

ผลงานวิชาการอันดับที่ ๑

ประกอบคำขอประเมินผลงาน

ของ

นายธีระยศ กอบจายา

นักวิชาการสาธารณสุขชำนาญการ

เรื่อง : ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัย

ของชุดตรวจสำเร็จรูป malaria rapid

ชนิด Paracheck-Pf และ OptiMAL-IT

(Factors influencing the efficiency of malaria rapid tests;

Paracheck-Pf และ OptiMAL-IT)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยของชุดตรวจสำหรับป่ามาลาเรีย

ชนิด Paracheck-Pf และ OptiMAL-IT

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ประเมินผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อประสิทธิภาพการวินิจฉัยเชื้อของ Malaria Rapid Diagnostic Test (MRDT) 2 ชนิด คือ OptiMAL-IT และ Paracheck – Pf โดย MRDT จะถูกจัดแบ่งกลุ่มเก็บให้อุ่นในสภาวะ 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 ซึ่งมีผลการศึกษายังที่เป็นระดับความหนาแน่นของเชื้อน้อย แต่ความไวในการวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองมากกว่าร้อยละ 100 และใช้วิธี Semi-nested PCR ในส่วนของ Small-Subunit rRNA gene ในการยืนยันชนิดเชื้อของตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ และจากการผลศึกษาพบว่าร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศไม่มีผลต่อผลประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองชั้ดเจน 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 อุ่นที่อุณหภูมิ 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 ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสำรองควรอยู่ที่ 4-7°C และระหว่างการขนส่งหรือในที่ทุรกันดารควรหลีกเลี่ยงการเก็บที่อุณหภูมิเกิน 35°C อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในระยะสั้นควรศึกษาผลกระทำต่อเนื่องเป็นเวลา 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 confirm 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 ribonuclei 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

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จจากความร่วมมือด้วยความเต็มใจของผู้ป่วยที่มารับบริการที่มาลาเรียคลินิกแม่ตัวอ และความอึ้งเพื่อสถานที่ของมาลาเรียคลินิกแม่ตัวอ ตำบลท่าสองยาง อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติกลุ่มน้ำตราชูนการตรวจวินิจฉัยโรคติดต่อโดยแมลง กรมควบคุมโรค

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำย่อ.....	ช
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	๑
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	๔
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	๑๘
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	๒๔
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	๓๐
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	๓๕
รายการอ้างอิง.....	๓๗
ภาคผนวก.....	๔๑

สารบัญตาราง

	หน้าที่
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 ผลของสภาวะที่ 1: ความชื้นสัมพัทธ์ 26–32 % อุณหภูมิ 28–37 ° C และสภาวะที่ 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 ผลของสภาวะที่ 1: ความชื้นสัมพัทธ์ 26–32% อุณหภูมิ 28–37° C และสภาวะที่ 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 ใน การตรวจจับแอนติเจน	24
ภาพที่ 2 การเตรียมตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการทดสอบ MRDT	26
ภาพที่ 3 แสดงผลผลิต PCR รอบแรกจากการใช้ inter-species primers ในส่วนของ SSUrRNA gene	28
ภาพที่ 4 แสดงผลผลิต PCR รอบที่สองจากการใช้ species-specific primers ในส่วนของ SSUrRNA gene	28
ภาพที่ 5 การเตรียม Malaria rapid diagnostic เพื่อการทดลอง	29
ภาพที่ 6 แสดงผลการทดสอบ MRDT ใน การตรวจหา HRP II หรือ pLDH ที่ระดับความหนาแน่นต่ำกว่า 200 และ 2,000-5,000 / μl ของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> (ภาพจาก Result of WHO product test of Malaria RDTs : Round 1(2008))	39
ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการตรวจพบ RHPR 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

ការឃើញ

bp = basepair

°C = degree Celsius

DNA = deoxyribonucleic acid

IgG = Immunoglobulin G

IgM = Immunoglobulin 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)

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาของหลายประเทศในเขต้อน จากข้อมูลสำนักงานโภชนาและแผนสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ในปีงบประมาณ 2553 รายงานอัตราการเกิดโรคมาลาเรียต่อแสนประชากรเท่ากับ 0.93 ผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 24,847 ราย เพิ่มขึ้นจากปี 2552 จำนวน 2,004 ราย หรือร้อยละ 8.77 และจำนวนผู้ป่วยรายตัวที่โรคมาลาเรียในปี 2553 ทั้งหมด 88 ราย เท่ากับ 0.14 ต่อแสนประชากรเพิ่มขึ้นจากปี 2552 ที่อัตราป่วยรายตัวที่ 0.11 ต่อแสนประชากร ปัจจัยที่ทำให้สถานการณ์โรคมาลาเรียเพิ่มขึ้น เกิดจากการเคลื่อนย้ายของแรงงานต่างชาติ มีทั้งที่ถูกกฎหมายจากการเข้าลงทะเบียนผ่อนผันค้าแรงงานในประเทศไทย ได้แรงงานเหล่านี้บางส่วนที่ยังคงมีเชื้อมาลาเรียในร่างกายเมื่อเข้ามาอยู่ในเมืองไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีภูมิอากาศเจิงโอกาสเพิ่ม โรคมาลาเรียสู่ชนชน ภาวะความไม่สงบของสถานการณ์ทางภาคใต้ทำให้ยากแก่การเข้าไปดำเนินการควบคุมโรคในพื้นที่ รวมทั้งปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยา⁽¹⁾

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

1. ดำเนินการตรวจวินิจฉัยและรักษามาลาเรียอย่างรวดเร็วเพื่อลดอัตราการตาย
2. วางแผนการใช้มาตรการอย่างเหมาะสมและสามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่อง
3. ดำเนินการให้สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็ว เพื่อยับยั้งกระบวนการของโรคมาลาเรีย
4. พัฒนาขีดความสามารถในการศึกษาวิจัยเชิงประยุกต์เพื่อแก้ไขปัญหาการควบคุมโรคมาลาเรีย

สำหรับประเทศไทยนั้นหลักใหญ่ทั้ง 4 ประการ มีการดำเนินการและพัฒนาค่อนข้างมาก การตรวจวินิจฉัยและการจำแนกชนิดเชื้อในปัจจุบันใช้การตรวจจากฟิล์มเลือดหนา เมื่อจากความสะอาดและราคาไม่แพง ผู้ตรวจที่มีทักษะในการตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่ระดับความหนาแน่นประมาณ 100 ตัวเลือด 100 ไมโครลิตร หรือน้อยกว่า ประสิทธิภาพเข้มข้นอยู่กับประสิทธิภาพของผู้ตรวจเป็นสำคัญ มาตรการสำคัญ⁽³⁾ในการควบคุมโรคที่ใช้คือ การเร่งรัดการดำเนินการค้นหาและให้การรักษาผู้ป่วยอย่างรวดเร็ว เพื่อตัดการแพร่เชื้อและรักษา ก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการแทรกซ้อนรุนแรง โดยการดำเนินการทั้งเชิงรุกและตั้งรับ (Active and passive case detection) ด้วยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดหนาผ่านกล้องจุลทรรศน์

สำหรับข้อผิดพลาดและข้อจำกัดในการตรวจวินิจฉัย ได้แก่

1. ในกรณีผู้ป่วยที่มีเชื้ออยู่ชั่วขณะนักพนในสภาวะ

- ผู้ป่วยกินยาป้องกันมาลาเรียก่อนเข้าเขตป่ากู้โรค เนื่องจากไม่มียาป้องกันโรคมาลาเรียที่ได้ผลสมบูรณ์ ยามีผลในการกดอาการของโรค ทำให้ระยะพักตัวของโรคยาวนานขึ้นและการตรวจพบเชื้อยากขึ้น

- ผู้ป่วยเป็นโรคมาลาเรียระยะแรกจะมีจำนวนเชื้อน้อย ดังนั้นในรายส่งสัมภึ้งมาตรวจข้ามอีกครั้ง

- ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* นั้น อัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงในระยะแรกจะลดลงตามจำนวนเชื้อน้อย ทั้งที่ผู้ป่วยมีเชื้อในร่างกายจำนวนมาก เนื่องจากเชื้อตัวเดียว (*late trophozoite*) เป็นต้นไปอยู่ในเส้นเลือดฝอยและเส้นเลือดดำนาค (*Sequestration*)

2. เทคนิคการข้อม เช่นสีมีตะกอนมาก น้ำข่าย้อมเก่า มีการปนเปื้อนเชื้อรานหรือแบคทีเรีย ทำให้มองเห็นไม่ชัด

3. การติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด มีโอกาสเกิดขึ้นบ่อยแต่ด้วยข้อด้อยจากการตรวจจากพิล์มเลือด จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบในครั้งแรก

4. ในการตรวจพิล์มหนานางครั้ง ไม่สามารถจำแนกเชื้อมาลาเรียได้ถูกต้อง โดยเฉพาะเชื้อ *P.ovale* และ *P.malariae* ต้องใช้การจำแนกจากพิล์มเลือดบาง ซึ่งมีข้อจำกัดคือความไวในการตรวจพบเชื้อ การตรวจจากพิล์มเลือดบางจะต่ำกว่าการตรวจจากพิล์มเลือดหนาประมาณ 1 ใน 3 เท่า

5. ปัจจัยอื่นๆ เช่นปัจจัยส่วนตัว ปัจจัยสิ่งแวดล้อม การปฏิบัติงาน ภาระงานและปัจจัยด้านความรู้⁽⁴⁾

จากปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจผิดพลาดอย่าง จึงมีมาตรการเสริมในพื้นที่ทุรกันดารการสนับสนุนกล่องจุลทรรศน์ไม่ครอบคลุม จึงทำให้มีการประยุกต์ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (malaria rapid Diagnostic test; MRDT) มาใช้ในพื้นที่แหล่งระบาดการคมนาคมไม่สะดวกหรือไม่มีกล่องจุลทรรศน์ เพื่อเพิ่มจุดการให้บริการ ให้ครอบคลุมเกิดความคล่องตัวสะดวกเร็ว ซึ่งชุดตรวจเหล่านี้ได้ถูกพัฒนาให้มีความสะดวกในการใช้ง่ายต่อการแพร่ผล สามารถฝึกให้แก่บุคคลที่ไม่มีทักษะในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ก็สามารถใช้ชุดตรวจได้ โดยผลตรวจสอดคล้องกับการตรวจผ่านกล่องจุลทรรศน์จากผู้เชี่ยวชาญ⁽⁵⁾ และถูกนำมาใช้งานมากขึ้น ในปี พ.ศ. 2548 ได้มีการสำรวจการใช้ MRDT ทั่วโลกประมาณพบว่าชุดตรวจถูกใช้กว่า 12 ล้านชุด การใช้พร้อมลายกรายการครอบคลุมสู่ระดับสาธารณสุขชุมชน ในพื้นที่ระบาดของโรคมาลาเรีย⁽⁶⁾ ซึ่งส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาในการขนส่งไปยังจุดให้บริการ ชุดตรวจต้องสัมผัสกับอากาศที่เปลี่ยนแปลง มีผลการศึกษาว่า ชุดตรวจที่ถูกเก็บในที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C เป็นเวลานาน 60 วัน มีผลทำให้ความถูกต้องในการตรวจพบเชื้อลดลงอาจสูงมากกว่าร้อยละ 25 ในชุดตรวจบางชนิด ดังนั้น WHO จึงได้ออกคำแนะนำให้ทุกหน่วยงานที่ใช้ชุดตรวจควรจัดเตรียมระบบควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการขนส่งและการเก็บ⁽⁷⁾ และจากการออกแบบงานมักได้รับข้อมูลปัญหาเกี่ยวกับบางครั้งชุดตรวจที่แพร่ผลไม้ได้ หรือผลการตรวจไม่สอดคล้องกับผลจากตรวจด้วยกล่องจุลทรรศน์ ควรต้องมีการศึกษาปัญหาอยู่ที่ชุดตรวจที่เกิดจากขั้นตอนการผลิตหรือ

เกิดจาก การเก็บไม่เป็นไปตามที่คำแนะนำกำหนดมีผลลดประสิทธิภาพการตรวจ เนื่องจากพื้นแหล่งระบาดของโรคมาลาเรียส่วนมากเป็นพื้นที่ทุรกันดาร บางแห่งอาจขาดอุปกรณ์การเก็บที่เหมาะสม หรือบางครั้งอาจหลีกเหลี่ยงไม่ได้ จึงจำเป็นต้องทราบผลกระแทบทากชุดตรวจต้องอยู่ในที่อุณหภูมิความชื้นไม่เหมาะสมแต่ส่วนใหญ่จะชุดตรวจอาจอยู่ในที่อุณหภูมิสูงของแต่ละวันในช่วงไม่กินวันละ 6 ชั่วโมง ไม่นานเหมือนการศึกษาของ WHO ชุดตรวจที่ถูกเก็บในที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C เป็นเวลานาน 60 วัน

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อ

1. ศึกษาผลกระแทบทองการเก็บ MRDT ในที่อุณหภูมิ 35°C, 40°C และ 45°C และความชื้นสูง ร้อยละ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 28-37 และ 80-90 ในช่วงเวลา 1 - 5 วัน ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้ोมาลาเรีย (diagnostic efficiency)

3. ขอบเขตการศึกษา

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

2. ศึกษาผลกระแทบทองการเก็บ MRDT: MRDT OptiMAL-IT และ Paracheck – Pf ในที่มีความชื้นสูง ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 28-37 และ 80-90 ระยะเวลา 1-5 วัน ต่อประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้ोมาลาเรีย (diagnostic efficiency)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

