



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยและพัฒนาระบบการจัดการและการเฝ้าระวัง
โรคมลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประภา นันทวรศิลป์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 23662

สัญญาเลขที่ 44/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยและพัฒนาระบบการจัดการและการเฝ้าระวัง
โรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประภา นันทวรศิลป์
คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สันปก

โครงการวิจัยและพัฒนาระบบการจัดการและการเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียง
สัญญาเลขที่ 44/2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 44/2562

ผู้วิจัยขอขอบคุณ แพทย์หญิงหรรษา รักษาคมผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดชลบุรี นายแพทย์สุนทร เจริญภูมิภารกิจนายแพทย์สาธารณสุขจังหวัดตราด ที่ได้ให้การสนับสนุนแก่ทีมงานวิจัยสามารถทำงานได้บรรลุวัตถุประสงค์ ขอขอบคุณ คุณวิชาญ ผาติรัตน์ หัวหน้าศูนย์ควบคุมโรคติดต่อฯโดยแมลง อำเภอมืองตราดและเจ้าหน้าที่กัญญาวิทยาและเจ้าหน้าที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯโดยแมลงทุกหน่วยในพื้นที่ตราดทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในการเข้าพื้นที่ประสานงานกับประชาชนในหมู่บ้านรวมถึงการให้ข้อมูล

ขอขอบคุณคุณณกุล กองทรัพย์และคุณบุรินทร์ ไตรรัตน์สาธารณสุขอำเภอบ่อไร่และสาธารณสุขอำเภอเกาะช้าง คุณรุ่งศักดิ์ ชูกำแพง คุณวัชรินทร์ สีนวลหัวหน้าหน่วยส่วนป่าท่ากุ่มโนโบรุ อุเมตะ คุณบันลือ เพ็ชรมาก ที่ท่านได้อนุเคราะห์ที่พักแก่ทีมวิจัย ทำให้งานวิจัยสามารถทำงานสำเร็จไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Asst. Dr. Ronald A. Markwardt ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทำงานและสนับสนุนยานพาหนะในภาคสนามสำหรับการวิจัยครั้งนี้ด้วย

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 44/2562).

I would like to thank Dr. Hansa Ruksakom, Director of Division of Disease Prevention and Control 6 Chonburi and also Dr. Suntorn Reanpoomparakit, Provincial Public Health Medical Doctor in Trad for endorsing our work in the Malaria endemic area. I appreciated Mr. Mr. Wichan Phatirat, Head of Provincial Vector control in Trad and his entomologist team which helping us to collect mosquitoes in community.

Special thanks are due to Mr. Nukool Kongsap and Mr. Burin Trirat, District Public Health of Borai and KhoChang, and also thanks to Mr. Rungsak Choogumpang, Mr. Watcharin Srinuan and Mr. Boonlue Petmak for providing accommodation during field trips.

Finally, we would like to thank Asst. Prof. Dr. Ronald A. Markwardt for his support and assistance on these research field trips.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้าผู้ช่วยศาสตราจารย์ประภา นันทวรศิลป์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) โครงการวิจัยและพัฒนาระบบการจัดการและการเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

(ภาษาอังกฤษ) Improvement and Development of Malaria surveillance in Eastern part of Thailand

รหัสโครงการ 2366 สัญญาเลขที่ 44/2562 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 5,149,700 บาท (ห้าล้านหนึ่งแสนสี่หมื่นเก้าพันเจ็ดร้อยบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 เดือน ตุลาคม 2562 ถึง 30 กันยายน 2562)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นการนำความรู้จากงานวิจัยพื้นฐานทางระบาดวิทยาร่วมกับนิเวศวิทยาของเชื้อมาลาเรียมาใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายโรคมมาลาเรีย โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทางแพทย์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย การดื้อต่อยา รักษาของเชื้อที่พบทั้งในคนและในยุงพาหะ ให้มีความจำเพาะและแม่นยำยิ่งขึ้น รวมทั้งสำรวจการดื้อต่อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะในแต่ละพื้นที่ที่มีการรายงานพบการติดเชื้อมาลาเรีย โดยอาศัยเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ เข้ามาช่วยในการกำหนดขอบเขตพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (Malaria transmission site; MTS) ทำให้ให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องสามารถเข้าไปทำการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของโรคได้ตรงจุดและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งจากการลงพื้นที่เพื่อเก็บข้อมูล พบว่า ในพื้นที่จังหวัดตราดพบพื้นที่ที่สามารถระบุให้เป็น MTS ได้ทั้งสิ้น 30 MTS ชนิดของยุงพาหะที่มีการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium vivax* เป็นยุงพาหะหลัก คือ *Anopheles dirus* โดยเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่พบทั้งในผู้ป่วยในพื้นที่และในยุงพาหะนั้นมีลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pvmdr1* โดยพบ double mutation คือ Y976F ร่วมกับ F1076L ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะพบในเชื้อที่ดื้อต่อยาคลอโรควินที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *pvcr-t-o* ยุงพาหะที่พบการติดเชื้อมาลาเรียอยู่ใน MTS ที่ถูกจัดให้เป็นพื้นที่ B1 แสดงให้เห็นว่าแม้จะไม่มีรายงานจำนวนผู้ป่วยในพื้นที่ การแพร่กระจายเชื้อที่ก่อให้เกิดมาลาเรียก็มีโอกาสเกิดขึ้นได้ เนื่องจากยังพบยุงพาหะที่ติดเชื้อในพื้นที่ และไม่พบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *kdr* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะในพื้นที่ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคจึงต้องมีความรัดกุมและเร่งค้นหาผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการไปพร้อมกับการควบคุมยุงพาหะหลักในพื้นที่ที่เคยมีการรายงานพบผู้ป่วยมาลาเรีย

Out put/ Out come

ชื่อผลลัพธ์	ประเภท	ปริมาณ	รายละเอียด
เป็นฐานข้อมูลการรับและตอบโต้แบบเร่งด่วนในการเฝ้าระวังมาลาเรียในพื้นที่เสี่ยงแพร่โรค	เชิงปริมาณ	30 MTS	การเรียนรู้ร่วมกันระหว่างผู้วิจัยเจ้าหน้าที่และประชาชนในแต่ละ MTS ทำให้ประชาชนและเจ้าหน้าที่แลกเปลี่ยนข้อมูลซึ่งกันและกันได้
การเฝ้าระวัง MTS ที่มีแหล่งท่องเที่ยว	เชิงปริมาณ	6 MTS	การเฝ้าระวังแหล่งท่องเที่ยวได้แก่ เกาะช้าง เกาะกูดและน้ำตก อุทยานแห่งชาติที่อยู่ในพื้นที่ MTS ต้องมีมาตรการเฝ้าระวังเป็นพิเศษ
ห้องปฏิบัติ Molecular Malaria และศูนย์เฝ้าระวังและตอบโต้โรคมมาลาเรีย	เชิงต้นทุน	1 ห้อง	เป็นห้องปฏิบัติที่มีมาตรฐานสากลสามารถเปิดให้บริการวิชาการแก่หน่วยงานรัฐหรือเอกชน และเป็นแหล่งฝึกอบรม เชื่อมโยงกับหน่วยงานในพื้นที่เป้าหมายและสามารถใช้ในปฏิบัติการเฝ้าระวังและตอบโต้ในสภาวะฉุกเฉินได้ทันที่

ข้อเสนอแนะ

1. การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียจำเป็นต้องทำในทุกพื้นที่ที่เคยมีการระบาด การกำหนดพื้นที่ที่มีลักษณะจำเพาะต่อการแพร่เชื้อจึงจะทำให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ประหยัดงบประมาณในการดำเนินการ
2. ควรมีการค้นหาผู้ที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการในแต่ละพื้นที่ที่เคยมีการระบาด
3. ควรมีการประเมินการกลายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษา รวมทั้งเฝ้าติดตามเชื้อมาลาเรียในเลือดผู้ที่เคยป่วยและได้รับการรักษาจนหายเป็นปกติ เนื่องจากอาจมีเชื้อที่ดื้อต่อยารักษาเหลืออยู่ในร่างกายผู้ป่วยเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ไม่แสดงอาการ ส่งผลให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดการแพร่กระจายของเชื้อผ่านยุงพาหะไปสู่ผู้อื่นได้
4. ยังไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน kdr ที่ส่งผลให้ยุงพาหะตอบสนองต่อยาฆ่าแมลงที่ใช้พ่นตามบ้านเรือนและชุมชน ดังนั้นมาตรการการพ่นยาฆ่าแมลงและการใช้มุ้งชุบสารเคมีจึงยังเป็นวิธีในการป้องกันการแพร่เชื้อจากยุงมาสู่คนได้มีประสิทธิภาพ จึงควรส่งเสริมการป้องกันด้วยแนวทางนี้ต่อไป แต่ทั้งนี้อาจมีการกลายพันธุ์ที่ยีนอื่นที่อาจส่งผลต่อการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในยุงพาหะ จึงควรมีการทดสอบการดื้อต่อสารฆ่าแมลงด้วยวิธี Bioassay รวมถึงการค้นหาการกลายพันธุ์ที่ยีนอื่นร่วมด้วย

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นการนำความรู้จากงานวิจัยพื้นฐานทางระบาดวิทยา ร่วมกับนิเวศวิทยาของ เชื้อมาลาเรียมาใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายโรคมมาลาเรียโดยอาศัย เทคโนโลยีชีวภาพทางแพทย์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย การดื้อต่อยา รักษาของเชื้อที่พบทั้งในคนและในยุงพาหะ ให้มีความจำเพาะและแม่นยำยิ่งขึ้น รวมทั้งสำรวจการดื้อต่อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะในแต่ละพื้นที่ที่มีการรายงานพบการติดเชื้อมาลาเรีย โดยอาศัยเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ เข้ามาช่วยในการกำหนดขอบเขตพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (Malaria transmission site; MTS) ทำให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องสามารถเข้าไปทำการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของโรคได้ตรงจุดและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งจากการลงพื้นที่เพื่อเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล พบว่า ในพื้นที่จังหวัดตราดพบพื้นที่ที่สามารถระบุให้เป็น MTS ได้ทั้งสิ้น 30 MTS ชนิดของยุงพาหะที่มีการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium vivax* เป็นยุงพาหะหลัก คือ *Anopheles dirus* โดยเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่พบทั้งในผู้ป่วยในพื้นที่และในยุงพาหะนั้นมีลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pvmdr1* โดยพบ double mutation คือ Y976F ร่วมกับ F1076L ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะพบในเชื้อที่ดื้อต่อยาคลอโรควินที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *pvcr-t-o* ยุงพาหะที่พบการติดเชื้อมาลาเรียอยู่ใน MTS ที่ถูกจัดให้เป็นพื้นที่ B1 แสดงให้เห็นว่าแม้จะไม่มีรายงานจำนวนผู้ป่วยในพื้นที่ การแพร่กระจายเชื้อที่ก่อให้เกิดมาลาเรียก็มีโอกาสเกิดขึ้นได้ เนื่องจากยังพบยุงพาหะที่ติดเชื้อในพื้นที่ และไม่พบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *kdr* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะในพื้นที่ ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคจึงต้องมีความรัดกุมและเร่งค้นหาผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการไปพร้อมกับการควบคุมยุงพาหะหลักในพื้นที่ที่เคยมีการรายงานพบผู้ป่วยมาลาเรียเพื่อเป็นการสนับสนุนการกำจัดมาลาเรียพื้นที่ตราด

Abstract

The aim of this project focus on applying research basic knowledge of Epidemiology combine with ecology that promote malaria to prevent and control distribution of malaria disease. This research also use medical biotechnology to increasing the effectiveness and precisely of diagnosis malaria parasites in human, malaria vectors and insecticide resistant. Geographic information system technology was used to determine malaria transmission site that can served the public health officer in term of reduce their workload but increase efficacy for controlling disease in particular area. The data which collected from field trip survey in Trat were analyzed and showed 30 malaria transmission sites (MTSs). The species of malaria vector in MTSs carried *Plasmodium vivax* was *Anopheles dirus*. Moreover, *Plasmodium vivax* that found in both human and *An dirus* were found double mutation of Y976F and F1076Lin pvmdr1 gene means *Plasmodium vivax* resistant to Chloroquine. It has no evidence of pvcr-t mutation. All of infected mosquitoes were found in MTS which classify in B1 of malaria control area, imply that these are high risk of transmission area. None of malaria vectors showed mutation in kdr gene mean no resistant to insecticide. Accordingly, surveillance system should be monitor and control malaria vector and search for carrier of malaria disease in hot spot area to support elimination of malaria in Trat.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง-จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
1 บทนำ	
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
1.2 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rationale)	6
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives)	8
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	8
1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	9
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
2 เนื้อเรื่อง	
2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Material and method)	11
2.2 ผลการวิจัย (Result)	21
3 อภิปรายผล (Discussion)	29
4 สรุปและเสนอแนะ (Conclusion and application)	
4.1 สรุป	32
4.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป	32
4.3 ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้	32
5 ผลผลิต (Output)	
5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)	34
5.2 การยื่นจดสิทธิบัตร	34
5.3 ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจหรือบุคคลทั่วไป)	34
5.4 ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)	34
5.5 ประโยชน์ของการพัฒนา Molecular laboratory	35

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	สรุปตัวแปร ตัวชี้วัดและการวัดตามวัตถุประสงค์เฉพาะของการวิจัย	17
2-2	PCR primers ในการตรวจการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย	22
3-1	Ecotope variables defining features noted from entomologist catching at about 10 meters from dwelling and in satellite overlay maps	24
3-2	รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน pvmdr1 และยีน pvcr1-o ของเชื้อมาลาเรีย ชนิดไวแวกซ์ในแต่ละ cluster	33

