Round 1 (2008))

ในการศึกษานี้เลือกใช้ MRDT ชนิด OptiMAL-IT และ Paracheck -Pf ซึ่งเป็น MDRT ที่ถูกนำมาใช้มากในงานควบคุมโรคมาลาเรียในพื้นที่ทุรกันดาร การคมนาคมไม่สะดวกของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ.2547 - 2552 ซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ซึ่งบางแห่งในเวลากลางวันของฤดูร้อนอุณหภูมิอาจสูงถึง 40°C ในฤดูหนาวอุณหภูมิต่ำสุดประมาณ 5°C และในพื้นที่ฤดูฝนความชื้นในอากาศอาจสูงเกินร้อยละ 80 ซึ่งคำแนะนำจากผู้ผลิตให้เก็บรักษาชุดตรวจ OptiMAL-IT ที่อุณหภูมิ 2-30°C ส่วน Paracheck-Pf เก็บที่อุณหภูมิ 4-40°C ชุดตรวจทั้งสองถูกบรรจุในซองป้องกันความชื้น แม้ว่าจะได้มีการเน้นย้ำการเก็บรักษา MDRT ในอยู่ภาวะที่เหมาะสม แต่บางครั้งก็ไม่สามารถทำได้ตามคำแนะนำได้ตลอดเวลา ชุดอาจต้องอยู่ในที่ที่ร้อนและชื้นได้ โดยทั่วไปค่าประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเครื่องทางานแพทย์ควรมากกว่าร้อยละ 95 จากผลการศึกษานี้พบว่า MRDT ชนิด OptiMAL-IT และ Paracheck -Pf ที่ใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ HRP-2 ของเชื้อ *P. falciparum* ชนิดเดียวกัน ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 40°C ขึ้นไประยะเวลาเพียง 1-2 วัน มีผลลดประสิทธิภาพการตรวจพบเชื้อลงร้อยละ 5.56–11.11 (รายละเอียดดังตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงผลของปัจจัยด้านอุณหภูมิในการเก็บต่อค่าประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT และ Paracheck-Pf

อุณหภูมิ เก็บ ชุดตรวจ (°C)	ชนิดชุดตรวจ	ค่า diagnostic efficiency (%)				
		จำนวนวันที่เก็บชุดตรวจ				
		1	2	3	4	5
control	OptiMAL-IT	100	100	100	94.44	100
	Paracheck-Pf	100	100	100	94.44	100
35	OptiMAL-IT	100	100	100	100	100
	Paracheck-Pf	100	100	100	100	94.44
40	OptiMAL-IT	94.44	94.44	94.44	88.89	88.89
	Paracheck-Pf	100	100	100	94.44	94.44
45	OptiMAL-IT	88.89	94.44	83.33	83.33	83.33
	Paracheck-Pf	100	100	91.44	91.44	83.33

MRDT ชนิด OptiMAL-IT ที่ใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ pLDH ของเชื้อ *P. vivax* ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 40°C ขึ้นไประยะเวลา 1-2 วัน ประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อลดลงใกล้เคียงกับกลุ่มแรก แต่เมื่อรวมค่าเฉลี่ยร้อยละของประสิทธิภาพการตรวจพบเชื้อพบว่า antibody ที่จำเพาะต่อ pLDH จะมีสภาพคงทนหรือ

ประสิทธิภาพการตรวจในที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่า antibody ที่จำเพาะต่อ HRP-2 และมีรายงานถึงความร้อนยังมีผลต่อ nitrocellulose membrane และ signaling antibody ทำให้บิตงอเสียรูป และการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีผลในการลดประสิทธิภาพการตรวจ⁽¹⁵⁾ จากผลการศึกษา MDRT ที่สัมผัสกับอากาศที่มีความชื้นร้อยละ 26-32 หรือสัมผัสกับอากาศที่มีความชื้นร้อยละ 80-90 เป็นเวลา 1-5 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อมากกว่าร้อยละ 95 ไม่แตกต่างกับชุดตรวจกลุ่ม control อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า MDRT สัมผัสกับความชื้นที่สูงเป็นเวลานานจะลดความสามารถในการ conjugate ของ signal antibody-indicator complex ทำให้แถบแสดงผลบวกไม่ชัดเจน และในการศึกษายังพบว่าความถี่ในการเกิด cross reaction สูงขึ้นในกลุ่มชุดทดสอบที่สัมผัสกับอากาศที่มีความชื้นสูง ดังนั้น MDRT ควรบรรจุในซองป้องกันความชื้น