อนุกรมวิธานเชื้อมาลาเรีย

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

Kingdom Protista

Subkingdom Protozoa

Phylum Apicomplexa

Class Sporozoa

Subclass Coccidia

Order Eucoccidiida

Suborder Haemosporina

Family Plasmodiidae

Genus Plasmodium

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

Sub-genus: *plasmodium*

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

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

Group: *Malariae* Species: *P. malariae*, *P. brasiliense*, *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

ในธรรมชาติพบว่าเชื้อนามาเรียมากกว่า 120 species โดยพบว่าเชื้อนามาเรียประมาณ 20 species ทำให้เกิดโรคในสิ่งประมาน 19 species ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ ค้างคาวและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยเท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคในคนโดยทั่วไป ซึ่งได้แก่

P. malariae (Laveran, 1881)

P. vivax (Grassi and Feletti, 1890)

P. falciparum Welch, 1897

P. ovale Stephens, 1922

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

วงชีวิต (Life cycle)

วงชีวิตของเชื้อนามาเรียประกอบด้วยวงชีวิตในคนและในยุงกันปล่องเพศเมีย (*Anopheles* sp.) กระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นในกระบวนการอาหารของยุง ส่วนกระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับในคน

เมื่อยุงกันปล่องที่มีเชื้อระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายกัดคน sporozoite จะถูกปล่อยสู่กระเพาะเลือดภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง sporozoite จะเข้าไปเจริญอยู่ภายในเซลล์ตับด้วยกระบวนการ endocytosis เป็นหุ้มเซลล์ตับบางส่วนจะถูกนำไปเป็นถุงหุ้ม (parasitophorous vacuolar membrane) เมื่อ sporozoite เข้าสู่ภายในเซลล์ตับจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นกลมหรือรี แล้วพัฒนาต่อไปเป็นระยะ trophozoite ระยะ schizont และระยะ merozoite ตามลำดับ จากกระบวนการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า schizogony หรือ merozoite โดย nucleus จะมีการแบ่งตัวแบบ mitosis ซ้ำกัน จันได้ 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 โดยแต่ละหน่อจะแยกตัวออกไปเป็นเซลล์รุ่นใหม่เรียกว่า merozoite เมื่อการแบ่งตัวเสร็จสมบูรณ์จะให้ 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 ในตับต่างกันตามชนิดของเชื้อนามาเรียโดยใช้เวลาประมาณ 5-15 วัน ซึ่ง *P. falciparum* ใช้เวลาอ่อนยิ่งที่สุดประมาณ 14-15 วัน

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

หยุดพักระการเจริญในเซลล์ตับชั่วระยะเวลาหนึ่งเรียกว่า hypnozoite (Krotoski et al., 1982) และจะกลับมาเจริญต่อไปเป็นระยะต่างๆ ดังกล่าวได้อีก โดยการกลับมาเจริญต่อไปใหม่อาจเกิดขึ้นไม่พร้อมกันซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยมีอาการไข้กลับ (relapse)

ระบบ merozoite ที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนั้น เริ่มต้นที่การรับรู้และการเก้าอี้ดเซลล์เม็ดเลือดแดง (recognition and attachment) จากนั้น merozoite จะหันด้านที่มี apical complex ในแนวตั้งหากกับผิวของเม็ดเลือดแดง (orientation)⁽⁸⁾ โดยอาศัยตัวจับจำเพาะ (specific receptor) บนผิวเม็ดเลือดแดง เมื่อ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้แล้ว โครงสร้างจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการถ่ายตัวของเยื่อหุ้มชั้น microtubule และ apical complex เซลล์จะมีรูปร่างกลมตรงกลางมี vacuole ขนาดใหญ่ซึ่งจะคัน nucleus และ cytoplasm ไปอยู่ที่ขอบของเซลล์ ทำให้เพิ่มปริมาณ cytoplasm ทำให้ vacuole มีขนาดเล็กลงเปลี่ยนเป็น growing trophozoite เชื่อมalaเรียจะแบ่งตัวโดยไม่ออาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง เมื่อ nucleus แบ่งตัวเต็มที่แล้ว nucleus จะเคลื่อนที่ไปบริเวณขอบเซลล์ที่เกิด cytomere จากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการคลอดตัวมาชิดกันทำให้เกิดเซลล์ใหม่หรือ merozoite กระบวนการที่เชื่อเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงที่ schizont มีการแบ่งตัวอย่างสมบูรณ์แล้วจะแตกออกทำให้ merozoite ถูกปล่อยออกจากสูตระและเลือด จากนั้นจะถูกตามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่และเจริญเป็นวัฏจักรต่อไป การแตกตัวของเม็ดเลือดแดงมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไข้หนาวสั่นในผู้ป่วยเรียกกระบวนการที่เชื่อมalaเรียเจริญเติบโตและแบ่งตัวในเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดว่า asexual erythrocytic stage

การเจริญเติบโตของเชื่อมalaเรียในเม็ดเลือดแดงจำต้องใช้สารอาหารจาก host cell เช่น กลูโคส กรดไขมัน กรดไขมัน และไขโนโกลบิน เป็นต้น โดยที่ไขโนโกลบินซึ่งอยู่ใน cytoplasm ของเม็ดเลือดแดงที่ถูกกินและย่อยเพื่อนำกรดอะมิโนไปใช้นั้น เชื่อมalaเรียไม่อาจย่อยสลาย heme ได้และ heme นี้พิษต่อเชื่อมalaเรีย ดังนั้นจึงถูกกำจัดในรูปของกากอาหาร (malarial pigment หรือ hemezoin) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของ heme⁽⁹⁾ มีลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลavaและมีรากเหง้าเป็นองค์ประกอบทั้งนี้ขนาด ปริมาณและสีของ malarial pigment จะแตกต่างกันเด่นชัดตามชนิดของเชื่อมalaเรีย

ภายหลังจากเชื่อมalaเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่ออาศัยเพศประมาณ 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 เชื่อมมาลาเรียจะเพิ่มจำนวน nucleus และ cytoplasm ใน cytoplasm ขยายเกือบเดือนเม็ดเลือดแดงจะพบปรินาม malarial pigment มากกว่าในระบบ schizont พร้อมกับมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยใน *P. falciparum* เมื่อเจริญเติบโต gametocyte จะมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) หรือกลวยหอน 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 เมื่อย้อมด้วยสีhimซ่าจะพบว่า nucleus ของ male gametocyte จะติดสีแดงอยู่ค่อนข้างกระชัด กระจายโดย gametocyte สามารถอยู่ในกระแสเลือดได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง จนกว่าบุญมากัดกินเลือดเพื่อเจริญเติบโตต่อไปหรือถ่ายตัว

เมื่อยุงกัดปล่อยเพศเมียมากัดกินเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรีย บุญจะได้รับเชื้อทุกระบบที่จะถูกย่อยในกระเพาะอาหารของบุญ ยกเว้นระบบ gametocyte จะเจริญเติบโตต่อไปเป็นระบบ gamete เรียกกระบวนการนี้ว่า gametocyte สำหรับ male gametocyte จะสร้างเซลล์สีบพันธุ์เพศผู้โดยการแบ่งตัวแบบ mitosis 3 ครั้ง ได้ male gamete แต่ละตัวจะมีแฟลกเจลล่า 1 เส้น และเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) กับ female gametocyte ภายในกระเพาะอาหาร (stomach lumen) ของบุญได้ zygote จากนั้นมีการสร้างเท้าเทียมเพื่อจะใช้ผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารแล้วไปเจริญที่ผิวค้านนอกของกระเพาะอาหารของบุญเรียกกระบวนการนี้ว่า ookinete หลังจากนั้นจะพัฒนาต่อไปเป็น oocyst ซึ่งภายในจะมี sporozoite จำนวนมากประมาณ 1,000 ถึง 2,000 ตัว (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991) เมื่อออคyst เจริญเติบโต ผนัง oocyst จะแตกเข้าระบบ sporozoite จะถูกปล่อยแพร่รวมถึงช่องอก (thoracic cavity) และใช้สูตรต่อมน้ำลาย (salivary gland) ของบุญ เรียกกระบวนการเจริญของเชื้อมาลาเรียในบุญโดยอาศัยการสีบพันธุ์แบบใช้เพสจันเกิดการสร้าง sporozoite ว่า spologony ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 8-21 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรียและชนิดของบุญพำนะ ตลอดจน สิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิกายนอก เป็นต้น

พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

การศึกษาทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค pulsed field gradient gel electrophoresis และ south blot hybridization (Kemp et al., 1985) ทำให้ทราบว่า *P. falciparum* มีโครโนโซมขนาดแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 650 Kb ถึง 3.4 Mb โดยการจัดเรียงโครโนโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดเป็นโครโนโซมที่ 1 เรียงลำดับตามขนาดขึ้นมาจนถึงโครโนโซมที่ 14 มีขนาดใหญ่ที่สุดลักษณะโครงสร้างของโครโนโซมที่ปลายทั้งสองข้าง (telomere) ของสิ่งมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้นนิวเคลียส จะมีความคล้ายกันประกอบด้วยลำดับเบสที่ซ้ำกันเป็นชุดเรียงติดต่อกัน (tandem repeated sequence) มีหน้าที่ช่วยให้ดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณตอนปลายของโครโนโซมเกิดการจำลองตัวเองอย่างสมบูรณ์และรักษาให้มีสภาพเป็นเส้นอยู่ได้⁽¹⁾ ชนิดต่างๆ ที่มีความจำเพาะกับ gene ที่สร้างโปรตีน

ของเชื้อ *P. falciparum* ได้แก่ glucose phosphate isomerase (*pfgpi*) 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 ที่จำเพาะกับโครโนโซมที่ 8 ที่ 7 และที่ 6 ตามลำดับ ทำให้ทราบ ตำแหน่งของ gene ต่างๆ บนโครโนโซม (chromosome mapping)⁽¹²⁾ (รายละเอียดดังตารางที่ 1) และเชื่อว่า gene 1 ซึ่งควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมที่เรียงอยู่บนโครโนโซมจะมีการแลกเปลี่ยน สารพันธุกรรม (crossingover) ระหว่างการปฏิสัตหินยุง ทำให้เชื้อมาลาเรียรุ่นต่อมาอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมใหม่ที่ต่างไปจากเดิม⁽¹³⁾ ในบางครั้งนิวคลีโอไทด์อาจถูกแทรกเพิ่ม (insertion) หรือ หายไป (deletion) ซึ่งอาจนำมาสู่การเปลี่ยนแปลงแบบผ่าเหล้า (mutation)

วิธีการตรวจเพื่อการวินิจฉัยมาลาเรียสามารถจำแนกออกได้เป็น

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

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือด

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในเลือดคือยกถังชุดตรวจที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ในถุงและนำเข้าไปในชุดตรวจ ผลลัพธ์จะแสดงผลว่ามีเชื้อมาลาเรียอยู่ในเลือดหรือไม่ ถ้ามีเชื้อมาลาเรียอยู่ในเลือด ผลลัพธ์จะเป็นบวก ถ้าไม่มี เชื้อมาลาเรียอยู่ในเลือด ผลลัพธ์จะเป็นลบ

1. การขูดตัวยีบมีดสำหรับตรวจเชื้อมาลาเรีย

- 1.1 การตรวจด้วยฟิล์มเลือดบาง โดยการใช้เลือดผู้ป่วยเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนแผ่นสไลด์ และขูดตัวยีบมีดสามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อ โดยการนับเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย คิดอัตราเป็นร้อยละของเม็ดเลือดที่ติดเชื้อ

1.2 วิธีการตรวจด้วยฟลัมเลือดหนา โดยการหยดลงบนสไลด์ ทำให้มีค่าเดือดแดงแตกถ้าปล่อยเชื้อมาลาเรียออกมานะในระหว่างการข้อมสี สามารถคำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยการนับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 200 ตัว

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการข้อมฟลัมเลือดด้วยสี吟ช่ามีข้อดี คือ

- การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยฟลัมเลือดหนา โดยผู้เชี่ยวชาญจะมีความไวสูง สามารถหาเชื้อมาลาเรียได้ เมื่อมีจำนวนน้อยเพียง 40 ตัวในเม็ดเลือด 1 มล.โดยลิตร หรือสามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่มีอยู่ 1-5 ตัวในเม็ดเลือดแดงล้านตัว
- มีความจำเพาะสูง สามารถจำแนกชนิดเชื้อ เป็นวิธีที่เหมาะสมในทางปฏิบัติเพื่อวินิจฉัยโรคทางคลินิก ตัวนี้ใหญ่ให้เวลาประมาณ 5-10 นาที
- เป็นวิธีที่ตรวจได้ง่ายและยังสามารถบอกได้ว่าเชื้อมาลาเรียที่พบมีรูปร่างอย่างไร (Bruce-Chwatt, 1993)