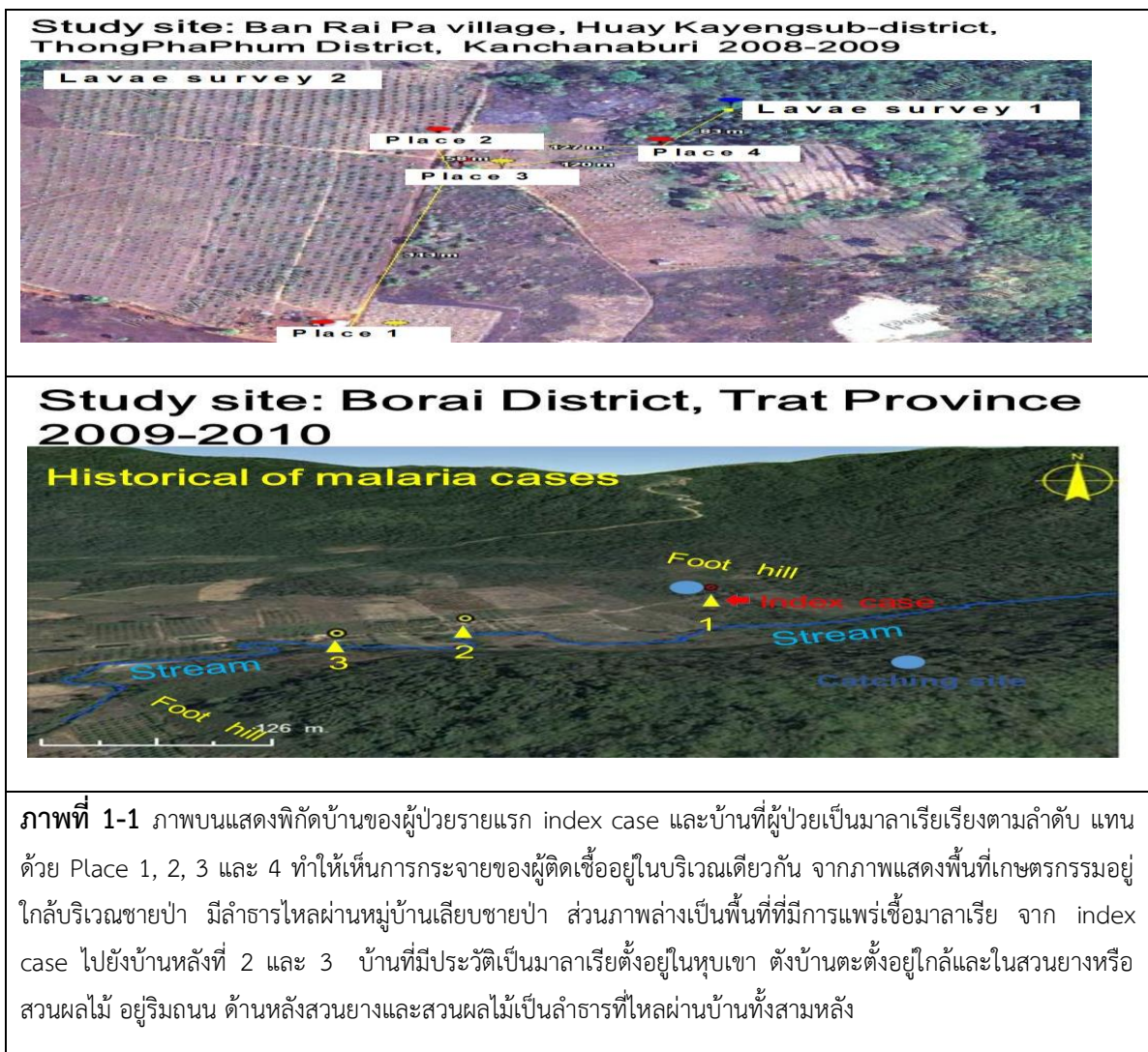
สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1-1	แผนภาพแสดงกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	10
2-1	แสดงพื้นที่การใช้ประโยชน์ที่ดินสิ่งปกคลุมดิน จังหวัดตราด	13
2-2	การกระจายของ MIPs ตามที่อยู่ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในพื้นที่ จังหวัดตราด	14
2-3	แสดงตัวอย่างการเลือกตัวแทน MIP จากภาพ 2-2	15
2-4	ตัวอย่างของการกำหนดขอบเขตการสำรวจพื้นที่แต่ละ MTS และลักษณะการใช้พื้นที่ สิ่งปกคลุมดิน ลักษณะทางภูมิศาสตร์	20
2-5	แสดงแถบ DNA ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดเมื่อย้อมด้วย ethidium bromide	21
3-1	การกระจายของมาลาเรีย case ใน MTS จากปี 2558-2562	32

1. บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำวิจัยมาก่อน

การเฝ้าระวังทางกีฏวิทยาโดยทดลองใช้นิเวศวิทยา ระบาดวิทยาและชีววิทยาของมาลาเรียพาหะ บริเวณชายแดนไทย-พม่า บ้านไร่ป่า ตำบลห้วยเขย่ง จังหวัดกาญจนบุรี ละติจูด 12.59, ลองจิจูด 102.61) และบ้านหินคม ตำบลบ่อพลอย อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด ละติจูด 14.57, ลองจิจูด 98.59) ทั้งสองพื้นที่มีการระบาดของมาลาเรียคล้ายคลึงกัน ดังนั้น ก่อนที่จะหาจุดจับยุง ต้องวิเคราะห์ข้อมูลการติดเชื้อของผู้ป่วยในพื้นที่ว่าใครเป็นคนแรกที่ป่วยเป็นมาลาเรียในช่วงเวลานั้นและมีคนที่ติดเชื้อต่อมาในบริเวณใกล้เคียง



จากการนำข้อมูลผู้ป่วยในพื้นที่มาลงพิกัดทำให้พบ “Hot spot” หลังจากที่ทราบบ้านผู้ที่ป่วยหรือมีประวัติป่วยเป็นมาลาเรียเรียบร้อยแล้ว ต้องมีการสำรวจเดินดินเพื่อเลือกบริเวณที่สามารถจับยุง การจับยุงใช้วิธีคนเป็นเหยื่อล่อจับทั้งในและนอกบ้าน จับยุงสามวันติดต่อกัน วันละ 6 ชั่วโมง 18.00-24.00 น. บันทึกอุณหภูมิ ความชื้นทุกชั่วโมง เก็บข้อมูลจับยุงทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน ทำการจำแนกชนิดยุงทั้ง *Culicine* และ *Anopheline* เก็บเฉพาะยุง *Anopheles* ทั้งหมดฆ่าต่อมน้ำลาย เก็บรักษาต่อมน้ำลายใน 90% alcohol

ตารางที่ 1-1 สรุปผลการจับยุงฤดูแล้งและฤดูฝนทั้งในบ้านและนอกบ้านและนอกบ้าน อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด ปี 2009- 2010

	อำเภอบ่อไร่		อำเภอทองผาภูมิ	
	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง
ในบ้่าน	<i>An. dirus</i> 2	<i>An. dirus</i> 3 <i>An. minimus</i> 5	<i>An. minimus</i> 2 <i>An. aconitus</i> 1 ^b <i>An. maculatus</i> 1	<i>An. dirus</i> 1 <i>An. minimus</i> 2 <i>An. aconitus</i> 1 <i>An. maculatus</i> 1
นอกบ้าน	<i>An. dirus</i> 9	<i>An. dirus</i> 22 ^a <i>An. minimus</i> 12	<i>An. dirus</i> 2 <i>An. minimus</i> 6 <i>An. aconitus</i> 2 ^c	<i>An. dirus</i> 10 <i>An. minimus</i> 10 <i>An. aconitus</i> 3 <i>An. maculatus</i> 12

^a ตรวจพบ *P. vivax* ด้วยวิธี Nested PCR จากต่อมน้ำลาย *An. dirus* 1 ตัว

^b ตรวจพบ *P. vivax* ด้วยวิธี Nested PCR จากต่อมน้ำลาย *An. aconitus* 1 ตัว

^c ตรวจพบ *P. vivax* ด้วยวิธี Nested PCR จากต่อมน้ำลาย *An. aconitus* 1 ตัว

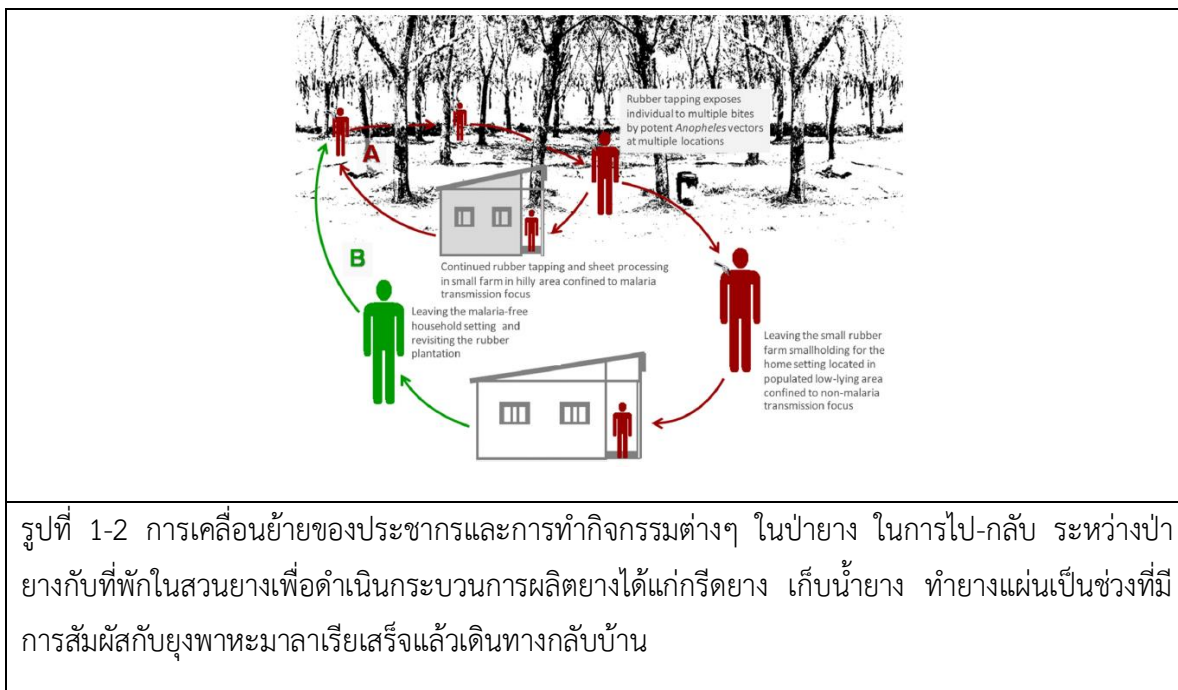
จากการเฝ้าระวังทางกีฏวิทยาโดยใช้หลักการดังกล่าว พบยุงที่ positive *P. vivax* ในยุง *An. dirus* บริเวณพื้นที่ตำบลบ่อยลอย อำเภอบ่อไร่ จันทบุรีในฤดูแล้ง(ธันวาคมและมกราคม) เกษตรกรทำสวนยางพารามีกิจกรรมการกรีดยางและทำแผ่นยางช่วงเวลากลางคืน ซึ่งเป็นเวลาของการออกหากินของยุงพาหะมาลาเรีย หากมีการกรีดยางโดยไม่มีการป้องกันยุงกัดมีโอกาเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียเนื่องจากกิจกรรมการกรีดยางได้ ซึ่งมาตรการการใช้มุ้งชุบสารเคมี การพ่นสารเคมีที่มีฤทธิ์คงค้างไม่สามารถครอบคลุมกิจกรรมของคนกลุ่มเหล่านี้

ในช่วงฤดูฝนที่ บ้านไร่ป่า ตำบลห้วยเขย่ง อำเภอทองผาภูมิ ยุง *An. aconitus* ที่จับได้ทั้งในบ้านและนอกบ้าน ซึ่งออกหากินในช่วงหลังพระอาทิตย์ตกดินทันที พบผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี PCR *P. vivax* ที่บ้านชาวกะเหรี่ยงมีบุตรชายสองคนป่วยเป็นมาลาเรียชนิดเดียวกันคือ *P. vivax* กำลังได้รับการรักษา การที่พบยุงกันปล่องที่ติดเชื้อสามารถบอกถึง

1. พื้นที่บริเวณนี้เป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการแพร่เชื้อมาลาเรีย
2. อาจเป็นไปได้ว่าเด็กทั้งสองเป็นทั้งผู้แพร่เชื้อให้ยุงนั้นหมายถึงการได้รับยาถูกต้องตามขนาดและระยะเวลาการกินหรือไม่ทำให้เกิดการพัฒนาของเชื้อเข้าสู่ระยะมีเพศแพร่ไปให้ยุง
3. ยุงเหล่านี้อาจได้รับเชื้อจากบ้านใกล้เคียงในละแวกเดียวกันซึ่งอาจมีคนเป็นพาหะมาลาเรีย *P. vivax* จากการสัมภาษณ์และการสังเกตพบว่า คนในครอบครัวนี้ไม่นอนในมุ้งโดยให้เหตุผลว่ายุงมีไม่เยอะ ดังนั้นการแพร่เชื้อมาลาเรียคงดำเนินต่อไปหากคนในบ้านและเพื่อนบ้านไม่มีการป้องกันยุงกัด ซึ่งจากภาพจะเห็นบ้านที่ได้รับเชื้อมาลาเรียจากรูป 2 (1, 2)

นอกจากจะทราบชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนแล้ว เราสามารถติดตามการดื้อยา มาลาเรียจากเชื้อที่พบในยุงได้ จากการติดตามการดื้อยามาลาเรียโดยทั่วจะสกัดจากเลือดของคนที่ติดเชื้อทำให้สามารถติดตามการดื้อยาในกลุ่มเดียวกันหรือการดื้อยาแบบข้ามกลุ่มในมาลาเรีย *P. vivax* ได้ ตัวอย่างการศึกษาการดื้อยาในกลุ่ม antifolate pyrimethamine, *P. vivax* DHFR และ *P. vivax* MDR1 (multidrug resistance transporter 1) เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลอโรควิน (3-10)

ตัวอย่างของการทำกิจกรรมได้แก่กรีดยางที่สัมผัสกับยุงพาหะมาลาเรีย Rubber tapping and malaria and malaria exposure