ในสถานการณ์ที่โรคมาลาเรียยังเป็นภัยที่คุกคามชีวิตมนุษย์ในหลายประเทศในเขตร้อน และยังพบเชื้อที่สามารถต้านยารักษามาลาเรีย ดังนั้นการพัฒนาการรักษายังมีความจำเป็นที่ต้องดำเนินการควบคู่มากับการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัย แต่ก็ยังคงพบว่าในพื้นที่แหล่งระบาดจำนวนมากในหลายประเทศยังใช้การวินิจฉัยโรคมาลาเรียจากอาการ โดยทั่วไปความรุนแรงของอาการมักมีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของเชื้อ แต่อาการของโรคมาลาเรียอาจมีความคล้ายคลึงกับหลายโรคที่พบในเขตร้อนหรืออาจเป็นการติดเชื้อร่วม ที่เป็นเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันหรือการติดเชื้อโรคในกลุ่มอื่นๆ ในเขตพื้นที่ sub-saharan ของแอฟริกา พบว่าผู้ป่วยมาลาเรียจะมีอาการที่หลากหลายและอาการยังไม่สัมพันธ์กับความหนาแน่นของเชื้อในกระแสเลือด รวมทั้งผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะ sequestration ของ *P.falciparum*⁽¹⁴⁾ เป็นต้น ดังนั้นผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้อง ช่วยลดอัตราการป่วยและตาย MDRT เป็นเทคโนโลยีทางเลือกที่ดีอันหนึ่งที่มีประโยชน์สามารถใช้ทดแทนวิธีมาตรฐานคือการตรวจจากฟิล์มเลือดผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ก็พบข้อจำกัดคือ การดูรักษาเครื่องต้องใช้ผู้มีทักษะชำนาญ ใช้เวลาพอสมควร ต้องพิจารณาเลือกใช้อย่างเหมาะสม

บทที่ 6

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

การศึกษานี้ได้ประเมินผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อประสิทธิภาพการวินิจฉัยเชื้อของ Malaria Rapid Diagnostic Test (MRDT) 2 ชนิด คือ OptiMAL-IT และ Paracheck – Pf โดย MRDT จะถูกจัดแบ่งกลุ่มเก็บให้อยู่ในสภาวะ 5 แบบ คือ ที่อุณหภูมิ 35°C, 40°C และ 45°C, ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 28-37 และ 80-90 เป็นเวลา 1-5 วัน และกลุ่มควบคุมจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-7°C จากนั้นนำ MRDT มาทดสอบกับตัวอย่างมาตรฐาน 3 กลุ่มคือ 1) พบเชื้อ *Plasmodium falciparum* 2) พบเชื้อ *P. vivax* และ 3) ไม่มีเชื้อมาลาเรีย โดยกลุ่มพบเชื้อจะเลือกที่มีความหนาแน่นเชื้อในช่วง 200 - 500 / μ l ซึ่งมีผลการศึกษานี้เป็นระดับความหนาแน่นของเชื่อน้อย แต่ความไวในการวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองมากกว่าร้อยละ 100 และใช้วิธี Semi-nested PCR ในส่วนของ Small-Subunit rRNA gene ในการยืนยันชนิดเชื้อของตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ และจากการผลศึกษาพบว่าร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองชุดเจน ส่วนอุณหภูมิที่สูงจะมีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT มากกว่า Paracheck-Pf ที่อุณหภูมิมากกว่า 40°C โดยพบว่า MRDT ในสภาวะที่อุณหภูมิ 40°C นาน 5 วัน ประสิทธิภาพของ OptiMAL-IT จะลดจากร้อยละ 100 เป็น 83.33 ส่วน Paracheck-Pf จะลดจากร้อยละ 100 เป็น 94.44 และในสภาวะ MRDT อยู่ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 5 วัน ประสิทธิภาพการตรวจของ OptiMAL-IT จะลดลงจากร้อยละ 96.66 เหลือ 77.78 ส่วน Paracheck-Pf จะลดลงจากร้อยละ 100 เหลือ 88.89 รวมทั้งพบการเกิด false negative, false positive, cross reaction มีความถี่มากขึ้น และค่า sensitivity, specificity ที่ลดลง เมื่อ MRDT เก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสำรองควรอยู่ที่ 4-7°C และระหว่างการขนส่งหรือในที่ทุรกันดารควรหลีกเลี่ยงการเก็บที่อุณหภูมิเกิน 35°C

