

วารสาร

โรคติดต่อมาโดยแมลง

Journal of Vector Borne Disease

ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2549

CONTENTS

- 8 สารไล่ยุงจากพืชสมุนไพร
พ่วงศรี ทิววงศ์โกศล
- 11 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์
Plasmodium lactate dehydrogenase เพื่อใช้วินิจฉัยโรคมาลาเรีย
พวงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ และคณะ
- 19 การเฝ้าระวังโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ของ
ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในจังหวัดหนองบัวลำภู ปีพ.ศ. 2548
ศศิธร ตั้งสวัสดิ์ และคณะ
- 29 การศึกษาความชุกชุมและชนิดของยุงสายในพื้นที่เสี่ยง
ต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออกในเขตกรุงเทพมหานคร
พรพิมล กิจนรินทร์ และคณะ
- 35 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี
Real-Time Polymerase Chain Reaction
คณินิจ คอพ่วง และคณะ
- 44 ความพึงพอใจของบุคลากรกรมควบคุมโรค
ต่อการให้บริการ Call Center
ของศูนย์ปฏิบัติการ กรมควบคุมโรค
ณรงค์ จันทน:กุล
- 52 การประยุกต์ใช้ชุดย้อมสีย้อมฆ่าสำเร็จรูป
กิตติกร รอดนาค และคณะ



สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง

กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

ISSN 1686-3747



วารสารโรคติดต่อนำโดยแมลง
Journal of Vector Borne Disease
ISSN 1686-3747

ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2549

Volume 3 No. 2 July - December 2006

สารบัญ

หน้า

CONTENTS

รายงานปริทัศน์

Review Article

สารไล่ยุงจากพืชสมุนไพร
ผ่องศรี ทิพวงโกศล

8

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Articles

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอ็นซัยม์
Plasmodium lactate dehydrogenase
เพื่อใช้วินิจฉัยโรคมาลาเรีย
พงษ์วิทย์ บัวล้อมไพบ และคณะ

11 Production of a monoclonal antibody against
Plasmodium lactate dehydrogenase
for the diagnosis of malaria
Pongwit Bualombai *et al.*

การเฝ้าระวังโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ของ
ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในจังหวัดหนองบัวลำภู
ปี พ.ศ. 2548
ศศิธร ตั้งสวัสดิ์ และคณะ

19 Serosurveillance of emerging infectious
diseases in Nongbualumpoo Province, 2005
Sasithorn Tangsawat *et al.*

การศึกษาความชุกชุมและชนิดของยุงลายในพื้นที่เสี่ยง
ต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออกในเขตกรุงเทพมหานคร
พรพิมล กิจนิตินันท์ และคณะ

28 Prevalence of *Aedes* mosquito in high risk
areas in Bangkok Metropolis in 2005
Pornpimol Kijnitinan *et al.*

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี
Real-Time Polymerase Chain Reaction
คณินิจ คงพ่วง และคณะ

35 Malaria parasites detection by
real-time polymerase chain reaction
Kanungnit Congpuong *et al.*

ความพึงพอใจของบุคลากรกรมควบคุมโรค
ต่อการให้บริการ Call Center
ของศูนย์ปฏิบัติการ กรมควบคุมโรค
ณรงค์ จันทนะกุล

44 Satisfaction of the disease control personnel
towards the DDC hot line call center
Narong Juntanakul

การประยุกต์ใช้ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูป
ติดตาม รอดนาค และคณะ

52 Application of a new blood film staining kit
in field operation
Ditthakorn Rodnak *et al.*

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารโรคติดต่อ นำโดยแมลงบินตีรับบทความวิชาการหรือรายงานผลการวิจัย ตลอดจนผลงานการควบคุมโรค ที่เกี่ยวกับโรคติดต่อ นำโดยแมลง โดยเรื่องที่จะส่งมาจะต้องไม่เคยตีพิมพ์ หรือก้าวส่งรอกพิมพ์ในวารสารอื่น ทั้งนี้ กองบรรณาธิการจะตรวจทานแก้ไขเรื่องต้นฉบับและพิจารณาตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลัง

หลักเกณฑ์และคำแนะนำสำหรับเรื่องลงพิมพ์

1. บทความที่ส่งลงพิมพ์

1.1 นิพนธ์ต้นฉบับ (original article) เป็นรายงาน การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ไม่เคย ตีพิมพ์ที่ใดมาก่อน

1.2 รายงานปริทัศน์ (review article) เป็นบทความ เพื่อฟื้นฟูวิชาการซึ่งรวบรวมผลงานเกี่ยวกับเรื่องใด เรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ที่เคยลงตีพิมพ์ในวารสารอื่นมาแล้ว โดยนำเรื่องมาวิเคราะห์ วิจารณ์ และเปรียบเทียบเพื่อให้ เกิดความกระจ่างแก่ผู้อ่านเกี่ยวกับเรื่องนั้น

1.3 รายงานผู้ป่วย (case report) เป็นรายงาน เกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยรายที่น่าสนใจทั้งด้าน ประวัติ ผลการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้อง ปฏิบัติการคลินิกร่วมกัน

1.4 ย่อวารสาร (abstract review) เป็นการย่อ บทความทางวิชาการด้านโรคติดต่อ นำโดยแมลง และ วิทยาการที่เกี่ยวข้องที่น่าสนใจ ซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้ว ในวารสารนานาชาติเป็นภาษาไทย

2. การเตรียมบทความเพื่อลงพิมพ์

2.1 ชื่อเรื่อง ควรสั้น กระชับรัด ให้ได้ใจความที่ ครบคลุมและตรงกับวัตถุประสงค์และเนื้อเรื่อง ชื่อเรื่อง ต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

2.2 ชื่อผู้เขียน ให้มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ (ไม่ใช่คำย่อ) พร้อมทั้งอภิไชยต่อท้ายชื่อและสถาบันที่ ทำงานทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

2.3 เนื้อเรื่อง ควรใช้ภาษาไทยให้มากที่สุด และภาษา ที่เข้าใจง่าย สั้น กระชับรัด และชัดเจนเพื่อประหยัดเวลา ของผู้อ่าน หากใช้คำย่อต้องเขียนคำเต็มไว้ครั้งแรกก่อน

2.4 บทคัดย่อ คือการย่อเนื้อหาสำคัญเฉพาะที่ จำเป็นเท่านั้น ระบุตัวเลขทางสถิติที่สำคัญ ใช้ภาษารัดกุม เป็นประโยคสมบูรณ์และเป็นร้อยแก้ว ความยาวไม่เกิน 15 บรรทัด และมีส่วนประกอบ คือ วัตถุประสงค์ วัสดุและ วิธีการศึกษา ผลการศึกษา และวิจารณ์หรือข้อเสนอแนะ (อย่างย่อ) ไม่ต้องมีเชิงอรรถอ้างอิง บทคัดย่อต้องเขียน ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

2.5 บทนำ อธิบายความเป็นมาและความสำคัญของ ปัญหาที่ทำการวิจัย ศึกษา ค้นคว้าของผู้อื่นที่เกี่ยวข้อง และวัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.6 วัสดุและวิธีการศึกษา แหล่งที่มาของข้อมูล วิธีการรวบรวมข้อมูล วิธีการเลือกสุ่มตัวอย่าง และการใช้ เครื่องมือช่วยในการวิจัย ตลอดจนวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล หรือใช้หลักสถิติมาประยุกต์

2.7 ผลการศึกษา อธิบายสิ่งที่ได้พบจากการวิจัย โดยเสนอหลักฐานและข้อมูลอย่างเป็นระเบียบพร้อมทั้ง แปลความหมายของผลที่ค้นพบหรือวิเคราะห์

2.8 วิจารณ์ ควรเขียนอภิปรายผลการวิจัยว่า เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้หรือไม่เพียงใด และควร อ้างอิงถึงทฤษฎีหรือผลการดำเนินงานของผู้ที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วย

2.9 เอกสารอ้างอิง

1) ผู้เขียนต้องรับผิดชอบในความถูกต้องของเอกสารอ้างอิง การอ้างอิงเอกสารใช้ระบบ Vancouver 1997

2) การอ้างอิงเอกสารใด ๆ ให้ใช้เครื่องหมายเชิงบรรทัดเป็นหมายเลข โดยใช้หมายเลข 1 สำหรับเอกสารอ้างอิงอันดับแรก และเรียงต่อตามลำดับ แต่ถ้าต้องการอ้างอิงซ้ำให้ใช้หมายเลขเดิม

3) เอกสารอ้างอิงหากเป็นวารสารภาษาอังกฤษให้ใช้ชื่อย่อวารสารตามหนังสือ Index Medicus การใช้เอกสารอ้างอิงไม่ถูกแบบจะทำให้เรื่องที่เกิดความล่าช้าในการพิมพ์ เพราะต้องมีการติดต่อผู้เขียนเพื่อขอข้อมูลเพิ่มเติมให้ครบตามหลักเกณฑ์

3. รูปแบบการเขียนวารสาร

(โปรดสังเกตเครื่องหมายวรรคตอนในทุกตัวอย่าง)

3.1 การอ้างอิงเอกสาร

ก. ภาษาอังกฤษ

ลำดับที่. ชื่อผู้แต่ง (สกุล อักษรย่อของชื่อ). ชื่อเรื่อง ชื่อย่อวารสาร ปี ค.ศ.; ปีที่พิมพ์ (Volume): หน้าแรก - หน้าสุดท้าย.

ในกรณีที่ผู้แต่งเกิน 6 คน ให้ใส่ชื่อผู้แต่ง 6 คนแรกแล้วตามด้วย *et al.*

ตัวอย่าง

1. Fischl MA, Dickinson GM, Scott GB. Evaluation of heterosexual partners, children and household contacts of adults with AIDS. *JAMA* 1987; 257: 640-4.

ข. ภาษาไทย

ใช้เช่นเดียวกับภาษาอังกฤษ แต่ชื่อผู้แต่งให้เขียนเต็มตามด้วยนามสกุล และใช้ชื่อวารสารเป็นตัวเต็ม

ตัวอย่าง

2. ชีระ รามสูต, นิวัติ มนต์วิรสวัสดิ์, สุรศักดิ์ สัมปตตะวานิช. อุบัติการณ์โรคเรื้อรังระยะแรก โดยการศึกษาจุลพยาธิวิทยาคลินิกจากวงต่างขาของผิวหนังผู้ป่วยที่สงสัยเป็นโรคเรื้อรัง 589 ราย. *วารสารโรคติดต่อ* 2527; 10: 101-2.

3.2 การอ้างอิงหนังสือหรือตำรา

ก. การอ้างอิงหนังสือหรือตำรา

ลำดับที่. ชื่อผู้แต่ง (สกุล อักษรย่อของชื่อ). ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีที่พิมพ์.

ตัวอย่าง

1. Toman K. Tuberculosis case-finding and chemotherapy. Geneva: World Health Organization; 1979.

ข. การอ้างอิงบทหนึ่งในหนังสือหรือตำรา

ลำดับที่. ชื่อผู้เขียน. ชื่อเรื่อง. ใน: (ชื่อบรรณาธิการ). บรรณาธิการ. ชื่อหนังสือ. ครั้งที่พิมพ์. เมืองที่พิมพ์: สำนักพิมพ์; ปีที่พิมพ์. หน้าแรก - หน้าสุดท้าย.

ตัวอย่าง

1. ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ. การดื้อยาของ เชื้อมาลาเรีย. ใน: ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ, ดนัย บุณนาค, ตระหนักจิต ทะริณสูตร, บรรณาธิการ. ตำรา อายุรศาสตร์เขตร้อน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: รวมทรรศน์; 2533. น. 115-20.

4. การส่งต้นฉบับ

4.1 การส่งเรื่องตีพิมพ์ให้ส่งต้นฉบับ 1 ชุด และแผ่น diskette ถึงสำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000 หรือที่ e-mail address: nungnit@health.moph.go.th

4.2 ใช้กระดาษพิมพ์ดีดขนาด A4 พิมพ์หน้าเดียว และส่งเอกสารมาพร้อมกับแผ่น diskette ซึ่งพิมพ์ต้นฉบับเอกสารพร้อมระบุชื่อ File

4.3 ภาพประกอบ ถ้าเป็นภาพลายเส้นต้องเขียนด้วยหมึกดำบนกระดาษหนาแน่น ถ้าเป็นภาพถ่ายควรเป็นภาพสไลด์หรืออาจใช้ภาพขาวดำขนาดโปสการ์ดแทนก็ได้ การเขียนคำอธิบายให้เขียนแยกต่างหาก อย่าเขียนลงในรูป

5. การรับเรื่องต้นฉบับ

5.1 เรื่องที่รับไว้กองบรรณาธิการจะแจ้งตอบรับให้ผู้เขียนทราบ

5.2 เรื่องที่ไม่ได้รับพิจารณาลงพิมพ์ กองบรรณาธิการจะแจ้งให้ทราบ แต่จะไม่ส่งต้นฉบับคืน

5.3 เรื่องที่ได้รับพิจารณาลงพิมพ์ กองบรรณาธิการจะส่งวารสารให้ผู้เขียนเรื่องละ 2 เล่ม

ความรับผิดชอบ

บทความที่ลงพิมพ์ในวารสารโรคติดต่อฯ โดยแมลง ถือเป็นผลงานทางวิชาการ การวิจัย วิเคราะห์ ตลอดจนความเห็นส่วนตัวของผู้เขียน ไม่ใช่ความเห็นของสำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง หรือกองบรรณาธิการแต่ประการใด ผู้เขียนจำเป็นต้องรับผิดชอบต่อบทความของตน

บรรณาธิการแถลง

วารสารโรคติดต่อ นำโดยแมลงฉบับนี้ เป็นฉบับที่ 2 เดือน กรกฎาคม – ธันวาคม 2549 ภายในเล่มมีรายงานปริทัศน์ที่น่าสนใจคือ เรื่องสารไล่ยุงจากพืชสมุนไพร โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผ่องศรี ทิพวงโกศล จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ฉบับนี้ค่อนข้างจะหนักไปในเรื่องการตรวจทางห้องปฏิบัติการ มีทั้งการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอ็นไซม์ pGAPDH ซึ่งจะ เป็นพื้นฐานนำไปสู่การผลิตชุดทดสอบเร็วสำหรับการวินิจฉัยมาลาเรีย โดย ดร.พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ และคณะกรรมการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วย เทคนิค real-time PCR โดย ดร.คณินิจ คงพ่วง และคณะกรรมการประเมินชุดย้อมสีสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดย คุณทิติถาการรอดนาค และคณะ

กองบรรณาธิการรู้สึกยินดีที่มีหน่วยงานต่าง ๆ ส่งผลงานวิชาการมาเผยแพร่ในวารสารโรคติดต่อ นำโดยแมลงฉบับนี้ โดยคุณพรพิมล กิจนิธินันท์ และคณะ จากสำนักอนามัยกรุงเทพมหานคร ส่งเรื่องการศึกษาความชุกชุมและชนิดของยุงลายในพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออกในกรุงเทพมหานคร แพทย์หญิงศศิธร ตั้งสวัสดิ์ และคณะ จากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 ขอนแก่น ส่งเรื่องการเฝ้าระวังโรคติดต่อ ซึ่งเป็นปัญหาใหม่ในจังหวัดหนองบัวลำภูมาเป็นสิริสรในฉบับนี้

นอกจากนี้ผู้อ่านจะได้รับทราบว่ามีกรมควบคุมโรคของเรายังมี hot line call center รายละเอียดติดตามได้จากผลงานของคุณรงค์ จันทนะกุล จากกองแผนงาน

ในฉบับต่อ ๆ ไปกองบรรณาธิการหวังว่าจะมีหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งจากภายในและนอกกรมควบคุมโรคส่งผลงานวิชาการมาเผยแพร่อย่างต่อเนื่อง

วารสารโรคติดต่อ นำโดยแมลง

วารสารโรคติดต่อ นำโดยแมลง เป็นวารสารวิชาการ จัดพิมพ์เผยแพร่ โดย สำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ ผลงานวิจัย และความรู้ด้านโรคติดต่อ นำโดยแมลงแก่นักวิชาการและผู้สนใจทั่วไป
2. เป็นสื่อกลางในการแลกเปลี่ยนทางวิชาการ และความคิดเห็นเกี่ยวกับโรคติดต่อ นำโดยแมลง
3. เสริมสร้างความรู้แก่ประชาชนในอันที่จะนำไปสู่การสร้างพฤติกรรม ในการป้องกันและควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง

คณะที่ปรึกษา

รองอธิบดี และ ผู้ทรงคุณวุฒิ กรมควบคุมโรค ที่ดูแลงานโรคติดต่อ นำโดยแมลง
ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1-12

แพทย์หญิงสุจิตรา นิมมานนิตย์ แพทย์หญิงกรองทอง ทิมาสาร
นายแพทย์จิรพัฒน์ ศิริชัยสินธพ นายแพทย์สุวิช ธรรมปาโล

บรรณาธิการ

นายแพทย์ชัยพร โรจนวัฒน์ศิริเวช

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

ดร. คณินิจ คงพ่วง

กองบรรณาธิการ

นายแพทย์กิตติ ปรมัตถผล	นายแพทย์อนุตรศักดิ์ รัชตะทัต
นายสุทัศน์ นุตสถาปนา	นางสาวกอบกาญจน์ กาญจโนภาส
นายภูภากร หลิมรัตน์	ดร.พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ
ดร.สิวิกา แสงธราทิพย์	ดร.สุภาวดี คนชม

ฝ่ายจัดการ

นายเจริญ โสธนนท์

ฝ่ายศิลป์

นายธวัช กันตะศรี นายชัยวัฒน์ วาสะศิริ

กำหนดออก

ปีละ 2 ฉบับ : มกราคม – มิถุนายน และ กรกฎาคม – ธันวาคม

สำนักงาน

สำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
ถนนติวานนท์ อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000

โทร. 0-2590-3108, 0-2590-3121 โทรสาร 0-2591-8422

สารไล่ยุงจากพืชสมุนไพร

ผ่องศรี ทิพวงโกศล

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ยุงเป็นพาหะนำโรคที่มีความสำคัญหลาย ๆ โรค และเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่ก่อให้เกิดการเจ็บป่วย และเสียชีวิตของคนทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อนและร้อนชื้น ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ยังคงมี ปัญหาการระบาดของโรคที่มียุงเป็นพาหะ ยุงพาหะสำคัญที่ ก่อให้เกิดโรคได้แก่ ยุงลายนำโรคไข้เลือดออกและโรคเท้าช้าง ยุงก้นปล่องนำโรคมาลาเรีย ยุงรำคาญนำโรคไข้สมองอักเสบ และยุงเสียนำโรคเท้าช้าง นอกจากนี้ยุงยังก่อความรำคาญ ให้แก่คนและสัตว์ ทำให้เกิดการสูญเสียเลือดและเกิดอาการ แพ้ทางผิวหนัง ปัจจุบันโรคที่มียุงเป็นพาหะส่วนใหญ่ยังไม่มียาหรือวัคซีนที่สามารถป้องกันโรคได้ทั้งหมด ดังนั้น การควบคุมโรคตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน จึงเน้นไปที่การ ควบคุมยุงพาหะเป็นสำคัญ การควบคุมยุงพาหะสามารถ ทำได้หลายวิธี วิธีที่ให้ผลดีที่สุดในการกำจัดยุงพาหะคือ การใช้สารเคมีสังเคราะห์หรือสารฆ่าแมลง สารเคมีเหล่านี้ แม้จะใช้ได้ผลดี มีประสิทธิภาพสูงแต่มีอันตราย หรือผล ข้างเคียงต่อคนและสัตว์เลี้ยงรวมไปถึงแมลงอื่น ๆ ที่เป็น ประโยชน์ทางเกษตรกรรม มีความคงทนและสลายตัวได้ยาก เกิดการสะสมในดินและน้ำ วิธีการป้องกันตนเองไม่ให้ยุงกัด ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ได้ผลดี สามารถทำได้โดยหลีกเลี่ยงที่จะ เข้าไปในแหล่งที่มียุงชุกชุม สวมเสื้อผ้าให้มิดชิดและใช้สาร ไล่แมลง

สารไล่ยุงที่มีประสิทธิภาพดีควรเป็นสารที่สามารถ ป้องกันยุงได้หลายชนิด และใช้ได้กับแมลงพาหะชนิดอื่น ๆ รวมทั้งใช้ได้ในพื้นที่ที่มีการใช้วิธีการควบคุมยุงด้วยวิธีอื่น ไม่ได้ผล ใช้ง่าย ราคาไม่แพง การควบคุมยุงโดยใช้สารฆ่า

แมลงหรือการใช้สารไล่แมลงที่มีส่วนประกอบของสารเคมี นอกจากราคาที่สูงแล้ว ยังมีผลต่อสุขภาพของคนและสัตว์ ชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังทำให้แมลงดื้อต่อสารเคมีที่ใช้ ปัจจุบันมีสารไล่ยุงวางขายในท้องตลาดมากมาย โดยผลิต ออกมาในรูปของธูปกันยุง แผ่นขุบสารกันยุง ขดยกันยุง หรือ ผลิตเป็นยาทาผิวหนังในรูปของครีม โลชั่น หรือสเปรย์ ซึ่งเป็น รูปแบบหนึ่งที่ยิยมใช้กันมาก เนื่องจากใช้ได้สะดวกและหา ซื้อง่ายตามท้องตลาดทั่ว ๆ ไป สารที่จะนำมาทาบนผิวหนัง ต้องไม่เป็นอันตราย และต้องไม่มีกลิ่นหรือสีที่น่ารังเกียจ แต่ มีผลทำให้ยุงไม่ชอบเข้าใกล้ หรือทำให้บริเวณที่ทาสารไม่ เป็นที่สนใจของยุง ทั้งนี้เพราะสารอาจออกฤทธิ์โดย รมควันการรับรู้ของยุง หรือก่อให้เกิดความระคายเคือง หรือ ทำให้ระบบสัมผัสของยุงทำงานผิดปกติไม่สามารถค้นหา เป้าหมายได้ สารขับไล่ยุงมีประโยชน์อย่างมากในบุคคลบาง กลุ่ม บางอาชีพ เช่น นักท่องเที่ยวที่เข้าไปในป่า ชาวสวน ยางพารา ชาวเหมือง ผู้ที่ทำงานป่าไม้หรือหาของป่า ยาม รักษาการณ์ ตลอดจนตำรวจทหารที่อยู่ตามแนวชายแดน อย่างไรก็ตามส่วนประกอบหลักในยาทากันยุงเหล่านี้ยังคง เป็นสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งหากใช้สารเคมี ดังกล่าวทาผิวหนังเป็นระยะเวลาานหลายเดือนติดต่อกัน อาจมีการสะสมของสารเคมีที่ผิวหนังก่อให้เกิดอาการแพ้ หรือระคายเคือง การนำสารสกัดจากพืชมาใช้เป็นสารขับไล่ ยุงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจทดแทนการใช้สาร ขับไล่ยุงที่ได้จากสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากสารสกัดจากพืช ส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์เลี้ยงค่อนข้างต่ำ ไม่ค่อยมีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ มีความปลอดภัยและมีกลิ่น



หอมมาใช้มากกว่า นอกจากนั้นยังมีพืชคางค่างตำในธรรมชาติ จึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ

สารไล่ยุงที่มีขายในท้องตลาดแบ่งออกได้ 3 ชนิด ชนิดแรกทำจากสารเคมีสังเคราะห์ ชนิดที่สองทำจากพืช ชนิดที่สามเป็นสารผสมของสารเคมีสังเคราะห์และสารที่ได้จากพืช สารไล่แมลงที่มีประสิทธิภาพดีและนิยมใช้มากที่สุด เป็นสารเคมีสังเคราะห์คือ DEET (N, N-diethyl-3-methylbenzamide) ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2500 และใช้ได้ผลดีมาจนถึงปัจจุบัน นอกจากนี้ DEET ยังถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบหลักของผลิตภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาด ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น โลชั่น เจล ครีม สเปรย์ ผ้า หรือ กระดาษที่ชุบด้วยสารเคมี

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เหล่านี้ยังคงเป็นสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งหากใช้สารเคมีดังกล่าวทาผิวหนังเป็นระยะเวลานานหลายเดือนติดต่อกัน อาจมีการสะสมของสารเคมีที่ผิวหนัง ก่อให้เกิดอาการแพ้หรือระคายเคืองได้ นอกจากนี้ DEET ยังมีข้อเสียในเรื่องของกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ สามารถซึมผ่านผิวหนังและละลายพลาสติกได้ ดังนั้นจึงมีผู้ผลิตสารไล่ยุงที่ได้จากธรรมชาติหรือสารไล่ยุงที่มีส่วนผสมของสารเคมีสังเคราะห์และสารจากธรรมชาติ

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ไล่ยุง และแมลงพาหะนำโรคอื่น ๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ ตะไคร้ ยูคาลิปตัส สะเดาอินเดีย ดอกพกากรอง นอกจากนี้ยังมี น้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด เช่น ตะไคร้หอม มะนาว ยูคาลิปตัส สะเดา และ สะระแหน่ ถูกนำมาใช้เป็นสารไล่ยุง ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ จากผลการวิจัยของ Trongtokit และคณะ⁽⁵⁾ ได้ทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ไล่ยุงของ น้ำมันหอมระเหย 38 ชนิด พบว่ามีน้ำมันหอมระเหยเพียง 4 ชนิด คือ ตะไคร้หอม พิมเสน กานพลู และมะแขว่น มีฤทธิ์ไล่ยุงลาย (*Aedes aegypti*) ได้นาน 2 ชั่วโมง และกานพลูมีฤทธิ์ไล่ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles dirus*) ได้นาน 2-4 ชั่วโมง

เนื่องจากสารไล่ยุงที่มีขายในท้องตลาดในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ มีให้เลือกใช้มากมายหลายชนิด ดังนั้นวิธีการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ไล่ยุง ควรอ่านฉลากของผลิตภัณฑ์ เพื่อเปรียบเทียบดูว่าผลิตภัณฑ์เหล่านั้นมีฤทธิ์ในการป้องกันยุงได้นานเท่าไร มีส่วนผสมของสารเคมีสังเคราะห์ในปริมาณมากน้อยเพียงใด จากการศึกษาของเบญจวรรณ ต้อตัน และ