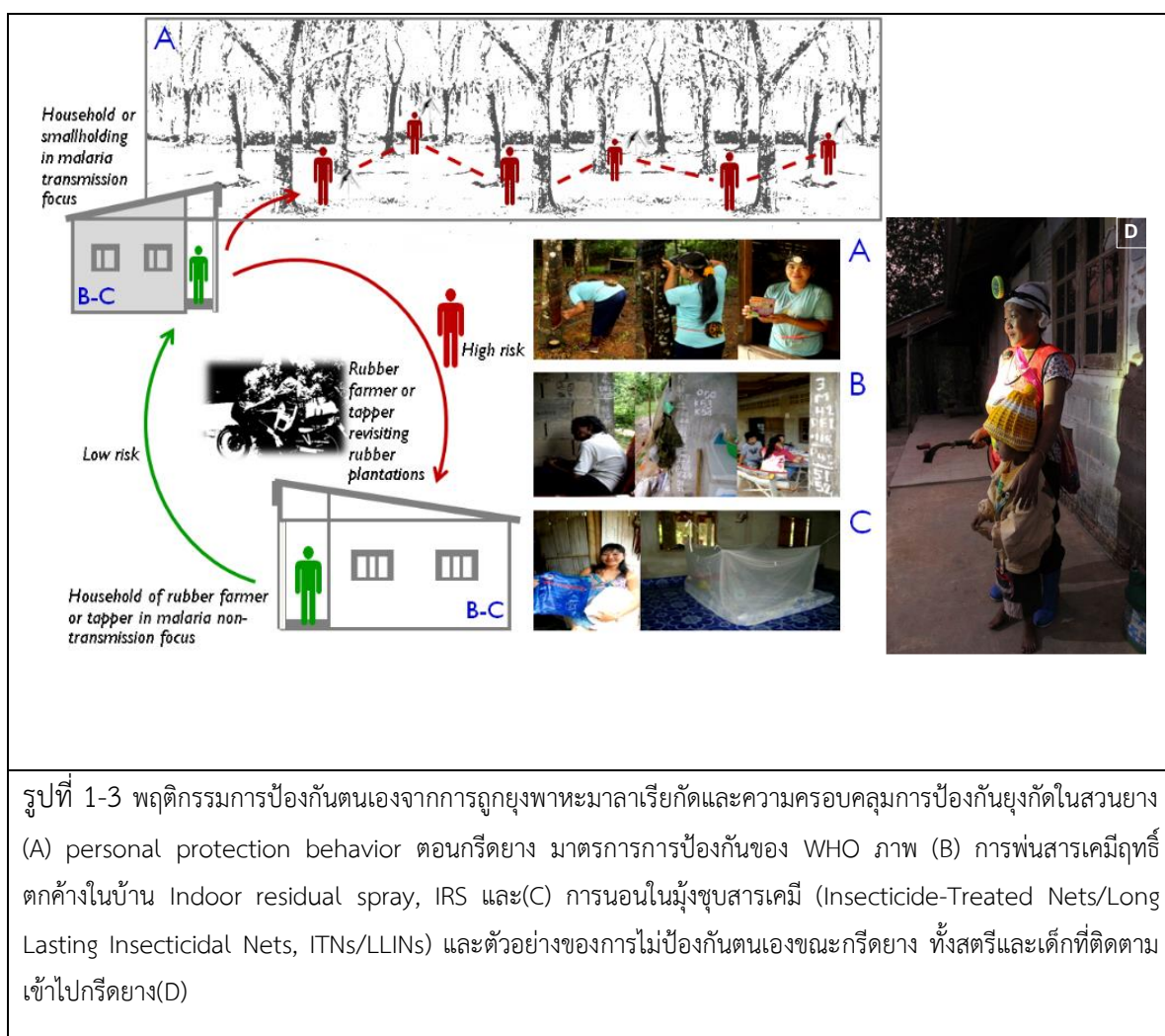


ตัวอย่างของการมีกิจกรรมที่ทำให้คนสัมผัสกับยุงพาหะมาลาเรียมากที่สุดได้แก่การเคลื่อนย้าย ของคนเข้าไปกรีดยางในพื้นที่อาจเป็นลักษณะของการไป-กลับหรือไปค้างแรม กรณีที่สวนยางอยู่ห่างจาก บ้านเป็นระยะทางไกลมากหรือมีป่ายางขนาดใหญ่ คนที่มีอาชีพกรีดยางมักทำที่พักเป็นกระท่อมหรือ บ้านเล็กๆ ในสวนยางพอให้ได้พักหรือเป็นที่รีดแผ่นยาง กิจกรรมกรีดยางจึงเป็นการเข้าไปสัมผัสกับยุง พาหะมาลาเรียซึ่งถูกกัดหลายๆ ครั้งในหลายๆที่ขณะกรีดยาง นอกจากนี้กิจกรรมขณะเก็บน้ำยาง การรีดแผ่น ยางในกระท่อมกลางป่ายางจึงเป็นอีกกิจกรรมหนึ่งที่ทำให้มีโอกาสถูกยุงพาหะมาลาเรียกัด เมื่อได้รับเชื้อ มาลาเรียแล้วก็กลับมาบ้านและกลับเข้าไปกรีดยางซึ่งเป็นการดำเนินชีวิตของคนมีอาชีพทำสวนยางพารา

พฤติกรรมป้องกันตนเองและความครอบคลุมของการได้รับมาตรการการป้องกันจากเจ้าหน้าที่ สาธารณสุข

การป้องกันยุงกัดของคนทำสวนยางเป็นการป้องกันขั้นปฐมภูมิซึ่งต้องพิจารณาเป็นเบื้องต้นใน การป้องกันมาลาเรีย ถ้าคนทำสวนยางกรีดยางใช้มาตรการนี้ป้องกันตนเองขณะกรีดยางช่วงกลางคืน บริเวณสวนยางที่เคยกรีดยางประจำ (Polygonal rubber plantation) ดังรูป 4 (A) จากภาพ B และ C เป็น การใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ตกค้างพ่นภายในบ้าน (Indoor residual spray, IRS) และการใช้มุ้งชุบสารเคมีที่มี

ฤทธิ์ตกค้างยาวนาน (Insecticide-Treated Nets/Long Lasting Insecticidal Nets, ITNs/LLINs) จะใช้มาตรการเหล่านี้ก่อนและระหว่าง peak ของฤดูกาลเกิดโรคมalaria บริเวณพื้นที่แพร่เชื้อ MRPs การใช้ ITNs/LLINs ควบคู่กับ IRS แจกจ่ายไปยังบ้านเรือนที่มีผู้ป่วยมาลาเรียและบ้านใกล้เคียงผู้ป่วย ไม่ว่าบ้านคนเหล่านั้นจะตั้งอยู่บริเวณใดก็ตามอาจเป็นบริเวณที่ไม่ได้อยู่ในพื้นที่แพร่เชื้อหรือเป็นพื้นที่แพร่เชื้อก็ได้ ครอบคลุมของการให้บริการแจกจ่าย ITNs/LLINs, IRS ต่อกลุ่มเป้าหมาย MRPs คนกรีตยาง (แทนด้วยรูปคนสีเขียว) อาศัยอยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่พื้นที่แพร่โรคมalaria แต่มีการเข้าไปกรีตยาง ไปและกลับเข้าไปอาศัยบ้านเล็กในป่ายาง จึงดูเหมือนว่าเป็นอาชีพเสี่ยงหรือพฤติกรรมเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (แทนด้วยรูปคนสีแดง) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเข้าไปกรีตยางหรือทำผลิตภัณฑ์กรีตยางแผ่น สำหรับตัวอย่างภาพ D เป็นชาวต่างด้าวที่รับจ้างกรีตยางและมีลูกติดตามเข้าไปกรีตยาง ซึ่งไม่ได้สวมเสื้อหรือทายาไล่ยุงป้องกันตนเองและบุตร



ความรู้เกี่ยวกับมาลาเรียและพฤติกรรมความเสี่ยงหาการรักษาของประชาชนใน MTS



รูปที่ 1-4 การสัมภาษณ์ผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอาชีพกรีดยาง หาของป่าและหญิงตั้งครรภ์เกี่ยวกับอาการและอาการแสดง การแสวงหาการรักษา และการป้องกันตนเองเพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อมาลาเรีย

การสำรวจความรู้เกี่ยวกับโรคมาลาเรีย อาการและอาการแสดง การติดต่อ การแพร่โรค การแสวงหาการรักษา และการป้องกันตนเองเพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อมาลาเรีย รวมถึงความรู้เกี่ยวกับพาหะมาลาเรียในแต่ละ MTS มีความสำคัญต่อการเฝ้าระวัง เพราะประชาชนที่อยู่ในบริเวณนี้เป็นผู้เสี่ยงต่อการติดและการแพร่หากไม่ป้องกันและเข้าใจการวินิจฉัย เข้าในการรักษา ดังนั้นการสัมภาษณ์และสอนคนใน MTS เป็นข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์และนำมาช่วยพัฒนาระบบเฝ้าระวังมาลาเรียได้เป็นอย่างดี (1, 2)

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

โรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ชายแดนไทย-กัมพูชา (พื้นที่ภาคตะวันออก โดยเฉพาะจังหวัดตราด จันทบุรี สระแก้ว) สถานการณ์การควบคุมการระบาดของมาลาเรียยังให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควรนัก ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การควบคุมไม่ได้ผล มีหลายประการ ได้แก่ สภาพทางภูมิศาสตร์ของประเทศที่เอื้ออำนวยต่อการเพิ่มจำนวนของยุงก้นปล่อง (พาหะนำโรคมาลาเรีย) โดยเฉพาะตามป่าเขาในเขตชายแดน ปัญหาการติดต่อ DELTAMETHRIN ของยุงก้นปล่องในพื้นที่ ปัญหาเรื่องการดื้อยาที่ใช้ต้านเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเกิดจากการใช้ยาที่ไม่เหมาะสมต่อการรักษา โดยเฉพาะในพื้นที่ชายแดนไทยกัมพูชาที่ผู้ป่วยซื้อยามาลาเรียมารับประทานเอง และมีการขายยาปลอม ทำให้เชื่อมีโอกาสในการพัฒนาการดื้อยามากขึ้น นอกจากนี้การป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียของประชาชนในพื้นที่ยังไม่ดีพอ เนื่องมาจากประชาชนในพื้นที่ยังขาดความรู้ (Health

literacy) เกี่ยวกับโรคมาลาเรีย รวมทั้งมีการเคลื่อนย้ายประชากรในพื้นที่ชายแดน ส่งผลให้โอกาสการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียมีมากขึ้น และอีกปัญหาที่ค่อนข้างมีผลอย่างมาก คือ การตรวจวินิจฉัยผิดพลาดและซ้ำ ซึ่งเกิดจากการที่ผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าหนึ่งชนิด (mix-infection) ทำให้ยากต่อการตรวจหาเชื้อมาลาเรียทุกชนิดจากฟิล์มเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่เจ้าหน้าที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย ผู้ป่วยจึงมีโอกาสได้รับยารักษาที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้ยังมีเชื้อมาลาเรียอยู่ในร่างกาย เป็นการเพิ่มโอกาสการแพร่เชื้อจากผู้ป่วยไปสู่ยุงก้นปล่องและจากยุงก้นปล่องไปสู่ผู้อื่นมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชนิดในพื้นที่อีกด้วย คือ *Plasmodium knowlesi* ซึ่งแต่เดิมเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนนั้นมีเพียงสี่ชนิด

เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction; PCR) เป็นวิธีการที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย และการตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อมาลาเรียได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ลดความผิดพลาดในการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียทั้งในยุงและในคน รวมไปถึงการตรวจหายีนดื้อต่อ DELTAMETHRIN ในยุงก้นปล่องได้อีกด้วย ซึ่งจะช่วยให้เจ้าหน้าที่ในพื้นที่สามารถประเมินสถานการณ์การแพร่กระจายของเชื้อ ประเมินการดื้อยาของทั้งเชื้อมาลาเรียและพาหะนำโรคได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การเฝ้าระวังและควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านของเครื่องมือและบุคลากรผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจด้วยเทคนิค PCR ในแต่ละพื้นที่ เจ้าหน้าที่ต้องส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการเฉพาะที่มีความพร้อมภายนอกพื้นที่ ซึ่งต้องรับภาระการตรวจนี้ทั่วประเทศ ทำให้ได้รับการยืนยันผลกลับมาล่าช้า เพื่อความความสะดวกรวดเร็วในการดำเนินการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของมาลาเรียได้ในทันที การจัดตั้งห้องปฏิบัติการเฉพาะสำหรับการตรวจหาชนิดเชื้อมาลาเรียทั้งในคนและยุงพาหะ ยีนดื้อต่อยารักษาของมาลาเรีย รวมทั้งยีนดื้อต่อ DELTAMETHRIN ของยุงพาหะโดยอาศัยเทคนิค PCR ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งห้องปฏิบัติการของคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มีความพร้อมในด้านเครื่องมือและบุคลากรในระดับหนึ่งที่สามารถจะพัฒนาจัดตั้งเป็นห้องปฏิบัติการเฉพาะดังกล่าวได้

นอกจากการจัดตั้งห้องปฏิบัติการเฉพาะเพื่อรองรับการทำงานและการทำวิจัยของเจ้าหน้าที่ในพื้นที่และบุคลากรของมหาวิทยาลัยแล้ว เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ (Geographic information system; GIS) จะถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับระบุพื้นที่แพร่กระจายเชื้อมาลาเรีย (Malaria transmission site; MTS) เพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของมาลาเรียในแต่ละพื้นที่อีกด้วย โดยทางห้องปฏิบัติการจะร่วมมือกับเจ้าหน้าที่ในแต่ละพื้นที่รวบรวมข้อมูลแหล่งแพร่กระจายเชื้อ สภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศของพื้นที่ที่มีผู้ป่วยมาลาเรียเกิดขึ้น ชนิดของเชื้อมาลาเรีย การดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดของยุงก้นปล่อง และการดื้อต่อ DELTAMETHRIN ของยุงก้นปล่องในแต่ละพื้นที่ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์และประเมินสถานการณ์การแพร่กระจายของโรคมาลาเรีย เพื่อนำไปวางแผนแนวทางในการป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรียในพื้นที่ของตนเอง เพื่อให้การทำงานของเจ้าหน้าที่ที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วยิ่งขึ้น

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 วัตถุประสงค์หลัก เพื่อพัฒนาระบบการจัดการและการเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์และเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ

1.3.2 วัตถุประสงค์เฉพาะ

1.3.2.1 เพื่อจัดตั้งห้องปฏิบัติการทางอณูชีวโมเลกุลมาลาเรีย (Molecular Malaria Laboratory)

1.3.2.2 เพื่อศึกษาระบาดวิทยาของโรคมาลาเรียและยุงพาหะนำโรคมาลาเรีย ในแต่ละพื้นที่ (MTS and Malaria ecotope)

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.4.1 ขอบเขตกลุ่มเป้าหมายและพื้นที่

- เจ้าหน้าที่ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงในพื้นที่ที่พบโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
- เจ้าหน้าที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลในพื้นที่ในพื้นที่ที่พบโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
- อาสาสมัคร Malaria Health Detective ในชุมชน (ตัวแทนจากแต่ละพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย)