ข้อเสนอแนะ

การใช้ MRDT ที่ใช้ในงานควบคุมโรคมาลาเรีย ต้องเลือกที่ได้รับการประกันคุณภาพที่แหล่งผลิตมีระบบควบคุมคุณภาพ ผ่านการทดสอบ TRD จาก WHO และผู้ใช้อาจต้องมีทักษะที่ถูกต้องในการใช้เครื่องมือ มีการควบคุมภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อคุณภาพของชุดตรวจ จากผลการศึกษาพบว่าความร้อนและความชื้นมีผลทำให้ค่า diagnostic efficiency ลดลง ดังนั้นต้องระบุให้ชัดเจนตั้งแต่ขั้นตอนสั่งซื้อเกี่ยวกับบรรจุภัณฑ์ และการบรรจุสารดูดซับความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสำรองควรอยู่ที่ 4-7°C โดยใช้ตั้งแต่การวางแผนการสั่งซื้อ การขนส่ง เพื่อลดต้นทุนในการสูญเสีย และลดพื้นที่ในเก็บ และควรมีคำแนะนำที่ชัดเจนระหว่างการขนส่งและเก็บสำรองในพื้นที่ที่ไม่ไฟฟ้า ให้เก็บชุดตรวจที่ควบคุมอุณหภูมิ ในสถานที่ที่แห้ง

สะอาด หากไม่มีให้เก็บในห้องภายในอาคารที่ร่มเพื่อไม่ร้อนมากในเวลากลางวันอุณหภูมิไม่เกิน 35°C ระยะเวลาไม่เกิน 1 วัน และไม่ควรเก็บสำรองชุดตรวจจำนวนมากเกินไป ความจำเป็น และควรเตรียม ตัวอย่างมาตรฐานทำการทดสอบคุณภาพเป็นระยะ ตั้งแต่แรกรับสินค้าและสุ่มตรวจจุดบริการปลายทางที่ใช้ ตรวจเพื่อเป็นการรับรองคุณภาพของชุดตรวจและเกิดประโยชน์สูงสุดในการควบคุมโรคมalaria

เอกสารอ้างอิง

1. กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ. รายงานประจำปี 2554. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, 2554.
2. Ministerial conference on Malarial WHO, 2007
3. Bruce-Chwatt LJ. **Essential malariology**. 3 rd ed. London: Edward Arnold, 1993.
4. Konchom S., Bualombai P. and Buafuengklin A. Factors influencing the microscopists misdiagnosis in malaria clinics in High malaria endemic province. *Com Dis J* 1999; 25(3): 246-254.
5. Bualombai P., Pralakwong S., Aussawatheerakul N., et al. Determining cost-effectiveness and cost component of three malaria diagnostic models being used in remote non-microscope areas. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(2): 322-333.
6. Bell D., Wongsridhanalai C. and Martin LB. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: S7-S20.
7. World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance. WHO press, World Health Organization, Geneva Switzerland, 2009.
8. Duorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, et al. Invasion of erythrocytes by malaria merozoite. *Science*. 1975; 187: 748-750
9. Slater AFG, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A, et al. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 325-329.
10. Sinden RE. The cell biology of sexual development in *plasmodium*. *Parasitology*. 1983;86:7-28.
11. Blackburn EH. Telomers: do the ends justify the mean? *Cell*. 1984; 37: 7-8
12. Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on plasmodium falciparum chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 3382-3386.
13. Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *plasmodium falciparum*. *Science*. 236; 1987: 1661-1666.

14. Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. **Lancet**. 1991; 337: 200-202.
15. Anthony RL, Bangs MJ, Anthony JM, Purnomo A. On-site diagnosis of *plasmodium falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae* by using the Quantitative Buffy Coat system. **J Parasitol**. 1992; 78: 994-998
16. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Edwards R. A comparison of isotopic and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1977; 715: 431-437.
17. Tharavanij S, Warrell MJ, Tantivanich S, Tapchaisri P, Chongsang-Nguan M, et al. Factors contributing to the development of cerebral malaria. I. Humoral immune responses. **Am J Trop Med Hyg**. 1984; 33: 1-11.
18. Khusmith S, Tharavanij S, Kasemsuth R, Vejvongvarn C, Bunnag D. Two-site immunoradiometric assay for detection of *plasmodium falciparum* antigen in blood using monoclonal and polyclonal antibodies. **J Clin Microbiol**. 1987; 25: 1467-1471.
19. Londner MV, Rosen G, Sintov A, Spira DT. The feasibility of a dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the diagnosis of *plasmodium falciparum* antigens and antibodies. **Am J Trop Med Hyg**. 1987; 36: 240-245.
20. Shiff CJ, Minjas J, Premji Z. The ParaSight ®-F test: a simple rapid manual dipstick test to detect *plasmodium falciparum* infection. **Parasitol Today**. 1994; 10: 494-495.
21. Oliveira DA, Holloway BP, Durigon EL, Collins WE, Lal AA. Polymerase chain reaction and a liquid-phase, nonisotopic hybridization for species-specific and sensitive detection of malaria infection. **Am J Trop Med Hyg**. 1995; 52: 139-144.
22. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharh SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 1988; 230: 1350-1354.
23. Tahar R, Ringwald P, Basco LK. Heterogeneity in the circumsporozoite protein gene of *plasmodium malariae* isolates from sub-Saharan Africa. **Mol Biochem Parasitol**. 1998; 92: 71-78.
24. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and