คณะ^(6,7) ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารไล่ยุงในรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ จากท้องตลาดจำนวน 15 ชนิด เช่น โลชั่น สเปรย์ เจล ลูกกิ้ง และครีมยี่ห้อต่าง ๆ ดังนี้ Off, ky 15, Sketolene, Beauti spray, Citronella, Noxy, Herbal mosquito repellent, Tipskin, Mistline censor และ Soffell ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาจากสารเคมีสังเคราะห์ สารสกัดจากธรรมชาติ และผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมทั้งสารเคมีสังเคราะห์ และสารสกัดจากธรรมชาติ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายและสารเคมีสังเคราะห์มาตรฐาน (DEET) ทดสอบกับยุงลายในท้องปฏิบัติการและทดสอบกับยุงในภาคสนาม

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายความเข้มข้น 10-25% ผสมกับสารเพิ่มประสิทธิภาพ (5% vanillin) สามารถป้องกันยุงได้นาน 2-5 ชั่วโมงในท้องปฏิบัติการ และให้ผลเช่นเดียวกันนี้กับ DEET (ความเข้มข้น 10-25% + 5% vanillin) ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีส่วนผสมของ DEET พบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงได้ต่ำกว่าสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย โดยป้องกันยุงกัดได้ยาวนานประมาณครึ่งชั่วโมงถึง 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งคือมีผลิตภัณฑ์หลายยี่ห้อ ที่ในฉลากได้ระบุประสิทธิภาพในการป้องกันยุงไว้แต่หลังจากทดสอบแล้วพบว่าไม่มีฤทธิ์ป้องกันยุงกัดได้เลย สารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่าย (ความเข้มข้น 25% + 5% vanillin) มีประสิทธิภาพป้องกันยุงกัดได้ดีในท้องปฏิบัติการ และสามารถป้องกันยุงลาย ยุงรำคาญ และยุงเสือได้ในภาคสนาม นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ระคายต่อผิวหนังหลังการใช้ติดต่อกันนาน 6 เดือน และประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายสามารถคงอยู่ได้นานอย่างน้อย 2 เดือน

ขึ้นฉ่าย (*Apium graveolens* L.) เป็นพืชที่พบได้ทั่วโลก หมอพื้นบ้านนำขึ้นฉ่ายมาใช้รักษาโรคข้ออักเสบ บำรุงประสาท ท้องบิด โรคตับและม้าม ส่วนประกอบหลักในเมล็ดขึ้นฉ่ายประกอบด้วย d-limonene (60%), selinene (10%), phthalides (3%) รวมทั้ง 3-n-butylphthalide, sedanenolide และ sedanonic anhydride จากการทดลองในหนูพบว่าสาร phthalide มีฤทธิ์เป็นยานอนหลับ ยากันชัก และต้านมะเร็ง นอกจากนี้สารประกอบจากเมล็ดขึ้นฉ่ายมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิ เชื้อรา ยุงลายระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัยได้ เบญจวรรณ ต้อตัน และคณะ^(11,12) ได้ทดสอบเปรียบเทียบ



ประสิทธิภาพสารสกัดจากเมล็ดขึ้นฉ่ายที่สกัดด้วยสารเคมี เช่น hexane, dichloromethane และเมทานอล พบว่า สารสกัดเฮกเซนมีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถป้องกันยุงกัด ได้นาน 3 ชั่วโมงครึ่งในห้องปฏิบัติการ

นอกจากขึ้นฉ่ายแล้วยังมีพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ น่าสนใจ คือพืชในสกุลขมิ้น (*Curcuma spp.*) พืชในสกุลนี้ ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคหลายชนิด รากและเหง้านิยมนำมาปรุงอาหารและยา พืชในสกุลนี้ที่น่าสนใจ ได้แก่ ว่านมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa*) ในประเทศไทยนำว่านชนิดนี้มา เป็นอาหารและยา ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*) ทำให้ เลือดไหลเวียนดี ใช้รักษาโรคมะเร็ง และว่านขมิ้นคุดถูก (*Curcuma xanthorrhiza*) ใช้รักษาโรคกระเพาะ โรคตับ ท้องเสีย อุจจาระเป็นเลือด อากาไรในเด็ก ริดสีดวงทวาร และโรคผิวหนัง มีฤทธิ์ต้านเนื้องอก แก้อักเสบ ต้านเชื้อ แบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น

เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์ และคณะ⁽³⁾ เปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของสารไล่ยุงจากสารสกัดจากพืชสกุลขมิ้น 3 ชนิด คือ ว่านนางคำ ว่านมหาเมฆ และว่านขมิ้นคุดถูก พบว่า มีเพียงสารสกัดว่านนางคำเท่านั้นที่สามารถป้องกันยุงได้ โดยป้องกันยุงกัดได้นาน 3 ชั่วโมงครึ่ง นอกจากนี้ยังไม่ ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังและไม่ก่อให้เกิด ผลข้างเคียงหรือผลเสียใด ๆ กับผู้ใช้ในระยะเวลา 2 เดือน ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ทาผิวหนังเพื่อป้องกันยุงกัด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการวิจัยที่พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด คือขึ้นฉ่ายและว่านนางคำมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุง กัดดีนั้น ในอนาคตจะมีการพัฒนานำสารทั้งสองชนิดนี้ มาใช้เป็นสารขับไล่ยุงในรูปแบบผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytother Res* 2005; 19: 303-9.
2. Tuetun B, Choochote W, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Chaiwong P, et al. Repellent properties of celery, *Aplum graveolens* L, compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions. *Trop Med Int Health* 2005; 10: 1190-8.
3. Tuetun B, Choochote W, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, et al. Mosquito repellency of the seeds of celery (*Aplum graveolens* L.). *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98: 407-17.
4. Pitasawat B, Choochote W, Tuetun B, Tippawangkosol P, Kanjanapothi D, Jitpakdi A, et al. Repellency of aromatic turmeric *Curcuma aromatica* under laboratory and field conditions. *J Vec Ecol* 2003; 28: 234-40.

ในประเทศไทยมีพืชและสมุนไพรมากมายหลายชนิด ที่มีคุณสมบัติใช้ทาป้องกันยุงกัดได้ เช่น กระเทียม ตะไคร้หอม มะกรูด ตีบสี โพล ขิง ข่า ขมิ้น ยูคาลิปตัส กระเพรา โหระพา แมงลัก ว่านน้ำ เปราะหอม สะระแหน่ สะเดา ฯลฯ หากมีการศึกษาอย่างจริงจังเพื่อให้ประชาชนสามารถนำพืช และสมุนไพรต่าง ๆ ที่เป็นทรัพยากรในห้องถิ่นของตนเอง มาพัฒนาและผลิตเพื่อใช้และจำหน่ายได้จะก่อให้เกิด ประโยชน์อย่างมากต่อชุมชนและประเทศชาติ นอกจากนี้ ยังเป็นการสนับสนุนการใช้พืชและสมุนไพรไทยที่สอดคล้อง กับงานสาธารณสุขมูลฐานและนโยบายของรัฐบาลในภาวะ ปัจจุบันที่ส่งเสริมให้มีการใช้ประโยชน์จากพืชและสมุนไพร มากขึ้น ซึ่งนอกจากจะทำให้ประชากรในชุมชนสามารถ อยู่อาศัยและพึ่งตนเองได้จากผลิตภัณฑ์ที่มาจากทรัพยากร ภายในท้องถิ่น ยังเป็นการประหยัดเงินตราของประเทศที่ สูญเสียไปกับการใช้สารเคมีซึ่งส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าจาก ต่างประเทศ



Curcuma aromatica



**Production of a monoclonal antibody against
Plasmodium lactate dehydrogenase
for the diagnosis of malaria**

Pongwit Bualombai¹, Kanchana Aiem-Umporn², Chaiporn Rojanawatsirivet¹,
Panadda Dhepaksorn³, Tassanee Sakuldamrongpanich², Kanungnit Congpuong¹

¹Bureau of Vector Borne Disease, Department of Disease Control,

²National Blood Center, Red Cross Council, ³Medical Biotechnology Center,
Department of Medical Science

Abstract

Malaria is still a major public health problem in Thailand especially along the border areas. Early diagnosis and prompt appropriate treatment has been the current successful control strategy. To succeed the early diagnosis strategy, malaria rapid diagnostic test (MRDT) is an appropriate alternative diagnostic tool. Some limitations of MRDT includes its high cost and quality variation. Locally developed MRDT could reduce these limitations. Specific monoclonal antibodies (MAbs) are the crucial components for the success of the MRDT kit production. In this study *Plasmodium lactate dehydrogenase* (pLDH) was selected as a proteinomic antigen for the production of specific MAbs because it was a glycolytic enzymatic protein produced very specifically to each species of human *Plasmodium* with high amount. In addition, it was produced only by viable parasite; therefore, its detection would evidence the recent infection. The pLDH protein antigens originated from two sources, native and recombinant proteins. Native protein derived from *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum* K1 strain. Culture parasites were concentrated by passing through Cibacron blue column and pLDH was then harvested. Two recombinant pLDH proteins i.e. pLDH-GST and pLDH-His were produced. Female BALB/c mice, separated into three groups, were immunized with native pLDH or pLDH-GST or pLDH-His. After appropriate period, hybridomas were created by fusing the hyper-immunised mice's splenic lymphocytes with myeloma cell, followed by screening and cloning the pLDH antibody secreting hybridomas. Two screening methods, ELISA and Dot-ELISA were used to test the hybridomas. Then, MAbs specific to *Plasmodium falciparum* and pan malaria species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were chosen by using three techniques, indirect immunofluorescence (IFA), SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis. Totally, 269 MAbs were raised, mostly derived from recombinant pLDH hybridomas. Activity of the 118 MAbs were strong and stable. 1, 35 and 63 clones with stable and strong activity were derived from native pLDH hybridomas, pLDH-GST hybridomas and pLDH-His hybridomas, respectively. However, all MAbs produced by the first two hybridomas were IgM class. Some of them were then class switched to IgG to suit the conjugation with colloidal gold. After performing class switching, 19 strong and stable clones were derived. Specificity of MAbs determined by IFA and Western blot analysis showed that 61, 15 and 33 MAbs were specific to *P. falciparum*, *P. vivax* and PAN malaria species, respectively. Some MAbs were chosen for embedding test strips. The developed test strip was tested by using blood samples collected from malaria patients. High sensitivity of the developed test kit was found. The detection limit was 312 parasites per microlitre.

Key Words: Malaria, Monoclonal antibody, pLDH



**การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอ็นซิม
Plasmodium lactate dehydrogenase เพื่อใช้วินิจฉัยโรคมาลาเรีย**

'พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, 'กาญจนา เอี่ยมอัมพร, 'ชัยพร โรจนวัฒน์ศิริเวช,
'ปนัดดา เทพอักษร, 'ทัศนีย์ สกุดคำรงค์พานิช, 'คณินิจ คงพ่วง
'สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค, 'ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
'ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์และสาธารณสุข

บทคัดย่อ

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะห้องที่ห่างไกลและทุรกันดารบริเวณชายแดนของประเทศ มาตรการที่สำคัญที่สุดในการควบคุมไข้มาลาเรียในสถานการณ์แบบนี้คือ การให้บริการตรวจและรักษาอย่างรวดเร็ว การประยุกต์ใช้ชุดตรวจหาเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็วที่เรียกกันง่าย ๆ ว่า dipstick เมื่อนำมาใช้เสริมวิธีตรวจปกตินับว่าเป็นมาตรการที่ดีและเหมาะสมมาตรการหนึ่ง แต่ปัญหาสำคัญคือ dipstick ในปัจจุบันมีราคาแพงและไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้ เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศ ดังนั้นความพยายามที่จะผลิต dipstick ได้เองในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งจำเป็น การผลิต dipstick เริ่มต้นจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวและความจำเพาะสูงต่อเชื้อมาลาเรีย ผู้วิจัยเลือก *Plasmodium lactate dehydrogenase* (pLDH) เป็นแอนติเจนที่จะนำมาใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากเป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิตอยู่ และถูกผลิตออกมาเป็นจำนวนมากในร่างกายผู้ป่วยที่กำลังติดเชื้อมาลาเรีย ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจากการเตรียมแอนติเจนซึ่งมาจาก 2 แหล่ง คือจากโปรตีนธรรมชาติและโปรตีนสังเคราะห์ ในส่วนของโปรตีนธรรมชาติได้จากการสกัดโปรตีน pLDH จากเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง แล้วนำมาผ่าน Cibacron blue column ส่วนโปรตีนอีก 2 ตัวเป็นโปรตีนสังเคราะห์ คือ pLDH-GST และ pLDH-His นำโปรตีนฉีดเข้าหนู BALB/c mice 3 กลุ่ม แบ่งตามที่มาของแอนติเจนดังกล่าว จากนั้นนำ mouse spleen มา fuse กับ myeloma cell line ทำ cloning แล้วเลือก hybridoma cells ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ pLDH โดยใช้วิธีคัดกรอง 2 วิธี คือ ELISA และ Dot-ELISA จากนั้นเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ PAN malaria antigen โดยวิธี indirect immunofluorescent assay (IFA), SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blot analysis พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่ได้มาจากการใช้โปรตีนสังเคราะห์ จำนวนโคลนที่ได้รวมทั้งสิ้น 269 โคลน แต่เป็นโคลนที่แข็งแรงและคงทน 118 โคลนซึ่งได้จากโปรตีนธรรมชาติ 1 โคลน โปรตีนสังเคราะห์ pLDH-GST 35 โคลน และโปรตีนสังเคราะห์ pLDH-His 63 โคลน แต่จากโคลนที่ผลิตจากกลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นชนิด IgM จึงต้องเปลี่ยน immunoglobulin class ของกลุ่มที่ 2 บางโคลนจาก IgM เป็น IgG เพื่อสะดวกต่อการนำมาเชื่อมกับ colloidal gold ให้ได้โคลนที่แข็งแรงและคงทนจำนวน 19 โคลน เมื่อวิเคราะห์ความจำเพาะโดยวิธี IFA และ Western blot ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. falciparum* 61 โคลน จำเพาะต่อเชื้อ *P. vivax* 15 โคลน และจำเพาะต่อ PAN malaria species 33 โคลน โคลนที่นำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่ตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ดีที่สุด 312 ตัวต่อไมโครลิตร ในขั้นตอนต่อไปจะเลือกบางโคลนนำไปผลิต dipstick ต่อไป

คำรหัส: มาลาเรีย, โมโนโคลนอลแอนติบอดี, เอ็นซิม pLDH

บทนำ

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะยังมีการระบาดในท้องที่ห่างไกลและทุรกันดาร ตามแนวชายแดนของประเทศ⁽¹⁾ มาตรการสำคัญที่สุดของการควบคุมไข้มาลาเรียในสถานการณ์แบบนี้คือการให้บริการตรวจและรักษาอย่างรวดเร็ว⁽²⁾ การนำชุดตรวจหาเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็วที่เรียกง่าย ๆ ว่า dipstick มาใช้เสริมวิธีตรวจปกติเป็นมาตรการที่ดีและเหมาะสม แต่มีอุปสรรคที่สำคัญคือราคาที่ยังคงแพงและ dipstick บางชนิดที่มีจำหน่ายยังมีข้อจำกัดเรื่องความถูกต้องของผลการตรวจที่ยังต่ำกว่าวิธีการตรวจฟิล์มเลือดหนาทึบด้วยสีย้อมฆ่า⁽²⁾ การผลิต dipstick ได้เองในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งจำเป็น

การผลิต dipstick เริ่มจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย ผู้วิจัยเลือกแอนติเจน *Plasmodium lactate dehydrogenase* (pLDH; L-Lactate, NAD⁺-oxidoreductase) เพื่อนำมาใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี pLDH เป็นเอ็นไซม์ตัวหนึ่งในขบวนการ glycolytic pathway ของเชื้อมาลาเรียซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดสาร lactate จาก pyruvate ที่เป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ pLDH ถูกผลิตออกมาในปริมาณมากในเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรีย⁽³⁾ มีลักษณะจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ที่พบในคน⁽⁴⁾ pLDH

ถูกผลิตโดยเชื้อตัวเป็นเท่านั้น ดังนั้นการพบ pLDH ในกระแสเลือดจึงสอดคล้องกับการพบเชื้อและจำนวนเชื้อในกระแสเลือดเช่นเดียวกับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจพบ pLDH จึงแสดงถึงการที่ผู้ป่วยมีเชื้อมาลาเรียอยู่ในขณะนั้น⁽⁵⁾

ปัจจุบันมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ pLDH จากเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ W2 และ D6 และได้นำมาผลิตเป็นชุดตรวจ immunocapture pLDH activity assay (ICpLDH assay) เมื่อนำมาตรวจเลือดผู้ป่วยมาลาเรียพบว่าผลการตรวจสอดคล้องกับการพบเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยเป็นอย่างดี⁽⁶⁾ ปัจจุบันโมโนโคลนอลต่อ pLDH ได้ถูกนำมาผลิตเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปโดยบริษัทผู้ผลิตหลายบริษัท

จากความต้องการที่จะผลิตชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็วได้เองในประเทศไทยโดยใช้เทคโนโลยีแบบพึ่งพาตนเอง เพื่อที่จะสามารถมีชุดตรวจเชื้อมาลาเรียราคาถูก และสามารถควบคุมคุณภาพได้อย่างใกล้ชิด ผู้วิจัยจึงได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ pLDH โดยสกัดโปรตีน pLDH จากเชื้อฟิลิปปินส์สายพันธุ์ K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายในประเทศต่าง ๆ ที่พบเชื้อมาลาเรีย⁽⁷⁾ การผลิตใช้ขั้นตอนที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Goding⁽⁸⁾ และ Harlow และคณะ⁽⁹⁾

วัสดุและวิธีการ

เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1⁽⁷⁾ ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์สดศรี ไทยทอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาเลี้ยงในหลอดทดลองโดยใช้ RPMI-1640 medium (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) ตามวิธีของ Trager และ Jensen⁽¹⁰⁾ ทำให้เชื้อเป็นระยะเดียวกัน (synchronisation) ตามวิธีของ Lambros และ Vanderberg⁽¹¹⁾ เตรียมเชื้อมาลาเรียระยะไซซอนต์ให้มีความหนาแน่นของเชื้อตามที่ต้องการโดยใช้ Percoll-sorbitol discontinuous gradient ตามวิธีของ Kutner และคณะ⁽¹²⁾ บั่นล้างเชื้อมาลาเรียด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ที่ 5,000 รอบต่อนาที 2 ครั้ง เก็บเชื้อมาลาเรีย ที่ -70°C

การเตรียมและสกัด pLDH pLDH ถูกเตรียมเพื่อนำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 แบบ คือ แบบโปรตีนธรรมชาติ (native protein) และแบบสังเคราะห์ (recombinant protein) การเตรียมโปรตีนธรรมชาติทำโดยนำเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงมาทำให้แตกเพื่อละลายเม็ดเลือดแดง โดยนำมาละลายใน 0.1 % saponin ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเชื้อมาลาเรีย อบบนเครื่องเขย่าผสมที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำเชื้อมาลาเรียมาย่อยสลายด้วยคลื่นเสียง (ultrasonic disintegrator) ที่ 4°C, 20,000 รอบ 1 นาที วัดค่า pLDH activity โดยวัดค่า enzyme kinetic หลักการคร่าว ๆ คือใช้ sodium pyruvate เป็นสารตั้งต้นและใช้ NADH เป็น cofactor ทาค่า LDH activity โดยใช้เครื่องมือของภาควิชาชีวเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ภายใต้



ความอนุเคราะห์ของศาสตราจารย์ ดร.วราชาติ สิริวรรณ นำโปรตีนมาผ่าน HiTrap™ Blue HP Column (Amersham Biosciences AB, Uppsala Sweden) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัทผู้จำหน่าย นำโปรตีน pLDH ที่ผ่าน column มาวัดค่า enzyme kinetic อีกครั้ง จากนั้นนำ pLDH โปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และวัดโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ⁽¹³⁾

โปรตีน pLDH ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ปนัดดา เทพหัสดิน ณ อยุธยา เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีวิธีการเตรียมคร่าว ๆ ดังนี้ clone pLDH gene ใน plasmid *E. coli* ด้วยการ express recombinant pLDH protein โดยใช้ Vector pGEX4T-1 และ transform ใน *E. coli* BL21 (DE3) แล้วเลี้ยงบน LB agar with ampicillin resistance จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จาก recombinant *E. coli* โปรตีน pLDH ที่ผลิตมี 2 แบบ คือ ชนิดที่เชื่อมกับโปรตีน glutathione S transferase (pLDH-GST) และชนิดที่เชื่อมกับ histidine (pLDH-His)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สถานที่ดำเนินการ 2 แห่ง คือ ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อมาโดยแมลง สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธี native และ recombinant ทำโดยนำโปรตีนที่เตรียมได้ฉีดเข้าไปในช่องท้องหนู BALB/c เพศเมียซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มแรกฉีดโปรตีน pLDH ธรรมชาติ กลุ่มที่ 2 ฉีดโปรตีน pLDH สังเคราะห์ที่ติดฉลากกับ glutathione S transferase (pLDH-GST) และกลุ่มที่ 3 ฉีดโปรตีน pLDH สังเคราะห์ที่ติดฉลากกับ histidine (pLDH-GST) การฉีดใช้โปรตีนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม หลังจากนั้น 14 วัน ฉีดกระตุ้นซ้ำ (boost) 3

ครั้ง ห่างกันครั้งละ 21 วัน ในการฉีดกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 3 จะฉีดเข้าทั้งในช่องท้องและเข้าเส้นเลือดดำ 3 วันหลังการฉีดกระตุ้นซ้ำครั้งสุดท้าย ฆ่าหนู นำม้ามของหนูมาสกัดเซลล์ม้ามออกมาโดยใช้เข็มที่มรอบ ๆ ม้ามทำให้เกิดช่องให้เซลล์ม้ามออกมา นำเซลล์ม้ามมา fuse กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ X63.Ag8.653

หลังจากนั้นประมาณ 1-2 สัปดาห์ ตรวจคัดกรองเพื่อหาโคลนที่ให้ผลบวกโดยใช้วิธีการตรวจคัดกรอง 3 วิธี คือ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent assay (IFA) ตามวิธีของ Tharavaniy และคณะ⁽¹⁴⁾ และ dot-ELISA ของพงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ และคณะ⁽¹⁵⁾ หากคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการหา immunoglobulin class และ sub-class ด้วยวิธี antibody capture on anti-Ig antibodies⁽⁹⁾ และการย้อมติดสีระยะต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรีย โดยวิธี IFA โคลนที่ให้ผลบวกเหล่านี้จะถูกวัดความแรง โดยทั้งวิธี ELISA และ Dot-ELISA⁽¹⁵⁾ และทดสอบโคลนเหล่านี้ทุก ๆ 3 เดือน โคลนใดที่ให้ผลบวกนานกว่า 6 เดือน จะนับว่าโคลนนั้นมีความคงทน

ทำโคลนเดี่ยว (single cell cloning) ตามวิธีของ ทศนีย์ สกุลดำรงคพานิช⁽¹⁶⁾ ตรวจคัดกรองหาโคลนที่ให้ผลบวกตามวิธีการ 3 วิธีดังกล่าวข้างต้น และตรวจยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี SDS-PAGE และวิธี Western blot คัดเลือกโคลนที่จะผลิตแบบจำนวนมากในสัตว์ทดลอง โดยผลิตจากน้ำช่องท้องของหนู BALB/c แข็งแข็งเก็บตามวิธีของ ทศนีย์ สกุลดำรงคพานิช⁽¹⁶⁾ เพื่อนำไปใช้ผลิตชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อมาลาเรียต่อไป

การหาความหลากหลายของความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียใช้วิธีของ Tranpradit และคณะ⁽¹⁷⁾ โดยทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียที่เก็บมาจากภาคต่าง ๆ ของประเทศ จำนวน 120 ตัวอย่างด้วยวิธี IFA โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความหลากหลายของความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ จะต้องให้ผลบวกต่อตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียเหล่านี้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 90

ผลการศึกษา

จากการเลี้ยงและเตรียมเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 เชื้อมาลาเรียถูก synchronise 2 ครั้งด้วย 5% D-sorbitol โดยใช้เวลาห่างกันครั้งละ 30 ชั่วโมง หลังการ synchronize ครั้งที่ 2 เมื่อทำ enrichment เฉพาะส่วนของระยะ schizont ได้ค่า recovery rate เท่ากับร้อยละ 69.53 และได้จำนวนเชื้อรวมทั้งสิ้น 3.7×10^{10} เซลล์ เมื่อนำเชื้อมาสกัด pLDH โดยผ่าน HiTrapTM blue HP column ตรวจวิเคราะห์ native pLDH โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Commassie brilliant blue, native pLDH แสดงน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa วัดค่า pLDH activity ได้ค่า Total activity เท่ากับ $11.1 \mu\text{mole/นาที่/มล.}$ และ % yield เท่ากับร้อยละ 0.001 ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 2.69 ไมโครกรัม/มล. จำนวน 2 มล. สำหรับ recombinant pLDH (Rec pLDH) 2 ชนิด ที่ได้รับจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE pLDH แสดงน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60 kDa สำหรับ pLDH-GST และ 33.5 kDa สำหรับ pLDH-His ตามลำดับ และให้ค่า Total activity $40.8 \mu\text{mole/นาที่/มล.}$ % yield เท่ากับร้อยละ 3.6 และ $86.6 \mu\text{mole/นาที่/มล.}$ % yield เท่ากับร้อยละ 10.5 ตามลำดับ โปรตีนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด ได้โปรตีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มล.เท่ากัน

การผลิต hybridoma clones ต่อ pLDH ในหนู 3 กลุ่ม immunize ด้วยโปรตีนธรรมชาติ pLDH และโปรตีนสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ pLDH-GST และ pLDH-His หลังจาก fusion เมื่อได้โคลนแล้วพบว่ากลุ่มที่ 1 เกิด hybridoma clones ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ pLDH รวม 6 โคลน จากการตรวจคัดกรองโดยวิธี ELISA และ Dot-ELISA เมื่อตรวจซ้ำทุก 3 เดือน มีเพียง 1 โคลนที่ให้ผลแรงและคงทน ทุกโคลนเป็น IgM class กลุ่มที่ 2 เมื่อทำ fusion 2 ครั้ง ได้ hybridoma clones รวม 79 โคลน มี 15 โคลนที่ให้ผลแรงและคงทน ทุกโคลนเป็น IgM class เช่นเดียวกัน คัดเลือก hybridoma clones จำนวน 3 โคลนที่ให้ผลแรงและคงทนมาทำโคลนนิ่งครั้งที่ 1 ได้ hybridoma clones รวม 27 โคลน มี 13 โคลนที่ให้ผลคงทน ทุกโคลนเป็น IgM class จากนั้นเลือก hybridoma clone ที่ให้ผลแรงและ

คงทน จำนวน 3 โคลน มาโคลนนิ่งครั้งที่ 3 ได้ hybridoma clones รวม 15 โคลน พบมี 7 โคลนที่ให้ผลคงทน โดยทุกโคลนเป็น IgM class เช่นเดียวกัน การที่มีแต่ hybridoma clone ที่ผลิตแอนติบอดีชนิด IgM class ทำให้ยากต่อการติดฉลากด้วยสี colloidal gold ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยน immunoglobulin class จาก IgM เป็น IgG ด้วยวิธีของ Faquet⁽¹⁸⁾ โดยเลือก hybridoma clone ที่ผลิตโดยใช้โปรตีนสังเคราะห์ pLDH-GST หลังทำโคลนนิ่งครั้งที่ 2 จำนวน 7 โคลนมาเปลี่ยน Ig class โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ ใช้ goat anti-mouse IgM antibody (Sigma) เจือจาง 1 ต่อ 4,000 ทำปฏิกิริยากับโคลนความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/100 เซลล์ของโคลน จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วย rabbit complement (Sigma) ที่เจือจาง 1:2,000 ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/100 เซลล์ของโคลน ทำให้เซลล์แตก 2-3 รอบ จะพบมีเซลล์ลูกผสมบางเซลล์ถูกทำลายไป เซลล์ที่รอด immunoglobulin class บนผิวเซลล์จะถูกเปลี่ยนจาก IgM เป็น IgG ผลการทดลองพบว่ามีเพียง 1 โคลนจาก 7 โคลนที่ประสบความสำเร็จสามารถเปลี่ยน Ig class จาก IgM เป็น IgG คือ โคลน 5D6-B6-H6 โดยถูกเปลี่ยนเป็น IgG1 จากนั้นเลี้ยงขยายเซลล์และตรวจคัดกรองให้ได้โคลนที่แข็งแรงและคงทน จำนวน 5 โคลน ตั้งชื่อโคลนใหม่เพื่อป้องกันความสับสนกับกลุ่มโคลนที่ผลิตจากโปรตีนอื่น ได้โคลนแม่ที่แข็งแรงและคงทน 2 โคลน คือ 3D7-H2-B2 และ 3D7-D8-A7 เมื่อทดสอบความจำเพาะโดยวิธี IFA โคลน 3D7-H2-B2 แสดงความจำเพาะต่อเชื้อ *P. falciparum* (Pf) ส่วนโคลน 3D7-D8-A7 แสดงความจำเพาะต่อทั้งเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* (Pan Pf. Pv.)