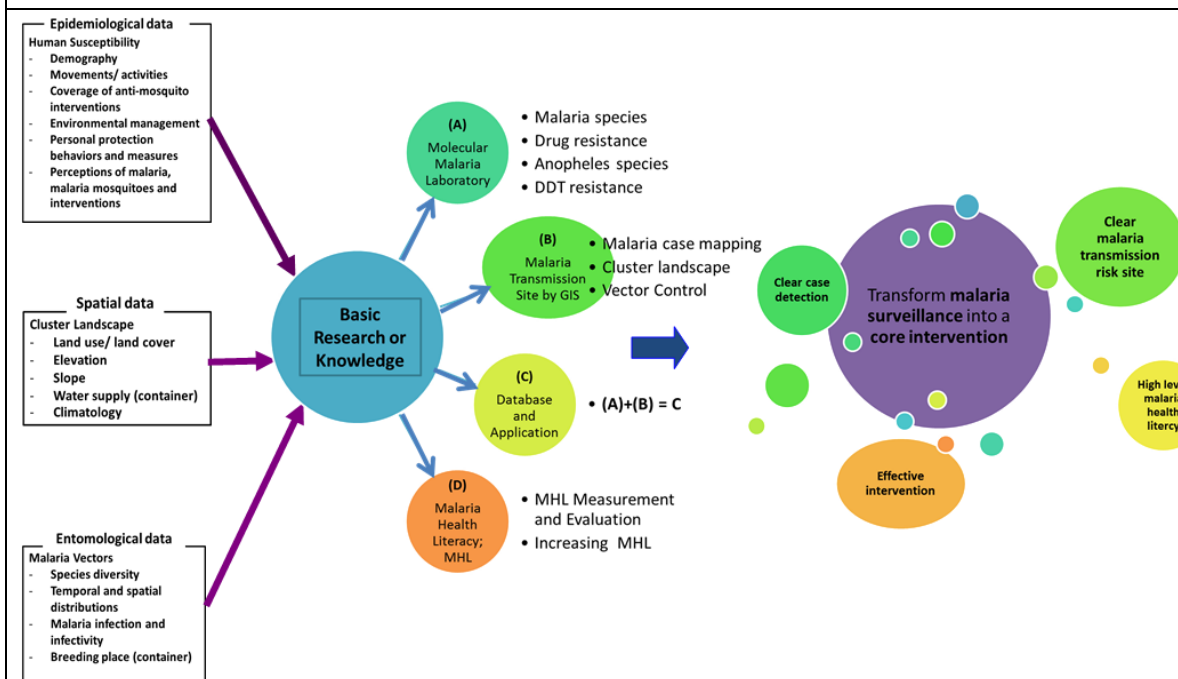
1.4.2 ขอบเขตด้านการศึกษาและวิจัย

- ศึกษาและวิจัยการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียทั้งในคนและในยุง (Case detection) รวมถึงการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อ (Drug resistance) และการดื้อต่อ DELTAMETHRIN (Insecticide resistance) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดยุงในแต่ละพื้นที่ที่มีรายงานพบผู้ป่วยมาลาเรีย โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์
- ศึกษาและวิเคราะห์พื้นที่การติดเชื้อมาลาเรีย (MTSs) ที่สัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมทางภูมิศาสตร์และขอบเขตการกระจายโรคมาลาเรียในแต่ละพื้นที่โดยอาศัยเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ภาพที่ 1-5 แผนภาพแสดงกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย



โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นการนำความรู้จากงานวิจัยพื้นฐานทางระบาดวิทยาร่วมกับ นิเวศวิทยาของเชื้อมาลาเรีย (Ecotope of Anopheles vectors) มาใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันและ ควบคุมการแพร่กระจายโรคมาลาเรีย (Malaria surveillance) โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทางแพทย์ (Molecular Malaria laboratory; A) ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย การติดต่อยารักษาทั้งในคนและในยุงพาหะ ให้มีความจำเพาะและแม่นยำยิ่งขึ้น (Clear Case detection) รวมทั้งการติดต่อ DELTAMETHRIN ของยุงพาหะของแต่ละพื้นที่ที่มีการรายงานพบการติดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งจะมีการนำเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ (GIS; B) เข้ามาช่วยในการกำหนดขอบเขตพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ มาลาเรีย (Clear Malaria transmission site) เพื่อช่วยให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องเข้าไปทำการป้องกันและ ควบคุมการแพร่กระจายของโรคได้ตรงจุดและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยข้อมูล (data) ที่ได้จากแต่ละพื้นที่ จะถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลออนไลน์ (Online database; C) โดยฐานข้อมูลดังกล่าวจะถูกย่อส่วนไว้ใน รูปแบบ Application บนมือถือ เพื่อให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องและประชาชนทั่วไปเข้าถึงข้อมูลได้ง่าย ซึ่ง ข้อมูลในฐานข้อมูลประกอบไปด้วย จำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด ชนิดของยุงพาหะที่มีการ ตรวจพบเชื้อ อัตราการติดยาด้านมาลาเรีย อัตราการติดต่อ DELTAMETHRIN ของยุงพาหะของแต่ละ

พื้นที่ ลักษณะของพื้นที่ที่มีการพบเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะช่วยให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องสามารถประเมินสถานการณ์และวางแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากการมุ่งเน้นการนำความรู้จากงานวิจัยพื้นฐานมาใช้ในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายโรคมาลาเรียในแต่ละพื้นที่แล้ว การสร้างเครือข่าย (Malaria Health Detective Volunteer; D) ในแต่ละพื้นที่ก็เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง จึงต้องมีการประเมินความรอบรู้ทางสุขภาพด้านการติดเชื้อมาลาเรีย (Malaria Health Literacy) ของคนในชุมชน เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มศักยภาพการเป็นเครือข่ายเฝ้าระวังมาลาเรียของกลุ่มเป้าหมายในชุมชน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการจัดการและการเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีประสิทธิภาพ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

มีการพัฒนาห้องปฏิบัติการที่ตอบสนองต่อการวิเคราะห์สถานการณ์การระบาดของโรคมาลาเรียในพื้นที่ ได้ทราบถึงการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียทั้งในคนและในยุง (Case detection) รวมถึงการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อ (Drug resistance) และการดื้อต่อ DELTAMETHRIN (Insecticide resistance) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดยุงในแต่ละพื้นที่ที่มีรายงานพบผู้ป่วยมาลาเรีย โดยประยุกต์เอาข้อมูลทางภูมิสารสนเทศเข้ามาช่วยในการระบุพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายโรค

ผู้ใช้	การใช้ประโยชน์
เจ้าหน้าที่ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงในพื้นที่ที่พบโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	MTS ช่วยเจ้าหน้าที่จัดระดับการทำงานและจัดระดับมาตรการในการควบคุมมาลาเรียมีเป้าหมายของพื้นที่ชัดเจน โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ทางด้านระบาดวิทยาและเจ้าหน้าที่กักกันโรค
เจ้าหน้าที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลในพื้นที่ในพื้นที่ที่พบโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	เจ้าหน้าที่ รพสต. ได้เรียนรู้และประสานกับ จนท. ศตม. เกี่ยวกับการพบคนไข้ติดเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ บอกถึงการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับการสัมผัสระหว่างคนกับยุงพาหะมาลาเรียเกิดขึ้น นำไปสู่การจัดการเพิ่มมาตรการต่างๆ ในบริเวณพื้นที่ดังกล่าว

2. เนื้อเรื่อง

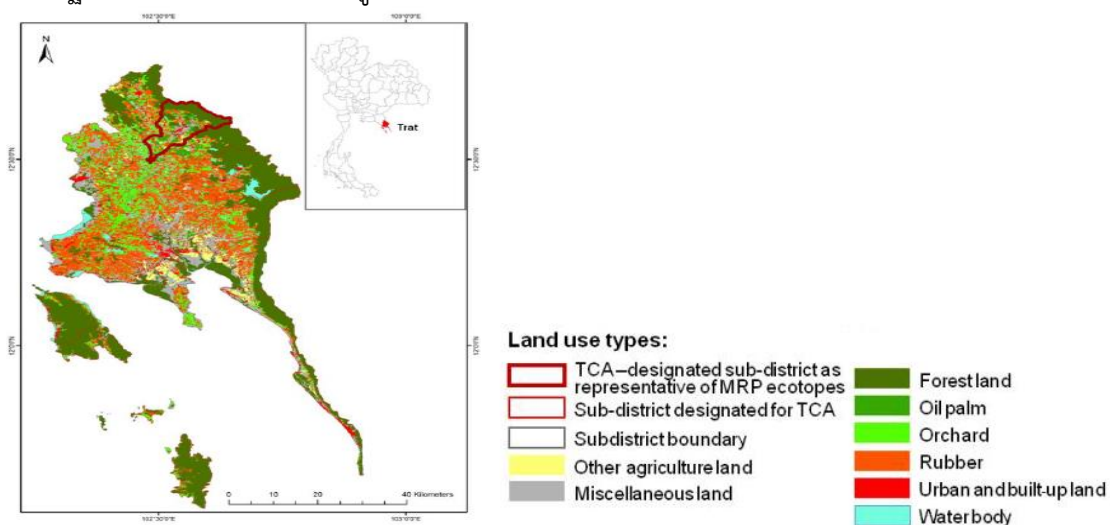
2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย ส่วนที่ 1

วิธีวิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล (Research Methods)

พื้นที่ศึกษา

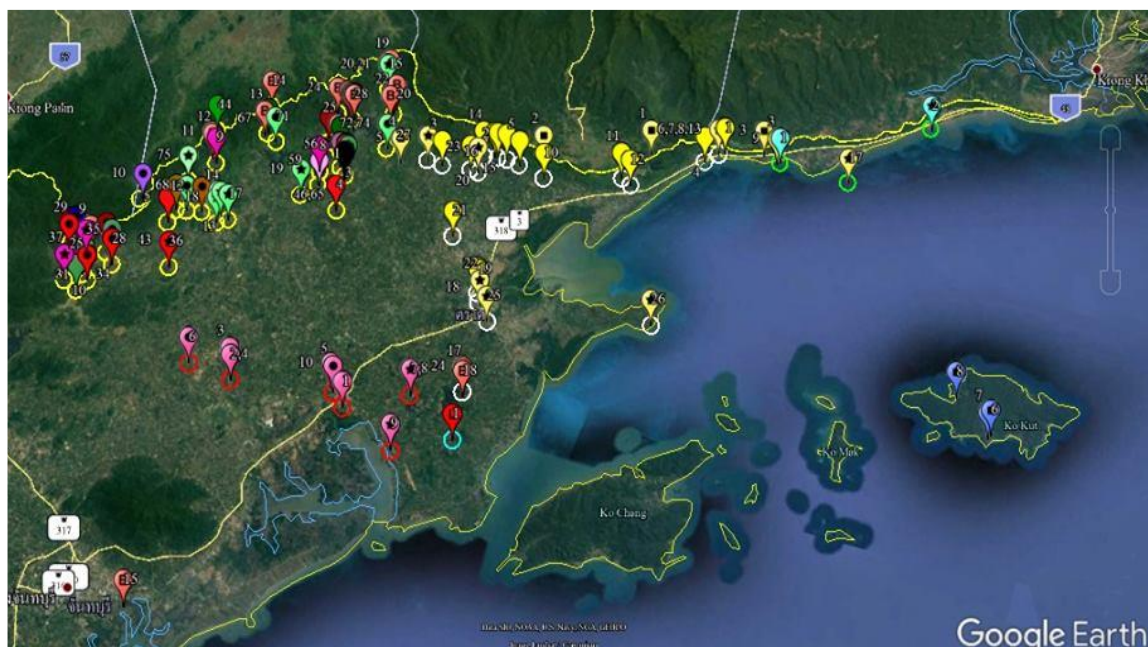
พื้นที่จังหวัดตราด ตั้งอยู่ที่ ละติจูด 12.402 N ถึง 12.758 N. และ ลองจิจูด 102.363 E. ถึง 102.784 E. ประกอบด้วย 7 อำเภอ 38 ตำบล (261 หมู่บ้าน) มีพื้นที่ทั้งหมด 2,917 ตารางกิโลเมตร มีประชากรทั้งสิ้น 28,091 คน จำนวน 11,294 หลังคาเรือน ประชากร 229, 914 คน ลักษณะของพื้นที่ โดยส่วนใหญ่เป็นที่ราบสูงเชิงเขาและเนินเขาเตี้ยๆ มีความสูงจากระดับทะเลปานกลาง 100-836 เมตร พื้นที่การเกษตร สวนยางพารา สวนผลไม้ สวนปาล์มและ มีป่าไม้ดิบชื้นบริเวณเทือกเขาสูง (ภาพที่ 2-1) มี อุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปี 27.3 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 80% (ต่ำสุด-สูงสุด: 67%-92%) เลือกศึกษาจังหวัดตราคนำร่องเนื่องจากเป็นพื้นที่มาลาเรียและมาลาเรียดื้อยาและเป็นจังหวัดในโครงการ เขตเศรษฐกิจพิเศษ ติดชายแดนกัมพูชา



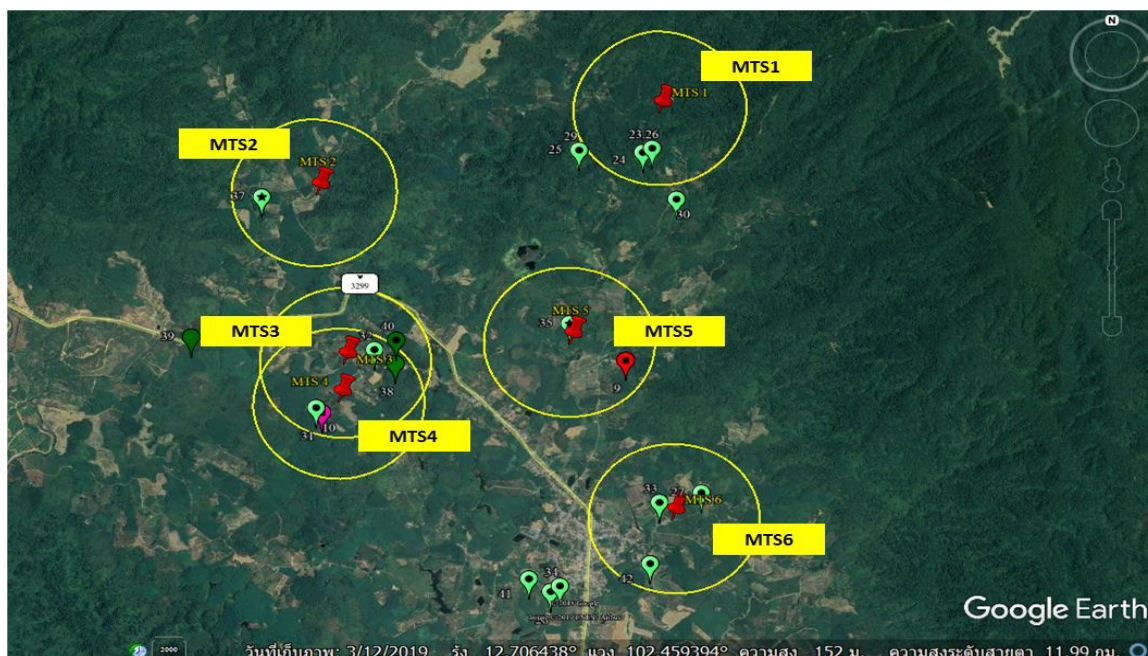
ภาพที่ 2-1 แสดงพื้นที่การใช้ประโยชน์ที่ดินสิ่งปกคลุมให้เห็นป่า ปาล์ม สวนผลไม้ สวนยางพารา ส่วนที่เป็นน้ำและบริเวณที่เป็นสิ่งปลูกสร้าง จังหวัดตราด เกาะกูดและเกาะช้าง ที่ผู้วิจัยนำมาเป็นพื้นที่จังหวัดนำร่อง เกี่ยวกับ MIP (Malaria Infection Pocket) ในภาคตะวันออก

กำหนดขนาดตัวอย่างและการสุ่มเลือกตัวอย่าง

ประชากรที่ศึกษาคือ MIPs Malaria infection pocket หมายถึงพื้นที่ที่เคยมีประวัติผู้ติดเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำข้อมูลพิกัดของผู้ป่วย มกราคม 2557 ถึง มกราคม 2561 มาลงในแผนที่ Google earth โดยจำแนกตามสีในแต่ละปี ภาพ 2-2 หลังจากนั้นทำการเลือก MIP ตัวอย่างที่อยู่ใกล้เคียงกันมากกลุ่มละ 1 MIP ดังภาพที่ 2-3