2. การข้อมด้วยสีอครีดีน ออเรนจ์ (Acridine orange stain) จำแนกเป็น

2.1 เนื่องจากการข้อมฟลัมเลือดด้วยสี吟ช่ามีข้อเสีย คือ ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ตรวจเป็นสำคัญ เพื่อให้การตรวจหาเชื้อมาลาเรียย่างขึ้น จึงใช้สี acridine orange ข้อมฟลัมเลือด ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับแสงที่มีช่วงคลื่นสั้นแต่มีพลังงานสูง เช่น แสง ultraviolet และเปล่งแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นยาวกว่า ดังนั้นต้องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มี interference filter ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นกระจกเคลือบเรืองแสงไว้ติดกับคอนเดนเซอร์ และใส่ barrier filter SD-54 ซึ่งมีแสงสีเหลืองไว้ติดเลนส์ตา ใช้แหล่งกำเนิดแสงจาก halogen light source ข้อดีของวิธีนี้ คือ เชื้อมาลาเรียที่ถูกข้อมด้วยสีดังกล่าวสามารถเรืองแสงได้ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังกล่าว ทำให้มองเห็นส่วนประกอบของเชื้อมาลาเรียภายในเม็ดเลือดแดงชัดเจนยิ่งขึ้น สามารถตรวจเชื้อมาลาเรียที่ความหนาแน่นประมาณ 5 ตัวต่ometre¹ ในโดยลิตร แต่ก็มีข้อเสีย คือ acridin orange มีพิษต่อเยื่อบุผิวต่างๆ ของสัตว์มีชีวิตและไม่สะดวกในการนำมาใช้ในภาคสนาม เพราะต้องใช้อุปกรณ์ประกอบกล้องจุลทรรศน์และเครื่องกำเนิดแสง ซึ่งต้องมาสามารถพัฒนาเลนส์พิเศษขึ้นเดียวใช้กรองแสงเดดให้เหลือเฉพาะแสงที่ทำให้เชื้อมาลาเรียเรืองแสงพลูออฟเรสเซนซ์ (fluorescence) เมื่อย้อมด้วยสี acridin orange⁽¹⁴⁾

2.2 Quantitative buffy coat (QBC) เป็นการนำ acridine orange มาเคลือบที่ผิวค้านในของ capillary tube เมื่อบรรจุเลือดลงในหลอดดังกล่าว เชื้อมาลาเรียที่ถูกข้อมจะเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้เลนส์พิเศษ⁽¹⁵⁾

การตรวจหา antibody ในรีัม

การศึกษาวิจัยเพื่อตรวจหา antibody ที่มีความเฉพาะต่อเชื้อมาลาเรียมีประโยชน์สำหรับงานทางค้านระบบวิทยาของมาลาเรีย วิธีการตรวจดังกล่าว ได้แก่

1. Indirect immunofluorescent antibody test (IFA)⁽¹⁶⁾ โดยนำเอาชิ้นของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลามาเรียหรือตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาเจือจางที่ระดับต่างกันโดยลำดับ แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ antigen ซึ่งเป็นเชื้ومาลามาเรียที่ทำเป็นแผ่นพิล์มน้ำสีใส่หลังจากนั้นนำไปล้างซีรั่มส่วนเกินออก นำ antihuman-immunoglobulin ซึ่งติดคลากด้วยสารเรืองแสง เช่น Fluorescent isothiocyanate (FITC) เป็นตัวทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง นำไปตรวจหา antibody ในชีรั่มจากการเรืองแสงบนตัวของเชื้อมาลามาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ antigen ที่ใช้ในการตรวจเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลามาเรียอยู่ภายใน ซึ่งเตรียมจากจากเลือดผู้ป่วยหรือเชื้อมามาลามาเรียที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ วิธีนี้จะให้ผลบวกในผู้ป่วยมาลามาเรียโดยตรวจพบ antibody เมื่อรีบมีเชื้อมามาลามาเรียในเลือดและระดับ antibody จะสูงขึ้นเรื่อยๆ ในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์แรกต่อมาจะลดลง antibody ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างนี้ ส่วนใหญ่จะเป็น antibody ชนิด IgG และ IgM โดย antibody ชนิด IgM จะอยู่ไม่นาน แต่ IgG จะอยู่ได้นานกว่า ข้อดีของวิธีการนี้คือการเตรียม antigen สะดวก เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากพอสมควร ซึ่งสัมพันธ์กับการเบย์ติคเชื้อมามาลามาเรีย ส่วนข้อเสีย ก็คือใช้ได้แค่ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพร้อม เช่น กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ นอกจากนี้การอ่านผลในห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งอาจใช้ผลสรุปต่างกันและโดยทั่วไปไม่สามารถแยกผู้ที่เคยติดเชื้อมามาเรียออกจากผู้ที่กำลังมีเชื้อยู่ภายในร่างกายได้ เนื่องจากระดับ antibody ยังคงอยู่นานกว่าหลังจากเชื้อได้หมดไปจกร่างกายแล้ว

2. Indirect hemagglutination test (IHA)⁽¹⁷⁾ เป็นวิธีการตรวจที่อาศัยเม็ดเลือดแดงเป็นตัวกลาง โดยให้ antigen ของเชื้อมามาลามาเรียที่ไปเกาะเชื่อมโยงกับ antigen ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง โดยใช้ tannic acid หรือ chromic chloride เป็นตัวช่วย หลังจากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับชีรั่มที่มี antibody ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อจะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจน สามารถอ่านระดับความเข้มข้นของ antibody จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น วิธีนี้มีคุณค่าและประโยชน์ในการตรวจหา antibody คล้ายคลึงกับวิธี IFA ข้อดีของวิธี IHA ก็คือ เป็นวิธีที่กระทำง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สามารถเก็บ antigen ของเชื้อมามาลามาเรียในรูปแห้ง (lyophilized) ได้เป็นระยะเวลานานและใช้ตรวจชีรั่มได้คราวละจำนวนมาก สามารถประยุกต์ใช้ได้ในทุกพื้นที่ มีความไวสูงกว่าวิธี IFA ส่วนข้อจำกัดของวิธี IHA ก็คือ การเตรียมและการทำ antigen ให้ได้มาตรฐานนั้นยุ่งยากกว่าการเตรียม antigen ที่ใช้ในวิธีของ IFA ดังนี้จึงเตรียมได้เฉพาะห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น และเมื่อนำมาทดสอบผู้ป่วยมาลามาเรียจะเสียบพลันหรือได้รับเชื้อเป็นครั้งแรก พนวั่นมีความไวน้อยกว่าวิธี 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 หลังจากนั้นเติมชีรั่มที่ต้องการจะทดสอบลงไปโดยให้มีความเข้มข้นที่ระดับต่างกันหรือใช้ความเข้มข้นของชีรั่มระดับ

เดียวลงไป ปล่อยทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา แล้วล้างเอาซีรั่มส่วนเกินออก เดิน anti-human immunoglobulin ที่ติดnakด้วยเอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase หรือ alkaline phosphatase ลงไปเพื่อทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไปเพื่อให้เกิดสี ตรวจวัดระดับ antibody ที่จำเพาะโดยคุณภาพของ substrate ที่เปลี่ยนไปด้วยตาเปล่าในการอ่านที่ตรวจ ซึ่งรั้นที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันไปอาจใช้เครื่องอ่านผลช่วย (ELISA reader) วิธี ELISA นี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ค่อนข้างง่าย จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจในภาคสนาม เพื่อนำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมาก (Artuda, 1996) อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้ ELISA reader จะเพิ่มความถูกต้องในการอ่านผลมากขึ้น นอกจากนี้วิธี ELISA ยังเป็นวิธีที่มีความไวสูง เมื่อเปรียบเทียบ กับวิธี IHA และการตรวจหาระดับ antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียยังสามารถลบผลกระทบและ ความจำเพาะของ antibody ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และชนิดของ antigen ที่ใช้ตรวจสอบ รวมทั้งอาจใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยที่จะเป็นมาลาเรียที่มีอยู่ในพื้นที่ที่ไม่มีการระบาด ของมาลาเรียข้อจำกัดคือ การเตรียม antigen ที่ไม่สามารถเตรียมได้ทุกห้องปฏิบัติการและการ ทดสอบอาจให้ผลลบในผู้ป่วยมาลาเรียระยะเฉียบพลันหรือพั่งติดเชื้อครั้งแรก ตลอดจนระดับ antibody อาจคงอยู่นานแม้ว่าจะหายจากโรคมาลาเรียแล้ว

การตรวจหา antigen ของเชื้ومาลาเรีย

1. Radioimmunoassay (RIA) และ Immunoradiometric assay (IRMA) การตรวจหา antigen ของเชื้ومาลาเรียในเลือด โดยหา antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ของเชื้ومาลาเรียทำการติดnak ด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นตัวทดสอบ โดยวิธี RIA และ IRMA หลักการของวิธี RIA คือ solid phase antibody binding inhibition test สามารถตรวจหาเชื้อที่มีอยู่ตั้งแต่ 1-10 ตัวต่อมิลลิลิตรเลือดแดง 1 ล้านตัว ทั้งนี้ความไวและความจำเพาะขึ้นอยู่กับ antibody ที่ใช้ส่วนวิธี IRMA โดยวิธี two-site sandwich วิธี IRMA นี้มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 0.67 ตัว ต่อมิลลิลิตรเลือดแดง 1 ล้านตัว⁽¹⁸⁾ แต่เนื่องจากการพัฒนาวิธีการตรวจหา antigen ของเชื้ومาลาเรียโดยใช้สาร กัมมันตรังสี มีความยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะสมนำไปใช้ในภาคสนามหรือทาง คลินิก และอาจเป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง

2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นอกจากวิธี ELISA ตรวจหา antibody ต่อ เชื้อมาลาเรีย ยังสามารถตรวจหา antigen โดยใช้ antibody ที่จำเพาะติดnakด้วยเอนไซม์ สำหรับ antibody ที่ใช้อาจเป็น monoclonal antibody หรือ polyclonal antibody แต่การใช้ monoclonal antibody มีความไวและความจำเพาะสูงกว่า การประยุกต์ใช้หลักการ ELISA สำหรับตรวจหา antigen นี้ดังนี้

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

ชนิดเดียวกับที่ใช้เคลือบ solid phase ที่ติดคลากด้วยเย็น ไนซ์ ซึ่งจะไปจับกับ antigen ที่ทำปฏิกิริยา กับ antibody บน solid phase หลังจากนั้นเติม substrate ที่เหมาะสมลงไป ถ้ามี antigen ที่ต้องการ ตรวจสอบในตัวอย่าง เย็น ไนซ์จะเปลี่ยนสี substrate สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า หรือวัดปฏิกิริยาที่เกิดเป็นค่า optical density (OD) โดยใช้ ELISA reader เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับเลื่อนปกติ (Khusmith et al., 1992)

2.2 Dot ELISA โดยการนำตัวอย่างเลือดที่ต้องการทดสอบ ไปทำให้มีค่าเลือดแดงแตกแล้ว หยดลงบนแผ่น membrane หลังจากนั้นใส่ IgG ซึ่งเป็น monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนของเชื้อมาลาเรียซึ่งติดคลากด้วยเย็น ไนซ์ alkaline phosphatase เมื่อเติม substrate ที่เหมาะสม เย็น ไนซ์จะเปลี่ยนสี substrate เกิดจุดสีที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า วิธีนี้มีความไวสามารถตรวจหาเชื้อได้ที่ระดับความหนาแน่นร้อยละ 0.001⁽¹⁹⁾ เมื่อนำวิธีการนี้มาทดสอบกับเลือดของผู้ป่วยมาลาเรีย พบร่วมกันความไวคิดเป็นร้อยละ 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 Immunochromotographic (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 เมื่อนำแผ่นทดสอบจุ่นในเลือดที่ทำให้มีค่าเลือดแดงแตกแล้ว ถ้าเลือดตัวอย่างมีเชื้อระยะดังกล่าว PfHRP-2 จะทำปฏิกิริยากับ dye-conjugated anti PfHRP-2 monoclonal antibody จะปรากฏแถบสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การทดสอบมีความไวร้อยละ 80-90 ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อมากกว่า 80 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร และการตรวจด้วยวิธีทึ้งสองยังให้ผลตรวจว่าติดเชื้อ 28 วันหลังจากได้รักษา

การตรวจหา Nucleic acid

1. Nucleic acid hybridization เป็นวิธีสำหรับการตรวจหา nucleic acid เป้าหมายของเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) เริ่มต้นจากการทำให้ดีเย็นและแยกเป็นสายเดี่ยว และถ้าลดอุณหภูมิคืนเย็นและแยกเป็นสายเดี่ยวจะมานะจับกัน (hybridization) กับสายเดิมโดยลักษณะการจับกันจะเป็นแบบ antiparallel นอกจากนี้หลักการของ hybridization สามารถใช้ได้สำหรับ RNA กับ RNA ที่มีลำดับเบสตรงกัน (complementary) โดยจำแนกวิธีการตรวจที่ใช้ดังนี้

1.1 solid phase hybridization โดยการแยกสกัดดีเอ็นเอจากตัวที่ต้องการส่งตรวจ นำมาตร์บนแผ่นคั่วจุน ซึ่งอาจทำมาจาก nylon หรือ nitrocellulose membrane หลังจากนั้นนำมา hybridize ในสารละลายของ probe ซึ่งเป็น nucleotide สายสัมที่มีลำดับเบส complementary กับ nucleotide เป้าหมาย สามารถตรวจปฏิกริยาที่เกิดบนแผ่นคั่วจุนหรือบนฟิล์ม X-ray

1.1.1 Dot blot hybridization สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้รวดเร็วและจำนวนน้อย ทำได้ง่าย โดยการแยกสกัด nucleic acid แล้วนำมาถ่ายโอน (transfer) บนแผ่นคั่วจุน หลังจากนั้นจึงนำมา hybridize ในสารละลายของ probe ซึ่งแยกออกตามชนิด probe คือ