- detection of a high prevalence of mixed infections. **Mol Biochem Parasitol.** 1993; 58: 283-292.
25. Miyake H, Kim HS, Kawai S, Yamane A, Kimura M, Wataya Y. DNA diagnosos of malaria using microtiter plate hybridization. **Nucleic Acids Res.** 1995; 34: 241-242.
 26. Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitol International.** 1997; 46: 91-95.
 27. Kilejian A. The biosynthesis of the knob protein and a 65,000 dalton histidine-rich polypeptide of *plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol.** 1984; 2: 185-194.
 28. Panton LJ, McPhie P, Maloy WL, Wellems TE, Taylor DW, Howard RJ. Purification and partial characterization of an unusual protein of *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II. **Mol Biochem Parasitol.** 1989; 53: 149-160.
 29. Karp G. **Cell and molecular biology : concepts and experiments.** New York: Hoffmann Press, 1996.
 30. Kemp DJ, Corcoran LM, Coppel RL, Stahi HD, Bianco AE, Brown AE, et al. Size variation in chromosomes from independent culture isolate of *plasmodium falciparum*. **Nature.** 1985; 315: 247-350
 31. Baker J., McCarthy J., Gatton M., Kyle DE., Belizario V., et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidyne-rich protein 2 (PfHRP II) and its effect on the performance of PfHRP II-based rapid diagnostic tests. **J infect Dis.** 2005, 192(5); 870-877.
 32. Howard RJ., Uni S., Aikawa M., Aley BS., Leech JH. et al. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf-HRP-II) from *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **J Cell Biol** 1986; 103: 1269-1277.
 33. Hayward RE., Sullivan DJ. and Day KP. *Plasmodium falciparum*: histidine protein II is expressed during gametocyte development. **Exp Parasitol** 2000; 96: 139-146.
 34. Makler MT., Piper RC. and Milhous Wk. Lactase dehydrogenase and the diagnosis of malaria. **Parasitol Today** 1998; 14: 376-377.
 35. Lee N., Baker J., Bell D., McCarthy J and Cheng Q. Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential

- effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic test. J Clin Microbiol 2006; 44: 4547-4549.
36. Forney JR., Wongsrichanalai C., Magill AJ., Craig LG., Sirichaisinthop J., et al. Devices for rapid diagnosis of malaria: evaluation of prototype assays that detect *Plasmodium falciparum* histidine rich protein 2 and a *Plasmodium vivax*-specific antigen. J Clin Microbiol 2003; 41: 2358-2366.
 37. Ferando SD., Karunaweera ND. and Fernando WP. Evaluation of a rapid whole blood immunochromatographic assay for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. Ceylon Med J 2004; 49: 7-11.
 38. Grobusch MP ., Hanscheid T., Gobels K., Slevote H., Zoller T., et al. Comparision of three antigen detection tests for diagnosis and follow-up of falciparum malaria in travelers return to Berlin, Germany. Parasitol Res 2003; 89: 354-357.
 39. Clinton KM., Robert AGJ., Alan JM. And Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. Clin Micribiol 2008; 97-110.

ภาคผนวก

สถิติอุณหภูมิสูงที่สุดในช่วงฤดูร้อนของประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2494 - 2553