นำโคลนมาโคลนนิ่งอีก 2 ครั้ง ได้โคลนรวมทั้งสิ้น 33 โคลน แต่มีความคงทนเพียง 14 โคลน จากการศึกษาความจำเพาะของโคลนที่ได้รับมา 33 โคลน มีความจำเพาะต่อเชื้อฟิลิปปารัม (Pf.) 16 โคลน จำเพาะต่อฟิลิปปารัมและไวแวกซ์ (Pan Pf. Pv.) 11 โคลน และจำเพาะต่อไวแวกซ์ (Pv.) 6 โคลนเมื่อทดสอบความจำเพาะต่อสายพันธุ์เชื้อมาลาเรีย (genetic diversity) ด้วยวิธี IFA ต่อตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจาก 4 ภาคของประเทศไทย จำนวน 120 ตัวอย่าง



เป็นเชื้อฟิลิปปาร์มและไวแวกซ์จำนวน 80 และ 40 ตัวอย่าง ตามลำดับ สุ่มเลือกโคลนที่แข็งแรงและคงทนต่อเชื้อฟิลิปปาร์ม 2 clones และต่อ Pan Pf. Pv. 2 โคลน (ร้อยละ 10 ของโคลนทั้งหมด) พบว่าทั้ง 4 โคลน ให้ผลบวกต่อตัวอย่างเลือดมากกว่าร้อยละ 90

การทดลองในกลุ่มที่ 3 ใช้โปรตีนสังเคราะห์ pLDH-His หลังจาก fusion ได้โคลนลูกผสมรวม 23 โคลน เป็นโคลนที่แข็งแรงและคงทน 7 โคลน เลือกโคลนแม่หนึ่งโคลนคือ 9C4 มาโคลนนิ่ง 4 ครั้ง ได้โคลนรวม 81 โคลน เป็นโคลนที่แข็งแรงและคงทน 56 โคลน จากการทดสอบโดย IFA ได้โคลนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อฟิลิปปาร์ม 41 โคลน ต่อ Pan Pf. Pv. 22 โคลน และต่อเชื้อไวแวกซ์ 8 โคลน สุ่มเลือกโคลนที่แข็งแรงและคงทนต่อเชื้อฟิลิปปาร์ม 4 โคลน และต่อ Pan Pf. Pv. 4 โคลน (ร้อยละ 10 จากโคลนทั้งหมด) พบว่าทั้ง 8 โคลน ให้ผลบวกต่อตัวอย่างเลือดมากกว่าร้อยละ 90

เมื่อรวมโคลนทั้งหมดที่เป็น IgG class และที่ได้โคลนนิ่งมากกว่า 3 ครั้งขึ้นไปทั้ง 3 กลุ่ม รวม 76 โคลน นำมาหาความจำเพาะโดยวิธี IFA พบว่าสามารถแยกความจำเพาะออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งแสดงความจำเพาะระดับสูงต่อเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนและระยะโทรโฟซอยต์มี 15 โคลน กลุ่มที่สองแสดงความจำเพาะต่อ

เชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนและโทรโฟซอยต์ระดับปานกลางมี 27 โคลน กลุ่มที่สามแสดงความจำเพาะระดับสูงต่อเชื้อมาลาเรียระยะไซซอนต์มี 23 โคลน และกลุ่มที่สี่แสดงความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียระยะไซซอนต์ระดับปานกลางมี 11 โคลน

จากนั้นเลือกโคลนที่แข็งแรงและคงทนจำนวน 8 โคลน ประกอบด้วยกลุ่มโคลนที่ได้จากการฉีดโปรตีนสังเคราะห์ pLDH-GST และเปลี่ยน Ig class จาก IgM เป็น IgG แล้ว จำนวน 4 โคลน มีความจำเพาะต่อเชื้อ Pf. 2 โคลน และต่อ Pan Pf. Pv. 2 โคลนตามลำดับ โคลนส่วนใหญ่แสดงความจำเพาะต่อเชื้อระยะวงแหวนและระยะโทรโฟซอยต์ระดับสูง โคลนที่ได้จากการฉีดโปรตีนสังเคราะห์ pLDH-His จำนวน 4 โคลนมีความจำเพาะต่อเชื้อ Pf. 2 โคลน และต่อ Pan Pf. Pv. 2 โคลนตามลำดับ โคลนส่วนใหญ่แสดงความจำเพาะต่อเชื้อระยะไซซอนต์ระดับสูง โคลนทั้ง 8 โคลนนี้เมื่อหาความไวในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุดโดยวิธี ELISA พบว่าโดยเฉลี่ยโคลนทั้งหมดสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุด 312 ตัว/ไมโครลิตร โคลนทั้ง 8 โคลนนี้เมื่อตรวจยืนยันความจำเพาะต่อชนิดเชื้อมาลาเรียอีกครั้งโดยวิธี Western blot พบว่าให้ผลสอดคล้องกับวิธี IFA เป็นอย่างดี

วิจารณ์ผล

การวิจัยเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน pLDH ได้ใช้โปรตีนจาก 2 แหล่ง คือ โปรตีนธรรมชาติและโปรตีนสังเคราะห์ จุดมุ่งหมายของการวิจัยครั้งนี้เพื่อค้นหาและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟิลิปปาร์มและต่อเชื้อมาลาเรียสปีชีส์อื่น ๆ (Pan malaria species) ผลการวิจัยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้โปรตีนธรรมชาติเป็นแอนติเจนได้ผลผลิตค่อนข้างน้อยและเป็น IgM class ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้โปรตีนสังเคราะห์เป็นแอนติเจนได้ผลผลิตมากกว่าถึง 3 เท่า แต่โปรตีนที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ใช้โปรตีน pLDH ที่ติดฉลากกับ GST ให้ผลผลิตของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็น IgM class เช่นกัน ยกเว้นกลุ่มที่ใช้โปรตีน pLDH-His ที่ให้ผลเป็น IgG1 ทั้งหมด ความแตกต่างกันใน

ลักษณะเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากลักษณะของแอนติเจนที่กระตุ้นให้ plasma cell ผลิต Ig class ที่แตกต่างกัน การวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จสามารถเปลี่ยน Ig class จาก IgM เป็น IgG ทำให้สามารถนำไปติดฉลากกับ colloidal gold ได้

หลังจากเลือกโคลนที่มี avidity และ affinity สูง มาทำ cloning อีก 3-4 รอบ โคลนส่วนใหญ่มาจากกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี นอกจากได้โคลนที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟิลิปปาร์มและชนิดอื่น (Pan malaria species) จำนวนหนึ่งแล้ว บางโคลนยังแสดงถึงความสามารถในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่ำกว่า 400 ตัว/ไมโครลิตร และบางโคลนสามารถยับยั้ง Shuffner's dot ของเชื้อชนิดไวแวกซ์ได้อย่างชัดเจน

อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ pLDH ที่ผลิตได้แตกต่างจากที่ผลิตได้โดยวิธีของ Piper⁽⁶⁾ ในส่วนความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อมาลาเรียที่นำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย⁽⁶⁾ และคือต่อยาด้านมาลาเรียหลายชนิดนอกเหนือไปจากชั้นตอนและวิธีการที่แตกต่างกันในรายละเอียดแล้ว จากการทดสอบหาความไวพบว่าปริมาณเชื้อมาลาเรีย 50-500 ตัว/ไมโครลิตรมีความไวใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 70)⁽⁶⁾

คุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้บางตัวมีลักษณะจำเพาะ เช่น มีความจำเพาะต่อ Shuffner's dot ของเชื้อมาลาเรียชนิดไวเวกซ์ และที่สำคัญที่สุดคือเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นภายในประเทศ สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ ลดการสูญเสียเงินตราซื้อผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศมาใช้ การวิจัยครั้งนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ติดต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและ Pan malaria spp. สามารถนำไปผลิตชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันคีนันแห่งเอเชียที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. วรชาติ ลิขรรณารณ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และรองศาสตราจารย์ ดร. มยุนา ศรีสุภนันท์ ภาควิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อความสำเร็จของการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณที่ปรึกษาจากต่างประเทศ คือ Professor Dr. John E. Hyde

จาก Department of Biomolecular Sciences, University of Manchester Institute of Science and Technology, Manchester, England, Professor Dr. Kelvin C. Kain จาก Division of Infectious Diseases, University of Toronto, Canada และ Professor Dr. Vergilio E do Rosario จาก Institute de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova De Lisboa

เอกสารอ้างอิง

1. กองมาลาเรีย. กรมควบคุมโรคติดต่อ. รายงานประจำปี พ.ศ. 2546. น. 11-27.
2. World Health Organization. The revised malaria control strategy for Southeast Asia Region: Draft, Roll Back Malaria; 2006. pp. 3-25.
3. Vander JDL, Hunsaker LA, Campos NM, Baack BR. D- lactate production in erythrocyts infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 42: 277-84.
4. Makler MT, Ries JM, Williams JA, et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 48: 739-41.
5. Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 205-10.
6. Piper R, Lebras J, Wentworth L, et al. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 109-18.
7. Thaithong S, Suebinwong T, Beale GH. Enzyme typing of some isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75: 268-70.
8. Goding JW. Antibody production by hybridoma. *J Immunol Method* 1980; 39: 285.
9. Harlow E, Lane D. Antibodies, a laboratory manual 1989. Cold Spring Harbor Laboratory, 139-243.
10. Trager W and Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193: 673-5.



11. Lambros C and Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979; 65: 418-20.
12. Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Aley SB, Cabantchik ZI. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum* : association with parasite development. *J Cell Physiol* 1985; 125: 521-7.
13. Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement of the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
14. Tharavanij S, Tanpradist S, Chongsa-Nguan M, Prasertsiroj V. Comparison of various serological test results using antigens from different strains of *Plasmodium falciparum*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1982; 13: 174-80.
15. พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, คณิงนิจ คงพ่วง, ชัยพร โรจนวัฒน์ศิริเวช และคณะ การพัฒนาชุดตรวจ Dot-ELISA ในการทำ Sero-epidemiology เพื่อใช้เป็นระบบเตือนภัยการแพร่ระบาดของไข้มาลาเรียในประเทศไทย. เอกสารการสัมมนาทางวิชาการป้องกันควบคุมโรคแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2549 ระหว่างวันที่ 21-23 มิถุนายน 2549 ณ โรงแรมปรินทร์พาเลส มหานคร กรุงเทพมหานคร, หน้า 147-8.
16. ทศนิยม สกุดดำรงศพานิช. โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิต. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย 2541. หน้า 48-51.
17. Tanpradist S, Tharavanij S, Yamogkul P, Bualombai P, Wongchotigul V, Singhasivanon P. Comparison between microscopic examination, ELISA and quantitative buffy coat (QBC) analysis in the diagnosis of falciparum malaria in an endemic population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990; 21: 534-40.
18. Faquet GB, Agee JF. A simple technique for the rapid enrichment of class and subclass hybridoma switch variants. *J Immunol Meth* 1993; 165: 217-24.



Serosurveillance of emerging infectious diseases in Nongbualumpoo Province, 2005

Sasithorn Tangawat¹, Sompon Tasaniyom², Paiboon Kanchanabat³,
Somkid Chantee¹, Srisawad Promsaeng³, Cherdchai Kaewpa¹,
Chaochuen Cheawkarnrop³, Sutassanee Vimonses⁴

¹Disease Control Office No. 6, Khonkaen, ²Faculty of Medicine, Khonkaen University,

³Public Health Office, Nongbualumpoo Province, ⁴Medical Science Center, Khonkaen

Abstract

The objective of this descriptive study was to confirm the diagnosis of the emerging infectious diseases (EID) in Nongbualumpoo province. Studied population was patients who were diagnosed of EID by using the definition established by the CUPs in the province including Dengue infection, Encephalitis, Leptospirosis, Scrub Typhus and Murine Typhus. The study was conducted during April to September 2005. Blood was drawn from patients fitted with the inclusion criteria by two occasions at 2-weeks interval. One hundred and one patients were recruited in this study. Of these, 91 pair serum were examined. Fifty-two patients were male and 39 were female. Mean age was 17.3 years and 43.4% was in 10-19 years age group. There was no report of encephalitis and Murine Typhus. Laboratory results of these 91 serum pairs revealed that 42.9% was acute primary dengue infection, 4.4% was acute secondary dengue infection, 2.2% was acute primary or secondary dengue infection and 12% was recent secondary dengue infection. 38.5% was non dengue infection. Dengue serotypes 1 and 4 were found in 18 and 1 patients, respectively. One of 8 patients diagnosed of Scrub typhus was confirmed as acute primary dengue infection, the rest was negative for antibody to Scrub typhus. Of the 13 patients diagnosed of Leptospirosis, two were also confirmed as acute primary dengue infection. Dengue surveillance, prevention and control are important strategies to reduce dengue disease burden at present and in the future.

Key words: Serosurveillance, Emerging infectious disease, Nongbualumpoo Province



การเฝ้าระวังโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ของห้องปฏิบัติการ ของโรงพยาบาลในจังหวัดหนองบัวลำภู ปีพ.ศ. 2548

¹ศศิธร ตั้งสวัสดิ์, ²สมพนธ์ ทศนิยม, ³ไพบูรณ์ กาญจนบัตร, ¹สมคิด จันท์,
¹ศรีสวัสดิ์ พรหมแสง, ¹เชิดชัย แก้วปา, ³เขาวนัชนัน เขียวการรบ, ⁴สุทัศนีย์ วิมลเศรษฐ์
¹สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 ขอนแก่น, ²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
³สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดหนองบัวลำภู, ⁴ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ขอนแก่น

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวินิจฉัยโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่โดยใช้ผลชันสูตรทางห้องปฏิบัติการและศึกษาผลการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ในพื้นที่จังหวัดหนองบัวลำภู เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา ประชากรศึกษาได้แก่ผู้ป่วยที่มารับบริการด้วยกลุ่มอาการของโรคที่เฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของ CUP ในจังหวัดหนองบัวลำภู ได้แก่กลุ่มโรคไข้เลือดออก, ไข้สมองอักเสบ, Leptospirosis, Scrub Typhus ระยะเวลาเก็บข้อมูลตั้งแต่เดือนเมษายน-กันยายน 2548 ดำเนินการโดยเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการสงสัยตามโรคที่เฝ้าระวัง 2 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ ผลการศึกษามีผู้ป่วยที่เข้ากับกลุ่มโรคที่เฝ้าระวังทั้งสิ้น 101 ราย เก็บตัวอย่างเลือดครบทั้ง 2 ครั้งได้จำนวน 91 ราย เป็นเพศชาย 52 ราย เพศหญิง 39 ราย อายุมากที่สุด 73 ปี น้อยที่สุด 1 ปี อายุเฉลี่ย 17.34 ปี กลุ่มอายุ 10-19 ปี มีรายงานมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 43.4 ไม่มีรายงานผู้ป่วยที่สงสัยมีอาการสมองอักเสบและผู้ป่วยที่สงสัย Murine typhus จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมด 91 ราย ได้ส่งตรวจยืนยันโรคไข้เลือดออกทุกราย ได้ผลดังนี้คือ พบ acute primary dengue infection ร้อยละ 42.9, acute secondary dengue infection ร้อยละ 4.4, acute primary or secondary dengue infection ร้อยละ 2.2, recent secondary dengue infection ร้อยละ 12 และ non-dengue infection ร้อยละ 38.5 พบ dengue serotype 1 จำนวน 18 ราย และ dengue serotype 4 จำนวน 1 ราย พบว่าผู้ป่วยที่สงสัยสครับไทฟัสจำนวน 8 ราย ตรวจระดับภูมิคุ้มกันเป็นลบทั้งหมด แต่มี 1 รายที่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็น acute primary dengue infection และผู้ป่วยที่สงสัยโรคลีทนู (Leptospirosis) จำนวน 13 ราย ตรวจระดับภูมิคุ้มกันเป็นลบทั้งหมดเช่นกัน มีผู้ป่วย 2 รายที่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็น acute primary dengue infection การศึกษาค้นคว้านี้พบว่ากลุ่มโรคไข้เลือดออกเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด ดังนั้นการดำเนินการเฝ้าระวังเพื่อวางแผนป้องกันและควบคุมโรคควรดำเนินการอย่างต่อเนื่องเพื่อลดปัญหาของโรคไข้เลือดออกในพื้นที่

คำรหัส: การเฝ้าระวังทางซีโรโลยี, โรคอุบัติใหม่, จังหวัดหนองบัวลำภู

บทนำ

โรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่เป็นคำภาษาไทยที่เรียกกันโดยรวม ทั้งคำว่าโรคติดต่ออุบัติใหม่ (emerging) และโรคติดต่ออุบัติซ้ำ (re-emerging) ตามความหมายขององค์การอนามัยโลกที่ได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โรคติดต่ออุบัติใหม่หมายถึงโรคติดต่อที่มีอุบัติการณ์ในคนเพิ่มขึ้นในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาหรือมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นในอนาคตอันใกล้ ส่วนโรคติดต่ออุบัติซ้ำหมายถึงโรคติดต่อที่กลับมาเป็นปัญหาใหม่หรือโรคที่เคยพบแล้วหายไปหลังจากที่อุบัติการณ์ของโรคลดลงในระดับหนึ่งหรือหายไปจนถือว่าไม่เป็นปัญหาสำคัญอีกต่อไป

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ (emerging infectious disease: EID) ถูกค้นพบมากกว่า 30 โรค เช่น ไวรัสเอชไอวี โรคไข้เลือดออกจากเชื้อไวรัส Ebola โรคอุจจาระร่วงจาก Rota virus ไข้หวัดนก โรคซาร์ โรคตับอักเสบชนิด C และ E โรคมือเท้าปาก เป็นต้น^(1,2)

โรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ในประเทศไทยเช่นโรคไข้ปวดข้อมือออกผื่น (Chikungunya infection) มีรายงานการเกิดโรคตั้งแต่ปีพ.ศ. 2501 แล้ว แต่การเกิดโรคในครั้งนั้นมีประปรายร่วมกับการระบาดของโรคไข้เลือดออก ต่อมาในปี พ.ศ. 2519 มีการระบาดที่จังหวัดปราจีนบุรี พ.ศ. 2534 ระบาดในจังหวัดขอนแก่น พ.ศ. 2538 ระบาดในจังหวัดนครศรีธรรมราชและจังหวัดหนองคาย โรคเลปโตสไปโรซิสที่เกิดการระบาดในจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดบุรีรัมย์ หลังน้ำท่วมใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อเดือนสิงหาคมถึงกันยายน พ.ศ. 2539 พบผู้ป่วยอาการไข้สูง ปวดศีรษะอย่างรุนแรง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อโดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่อง บางรายมีอาการตาแดงจัด บางรายมีอาการตาเหลือง ตัวเหลืองร่วมด้วย⁽³⁾

นอกจากนี้โรคอุบัติใหม่ เช่น ไข้หวัดนกในคนที่มีการระบาดจากสัตว์ปีกมาสู่คน ในประเทศไทย เฉพาะในปีพ.ศ. 2547 มีผู้ป่วยยืนยันเป็นโรคไข้หวัดนก รวม 17 รายใน 12 จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี (3 ราย) กาญจนบุรี สุโขทัย และกำแพงเพชร (จังหวัดละ 2 ราย) ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ นครราชสีมา ปทุมธานี และขอนแก่น (จังหวัดละ 1 ราย)⁽⁴⁾

โรคมือเท้าปากเป็นโรคที่พบได้บ่อยในเด็กต่ำกว่า 10 ขวบ (HFMD) โดยเฉพาะเด็กก่อนวัยเรียน HFMD เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม enteroviruses ชนิดที่พบได้บ่อยคือกลุ่ม coxsackievirus A16 ระยะเวลาที่มีรายงาน HFMD ซึ่งเกิดจากกลุ่ม enterovirus 71 หรือกลุ่ม enterovirus อื่น ๆ ปีพ.ศ. 2540 ประเทศมาเลเซียมีรายงานเด็กป่วยด้วย HFMD 2,628 ราย เสียชีวิต 29 ราย ซึ่งมีอาการสมองอักเสบร่วมกับมีภาวะ pulmonary edema and haemorrhage ในปีพ.ศ. 2543 มีรายงานการระบาดที่ประเทศสิงคโปร์ 408 ราย เด็กเล็กเสียชีวิต 4 รายจากภาวะ pulmonary edema, cardiac arrhythmia คาดว่าเกิดจากกลุ่ม enterovirus 71

เนื่องจากโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ โดยเฉพาะโรคที่พบใหม่ ๆ มักจะมีอาการที่ผู้ให้การรักษาไม่เคยพบเห็นมาก่อน หรือโรคที่เคยเกิดขึ้นสมัยก่อน ต่อมาสามารถควบคุมได้จนโรคเกือบจะสงบหายไป แล้วกลับมาเกิดการระบาดครั้งใหม่ จึงดูเหมือนเป็นโรคที่แปลกใหม่ที่มิคุ้นเคยมาก่อน เช่นเดียวกับแพทย์หรือผู้ให้การรักษาจึงไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้ทันที หรือไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้ในระยะเวลาสั้น ๆ ดังนั้นการที่จะหยุดยั้งการแพร่ระบาดและการลุกลามของโรคในพื้นที่ นอกจากจะต้องมีระบบการเฝ้าระวัง การรายงาน การสอบสวนโรคที่ดีแล้วการวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องและรวดเร็วจากห้องปฏิบัติการจะช่วยสนับสนุนแพทย์ที่ดูแลรักษาผู้ป่วยเหล่านั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ เจ้าหน้าที่สาธารณสุขที่เกี่ยวข้องสามารถวางแผนควบคุมป้องกันโรคที่เป็นปัญหาใหม่ในพื้นที่นั้นอย่างมีประสิทธิภาพ

โรคติดต่ออุบัติใหม่หรืออุบัติซ้ำ มีการจัดการในลักษณะโครงการเฝ้าระวังป้องกันและควบคุมโรค โดยมีองค์ประกอบหลัก 3 อย่าง คือ การเฝ้าระวังโรค (surveillance) การจัดการผู้ป่วย (case management) และการป้องกันควบคุมโรค (prevention and control)

การเฝ้าระวังโรค (surveillance) เป็นองค์ประกอบสำคัญที่สุด ประกอบด้วย การรายงานผู้ป่วย การเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ การเฝ้าระวังการดื้อยาต้านจุลชีพ และควรรขยายไปถึงการเฝ้าระวังทางสิ่งแวดล้อมและพฤติกรรมด้วย



โรคติดต่ออุบัติใหม่หรืออุบัติซ้ำหลายโรค เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ดังนั้นเครือข่ายการเฝ้าระวังโรคต้องมีการเชื่อมโยงกับกรมปศุสัตว์ รวมทั้งการพัฒนาทางห้องปฏิบัติการไปด้วย

การจัดการผู้ป่วย (case management) มีการปรับปรุงเรื่องการวินิจฉัยและรักษา การแยกผู้ป่วยที่ติดเชื้อรุนแรง การเตรียมอุปกรณ์และบุคลากรด้านต่าง ๆ ให้พร้อม