1.1.1.1 DNA probe เตรียมจากสายดีเอ็นเอในส่วนที่จำเพาะกับชนิดของเชื้อ มาลาเรียโดยการทำ DNA cloning จากนั้นเลือกสายดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาติดคลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือเอนไซม์ (Barker et al., 1989; Barker et al., 1992) การตรวจด้วยวิธี DNA probe โดยทั่วไปใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง มีความไวของการทดสอบประมาณ ร้อยละ 80-85 และมีความจำเพาะประมาณร้อยละ 90-100 การใช้ DNA probe ที่ติดคลากด้วยกัมมันตรังสีพบว่ามีความไวมากกว่าวิธีการที่ใช้เอนไซม์ โดยจำนวนเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจะแตกต่างกันแล้วแต่ วิธีการและความจำเพาะของ DNA probe ที่ใช้สามารถตรวจพบเชื้อมalaria ตั้งแต่ 40-500 ตัวต่อ เลือด 1 ไมโครลิตร อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด เช่น ความไวของการตรวจไม่ดีไปกว่าการตรวจจากฟิล์มเลือดหนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีเชื้อในเลือดจำนวนต่ำ และวิธี DNA probe ที่ติดคลากด้วยสารกัมมันตรังสีเป็นวิธีที่ยุ่งยาก มีอายุการใช้งาน (half life) สั้น ราคาแพง

1.1.1.2 RNA probe ใช้หลักการเช่นเดียวกับ DNA probe โดยใช้ RNA probe ที่จำเพาะต่อสาย RNA ของเชื้омalaria เป็นตัวตรวจ สาเหตุที่มีการพัฒนาวิธีการนี้มาเพื่อใช้แทน DNA probe เนื่องจาก RNA probe น่าจะมีความไวสูงกว่า DNA probe โดยทฤษฎีแล้วเชื้อมalaria เรียก แต่ละตัวจะมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 0.02 พิโภกรัม แต่จะมีปริมาณ RNA มากถึง 0.21 พิโภกรัม ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่า และในห้องปฏิบัติการสามารถให้ผลบวกได้แม้ว่ามีเชื้อเพียงร้อยละ 0.00046 ค่าที่อ่านได้จาก RNA probe มีความสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อมalaria ในเลือดที่ได้จากการอ่านด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Waters & McCutchan, 1989) ซึ่ง RNA probe กว่าจะให้ผลดีกว่าแต่ในทางปฏิบัตินั้นยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับการเตรียม probe นอกจากนั้นการพัฒนาเทคนิค PCR ขึ้นมาใช้เป็นเทคโนโลยีที่มีความไวและความจำเพาะ จึงทำให้ไม่ได้มีการพัฒนา RNA probe ขึ้นมาจนถึงระดับที่นำมาใช้กันแพร่หลาย

1.1.2 Southern blot hybridization ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่แยกสกัดจากตัวอย่างแล้วนำไปตัดด้วย restriction endonuclease ที่เหมาะสม นำไปแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis ทำการบนถ่ายดีเอ็นเอจากเจลสู่แผ่นคั่วจุน ซึ่งอาจเป็นแผ่น nitrocellulose หรือ nylon จากนั้น นำไป hybridize กับ probe ที่ติดคลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ไนซ์ หรือสาร chemiluminescence

1.1.3 Northern blot hybridization ขั้นตอนการทำลักษณะกับ Southern blot hybridization จุดแตกต่างที่สำคัญเป็นการตรวจหา RNA

1.2 Liquid phase hybridization ในหลักการของ hybridization วิธีนี้ nucleotide ที่สกัดจากตัวอย่างและ probe จะต้องติดต่อกันด้วย acridinium ester แล้วนำไป hybridize กับตัวอย่างตรวจและเมื่อติดต่อ hydrogen peroxide ลงไปจะทำปฏิกิริยา กับ acridinium ester ที่อยู่บนตัว probe และจะปลดปล่อยพลังงานแสงออกมานะ 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 ซึ่งแต่ละสายจะจับคู่กันด้วยพันธุ์ไซโตรเจนระหว่างเบสที่มีความจำเพาะต่อกัน (complementary) โดยเบสชนิด thymine (RNA จะเป็น uracil) สามารถจับคู่กับเบสชนิด adenine และเบสชนิด cytosine มีความจำเพาะกับเบสชนิด guanine ความสามารถสร้างพันธุ์ไซโตรเจนระหว่างสายดีเอ็นเอแบบจำเพาะนี้ ทำให้สามารถสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยลอกแบบดีเอ็นเอต้นแบบได้เหมือนกับสายเดิมทุกประการ วิธี PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้อย่างมาก ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม⁽²²⁾ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนเล็กน้อยเท่านั้น วิธี PCR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 2^n โดย n เท่ากับจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ภายนอกลังสีสูดปฏิกิริยาจะได้ดีเอ็นเอจำนวน 3.4×10^{10} สาย จากสายดีเอ็นเอต้นแบบเพียงสายเดียว ซึ่งได้มีการประยุกต์วิธีการให้เหมาะสมกับลักษณะงาน

2.1 Polymerase chain reaction หลักการของวิธีนี้โดยเริ่มจากการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวคือความร้อน เพื่อทำลายพันธุ์ไซโตรเจนระหว่างคู่เบส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงในระดับที่ primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สายเดี่ยวนาเข้าบ่าย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่ complementary กับ primer และอาจขยายเช่น Taq DNA polymerase ได้จากแบบที่เรียกว่า *Thermus aquaticus* (Brock & Freeze, 1969) นอกจากนี้การประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อเพิ่มและลดอุณหภูมิโดยอัตโนมัติ (automated thermal cycler) ทำให้วิธี PCR ได้รับการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง

การนำวิธี PCR มาใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมalaria โดยใช้ gene ของดีเอ็นเอ เป้าหมายที่แตกต่างกัน 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

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อมalaria โดยมีหลายวิธีเพื่อมาเสริมการทำงาน แต่วิธีที่ถูกนำมาใช้อบย่างแพร่หลายคือการตรวจหา circulating antigen ที่สามารถตรวจพบได้ในช่วงที่มีการติด

เชื้อนามาเรีย คือการตรวจแบบ Immunochromatographic (ICT) ซึ่ง circulating antigen ที่มีบทบาทมากในการตรวจวินิจฉัยเชื้อนามาเรีย และผลิตชุดตรวจโรคมาลาเรีย (MRDT) ออกเพื่อขายใช้ทั่วไปได้แก่

1.Histidine rich protein (HRP) โดยเชื้อ *P. falciparum* ที่เข้าไปเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดงจะให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นตุ่นยื่นออกมานะ (knob) ซึ่งเป็นปัจจัยประการหนึ่งที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงจากการไปอุดตันหลอดเลือดที่ไปหล่อเลี้ยงอวัยวะที่สำคัญ 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 พันแทรกอยู่ใน cytoskeleton ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในส่วนที่เป็นฐานของ knob

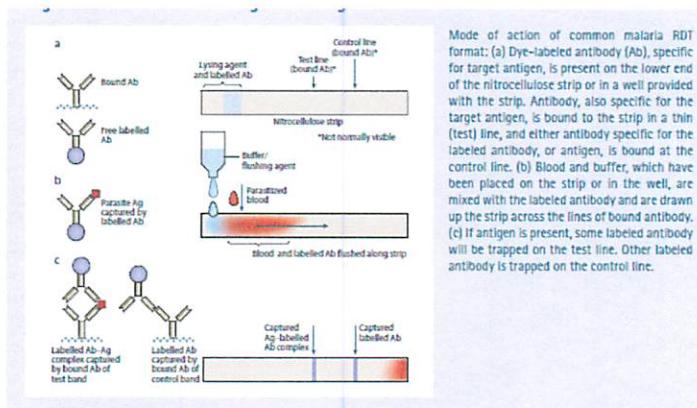
1.2 HRPII เป็น soluble histidine-alanine rich protein (Soluble HARP) หรือ *P.falciparum* HRPII (PfHRPII) ประกอบด้วย histidine ร้อยละ 35 alanine ร้อยละ 37 และ aspartic ร้อยละ 10 ถูกสังเคราะห์และส่งออกนอกเซลล์ในช่วงการเจริญแบบไม้อาศัยแพค ลักษณะสำคัญของ HRPII คือ

- จะถูกผลิตออกมานเป็นจำนวนมาก
- มี amino acid sequence ซ้ำกัน 12 ชุด
- สามารถจับกับ metal ion
- สามารถกรองตัวผ่านห้องให้สร้างแอนติบอดี

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

2. Lactate dehydrogenase (LDH) ประกอบด้วย polypeptide 4 หน่วยย่อย ที่มีการจัดเรียงเป็น enzyme ที่ต่างชนิดกัน(isoenzyme) โดยโมเลกุลของ LDH จะมีน้ำหนักประมาณ 35 KDa จะพบ LDH ในเซลล์ที่ต้องการพลังงาน ซึ่งได้จากปฏิกิริยา glycolysis โดยไม่ใช้ออกซิเจน LDH จะช่วงเร่งการเกิดปฏิกิริยาขึ้นสุดท้ายเพื่อเปลี่ยน pyruvate ให้เป็น acetic acid และพลังงาน ⁽²⁹⁾ LDH ของเชื้อนามาเรียจะมีความจำเพาะสำหรับแต่ละ 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 aldo-1 และ aldo-2 ซึ่ง aldo-1 มีความเหมือนกับ aldolase ที่พบใน *P.falciparum* ระยะ sporozoite ส่วน aldo-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 ทำให้มีการใช้ข้ากินความจำเป็นและขาดการควบคุมกำกับการดูแลติดตามผู้ป่วย

WHO แนะนำว่าการดูแลรายที่ป่วยทุกรายต้องใช้การตรวจวินิจฉีดมาลาเรีย แต่การใช้ MRDT ที่มีความจำเป็นโดยเฉพาะพื้นที่ที่ไม่มีกล่องจุลทรรศน์และคนตรวจที่มีประสบการณ์ และถูกนำมาใช้มากขึ้นในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา แต่ก็มีข้อจำกัดได้ถูกนำมาเปรียบเทียบเมื่อนำมาใช้ในภาคสนามในความต่างธรรมชาติของเชื้อและการระบาด WHO เห็นว่าสมควรมีการรวบรวมข้อมูลเพื่อใช้ประโยชน์ประกอบการตัดสินใจเลือกใช้และจัดหา ได้ดำเนินการจัด Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) และจัดตั้งกองทุน Foundation for innovation New Diagnostic (FIND) ใช้ประเมิน MRDR ที่มีจำนวนอย่างมาก แม้ว่า Monoclonal antibody ออกแบบเพื่อคัดจับแอนติเจนทั้ง 3 คือ PfHRPII , pLDH, aldolase ชุดตรวจคัดจับแอนติเจนตัวเดียวกันแต่ตัว Monoclonal antibody ของแต่ละบริษัทอาจไม่เหมือนกัน โดยเมื่อนำทดสอบพบว่ามีความไวและความถูกต้องสูงมากในพื้นที่หนึ่ง แต่อาจต่ำมากในอีกพื้นที่ เพาะแอนติเจนที่มีความหลากหลาย เช่น PfHRPII มีการจำแนกออกเป็น 4 ชนิด ตามจำนวนชุดของ amino acid ที่ซ้ำกัน โดยชนิด A มีชั้นมากกว่า 100, ชนิด B มี 50-100 ชุด ชนิด C มีน้อยกว่า 43 ชุด และชุด borderline มี 44-49 ชุด และเมื่อนำมาทำการกระจายของแต่ละชนิดในแต่ละภูมิภาคพบความแตกต่างดังตารางที่ 1⁽³⁾