สถานี	กุมภาพันธ์			มีนาคม			เมษายน			พฤษภาคม			คาบ (ปี)	ตั้งแต่ พ.ศ.
	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.		
ภาคเหนือ														
1. เชียงราย	37.0	22	2552	39.3	25	2534	41.3	30	2503	41.2	2	2509	60	2494
2. สกย. เชียงราย (อ.เมือง)	36.5	25	2541	38.8	25	2535	40.8	23	2533	40.3	2	2523	32	2522
	36.5	21,22	2552											
3. แม่ฮ่องสอน	38.0	27	2541	41.0	31	2547	43.4	23	2553	44.0	15	2553	56	2498
4. แม่สะเรียง (จ.แม่ฮ่องสอน)	39.6	27	2542	42.1	17	2541	44.1	25	2501	42.7	8	2510	59	2495
											6	2541		
5. พะเยา	37.1	18	2548	39.7	26	2535	42.0	19	2526	40.7	10	2535	30	2524
6. ศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคเหนือ (จ.เชียงใหม่)	37.7	26	2541	40.9	31	2548	41.5	29	2503	42.4	1	2548	59	2495
7. สกย. แม่ใจ (จ.เชียงใหม่)	37.6	26	2542	39.4	31	2548	41.2	17	2526	41.6	10	2541	42	2512
8. น่าน	38.8	23,25	2552	41.8	31	2547	44.1	12	2502	42.1	2	2503	60	2494
9. สกย. น่าน (อ.เมือง)	37.7	26	2541	40.6	29	2547	41.6	11	2526	41.0	23	2512	42	2512
		23	2552								2	2523		
											9	2535		
10. สอท. ท่าวังผา (จ.น่าน)	37.6	24	2552	40.2	17	2541	42.5	22	2553	41.4	9	2535	41	2513
11. สอท. หุ่นช้าง (จ.น่าน)	36.4	23	2552	38.7	29	2547	40.3	22	2553	39.9	8	2546	13	2541
12. ลำพูน	38.5	19	2548	41.7	26	2535	42.6	29	2526	42.3	6	2535	30	2524
		26	2550											
		22	2552											
13. ลำปาง	40.0	28	2541	42.5	16	2541	43.5	18	2526	43.2	1	2523	60	2494
					30	2547								
14. สกย. ลำปาง (อ.ห้างฉัตร)	38.7	26	2541	41.9	26	2535	42.7	21	2535	42.4	6	2535	29	2525
15.แพร่	38.5	27	2513	41.7	17	2541	43.6	14	2526	43.0	10	2553	59	2495
		27	2541											
16. อุตรดิตถ์	39.3	27	2497	42.7	24	2503	44.5	27	2503	43.3	15	2506	60	2494
		27	2541											
17. สุโขทัย	37.4	18	2548	40.7	31	2548	42.6	21	2553	42.8	10	2553	11	2543
18. สกย. ศรีสำโรง (จ.สุโขทัย)	39.0	26	2541	41.0	30	2522	43.2	23	2512	42.2	22,23	2526	42	2512
											9	2535		
19. ตาก	41.2	19	2548	42.7	17	2541	44.0	25	2550	43.0	5	2512	57	2497
20. เขื่อนภูมิพล (จ.ตาก)	40.8	19	2548	42.3	30	2547	43.7	26	2541	43.0	2	2541	51	2503
21. แม่สอด	38.5	19	2548	40.3	14	2547	41.1	8	2553	41.6	9,11	2541	60	2494
22. สอท. อุ้มผาง (จ.ตาก)	37.0	19	2548	39.7	29	2524	41.0	14	2526	39.5	4	2541	33	2521
23. สกย. คอยมูเซอ (อ.เมือง จ.ตาก)	33.8	19	2548	35.3	17	2541	36.2	1	2548	35.7	9	2541	18	2536
24. สกย. พิจิตร (อ.เมือง)	37.1	18	2537	38.4	31	2548	40.7	10	2553	40.1	9,14	2553	18	2536
		25	2541											
25. พิชญ โลก	38.4	25	2541	40.5	24	2503	42.8	27	2503	42.0	2	2523	60	2494
26. เพชรบูรณ์	39.4	27	2541	42.2	25	2553	43.0	25	2501	42.4	17	2500	60	2494
27. สอท. หล่มสัก (จ.เพชรบูรณ์)	38.8	27	2513	40.7	17	2541	41.5	29	2518	40.6	7	2546	41	2513
											1	2547		
28. สอท. วิเชียรบุรี (จ.เพชรบูรณ์)	39.6	28	2513	41.0	30	2547	42.1	24	2550	41.5	10	2535	41	2513
29. กำแพงเพชร	39.8	25	2541	40.8	28	2526	43.0	14,15	2526	41.8	22	2526	30	2524
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ														
1. หนองคาย	39.1	25	2552	42.8	31	2548	43.3	12	2548	42.8	9	2535	43	2511
2. เลย	39.5	24	2541	41.3	19	2541	43.1	25	2501	41.8	7	2546	56	2498
3. สกย. เลย (อ.เมือง)	39.0	17	2539	41.5	26	2535	43.5	21	2535	41.0	3	2541	41	2513
4. อุดรธานี	39.2	24	2552	42.0	18	2541	43.9	28	2503	42.6	11	2501	60	2494
5. นครพนม	38.9	25	2516	41.2	21	2529	42.0	10	2516	40.3	7	2546	58	2496
								14	2526					

สถิติอุณหภูมิสูงสุดในช่วงฤดูร้อนของประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2494 - 2553