การป้องกันควบคุมโรค (prevention and control) โดยมีระบบการป้องกัน ควบคุม และมีวิธีการดำเนินงานที่เข้มแข็งและเหมาะสม⁽⁵⁾

โรคไข้เลือดออก เป็นโรคที่มีรายงานในประเทศไทยประมาณ 40 กว่าปีที่ผ่านมา ปัจจุบันถือเป็นโรคอุบัติซ้ำ โรคไข้เลือดออกที่พบในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียงในเอเชียอาคเนย์ เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี จึงเรียกชื่อว่า dengue haemorrhagic fever (DHF) เชื้อไวรัสเดงกีเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ปัจจุบันมีทั้งหมด 4 ชนิด บางท่านอาจเรียกว่า 4 สายพันธุ์หรือใช้ทับศัพท์ว่า 4 ซีโรทัยป์ ประกอบด้วย DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 ทั้ง 4 ซีโรทัยป์นี้ ถ้ามีการติดเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วจะมีภูมิคุ้มกันต่อชนิดนั้นไปตลอดชีวิต (permanent immunity) แต่จะมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีชนิดอื่น ๆ อีก 3 ชนิดได้ในช่วงสั้น ๆ (partial immunity) ประมาณ 6-12 เดือน หลังจากนั้นจะมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิดอื่น ๆ ที่ต่างจากครั้งแรกได้ เป็นการติดเชื้อซ้ำ (secondary dengue infection) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคไข้เลือดออกเดงกี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทำการเฝ้าระวังซีโรไลย์ของสายพันธุ์ไข้เลือดออกเดงกีของผู้ป่วยในประเทศไทย (พ.ศ. 2516-2547) พบว่าสายพันธุ์ที่ 2 (DEN-2) พบได้ตลอดเวลา ส่วนสายพันธุ์ที่ 1 (DEN-1) สายพันธุ์ที่ 3 (DEN-3) และสายพันธุ์ที่ 4 (DEN-4) อาจหายไปเป็นช่วง ๆ สัดส่วนของเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ชนิด จะแตกต่างกันไปในแต่ละปี ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาพบว่าสายพันธุ์ที่ 3 เริ่มพบมากขึ้นในประเทศไทย และในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาพบน้อยลง เริ่มพบสายพันธุ์ที่ 4 เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในปีพ.ศ. 2547 และ 2548 เริ่มมีรายงานสายพันธุ์ที่ 4 มากขึ้น ประมาณร้อยละ 25 ของทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งแต่เดิมพบประมาณร้อยละ 5-10 เท่านั้น ที่มีคนเรียกว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่นั้นเอง การที่มีรายงานสายพันธุ์ที่แตกต่างไปจากเดิมมีความสำคัญเพราะจากการศึกษาด้านไวรัสและระบาดวิทยา พบว่าปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออก

เดงกีคือมีไวรัสเดงกีชุกชุมมากกว่า 1 ชนิด หรือมีการระบาดของต่างชนิดเป็นระยะ ๆ ซึ่งในพื้นที่ที่มีประชากรหนาแน่น ทำให้มีการติดเชื้อซ้ำได้บ่อย และประชากรในพื้นที่ที่ยังไม่มีภูมิคุ้มกันต่อสายพันธุ์ที่เปลี่ยนไป ทำให้มีโอกาสเกิดการระบาดของไข้เลือดออกเดงกีได้มากกว่าเดิม⁽⁶⁾

ปัจจัยที่สำคัญมากอย่างหนึ่งในการเตรียมพร้อมรับสถานการณ์โรคติดต่ออุบัติใหม่หรืออุบัติซ้ำคือการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการเพื่อที่จะสามารถวินิจฉัยการติดเชื้อที่เกิดขึ้นใหม่ได้อย่างทันท่วงทีและสามารถติดตามการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้สำหรับโรคติดเชื่อนั้นอาจแบ่งออกเป็นกลุ่มตามเทคนิคที่ใช้ ได้แก่⁽⁷⁾

การเพาะเชื้อ: จุลชีพแต่ละชนิดมีความยากง่ายและเงื่อนไขความสำเร็จของการเพาะเชื้อที่แตกต่างกัน แบคทีเรียทั่วไปเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงง่ายและมักใช้วิธีนี้ในการตรวจวินิจฉัย ส่วนเชื้อไวรัส รา และ มัยโครแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงได้ยากกว่าและใช้เวลานานกว่า จึงอาจจำเป็นต้องใช้เทคนิคใหม่ ๆ เข้าช่วย อย่างไรก็ตามการเพาะเชื้อชนิดใหม่ มีข้อดีที่สามารถได้ตัวเชื้อไปศึกษารายละเอียด และคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป เช่น การดื้อยา เป็นต้น

ประเด็นที่จะต้องให้ความสนใจในการเพาะเชื้อสำหรับเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำคือความปลอดภัย เนื่องจากเชื้ออาจมีอันตรายร้ายแรงต่อผู้ปฏิบัติงาน และการที่เป็นเชื้อชนิดใหม่ที่ไม่มี การแพร่หลายมากนัก การหลุดรอดของเชื้อออกจากห้องปฏิบัติการอาจทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อและเกิดการระบาด

ได้มีการกำหนดเกณฑ์ความปลอดภัยกำกับกับการปฏิบัติงานกับเชื้อต่าง ๆ เป็น 4 ระดับ ซึ่งจะต้องปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด ห้องปฏิบัติการที่ไม่พร้อมควรส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อม

การตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา: ได้แก่ การตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและเหมาะที่จะใช้ในการวินิจฉัยและเฝ้าระวังโรค เพราะสามารถใช้กับตัวอย่างจำนวนมากได้ ต้นทุนไม่สูงนัก ปัญหาสำหรับเชื้ออุบัติใหม่คือ หากเป็นเชื้อใหม่ที่ไม่เคยมีการผลิตชุดน้ำยาตรวจมาก่อน หรือไม่มีแอนติเจน หรือแอนติบอดีเตรียมไว้ การตรวจด้วยวิธีนี้จะไม่สามารถทำได้ การเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญ นอกจากจะต้องเร่งพัฒนาชุด



ตรวจสอบสำหรับโรคติดเชื้ออุบัติใหม่หรืออุบัติซ้ำที่เป็นปัญหา แล้วยังต้องสร้างความพร้อมให้ห้องปฏิบัติการที่จะสามารถผลิตแอนติเจนของเชื้อชนิดใหม่ที่อุบัติขึ้นได้ในเวลาอันรวดเร็ว เพื่อที่จะใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี เพื่อติดตามเฝ้าระวังการระบาดอย่างทันทั่วถึง

การตรวจด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา: หรือการตรวจหากรดนิวคลีอิกของจุลชีพซึ่งส่วนใหญ่ เป็นการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกจำเพาะ เช่น วิธี PCR, NASBA, LCR มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถดัดแปลงเพื่อให้มีความเหมาะสมกับเชื้อต่าง ๆ ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ไม่ยากนัก จึงทำให้สามารถสร้างวิธีการตรวจสำหรับเชื้อชนิดใหม่ได้ค่อนข้างง่ายกว่าวิธีอื่น ทั้งนี้เนื่องจากความก้าวหน้าทางอนุชีววิทยา ทำให้สามารถทราบลำดับเบสบางส่วนของจุลชีพได้ค่อนข้างรวดเร็ว นำไปสู่การออกแบบการตรวจหากรดนิวคลีอิกของจุลชีพนั้นได้รวดเร็วกว่าการพัฒนาการตรวจทางอิมมูโนวิทยา นอกจากนี้วิธีอณูชีววิทยายังมีบทบาทสำคัญในการแบ่งกลุ่มจุลชีพออกเป็น genotype ต่าง ๆ ซึ่งเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุล นอกจากการใช้ลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนแล้วยังอาจใช้วิธีอื่น ๆ ที่ทำได้ง่ายกว่า เช่น restriction pattern, PCR typing, hybridization ด้วย type-specific probe, heteroduplex mobility assay เป็นต้น⁽⁷⁾

วัสดุและวิธีการ

นิยามศัพท์ที่ใช้ในการศึกษา: โรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ หมายถึงโรคติดต่อที่มีอุบัติการณ์ในคนที่เพิ่มขึ้นในอนาคตรันใกล้ ตลอดจนโรคติดต่อที่กลับมาเป็นปัญหาใหม่ภายหลังจากที่อุบัติการณ์ของโรคนั้น ๆ ลดลงหรือหายไปจนถือว่าไม่ เป็นปัญหาสำคัญ

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษากลุ่มโรคไข้สมองอักเสบ โรค ไข้เลือดออก โรคฉี่หนู โรคสครับทัยฟัส/มิวรินทัยฟัส

สำนักระบาดวิทยาได้นิยามผู้ป่วยที่เข้าข่ายมีอาการ สงสัยโรคอุบัติใหม่ (EID) ดังต่อไปนี้

1. โรคไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis) ผู้ป่วยที่มีอาการและอาการแสดงดังนี้ มีไข้ ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียนนำมาก่อน 2-4 วัน (อาจพบมี

สภาพการณ์ปัจจุบันมีการปรับเปลี่ยนระบบบริการ สุขภาพตามนโยบายหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า ทำให้ โครงสร้างการบริการสุขภาพเปลี่ยนไป มีหน่วยบริการทั้งภาค รัฐ เอกชน และโรงพยาบาลนอกสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ได้มาเป็นหน่วยคู่สัญญาจัดบริการปฐมภูมิในพื้นที่รับผิดชอบ และให้บริการสุขภาพในทุกกิจกรรม จึงจำเป็นต้องมีระบบการ เฝ้าระวังโรคให้ครอบคลุม เพื่อเตรียมรับสถานการณ์โรคติดต่อ ที่เป็นปัญหาดังกล่าว ฉะนั้นการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ หรือการส่งต่อตัวอย่างจากผู้ป่วยไปยังห้องปฏิบัติการที่สามารถ ตรวจได้ หรือมีศักยภาพสูงกว่า จึงมีความสำคัญยิ่งเพื่อใช้ เป็นเครื่องมือในการตรวจหาโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่ใน พื้นที่ได้อย่างรวดเร็ว ครอบคลุม และสามารถควบคุมการ แพร่ระบาดของโรคได้อย่างทันทั่วถึงและมีประสิทธิภาพ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จึงได้ศึกษานำร่องในพื้นที่ เขต 6 จังหวัดหนองบัวลำภู เพื่อวินิจฉัยโรคติดต่อที่เป็น ปัญหาใหม่ โดยใช้ผลชันสูตรทางห้องปฏิบัติการและศึกษา ผลการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อที่เป็นปัญหา ใหม่

น้ำมูกหรือไอร่วมด้วย) หลังจากนั้นจะพบการเปลี่ยนแปลง ทางระดับความรู้สึกตัว เช่น ซึม สับสน พฤติกรรมเปลี่ยน หรือไม่รู้สึกรู้ตัว นอกจากนี้อาจมีอาการชักทั้งตัวหรือเฉพาะที่ แขนขาอ่อนแรงหรือมีอาการเซร่วมด้วย

2. โรคไข้เดงกี (dengue fever) ไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever) ไข้เลือดออกช็อก (dengue shock syndrome)

ไข้เดงกี: ผู้ที่มีอาการไข้สูง ปวดศีรษะอย่าง รุนแรง ปวดกระบอกตา กล้ามเนื้อ กระดูกหรือข้อต่อ มีผื่น มี เลือดออกตามผิวหนัง อาจตรวจพบ tourniquet test ให้ผลบวก

ไข้เลือดออก: ผู้ที่มีอาการคล้ายไข้เดงกี แต่จะ มีการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต บางรายอาจมี



อาการช็อค คือ กระสับกระส่าย เหงื่อออก ตัวเย็น ไม่ปัสสาวะ เป็นเวลานาน ถ้าไม่ได้รับการรักษาอาจเสียชีวิตภายใน 12 - 24 ชั่วโมง

ใช้เลือดออกช็อค: ผู้ป่วยใช้เลือดออกที่มีภาวะ ความดันโลหิตลดลงต่ำลง

3. โรคสครับทัยฟัส (scrub typhus) ผู้ที่มีไข้ เจ็บพื้น ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว ปวดกระบอกตา ตาแดง ค่อมน้ำเหลืองโตและเจ็บ โดยเฉพาะที่อุ้งมือ ๗ กับแผล (eschar) อาจมีไธแห่ง มักพบผื่น (maculopapular) และหายเองใน 2-3 วัน อาจพบแผลเหมือนนุหรีจี้ (eschar) ได้ตามร่มผ้า เช่น รักแร้ ขาหนีบ ในรายที่อาการรุนแรง เช่น ซึม สมองอึกเสบ ปอดบวม ตัวและตาเหลือง ผู้ป่วยมักมี ประวัติเที่ยวหรือเข้าไปในทุ่งหญ้าหรือป่า 6-18 วันก่อนมี อาการ

4. โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) ผู้ป่วยมีอาการและอาการแสดงดังนี้ ไข้สูง หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้อ อย่างรุนแรง โดยเฉพาะบริเวณขาและน่อง ตาแดง (หลอด เลือดแดงแผ่เป็นตาข่าย) ไธแห่งหรือมีเสมหะปนเลือด บาง รายอาจมีอาการทางประสาท เช่น ปวดศีรษะชนิดรุนแรง คอแข็ง การรับรู้สติเปลี่ยนแปลง หากรุนแรงอาจมีอาการไต วาย ปัสสาวะออกน้อยหรือไม่ออก การหายใจล้มเหลว อาจมี ภาวะ refractory hypoxemia อาการดีซ่าน หรือเลือดออก ผิดปกติตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น อาเจียนเป็นเลือด ถ่ายอุจจาระ เป็นสีดำ ไธเป็นเลือดสด

รูปแบบการศึกษา เป็นการวิจัยเชิงสำรวจ

ประชากรศึกษา: ได้แก่ผู้ป่วยที่มารับบริการด้วยกลุ่ม อาการของโรคที่ต้องเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของ CUP ในจังหวัดหนองบัวลำภู

หน่วยของการวิเคราะห์: CUP รพช., CUP โรงพยาบาล ทั่วไปในจังหวัดหนองบัวลำภู

ขอบเขตการวิจัย: ดำเนินการเฉพาะโรงพยาบาลใน จังหวัดหนองบัวลำภู ระยะเวลาเก็บข้อมูลตั้งแต่เมษายน- กันยายน พ.ศ. 2548

ขั้นตอนการดำเนินการ

1. **ขั้นเตรียมพื้นที่วิจัย:** สคร. 6 ขอนแก่น ทำหนังสือ ขอความร่วมมือถึงนายแพทย์สาธารณสุข จังหวัดหนองบัวลำภู

ทีมวิจัยจาก สคร. 8 จัดประชุมชี้แจงผู้เกี่ยวข้องเกี่ยวกับ หลักเกณฑ์และขั้นตอนการเก็บข้อมูลและตัวอย่างจากผู้ป่วย ที่สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย ที่มีอายุมากกว่า 2 ปีที่ได้รับการวินิจฉัยโรคตามนิยามข้างต้น

2. **ขั้นดำเนินการ:** เจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาล เมื่อพบ ผู้ป่วยที่เข้าหลักเกณฑ์ของโรคติดต่อที่ต้องเฝ้าระวังทางห้อง ปฏิบัติการตามค่านิยาม จะอธิบายและขออนุญาตผู้ป่วย เมื่อได้รับคำยินยอมแล้วจะให้ผู้ป่วยลงลายมือชื่อในแบบ แสดงความยินยอมเป็นหลักฐาน เจ้าหน้าที่ลงรายละเอียด ในแบบส่งตัวอย่าง แล้วดำเนินการเก็บตัวอย่างส่งตรวจ นำ ตัวอย่างที่เก็บแล้วแช่ในตู้เย็น

คณะผู้วิจัยดำเนินการเก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาล ต่าง ๆ ที่ตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี dengue capture ELISA และตรวจซีโรทัยป์ด้วยวิธี RT-PCR จัดทำสรุปผลการดำเนินงาน รายงานให้จังหวัดทราบ และจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์ เมื่อสิ้นสุดโครงการ

ประเด็นด้านจริยธรรม

จัดให้มีเจ้าหน้าที่อธิบายรายละเอียดของโครงการ ผู้ป่วยมีสิทธิเลือกที่จะเข้าหรือไม่เข้าร่วมโครงการตามความ สมัครใจ ผู้เข้าร่วมโครงการต้องลงลายมือชื่อเป็นหลักฐาน ผู้ที่ไม่สามารถลงลายมือชื่อได้ ต้องได้รับความเห็นชอบจาก ผู้ปกครองก่อน

กรณีต้องเจาะเลือด ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่สาธารณสุข ที่มีใบอนุญาตให้เจาะเลือดจากผู้ป่วยได้ด้วยอุปกรณ์ปลอดเชื้อ ที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง

เก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 5 มล. ซึ่งต้องไม่กระทบต่อ ระบบไหลเวียนโลหิตของผู้ป่วย เลือดที่ได้จะใช้ในโครงการนี้ เท่านั้น ไม่นำไปใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นที่ผู้ป่วยไม่ได้ให้ความ ยินยอม ตัวอย่างหากมีเหลือก็จะเก็บรักษาไว้ในที่ปลอดภัย มี คณะกรรมการดูแล จะนำไปใช้ได้ก็ต่อเมื่อคณะกรรมการ จริยธรรมให้ความเห็นชอบแล้วเท่านั้น

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ใช้สถิติเชิงพรรณนา เช่น จำนวน ร้อยละ และอัตรา ส่วนของแต่ละโรคที่ศึกษา

ผลการศึกษา

จากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในจังหวัดหนองบัวลำภูตั้งแต่เดือนเมษายน-กันยายน พ.ศ. 2548 พบว่าผู้ป่วยมีอาการไข้เข้ากัมนิยามการเฝ้าระวังทั้งสิ้น 101 ราย สามารถเก็บซีรัมคู่ได้ครบจำนวน 91 ราย เป็นเพศชาย 52 ราย เพศหญิง 39 ราย อายุมากที่สุด 73 ปี น้อยที่สุด 1 ปี อายุเฉลี่ย 17.34 ปี กลุ่มอายุ 10-19 ปีมีรายงานมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 43.4 ดังแสดง ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงช่วงอายุผู้ป่วยจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ จังหวัดหนองบัวลำภู ปี พ.ศ. 2548

อายุ (ปี)	จำนวน	ร้อยละ
0-9	29	32.3
10-19	39	43.4
20-29	9	10.0
30-39	3	3.3
40-49	4	4.4
50-59	2	2.2
60-69	3	3.3
>70	1	1.1

แยกผลการวินิจฉัยตามนิยามที่กำหนดไว้ได้ ดังนี้ กลุ่มโรคไข้เลือดออกจำนวน 70 ราย เป็นเพศชาย 34 ราย เพศหญิง 36 ราย (ไข้เลือดออกช็อค 1 ราย) ผู้ป่วยที่สงสัยสกรับทัยฟัสจำนวน 8 ราย เป็นเพศชาย 5 ราย เพศหญิง 3 ราย ผู้ป่วยที่สงสัยโรคฉี่หนูจำนวน 13 ราย เป็นเพศชายทั้งหมด ไม่มีรายงานผู้ป่วยที่สงสัยอาการสมองอักเสบและผู้ป่วยที่สงสัย Murine typhus ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนผู้ป่วยจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ จังหวัดหนองบัวลำภู จำแนกตามการวินิจฉัย ปี พ.ศ. 2548

การวินิจฉัยเบื้องต้น	เพศชาย (ราย)	เพศหญิง (ราย)	รวม (ราย)	ร้อยละ
โรคไข้เลือดออก	34	36	70	76.9
โรคสกรับทัยฟัส	5	3	8	8.8
โรคฉี่หนู	13	0	13	14.3
รวม	52	39	91	100

รายงานส่วนใหญ่ (54 ราย) ได้รับมาจากโรงพยาบาลจังหวัดหนองบัวลำภูมากที่สุด และส่วนมากได้รับการวินิจฉัยว่าสงสัยจะเป็นไข้เดงกี

จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า ผู้ป่วยที่สงสัยสกรับทัยฟัสจำนวน 8 ราย ตรวจระดับภูมิคุ้มกันเป็นลบทั้งหมด แต่มี 1 รายที่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็น acute primary dengue infection และผู้ป่วยที่สงสัยโรคฉี่หนูจำนวน 13 ราย ตรวจระดับภูมิคุ้มกันเป็นลบทั้งหมดเช่นกัน และมีผู้ป่วย 2 รายที่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็น acute primary dengue infection

จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมด 91 ราย ที่ตรวจยืนยันโรคไข้เลือดออก ได้ผลดังนี้คือ พบ acute primary dengue infection ร้อยละ 42.9, acute secondary dengue infection ร้อยละ 4.4, acute primary หรือ secondary dengue infection ร้อยละ 22 recent secondary dengue infection ร้อยละ 12 และไม่ใช้การติดเชื้อไวรัสเดงกี ร้อยละ 38.5 ดังแสดงในตารางที่ 3



ตารางที่ 3 แสดงจำนวนผู้ป่วยจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ จังหวัดหนองบัวลำภู จำแนกตามชนิดของการติดเชื้อ ปี พ.ศ. 2548

ชนิดของการติดเชื้อ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
Acute primary dengue infection	39	42.9
Acute secondary dengue infection	4	4.4
Acute primary or secondary dengue infection	2	2.2
Recent secondary dengue infection	11	12.0
Not dengue infection	35	38.5
รวม	91	100

จากการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ในตัวอย่างซีรัมแรก (acute serum) พบเดงกีซีโรทัยปี 1 จำนวน 18 ราย และเดงกีซีโรทัยปี 4 จำนวน 1 ราย ในรายที่เป็นไข้เดงกีที่มีการซื้อค (DSS) จากผลการตรวจยืนยันเป็น acute primary dengue infection แต่ตรวจแยกซีโรทัยปีไม่พบ เมื่อแยกตามกลุ่มอายุ พบว่ากลุ่มอายุ 2-4 ปี พบ 3 ราย กลุ่มอายุ 5-9 ปี พบ 5 ราย กลุ่มอายุ 10-14 ปี พบ 7 ราย กลุ่มอายุ 15-19 ปี

พบ 1 ราย และกลุ่มอายุ 25-29 ปีพบ 3 ราย ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงช่วงอายุผู้ป่วยจากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการ จังหวัดหนองบัวลำภู ปี พ.ศ. 2548 แยกตามซีโรทัยปี

อายุ (ปี)	จำนวน	ร้อยละ
0-4	3	15.8
5-9	5	26.3
10-14	7	36.8
15-19	1	5.3
20-24	0	0
25-29	3	15.8
รวม	19	100

วิจารณ์ผล

จากการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการในจังหวัดหนองบัวลำภู ในครั้งนี้ มีรายงานผู้ป่วยตามเกณฑ์การเฝ้าระวังทั้งสิ้น 101 ราย เก็บตัวอย่างซีรัมคู่ได้ 91 ราย คิดเป็นร้อยละ 90

ปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้เกิดโรคแบบ DHF ที่สำคัญคือ การที่พื้นที่มีเชื้อไวรัสเดงกีชุกชุมและมีมากกว่าหนึ่งชนิดในเวลาเดียวกัน หรือมีการระบาดทีละชนิดตามกันในเวลาที่เหมาะสม เด็กมีความเสี่ยงมากกว่าผู้ใหญ่ ส่วนใหญ่จะเป็นเด็กที่เคยติดเชื้อมาแล้วครั้งหนึ่งและเป็นเด็กที่มีภาวะโภชนาการดี มีการศึกษาทางระบาดวิทยาที่แสดงว่าการติดเชื้อซ้ำด้วยชนิดที่ต่างจากการติดเชื้อครั้งแรกเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ เพราะส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยที่เป็น DHF เป็นผู้ติดเชื้อซ้ำ

การศึกษาที่โรงพยาบาลเด็กในปีพ.ศ. 2538-2542 พบว่าผู้ป่วยที่รับไว้ในโรงพยาบาลรวมผู้ป่วยไข้เดงกีและไข้เลือดออกร้อยละ 77.3 มีการติดเชื้อซ้ำ โดยในผู้ป่วยไข้เดงกี พบเป็นการติดเชื้อซ้ำร้อยละ 61.6 ผู้ป่วยไข้เลือดออกพบเป็นการติดเชื้อซ้ำร้อยละ 80.9 ส่วนผู้ที่เป็นไข้เลือดออก

เมื่อมีการติดเชื้อครั้งแรกมักเป็นในเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี ชนิดของไวรัสเดงกีที่เป็นครั้งที่ 1 และ 2 อาจมีความสำคัญเช่นเดียวกัน การศึกษาในประเทศคิวบาและประเทศไทย แสดงว่าการติดเชื้อครั้งที่ 2 ด้วย DEN-2 มีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเป็นไข้เลือดออก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเป็นการติดเชื้อตามหลังการติดเชื้อครั้งแรกด้วย DEN-1⁽¹⁰⁾

การเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการเป็นส่วนหนึ่งของงานเฝ้าระวังโรคที่ช่วยยืนยันและพยากรณ์แนวโน้มการระบาดของโรคในพื้นที่ได้ รวมทั้งช่วยในการวางแผนเพื่อการดำเนินงานป้องกันควบคุมโรคให้เกิดประโยชน์และประสิทธิภาพสูงสุด การที่มีห้องปฏิบัติการที่สามารถวินิจฉัยโรคได้รวดเร็วและทันการณ์ จะช่วยในการวางแผนการรักษาของแพทย์และผู้เกี่ยวข้องได้อย่างแม่นยำมากขึ้น เพราะฉะนั้นการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยที่ง่ายและปฏิบัติได้ในชุมชน เป็นทางหนึ่งที่จะทำงานเฝ้าระวังได้รวดเร็วมากขึ้นต่อไป



กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณนายแพทย์เกรียงศักดิ์ เวทีวุฒาจารย์ ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรค ที่สนับสนุนให้ทำการศึกษา นายแพทย์สัจชัย ปิยะพงษ์กุล นายแพทย์สาธารณสุขจังหวัดหนองบัวลำภู ที่อนุญาตให้ทำการศึกษาและให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี ผู้อำนวยการโรงพยาบาลจังหวัดหนองบัวลำภู ผู้อำนวยการโรงพยาบาลนากลาง ผู้อำนวยการโรงพยาบาลสุวรรณคูหา ผู้อำนวยการ

โรงพยาบาลศรีบุญเรือง ผู้อำนวยการโรงพยาบาลโนนสัง ผู้อำนวยการโรงพยาบาลวีระพลการแพทย์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ป่วยและผู้ปกครองทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. กองระบาดวิทยา. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการดำเนินงานทางระบาดวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 2542.
2. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. โรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่. ใน: ไพจิตร วราชาติ, บรรณาธิการ. คู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน; 2541.
3. กองระบาดวิทยา. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. แนวทางเฝ้าระวังและสอบสวนโรคติดต่อที่เป็นปัญหาใหม่. กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
4. ทวี โชติพิทยสุนนท์. โรคไข้หวัดนก. *แพทยสภาสาร* 2548; 34: 81-9.
5. ศุภมิตร ชุณหสวัณวิวัฒน์. กลยุทธ์การป้องกันและควบคุมโรค. ใน: โรคติดต่ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 2544. 269-70.
6. สำนักงานควบคุมโรคไข้เลือดออก. กรมควบคุมโรคติดต่อ. โรคไข้เลือดออกฉบับประกายประกาย. 2545.
7. ประเสริฐ เอื้อวรากุล. Laboratory Tools for Emerging Infectious Diseases. ใน: โรคติดต่ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2544; 281-2.
8. วิภาวี อุษาวัฒนากุล และคณะ. การตรวจวินิจฉัยแยกซีโรทัยป์ของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกในเขตพื้นที่ชายแดนไทย-ลาวด้วยวิธี NASBA. การประชุมวิจัยโรคติดต่อ นำโดยแมลงระดับชาติปี พ.ศ. 2547.
9. Nisalak A, Endy TP, et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973-1999. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 191-202.
10. ศิริเพ็ญ ภัลยานรจ และ สุจิตรา นิมมานนิตย์. แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคไข้เลือดออกเดงกี. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2548.