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

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

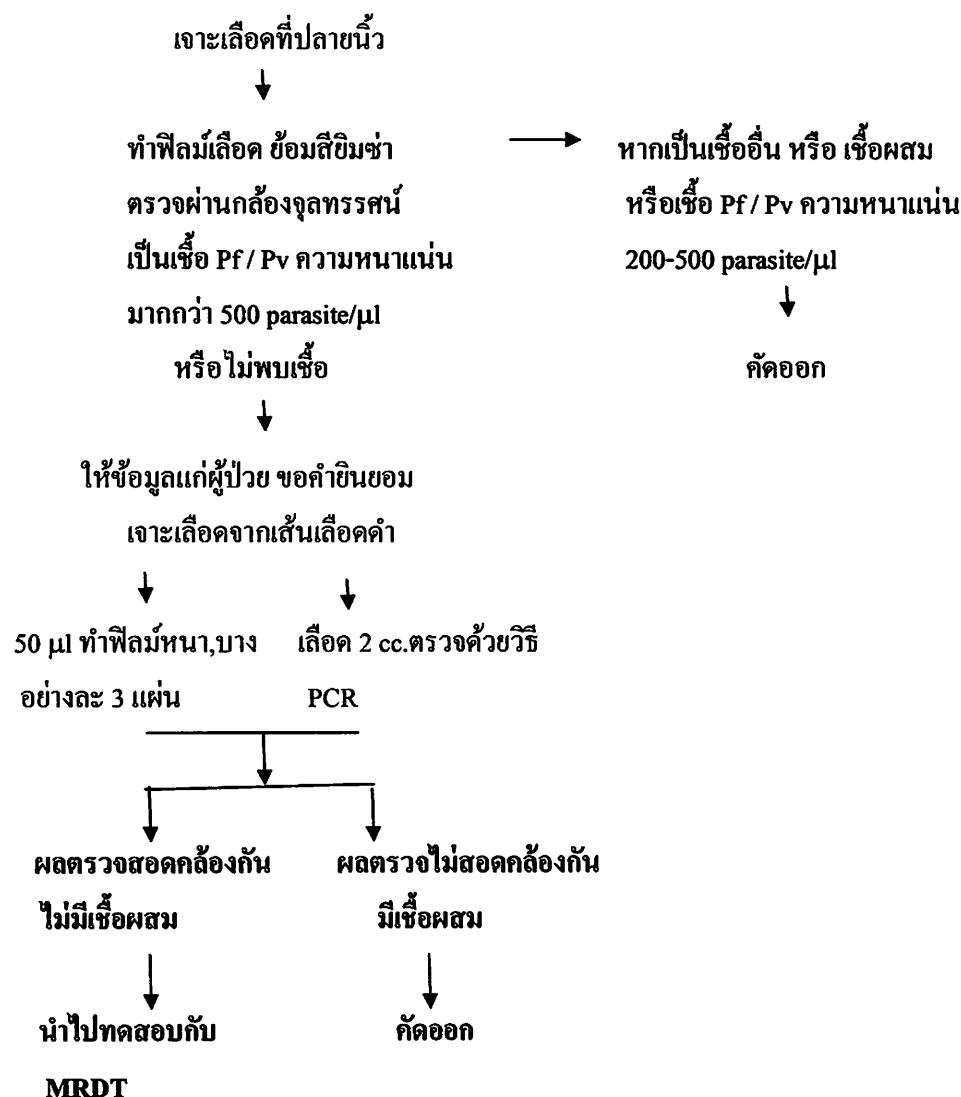
ดังนั้นการเก็บข้อมูลพื้นฐานการใช้งานของชุดตรวจ จะเป็นประโยชน์อย่างในการนำมาประกอบการเลือกใช้ การซื้อ การขนส่ง และการนำผลสอบทดสอบไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study) เพื่อศึกษาผลของปัจจัยด้านความร้อนและความชื้น ต่อการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยของ MRDT

ภาคที่ 2 การเตรียมตัวอย่างมาตรฐานสำหรับการทดสอบ MRDT



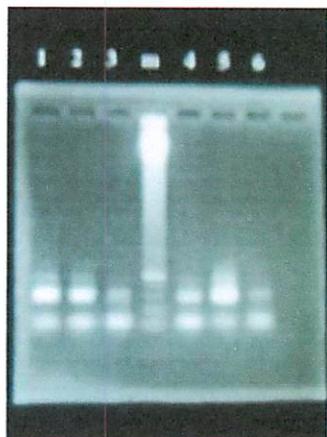
ตัวอย่างเชื้อมาตราฐาน ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่มาลาเรียคลินิกแม่ตะวอ อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก จำแนกตัวอย่างเลือดที่เก็บออกเป็น 3 ประเภท ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย พบ เชื้อชนิด *P. falciparum* และพบเชื้อชนิด *P. vivax*

การตรวจนับความหนาแน่นและการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย ใช้ตรวจจากฟิล์มเลือดหนา ที่ย้อมด้วยสี吟ช่าความเข้มข้นร้อยละ 10 นาan 10 นาที ตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเจ้าหน้าที่ที่ผ่านการอบรมและมีประสบการณ์ในการตรวจเลือดมาลาเรีย จำนวน 3 คน รายที่ตรวจไม่พบ เชื้อต้องตรวจไม่น้อยกว่า 200 กล้อง ในรายพบเชื้อให้จำแนกชนิดเชื้อ และตรวจนับจำนวนเชื้อเพื่อหาความ หนาแน่นของเชื้อตั้งสูตร :

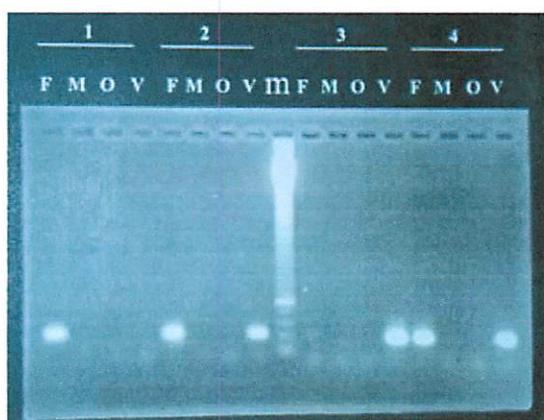
$$\frac{\text{จำนวนเชื้อมาลาเรีย} \times 8,000 \text{ เม็ดเลือดขาว / mcL}}{100 \text{ เม็ดเลือดขาว}} = \text{จำนวนเชื้อ / mcL}$$

การยืนยันผลการจำแนกชนิดเชื้อของตัวอย่างมาตราฐานอีกครั้ง 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' ACGATCAQTCACGTCQTAATCTT-3', P2: 5'-GAACCCAAAGACTTGTATTCTC AT-3' และที่เป็น species – specific primers สำหรับ *P.falciparum* (F2):-5'-CAATCTAAAAGTCACCTCGAA AGATG-3', *P.malariae* (M1): 5'-GGAAGCTATCTAAAAGAACACTCATAT-3', *P. ovale* (O2): 5'ACTG AA GGAAGCAATCTAAGAAATT-3', *P.vivax* (V1) 5'-CAATCTAAGAATAACTCCGAAGAG AAA-3' โดยใช้ Automatic thermal cycle (Perkin Elmer)

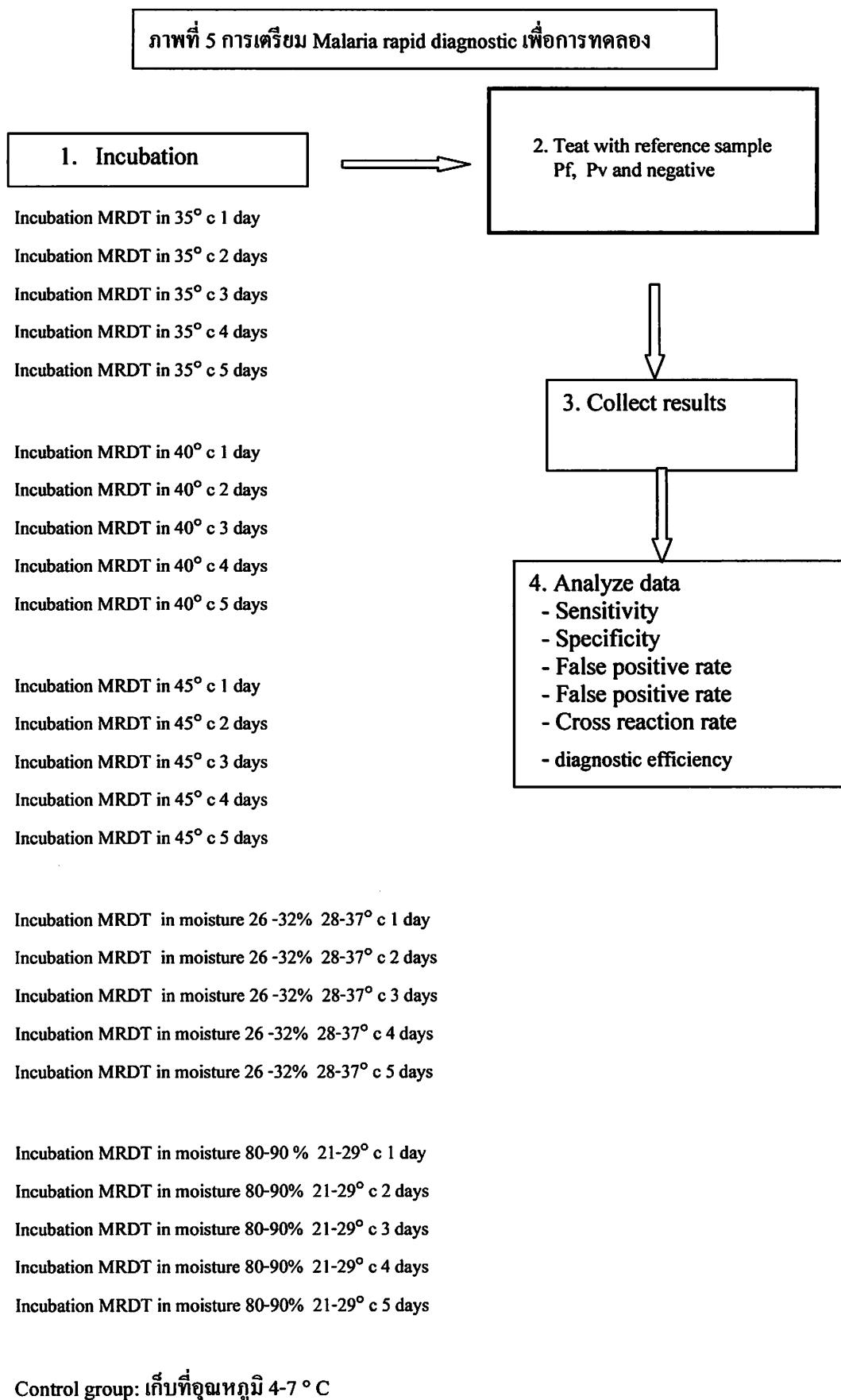
การคัดเลือกตัวอย่างมาตราฐาน สำหรับใช้ทดสอบชุดตรวจในการยืนยันชนิดเชื้อมาลาเรียที่ตรวจ พบ โดยใช้ผลจากฟิล์มหนาที่สอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธี Semi-nested PCR เพื่อความชัดเจนในการ แปลผลกรณีการเกิด cross-reaction ของชุดตรวจเลือด และคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีความหนาแน่นของ เชื้อประมาณ 500-1000/mcL ซึ่งเป็นระดับความหนาแน่นน้อย แต่ความถูกต้องในการตรวจของ MRDT ที่ ใช้ RHP-2 หรือ pLDH มีความไวมากกว่าร้อยละ 95 และ จากการศึกษาในประเทศไทยและเปรียบการตรวจหา Pf ด้วย MRDT พบว่าความไวเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อความหนาแน่นของเชื้อมาลากว่าหรือเท่ากับ 500 /mcL และความไวในการตรวจจะลดลงอย่างมีนัยสัมพันธ์กับการลดลงของความหนาแน่นของเชื้อในกระเพาะเลือด⁽⁶⁾ นำไปใช้ความหนาแน่นของเชื้อเพื่อทดสอบกับ MRDT ที่ถูกจัดเตรียมให้อยู่สภาวะแวดล้อมที่มีปัจจัยที่อาจ ส่งผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจ 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



โดยแบ่งสภาวะเก็บชุดตรวจก่อนการนำมายืดทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

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

กลุ่มที่ 2 ชุดทดสอบจะถูกนำมาจากของกันชื่นให้สัมผัสกับอากาศภายนอก โดยใช้หน่วยวัดเป็นร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ (Relative Humidity) คือ อัตราส่วนความชื้นของไอน้ำในอากาศในขณะนั้น(ที่อุณหภูมินั้น) ต่อ ไอน้ำสูงสุดที่อากาศสามารถดูดซึมน้ำได้ในการวัดความชื้นสัมพัทธ์ โดยใช้ Hygrometer วัดทุก 6 ชั่วโมงแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.1 แผ่นทดสอบถูกนำมาจากของเพื่อสัมผัสกับอากาศช่วงฤดูที่ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศประมาณร้อยละ 20-40 และอุณหภูมิประมาณ $25-40^{\circ}\text{C}$ เป็นพื้นที่เขตเมือง ทำการบันทึกข้อมูลทุก 6 ชั่วโมง และรายงานค่าสูงสุดและต่ำสุด และระบุในภาวะที่ 1 และแบ่ง MRDT ออกเป็น 5 กลุ่มย่อย โดยเก็บที่ความชื้นและอุณหภูมิเดียวกันแต่จำนวนวันที่คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 กลุ่มย่อยละ 30 ชุดทดสอบ

2.2 นำแผ่นทดสอบถูกนำมาจากของเพื่อสัมผัสกับอากาศช่วงต้นฤดูหนาวที่ความชื้นในอากาศประมาณร้อยละ 70-90 และอุณหภูมิประมาณ $21-29^{\circ}\text{C}$ เป็นพื้นที่แหล่งระบาดของโรคช่วงฤดูฝน ทำการบันทึกข้อมูลทุก 6 ชั่วโมง และรายงานค่าสูงสุดและต่ำสุด และระบุในภาวะที่ 2 และแบ่ง ออกเป็น 5 กลุ่มย่อย โดยเก็บที่ความชื้นและอุณหภูมิเดียวกันแต่จำนวนวันคือ 1, 2, 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มย่อยละ 30 ชุดทดสอบ

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม ชุดทดสอบทั้งของจะถูกเก็บอุณหภูมิตามคำแนะนำของ WHO คือ $4-7^{\circ}\text{C}$ เพื่อใช้เป็นกลุ่มมาตรฐานในการเปรียบเทียบ โดยจะนำมาทดสอบในจำนวนที่เท่ากันกับกลุ่มที่ 1 และ 2 มาศึกษาเปรียบเทียบ

วัสดุ

ชุดตรวจ MRT ในรูปแบบหลักการทำงานของ Immunochromatographic test ที่หน่วยงานราชการนิยมนำมาใช้ในงานสำรวจ โรคมาลาเรียและงานวิจัย 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