ภาพที่ 2-2 การกระจายของ MIPs ตามที่อยู่ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในพื้นที่ จังหวัดตราด (ตามรายงานระบาดวิทยาของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง ตราด 2557 ถึง มกราคม 2561 หลังจากนั้นได้ลงพื้นที่สำรวจและซักประวัติการเป็นมาลาเรียเพื่อคัดเลือกพื้นที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 2-3 แสดงตัวอย่างการเลือกตัวแทน MIP จากภาพ 2-2 เพื่อให้ได้ MIP ที่เป็นตัวแทนในการศึกษาในแต่ละพื้นที่ MIP จึงทำการคัดเลือกที่อยู่ใกล้เคียงกันจะทำการเลือกมา 1 MIP ของแต่ละกลุ่ม ทั้งหมดเบื้องต้นได้ 30 MIPs ในช่วงฤดูฝนสามารถเข้าสำรวจได้เพียง 25 MIP เนื่องจากมีอุปสรรคในการเข้าเก็บข้อมูล

การเก็บตัวอย่างยุงกันปล่อง

1. เก็บตัวอย่างยุงโดยใช้คนเป็นเหยื่อล่อบ้านผู้ป่วยที่อยู่ใกล้บริเวณป่ายาง แบ่งเก็บเป็น 2 ฤดูกาล คือฤดูหนาวและฤดูฝน ในแต่ละครั้งจับยุงเป็นจำนวน 3 คืน ติดต่อกันแบ่งจับ polygonal rubber plantation ละ 4 คน 2 คนต่อ 1 ผลิตฯ ละ 6 ชม. เริ่มทำการจับยุงตั้งแต่วันที่ 18.00-06.00 น. บันทึกอุณหภูมิและความชื้น ความเร็วลมทุกชั่วโมง เพื่อนำมาจำแนกชนิดต่อไปโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology, Rattanaarithikul et al., 2006) ผ่าเก็บต่อมน้ำลายยุงเพื่อตรวจโดย PCR (วิธีดำเนินการวิจัยส่วนที่ 2)

2. สำรองลูกน้ำยุงกันปล่องในแต่ละ MIP ทั้งสองฤดูกาล
3. การเก็บตัวอย่างยุงตรวจการดื้อ Deltamethrin ด้วยวิธี PCR (วิธีดำเนินการวิจัยส่วนที่ 2)

ตัวแปรศึกษา ตัวชี้วัดและการวัด

Human susceptibility ในแต่ละ MIP ได้แก่

1) ประวัติการป่วยด้วยโรคมาลาเรียของคนในบ้าน (Malaria Case) สัญชาติไทยและต่าง
 ด้วทุกกลุ่มอายุและเพศและมีประวัติการเจ็บป่วยด้วยโรคมาลาเรียจากทะเบียนรายงาน 506 ในช่วงระหว่าง
 ปี พ.ศ. 2558-2561

2) การตั้งถิ่นฐานบ้านเรือนสิ่งแวดล้อมของบ้านเรือน

3) การเคลื่อนย้ายและการทำกิจกรรมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ MIP

4) การกระจายของการใช้มาตรการควบคุมพาหะนำโรคมาลาเรียในระดับครัวเรือนที่จับยุง
 ในรอบปีของการดำเนินการควบคุมโรคมาลาเรียในพื้นที่ MIP

Malaria Vector Capacity

1) Species diversity

2) Abundance or density,

3) Temporal and spatial distribution,

4) Malaria infection, malaria infectivity

5) Breeding place

Spatial data (Malaria Infection Pocket) MTS land scape

1) Land use/land cover พิกัดจุดของหลังคาเรือนที่มีผู้ป่วยที่อยู่ใน/หรือใกล้ป่ายาง
 ความสูงของที่ตั้งหลังคาเรือนจากระดับน้ำทะเล

2) พิกัดจุดของแหล่งเพาะพันธุ์ยุงก้นปล่องและความสูง ความลาดชัน

3) Polygonal plantation พิกัดจุดของพื้นที่ MIP และ เดินสำรวจภาคพื้นดินรัศมี 1
 ตารางกิโลเมตร

ตาราง 2-1 สรุปตัวแปร ตัวชี้วัดและการวัดตามวัตถุประสงค์เฉพาะข้อ 2-5

วัตถุประสงค์เฉพาะ	ตัวแปร (Variables)	ตัวชี้วัด (Indicators)	การวัด/วิธีการวัด (Measurement/tools)
2	Human susceptibility ในแต่ละ MIP	1.Demography 2.การตั้งบ้านเรือน ถิ่นฐาน 3.Movement and activity 4.ความครอบคลุมของมาตรการควบคุมพาหะนำโรคมาลาเรีย (Vector control intervention coverage หรือ VC)	1. ครัวเรือนที่มีผู้ป่วยโรคมาลาเรีย 2. การตั้งบ้านเรือนในป่ายางหรือห่างจากป่ายาง 3. ชนิด Intervention ที่เคยได้รับ
2-4	พลวัติประชากรยุง	ความหลากหลายของสปีชีส์	การจับยุง แบบ human

วัตถุประสงค์เฉพาะ	ตัวแปร (Variables)	ตัวชี้วัด (Indicators)	การวัด/วิธีการวัด (Measurement/tools)
	พาหะนำโรคมาลาเรีย (Vector population dynamic)	(Species diversity) ความหนาแน่น (vector abundance or density) Vector distribution และการกระจายตามสภาพภูมิทัศน์ (geographical distribution) ในเชิงพื้นที่และเวลา ของยุงพาหะนำโรคมาลาเรีย <i>Anophele</i> spp. สํารวจแหล่งเพาะพันธุ์พาหะมาลาเรีย	landing catch & animal bait <i>Anophele</i> spp. นอกบ้าน ก่อน peak และ peak มาลาเรีย จากบ้านที่อยู่ใน MIP ละ 1 หลังจำแนกชนิดยุง ผ่ายุง สํารวจการติดเชื้อ Plasmodium spp โดย ใช้ PCR จำแนก
2-4	ความสามารถเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่ติดเชื้อ	สปีชีส์ของยุง <i>Anophele</i> <u>ที่มีการติดเชื้อ</u> มาลาเรีย	
5	Spatial data; MTS landscape ลักษณะทางภูมิศาสตร์ สภาพภูมิอากาศของพื้นที่แพร่เชื้อหรือเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อโรค	- ลักษณะทางภูมิอากาศ (Meteorological conditions) ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และความเร็วลม - ลักษณะทางภูมิศาสตร์ (Topography) ลักษณะพื้นที่ ความลาดชัน ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล	1. การใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (GIS) (ทุดิยภูมิ) ในการวิเคราะห์ลักษณะทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่แต่ละ MTS โดยใช้โปรแกรม Google earth pro version 7.3.2.5776 สร้างเส้นชั้นความสูง และวิเคราะห์ลักษณะการใช้พื้นที่และสิ่งปกคลุมดินผ่านภาพถ่ายดาวเทียม
5	Land use/land cover สภาพภูมิทัศน์พื้นที่แพร่เชื้อหรือพื้นที่เสี่ยงต่อการแพร่เชื้อโรคมาลาเรีย	- Landscape classes: พื้นที่ป่าธรรมชาติ พื้นที่เพาะปลูกยางพารา พื้นที่เพาะปลูกปาล์ม พื้นที่เพาะปลูกผลไม้ พื้นที่เพาะปลูกพืชไร่ แหล่งน้ำจืด พื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พื้นที่อยู่อาศัย สิ่งก่อสร้าง และพื้นที่ว่างเปล่า	2. สํารวจข้อมูลภาคพื้นที่ดิน (ปฐมภูมิ) เพื่อการวัดพิกัดจากบ้านที่อยู่ใน MTS เป้าหมาย สํารวจลักษณะทางภูมิศาสตร์ การใช้พื้นที่และสิ่งปกคลุมดิน แหล่ง

วัตถุประสงค์ เฉพาะ	ตัวแปร (Variables)	ตัวชี้วัด (Indicators)	การวัด/วิธีการวัด (Measurement/tools)
			<p>น้ำธรรมชาติ วัดอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และ ความเร็วลม ณ จุดจับยุง ในแต่ละ MTS</p> <p>3. นำข้อมูลจากทั้งปฐมภูมิ และทุติยภูมิ ร่วมกับข้อมูล การสำรวจยุงพาหะ มาลาเรียในพื้นที่มา ประกอบรวมกันในการ วิเคราะห์พื้นที่ผ่าน โปรแกรม Google earth pro</p>

วิธีการศึกษาทางภูมิศาสตร์ใน MTS ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

- 1) สำรวจข้อมูลภาคพื้นที่ดิน เพื่อการวัดพิกัดจากบ้านที่อยู่ใน MTS เป้าหมาย
- 2) กำหนดขอบเขตการสำรวจพื้นที่แต่ละ MTS โดยใช้โปรแกรม Google earth pro version 7.3.2.5776 ระยะห่างนับจากจุดจับยุง 1 กิโลเมตร ไปทางทิศเหนือ ทิศใต้ ทิศตะวันออก และทิศตะวันตก เกิดเป็นพื้นที่สี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่ รวมเป็นพื้นที่ 4 ตารางกิโลเมตร
- 3) สำรวจลักษณะทางภูมิศาสตร์ การใช้พื้นที่และสิ่งปกคลุมดิน แหล่งน้ำธรรมชาติ วัดอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และความเร็วลม ณ จุดจับยุงในแต่ละ MTS รวมทั้งสิ้น 30 MTS

การวิเคราะห์ข้อมูล

- 1) ใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (GIS) คือโปรแกรม Google earth pro ในการวิเคราะห์ ลักษณะทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่แต่ละ MTS สร้างเส้นชั้นความสูง และวิเคราะห์ลักษณะการใช้พื้นที่และ สิ่งปกคลุมดินผ่านภาพถ่ายดาวเทียมด้วยสายตา ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการสำรวจภาคพื้นดิน
- 2) จัดกลุ่มลักษณะพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ แบ่งได้ 1 ประเภท ดังนี้
 - 2.1) พื้นที่ชายฝั่งทะเล คือ พื้นที่ที่อยู่ห่างจากทะเลไม่เกิน 5 กิโลเมตร
 - 2.2) พื้นที่ราบ คือ พื้นที่ที่มีความสูงไม่เกิน 100 เมตรจากระดับน้ำทะเล และมีความต่าง ระดับในพื้นที่ไม่เกิน 100 เมตร

2.3) พื้นที่ราบสูง คือ พื้นที่ที่มีความสูงเกิน 100 เมตรจากระดับน้ำทะเล และมีความต่างระดับในพื้นที่ไม่เกิน 100 เมตร

2.4) พื้นที่เชิงเขา คือ พื้นที่ที่มีความสูงไม่เกิน 100 เมตรจากระดับน้ำทะเล แต่มีความต่างระดับในพื้นที่เกิน 100 เมตรเพียง 1 ตำแหน่ง

2.5) พื้นที่เนินเขา คือ พื้นที่ที่มีความสูงเกิน 100 เมตรจากระดับน้ำทะเล และมีความต่างระดับในพื้นที่เกิน 100 เมตรเพียง 1 ตำแหน่ง

2.6) พื้นที่หุบเขา คือ พื้นที่ที่มีความสูงไม่เกิน 100 เมตรจากระดับน้ำทะเล แต่มีความต่างระดับในพื้นที่เกิน 100 เมตรมากกว่า 1 ตำแหน่ง

2.7) พื้นที่หุบเขาสูง คือ พื้นที่ที่มีความสูงเกิน 100 เมตรจากระดับน้ำทะเล และมีความต่างระดับในพื้นที่เกิน 100 เมตรมากกว่า 1 ตำแหน่ง

2.8) พื้นที่เกาะ คือ พื้นที่ที่แยกตัวออกจากแผ่นดินใหญ่ มีทะเลล้อมโดยรอบ

3) วิเคราะห์ข้อมูลโดยการพรรณนาลักษณะการใช้พื้นที่ สิ่งปกคลุมดิน ลักษณะทางภูมิศาสตร์



ภาพที่ 2-4 ตัวอย่างของการกำหนดขอบเขตการสำรวจพื้นที่แต่ละ MTS โดยใช้โปรแกรม Google earth pro version 7.3.2.5776 ระยะห่างนับจากจุดจับยุง 1 กิโลเมตร ไปทางทิศเหนือ ทิศใต้ ทิศตะวันออก และทิศตะวันตก เกิดเป็นพื้นที่สี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่ รวมเป็นพื้นที่ 4 ตารางกิโลเมตรสำรวจลักษณะทางภูมิศาสตร์ การใช้พื้นที่และสิ่งปกคลุมดิน แหล่งน้ำธรรมชาติ วัตถุธรรมชาติ ความชื้นสัมพัทธ์และความเร็วลม ณ จุดจับยุงในแต่ละ MTS รวมทั้งสิ้น 30 MTS

วิธีดำเนินการวิจัย ส่วนที่ 2

การสกัด DNA จากตัวอย่างด้วยชุดสกัด

การสกัด DNA จากยุงด้วยชุดสกัด

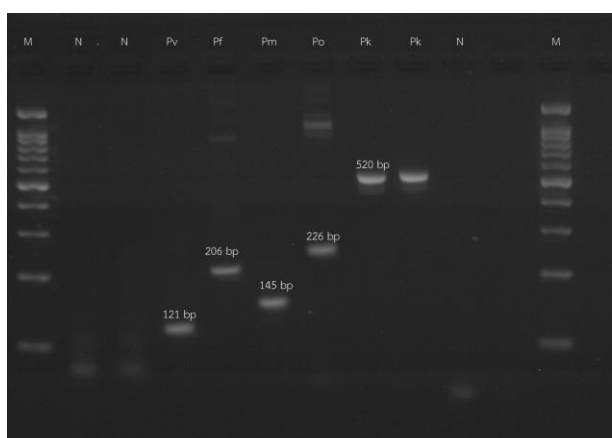
นำยุงที่เก็บจากภาคสนามสนามมาตัดขาและปีกออก ตัดแยกส่วนหัวและลำตัว แยกใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 20 mL โดยแยกตามแหล่งที่เก็บ วัน เวลา และชนิดที่เก็บ จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 180 μ L บดชิ้นส่วนของยุงให้ละเอียดด้วยปลายทิวป์ หลังจากนั้นสกัด DNA ด้วย DNeasy blood and tissue kit (Spin column protocol) ปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท จากนั้นละลาย DNA ที่สกัดด้วย AE buffer 100 μ L เก็บตัวอย่าง DNA ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

การสกัด DNA จากเลือด

สกัด DNA จากตัวอย่างเลือด 200 μ L โดยใช้ DNeasy blood and tissue kit (Spin column protocol) ขึ้นตอนตามคู่มือของบริษัท จากนั้นละลาย DNA ที่สกัดได้ด้วย AE buffer 200 μ L เก็บตัวอย่าง DNA ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

การตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและยุงด้วยวิธี Nested-PCR

ส่วนประกอบของปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อมาลาเรียปริมาตร 20 μ L ประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 μ L, dNTP mix 0.2 mM each, forward primer 0.25 μ M, reverse primer 0.25 μ M, MgCl_2 2 mM, template DNA 2 μ L และ taq polymerase 1.25 units นำเข้าเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้ 95°C 10 นาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบของ 95°C 30 วินาที, 58°C 1 นาที และ 72°C 1 นาทีตามด้วย 72°C 10 นาทีวิเคราะห์ผลด้วย 3 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide



ภาพที่ 2-5 แสดงแถบ DNA ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดเมื่อย้อมด้วย ethidium bromide

M: DNA ladder; N: Negative

Pv: *Plasmodium vivax*

Pf: *Plasmodium falciparum*

Pm: *Plasmodium malariae*

Po: *Plasmodium ovale*

Pk: *Plasmodium knowlesi*

ตารางที่ 2-2 PCR primers ในการตรวจการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย

Primer	5' Sequence 3'	Amplicon size (bp)
rPLU1 (F)	TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA	1,100
rPLU5 (R)	CTTGTTGTTGCCTTAACTTC	
rFAL1 (F)	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	206
rFAL2 (R)	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	
rVIV1 (F)	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	121
rVIV2 (R)	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	
rMAL1 (F)	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	145
rMAL2 (R)	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA	
rOVA1 (F)	ATCTCTTTTGTATTTTTTAGTATTGGAGA	226
rPLU2 (R)	ATCTAAGAAATTCACCTCTGACATCTG	
PkR1550	GAGTTCTAATCTCCGGAGAGAAAAGA	520
PkF1140	GATTCATCTATTAATAAATTTGCTTC	

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *pvmdr1* และยีน *pvcrt-o* จากเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์

Pvmdr1

ส่วนประกอบของปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อมาลาเรียปริมาตร 50 μ L ประกอบด้วย 5X PCR buffer 10 μ L, dNTP mix 1.25 mM each, forward primer 0.5 μ M F3.2 5'ACCAGGATAGTCATGCCC3' (nt 2747–2764), reverse primer 0.5 μ M R3 5'TCTCCCTTTAGGGACATCAAC3' (nt 3384–3368), MgCl₂ 2.5 mM, template DNA 2-4 μ L และ taq polymerase 5 u/ μ L นำเข้าเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้ 94 °C 5 นาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบของ 94 °C 1 นาที, 60 °C 1 นาทีและ 72 °C 1 นาทีตามด้วย 72 °C 10 นาที วิเคราะห์ผลด้วย 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

Pvcrt-o

ส่วนประกอบของปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อมาลาเรียปริมาตร 50 μ L ประกอบด้วย 5X PCR buffer 10 μ L, dNTP mix 1.25 mM each, forward primer 0.5 μ M 5' AAGAGCCGTCTAGCCATCC3' (nt -99–81), reverse primer 0.5 μ M 5'AGTTTCCCTCTACACCCG3' (nt 1069–1086), MgCl₂ 2.5 mM, template DNA 2-4 μ L และ taq polymerase 5 u/ μ L นำเข้าเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้ 94 °C 5 นาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบของ 94 °C 1 นาที, 60 °C 1 นาทีและ 72 °C 1 นาทีตามด้วย 72 °C 10 นาที วิเคราะห์ผลด้วย 1 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

การวิเคราะห์หาตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน *pvmdr 1* และยีน *pvcr-t-o*

สกัด DNA จากเจลด้วยชุดสกัด Gel Extraction kit (Sigma-Aldrich) และวัดปริมาณของ DNA ด้วย nanodrop จากนั้นส่ง DNA ที่สกัดจากเจลไปทำการถอดลำดับเบสที่ Macrogen Korea จากนั้นวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Blast และ Bio Edit Sequence Alignment Editor โดยเทียบกับ reference sequences ที่ดึงมาจาก Gen-Bank *pvcr-t-o* รหัส AF314649 และ *pvmdr-1* รหัส AY571984

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *kdr* ในยุงก้นปล่อง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อมาลาเรียปริมาตร 50 μ L ประกอบด้วย 1X PCR, dNTP mix 0.2 mM each, forward primer 0.3 μ M AaSCR6 – CGACTTGATCCAGTTGGAGA, reverse primer 0.3 μ M AaSCR8 – TAGCTTTCAGCGGCTTCTTC, $MgCl_2$ 2.5 mM, template DNA 3 μ L (amplicon size 612 bp) และ taq polymerase 1.5 u/ μ L นำเข้าเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้ 94°C 3 นาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบของ 94°C 15 วินาที, 55°C 30 วินาทีและ 72°C 30 วินาที ตามด้วย 72°C 10 นาที วิเคราะห์ผลด้วย 2 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

2.2 ผลการวิจัย

ตารางที่ 2-3 Ecotope variables defining features noted from entomologist catching at about 10 meters from dwelling and in satellite overlay maps

MTS	primary + secondary +suspected vectors	Approximate Distance to forest (meters)	Topology	Altitude from MSL (meters)	Landscape Notes	Distance to Rubber plantation	Ecotope change Noted	Water / distance from dwelling	Distance to Palm orchard	animals (other prey)	Electric light	Near Fruit orchard
MTS1	22+0+1	100	Near top of hill	260	Rubber Not being harvested	10 m	No	River / small stream @ 200 m	n/a	Dogs Chicken cats	yes	Yes / sprayed
MTS2	3 +0+6	500	Valley (huay)	160	Step hill side	10 m	Forest being cleared	Shallow	n/a	dogs	No	Yes 30 m
MTS3	1 + 0+32	400	flat	180	Fruit farm	10 m	Vacant land &new fruit planting	B + D@200m	n/a	dogs	yes	Yes / sprayed 0 m
MTS4	1+0+4	250	hillside	100	Between rubber &fruit	0	No	A+D	n/a	Dogs Chicken	No	Yes 10 m
MTS5	7 + 0+1	100	hillside	240	Forest holler	N/A	No	Two small streams	100 m	Dogs	No	Yes 0 m
MTS6	1 +0+ 52	400	lowland	100	Many vacant plots+houses	0 m	yes	canal	180 m	Dogs	yes	Yes/ sprayed

Regarding water: A = Seasonal stream or Huay ; B= All year stream ; C= Canal ; D= Ponds or impound ; E= River; F= Lake or Reservoir

Distances to ecotope features are indicated as meters from the catching site. No distance, e.g. 0 meter from a fruit orchard, mean the catcher sat in the orchard.

ตารางที่ 2-3 Ecotope variables defining features noted from entomologist catching at about 10 meters from dwelling and in satellite overlay maps (cont.)

MTS	primary Vectors + secondary vectors	Approximate Distance to forest (meters)	Topology	Altitude from MSL (meters)	Landscape Notes	Distance to Rubber plantation	Ecotope change Noted	Water / distance from dwelling	Distance to Palm orchard	animals (other prey)	Electric light	Near Fruit orchard
MTS7	8 +0+ 39	1,000	lowland	60	Stream goes Through fruit farm	0 m	palm	Many B+D streams /200m	400 m	Dogs Chicken cats	No	Yes 200 m
MTS8	297+0+ 13	300	Bottom of steep hill	80	Forest holler	0 m	Mixed planting/ many houses	Stream and ponds @ 20 m / yes	250 m	Monkey dog	No	New durian 50 m
MTS9	130 + 0 +35	0	Bottom of hill	100	Parkland, No agriculture	N/A	Forest nursery	Stream + reservoir @ 10 m	N/A	Monkey dogs	No	No
MTS10	0 +0+21	300	Lowland Bottom of forest hill	100	Palm	0	Road & cleared land	B+D @10 m	20 m	Dogs Chicken cats	No	Yes 10 m
MTS11	5 + 0+1	400	Lakeshore	50	Shallow reservoir Changes shore line	0	People Move away	F @ 10 m	20 m	No	No	No
MTS12	30+2+ 225	400	Lakeshore	50	Shallow reservoir	0	Water level changes	F @10 m	N/A	Dogs+ chickens	No	No
MTS13	107+0+ 67	200	Low hill	60	forest	N/A	building	B@200 m D@100 m	400 m			Yes 400 m

A = Seasonal stream or Huay ; B= All year stream ; C= Canal ; D= Ponds or impound ; E= River; F= Lake or Reservoir

ตารางที่ 2-3 Ecotope variables defining features noted from entomologist catching at about 10 meters from dwelling and in satellite overlay maps (cont.)

MTS	primary Vectors + secondary vectors	Approximate Distance to forest (meters)	Topology	Altitude from MSL (meters)	Landscape Notes	Distance to Rubber plantation	Ecotope change Noted	Water / distance from dwelling	Distance to Palm orchard	animals (other prey)	Electric light	Near Fruit orchard
MTS14	7 + 0+52	0	Low land	70	Forest	N/A	Army camp	A@ 100 m	N/A	Dogs	No	No
MTS15	196+0+ 8	0	Valley	100	Forest	N/A	Making preservative area	B@600 m	N/A	6 dogs	No	No
MTS16	47+11+ 89	200	Mountain forest	53 m	Fruit farm/ Coconut/ Logan	0	Rubber in	B@400 m	N/A	Monkeys, 1 dog	No	Yes 10 m
MTS17	92+0+33	200	Foot of the mountain	70 m	MRP	0	Forests	B@400 m A@50 m	N/A	cat	No	No
MTS18	11 +0+ 33	200	Flat	22 m	MRP	0	Pineapple Planting	B@100	200 m	dogs chickens	No	No
MTS19	2 + 264 +8	600	Coastal flat near cliff	10 m	Durian 13 Rai	50	Border forest	D@10 m	350 m	dog	No	Yes

A = Seasonal stream or Huay ; B= All year stream ; C= Canal ; D= Ponds or impound ; E= River; F= Lake or Reservoir

ตารางที่ 2-3 Ecotope variables defining features noted from entomologist catching at about 10 meters from dwelling and in satellite overlay maps (cont.)

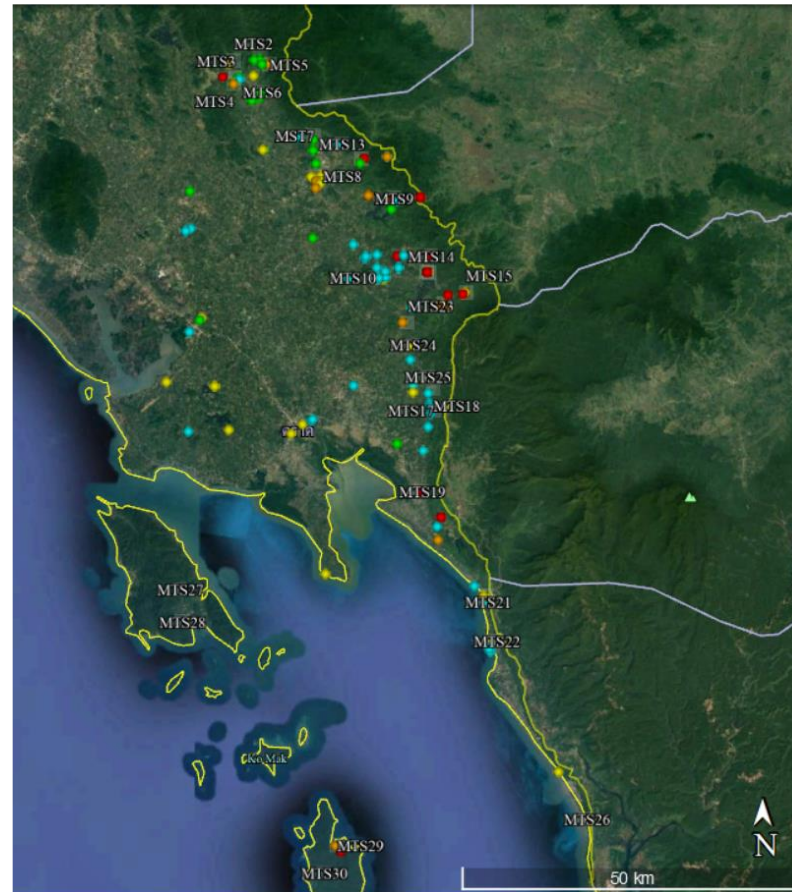
MTS	primary Vectors + secondary vectors	Approximate Distance to forest (meters)	Topology	Altitude from MSL (meters)	Landscape Notes	Distance to Rubber plantation	Ecotope change Noted	Water / distance from dwelling	Distance to Palm orchard	animals (other prey)	Electric light	Near Fruit orchard
MTS20	14 +6+10	60	top of cliff	72 m	Army camp	10	New highway & clear mountain forest (600 m)	A@500 m	N/A	Dog	No	Yes 10 m
MTS21	0 + 10+0	300	Coastal flat near cliff	77	Fruit farm Between mountain forest & brackish forest	100	No	A & D @ 10m	N/A	Dog	Yes	Yes
MTS22	0 +83+2	220	Coastal flat near cliff	50	Fruit farm At foot of mountain forest	400	Large reservoir	A & D @ 10 m	n/a	Chickens Cats	Yes	Yes \ 0 m
MTS23	2 + 0+5	0	Forest	43	Parkland	10	Planting protected tree species	D stagnant @ 700 m	n/a	cows	No	No
MTS24	8 +10+26	800	Flat	43	Fruit farm near palm		Mixed tree farming	B (slow)	10 m	No	Yes	Yes 0 m

A = Seasonal stream or Huay ; B= All year stream ; C= Canal ; D= Ponds or impound ; E= River; F= Lake or Reservoir

ตารางที่ 2-3 Ecotope variables defining features noted from entomologist catching at about 10 meters from dwelling and in satellite overlay maps (cont.)