**Prevalence of Aedes mosquito in high risk areas
in Bangkok Metropolis in 2005**

**Pornpimol Kijnitinan, Sompis Oatwaree, Bunchuai Bunyun,
Nuttakit Klomkiew, Visut Kongchai, Kriengsak Rungsawang**

*Vector Control Sub-division, Disease Control Division, Department of Health,
Bangkok Metropolitan Administration*

Abstract

Dengue haemorrhagic fever (DHF) is one of the main public health problems in Thailand. According to the disease statistics, outbreak in Bangkok in 2005-2006 had been predicted. To prevent the outbreak, Bangkok Metropolitan Administration (BMA) then set up a policy to decrease House Index (HI) and morbidity of DHF. The objectives of this study were to study vector breeding places, density of Aedes larvae, vector species and evaluate the DHF vectors control project in 2005. The study was done during September - December 2005. Larval survey and identification were conducted in 189 communities (5,427 houses), 33 temples and 21 schools around the DHF patient's houses in Bangkok. Results revealed that community container Index (CI) was 13.69%. The highest positive containers were jar (essential use water container), miscellaneous, container under plant pot and cement container respectively. The average containers per house was 2.3. House Index of 1-10, 11-20, 21-30 and 91-100 were 21.16%, 20.11%, 18.52% and 1.89%, respectively. The HI of 0 was 7.41%. The successful rate (HI>10) was 28.57%. The temples CI was 12.86% and the schools CI was 9.09%. The majority species of the DHF vectors was *Aede aegypti*.

Key words: Dengue haemorrhagic fever, Aede mosquito, Bangkok Metropolitan Administration



การศึกษาความชุกชุมและชนิดของยุงลายในพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออกในเขตกรุงเทพมหานคร

พรพิมล กิจนิรันดร์, สมพิศ โอธวาริ, บุญช่วย บุญยีน,
ณัฐกฤต กลมเกลียว, วิสูตร กองชัย, เกรียงศักดิ์ รุ่งสว่าง
ฝ่ายสัตว์นำโรค กองควบคุมโรค สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและกรุงเทพมหานคร มีแนวโน้มว่าในปี พ.ศ. 2548 - 2549 จะมีการระบาดรุนแรง กรุงเทพมหานครมีนโยบายที่จะลดอัตราป่วยให้ต่ำกว่าเป้าหมายที่กำหนดไว้ จึงจำเป็นต้องลดความชุกชุมของยุงลายให้ต่ำสุด การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายที่มีความสำคัญสูงสุด ความชุกชุมของยุงลาย ชนิดของยุงลาย และประเมินผลโครงการกำจัดลูกน้ำยุงลาย ศึกษาาระหว่างเดือนกันยายน - ธันวาคม พ.ศ. 2548 โดยการสำรวจและเก็บลูกน้ำรวมทั้งตัวโม่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ จากบ้านผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก 266 ราย รวมทั้งรอบบ้านผู้ป่วย และ 40 ชุมชน รวม 189 ชุมชน 5,427 หลังคาเรือน วัด 33 แห่ง และโรงเรียน 21 แห่งในกรุงเทพมหานคร ผลการศึกษาพบว่าในชุมชน ภาชนะชั่งน้ำภายนอกบ้านที่พบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง (container index, CI) เท่ากับร้อยละ 14.76 ภาชนะภายในบ้าน CI ร้อยละ 10.89 เฉลี่ยร้อยละ 13.69 ภาชนะที่ต้องให้ความสำคัญมากที่สุด ได้แก่ โอ่งน้ำใช้ รองลงมาเป็นภาชนะอื่น ๆ งานรองกระถางต้นไม้ อย่างซิเมนต์ในท้องน้ำ ตามลำดับ เฉลี่ยมีภาชนะจำนวน 2.39 ภาชนะต่อบ้าน ความชุกชุมของลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง (house index, HI) ระหว่าง 1-10 สูงสุดร้อยละ 21.16 ระหว่าง 10-20 ร้อยละ 20.11 ระหว่าง 21-30 ร้อยละ 18.52 ระหว่าง 91-100 ร้อยละ 1.89 และเท่ากับ 0 ร้อยละ 7.41 ในวัด ภาชนะชั่งน้ำภายนอกอาคารที่พบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง CI ร้อยละ 18.86 ภายในอาคารร้อยละ 7.54 เฉลี่ย CI ร้อยละ 12.86 จำนวนภาชนะเฉลี่ยเท่ากับ 21 ภาชนะต่อวัด ภาชนะภายนอกอาคารที่สำคัญที่สุด ได้แก่ งานรองกระถางต้นไม้ ภาชนะอื่น ๆ เท่ากับ ร้อยละ 34.92, 23.80 และ 17.46 ตามลำดับ ภาชนะภายในอาคารที่ต้องให้ความสำคัญมากที่สุด ได้แก่ อย่างซิเมนต์ในท้องน้ำร้อยละ 92.60 ในโรงเรียน ภาชนะชั่งน้ำภายนอกอาคารที่พบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง CI ร้อยละ 9.77 ภาชนะภายในอาคารร้อยละ 8.77 เฉลี่ย CI ร้อยละ 9.04 จำนวนภาชนะเฉลี่ยเท่ากับ 30 ภาชนะต่อโรงเรียน ภาชนะภายนอกอาคารที่สำคัญมากที่สุด ได้แก่ ภาชนะอื่น ๆ งานรองกระถางต้นไม้ และอ่างน้ำ กะละมัง ร้อยละ 47.05, 29.41 และ 17.64 ตามลำดับ ภาชนะภายในอาคารที่ต้องให้ความสำคัญมากที่สุด ได้แก่ อย่างซิเมนต์ในท้องน้ำร้อยละ 92.50 ยุงลายที่พบในเขตกรุงเทพมหานครส่วนใหญ่เป็นยุงลายบ้าน รองลงมา ได้แก่ ยุงลายสวนซึ่งตรวจพบมีจำนวนน้อย ผลของโครงการกำจัดลูกน้ำยุงลายทำให้ HI ต่ำกว่า 10 เท่ากับร้อยละ 28.57

คำรหัส: โรคไข้เลือดออก ยุงลาย กรุงเทพมหานคร



บทนำ

โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เริ่มมีการระบาดใหญ่ครั้งแรกเมื่อปีพ.ศ. 2501 ในเขตกรุงเทพมหานครและธนบุรี ระยะ 5 ปี ต่อมา มีรายงานผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกกระบาดในจังหวัดที่มีการคมนาคมสะดวก ปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยเกิดขึ้นทุกตำบลของประเทศไทยรวมทั้งทุกพื้นที่เขตของกรุงเทพมหานคร และมีแนวโน้มจะมีการระบาดรุนแรงในปีพ.ศ. 2548-2549

โรคไข้เลือดออกเกิดจากเชื้อเด็งกีไวรัส มียุงลายเป็นพาหะนำโรค วิธีป้องกันและควบคุมโรคที่ได้ผลดีที่สุดคือการกำจัดลูกน้ำยุงลายและการควบคุมแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายในประเทศไทยพบยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก 2 ชนิด คือ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะหลักชอบเพาะพันธุ์ในภาชนะที่มนุษย์ทำขึ้น เช่น โอ่งน้ำ อ่างซิเมนต์ในห้องน้ำ จานรองขาตู้กันมด จานรองกระถางต้นไม้ แจกัน ยางรถยนต์ กระบอง และเศษภาชนะ เป็นต้น และมียุงลายสวน

(*Aedes albopictus*) เป็นพาหะรองเพาะพันธุ์ในแหล่งขังน้ำตามธรรมชาติ กาบใบของพืชที่สามารถขังน้ำได้ เช่น ต้นกล้วย พลับพลึง บอน ไพรงไม้ กระบองไม้ไฟ และกะลา เป็นต้น กรุงเทพมหานครมีนโยบายที่จะลดจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตด้วยโรคไข้เลือดออกโดยการป้องกันและควบคุมยุงลายด้วยการกำจัดลูกน้ำและยุงลายโดยวิธีต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทราบแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายและความสำคัญของแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายในเขตกรุงเทพมหานคร การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายที่มีความสำคัญสูงสุดเรียงตามลำดับ และเพื่อศึกษาความชุกชุมของยุงลาย ชนิดของยุงลาย house index (HI), container index (CI) และ Breteau index (BI) และเพื่อประเมินผลโครงการกำจัดลูกน้ำยุงลายและพิจารณาพื้นที่เสี่ยงสูงต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออก

วัสดุและวิธีการ

พื้นที่ศึกษาถูกกำหนดขึ้นจากการเข้าปฏิบัติงานในพื้นที่ซึ่งเป็นบ้านที่อยู่อาศัยของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกที่ได้รับรายงานในปีพ.ศ. 2548 และบ้านใกล้เคียงทุกหลังคาเรือนในรัศมี 50-100 เมตร ซึ่งกำหนดให้เป็นเขตควบคุมโรคในพื้นที่เหล่านี้จะได้รับการพ่นสารเคมีกำจัดยุงและใส่ทรายเคลือบสารเคมี (ที่มีฟอส) กำจัดลูกน้ำยุงลาย ภายหลังจากเก็บตัวอย่างลูกน้ำหรือตัวโม่งส่งตรวจ รวมทั้งสำรวจชุมชน วัด และโรงเรียนซึ่งอยู่ในเขตพื้นที่เสี่ยงต่อโรคไข้เลือดออก ดำเนินการระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2548 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2548

การดำเนินการในภาคสนาม

สุ่มสำรวจและเก็บตัวอย่างลูกน้ำ (larva) และตัวโม่ง (pupa) จากภาชนะขังน้ำในพื้นที่ศึกษาซึ่งเป็นบ้านผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกจำนวน 266 ราย และบ้านใกล้เคียงในรัศมี 50-100 เมตร จำนวน 149 ชุมชน รวมทั้งสำรวจบ้านในชุมชนชุมชนละ 10 หลังคาเรือนเป็นอย่างน้อย จำนวน 40 ชุมชนรวม 189 ชุมชน จำนวนทั้งหมด 5,427 หลังคาเรือน วัด 33 แห่ง และโรงเรียน 21 แห่ง บันทึกรายละเอียดการสำรวจลูกน้ำและตัวโม่ง และการเก็บตัวอย่างลูกน้ำและตัวโม่งลงในแบบฟอร์มเก็บตัวอย่างลูกน้ำและตัวโม่ง บางภาชนะเก็บเกิน 1 ตัวจากภาชนะขังน้ำ ใส่ขวดพลาสติกมีฝาปิด ติดสติ๊กเกอร์ระบุชนิดของภาชนะ สถานที่ และวัน เดือน ปีที่เก็บลูกน้ำและตัวโม่ง นำส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการของคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล



ผลการศึกษา

ชุมชนในพื้นที่กรุงเทพมหานครรวม 189 ชุมชน จำนวนบ้าน 5,427 หลังคาเรือน ภาชนะชั่งน้ำภายนอกบ้าน พบ ลูกน้ำ container index (CI) ร้อยละ 14.76 ภาชนะชั่งน้ำ ภายในบ้าน พบลูกน้ำร้อยละ 10.89 ภาชนะที่ยุงลายชอบ วางไข่มากที่สุด ได้แก่ ยางรถยนต์ร้อยละ 26.05 รองลงมา ได้แก่ อ่างน้ำ กะละมังร้อยละ 18.51 และภาชนะอื่น ๆ ร้อยละ 17.85 แต่จำนวนภาชนะที่พบลูกน้ำยุงลายมากที่สุด (สำคัญ ที่สุด) ได้แก่ โถ่งน้ำร้อยละ 41.18 รองลงมา ได้แก่ ภาชนะ อื่น ๆ ร้อยละ 13.70 จานรองกระถางต้นไม้ร้อยละ 11.66 อ่างซีเมนต์ในห้องน้ำร้อยละ 9.58 จานรองขาตู้กันมดสำคัญ น้อยที่สุดร้อยละ 0.22 (ตารางที่ 1)

ค่า CI เฉลี่ยร้อยละ 13.69 เฉลี่ยมีภาชนะชั่งน้ำ 2.39 ภาชนะต่อบ้าน เฉลี่ยพบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่งร้อยละ 0.33 ต่อบ้านหรือ 3 บ้านพบภาชนะที่มีลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง 1 ภาชนะ ค่า BI เฉลี่ยเท่ากับ 32.70

$$BI = \frac{\text{จำนวนภาชนะที่พบลูกน้ำ (1,755)} \times 100}{\text{จำนวนบ้านที่สำรวจ (5,427)}}$$

ชุมชนที่ไม่พบลูกน้ำยุงลายและตัวโม่ง house index (HI) เท่ากับ 0 ร้อยละ 7.41 HI ต่ำกว่า 10 สูงสุดร้อยละ

21.16 HI ระหว่าง 11-20 ร้อยละ 20.11 HI ระหว่าง 21-30 ร้อยละ 18.52 HI ระหว่าง 31-40 ร้อยละ 15.34 HI ระหว่าง 91-100 ร้อยละ 1.59 (ตารางที่ 2)

จากการสำรวจจุด 33 แห่งพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวน ภาชนะเท่ากับ 21 ภาชนะต่อ 1 วัด สัดส่วนของภาชนะชั่งน้ำ ที่พบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง (CI) ร้อยละ 12.86 ภายนอก อาคารร้อยละ 18.86 ภายในอาคารร้อยละ 7.54 ภาชนะภาย นอกอาคารที่มีความสำคัญมากที่สุด ได้แก่ จานรองกระถาง ต้นไม้ร้อยละ 34.90 รองลงมา ได้แก่ ภาชนะอื่น ๆ ร้อยละ 23.80 และโถ่งร้อยละ 17.46 ภาชนะภายในอาคาร ได้แก่ อ่างซีเมนต์ในห้องน้ำร้อยละ 92.60

จากการสำรวจโรงเรียน 21 แห่ง ค่าเฉลี่ยจำนวน ภาชนะเท่ากับ 30 ภาชนะต่อโรงเรียน สัดส่วนของภาชนะ ที่พบลูกน้ำ (CI) ร้อยละ 9.04 ภายนอกอาคารร้อยละ 9.77 ภายในอาคารร้อยละ 8.77 ภาชนะภายนอกอาคารที่มีความ สำคัญมากที่สุด ได้แก่ ภาชนะอื่น ๆ ร้อยละ 47.05 รองลงมา ได้แก่ จานรองกระถางต้นไม้ร้อยละ 29.41 ภาชนะภายใน อาคารที่มีความสำคัญมากที่สุด ได้แก่ อ่างซีเมนต์ในห้องน้ำ ร้อยละ 92.50 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของภาชนะชั่งน้ำที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลายและตัวโม่งภายนอกและภายในบ้าน ภาชนะที่ยุงลายชอบ วางไข่มากที่สุดและภาชนะที่พบลูกน้ำยุงลายมากที่สุด ในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนกันยายน - ธันวาคม 2548

ประเภทภาชนะ	ภายนอกบ้าน			ภายในบ้าน			รวม			ร้อยละ ที่พบลูกน้ำ	ความสำคัญ ของภาชนะ (ร้อยละ)
	สำรวจ (จำนวน)	พบ (จำนวน)		สำรวจ (จำนวน)	พบ (จำนวน)		สำรวจ (จำนวน)	พบ (จำนวน)			
		ลูกน้ำ	ตัวโม่ง		ลูกน้ำ	ตัวโม่ง		ลูกน้ำ	ตัวโม่ง		
โถ่งน้ำ	4125	634	250	1060	97	46	5185	731	296	14.09	41.18
อ่างน้ำ-กะละมัง	336	55	14	215	43	11	551	102	25	18.51	5.74
อ่างบัว	977	22	11	-	-	-	977	22	11	2.25	1.23
จานรองกระถางต้นไม้	1756	207	56	-	-	-	1756	207	56	11.78	11.66
ถังน้ำ	581	113	27	432	41	6	1013	154	33	15.2	8.68
ยางรถยนต์	545	142	37	-	-	-	545	142	37	26.05	8
อ่างซีเมนต์ในห้องน้ำ	-	-	-	1537	170	53	1537	170	53	11.06	9.58
จานรองขาตู้กันมด	-	-	-	44	4	0	44	4	0	9.09	0.22
อื่น ๆ	1040	205	20	321	38	10	1361	243	60	17.58	13.7
รวม	9360	1378	415	3609	393	126	12969	1775	571	13.69	100



ผลการเก็บลูกน้ำและตัวโม่งจากภาชนะขังน้ำภายในบ้านและภายนอกบ้านส่งตรวจที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าเป็นลูกน้ำยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นส่วนใหญ่ บางชุมชนมียุงลายสวน (*Aedes albopictus*) บ้างเล็กน้อย และยุงรำคาญ (*Culex*) ตามลำดับ นอกจากนี้บางชุมชนยังพบลูกน้ำยุงยักรัสด้วย แต่มีจำนวนน้อยมาก

ตารางที่ 2 แสดงค่า house index (HI) จำนวนชุมชนและร้อยละของ HI ในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนกันยายน - ธันวาคม 2548

HI	จำนวนชุมชน	ร้อยละ
0	14	7.41
1-10	40	21.16
11-20	38	20.11
21-30	35	18.52
31-40	29	15.34
41-50	18	9.52
51-60	1	0.53
61-70	10	5.29
71-80	1	0.53
81-90	0	0.00
91-100	3	1.59
รวม	189	100.00

หมายเหตุ สํารวจลูกน้ำและตัวโม่งจาก 189 ชุมชน (บ้านผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก บ้านใกล้เคียง และชุมชนพื้นที่เสี่ยง สํารวจมากกว่า 10 หลังคาเรือนต่อชุมชน)

วิจารณ์ผล

ในเขตชุมชน ภาชนะขังน้ำภายนอกบ้านที่พบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง CI เท่ากับร้อยละ 14.76 ภาชนะภายในบ้าน CI ร้อยละ 10.89 เฉลี่ยร้อยละ 13.69 ภาชนะที่ต้องให้ความสำคัญมากที่สุด ได้แก่ โถงน้ำใช้ รองลงมาเป็นภาชนะอื่น ๆ งานรองกระถางต้นไม้ อ่างซีเมนต์ในห้องน้ำ ตามลำดับ จำนวนภาชนะเฉลี่ยเท่ากับ 2.39 ภาชนะต่อบ้าน

ในเขตชุมชน ความชุกชุมของลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง (house index) ระหว่าง 1-10 สูงสุดร้อยละ 21.16 ระหว่าง 10-20 ร้อยละ 20.11 ระหว่าง 21-30 ร้อยละ 18.52 ระหว่าง 31-40 ร้อยละ 15.34 ระหว่าง 41-50 ร้อยละ 9.52 ระหว่าง 51-60 ร้อยละ 0.53 ระหว่าง 61-70 ร้อยละ 5.29 ระหว่าง 71-80 ร้อยละ 0.53 ระหว่าง 81-90 ร้อยละ 0.00 และเท่ากับ 0 ร้อยละ 7.41

ในวัด ภาชนะขังน้ำภายนอกอาคารที่พบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง (CI) ร้อยละ 18.86 ภายในอาคารร้อยละ 7.54 เฉลี่ย CI ร้อยละ 12.86 จำนวนภาชนะเฉลี่ยเท่ากับ 21 ภาชนะต่อวัด ภาชนะภายนอกอาคารที่สำคัญที่สุด ได้แก่ งานรองกระถางต้นไม้ ภาชนะอื่น ๆ และโถงน้ำเท่ากับ ร้อยละ 34.92, 23.80 และ 17.46 ตามลำดับ ภาชนะภายในอาคารที่สำคัญที่สุด ได้แก่ อ่างซีเมนต์ในห้องน้ำร้อยละ 92.60

ในโรงเรียน ภาชนะขังน้ำภายนอกอาคารที่พบลูกน้ำยุงลายหรือตัวโม่ง CI ร้อยละ 9.77 ภาชนะภายในอาคาร ร้อยละ 8.77 เฉลี่ย CI ร้อยละ 9.04 จำนวนภาชนะเฉลี่ยเท่ากับ 30 ภาชนะต่อโรงเรียน ภาชนะภายนอกอาคารที่สำคัญมากที่สุด ได้แก่ ภาชนะอื่น ๆ งานรองกระถางต้นไม้ และอ่างน้ำ กะละมังร้อยละ 47.05, 29.41 และ 17.64 ตามลำดับ ภาชนะภายในอาคารที่มีความสำคัญมากที่สุด ได้แก่ อ่างซีเมนต์ในห้องน้ำร้อยละ 92.50

ยุงลายที่พบในเขตกรุงเทพมหานคร ส่วนใหญ่เป็นยุงลายบ้าน รองลงมา ได้แก่ ยุงลายสวน ผลการตรวจพบมีจำนวนน้อย

จำนวนภาชนะขังน้ำที่ตรวจพบลูกน้ำเฉลี่ยต่อบ้านเท่ากับ 2.39 ภาชนะซึ่งนับว่าน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาขององอาจ เจริญสุข และคณะ เมื่อปีพ.ศ.2533⁽³⁾ เฉลี่ย 10-11 ภาชนะต่อบ้าน ปีพ.ศ. 2538 เฉลี่ย 10.3 ภาชนะต่อบ้าน ปีพ.ศ. 2542 เฉลี่ย 8-10 ภาชนะต่อบ้าน ฤดูฝนจะพบมากกว่าฤดูอื่นเล็กน้อย และเขตเทศบาลจำนวนภาชนะจะน้อยกว่าเขตชนบท และจากการศึกษาของวิจารณ์ ลีลาพงศ์



และคณะ ปี พ.ศ. 2542⁽⁶⁾ และปี พ.ศ. 2544 เฉลี่ย 10.35 ต่อบ้าน ในทำนองเดียวกันภาษาชะง้ำเฉลี่ยต่อวัดเท่ากับ 21 ภาษา และภาษาชะง้ำเฉลี่ยต่อโรงเรียนเท่ากับ 30 ภาษา ซึ่งน่าจะต่ำกว่าความเป็นจริงด้วย อาจเป็นเพราะการเข้าไปสำรวจภาษาในบ้านเขตกรุงเทพมหานครเป็นไปได้ยาก ผู้สำรวจอาจจะไม่สามารถเข้าสำรวจได้ทุกหลังคาเรือน ดังนั้น การสำรวจภาษานี้จะต้องสำรวจให้ละเอียดครบถ้วนมากขึ้น

การเก็บลูกน้ำและตัวโม่งส่งตรวจแยกชนิดนั้นโดยหลักการแล้วต้องเก็บ 1 ตัวต่อ 1 ภาษาเท่านั้น ถ้าเป็นลูกน้ำควรเป็นลูกน้ำระยะที่ 3-4 ซึ่งจะแยกชนิดได้ง่าย จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยดูที่ comb scale หรือจะเลี้ยงให้เป็นตัวโม่ง ปล่อยให้เจริญเติบโตเป็นตัวมูก แล้วดูตัวมูกก็ได้ การเก็บลูกน้ำโดยไม่จำกัดจำนวน ในแต่ละภาษาจึงไม่สามารถบอกถึงสัดส่วนชนิดของลูกน้ำยุงแต่ละชนิดได้

ในการสำรวจภาษานี้ไม่จำเป็นต้องแยกเป็นลูกน้ำหรือตัวโม่ง ถ้าพบอย่างใดอย่างหนึ่งหรือพบทั้ง 2 อย่างในภาษาเดียวกัน ก็ถือว่าพบลูกน้ำยุงลายได้ การพบลูกน้ำในภาษาที่คนทำขึ้น หรือภาษาที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติให้ถือว่าเป็นลูกน้ำยุงลายได้ (ถ้าไม่สามารถแยกชนิดลูกน้ำยุงลายได้) เพราะจากการศึกษาขององอาจ เจริญสุข ปี พ.ศ. 2542 ระบุไว้ว่า ลูกน้ำที่สำรวจพบในภาษาที่มีน้ำขังร้อยละ 95 - 97 เป็นลูกน้ำยุงลาย ที่เหลือเป็นลูกน้ำยุงรำคาญ (Culex) และยุงแม่ไก่ (Armigeris)

การศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าจะยังไม่สมบูรณ์และถูกต้องตามหลักวิชาการทั้งหมด แต่ได้สะท้อนให้เห็นว่าความชุกชุมของยุงลายในเขตกรุงเทพมหานครยังสูงอยู่และเสี่ยงต่อการระบาดของรุนแรงของโรคไข้เลือดออกในช่วงฤดูฝนได้

ตารางที่ 3 แสดงผลการสำรวจภาษาที่พบลูกน้ำและตัวโม่ง ในวัด 33 แห่ง โรงเรียน 21 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนกันยายน - ธันวาคม 2548

ประเภทภาษา	วัด				โรงเรียน			
	ภาษาที่สำรวจ (จำนวน)	พบลูกน้ำ (จำนวน)			ภาษาที่สำรวจ (จำนวน)	พบลูกน้ำ (จำนวน)		
		ลูกน้ำ	ตัวโม่ง	ความสำคัญของ ภาษา (%)		ลูกน้ำ	ตัวโม่ง	ความสำคัญของ ภาษา (%)
ภายนอกอาคาร								
โถงน้ำ	128	11	2	17.46	0	0	0	0
อ่างน้ำ-กะละมัง	36	7	0	11.11	3	3	0	17.64
อ่างบัว	11	1	0	1.58	41	1	0	5.88
จานรองกระถางต้นไม้	84	22	0	34.92	94	5	0	29.41
ถังน้ำ	5	5	0	7.93	0	0	0	0
ยางรถยนต์	2	2	1	3.17	0	0	0	0
อื่น ๆ	68	15	1	23.8	36	8	0	47.05
รวม	334	63	4	100	174	17	0	100
ภายในอาคาร								
โถงน้ำ	1	1	0	3.7	0	0	0	0
อ่างน้ำ-กะละมัง	0	0	0	0	0	0	0	0
ถังน้ำ	0	0	0	0	0	0	0	0
อ่างซิเมนต์ห้องน้ำ	356	25	2	92.6	450	37	0	92.5
จานรองขาตู้กันมด	0	0	0	0	0	0	0	0
อื่น ๆ	1	1	0	3.7	6	3	0	7.5
รวม	358	27	2	100	456	40	0	100
รวมภายนอกและ ภายในอาคาร	692	90	6	-	630	57	0	-

การศึกษาค้างนี้พบค่าดัชนีต่าง ๆ ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการศึกษาขององอาจ เจริญสุข และสมบัติ แทนประเสริฐสุข ในปี พ.ศ. 2511 - 2530⁽²⁾ ที่พบว่าในเขตเมือง (เทศบาล) มีค่า HI เท่ากับ 71.4 ± 21.9 ค่า CI เท่ากับ 32.5 ± 15.7 และค่า BI เท่ากับ 231.1 ± 119.7 หรือจากการศึกษาของ วิจารย์ ลีลาพงศ์ และคณะ ในปี พ.ศ. 2544⁽⁶⁾ ค่า HI ระหว่าง 91-100 เท่ากับร้อยละ 31.0 ค่า CI ระหว่าง 31-35 สูงสุดร้อยละ 12 และค่า BI ระหว่าง 0-50 ต่ำสุดร้อยละ 4.7

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาขององอาจ เจริญสุข และคณะ⁽⁸⁾ ในปีพ.ศ. 2543 พบว่าฤดูกาลในประเทศไทยไม่ได้ทำให้ความชุกชุมของยุงลายในเขตเทศบาลเปลี่ยนแปลงมากนัก เพราะค่า BI แตกต่างกันเล็กน้อยเท่านั้น

ในเดือนมกราคม-เมษายนของทุกปี ส่วนใหญ่การระบาดของโรคไข้เลือดออกจะไม่รุนแรง ระบาดนี้จึงเป็นระยะที่ต้องป้องกันโรค ควรรีบกำจัดลูกน้ำยุงลายโดยด่วน เมื่อพบผู้ป่วยจะต้องรีบออกไปกำจัดยุงลายโดยการพ่นสารเคมี การพ่นสารเคมีจะต้องพ่นให้ถูกต้องตามหลักวิชาการจึงจะได้ผล เมื่อกำจัดยุงลายแล้วให้กำจัดลูกน้ำยุงลายด้วยสารเคมี เช่น ที่มีฟอส โดยเน้นภาชนะที่มีความสำคัญตามผลการศึกษาครั้งนี้จะช่วยลดการระบาดลงได้ระดับหนึ่ง และการกำจัดลูกน้ำหรือยุงลายควรกำจัดอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ สำหรับพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดรุนแรงในปี พ.ศ. 2549 คือพื้นที่ที่ไม่มีมีการระบาด หรือมีผู้ป่วยจำนวนน้อยในปี พ.ศ. 2547 และ 2548 ซึ่งจะต้องให้ความสนใจในการกำจัดยุงลายเป็นพิเศษ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ศึกษาขอขอบคุณ นายองอาจ เจริญสุข ที่ปรึกษา ด้านกัญญาวิทยา ฝ่ายสัตว์นำโรค กองควบคุมโรค สำนักอนามัย, รศ.นฤมล โกมลมิตร และเจ้าหน้าที่ภาควิชา กัญญาวิทยาทาง การแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้

ช่วยตรวจแยกชนิดของลูกน้ำยุงและตัวโม่่งที่รวบรวมได้จากการสำรวจ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายสัตว์นำโรคที่มีส่วนช่วยในการสำรวจลูกน้ำยุงและเก็บลูกน้ำส่งตรวจในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. องอาจ เจริญสุข และคณะ. ความชุกชุมของลูกน้ำยุงลายในโอ่งซีเมนต์ขนาดใหญ่และถังคอนกรีตเก็บน้ำฝน. *วารสารโรคติดต่อ* 2528; 11: 247-55.
2. องอาจ เจริญสุข, สมบัติ แทนประเสริฐสุข. การศึกษาย้อนหลังการสำรวจความชุกชุมลูกน้ำยุงลายในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2511-2530. *วารสารโรคติดต่อ* 2532; 15: 289-303.
3. องอาจ เจริญสุข, สมบัติ แทนประเสริฐสุข. การเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออกตามฤดูกาลในชนบท. *วารสารกองสุขาภิบาล* 2533; 16: 44-66.
4. องอาจ เจริญสุข. ระบาดวิทยาของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย. กรุงเทพฯ ฯ: โรงพิมพ์ทหารผ่านศึก; 2538.
5. องอาจ เจริญสุข. แหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์* 2542; 4: 349-52.
6. วิจารย์ ลีลาพงศ์, กนกทิพย์ ทิพย์รัตน์, สุชาดา จันทสิริยากร, องอาจ เจริญสุข. การเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออกและความชุกชุมลูกน้ำยุงลาย ปี พ.ศ. 2542 และปี พ.ศ. 2544. รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำเดือน. กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข 2545; 33.
7. สุชาติ เจตนาเสน, องอาจ เจริญสุข, ชูวิทย์ ลิขิตยั้งวรา. ความรู้และทักษะที่จำเป็นต่อการป้องกันและควบคุมโรคไข้เลือดออก. *รวมบทบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการเพื่อการควบคุมโรคไข้เลือดออก*. 21-23 มกราคม พ.ศ. 2545 ณ โรงแรมพาววิลเลียน ริมน้ำจันทบูร จ.กาญจนบุรี. กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.

Malaria parasites detection by real-time polymerase chain reaction

Kanungnit Congpuong, Pongwit Bualombai, Nisa Kuisab, Ampai Darakapong

Reference laboratory center for Vector Borne Disease, Bureau of Vector Borne Disease

Abstract

Malaria parasite detection by polymerase chain reaction (PCR) is as sensitive and specific as standard microscopic examination of a Giemsa-stained thick blood film (GS-TBF). At present, PCR is not suitable for use in a malaria clinic because the method is time consuming and sophisticated. Real-time PCR is a new PCR technology developed for the detection of many infectious agents including malaria parasites. Besides its shortening of the detection time, the parasite density can also be quantified. This study was a method comparison of multiplex PCR or classical PCR with a TaqMan real-time PCR. A GS-TBF was the standard method for the comparison. One hundred and twenty six samples were malaria positive blood collected from patients attending malaria clinics in Pong Nam Ron District, Chanthaburi Province and Muang District, Ranong Province. In addition, 77 malaria negative samples were also studied. The results showed that multiplex PCR and real-time PCR used in this study were 100% sensitive and specific compared with the standard GS-TBF. However, real-time PCR has more advantages over multiplex PCR as it spent shorter duration and could quantify parasite density which is useful for the following up of treatment especially in areas where there is multidrug resistant *P. falciparum*.

Key words: multiplex PCR, real-time PCR, malaria

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction

คณิงนิจ คงพ่วง, พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, นิสา คัญทรัพย์, อำไพ ดารกะพงษ์
สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าวิธีมาตรฐานการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือดที่ย้อมสียิมซาด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่วิธี PCR มีขั้นตอนการทดสอบนานและยุ่งยาก จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่มลาเรียคลินิก ปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า real-time PCR เป็นเทคนิคที่สามารถรู้ระยะเวลาในการตรวจและสามารถตรวจวัดปริมาณของเชื้อมาลาเรียในเลือดได้ด้วย จึงเป็นเทคนิคที่คาดว่าในอนาคตอาจนำมาใช้เพื่อวินิจฉัยผู้ป่วยมาลาเรียที่มารับการรักษาที่มลาเรียคลินิกได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบวิธี multiplex PCR ซึ่งคือวิธี PCR ปกติ กับวิธี real-time PCR โดยเปรียบเทียบทั้งสองวิธีกับวิธีมาตรฐาน ตัวอย่างศึกษาเป็นผู้ป่วยมาลาเรียที่มารับการรักษาที่มลาเรียคลินิก อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี และอำเภอเมือง จังหวัดระนอง จำนวน 126 ราย และผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานจำนวน 77 ราย ผลการศึกษาพบว่าวิธี multiplex PCR และวิธี real-time PCR มีความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน แต่วิธี real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อผสมระหว่างเชื้อฟัลซิพารัมและเชื้อไวแวกซีได้ดีกว่าวิธี multiplex PCR สามารถทราบปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด และใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธี multiplex PCR ดังนั้นจึงเหมาะสมกว่าวิธี multiplex PCR หากต้องการนำมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยมาลาเรีย โดยเฉพาะเมื่อต้องการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยซึ่งมีความจำเป็นในภาวะที่มีปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยาในพื้นที่

คำรหัส: multiplex PCR, real-time PCR, มาลาเรีย

บทนำ

ระยะเวลาที่ผ่านมาเกือบร้อยปีแล้วที่การวินิจฉัยโรคมาลาเรียทำโดยการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดแบบหนาหรือบางที่ย้อมด้วยสีย้อมชาด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐาน^(1,2) ต้นทุนต่ำ ทำง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบเชื้ออย่างน้อย 50 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตรสำหรับฟิล์มหนาและ 500 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตรสำหรับฟิล์มบาง⁽³⁾ สามารถแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนได้ทั้ง 4 สปีชีส์ สามารถวัดปริมาณของเชื้อได้ด้วย ทำให้สามารถประเมินความรุนแรงของโรคและติดตามผลการรักษาได้ดี

อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้เวลาตรวจนาน ผู้ตรวจต้องมีความเชี่ยวชาญ ในทางปฏิบัติในคลินิกที่มีผู้ป่วยจำนวนมากต่อวันจะพบการตรวจผิดพลาดได้มาก หรือถ้าผู้ป่วยมีเชื้อในร่างกายน้อย การตรวจก็ผิดพลาดได้มากเช่นเดียวกัน⁽⁴⁻⁷⁾ ผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียหลายสปีชีส์พร้อมกัน และผู้ป่วยหลังได้รับการรักษา จำนวนเชื้อในเลือดจะน้อย การตรวจฟิล์มเลือดจากผู้ป่วยเหล่านี้ต้องใช้ผู้ตรวจที่มีความชำนาญและใช้เวลาตรวจนาน ซึ่งในมาลาเรียคลินิกที่มีผู้ป่วยมารับบริการมากผู้ตรวจไม่มีเวลามากพอ หรือในพื้นที่ที่มีมาลาเรียน้อย ผู้ตรวจขาดประสบการณ์ทำให้ตรวจผิดพลาดได้เช่นกัน

ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียเพื่อใช้ตรวจได้ทั้งในพื้นที่ที่มีมาลาเรียชุกชุมและไม่ชุกชุม เพื่อให้วิธีที่พัฒนาขึ้นมีประโยชน์ทางคลินิก สามารถแก้ข้อจำกัดของการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีที่พัฒนาขึ้นควรเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบเชื้อปริมาณน้อย ๆ ได้ สามารถแยกสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรียได้ผลการตรวจเหมือนกันโดยไม่ขึ้นกับความสามารถหรือความชำนาญของผู้ตรวจ ปัจจุบันมีวิธีการตรวจทางซีโรโลยีทั้งวิธีที่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และวิธีทดสอบเร็วที่อาศัย

หลักการของ malaria antigen capture immunochromatographic strip technology ซึ่งเป็นวิธีที่สอดคล้องกับความต้องการดังกล่าวข้างต้น แต่วิธีทดสอบเร็วยังคงมีความไวน้อยกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเฉพาะเมื่อจำนวนเชื้อในเลือดมีน้อยกว่า 100 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร⁽²⁾ ชุดทดสอบเร็วที่อาศัยหลักการตรวจหาแอนติเจน HRP2 อาจให้ผลบวกปลอมเนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวจะยังคงอยู่ในเลือดแม้ว่าเชื้อมาลาเรียจะตายแล้ว แต่ยังมีแอนติเจน HRP2 หลงเหลืออยู่ ชุดทดสอบเร็วในปัจจุบันส่วนมากตรวจได้เฉพาะเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมมีบางชนิดที่สามารถแยกเชื้อฟัลซิพารัมจากเชื้อไวเวกซ์ได้ แต่ความไวและความจำเพาะยังไม่เป็นที่น่าพอใจ⁽⁸⁾ และไม่สามารถแยกผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อผสม

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เริ่มมีเมื่อไม่นานมานี้ เป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่วิธีการตรวจที่ให้ความไวสูงต้องใช้วิธีเพิ่มจำนวนมากกว่าหนึ่งครั้งที่เรียกว่าวิธี nested หรือ semi-nested PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลานาน ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่รอรับการรักษาและไม่สามารถให้ข้อมูลปริมาณเชื้อในเลือด บอกได้เพียงว่ามีเชื้อมาลาเรียหรือไม่เท่านั้น ปัจจุบันปัญหาที่สำคัญของโรคมมาลาเรียคือเชื้อดื้อยา วิธีการตรวจที่สามารถให้ข้อมูลปริมาณเชื้อในเลือดจะมีประโยชน์ต่อการติดตามผลการรักษา ทำให้ทราบว่ายาที่ใช้รักษาสามารถกำจัดเชื้อมาลาเรียในเลือดให้หมดไปได้หรือไม่ ล่าสุดมีการพัฒนาวิธี PCR ให้สามารถวัดปริมาณเชื้อมาลาเรียได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี real-time PCR (RT-PCR) เปรียบเทียบกับวิธี multiplex PCR และวิธีมาตรฐานคือการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจากปลายนิ้วของผู้ป่วยที่มารับบริการที่มาลาเรียคลินิก อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรีและอำเภอเมือง จังหวัดระนอง เป็นเลือดผู้ป่วยตรวจพบเชื้อมาลาเรียจำนวน 126 ราย และผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย 77 ราย ทำฟิล์มเลือดหนาและบางอย่างละหนึ่งฟิล์ม และหยด

เลือด 2 หยด ลงบนกระดาษกรอง 3 MM Whatman หยดละประมาณ 15 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บใส่ของพลาสติกที่บรรจุสารดูดความชื้น ปิดถุงให้แน่น นำมาตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค PCR ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์อ้างอิง ฯ สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง



การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำฟิล์มเลือดหนาและบางที่เตรียมไว้ ย้อมสีิมซา ความเข้มข้น 10% pH 7.2 ตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x ตรวจอย่างน้อย 100 วงกล้องสำหรับฟิล์มหนา ฟิล์มบางจะใช้เพื่อแยกสปีชีส์ของเชื้อ ฟิล์มเลือดแต่ละฟิล์มจะได้รับการตรวจจากผู้ตรวจสองคน โดยที่แต่ละคนไม่ทราบผลการตรวจของกันและกัน คนแรกเป็นจุลทัศน์กรของมาลาเรียคลินิก คนที่สองเป็นจุลทัศน์กรของศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง คำนวณความหนาแน่นของเชื้อโดยนับจำนวนเชื้อทั้งหมดต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว แล้วคำนวณจำนวนเชื้อต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร โดยใช้มาตรฐานขององค์การอนามัยโลกที่กำหนดให้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร⁽⁹⁾

การเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดบนกระดาษกรองใช้วิธี Chelex method⁽¹⁰⁾ มีวิธีการโดยย่อดังนี้ ตัดกระดาษกรองขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของหยดเลือดซึ่งเท่ากับเลือดประมาณ 15 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่บรรจุ 0.5% Saponin 1 มล. เขย่าเบา ๆ เก็บในตู้เย็น 4°C ค้างคืน เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์ เทส่วนน้ำทิ้ง เติม phosphate buffer saline (PBS) 1 มล. เขย่าเบา ๆ เก็บในตู้เย็นอีก 15-30 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เติม 5% Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 200 ไมโครลิตร เขย่าแรง ๆ นำไป incubate ใน heating block อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที vortex 30 วินาที แล้ว incubate ต่ออีก 10 นาที แยก Chelex ออกโดยการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอไปใส่หลอดใหม่ ถ้ายังไม่ใช้ทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ -70°C

Multiplex PCR

ใช้วิธีของ Kho และคณะ (2003) primers ที่ใช้เป็น ส่วนของ 18S rRNA gene ของเชื้อฟัลซิพารัมและเชื้อไวแวกซ์ วิธีนี้จึงสามารถแยกเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและชนิดไวแวกซ์พร้อมกันโดยทำปฏิกิริยา PCR เพียงครั้งเดียว forward primer ถูกออกแบบให้จำเพาะกับส่วนของยีนที่จำเพาะต่อ genus *Plasmodium* มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCA GCT TTT GAT GTT AGG GTA TT-3' (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 318-340, GenBank accession no. U03079 strain Sal-1 ของเชื้อไวแวกซ์ และ GenBank no. M19172 ของเชื้อฟัลซิพารัม)

reverse primers มีสองชนิดคือชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อไวแวกซ์ มีลำดับเบส 5'-TAA ACT CCG AAG AGA AAA TTC T-3' (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1150-1129 GenBank no. U03079) และที่จำเพาะต่อเชื้อฟัลซิพารัม มีลำดับเบส 5'-GCA TCA AAG ATA CAA ATA TAA GC-3' (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1768-1746 GenBank no. M19172)

forward primer จะจับได้กับทั้งเชื้อฟัลซิพารัมและเชื้อไวแวกซ์ reverse primers มีสองชนิด คือ ชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อฟัลซิพารัมและชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อไวแวกซ์ primers ทั้งหมดจะอยู่ในหลอดทดสอบเดียวกัน เมื่อทำปฏิกิริยา PCR แล้ว แยก product ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis จะได้แถบที่แสดงว่ามีเชื้อฟัลซิพารัมหรือเชื้อไวแวกซ์ที่มีขนาดคู่เบสต่างกัน คือ ชนิดฟัลซิพารัมจะได้แถบขนาด 1451 คู่เบส และชนิดไวแวกซ์ได้แถบขนาด 833 คู่เบส

การทำปฏิกิริยา PCR ใช้เครื่อง Px2 Thermal Cycle (Thermo Hybaid US, MA, USA) ปริมาตรของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 500 μM dNTP แต่ละตัว 250 nM ของ forward primer และ primer ที่จำเพาะกับเชื้อชนิดฟัลซิพารัมและ 125 nM ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อไวแวกซ์ 100 nM Tris-HCl (pH 8.3), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂ และ 2 ยูนิตของ Immolase™ DNA polymerase (Bioline USA Inc., MA, USA) ตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ขั้นตอน pre-heating activation 95°C 7 นาที ขั้นตอน PCR 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่ 94°C 30 วินาที annealing ที่ 58°C 90 วินาที extension ที่ 72°C 90 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย คือ extension ที่ 72°C อีก 10 นาที

ตรวจสอบว่า product ที่ได้เป็นเชื้อชนิดฟัลซิพารัมหรือเชื้อชนิดไวแวกซ์โดยนำ product 7 ไมโครลิตรไปแยกด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใช้ 1% Tris-Borate-EDTA (TBE) เป็นบัฟเฟอร์ และเติม 0.05% ethidium bromide เป็นตัวย้อมสี ใช้เครื่อง GelMate[®] 2000 ใช้ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที อ่านแถบของดีเอ็นเอที่แยกได้ด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตจากเครื่อง Gel Image Documentation System Dolphin Series (Wealtec Corp., GA, USA)



Real-Time PCR

ใช้วิธี Real-Time monoplex PCR เพื่อแยกสปีชีส์ของเชื้อฟัลซิพารัม ไวแวกซ์ และโอวัลเล⁽¹⁾ primer ที่ใช้เป็นส่วนของ 18S rRNA gene เช่นเดียวกับวิธี multiplex PCR, probe ที่ใช้เป็นชนิด TaqMan ตารางที่ 1 แสดง primer และ probe ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

TaqMan probe ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สังเคราะห์โดย Operon Biotechnologies GmbH (เยอรมนี) ปริมาตรของปฏิกิริยาใช้ 20 ไมโครลิตร และใช้ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตรในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 ไมโครลิตรของ 2x QuantiTect probe PCR master mix (QIAGEN) 0.4 μ M ของ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีส์ และ 0.2 μ M ของ probe ที่จำเพาะต่อแต่ละสปีชีส์ ปฏิกิริยาทำในเครื่อง ARTUS 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research) ตั้งโปรแกรมเครื่องดังนี้ กระตุ้นปฏิกิริยาของ Hot Star Taq DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 95°C 15 นาที ทำปฏิกิริยา PCR 45 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 95°C 15 วินาที และ 60°C 1 นาที การทำแต่ละครั้งได้ทำตัวอย่างควบคุมทั้งชนิดบวกและลบพร้อมไปด้วยกัน ผลที่ได้แสดงเป็นกราฟที่เรียกว่า sigmoid-shaped amplification plots เมื่อสร้างกราฟโดยใช้สเกลเส้นตรง กราฟเกิดจากการ plot ระหว่างปริมาณของแสงฟลูออเรสเซนซ์กับ threshold cycle (CT) ซึ่งเป็นดัชนีที่ใช้วัดปริมาณดีเอ็นเอที่จะตรวจหาในตัวอย่าง เป็นค่าที่แสดงจำนวนรอบที่ดีเอ็นเอที่ต้องการวัดได้เพิ่มมากขึ้นจนสามารถตรวจวัดได้ โดยวัดจากปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เพิ่มขึ้นมากกว่า baseline การวัดค่า CT ต้องวัดในช่วงของ log-linear phase

การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้วัดปริมาณ

เตรียมกราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอของเชื้อฟัลซิพารัม และเชื้อไวแวกซ์ที่ทราบปริมาณความหนาแน่นของเชื้อ วัดปริมาณด้วยวิธี RT-PCR นำค่าความหนาแน่นของเชื้อกับค่า threshold cycle (CT) มาสร้างกราฟเส้นตรงและคำนวณสมการถดถอยด้วยโปรแกรม Analysis Function ใน ARTUS3000 software

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณค่า analytical sensitivity ซึ่งหมายถึงจำนวนเชื้อน้อยที่สุดที่วิธีทดสอบนี้จะสามารถตรวจพบได้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยชนิดฟัลซิพารัมและชนิดไวแวกซ์อย่างละหนึ่งตัวอย่าง นำมาเจือจางในลักษณะที่เรียกว่า ten-fold dilution จนได้ปริมาณเชื้อน้อยกว่า 0 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตร แล้วนำไปวัดด้วยวิธี real-time PCR

การคำนวณค่าความไวและความจำเพาะเปรียบเทียบระหว่างวิธี multiplex PCR และ real-time PCR โดยใช้วิธีมาตรฐาน คือ Giemsa stained thick blood film (GS-TBF) เป็นตัวเปรียบเทียบค่าความไวคำนวณจากสูตร (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง)/(จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง+จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม) และค่าความจำเพาะคำนวณได้จากสูตร (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง)/(จำนวนที่ให้ผลลบจริง+จำนวนที่ให้ผลบวกปลอม)

ใช้สถิติ Mann-Whitney test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่า median CT ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด และหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า CT กับความหนาแน่นของเชื้อในเลือด โดยใช้สถิติ Non-linear regression analysis

ตารางที่ 1 แสดง primers และ probes ที่ใช้ใน real-time PCR

Species	Primers or Probes	Sequence 5'---3'	Nucleotide position
<i>P. falciparum</i>	FAL-F FAL-R FAL probe (FAM)	5'-CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA-3' 5'-TATTCATGCTGTAGTATTCAAACACAAA-3' 5'-TGTTCCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCA-3'	793-821 864-891 829-863
<i>P. vivax</i>	VIV-F VIV-R VIV-probe (TET)	5'-ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT-3' 5'-ATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC-3' 5'-TTCGTATCGACTTTGTGCGCATTTTGC-3'	665-690 777-806 695-722
<i>P. ovale</i>	OVA-F OVA-R OVA probe (VIC)	5'-TTTTGAAGAATACATTAGGATACAATTAATG-3' 5'-CATCGTTTCTCTAAGAAGCTTTACAAT-3' 5'-CCTTTTCCCTATTCTACTTAATTGCAATTCATG-3'	1515-1545 1617-1643 1549-1582