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

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

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

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

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นจากระดับ 35°C , 40°C และ 45°C ในจำนวนวันที่มากขึ้น มีผลต่อ
ความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT มีค่า diagnostic efficiency ต่ำ
กว่าระดับร้อยละ 95 ชุดตรวจที่อยู่ในสภาพภาวะระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 1 วันและค่า diagnostic
efficiency ลดลงจากร้อยละ 100 เหลือร้อยละ 77.78 เมื่อชุดตรวจอยู่ในสภาพอุณหภูมิ 45°C ต่อนีองเป็น[†]
เวลา 5 วัน รวมทั้งพบการเกิด false negative, false positive, cross reaction มีความถี่มากขึ้น และค่า
sensitivity, specificity ที่ลดลงดังตารางที่ 2

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

คัชชี (%)	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 มีผลต่อ ความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *P. vivax* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT โดยค่า diagnostic efficiency ต่ำกว่า ระดับร้อยละ 95 โดยชุดตรวจ OptiMAL-IT ที่อยู่ในสภาพภาวะระดับอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 วันค่า diagnostic efficiency อยู่ที่ระดับร้อยละ 94.44 และลดลงอยู่ที่ระดับร้อยละ 83.33 เมื่อชุดตรวจอยู่ในสภาพ

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

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

ค่านี้ (%)	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 มีผลต่อ
ความสามารถในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ Paracheck Pf โดยค่า diagnostic efficiency ต่ำ
กว่าระดับร้อยละ 95 เมื่อออยู่ในสภาวะระดับอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 4 วัน ค่า diagnostic efficiency ลดลง
จากร้อยละ 94.44 มาอยู่ที่ร้อยละ 83.33 เมื่อชุดตรวจอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 45°C ต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน
รวมทั้งพบว่าค่า specificity, sensitivity, false negative, false positive และ cross reaction มีการ
เปลี่ยนแปลงไม่นัก ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการเปลี่ยนอุณหภูมิต่อความไว ความและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ของ
ชุดตรวจ Paracheck -Pf

ค่านี้ (%)	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 เพื่อให้สัมผัสกับอาการที่มีความชื้นสัมพัทธ์ระดับร้อยละ 26-32 และ 80-90 ระยะเวลา 1-5 วัน ไม่มีผลผลกระทบมากต่อประสิทธิภาพการตรวจพบเชื้อของชุดตรวจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบความถี่ในการเกิด cross reaction มากขึ้นในการตรวจหาเชื้อ *P.falciparum* ในกลุ่มชุดตรวจ OptiMAL-IT ที่สัมผัสกับความชื้นสูง ดังตารางที่ 4 และ 5 ส่วนผลของการชี้บวกในนัยเชื้อชนิด *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 ต่อประสิทธิภาพในการตรวจนัยเชื้อชนิด *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

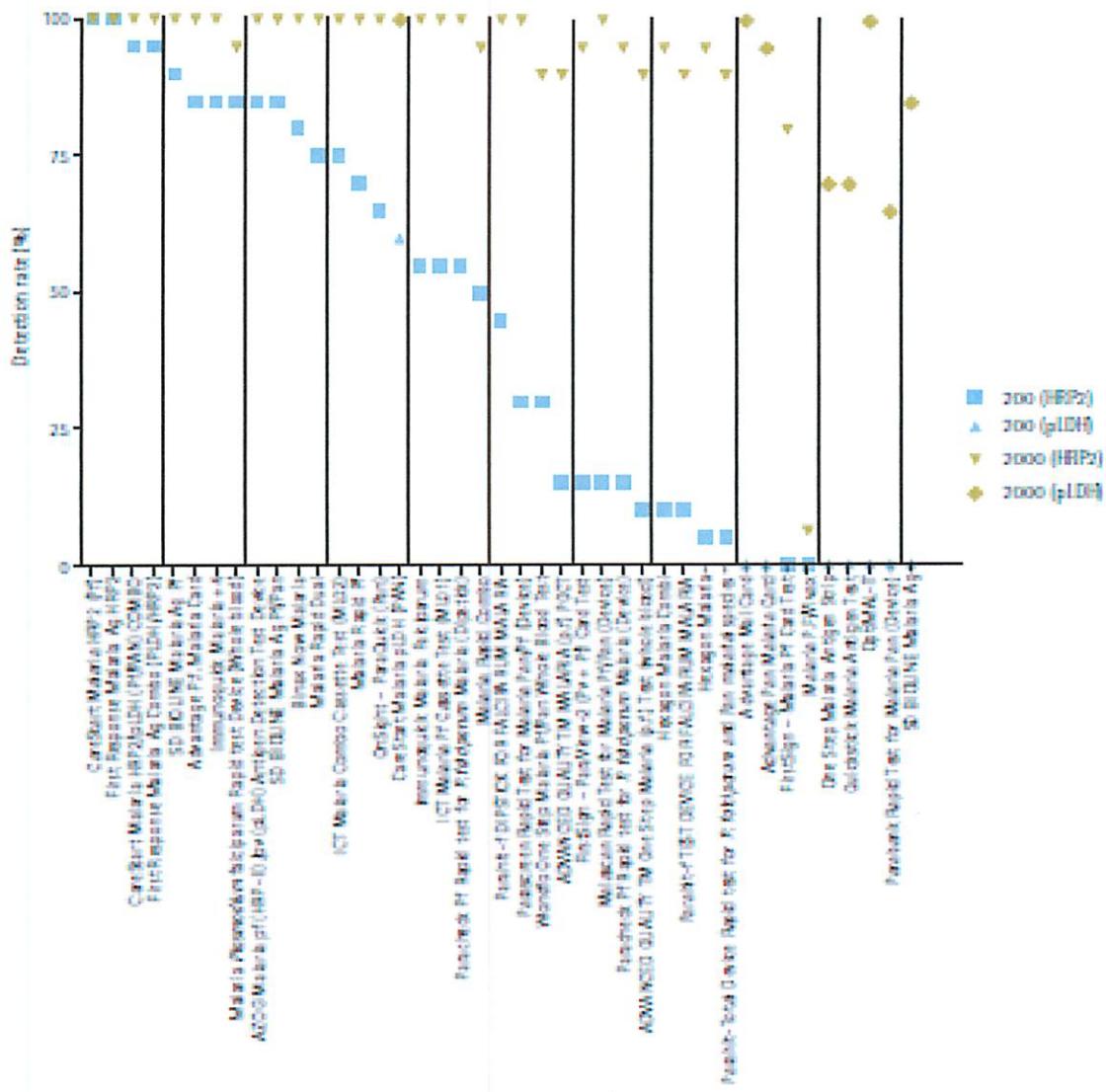
วิจารณ์

MDRT ทำงานโดยใช้หลักการของ Immunochromatographic test ให้ clinical sample ที่เป็นของเหลวเคลื่อนไปบนพื้นผิวของแผ่น nitrocellulose membrane คล้ายหลักการทำงานของ capillary action โดย target parasite antigen จะจับกับ antibody อย่างจำเพาะ และ antibody ที่มีความจำเพาะได้รับการขอมรับผ่านการทดสอบนำมาใช้ในชุดตรวจ 3 ชนิดคือ 1.) Histidine rich protein-2 (HRP-2) เป็น antigen ที่มีความจำเพาะกับ *P. falciparum* specific monoclonal antibody เป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำ พบรใน cytoplasm และที่ erythrocyte membrane ที่ติดเชื้อ และพบมากใน asexual stage โดยเฉพาะในช่วงที่เชื้อระยะแหวนจะพัฒนาเป็นระยะ trophozoite⁽⁸⁾ และ antigen นี้ยังสามารถพบได้ในเชื้อระยะ young gametocyte⁽³³⁾ 2.) Plasmodium lactase dehydrogenase (pLDH) เป็น enzyme ที่พบในช่วงท้ายของการพัฒนาของชีวิตของ malarial parasite glycolytic pathway (การปฏิกิริยาเคมีที่พบทั้งใน prokaryote และ eukaryote โดยใน eukaryote นั้นพบ enzyme นี้ใน cytoplasm ใช้ในการสังเคราะห์ไม่เลกฤทธิ์ ATP กับ NADH จากกลูโคส) ชีวิตสามารถพบ antigen นี้ได้ทั้งในระยะ sexual และ asexual malarial parasite ซึ่ง monoclonal antibody สามารถตรวจหา all human malaria species (panmalaria) และถูกพัฒนาให้จำเพาะกับเชื้อ *P. falciparum* หรือ *P. vivax*⁽³⁴⁾ และ 3.) Aldolase enzyme เป็น key enzyme ใน glycosis pathway ของ malaria parasite โดย antibody ที่จำเพาะต่อ enzyme นี้ สามารถตรวจหา all human malaria species (panmalaria)⁽³⁵⁾

ผลการศึกษาในช่วงปี พ.ศ. 2545- 2549 พบว่า MDRT ใช้การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. falciparum* ในผู้ป่วยที่มีอาการจะมีความไวในการตรวจพบเชื่อมากกว่าร้อยละ 90 แต่ MDRT ที่นำเอา aldolase assay เข้าไปร่วมด้วยพบว่าทำให้ความไวลดลง⁽³⁶⁻³⁷⁾ สำหรับ pLDH assay ผลการตรวจมีความแกร่งมากในแต่ละ lot อยู่ในช่วงร้อยละ 80-90 และใช้ได้มีความไวในการตรวจเท่ากับร้อยละ 100 ในกลุ่ม non-immune traveler โดย HRP-2 สามารถในการตรวจพบเชื้อในผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อได้ดีกว่า aldolase⁽³⁸⁾ HRP-2 ถูกนำมาประเมินผลการใช้ใน 19 ประเทศ ให้ผลที่แตกต่างกัน และมีรายงานประเมินผลการใช้ในพื้นที่ Asia-Pacific พนความไวจะลดลงเหลือร้อยละ 84 เมื่อใช้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อน้อยกว่า 250 /mcL⁽³⁹⁾

MRDT ได้ถูกพัฒนาเป็นธุรกิจที่เดินโดยย่างรวดเร็ว โดยในปี พ.ศ.2533 มีการผลิต MRDT ออกมานำหน่ายประมาณ 20 ชนิด แต่ปี พ.ศ.2552 พบว่ามีมากกว่า 200 ชนิด และ โดยใช้แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดมาพัฒนารูปแบบต่างกันให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้ใช้ มีการนำ MRDT หลายชนิด เช่น CareStare™, HiSens Malaria, One Step Maralia, Onsight™, Onsite Rapid test, First Response Malaria, FirstSign™, ParaHIT, CareStart™, Falcivax Rapid Test, Malercan, DD BIOLINE Malaria, Paramax-3

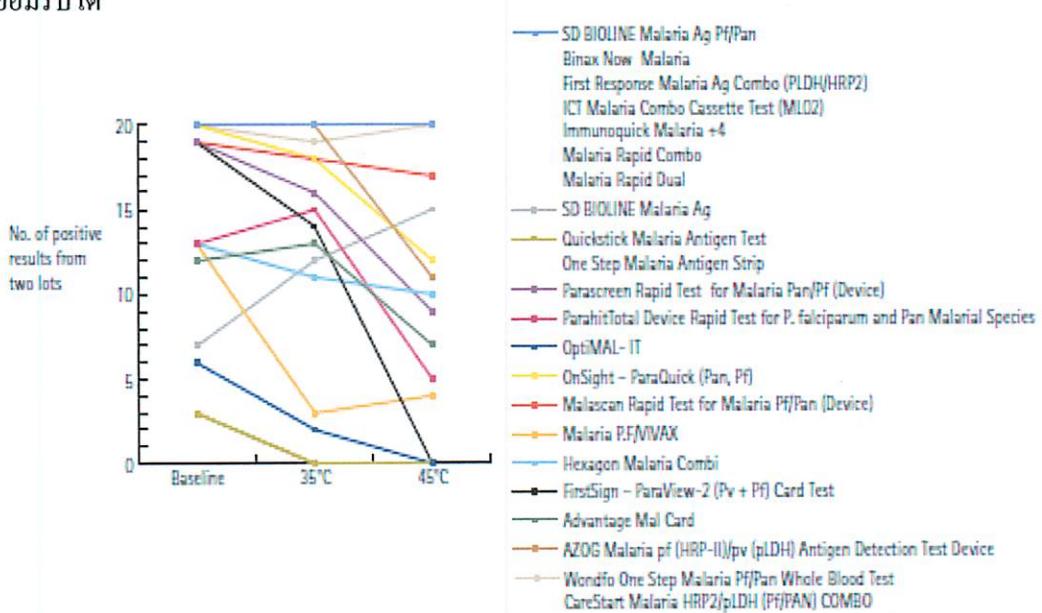
เป็นต้น MRDT ถูกผลิตออกแบบเพื่อตรวจหาแอนติเจนตัวเดียวกันแต่ใช้ผลการตรวจที่แตกต่างกัน อาจมีสาเหตุจากการออกแบบ Monoclonal antibody ของนวัตกรรมผลิต หรือการไม่เสถียรของชุดต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง ดังภาพที่ 4 ชุดตรวจจำนวน 42 ชนิด ให้การตรวจพบแอนติเจนที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในกลุ่มที่ความหนาแน่นของเชื้อต้องมากกว่า $200 \mu\text{l}$ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ความหนาแน่นเชื้อที่ระดับ $200 - 500 \mu\text{l}$ มาเป็นตัวอย่างมาตรฐาน เพราะเป็นระดับความหนาแน่นที่น้อยแต่ MRDT ที่เป็นที่ยอมรับสามารถตรวจพบแอนติเจนมากกว่าร้อยละ 95



4 - Phase 1 Evaluation Panel : 20 P. falciparum culture samples, RDTs = 2 tests x 2 lots of 200 parasites/ μl ; 1 test x 2 lots of 2000 parasites/ μl .