MTS	primary Vectors + secondary vectors	Approximate Distance to forest (meters)	Topology	Altitude from MSL (meters)	Landscape Notes	Distance to Rubber plantation	Ecotope change Noted	Water / distance from dwelling	Distance to Palm orchard	animals (other prey)	Electric light	Near Fruit orchard
MTS25	5 +0+ 5	400	Flat	57	Rubber plants + pineapple	0	Removing rubber trees across stream	A @ 100m	n/a	Cat Dog chicken	No	No
MTS26	0 + 0+0	n/a	Town / highway / forest	20	Vacant land	800	Hiway construction	None	Suspect malaria imported from Cambodia via forest	Yes	Yes	No
MTS27	18 + 0+0	0	Valley	83	Forest w many streams	20	Planting new rubber	B	n/a	Dog	No	No
MTS28	7 + 8 +4	0	Coastal against mountain	14	Coastal	0	Removing rubber trees	A	n/a	Chicken Dog cat	No	No
MTS29	0 + 2 +0	0	Coastal against mountain	15	Houses near mountain + brackish water	10	Shrimp ponds @ 40 m	B	n/a	Monkey	Yes	n/a
MTS30	1+1+2	0	coastal	100	Houses near mountain + brackish water	200	Making new buildings	B	n/a	Goat Chicken Dog Cat	Yes	coconut

A = Seasonal stream or Huay ; B= All year stream ; C= Canal ; D= Ponds or impound ; E= River; F= Lake or Reservoir



ภาพที่ 2-6 การกระจายของมาลาเรีย case ใน MTS จากปี 2558-2562: สีฟ้า สีเขียว สีเหลือง สีส้มและสีแดงแทนผู้ป่วยมาลาเรียปี 2558, 2559, 2560, 2561 และ 2562 แสดงให้เห็นมาลาเรียผู้ป่วยรายเก่าและผู้ป่วยมาลาเรียรายใหม่เกิดขึ้นบริเวณ MTS ที่เลือกศึกษา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ศึกษาเป็น malaria ecotope

ตารางที่ 2-4 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *pvmdr1* และยีน *pvcr-t-o* ของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ในแต่ละ cluster

No.	Pv sample	Site		<i>Pvmdr1</i>		<i>Pvcr-t-o</i>
		Latitude	Longitude	Y976F	F1076L	
1	<i>An. dirus</i>	12.55118	102.420048	wildtype	wildtype	wildtype
2	<i>An. dirus</i>	12.55118	102.420048	wildtype	wildtype	wildtype
3	<i>An. dirus</i>	12.55118	102.420048	wildtype	wildtype	wildtype
4	<i>An. dirus</i>	12.55118	102.420048	wildtype	wildtype	wildtype
5	<i>An. dirus</i>	12.164609	102.414297	√	√	wildtype
6	<i>An. dirus</i>	12.164609	102.414297	√	√	wildtype
7	Human blood	12.404052	102.71874	√	√	wildtype
8	Human blood	12.404052	102.71874	√	√	wildtype
9	Human blood	12.40514	102.70347	wildtype	wildtype	wildtype
10	Human blood	ติดที่ศรีสะเกษ		wildtype	wildtype	wildtype
11	Human blood	12.40686	102.71201	√	√	wildtype
12	Human blood	12.40686	102.71201	wildtype	wildtype	wildtype
13	Human blood	12.24270	102.42459	wildtype	wildtype	wildtype

จากผลการศึกษา Genotype ของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์จำนวน 13 ตัวอย่างที่พบในเลือดผู้ป่วย (จำนวน 7 ราย) และยุงก้นปล่องในพื้นที่ (จำนวน 6 ตัว) พบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pvmdr1* โดยพบ double mutation คือ Y976F ร่วมกับ F1076L จำนวน 5 ตัวอย่าง แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *pvcr-t-o*

รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *kdr* ยุงก้นปล่องในแต่ละ Cluster

จากการเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องในแต่ละ Cluster ในฤดูหนาว (เดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปีพุทธศักราช 2562) และฤดูฝน (เดือนพฤษภาคม ปีพุทธศักราช 2562) ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *kdr* ด้วยวิธี PCR พบว่าลักษณะจีโนไทป์ของยีนดังกล่าวในยุงก้นปล่องแต่ละ cluster ไม่มีการกลายพันธุ์รูปแบบ L1014F ซึ่งเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบในยุงก้นปล่องที่รอดชีวิตจากการทดสอบการติดต่อสารฆ่าแมลงไพริไทยด์

3. อภิปรายและวิจารณ์

3.1 Epidemiology of malaria in Malaria Transmission Sites

Malaria transmission site (MTS) ทั้ง 30 MTS ได้จากการลงพื้นที่บริเวณที่ผู้ป่วยติดเชื้อ 5 ปีตั้งแต่ปี 2557 จนถึง 2561 ทั้งหมด 81 ราย (รายงานระบาดวิทยาศูนย์ควบคุมโรคติดต่อหน้าโดยแมลง) การวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถศึกษาทุกๆ MIPs ได้จึงเลือก MTS จากการ cluster mapping (MIPs) เป็นตัวแทนในแต่ละ cluster ผนวกกับการรายงานข้อมูลเกี่ยวกับการสำรวจมาลาเรียพาหะในแต่ละ cluster นั้น

จากการทำแผนที่การกระจายของผู้ป่วย 4 ปีย้อนหลัง จะเห็นว่าความหนาแน่นของผู้ป่วยส่วนใหญ่จะอยู่ใกล้บริเวณเขาซึ่งเป็นแนวชายแดนไทยกัมพูชา บริเวณป่าเทือกเขาบรรทัดเป็นบริเวณที่มีเขตหวงห้ามในการบุกรุกเนื่องจากมีอันตรายจากวัตถุระเบิด จึงทำให้สภาพป่ายังมีความสมบูรณ์ทำให้เชื้อต่อเนื้เวคินพาหะมาลาเรีย อย่างไรก็ตามกิจกรรมต่างของมนุษย์ได้แก่ทหาร เจ้าหน้าที่อุทยาน รวมถึงการพัฒนาสร้างถนน การเกษตรกรรมในรูปแบบต่างๆ ทำให้โอกาสที่คนจะสัมผัสสูงมีมากขึ้น

เมื่อดูจากแผนที่จะเห็นความหนาแน่นของผู้ป่วยมาลาเรียกระจายเป็นกลุ่มเรียงตัวอยู่บริเวณใกล้ภูเขาในอำเภอบ่อไร่ ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยในพื้นที่บ่อไร่มาก่อนเนื่องจากเป็นพื้นที่มีมาลาเรียมากที่สุด และการกระจายของ malaria case จะทอดยาวไปทางใต้บริเวณรอบเมืองตราด หาดเล็ก คลองใหญ่ เกาะช้างและเกาะกูด ในช่วงระหว่างที่ทำการวิจัยได้มีผู้ป่วยมาลาเรียรายใหม่เกิดขึ้นทั้งหมด 21 ราย ผู้ป่วยรายใหม่เป็นทหารทั้งหมด 9 ราย (*P. vivax* = 5, *P. malariae* = 3, *P. falciparum* = 1) ทำสวนยาพารา 4 ราย (*Pv* = 3, *P. knowlesi* = 1) ทำสวนผลไม้ 3 ราย (*Pm* = 2, *Pk* = 1) รับจ้างทั่วไป 3 ราย (*Pk* = 3) หาของป่า 1 ราย (*Pm*) เป็นนักเรียน 1 ราย (*Pf*) ซึ่งเมื่อทำการ mapping ผู้ป่วยรายใหม่ 7 มกราคมถึง 9 กันยายน 2562 พบว่ากระจายอยู่ในบริเวณพื้นที่ MTS ที่ศึกษาได้แก่ MTS 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23 และ 29 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า MTS ที่ศึกษาเป็น malaria ecotope เมื่อวิเคราะห์การพบผู้ป่วยมาลาเรียจากปี 2561-2562 พบ MTS ที่มีผู้ป่วยติดเชื้อตั้งแต่ 2 คนขึ้นไปคือ MTS 9, 11, 12, 14, 15, 16, 29 อาชีพทหารและอาชีพทำสวนยาพาราพบมาลาเรียชนิด *Pv* มากที่สุด ซึ่งช่วงฤดูหนาวได้เข้าสำรวจงูพาหะมาลาเรีย 3 วัน ใน MTS17 อยู่ใกล้ฐานทหารพบ *An. dirus* positive *P. vivax* ทั้งหมด 4 ตัว จากการตรวจพาหะหลักที่จับได้โดยวิธีใช้ Human landing catch ได้ 24 ตัว ทำให้ทราบว่าบริเวณพื้นที่นี้มีความเสี่ยงสูงในการแพร่เชื้อมาลาเรีย แต่พื้นที่ดังกล่าวถูกจัดให้เป็นพื้นที่ B1 กล่าวคือ ไม่มีรายงานการพบผู้ติดเชื้อในพื้นที่มานานกว่า 1 ปี แต่มีงูพาหะหลักในพื้นที่ ดังนั้นการพบงูพาหะหลักที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ในพื้นที่ แสดงให้เห็นว่ามีผู้ติดเชื้อมาลาเรียแต่ไม่แสดงอาการอยู่ในบริเวณพื้นที่ อีกทั้งเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ที่พบในงูพาหะหลักดังกล่าวมีลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *mdr1* ชนิด double mutation คือ Y976F ร่วมกับ F1076L ซึ่งลักษณะดังกล่าว จะพบในเชื้อที่ติดต่อยาคลอโรควินที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* จากผลการสำรวจในครั้งนี้ จึงอนุมานได้ว่าผู้ที่เคยติดเชื้อมาลาเรียที่อาศัยอยู่ในพื้นที่นี้อาจได้รับเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ที่ื้อยา จึงทำให้อาจมีเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ร่างกายในปริมาณต่ำ จึงไม่แสดงอาการ เป็นเหตุให้ไม่มีการรายงานผู้ป่วยในพื้นที่ แต่พบการแพร่กระจายของเชื้อในงูพาหะหลัก เช่นเดียวกับในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียอื่นๆ เช่น ทาง

ภาคตะวันตกและภาคใต้ของประเทศไทย และในทวีปแอฟริกาและอเมริกา (11)(12-20)สำหรับ MTS18 ฤดูเดียวกันเป็นพื้นที่สวนยางพาราติดกับค่ายทหารสำรวจจุง 3 วัน พบ *An. dirus* 2 ตัวติดเชื้อ Pv ทั้งสองตัว ดังนั้น MTS17,18 เป็น malaria ecotope ที่มีความเสี่ยงแพร่โรคสูง เนื่องจากพบทั้งพาหะหลักและตรวจพบเชื้อมาลาเรีย จากการสัมภาษณ์ผู้ที่อยู่โดยรอบบริเวณ MTS 17, 18 เกี่ยวกับการนอนในมุ้งชุบสารพบว่าส่วนใหญ่เป็นทหารและไม่ได้นอนเปลชุบสารเคมีหรือนอนในมุ้งชุบสารเคมี ดังนั้นผู้ที่อาศัยอยู่ในบริเวณพื้นที่ดังกล่าวในขณะที่ผู้วิจัยทำการเก็บข้อมูลและสังเกตจะเห็นชาวพม่ามารับจ้างตัดไม้ยางพาราอยู่ห่างจากค่ายทหารประมาณ 200 เมตร ภายหลังเสร็จกิจกรรมตัดไม้ยางพาราคนเหล่านี้ได้กางเต็นท์เป็นที่พักอาศัยชั่วคราวและไม่มีไฟฟ้า การทำกิจกรรมการตัดไม้และการกางเต็นท์ในสวนยางพาราของคนที่เคลื่อนย้ายมาพักแรมชั่วคราวจึงมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียและเป็นผู้แพร่เชื้อมาลาเรียเมื่อเคลื่อนย้ายไปบริเวณ malaria ecotope เนื่องจากการแบ่งพื้นที่แพร่เชื้อมาลาเรียได้ใช้เขตของทางด้านการปกครองในการใช้บริหารจัดการ การใช้มาตรการ vector control ในการใช้ ITNS และ IRS ซึ่งบริเวณ MTS 17, 18 จัดเป็นพื้นที่ B ดังนั้นจึงไม่มีการเข้าไปติดตาม ดังนั้นหากจะต้องการกำจัดมาลาเรีย ต้องติดตามมาตรการ vector control บ้านเรือนของประชาชนใน MTS และเข้มงวดการป้องกันตนเองจากยุงพาหะมาลาเรียใน malaria ecotope เหล่านี้

3.2 Distribution of Vectors in MTS

3.2.1 จากการสำรวจจุงทั้ง 30 MTSs พบว่ามีจำนวนพาหะหลัก (*An. dirus*, *An. minimus* and *An. maculatus*) จำนวนที่จับได้มีความแตกต่างกันอย่างมากตั้งแต่ไม่พบเลย (MTS10) จนกระทั่งถึง 297 ตัว (MTS8) ลักษณะเช่นนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ ecotope และการเปลี่ยนแปลงของการพื้นที่การทำเกษตรและกิจกรรมของเกษตรกรที่มีผลต่อพาหะหลัก จำนวนพาหะหลักที่จับได้ในสวนยางตัดชายป่า(MTS8) หรือบริเวณที่ทำการเพาะกล้าไม้เขตอุทยาน(MTS9)หรืออุทยานน้ำตกคลองแก้วที่เป็นแหล่งท่องเที่ยวต่างๆ (MTS13) มีแนวโน้มของการจับพาหะหลัก *Anopheles dirus* และชนิดอื่นๆได้มากกว่าการจับยุงในสวนผลไม้มังคุด สวนทุเรียนที่อยู่ใกล้บริเวณชายป่าเขาและมีลำธาร(MTS5) จับพาหะหลักได้น้อยลง กิจกรรมของเกษตรกรที่เกี่ยวข้องกับการที่พบพาหะหลักน้อยลงในบริเวณสวนผลไม้ใกล้ชายป่าเขา เนื่องจากชาวสวนจำเป็นต้องรักษาบำรุงผลผลิตของตนเองต้องทำการฉีดพ่นสารเคมีฆ่าแมลง หนอน เพลี้ย ให้อายุสวนมังคุดและสวนทุเรียน จนกว่าจะถึงเดือนพฤษภาคมซึ่งเป็นช่วงเก็บผลไม้ ช่วงเก็บผลไม้ไม่ฉีดพ่นยาแต่มีการใช้ยาฆ่าแมลงใส่ขวดพลาสติกและห้อยไว้ตามเชือกที่ขึงไปตามต้นผลไม้เพื่อให้กลิ่นเหล่านี้ไล่ช้างที่มารบกวนการกินผลไม้ ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุทำให้พาหะหลักเข้ามาหาถิ่นบริเวณสวนผลไม้เหล่านี้ลดลงทั้งในช่วงฤดูหนาวและฤดูฝนทำให้จับยุงได้น้อย ทำให้โอกาสของชาวสวนผลไม้ที่จะสัมผัสยุงมาลาเรียพาหะลดลง กิจกรรมของชาวสวนมังคุดและทุเรียนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้แก่การเก็บมังคุดสายเลือด (มังคุดที่มีจุดแดง 2-3 จุดแต่มีผิวสีเขียว) ซึ่งต้องเก็บตอนหัวค่ำถึงกลางคืนชาวสวนจะได้มองเห็นจุดสีแดงบนผิวมังคุดชัดเจนซึ่งจะได้ราคาดีที่สุด สำหรับบริเวณรอบบ้านที่นั่งจับยุงที่มีแสงสว่างจะมีผลต่อการจับยุงพาหะมาลาเรีย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการจับยุงใน MTS ต่างๆ จะพบว่าจำนวนพาหะหลักมีแนวโน้มลดลงหากเป็น MTS ที่มีความสลับซับซ้อนของพืชพรรณที่ปกคลุมดินตัวอย่างเช่น MTS ที่อยู่ใกล้ป่าเชิงเขาที่ถูกล้อมรอบด้วยปาล์มและสวนยางพาราจะพบพาหะหลักน้อยกว่า พื้นที่ที่เป็นสวนยางพาราตลอดจนถึงชายป่า และพื้นที่ MTS ที่ล้อมรอบด้วยปาล์มจะได้พาหะหลักลดลงเช่นเดียวกัน