ผลการศึกษา

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบระหว่าง multiplex PCR, real-time PCR และ GS-TBF ตารางที่ 3 เปรียบเทียบระหว่าง real-time PCR กับ GS-TBF ตารางที่ 4 เปรียบเทียบระหว่าง multiplex PCR กับ real-time PCR จากการคำนวณค่าความไวและความจำเพาะจากสูตรดังกล่าวข้างต้นพบว่าวิธี multiplex PCR และ real-time PCR มีความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับวิธี GS-TBF และเมื่อเทียบระหว่าง multiplex PCR กับ real-time PCR พบว่าวิธี real-time PCR มีความไวและความจำเพาะเท่ากับวิธี multiplex PCR อย่างไรก็ตามวิธี real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อผสมระหว่างฟัลซิพารัมและไวแวกซ์ได้ดีกว่าวิธี multiplex PCR โดยพบว่ามีตัวอย่าง 3 ตัวอย่างที่ตรวจด้วยวิธี multiplex PCR เป็นเชื้อไวแวกซ์ แต่เมื่อตรวจด้วย real-time PCR พบมีการติดเชื้อผสมระหว่างฟัลซิพารัมกับไวแวกซ์ เมื่อนำฟิล์มเลือดผู้ป่วยทั้งสามตัวอย่างนี้ไปตรวจซ้ำด้วยวิธี GS-TBF อีกครั้ง โดยผู้เชี่ยวชาญอีก 2 ท่าน พบว่ามีการติดเชื้อผสมจริง

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบชนิดเชื้อฟัลซิพารัมและไวแวกซ์ที่ตรวจพบด้วยวิธี GS-TBF, Multiplex PCR และ Real-time PCR

Methods			No. of samples
GS-TBF	Multiplex PCR	Real-time PCR	
F	F	F	53
V	V	V	45
N	N	N	57
V	V	V+F	2
N	F	F	4
N	F	N	4
N	V	N	2

F = *P. falciparum*, V = *P. vivax*, N = negative

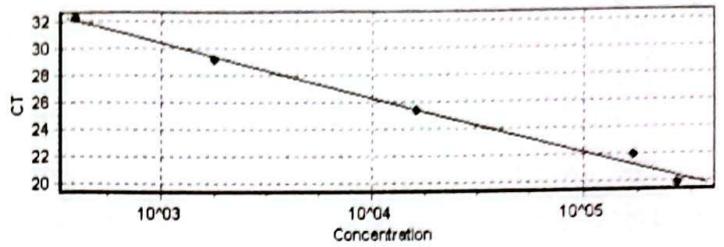
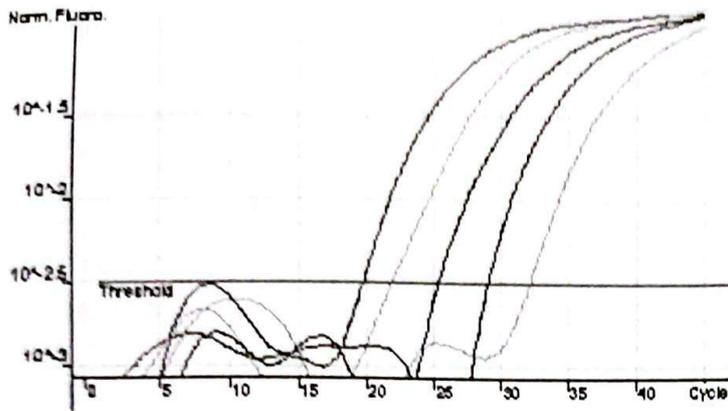
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อฟัลซิพารัมและไวแวกซ์ที่ตรวจพบด้วยวิธี Multiplex PCR และ GS-TBF

Multiplex PCR	GS-TBF			Total
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Negative	
<i>P. falciparum</i>	32	-	-	32
<i>P. vivax</i>	-	42	-	42
Negative	-	-	50	50
Total	32	42	50	124

รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานและสมการถดถอยที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณของเชื้อมาลาเรีย การแปลผลว่าตัวอย่างที่ตรวจมีเชื้อมาลาเรียหรือไม่ด้วยวิธี real-time PCR จะใช้ ค่า cut off ของค่า CT เท่ากับ 38 สำหรับเชื้อชนิดฟัลซิพารัมและเท่ากับ 32 สำหรับเชื้อชนิดไวแวกซ์ ค่านี้ได้จากการทดสอบตัวอย่างไม่มีเชื้อมาลาเรียจำนวน 57 ตัวอย่าง สำหรับการคำนวณหาความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานหรือสมการถดถอยที่คำนวณได้จากโปรแกรม ARTUS 3000 ของเครื่อง real-time PCR

เมื่อนำค่า CT ที่วัดได้จากการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR มาหาความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียจากการคำนวณด้วยวิธี GS-TBF พบว่ามีความสัมพันธ์แบบ non-linear regression models แบบ compound, power, growth, exponential หรือ แบบ logistic non-linear regression models สำหรับเชื้อฟัลซิพารัม ($R^2 = 0.343$, $p < 0.0001$) และพบความสัมพันธ์แบบ growth, exponential หรือ logistic non-linear equation สำหรับเชื้อไวแวกซ์ ($R^2 = 0.695$, $p < 0.0001$)





Colour	Sample No.	CT	Parasitaemia (parasite/ μ l)
■	MSF5-F	19.83	274,774.0
■	MSF5.1-F	21.97	171,782.0
■	MSF5.2-F	25.43	16,387.0
■	MSF5.3-F	29.11	1,778.0
■	MSF5.4-F	32.27	396.0

รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานและสมการถดถอยที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณของเชื้อมาลาเรีย

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี real-time PCR ที่สามารถวัดปริมาณเชื้อได้ด้วยเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง วิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธี PCR ธรรมดา วิธี real-time PCR รวมขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและการตรวจวัดว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบหรือไม่ในขั้นตอนเดียวกัน ในขณะที่วิธี PCR ธรรมดา หลังการเพิ่มจำนวนแล้ว ต้องใช้เวลาอีกไม่ต่ำกว่า 1 ชม. เพื่อตรวจว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่โดยการทำ gel electrophoresis

วิธี real-time PCR เป็นการทดสอบในขั้นตอนเดียวกัน ทั้งการเพิ่มจำนวนและการตรวจวัดปริมาณ ทั้งสองขั้นตอนทำในหลอดเดียวกันจึงไม่มีการปนเปื้อน ในขณะที่ PCR ปกติ ถ้าต้องการให้มีความไวเพิ่มขึ้นต้องทำ nested คือเพิ่มจำนวน 2 ครั้ง และต้องตรวจหาว่ามีการเพิ่มจำนวนที่จำเพาะหรือไม่ด้วยการทำ gel electrophoresis ดังนั้นโอกาสที่จะมีการปนเปื้อนระหว่างการทดสอบจึงมีมากกว่า

real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เวลาเพียง 2 ชม. เทียบกับ multiplex PCR ที่ใช้เวลา 5-6 ชม. real-time PCR จึงเหมาะสมที่จะใช้ในโรงพยาบาลที่จำเป็นต้องมี

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบชนิดของเชื้อฟัลซิพารัมและไวแวกซ์ ที่ตรวจพบด้วยวิธี real-time PCR และ GS-TBF

Real-time PCR	GS-TBF				Total
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Mixed	Negative	
<i>P. falciparum</i>	45	-	-	-	45
<i>P. vivax</i>	-	37	-	-	37
Mixed	-	2	-	-	2
Negative	-	-	-	51	51
Total	45	39	-	51	135

การวินิจฉัยที่ถูกต้องรวดเร็ว ปัจจุบันมีเครื่องมืออัตโนมัติที่สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอทำให้การสกัดดีเอ็นเอสะดวกรวดเร็วขึ้น

การที่วิธี real-time PCR สามารถวัดปริมาณได้ ทำให้สามารถนำไปใช้เพื่อประเมินผลการรักษาผู้ป่วยได้ โดยเฉพาะในสถานการณ์ปัจจุบันที่มีปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยามากขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียที่วัดได้ด้วยวิธี real-time PCR มีความสัมพันธ์กับที่คำนวณได้ด้วยวิธี GS-TBF โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.819 ($p < 0.0001$)

วิธี real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้มีความไวสูง สามารถวัดเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุดที่ 0.04 และ 1.5 ตัวต่อเลือดหนึ่งไมโครลิตรสำหรับเชื้อพลาสโมเดียมและเชื้อไวแวกซ์ตามลำดับ

การคำนวณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี GS-TBF มีความแปรผันได้มากจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความชำนาญของผู้ตรวจ ความหนาบางของฟิล์มเลือด จำนวนเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันในแต่ละคน เป็นต้น การคำนวณความหนาแน่นของเชื้อด้วยวิธี real-time PCR มีความแปรผันน้อยกว่าจากการที่ใช้เครื่องวัด

การศึกษาค้างนี้วิธี real-time PCR มีความไวเท่ากับวิธี multiplex PCR แต่วิธี real-time PCR สามารถตรวจหาการติดเชื้อแบบผสมได้ดีกว่า วิธี real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ใช้แบบ monoplex PCR คือทดสอบเชื้อแต่ละสปีชีส์แยกกัน แต่สามารถทำพร้อมกันโดยใช้โปรแกรมการเพิ่มจำนวนอย่างเดียวกัน ทำให้ประหยัดเวลาในการทดสอบการที่วิธี monoplex PCR สามารถตรวจพบการติดเชื้อผสมได้ดีกว่า multiplex PCR อธิบายได้ว่าเมื่อมี primers มากกว่า

หนึ่งคู่ในปฏิกิริยาและมีเชื้อมาลาเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง มากหรือน้อยกว่าอีกชนิดหนึ่งมาก ความไวที่จะตรวจพบเชื้อที่มีน้อยกว่าจะด้อยกว่าเชื้อชนิดที่มีมากกว่าเป็นธรรมดา

อย่างไรก็ตาม วิธี real-time PCR มีข้อจำกัดในเรื่องของราคาเครื่องมือและน้ำยาที่ใช้ ในขณะที่งานตรวจวินิจฉัยมาลาเรียของประเทศไทยส่วนมากยังอยู่ในห้องที่ทุรกันดารงบประมาณเพื่อการตรวจวินิจฉัยมีน้อย ประกอบกับการตรวจด้วยวิธี PCR ไม่สามารถบอกระยะของเชื้อมาลาเรียซึ่งมีความสำคัญต่อการรักษาและการป้องกันการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ วิธี PCR นี้เหมาะกับการศึกษาทางระบาดวิทยา เนื่องจากสามารถตรวจตัวอย่างเลือดได้พร้อมกันเป็นจำนวนมาก ๆ ด้วยเวลาที่รวดเร็ว เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของศูนย์อ้างอิง ๖ มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจตัวอย่างได้พร้อมกันสูงสุดถึงครั้งละ 72 ตัวอย่าง และมีความเบี่ยงเบนน้อยกว่าวิธี GS-TBF การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ตรวจได้ครั้งละ 1 ฟิล์ม ถ้ามีจำนวนฟิล์มที่จะตรวจต่อวันมากจะมีผลกระทบต่อผลการตรวจ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2548 ของสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค ขอขอบคุณหน่วยควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่อำเภอปองน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี และหน่วย

ควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงอำเภอเมือง จังหวัดระนอง ที่สนับสนุนการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่มารับการรักษามาลาเรียคลินิก

เอกสารอ้างอิง

1. Warhurst DC, Williams JE. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol* 1996; 49: 533-8.
2. Mills CD, Burgess DC, Taylor HJ, Kain KC. Evaluation of a rapid and inexpensive dipstick assay for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 553-9.
3. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 66-78.
4. Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 142-9.
5. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1994; 47: 740-2.



6. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus-and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 687-92.
7. Snounou G, Pinheiro L, Goncalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, do Rosario VE. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 649-53.
8. Playford EG, Walker J. Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travellers. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4166-71.
9. World Health Organization. Bench aids for the diagnosis of malaria infections. WHO document, 2nd edition, 2000.
10. Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1993; 9: 303-5.
11. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Medici M, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1214-9.



**Satisfaction of the disease control personnel
towards the DDC hot line call center**

Narong Juntanakul

Planning Division, Department of Disease Control

Abstract

Satisfaction of personnels of the Department of Disease Control towards the performance of the hot line call center of the Department of Disease Control (call number, 0-2590-3333) was surveyed by questionnaire. The survey was conducted during January to March 2006. Three hundred and thirty four personnels were randomly selected from the total 2,014 personnels of the 14 divisions in the Department. Questionnaire was comprised of 3 parts; general information, satisfaction towards call center performance, opinion and suggestions. Descriptive statistics were used to analyze the data including frequency, percentage, mean and standard deviation. Chi-square test was used to test the relationship between the satisfaction level and the related factors. Statistical significant was set at 0.05. The results revealed that most personnels of the Department never used the hotline service of the Department. They proposed that call center staff should be friendly, polite, enthusiastic and call service should be provided within 5-10 minutes. Personnels experienced the hot line service were moderately satisfied with the service including staff, service system, service quality and service approach. Factors including gender, service usage record, staff, system, quality and approach had a significant relationship with satisfaction towards performance of the call center whereas age, educational level, marital status, job position, job level and service usage record of the other call centers had no relationship with the satisfaction. Services should be widely promoted to serve the main target groups i.e. general public. DDC personnels have the other channels to reach the service. In addition, any information offered in the service should be updated, present and practical in order to boost ultimate satisfaction among users.



ความพึงพอใจของบุคลากรกรมควบคุมโรค ต่อการให้บริการ Call Center ของศูนย์ปฏิบัติการ กรมควบคุมโรค

ณรงค์ จันทนะกุล

กองแผนงาน กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

การศึกษาระดับความพึงพอใจของบุคลากรส่วนกลางของกรมควบคุมโรคต่อการให้บริการระบบ hot line ของศูนย์ปฏิบัติการกรมควบคุมโรคประจำปี พ.ศ. 2548 โดยการสำรวจบุคลากรกรมควบคุมโรคจำนวน 334 คน จาก 14 หน่วยงาน ใช้แบบสอบถาม ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป ส่วนที่ 2 ความพึงพอใจต่อการให้บริการ ส่วนที่ 3 ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่น ๆ เก็บข้อมูลระหว่างเดือนมกราคม - มีนาคม พ.ศ. 2549 พบว่าบุคลากรส่วนใหญ่ไม่เคยใช้บริการระบบ hot line ของศูนย์ปฏิบัติการ และมีความคาดหวังเกี่ยวกับการใช้บริการระบบ hot line ของศูนย์ปฏิบัติการในเรื่องการให้บริการรับโทรศัพท์และตอบคำถาม ส่วนใหญ่เห็นว่าควรมีความเป็นมิตร พนักงานสุภาพ เอาใจใส่ และกระตือรือร้นทั้ง 3 อย่างรวมกัน ส่วนการเข้าถึงบริการบุคลากร กรมควบคุมโรค คิดว่าควรเข้าถึงบริการได้ภายใน 5-10 นาที บุคลากรที่เคยใช้บริการมีความพึงพอใจต่อการให้บริการระบบ hot line ของศูนย์ปฏิบัติการทั้งด้านผู้ให้บริการ ระบบบริการ คุณภาพบริการ และการเข้าถึงบริการอยู่ในระดับปานกลาง เพศ ประวัติการใช้บริการระบบ hot line ของศูนย์ปฏิบัติการ ปัจจัยด้านผู้ให้บริการ ระบบบริการ คุณภาพบริการ และการเข้าถึงบริการมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความพึงพอใจของบุคลากรต่อการให้บริการระบบ hot line แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอายุ ระดับการศึกษา สถานภาพสมรส ตำแหน่ง ระดับและประวัติการใช้บริการของศูนย์ ฯ อื่น ผลจากการศึกษาทำให้จำเป็นต้องเพิ่มการประชาสัมพันธ์ให้เกิดการรับทราบอย่างทั่วถึง นอกจากนี้ควรเพิ่มการประชาสัมพันธ์ให้ประชาชนทั่วไปได้รับทราบด้วยเพราะเป้าหมายการให้บริการที่แท้จริงอยู่ที่ประชาชน ส่วนเจ้าหน้าที่มีช่องทางอื่น ๆ ที่จะสามารถเข้าถึงข้อมูลดังกล่าวอยู่แล้ว รวมทั้งควรมีการพัฒนาข้อมูลให้ทันสมัย ทันเหตุการณ์ เป็นปัจจุบัน และสามารถใช้งานได้จริง เพื่อสร้างความพึงพอใจในการใช้บริการ

คำรหัส: ความพึงพอใจ, ระบบ hot line, กรมควบคุมโรค



บทนำ

ตามมติที่ประชุมคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 18 มีนาคม 2546 ณ กรมประชาสัมพันธ์มีนโยบายและแนวทางการดำเนินการศูนย์ปฏิบัติการนายกรัฐมนตรี (PMOC) ศูนย์ปฏิบัติการกระทรวง (MOC) และศูนย์ปฏิบัติการกรม (DOC) โดยให้เป็นการรวบรวมข้อมูลที่มีการบูรณาการแล้วของทุกกระทรวง ทบวง กรม และรัฐวิสาหกิจ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจของนายกรัฐมนตรี ซึ่งนายกรัฐมนตรีได้มอบนโยบายและแนวทางการดำเนินงานดังกล่าวแก่ทุกหน่วยราชการที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นเพื่อรองรับนโยบายดังกล่าวข้างต้น ประกอบกับกองแผนงานมีภารกิจหลักในการจัดวางระบบข้อมูลข่าวสาร ตลอดจนเป็นศูนย์รวบรวมข้อมูลและระบบเทคโนโลยีสารสนเทศทั้งด้านบริหารและวิชาการของกรมควบคุมโรค จึงได้ตระหนักถึงความสำคัญที่จะต้องพัฒนาระบบและเครือข่ายสารสนเทศเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบริหารจัดการเพื่อการเฝ้าระวัง ป้องกัน ควบคุมโรค ทั้งนี้ระบบข้อมูลสารสนเทศที่มีประสิทธิภาพจะช่วยให้ผู้บริหารสามารถนำข้อมูลทั้งภายในและภายนอกองค์กรมาศึกษา วิเคราะห์ พิจารณา รวมทั้งประเมินสถานการณ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการตัดสินใจในการวางแผนนโยบายและ

แนวทางการดำเนินงานตามภารกิจหลักของกรมได้อย่างถูกต้อง กองแผนงานจึงได้จัดตั้งระบบ hot line ของศูนย์ปฏิบัติการกรมควบคุมโรค โดยให้บริการผ่านคู่สายโทรศัพท์ตอบรับอัตโนมัติและผ่านเจ้าหน้าที่ เพื่อให้บริการข้อมูลข่าวสารต่าง ๆ แก่ผู้สนใจทั่วไปที่สอบถามข้อมูลข่าวสารต่าง ๆ เช่น การระบาดของโรค สถิติโรค ข้อมูลวิชาการและข่าวสารเรื่องโรคอื่น ๆ ผ่านทางโทรศัพท์ โดยเป็นคำถามที่เป็นที่สนใจกันกว้างขวางซึ่งจำนวนเจ้าหน้าที่ไม่สามารถตอบคำถามได้อย่างเพียงพอ ศูนย์ ฯ จะทำหน้าที่แทนเจ้าหน้าที่ดังกล่าวได้ตลอด 24 ชั่วโมง โดยให้บริการผ่านหมายเลข 4 หลักที่จำง่าย (3333) และมีจำนวนคู่สายโทรศัพท์ที่มากพอ สามารถเพิ่มขยายได้ในอนาคต อีกทั้งยังมีระบบ audio text ที่สามารถติดตั้งและกำหนดคำตอบที่ต้องการได้โดยบันทึกเสียงไว้ล่วงหน้า

เพื่อประเมินผลการดำเนินงานของระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการ กรมควบคุมโรค ผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการศึกษาความพึงพอใจ ความคิดเห็น และข้อเสนอแนะของบุคลากรส่วนกลางของกรมควบคุมโรคต่อการให้บริการของระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการ ฯ

วัตถุประสงค์และวิธีการ

การศึกษาครั้งนี้ได้สำรวจความคิดเห็นของบุคลากรกรมควบคุมโรค จาก 14 หน่วยงาน รวม 2,014 คน สุ่มเลือกตัวอย่างแบบง่าย ได้จำนวนตัวอย่าง 334 คน เก็บข้อมูลในช่วงเดือนมกราคม - มีนาคม พ.ศ. 2549 โดยใช้แบบสอบถามซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป ส่วนที่ 2 ความพึงพอใจต่อการให้บริการ และส่วนที่ 3 ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่น ๆ แบบสอบถามถูกส่งไป

ยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง โดยทำเป็นบันทึกขอความร่วมมือเมื่อได้รับแบบสอบถามคืน ได้ตรวจสอบความถูกต้อง ครบถ้วน และสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมเมื่อปรากฏว่าแบบสอบถามไม่ครบถ้วน การวิเคราะห์ข้อมูลประกอบด้วย สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาความสัมพันธ์ด้วย Chi-square กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ผลการศึกษา

จากกลุ่มตัวอย่างจำนวน 334 คน ได้รับแบบสอบถามที่ครบสมบูรณ์ทั้งสิ้น 270 ชุด กลุ่มตัวอย่างประกอบด้วยเพศหญิงร้อยละ 84.8 เพศชายร้อยละ 15.2 อายุเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 41-50 ปีร้อยละ 40 รองลงมาอายุ 31-40 ปีร้อยละ 23 จบการศึกษาระดับปริญญาตรีมากที่สุดร้อยละ

61.9 บุคลากรส่วนใหญ่มีสถานภาพสมรสร้อยละ 56.3 มีตำแหน่งเป็นพยาบาลวิชาชีพ/พยาบาลเทคนิคร้อยละ 28.5 รองลงมาเป็นนักวิชาการสาธารณสุขร้อยละ 25.2 ส่วนใหญ่เป็นบุคลากรระดับ 7-8 ร้อยละ 66.2



พบว่าบุคลากรที่ไม่เคยใช้บริการ call center ร้อยละ 79.6 ในส่วนที่เคยใช้บริการ call center ร้อยละ 20.4 ส่วนใหญ่มีระยะเวลาในการใช้บริการแต่ละครั้งนาน 1-10 นาที ร้อยละ 90.9 บุคลากรที่ไม่เคยใช้บริการ call center นอกกรมควบคุมโรคร้อยละ 71.9 ส่วนที่เคยใช้บริการ call center ของหน่วยงานอื่นนอกกรมควบคุมโรคร้อยละ 28.1 ส่วนใหญ่ใช้บริการจากหน่วยงานเอกชน/นอกสังกัดกระทรวงสาธารณสุขร้อยละ 57.9 รองลงมาเป็นหน่วยงานในสังกัดกระทรวงสาธารณสุขร้อยละ 42.1

ผลการศึกษาพบว่า บุคลากรส่วนใหญ่ไม่เคยใช้บริการ call center ร้อยละ 79.6 และมีความคาดหวังเกี่ยวกับการใช้บริการ call center ในเรื่อง

- การให้บริการ ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่เห็นว่าควรมีความเป็นมิตร พนักงานสุภาพ มีความเอาใจใส่ และกระตือรือร้น ทั้ง 3 อย่างรวมกันคิดเป็นร้อยละ 67.4
- การเข้าถึงบริการ ส่วนใหญ่คิดว่าควรเข้าถึงการบริการภายใน 5-10 นาที ร้อยละ 84.7
- ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่ไม่ระบุลักษณะความสุภาพและความมีมารยาทของพนักงาน ร้อยละ 68.4
- ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่ไม่ระบุความมั่นคงปลอดภัยและอบอุ่นใจของผู้ใช้บริการ ร้อยละ 78.2
- ความเชื่อถือได้ของคำแนะนำส่วนใหญ่เห็นว่าชัดเจน ร้อยละ 62.3
- บุคลากรที่เคยใช้บริการ call center มีระดับความพึงพอใจต่อการให้บริการ call center ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

ด้านผู้ให้บริการ: พบว่าบุคลากรมีความพึงพอใจในภาพรวมอยู่ในระดับปานกลาง ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.17 ซึ่งในทุกคำถามมีความพึงพอใจระดับปานกลางทั้งสิ้น รายละเอียดดังตารางที่ 2

ด้านระบบบริการ: พบว่าบุคลากรมีระดับความพึงพอใจด้านระบบบริการในภาพรวมอยู่ในระดับปานกลาง ค่าเฉลี่ย 3.20 เรื่องที่มีความพึงพอใจระดับมาก ได้แก่ การให้บริการระบบ hotline ของศูนย์ปฏิบัติการมีประโยชน์ต่อผู้ใช้บริการ ค่าเฉลี่ย 3.55 นอกนั้นมีความพึงพอใจระดับปานกลาง รายละเอียดดังตารางที่ 3

ด้านคุณภาพบริการ: พบว่าบุคลากรมีระดับความพึงพอใจด้านคุณภาพบริการในภาพรวมอยู่ในระดับปานกลาง ค่าเฉลี่ย 3.09 ซึ่งในทุกคำถามมีความพึงพอใจอยู่ในระดับปานกลางทั้งสิ้น รายละเอียดดังตารางที่ 4

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

ข้อมูลทั่วไป		จำนวน	ร้อยละ
เพศ	ชาย	41	15.2
	หญิง	229	84.8
อายุ	< 20 ปี	1	0.4
	20-30 ปี	32	11.8
	31-40 ปี	62	23
	41-50 ปี	108	40
	51-60 ปี	54	20
	> 60 ปี	13	4.8
การศึกษา	ต่ำกว่าปริญญาตรี	49	18.1
	ปริญญาตรี	167	61.9
	ปริญญาโท	49	18.1
	ปริญญาเอก	5	1.9
สถานภาพสมรส	โสด	93	34.4
	หม้ายหย่า	20	7.4
	สมรส (อยู่ด้วยกัน)	152	56.3
	สมรส (ไม่ได้อยู่ด้วยกัน)	5	1.9
ตำแหน่ง	บริหาร/ธุรการ/ประชาสัมพันธ์/ตรวจสอบการเงิน	33	12.2
	นักวิชาการสาธารณสุข	68	25.2
	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์นโยบายและแผน	12	4.4
	แพทย์เทคนิค/วิทยาศาสตร์การแพทย์/เภสัชกร	33	12.2
	ผู้ทรงคุณวุฒิ	1	0.4
	เจ้าหน้าที่คอมพิวเตอร์และสารสนเทศ	8	3
	พยาบาล	77	28.5
	อื่น ๆ	38	14.1
ระดับ	ต่ำกว่าระดับ 4	41	15.2
	ระดับ 4-6	98	36.3
	ระดับ 7-8	125	66.2
	ระดับ 9-10	6	2.3
ประวัติการใช้บริการ call center ของกรมควบคุมโรค	ไม่เคย	215	79.6
	เคย	55	20.4
	ระยะเวลา		
ระยะเวลา	1-10 นาที	50	90.9
	11-20 นาที	3	5.4
	21-30 นาที	1	1.8
	> 30 นาที	1	1.8
ประวัติการใช้ call center ของศูนย์ฯ อื่น	ไม่เคย	194	71.9
	เคย	76	28.1
กรณีใช้ศูนย์ปฏิบัติการของหน่วยงานอื่น	หน่วยงานนอกกระทรวงสาธารณสุข	44	57.9
	หน่วยงานในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข	32	42.1