ภาพที่ 6 แสดงผลการทดสอบ MRDT ในการตรวจหา HRPII หรือ pLDH ที่ระดับความหนาแน่นต่ำกว่า 200 และ $2,000-5,000 \mu\text{l}$ ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (ภาพจาก Result of WHO product test of Malaria RDTs : Round 1(2008))

ปัจจัยด้านอุณหภูมิดังภาพที่ 5 เริ่มต้นตั้งแต่ baseline อัตราการตรวจพบแอนติเจนก็มีความต่างกัน พอสมควร และเมื่ออุ่นในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นเป็นเวลานานถึง 60 วัน ประสิทธิภาพในการตรวจจะลดลง 1-19 % เป็นผลการศึกษาของ WHO แต่จากการศึกษานี้การให้ MRDT อุ่นในที่อุณหภูมิ 40°C นานเพียง 1 วัน ก็ทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อลดลงร้อยละ 4.56 หากนานถึง 4 วัน วัน ก็ทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อลดลงร้อยละ 11.11 จุดที่น่าสังเกตคือที่ baseline ชุดตรวจทุกชนิดถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4-7^{\circ}\text{C}$ ในชื้นในอากาศประมาณร้อยละ 75 เมน้ำสมที่สุดในการรักษาคุณภาพของชุดตรวจตามที่ WHO แนะนำ แต่เมื่อนำมาทดสอบพบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อมีความแตกต่างกันมากตั้งแต่ร้อยละ 15 – 100 ผลการตรวจที่ต่างกันอาจเป็นผลจากบวนการผลิต การใช้คุณภาพของวัสดุ ความบริสุทธิ์ในการสังเคราะห์ Monoclonal antibody MDRT ที่ถูกเก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้นความถูกต้องในการตรวจพบเชื้อของ MRDT ที่นำมาทดสอบทุกชนิดลดลงในอัตราที่แตกต่างกัน แสดงถึงทั้งปัจจัยการเก็บที่อุณหภูมินากกว่า 35°C เวลานาน 60 วัน มีผลลดความถูกต้องในการตรวจวินิจฉัย ซึ่งมีผลจากการศึกษาในเรื่องการประเมินความถูกต้องในการตรวจหาเชื้อมากกว่า 100 งานวิจัย ไม่ใช่เรื่องง่ายในการนำรวมเปรียบเทียบกัน เพราะมีความต่างของแนวทางการศึกษาต่างกัน ลักษณะอาการของผู้ป่วย ปัจจัยทางระบบน้ำดิบวิทยาต่างกัน Reference standard ต่างกัน เครื่องมือ คุณต่างกัน ปัจจัยด้านการผลิต ระบบ QA รูปแบบการขนส่งนั้นถึงการใช้งานก็ต่างกันในแต่ละแหล่งผลิต optimal temperature rang ซึ่งจากการศึกษานี้ MRDT ในกลุ่มควบคุมปัจจัยแวดล้อมผลการทดสอบสมควรถูกต้องร้อยละ 100 แต่พบว่าค่าร้อยละเฉลี่ยของ sensitivity = 95.84, specificity = 97.51 และ diagnostic efficiency = 97.78 อาจเป็นผลกระทบจากปัจจัยดังกล่าว แต่ผลการตรวจยังคงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการตรวจพบ RHPR II ของชุดตรวจ 15 ชนิด ที่ถูกนำไปเก็บในที่อุณหภูมิ 35°C 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 ที่ถูกนำมาใช้มากในงานควบคุมโรคมาเริ่ยในพื้นที่ทุรกันดาร การคุณภาพไม่สะOCUMENTATION OF THE THAI MEDICAL JOURNAL 2019; 10(1) 33-39
คุณภาพของประเทศไทยในช่วงปี 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 แม้ว่าจะได้มีการเน้นข้อควรระวัง MDRT ในอยู่ภาวะที่เหมาะสม แต่บางครั้งก็ไม่สามารถทำได้ตามคำแนะนำได้ตลอดเวลา ชุดอาจต้องอยู่ในที่ร้อนและชื้นได้ โดยทั่วไปค่าประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเครื่องทางการแพทย์รวมมากกว่าร้อยละ 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 มีผลลัพธ์ประสิทธิภาพการตรวจพบเชื้อลบลงร้อยละ 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 ประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อลดลงໄกต่อกับกลุ่มแรก แต่เมื่อร่วมกับเชื้อ *P. falciparum* ค่าเฉลี่บร้อยละของประสิทธิภาพการตรวจพบเชื้อพบว่า antibody ที่จำเพาะต่อ pLDH จะมีสภาพคงทันหรือ

ประสิทธิภาพการตรวจในที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่า antibody ที่จำเพาะต่อ HRP-2 และมีรายงานถึงความร้อนยังมีผลต่อ nitrocellulose membrane และ signaling antibody ทำให้บิดงอเสียรูป และการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีผลในการลดประสิทธิภาพการตรวจ⁽¹⁵⁾ จากผลการศึกษา MDRT ที่สัมผัสถักน้อากาศที่มีความชื้นร้อยละ 26-32 หรือสัมผัสถักน้อากาศที่มีความชื้นร้อยละ 80-90 เป็นเวลา 1-5 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพในการตรวจซึ่งมากกว่าร้อยละ 95 ไม่แตกต่างกับชุดตรวจอุ่น control อุ่นไวร์ก์ตามนี้รายงานว่า MRDT สัมผัสถักน้อความชื้นที่สูงเป็นเวลานานจะลดความสามารถในการ conjugate ของ signal antibody-indicator complex ทำให้แบบแสดงผลบวกไม่ชัดเจน และในการศึกษาข้างบนว่าความถี่ในการเกิด cross reaction ซึ่งขึ้นในกลุ่มชุดทดสอบที่สัมผัสถักน้อากาศที่มีความชื้นสูง ดังนั้น MDRT ควรบรรจุในของป้องกันความชื้น

ในสถานการณ์ที่โรคมาลาเรียขึ้นกับที่คุกคามชีวิตมนุษย์ในหลายประเทศในเขตร้อน และบังพน เชื่อที่สามารถต้านยาரักษามาลาเรีย ดังนั้นการพัฒนายาารักษาขึ้นมีความจำเป็นที่ต้องดำเนินการควบคู่ม้ากับ การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัย แต่ก็ยังคงพบว่าในพื้นที่แหล่งระบาดจำนวนมากในหลายประเทศยังใช้การวินิจฉัยโรคมาลาเรียจากอาการ โดยทั่วไปความรุนแรงของอาการมักมีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของเชื้อ แต่อาการของโรคมาลาเรียอาจมีความคล้ายคลึงกับหลายโรคที่พบในเขตร้อนหรืออาจเป็นการติดเชื้อร่วม ที่เป็นเชื้อนามาลาเรียต่างชนิดกันหรือการติดเชื้อโรคในกลุ่มอื่นๆ ในเขตพื้นที่ sub-saharan ของอัฟริกา พบว่าผู้ป่วยมาลาเรียจะมีอาการที่หลากหลายและอาการบังไม่สัมพันธ์กับความหนาแน่นของเชื้อ ในกระแสเลือด รวมทั้งผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะ sequestration ของ *P.falciparum*⁽¹⁴⁾ เป็นต้น ดังนั้นผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้อง ช่วยลดอัตราการป่วยและตาย MDRT เป็นเทคโนโลยีทางเดี๋ยวก็คือที่ดีอันหนึ่งที่มีประโยชน์สามารถใช้ทดสอบวิธีมาตรฐานคือการตรวจจากพิล์มเลือดผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ก็พบข้อจำกัดคือ การดูรักษาเครื่องต้องใช้ผู้ที่มีทักษะชำนาญ ใช้เวลาพอสมควร ต้องพิจารณาเลือกใช้อย่างเหมาะสม

บทที่ 6

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

การศึกษานี้ได้ประเมินผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อประสิทธิภาพการวินิจฉัยเชื้ออุณหภูมิ 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 และกลุ่มความคุณจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-7°C จากนั้นนำ MRDT มาทดสอบกับตัวอย่างมาตรฐาน 3 กลุ่มคือ 1) พบเชื้อ *Plasmodium falciparum* 2) พบเชื้อ *P. vivax* และ 3) ไม่มีเชื้อมาลาเรีย โดยกลุ่มพบเชื้อจะเลือกที่มีความหนาแน่นเชื้อในช่วง 200 - 500 / μ l ซึ่งมีผลการศึกษานี้เป็นระดับความหนาแน่นของเชื้อน้อย แต่ความไวในการวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองมากกว่าร้อยละ 100 และใช้วิธี Semi-nested PCR ในส่วนของ Small-Subunit rRNA gene ในการยืนยันชนิดเชื้อของตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ และจากการผลศึกษาพบว่าร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศไม่มีผลต่อผลประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยของ MRDT ทั้งสองชั้นเงิน ส่วนอุณหภูมิที่สูงจะมีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดเชื้อ *P. falciparum* ของชุดตรวจ OptiMAL-IT มากกว่า Paracheck-Pf ที่อุณหภูมามากกว่า 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 MDRT ที่ใช้ในงานควบคุมโรคมาลาเรีย ต้องเลือกที่ได้รับการประกันคุณภาพที่แหล่งผลิตมีระบบควบคุมคุณภาพ ผ่านการทดสอบ TRD จาก WHO และผู้ใช้ต้องมีทักษะที่ถูกต้องในการใช้เครื่องมือ มีการควบคุมภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อคุณภาพของชุดตรวจ จากผลการศึกษานี้พบว่าความร้อนและความชื้นมีผลทำให้ค่า diagnostic efficiency ลดลง ดังนั้นต้องระบุให้ชัดเจนตั้งแต่ขั้นตอนสั่งซื้อเกี่ยวกับบรรจุภัณฑ์ และการบรรจุสารดูดซับความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสำรองควรอยู่ที่ 4-7°C โดยใช้ตั้งแต่การวางแผนการสั่งซื้อ การขนส่ง เพื่อลดดันทุนในการสูญเสีย และลดพื้นที่ในเก็บ และควรมีคำแนะนำที่ชัดเจน ระหว่างการขนส่งและเก็บสำรองในพื้นที่ที่ไม่ไฟฟ้า ให้เก็บชุดตรวจที่ควบคุมอุณหภูมิ ในสถานที่ที่แห้ง

สะอาด หากไม่มีให้เก็บในห้องภายในอาคารที่ร้อนเพื่อไม่ร้อนมากในเวลาอย่างวันอุณหภูมิไม่เกิน 35°C ระยะเวลาไม่เกิน 1 วัน และไม่ควรเก็บสำรองชุดตรวจจำนวนมากเกินไปความจำเป็น และควรเตรียมตัวอย่างมาตรฐานทำการทดสอบคุณภาพเป็นระยะ ตั้งแต่แรกรับสินค้าและสุ่มตรวจจุดบริการปลายทางที่ใช้ตรวจเพื่อเป็นการรับรองคุณภาพของชุดตรวจและเกิดประโยชน์สูงสุดในการควบคุมโรคมาตราเรียบ

เอกสารอ้างอิง

1. กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ. รายงานประจำปี 2554. กรุงเทพ: ชุมนุมสหกรณ์ การเกษตร แห่งประเทศไทย, 2554.
2. Ministerial conference on Malaria 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. Telomeres: do the ends justify the mean? *Cell*. 1984; 37: 7-8
12. Wellemes 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, Wellemes 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; 71: 431-437.
17. Tharavanij S, Warrell MJ, Tantivanich S, Tapchaisri P, Chongsa-Nguan M, et al. Factors contributing to the development of cerebral malaria. I. Humoral immune responses. *Am J Trop Med Hyg*. 1984; 33: 1-11.
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 *placiparum 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 diagnosis 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, Wellemes 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, Stahli 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* histidine-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.