สถานี	กุมภาพันธ์			มีนาคม			เมษายน			พฤษภาคม			คาบ (ปี)	ตั้งแต่ พ.ศ.
	° ซ.	วันที่	พ.ศ.	° ซ.	วันที่	พ.ศ.	° ซ.	วันที่	พ.ศ.	° ซ.	วันที่	พ.ศ.		
6.สภ.นครพนม (อ.เมือง)	39.0	26	2548	40.5	20	2529	41.9	14	2526	41.0	7	2546	28	2526
7.สกลนคร	39.2	22	2504	41.2	24	2504	41.9	24	2500	40.5	2.3	2541	60	2494
8.สภ.สกลนคร (อ.เมือง)	38.8	24	2524	40.9	21	2539	42.3	14	2526	41.0	9	2535	42	2512
		24	2552											
9.นุกดาหาร	40.0	25	2552	42.1	16	2541	42.5	14	2541	41.7	1.3	2541	58	2496
								24	2550					
10.ขอนแก่น	41.0	10	2504	41.8	26	2501	42.8	6,25	2501	41.9	9	2535	60	2494
								29	2503					
11.สภ.ท่าพระ (อ.เมือง จ.ขอนแก่น)	40.0	27	2542	41.2	29	2536	42.1	14	2526	40.6	1	2523	41	2513
								11	2544					
12.สอท.ภมลาไสย (จ.กาฬสินธุ์)	38.3	20	2541	40.8	17	2541	41.5	14	2541	42.3	9	2553	13	2541
13.สอท.โกสุมพิสัย (จ.มหาสารคาม)	39.7	27	2548	41.5	21	2539	42.4	14	2526	42.0	7	2546	41	2513
14.ร้อยเอ็ด	38.7	27	2513	40.5	26	2501	41.5	24,25	2501	41.1	7	2553	56	2498
15.สภ.ร้อยเอ็ด (อ.เมือง)	38.6	26	2552	41.0	17	2541	40.7	14	2526	40.4	8	2553	28	2526
								23,24	2550					
16.ชัยภูมิ	39.5	27	2542	41.5	17	2541	42.6	14	2526	41.0	7	2546	54	2500
17.ศูนย์อำนวยการบริหารจังหวัดชายแดนภาคใต้ (จ.อุบลราชธานี)	39.2	26	2548	40.6	28	2536	42.0	14	2541	41.2	3	2548	60	2494
18.สภ.อุบลราชธานี (อ.วารินชำราบ)	39.4	18	2548	40.7	6	2525	42.4	14	2541	39.8	1	2516	41	2513
19.สุรินทร์	38.9	18	2548	40.8	26	2501	41.6	28	2503	41.6	3	2523	60	2494
								14	2526					
20.สภ.สุรินทร์ (อ.เมือง)	39.5	18	2548	41.1	18	2529	41.8	14	2526	41.0	6	2553	42	2512
					31	2550		21	2532					
21.สอท.ท่าตูม (จ.สุรินทร์)	39.4	18	2548	41.1	31	2550	42.3	14	2541	41.3	4	2536	41	2513
22.นครราชสีมา	40.6	27	2513	42.3	31	2522	42.7	7	2522	41.4	12	2513	60	2494
23.สอท.โชคชัย (จ.นครราชสีมา)	39	18	2548	40.5	31	2529	41.1	14	2541	40.2	1.4	2541	41	2513
					16,22	2541								
24.สภ.ปากช่อง (จ.นครราชสีมา)	38.1	26	2522	39.0	16	2526	39.5	14	2526	38.5	7	2540	42	2512
25.สภ.ศรีสะเกษ (อ.เมือง)	38.9	18	2548	40.2	31	2550	42.5	14	2541	40.1	20	2540	28	2526
26.บุรีรัมย์	39.2	18,27	2548	40.3	31	2550	41.7	6,22	2553	42.2	9,10	2553	8	2546
27.สอท.นางรอง (จ.บุรีรัมย์)	41.0	22	2522	41.4	20	2529	41.8	12	2528	40.7	2	2541	41	2513
ภาคกลาง														
1.นครสวรรค์	39.8	29	2495	41.4	20	2529	42.5	25	2512	42.7	16	2506	60	2494

สถิติอุณหภูมิสูงที่สุดในช่วงฤดูร้อนของประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2494 - 2553