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับความพึงพอใจด้านผู้ให้บริการ

คำถาม	ค่าเฉลี่ย (x)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D)	ระดับ
ความพึงพอใจต่อผู้ให้บริการ			
1. มารยาทในการรับสายโทรศัพท์ของพนักงานประจำศูนย์ที่รับผิดชอบให้คำแนะนำ	3.20	0.704	ปานกลาง
2. คำอธิบายและคำแนะนำในการดูแลป้องกันตนเองให้ปลอดภัย	3.90	0.617	ปานกลาง
3. ความสนใจกระตือรือร้นในการรับฟังปัญหาและตอบคำถาม	3.22	0.786	ปานกลาง
4. ทักษะการถ่ายทอดยาศัยไมตรีของพนักงานประจำศูนย์ปฏิบัติการ	3.22	0.738	ปานกลาง
5. ความรวดเร็วในการให้บริการตอบปัญหา	3.13	0.84	ปานกลาง
6. ความรวดเร็วในการติดต่อโทรศัพท์กับศูนย์ปฏิบัติการกรมควบคุมโรค	3.11	0.742	ปานกลาง
7. ความสามารถในการสื่อความหมายในการตอบข้อสงสัยหรือปัญหาอย่างชัดเจน	3.05	0.705	ปานกลาง
8. ความเชื่อมั่นว่าพนักงานประจำศูนย์ปฏิบัติการกรมควบคุมโรค มีความรู้ความสามารถ	3.18	0.772	ปานกลาง
ในการตอบคำถามเกี่ยวกับการป้องกันควบคุมโรคที่เกิดขึ้นในแต่ละกรณี			
9. ความประทับใจในการให้บริการ	3.16	0.764	ปานกลาง
รวม	3.17	0.601	ปานกลาง

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับความพึงพอใจด้านระบบบริการ

คำถาม	ค่าเฉลี่ย (x)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D)	ระดับ
ความพึงพอใจต่อระบบ hot line			
10. การให้คำแนะนำตอบปัญหาเกี่ยวกับการป้องกันควบคุมโรคในแต่ละเหตุการณ์	3.24	0.769	ปานกลาง
11. ความเชื่อมั่นในข้อมูลที่ได้รับ	3.22	0.712	ปานกลาง
12. ประโยชน์ของระบบ	3.55	0.857	ปานกลาง
13. การให้บริการ	3.33	0.818	ปานกลาง
14. ข้อมูลทั่วไปที่ได้รับ	3.15	0.678	ปานกลาง
15. ความทันต่อสถานการณ์ปัจจุบันของข้อมูล	3.16	0.601	ปานกลาง
16. ข้อมูลเกี่ยวกับการป้องกันและควบคุมโรค	3.15	0.803	ปานกลาง
17. บริการเฉพาะเมื่อเกิดเหตุการณ์ระบาดของโรคหรือเกิดภัยพิบัติ บริการตลอดเวลา เป็นประจำหรือกรณีเหตุการณ์ปกติ บริการโดยเทป	3.16	0.739	ปานกลาง
รวม	3.2	0.617	ปานกลาง



ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับความพึงพอใจด้านคุณภาพบริการ

คำถาม	ค่าเฉลี่ย (x)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D)	ระดับ
ความพึงพอใจต่อคุณภาพบริการ			
18. ความสามารถในการให้บริการ	3.07	0.79	ปานกลาง
19. ความสะดวกรวดเร็วที่ได้รับ	3.22	0.832	ปานกลาง
20. การได้รับบริการทันที	3.16	0.811	ปานกลาง
21. คำแนะนำที่รวดเร็ว	3.11	0.737	ปานกลาง
22. คำอธิบายที่ชัดเจนทุกครั้ง	3.07	0.858	ปานกลาง
23. ความรู้เกี่ยวกับการป้องกันควบคุมโรคต่าง ๆ เพียงพอต่อความต้องการ	3.09	0.776	ปานกลาง
24. ความเพียงพอของข้อมูลด้านต่าง ๆ	2.98	0.707	ปานกลาง
25. การประสานงานในการให้บริการระหว่างหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและสามารถ ตอบสนองความต้องการได้อย่างเพียงพอ	3.00	0.667	ปานกลาง
26. การประสานงานในการขอข้อมูลจากหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง	2.82	0.796	ปานกลาง
รวม	3.09	0.674	ปานกลาง

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับความพึงพอใจด้านการเข้าถึงบริการ

คำถาม	ค่าเฉลี่ย (x)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D)	ระดับ
ความพึงพอใจต่อการเข้าถึงบริการ			
27. ระยะเวลาที่รอคอยระหว่างการให้บริการ	2.89	0.712	ปานกลาง
28. ความคุ้มค่าเทียบกับระยะเวลาที่รอคอยการให้บริการ	3.02	0.733	ปานกลาง
29. ความเข้าใจในการติดต่อสื่อสาร	3.07	0.696	ปานกลาง
30. การติดต่อสื่อสารกับพนักงานประจำศูนย์บริการ	2.95	0.705	ปานกลาง
31. คำแนะนำในการใช้บริการ	2.91	0.823	ปานกลาง
32. การได้รับคำแนะนำในการใช้บริการจากสื่อโทรทัศน์	2.85	0.891	ปานกลาง
33. การได้รับคำแนะนำในการใช้บริการจากสื่อหนังสือพิมพ์	2.85	0.803	ปานกลาง
รวม	3.00	0.667	ปานกลาง



ด้านการเข้าถึงบริการ: พบว่าบุคลากรมีความพึงพอใจด้านการเข้าถึงบริการในภาพรวมอยู่ในระดับปานกลาง ค่าเฉลี่ย 3.00 ซึ่งในทุกคำถามมีความพึงพอใจอยู่ในระดับปานกลางทั้งสิ้น รายละเอียดดังตารางที่ 5

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการให้บริการระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการกรมควบคุมโรค ประกอบด้วย

- ร้อยละ 16.4 ของผู้ตอบแบบสอบถามเห็นว่าควรมีการเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ จัดทำคู่มือต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับศูนย์ ฯ ให้ประชาชนและเจ้าหน้าที่ได้รับทราบ

- ร้อยละ 12.7 เห็นว่าควรเพิ่มพนักงานรับสาย/เจ้าหน้าที่ที่ให้ความรู้ควมมีความรู้ความสามารถที่จะตอบปัญหาได้ทันที

- ร้อยละ 9.1 เห็นว่าควรเพิ่มศักยภาพของศูนย์ปฏิบัติการให้มากขึ้น

ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับความพึงพอใจของบุคลากรส่วนกลาง กรมควบคุมโรค ต่อการให้บริการระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการประกอบด้วยเพศและประวัติการใช้บริการสายด่วนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความพึงพอใจต่อการให้บริการระบบสายด่วน แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอายุ ระดับการศึกษา สถานภาพสมรส ตำแหน่งระดับ และประวัติการใช้บริการของศูนย์ปฏิบัติการอื่น

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านผู้ให้บริการด้านระบบบริการ ด้านคุณภาพบริการ และด้านการเข้าถึงบริการ พบว่าทุกปัจจัยมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความพึงพอใจต่อการให้บริการระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการ

วิจารณ์ผล

ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่ร้อยละ 79.6 ไม่เคยใช้บริการระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการ มีผู้เคยใช้บริการเพียงร้อยละ 20.4 ดังนั้นจึงควรเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ จัดทำคู่มือข้อมูลต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับศูนย์ปฏิบัติการให้ประชาชนและเจ้าหน้าที่ได้รับทราบมากกว่านี้ ความคาดหวังที่ต้องการของบุคลากรที่ไม่เคยใช้บริการเห็นว่าเรื่องของการให้บริการในการรับโทรศัพท์และตอบคำถาม พนักงานควรมีความเป็นมิตร สุภาพ เอาใจใส่ และกระตือรือร้นระยะเวลาในการเข้าถึงบริการควรใช้เวลา 5-10 นาที การพัฒนาบริการของศูนย์ ฯ ควรพัฒนาข้อมูลให้ทันสมัย/ทันเหตุการณ์ เป็นปัจจุบันและสามารถใช้งานได้จริงเพื่อสร้างความพึงพอใจในบริการ

ปัจจัยด้านผู้ให้บริการ ด้านระบบบริการ ด้านคุณภาพบริการ และด้านการเข้าถึงบริการ พบว่าทุกปัจจัยมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความพึงพอใจต่อการให้บริการระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการ นั่นคือเจ้าหน้าที่ที่รับผิดชอบประจำศูนย์ปฏิบัติการควรสนใจเอาใจใส่ในการให้บริการ การให้ข้อมูลที่จำเป็น ความทันสมัยของข้อมูลและข่าวสารที่ได้รับ ความสามารถในการให้บริการ ความสะดวกที่ได้รับจากบริการ ความเพียงพอของข้อมูลและการประสานงานในการบริการ การรอคอยการให้บริการและความเข้าใจในการติดต่อสื่อสารมีผลต่อความพึงพอใจต่อการให้บริการระบบสายด่วนของศูนย์ปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองแผนงาน กรมควบคุมโรค นางสาวพรทิพย์ วิริยานนท์ ที่สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กรมควบคุมโรคทุกท่านที่ให้ความร่วมมือตอบแบบสอบถาม และขอขอบคุณผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน



เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือโรคติดต่อทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ ฯ: โรงพิมพ์การศาสนา; 2540.
2. ธงชัย และ ชัยยศ สันติวงษ์. พฤติกรรมบุคคลในองค์กร. กรุงเทพฯ ฯ: โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด; 2537.
3. บุญธรรม กิจปริดาภิสิทธิ์. ระเบียบวิธีวิจัยทางสังคมศาสตร์. กรุงเทพฯ ฯ: การพิมพ์พระนคร; 2527.
4. พัชรี ทองแท้. คุณภาพบริการพยาบาลตามการรับรู้ของผู้ป่วยในโรงพยาบาลชุมชนเขต 2. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 2540.
5. ภาณี แสนเจริญ. การใช้บริการทางการแพทย์และสาธารณสุขของประชาชน. กรุงเทพฯ ฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; 2539.
6. ภัคสุภพิชญ์ ศรีภักสิทธิ์ และบุญจันทร์ วงศ์สุนทรรัตน์. ความพึงพอใจต่อบริการการพยาบาลของผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในหอผู้ป่วยอายุรกรรมสามัญโรงพยาบาลรามธิบดี. *รามธิบดีพยาบาลสาร* 2539; 10: 70-5.
7. ระวีวรรณ เครือฟ้า และคณะ. ความพึงพอใจของผู้รับบริการต่อบริการของโรงพยาบาลแม่และเด็ก ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพเขต 4 ราชบุรี. โรงพยาบาลแม่และเด็ก, ราชบุรี. 2541.
8. วิโรจน์ ตั้งเจริญเสถียร และคณะ. คุณภาพบริการโรงพยาบาลในสายตาผู้ป่วย. *วารสารการวิจัยระบบสาธารณสุข* 2539; 4: 158-68.
9. สายสมร บุญญาสดิษฐ์ และคณะ. 2539. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับความพึงพอใจของผู้ป่วยที่มาใช้บริการในโรงพยาบาลมหาสารคาม. *วารสารโรงพยาบาลร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม* 2539; 1: 17-24.
10. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. 2537. การควบคุมคุณภาพการพยาบาล. กรุงเทพฯ ฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2537.
11. Ansari, S.P. 1998. Client satisfaction towards health center services in Urban Islamabad. Master's thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
12. Spitzer, R.B. 1998. Meeting consumer expectation. *Nursing Administration* 1998; 12: 1-2.



**Application of a new blood film staining kit
in field operation**

**Ditthakorn Rodnak, Pongwit Bualombai, Praneet Uttarapinyo,
Kanungnit Congpuong, Suebskul Sakolvaree, Komkit Kirdjantug, Chaiporn
Rojanawatsirivet**

Laboratory Reference Center, Bureau of Vector Borne Disease

Abstract

A new blood film staining kit was applied to improve the performance of microscopic malaria diagnosis in endemic areas. One hundred blood staining kits were tested in malaria clinics under the responsibility of the Disease Prevention and Control Office (DPCO) number 2-12. The number of test kits sending to the DPCO varied according to their malaria transmission level. Quality of the new staining kit was compared with the routine staining in terms of their ability to clearly differentiate chromatin, cytoplasm and artifacts caused by stain precipitation. The user satisfaction to the new staining kit was also evaluated. Result showed that quality of the new staining kit was better than the routine staining in term of less artifact forming. 50-64% of microscopists in this study preferred the new blood film staining kit and 85% would like to replace the routine staining by this new staining kit. Further improvement should be the packaging and staining tray.

Key words: Malaria, Giemsa stain, Staining kit



การประยุกต์ใช้ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูป

กิตติการ รอดนาค, พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, ประณีต อุตระภิญโญ, คณิงนิจ คงพ่วง,
สืบสกุล สากลวาริ, คมกฤษ เกิดจันทิก, ชัยพร โรจนวัฒน์ศิริเวช

สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค

บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาชุดย้อมสีสำเร็จรูปเพื่อใช้ย้อมฟิล์มโลหิตในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียอย่างมีประสิทธิภาพและสะดวกต่อการนำไปใช้ในภาคสนาม การศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินผลการประยุกต์ใช้ชุดทดสอบในภาคสนาม ดำเนินการโดยจัดส่งชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูปจำนวน 100 ชุด ให้กับสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2-12 เพื่อนำไปทดลองใช้ในภาคสนาม การประเมินผลประกอบด้วย การประเมินคุณภาพการติดสีของฟิล์มโลหิต การเกิดตะกอนสี เปรียบเทียบกับฟิล์มโลหิตที่ย้อมด้วยยิมฆ่าที่ใช้ในงานปกติ นอกจากนี้ยังได้ประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ ผลการศึกษาพบว่าคุณภาพของการย้อมติดสีฟิล์มโลหิตดีกว่าวิธีการย้อมแบบปกติและพบตะกอนสีน้อยมาก ผู้ใช้มีความพึงพอใจชุดย้อมสีสำเร็จรูปร้อยละ 50-64 และต้องการที่จะนำมาใช้แทนวิธีการย้อมแบบปกติถึงร้อยละ 85 อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบข้อบกพร่องในบางจุดของชุดย้อมสีสำเร็จรูปนี้ เช่น ถาดย้อมสีไม่เหมาะสม ซึ่งคณะผู้ศึกษาจะได้ปรับปรุงก่อนที่จะนำไปขยายผลต่อไป

คำรหัส: มาลาเรีย, สียิมฆ่า, ชุดย้อมสีสำเร็จรูป



บทนำ

ขั้นตอนการตรวจรักษาโรคมalaria เรียกว่าประกอบด้วย การซักประวัติผู้ป่วย เจาะเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อในกระแสเลือด ทำฟิล์มเลือดแล้วย้อมด้วยสียิมฆ่า จากนั้นตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อตรวจพบเชื้อก็จะให้การรักษาหายขาดด้วยยารักษามalaria เรียกว่า การย้อมฟิล์มเลือดเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญต่อการวินิจฉัยโรคมalaria เรียกว่ามีคุณภาพ มีปัจจัยที่สำคัญที่เกี่ยวข้องคือคุณภาพของสียิมฆ่าที่ใช้ย้อม และบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวเจือจางสียิมฆ่า สียิมฆ่าที่ใช้ในงานปกติของมาลาเรียคลินิกได้รับการเตรียมมาจากห้องปฏิบัติการของสำนักงานป้องกันควบคุมโรค หรือศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง ซึ่งการเตรียมต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วันเพื่อให้ได้สีที่มีคุณภาพ ปัญหาที่ทำให้คุณภาพสีย้อมไม่ติดมักเกิด

จากการเก็บรักษา เช่น ปิดฝาไม่สนิททำให้เมธานอลซึ่งเป็นส่วนประกอบของสีระเหยไป หรือมีการปนเปื้อนของน้ำลงไป ในสต็อกของสียิมฆ่าเหล่านี้ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดตะกอนสี และคุณภาพของสีเสื่อม เป็นผลให้การติดสีขององค์ประกอบในฟิล์มเลือด เช่น ตัวเชื่อมมาลาเรีย เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด ผิดไปจากเดิม ทำให้การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในฟิล์มเลือด ผิดพลาดไปได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ประดิษฐ์ชุดย้อมสีสำเร็จรูปขึ้นเพื่อช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้น การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำชุดย้อมสีสำเร็จรูปที่ได้พัฒนาขึ้นไปใช้จริงในภาคสนาม และประเมินผลชุดย้อมสีสำเร็จรูปในด้านคุณภาพของการย้อมและความพึงพอใจของผู้ใช้

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

จุลทัศน์กรของมาลาเรียคลินิกในสังกัดของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 - 12 จำนวน 100 แห่ง ดำเนินการระหว่างเดือนมกราคม 2546 - มิถุนายน 2546

ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูป

ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูปประกอบด้วย กล่องสำหรับใส่อุปกรณ์ย้อมสี 1 ใบ ขวดแก้วสีขาขนาด 100 ซีซี สำหรับใส่สต็อกสียิมฆ่าจำนวน 2 ใบ ขวดพลาสติกสีขาวใสขนาดบรรจุ 50 ซีซี จำนวน 2 ใบ ขวดพลาสติกสีขาวใสขนาดบรรจุ 20 ซีซี จำนวน 2 ใบ ขวดพลาสติกฝาสีน้ำเงินขนาดบรรจุ 30 ซีซี จำนวน 2 ใบ บัฟเฟอร์ชนิดแคปซูลมี 2 ขนาด คือ ขนาด 0.05 กรัมบรรจุ 100 แคปซูล/ซอง และขนาด 0.02 กรัมบรรจุ 100 แคปซูล/ซอง กระดาษกรอง Whatman No. 2 รูปทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. บรรจุ 100 แผ่น/ซอง (รูปที่ 1)

การประยุกต์ใช้ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูป

ขั้นตอนการย้อม

เติมน้ำในขวดผสมที่จะเตรียมสีขนาด 50 ซีซี โดยเติมน้ำลงไป 45 ซีซี หรือเติมน้ำในขวดผสมที่จะเตรียมสี 20 ซีซี โดยเติมน้ำลงไป 18 ซีซี ผงบัฟเฟอร์มี 2 ขนาด คือ



รูปที่ 1 ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูป

ขนาด 0.02 กรัม ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ 18 ซีซี และขนาด 0.05 กรัม ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ 45 ซีซี เทผงบัฟเฟอร์ใส่ขวดผสมแล้วเขย่าให้ผงบัฟเฟอร์ละลาย เตรียมสียิมฆ่าโดยเติมสต็อกยิมฆ่าลงในขวดเตรียมที่ได้เตรียมบัฟเฟอร์ไว้แล้ว 45 ซีซี ให้ครบ 50 ซีซี หรือเติมสต็อกยิมฆ่าให้ครบ 20 ซีซี ในขวดเตรียมสีขนาด 20 ซีซี ที่ได้เตรียมบัฟเฟอร์ไว้แล้ว 18 ซีซี ตรวจสอบกระดาษกรองที่บุฝาด้านในของขวดผสมก่อนปิดฝาขวดและเขย่าขวดเพื่อให้สต็อกยิมฆ่าละลายเข้ากับบัฟเฟอร์ให้ได้



การย้อมฟิล์มเลือด

ย้อมแบบคว่ำนาน 8-10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาดและตากให้แห้ง การล้างสีออกจากฟิล์มเลือด ห้ามเทสีออกจากฟิล์มเลือดโดยตรง แต่ให้เทน้ำล้างสีออกจากฟิล์มเลือดแทน เพื่อป้องกันการเกิดตะกอนสีบนฟิล์มเลือดที่ย้อมแล้ว

การประเมินคุณภาพและความพึงพอใจของผู้ใช้

การประเมินคุณภาพและความพึงพอใจของผู้ใช้ ทำโดยสัมภาษณ์ผู้ใช้ตามแบบสอบถามที่ได้จัดทำขึ้น ประกอบด้วยคำถามจำนวน 10 ข้อ

ผลการศึกษา

ผลการประเมินคุณภาพและความพึงพอใจของจุลทัศน์กรต่อการใช้ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูปจำนวน 100 ตัวอย่าง ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผู้ใช้ประมาณมากกว่าร้อยละ 80 มีความเห็นว่าคุณภาพการติดสีของชุดย้อมสีสำเร็จรูปนี้สามารถย้อมสีได้สวยชัดเจนจนถึงสวยมากชัดเจนทั้งการย้อมสีไซโตพลาสซึม โครมาติน เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง และมีตะกอนสีน้อย ร้อยละ

42 เห็นว่าชุดย้อมสีสำเร็จรูปนี้สะดวกมากกว่าการย้อมสีแบบเดิม ร้อยละ 41 เห็นว่ามีความสะดวกเทียบเท่ากับวิธีเดิม และร้อยละ 13 เห็นว่ามีความสะดวกน้อยกว่าวิธีเดิม สำหรับการประเมินความพึงพอใจ มากกว่าร้อยละ 50 มีความพึงพอใจที่จะใช้ชุดย้อมสีสำเร็จรูปนี้ และร้อยละ 85 เห็นว่าสามารถนำชุดย้อมสีสำเร็จรูปนี้มาใช้แทนวิธีการย้อมตามปกติได้

ตารางที่ 1 ผลการประเมินคุณภาพและความพึงพอใจของจุลทัศน์กรต่อการใช้ชุดย้อมสียิมฆ่าสำเร็จรูป

คุณภาพการติดสีของฟิล์มเลือด	สวยมาก ชัดเจน	สวย ชัดเจน	พอใช้
1. การย้อมไซโตพลาสซึม	22 (22.02%)	57 (57.05%)	18 (18.18%)
2. การย้อมโครมาติน	15 (15.30%)	64 (64.30%)	17 (17.34%)
3. การย้อมเม็ดเลือดขาว	20 (20.20%)	60 (60.60%)	18 (18.18%)
4. การย้อมเม็ดเลือดแดง	17 (19.76%)	51 (59.30%)	12 (13.95%)
จำนวนตะกอนที่เกิดขึ้น	น้อย	ปานกลาง	มาก
5. ปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้น	83 (83.83%)	14 (14.14%)	2 (2.02%)
ความสะดวกเมื่อเทียบกับวิธีเดิม	มากกว่า	ปานกลาง	น้อยกว่า
6. ความสะดวกของวิธีการ	42 (42.42%)	41 (41.41%)	13 (13.13%)
ความพึงพอใจเทียบกับวิธีเดิม	มากกว่า	ปานกลาง	เท่ากับวิธีปกติ
7. ความพึงพอใจ	53 (53.53%)	29 (29.29%)	8 (8.08%)
8. ความเหมาะสมที่จะใช้ในภาคสนาม	64 (64.64%)	13 (13.13%)	7 (7.07%)
9. ความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้แทนวิธีเดิม	85 (85.85%)	5 (5.05%)	7 (7.07%)
10. ค้นหาผู้ป่วยได้เพิ่มมากขึ้น	61 (61.61%)	19 (19.19%)	17 (17.17%)



วิจารณ์ผลการศึกษา

การเตรียมสีย้อมฆ่าและบัฟเฟอร์แบบเดิมมีหลายขั้นตอน ต้องใช้เวลาค่อนข้างมาก ชุดย้อมสีสำเร็จรูปที่ได้พัฒนาขึ้นมาช่วยลดขั้นตอนการเตรียมสีและมีประสิทธิภาพดี เทียบเท่ากับวิธีการเตรียมสีฆ่ามาตรฐาน มีความสะดวกในการใช้งาน ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ได้ในงานภาคสนาม จากการศึกษาผู้ใช้มากถึงร้อยละ 86 เห็นด้วยกับการนำชุดย้อมสีสำเร็จรูปนี้มาใช้ในการพัฒนางานตรวจฟิล์มเลือดให้ได้มาตรฐานเดียวกันทั่วประเทศ การย้อมสีควรเป็นวิธีการเดียวกัน การย้อมสีด้วยชุดย้อมสีสำเร็จรูป

นี้จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่ง

การประยุกต์ใช้ชุดย้อมสีย้อมฆ่าสำเร็จรูปในระยะแรก อาจพบปัญหาบ้าง เพราะยังใหม่สำหรับเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติที่ยังไม่คุ้นกับการปรับเปลี่ยนอุปกรณ์บางอย่าง ดังนั้นจึงควรมีการติดตามประเมินผลอย่างต่อเนื่องเพื่อทราบปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้ชุดย้อมสีย้อมฆ่าสำเร็จรูป และหาวิธีแก้ไขให้ตรงกับความต้องการของผู้ใช้ในระดับมาลาเรียคลินิกและมาลาเรียคลินิกเคลื่อนที่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคคลที่ช่วยให้การศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จ ประกอบด้วย คุณเกษณี กลัดพ่วง นักวิชาการควบคุมโรค 6 เจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการทุกท่าน หัวหน้ากลุ่มโรคติดต่อฯ โดยแมลง

หัวหน้าศูนย์ควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง และหัวหน้าหน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2-12

เอกสารอ้างอิง

1. สิบสกุล สากลวารี. งานชันสูตรโรคมาลาเรียและโรคเท้าช้าง. กรุงเทพฯ ฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด ; 2543.
2. ศิริชัย พรรณธนะ. ปาราสิตวิทยาและการวินิจฉัยโรคเท้าช้างทางห้องปฏิบัติการ. กองโรคเท้าช้าง; 2540.
3. กองมาลาเรีย. คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย. กรุงเทพฯ ฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด; 2545.