ກາຄົນວກ

สถิติอุณหภูมิสูงที่สุดในช่วงฤดูร้อนของประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2494 - 2553

สถานี	กุมภาพันธ์			มีนาคม			เมษายน			พฤษภาคม			ค่า (ปี)	ตั้งแต่ พ.ศ.
	* ช. วันที่	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. สกน.เชียงราย (อ.เมือง)	36.5	25	2541	38.8	25	2535	40.8	23	2533	40.3	2	2523	32	2522
3. เมืองเชียงใหม่	36.5	21.22	2552											
4. เมืองเชียงใหม่ (อ.เมืองเชียงใหม่)	38.0	27	2541	41.0	31	2547	43.4	23	2553	44.0	15	2553	56	2498
5. เชียงใหม่	39.6	27	2542	42.1	17	2541	44.1	25	2501	42.7	8	2510	59	2495
6. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	37.1	18	2548	39.7	26	2535	42.0	19	2526	40.7	10	2535	30	2524
7. ศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคเหนือ (จ.เชียงใหม่)	37.7	26	2541	40.9	31	2548	41.5	29	2503	42.4	1	2548	59	2495
8. ลำปาง	37.6	26	2542	39.4	31	2548	41.2	17	2526	41.6	10	2541	42	2512
9. น่าน	38.8	23.25	2552	41.8	31	2547	44.1	12	2502	42.1	2	2503	60	2494
10. สกน.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			
11. สกน.พะเยา (จ.น่าน)	37.6	24	2552	40.2	17	2541	42.5	22	2553	41.4	9	2535	41	2513
12. สกน.พะเยา (จ.พะเยา)	36.4	23	2552	38.7	29	2547	40.3	22	2553	39.9	8	2546	13	2541
13. สกน.พะเยา (จ.พะเยา)	38.5	19	2548	41.7	26	2535	42.6	29	2526	42.3	6	2535	30	2524
		26	2550											
		22	2552											
14. สกน.ล้านนา (อ.ห้างฉัตร)	40.0	28	2541	42.5	16	2541	43.5	18	2526	43.2	1	2523	60	2494
				30	2547									
15. เชียงใหม่	38.7	26	2541	41.9	26	2535	42.7	21	2535	42.4	6	2535	29	2525
16. เชียงใหม่	38.5	27	2513	41.7	17	2541	43.6	14	2526	43.0	10	2553	59	2495
17. เชียงใหม่	39.3	27	2497	42.7	24	2503	44.5	27	2503	43.3	15	2506	60	2494
		27	2541											
18. สกน.เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	37.4	18	2548	40.7	31	2548	42.6	21	2553	42.8	10	2553	11	2543
19. สกน.เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	39.0	26	2541	41.0	30	2522	43.2	23	2512	42.2	22,23	2526	42	2512
										9	2535			
20. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	41.2	19	2548	42.7	17	2541	44.0	25	2550	43.0	5	2512	57	2497
21. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	40.8	19	2548	42.3	30	2547	43.7	26	2541	43.0	2	2541	51	2503
22. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	38.5	19	2548	40.3	14	2547	41.1	8	2553	41.6	9,11	2541	60	2494
23. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	37.0	19	2548	39.7	29	2524	41.0	14	2526	39.5	4	2541	33	2521
24. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	33.8	19	2548	35.3	17	2541	36.2	1	2548	35.7	9	2541	18	2536
25. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	37.1	18	2537	38.4	31	2548	40.7	10	2553	40.1	9,14	2553	18	2536
		25	2541											
26. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	38.4	25	2541	40.5	24	2503	42.8	27	2503	42.0	2	2523	60	2494
27. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	39.4	27	2541	42.2	25	2553	43.0	25	2501	42.4	17	2500	60	2494
28. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	38.8	27	2513	40.7	17	2541	41.5	29	2518	40.6	7	2546	41	2513
										1	2547			
29. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	39.6	28	2513	41.0	30	2547	42.1	24	2550	41.5	10	2535	41	2513
30. เชียงใหม่ (จ.เชียงใหม่)	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. สกน.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					

สถิติอุบัติภัยมีสูงที่สุดในช่วงฤดูร้อนของประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2494 - 2553

สถานี	กุณภาพพื้นท์			มีนาคม			เมษายน			พฤษภาคม			ค่าปี (ร.)	ตั้งแต่ พ.ศ.
	* ช. วันที่	ว. พ.ศ.	* ช. วันที่	ว. พ.ศ.	* ช. วันที่	ว. พ.ศ.	* ช. วันที่	ว. พ.ศ.	* ช. วันที่	ว. พ.ศ.	* ช. วันที่	ว. พ.ศ.		
6.สกย.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.สกย.สกลนคร (อ.เมือง)	38.8	24	2524	40.9	21	2539	42.3	14	2526	41.0	9	2535	42	2512
9.บุรีราษฎร์	40.0	25	2552	42.1	16	2541	42.5	14	2541	41.7	1.3	2541	58	2496
10.ขอนแก่น	41.0	10	2504	41.8	26	2501	42.8	6,25 29	2501	41.9	9	2535	60	2494
11.สกย.ท่าพะระ (อ.เมือง จ.ขอนแก่น)	40.0	27	2542	41.2	29	2536	42.1	14 11	2526	40.6	1	2523	41	2513
12.สอท.กนกไวย (จ.กาฬสินธ์)	38.3	20	2541	40.8	17	2541	41.5	14	2541	42.3	9	2553	13	2541
13.สอท.ไถสุมพิสัย (จ.มหาสารคาม)	39.7	27	2548	41.5	21	2539	42.4	14	2526	42.0	7	2546	41	2513
14.รัชบุรี	38.7	27	2513	40.5	26	2501	41.5	24,25	2501	41.1	7	2553	56	2498
15.สกย.รัชบุรี (อ.เมือง)	38.6	26	2552	41.0	17	2541	40.7	14 23,24	2526	40.4	8	2553	28	2526
16.ชัยภูมิ	39.5	27	2542	41.5	17	2541	42.6	14	2526	41.0	7	2546	54	2500
17.ศูนย์อุดหนุนวิทยาการคหบดีวันออกเสียงเนื่อง (จ.อุบลราชธานี)	39.2	26	2548	40.6	28	2536	42.0	14	2541	41.2	3	2548	60	2494
18.สกย.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 14	2503	41.6	3	2523	60	2494
20.สกย.สุรินทร์ (อ.เมือง)	39.5	18	2548	41.1	18 31	2529	41.8	14 21	2526	41.0	6	2553	42	2512
21.สอท.ท่าตุ้ม (อ.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.ไชยบัช (จ.นครราชสีมา)	39	18	2548	40.5	31 16,22	2529	41.1	14	2541	40.2	1.4	2541	41	2513
24.สกย.ปากช่อง (อ.นครราชสีมา)	38.1	26	2522	39.0	16	2526	39.5	14	2526	38.5	7	2540	42	2512
25.สกย.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 (อ.บุรีรัมย์)	41.0	22	2522	41.4	20	2529	41.8	12	2528	40.7	2	2541	41	2513
ภาคตะวันออก														
1.นครสวรรค์	39.8	29	2495	41.4	20	2529	42.5	25	2512	42.7	16	2506	60	2494
		27	2513											
2.สกย.คาดฟ้า (จ.นครสวรรค์)	38.4	19	2537	40.0	29,30 29	2530	41.5	23	2533	41.2	10	2553	42	2512
3.สกย.ชัยนาท (อ.เมือง จ.ชัยนาท)	38.7	27	2513	39.7	11 21	2523	41.3	14	2535	41.4	10	2553	41	2513
4.สพบ.	38.6	26	2541	40.6	26	2501	41.8	25	2503	41.5	15	2506	60	2494
5.สอท.บัวจุน (อ.ขึ้นบ้า จ.สพบ.)	40.7	26	2541	42.4	17	2541	42.7	14	2526	41.8	10	2553	41	2513
6.สุพรรณบุรี	39.8	14	2505	41.0	26	2501	42.2	24	2503	42.6	16	2506	56	2498
7.สกย.อุทธรฯ (อ.สุพรรณบุรี)	39.6	26	2541	41.8	26	2526	42.1	16	2526	42.4	8	2523	42	2512
8.กาญจนบุรี	40.8	25	2541	42.1	18	2541	43.5	29 14	2501	42.8	6	2535	59	2495
9.ทองผาภูมิ (จ.กาญจนบุรี)	39.2	23 17 24,25	2518	41.3	25	2553	43.0	8	2553	41.5	1	2526	41	2513

สถิติอุบัติภัยนิรุสท์ที่สำคัญในช่วงฤดูร้อนของประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2494 - 2553

สถานี	กุมภาพันธ์			มีนาคม			เมษายน			พฤษภาคม			ค่า (ปี)	ตั้งแต่ พ.ศ.
	° ช.	วันที่	พ.ศ.	° ช.	วันที่	พ.ศ.	° ช.	วันที่	พ.ศ.	° ช.	วันที่	พ.ศ.		
10.สกย.กำแพงแสน (อ.นครปฐม)	38.4	26	2523	40.4	29	2529	40.8	23	2516	41.0	3.8	2523	38	2516
		14	2534					13	2526					
		26	2541											
11.สกย.ราชบุรี (อ.เมือง)	38.9	19	2537	39.5	16	2550	40.9	24	2541	39.5	1	2536	18	2536
											12	2541		
											5	2548		
12.สกย.อุบลฯ (อ.ท่าเรือ อ.หะนนครศรีอยุธยา)	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	2526	40.0	23	2495	40.8	22	2526	60	2494
15.สกย.บางเขน (เขตอุดมสุข กรุงเทพฯ)	38.3	27	2541	38.4	24	2541	39.4	17	2533	38.8	4	2540	30	2512-2541
16.สกย.บางนา (เขตบางนา กรุงเทพฯ)	37.0	14	2534	37.6	29	2541	40.0	23	2533	39.2	1	2534	42	2512
17.ส่าน.อุดมท่าเรือกรุงเทพ (เขตคลองเตย)	36.9	19	2541	38.2	29	2544	39.2	24	2552	39.3	10	2553	17	2537
18.สกย.น้ำร่อง (อ.เมือง อ.สมุทรปราการ)	37.5	11	2525	35.5	31	2524	36.1	4	2524	35.5	4	2524	30	2524
19.สกย.ปทุมธานี (อ.คลองหลวง)	37.5	19	2548	38.8	16	2550	40.5	15	2547	39.8	9	2553	13	2541
ภาคตะวันออก														
1.สกย.ละเจิงเทรา (อ.สันนาชัยเขต)	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.สอท.กบินทร์บุรี (อ.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 (อ.สระแก้ว)	39.7	26	2522	40.3	30	2550	41.7	14	2526	41.4	20	2526	59	2495
6.ฉะบุรี	37.6	17	2523	38.4	17	2534	39.9	23	2538	39.0	10	2553	60	2494
7.กาฬสินธุ์ (อ.ชลบุรี)	35.2	23	2549	36.0	18,19,28	2553	36.9	25	2503	36.2	5	2503	52	2502
8.พัทยา (อ.บางละมุง อ.ชลบุรี)	37.1	21	2542	37.3	17	2534	37.0	19	2533	36.0	8	2535	30	2524
9.สตูล (อ.สตูล จ.ชลบุรี)	39.2	13	2495	39.5	9,17	2495	40.5	10	2495	40.5	2	2495	60	2494
10.แม่เมาะ (อ.ศรีราชา อ.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.สกย.หัวหิน (อ.เมือง อ.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.สกย.พัตตานี (อ.ยะลา อ.จันทบุรี)	36.2	7	2513	36.2	3	2527	36.8	11	2522	36.1	4	2541	42	2512
		17	2523											
15.คลองไทร (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.ทวาย (อ.ประจวบคีรีขันธ์)	35.6	24	2501	36.2	26	2503	38.3	19	2552	37.7	28	2540	60	2494
4.สกย.หนองหลัง (อ.ทวาย อ.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	2501	60	2494
											22	2526		
											1	2541		
											5	2548		
6.สกย.ภู (อ.ชุมพร)	36.2	20	2537	38.4	28	2526	38.6	13	2526	38.5	21	2526	42	2512
								7	2539		5	2548		
								13	2541					
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.กาฬสุข (อ.สุราษฎร์ธานี)	34.1	25	2522	35.6	30	2511	36.5	19	2533	36.3	21	2526	42	2512
10.สกย.สุราษฎร์ธานี (อ.กาญจนบุรี)	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			ครบ (ปี)	ตั้งแต่ พ.ศ.
	° ช.	วันที่	พ.ศ.	° ช.	วันที่	พ.ศ.	° ช.	วันที่	พ.ศ.	° ช.	วันที่	พ.ศ.		
11.สอท.พระแสง (อ.สราษฎร์ธานี)	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.สกย.นครศรีธรรมราช (อ.เมือง)	35.6	25	2541	36.6	21,22	2541	38.2	28	2548	36.8	3	2541	27	2527
14.ท่าเรือการไฟฟ้าบ้านตอน (อ.นครศรีธรรมราช)	33.0	20	2537	35.5	20	2542	36.0	10	2539	35.8	12	2541	9	2537-2545
15.สอท.จวาง (อ.นครศรีธรรมราช)	39.5	18	2548	39.1	11	2541	41.0	15	2541	39.2	2	2548	13	2541
16.สกย.พังงา (อ.เมือง)	34.5	21,22	2552	35.8	8	2542	37.3	23	2533	37.3	27	2553	30	2524
17.ศูนย์อุตุฯภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ.สงขลา)	34.3	14,15	2552	36.5	30	2511	38.2	15	2519	38.6	27	2553	60	2494
18.ท่าอากาศยานหาดใหญ่ (อ.สงขลา)	37.4	21	2541	38.3	24	2525	39.2	15	2541	38.3	7	2553	38	2516
19. สอท.สะเดา (อ.สงขลา)	37.2	25	2544	38.5	3	2553	37.2	22	2553	38.0	10	2553	12	2542
			2548											
20.สกย.คอหงส์ (อ.หาดใหญ่ อ.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.สกย.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.มราฐวิวัฒน์	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.ตะกว้าป่า (อ.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.ศูนย์อุตุฯภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อ.ถลาง อ.ภูเก็ต)	38.5	22	2548	37.5	31	2530	37.6	5	2541	37.7	15	2553	59	2495
5.กระปี	38.0	14,27	2541	39.1	26	2541	38.9	3	2541	38.8	5	2541	9	2537-2545
6.เกาะลันตา (อ.กระปี)	37.2	29	2531	38.0	26	2539	38.5	1	2541	38.0	5	2541	30	2524
7.ท่าอากาศยานครัง	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, สถานีอุตุนิยมวิทยาทุกแห่ง (สอท.) และสถานีอากาศเกษตร (สกย.)

ศูนย์ภูมิอากาศ สำนักพัฒนาอุตุนิยมวิทยา