สถานี	กุมภาพันธ์			มีนาคม			เมษายน			พฤษภาคม			คาบ	ตั้งแต่
	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	(ปี)	พ.ศ.
10.สภ.กำแพงแสน (จ.นครปฐม)	38.4	26 14 26	2523 2534 2541	40.4	29	2529	40.8	23 13	2516 2526	41.0	3.8	2523	38	2516
11.สภ.ราชบุรี (อ.เมือง)	38.9	19	2537	39.5	16	2550	40.9	24	2541	39.5	1 12 5	2536 2541 2548	18	2536
12.สภ.อยุธยา (อ.ท่าเรือ จ.พระนครศรีอยุธยา)	38.7	26	2541	39.0	16,22	2541	40.6	24	2541	40.4	1	2541	17	2537
13.กรุงเทพฯ (ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์)	38.8	16	2552	39.8	25	2503	40.0	20	2522	39.7	10	2553	60	2494
14.ท่าอากาศยานกรุงเทพ (ดอนเมือง)	38.5	28	2540	40.0	22 24	2526 2540	40.0	23	2495	40.8	22	2526	60	2494
15.สภ.บางเขน (เขตจตุจักร กรุงเทพฯ)	38.3	27	2541	38.4	24	2541	39.4	17	2533	38.8	4	2540	30	2512-2541
16.สภ.บางนา (เขตบางนา กรุงเทพฯ)	37.0	14	2534	37.6	29	2541	40.0	23	2533	39.2	1	2534	42	2512
17.สนง.อุตสาหกรรมกรุงเทพ (เขตคลองเตย)	36.9	19	2541	38.2	29	2544	39.2	24	2552	39.3	10	2553	17	2537
18.สถานีน้ำร้อน (อ.เมือง จ.สมุทรปราการ)	37.5	11	2525	35.5	31	2524	36.1	4	2524	35.5	4	2524	30	2524
19.สภ.ปทุมธานี (อ.คลองหลวง)	37.5	19	2548	38.8	16	2550	40.5	15	2547	39.8	9	2553	13	2541
ภาคตะวันออก														
1.สภ.ฉะเชิงเทรา (อ.สนามชัยเขต)	38.3	19	2548	40.0	25	2553	40.2	15	2547	40.2	13	2540	22	2532
2.ปราจีนบุรี	39.1	19	2548	40.6	17	2541	42.2	14	2541	41.3	4	2541	60	2494
3.สภ.กบินทร์บุรี (จ.ปราจีนบุรี)	39.8	20	2538	40.8	17	2541	42.9	23	2533	41.7	4	2541	41	2513
4.สระแก้ว	39.2	19	2548	39.9	25	2553	40.4	11	2544	40.3	6	2548	13	2541
5.อรัญประเทศ (จ.สระแก้ว)	39.7	26	2522	40.3	30	2550	41.7	14	2526	41.4	20	2526	59	2495
6.ชลบุรี	37.6	17	2523	38.4	17	2534	39.9	23	2538	39.0	10	2553	60	2494
7.เกาะสีชัง (จ.ชลบุรี)	35.2	23	2549	36.0	18,19,28	2553	36.9	25	2503	36.2	5	2503	52	2502
8.พญา (อ.บางละมุง จ.ชลบุรี)	37.1	21	2542	37.3	17	2534	37.0	19	2533	36.0	8	2535	30	2524
9.สัตหีบ (อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี)	39.2	13	2495	39.5	9,17	2495	40.5	10	2495	40.5	2	2495	60	2494
10.แหลมฉบัง (อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี)	37.5	21	2542	37.5	18	2553	38.1	14	2541	38.7	6	2541	17	2537
11.ระยอง	37.5	24	2544	37.9	26	2545	40.0	23	2544	39.5	1,12,22	2541	30	2524
12.สภ.ห้วยโป่ง (อ.เมือง จ.ระยอง)	36	13	2544	37.6	23	2525	38.2	20	2522	38.7	8	2535	42	2512
13.จันทบุรี	37.7	7	2496	37.2	27	2495	38.8	9	2542	36.8	1	2503	60	2494
14.สภ.พลับ (อ.ขลุง จ.จันทบุรี)	36.2	7 17	2513 2523	36.2	3	2527	36.8	11	2522	36.1	4	2541	42	2512
15.คลองใหญ่ (จ.ตราด)	35.7	9	2549	38.2	26	2524	35.6	25	2526	36.0	3	2526	59	2495
ภาคใต้ฝั่งตะวันออก														
1.เพชรบุรี	35.2	23	2531	36.6	29	2527	37.8	23	2533	38.5	18	2553	30	2524
2.ประจวบคีรีขันธ์	37.8	16	2534	38.5	26	2503	40.0	19	2544	39.5	23	2553	60	2494
3.หัวหิน (จ.ประจวบคีรีขันธ์)	35.6	24	2501	36.2	26	2503	38.3	19	2552	37.7	28	2540	60	2494
4.สภ.หนองพลับ (อ.หัวหิน จ.ประจวบฯ)	39.3	25	2548	40.0	30	2547	41.2	15	2541	40.2	10	2553	37	2517
5.ชุมพร	36.4	20	2537	38.0	19	2542	38.8	13	2541	38.2	10 22 1 5	2501 2526 2541 2548	60	2494
6.สภ.สวี (จ.ชุมพร)	36.2	20	2537	38.4	28	2526	38.6	13 7 13	2526 2539 2541	38.5	21 5	2526 2548	42	2512
7.สุราษฎร์ธานี	37.0	28	2495	39.0	27	2501	39.7	13	2535	38.5	10	2501	46	2494-2539
8.ท่าอากาศยานสุราษฎร์ธานี (อ.พุนพิน)	37.0	25	2548	38.3	17	2550	39.1	13	2535	39.8	11	2553	23	2531
9.เกาะสมุย (จ.สุราษฎร์ธานี)	34.1	25	2522	35.6	30	2511	36.5	19	2533	36.3	21	2526	42	2512
10.สภ.สุราษฎร์ธานี (อ.กาญจนดิษฐ์)	36.6	19	2548	38.4	16	2541	37.8	13	2541	38.8	17	2541	18	2536

สถิติอุณหภูมิสูงที่สุดในช่วงฤดูร้อนของประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2494 - 2553

สถานี	กุมภาพันธ์			มีนาคม			เมษายน			พฤษภาคม			คาบ (ปี)	ตั้งแต่ พ.ศ.
	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.	°ซ.	วันที่	พ.ศ.		
11.สอท.พระแสง (จ.สุราษฎร์ธานี)	38.2	27	2548	38.8	21	2541	40.0	13,15	2541	38.6	2	2548	13	2541
12.นครศรีธรรมราช	35.5	18	2541	38.0	23	2511	38.9	13	2541	38.1	1	2541	59	2495
13.สทช.นครศรีธรรมราช (อ.เมือง)	35.6	25	2541	36.6	21,22	2541	38.2	28	2548	36.8	3	2541	27	2527
14.ท่าเรือการไฟฟ้าขนอม (จ.นครศรีธรรมราช)	33.0	20	2537	35.5	20	2542	36.0	10	2539	35.8	12	2541	9	2537-2545
		18,23	2541											
		25,26	2543											
15.สอท.ฉวาง (จ.นครศรีธรรมราช)	39.5	18	2548	39.1	11	2541	41.0	15	2541	39.2	2	2548	13	2541
16.สทช.พัทลุง (อ.เมือง)	34.5	21,22	2552	35.8	8	2542	37.3	23	2533	37.3	27	2553	30	2524
17.ศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคใต้ฝั่งตะวันออก (จ.สงขลา)	34.3	14,15	2552	36.5	30	2511	38.2	15	2519	38.6	27	2553	60	2494
18.ท่าอากาศยานหาดใหญ่ (จ.สงขลา)	37.4	21	2541	38.3	24	2525	39.2	15	2541	38.3	7	2553	38	2516
19. สอท.สะเตา (จ.สงขลา)	37.2	25	2544	38.5	3	2553	37.2	22	2553	38.0	10	2553	12	2542
		27	2548											
20.สทช.คลองสียะ (อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)	36.6	27	2548	37.2	16	2550	37.5	14	2553	38.2	5	2548	42	2512
21.ท่าอากาศยานปัตตานี	35.9	27	2548	37.9	30	2511	37.9	23	2541	38.0	6	2548	47	2507
22.สทช.ยะลา (อ.เมือง)	39.1	25	2548	38.4	25	2525	40.0	14	2541	38.8	4,5	2541	29	2525
					18	2547								
					12	2548								
23.นราธิวาส	35.1	25	2516	36.6	25	2525	37.6	8,17	2530	39.0	23	2526	55	2499
								22	2532					
ภาคใต้ฝั่งตะวันตก														
1.ระนอง	38.3	19	2533	39.6	31	2526	39.1	25	2526	38.7	10	2541	60	2494
2.ตะกั่วป่า (จ.พังงา)	38.2	23	2533	38.1	13	2533	38.4	24	2541	38.0	20	2541	30	2524
3.ภูเก็ต (อ.เมือง)	36.7	14	2541	37.8	5	2553	37.8	9	2522	37.8	11	2541	59	2495
								1	2541					
4.ศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อ.ถลาง จ.ภูเก็ต)	38.5	22	2548	37.5	31	2530	37.6	5	2541	37.7	15	2553	59	2495
5.กระบี่	38.0	14,27	2541	39.1	26	2541	38.9	3	2541	38.8	5	2541	9	2537-2545
6.เกาะลันตา (จ.กระบี่)	37.2	29	2531	38.0	26	2539	38.5	1	2541	38.0	5	2541	30	2524
7.ท่าอากาศยานตรัง	40.0	18	2548	40.5	29	2535	40.3	24	2535	39.0	2,3	2548	60	2494
								17	2541					
8.สตูล	37.8	28	2522	39.5	22	2541	38.9	18	2526	37.8	5	2541	33	2521

หมายเหตุ : ข้อมูลจาก สถานีตรวจอากาศ, สถานีอุตุนิยมวิทยาอุทก (สอท.) และสถานีอากาศเกษตร (สทช.)

ศูนย์ภูมิอากาศ สำนักพัฒนาอุตุนิยมวิทยา