An. sondaicus spp. complex เป็นพาหะรองที่มีในความสำคัญพบในหลาย MTS ที่กระจายโดยเฉพาะบริเวณชายฝั่งจนถึงเกาะกูดและเกาะช้าง หรือพบบริเวณที่มีนิเวศน์เชิงภูมิทัศน์ที่ราบและมีแอ่งเก็บน้ำ (stagnant water) ซึ่งบ่งบอกว่าเป็นป่าที่อยู่ใกล้ทะเลหรือมีป่าอยู่บนเกาะ การวิจัยครั้งนี้พบ *An. sondaicus* spp. complex ที่พบร่วมกับพาหะหลัก ใน MTS (MTS16) อุทยานทุ่งไถ้หรือ MTS24 การพบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในพื้นที่ malaria ecotope มีพื้นที่ MTS ที่สามารถเอื้อทั้งพาหะหลักและพาหะรองได้ ซึ่งทำให้เห็นความสามารถของการปรับตัวของ *Anopheles* vector กับการเปลี่ยนแปลงนิเวศน์

การสำรวจครั้งนี้พบพาหะสงสัย *An. barbirostris*, *An. campresstirs* กับพาหะหลักและแนวโน้มพบมากขึ้นเมื่อพื้นที่ MTS อยู่ในพื้นที่ราบ ความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 40-180 m สามารถเพาะพันธุ์ในแหล่งน้ำคล้ายพาหะหลักแต่ชอบแสงแดดไม่ห่างจากแหล่งอาหารมากนัก พบพาหะชนิดนี้ความหนาแน่นลดลงน้อยหรือไม่พบเลยใน MTS บริเวณชายฝั่งทะเล จากการตรวจเชื้อมาลาเรียในยุงชนิดนี้ยังไม่พบเชื้อแต่มีบางรายงานว่าพบแต่ oocyst (20) ในพาหะชนิดนี้แต่ยังไม่พบ sporozoite ยังไม่จัดเป็นพาหะนำเชื้อในมาลาเรีย ecotope

จากการทำวิจัยครั้งนี้ทำให้สามารถรวบรวมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับ malaria ecotope ที่นำไปพัฒนาระบบการเฝ้าระวังป้องกันและควบคุมมาลาเรียในพื้นที่เป้าหมายค่อนข้างชัดเจน ผู้วิจัยได้ออกแบบการทำ database จากงานวิจัยที่ได้ข้อมูลเพื่อเป็นตัวอย่างในการนำข้อมูลเหล่านี้ไปสู่การปฏิบัติและสามารถนำเข้าสู่โปรแกรม application ในมือถือจากการเชื่อมโยงเครือข่ายระหว่างผู้ที่อาศัยในพื้นที่แพร่โรคและเจ้าหน้าที่มาลาเรียทำให้การกำจัดมาลาเรียมีโอกาสเป็นไปได้มากยิ่งขึ้น

4. สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัย (conclusion)

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นการนำความรู้จากงานวิจัยพื้นฐานทางระบาดวิทยาร่วมกับนิเวศวิทยาของเชื้อมาลาเรียมาใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายโรคมาลาเรีย โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทางแพทย์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรีย การต่อต่อยารักษาของเชื้อที่พบทั้งในคนและในยุงพาหะ ให้มีความจำเพาะและแม่นยำยิ่งขึ้น รวมทั้งสำรวจการต่อต่อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะในแต่ละพื้นที่ที่มีการรายงานพบการติดเชื้อมาลาเรีย โดยอาศัยเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ เข้ามาช่วยในการกำหนดขอบเขตพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (Malaria transmission site; MTS) ทำให้ให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องสามารถเข้าไปทำการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของโรคได้ตรงจุดและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งจากการลงพื้นที่เพื่อเก็บข้อมูล พบว่า ในพื้นที่จังหวัดตราดพบพื้นที่ที่สามารถระบุให้เป็น MTS ได้ทั้งสิ้น 30 MTS ชนิดของยุงพาหะที่มีการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium vivax* เป็นยุงพาหะหลัก คือ *Anopheles dirus* โดยเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่พบทั้งในผู้ป่วยในพื้นที่และในยุงพาหะนั้นมีลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pvmdr1* โดยพบ double mutation คือ Y976F ร่วมกับ F1076L ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะพบในเชื้อที่ต่อต่อยาคลอโรควินที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *pvcr-t-o* ยุงพาหะที่พบการติดเชื้อมีลักษณะดังกล่าวอยู่ใน MTS ที่ถูกจัดให้เป็นพื้นที่ B1 แสดงให้เห็นว่าแม้จะไม่มีรายงานจำนวนผู้ป่วยในพื้นที่ การแพร่กระจายเชื้อที่ก่อให้เกิดมาลาเรียก็มีโอกาสเกิดขึ้นได้ เนื่องจากยังพบยุงพาหะที่ติดเชื้อในพื้นที่ และไม่พบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *kdr* ที่ทำให้เกิดการต่อต่อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะในพื้นที่ ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคจึงต้องมีความรัดกุมและเร่งค้นหาผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการไปพร้อมกับการควบคุมยุงพาหะหลักในพื้นที่ที่เคยมีการรายงานพบผู้ป่วยมาลาเรีย

4.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

- 4.2.1 Health literacy ของประชาชนในพื้นที่เสี่ยงแพร่โรคมมาลาเรีย
- 4.2.2 การเรียนรู้การป้องกันตนเองในพื้นที่เสี่ยงแพร่โรค
- 4.2.3 การพัฒนาโปรแกรมการเฝ้าระวังมาลาเรียโดยอาศัยเครือข่ายของประชาชนในพื้นที่

4.3 ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์

- 4.3.1 การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคมมาลาเรียจำเป็นต้องทำในทุกพื้นที่ที่เคยมีการระบาด การกำหนดพื้นที่ที่มีลักษณะจำเพาะต่อการแพร่เชื้อจึงจะทำให้เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ประหยัดงบประมาณในการดำเนินการ
- 4.3.2 ควรมีการค้นหาผู้ที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการในแต่ละพื้นที่ที่เคยมีการระบาด
- 4.3.3 ควรมีการประเมินการกลายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษา รวมทั้งเฝ้าติดตามเชื้อมาลาเรียในเลือดผู้ที่เคยป่วยและได้รับการรักษาจนหายเป็นปกติ เนื่องจาก

อาจมีเชื้อที่ติดต่อยารักษาเหลืออยู่ในร่างกายผู้ป่วยเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ไม่แสดงอาการ ส่งผลให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดการแพร่กระจายของเชื้อผ่านยุงพาหะไปสู่ผู้อื่นได้

4.3.4 ยังไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน kdr ที่ส่งผลให้ยุงพาหะตอบสนองต่อยาฆ่าแมลงที่ใช้พ่นตามบ้านเรือนและชุมชน ดังนั้นมาตรการการพ่นยาฆ่าแมลงและการใช้มุ้งชุบสารเคมีจึงยังเป็นวิธีในการป้องกันการแพร่เชื้อจากยุงมาสู่คนได้มีประสิทธิภาพ จึงควรส่งเสริมการป้องกันด้วยแนวทางนี้ต่อไป แต่ทั้งนี้อาจมีการกลายพันธุ์ที่ยีนอื่นที่อาจส่งผลต่อการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในยุงพาหะ จึงควรมีการทดสอบการดื้อต่อสารฆ่าแมลงด้วยวิธี Bioassay รวมถึงการค้นหากลายพันธุ์ที่ยีนอื่นร่วมด้วย

4.3.5 การจัดทำฐานข้อมูลจากงานวิจัย

The advantage of this data base is that it can be updated constantly. The records we keep are valuable not only to vector control and health personnel in Trat, but it is valuable for resource allocation on a regional and global scale, as described by Obsomer et al in p 10 of the *Predicted Distribution of Major Malaria Vectors Belonging to the Anopheles dirus Complex in Asia: Ecological Niche and Environmental Influences*, PLOS ONE 2012, 7,11

The data base has two components. First is the satellite mapping overlaid with topographical information and GIS data of malaria and mosquito data

The following table shows the structure of our data base.

VARIABLE	EXAMPLE
Ecotope name and cross reference to GIS	MTS 01
MIP locator	N 13,45,12 E 104,12,60
Date updated	
Date of most recent MIP visit	Date of ground survey
Person reporting	Name of catcher
Updated Avg. temperature Summer	
Updated Avg. temperature Winter	
Land use description	e.g. fruit orchard, rubber, palm, vacant, rice paddy, etc
Breeding site identified	GIS coordinate
Mosquito types	
Dwelling type	Eg. Cement house, temporary guardhouse
N residents in area at last visit	
Transients or migrants observed	
Recent intervention	Eg. Spray or bednet check
Date of last intervention by PH or Vector control	

5. Output

จากงานวิจัยครั้งนี้ได้ทีมวิจัยได้ความรู้ใหม่เพิ่มเติม ได้แผนที่ malaria ecotope จังหวัดตราด วิธีการที่จะนำไปใช้เสริมมาตรการในการ Intervention นำไปสู่การกำจัดมาลาเรียในพื้นที่ malaria ecotope จังหวัดตราด ทำให้เห็นความชัดเจนของบริเวณที่ยังคงมีโอกาสเป็นแหล่งแพร่โรค (local malaria endemic area) การได้เรียนรู้การทำงานร่วมกับเจ้าหน้าที่และการแลกเปลี่ยนเรียนรู้เกี่ยวกับมาลาเรียพาทะกับประชาชนในแหล่งแพร่เชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้วิจัยได้ปฏิบัติควบคู่ไปกับการเก็บข้อมูลขณะทำการวิจัยนำไปสู่การแก้ปัญหามาลาเรียในแต่ละพื้นที่ รวมถึงกิจกรรมของการเปลี่ยนแปลงทางการเกษตรที่จะมีผลทำให้สัมผัสและเป็นผู้แพร่เชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีผลผลิตต่อไปนี้

5.1 Publication: Regarding: Land use - land cover changes promote and barrier of local malaria transmission area:

รายงานแผนที่พื้นที่ที่ยังเสี่ยงเป็นพื้นที่แพร่เชื้อมาลาเรีย จังหวัดตราด

Sharing of data from vector control, historical references, data base,

5.2 Innovation ในเรื่องต่อไปนี้

5.2.1 Techniques used in EES

5.2.2 Mapping overlays of MIPs on local level

การประยุกต์ใช้ satellite และการสำรวจภาคพื้นดินทำให้เห็นสภาพนิเวศน์เชิงภูมิทัศน์ชัดเจนมากยิ่งขึ้น การเกิดคนสำรวจและสังเกตนอกจากจะทราบสภาพนิเวศน์แล้วยังทำให้เห็นกิจกรรม การเคลื่อนย้ายของคนในแต่ละ MTS ทำให้การประเมินพื้นที่เสี่ยงมีประสิทธิภาพมาก ทั้งนี้การกำจัดมาลาเรียจำเป็นต้องพึ่งการเก็บและสำรวจข้อมูลของมาลาเรียพาทะและการติดเชื้อของมาลาเรียพาทะที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการ identify high risk transmission area นั่นคือนักกัญญาวิทยาที่มีความรู้ความเข้าใจเรื่องของระบาดวิทยาและ EES

5.3 Contribution to business community

Molecular laboratory that will support early detection and diagnosis of endemic malaria types and others infectious disease in the future

5.4 Benefits to local community

การอบรมเจ้าหน้าที่ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง ตราดและเจ้าหน้าที่และผู้สนใจเกี่ยวข้อง ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการอบรมการใช้ EES มาอย่างต่อเนื่อง ภายหลังจากที่ได้ข้อมูลจากการวิจัยมาเป็นเวลาสามปี และครั้งนี้เป็นการอบรมการใช้ข้อมูลที่ได้ให้เจ้าหน้าที่ที่มีความชัดเจนในการลงพื้นที่เฝ้าระวังป้องกันมาลาเรียและแลกเปลี่ยนเรียนรู้รับ Intervention นำไปสู่การกำจัดมาลาเรียในพื้นที่ ที่มีเป้าหมายชัดเจนมากยิ่งขึ้น (เจ้าหน้าที่ได้ฐานข้อมูล local malaria endemic area)

การกำจัดมาลาเรียข้อมูลเกี่ยวกับพื้นที่ที่มีุงพาทะมาลาเรียและผู้ป่วยใหม่ต้องมีความทันสมัยอยู่ตลอดเวลา การตรวจเชื้อมาลาเรียในยุงจึงมีความจำเป็นในการเฝ้าระวังมาลาเรียในพื้นที่เสี่ยงหรือเคยมีผู้ป่วยมาลาเรียมาก่อน

ประชาชนใน malaria ecotope ต้องได้เรียนรู้เกี่ยวกับพาหะมาลาเรียและแหล่งเพาะพันธุ์ รวมถึงกิจกรรมอะไรบ้างที่ทำให้มีโอกาสที่จะติดเชื้อ รวมถึงประชาชนต้องทราบว่าตนเองอยู่ในพื้นที่เสี่ยงแพร่โรคมมาลาเรีย จำเป็นต้องทราบและให้ความสำคัญของการป้องกันตนเองรวมถึงคนในครอบครัว นอกจากนี้ประชาชนในพื้นที่เสี่ยงสามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลกับเจ้าหน้าที่ได้เพื่อการประเมินปรับมาตรการเกี่ยวกับการจัดการพาหะก่อนเกิดโรค

5.5 Molecular laboratory

ห้องปฏิบัติการมีเครื่องมือที่ทันสมัยและได้ใช้ในงานวิจัยรวมถึงสนับสนุนงานวิจัยทางห้องปฏิบัติการแก่สำนักงานป้องกันควบคุมโรค ชลบุรีที่ 6 ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง จังหวัดตราด นอกจากนี้ยังสามารถสนับสนุนตอบโต้ภาวะฉุกเฉินในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบบเร่งด่วน

รายงานสรุปการเงิน

สัญญาเลขที่ 44/2562 โครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา
ชื่อโครงการ โครงการวิจัยและพัฒนาระบบการจัดการและการเฝ้าระวังโรคมาลาเรีย
ในพื้นที่ภาคตะวันออก

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.)...ประภา นันทวรศิลป์
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี)...๑ ตุลาคม ๒๕๖๑..ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี)..๓๐ กันยายน
๒๕๖๒
ระยะเวลาดำเนินการ...๑.....ปี-.... เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) ๑ ตุลาคม ๒๕๖๑-๒๕๖๒

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ ๑ (๕๐%) ..๒,๔๘๓,๙๕๑.๕๐ บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี...๑๕ พฤศจิกายน ๒๕๖๑.....
งวดที่ ๒ (๕๐%) ...๑๙๘๗๒๘๑.. บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี ๑ พฤษภาคม ๒๕๖๒.....
งวดที่ ๓ (๑๐%) ๔๙๖,๘๒๐.๓๐ บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี.....
รวม๕,๑๔๙,๗๐๐.....(ห้าล้านหนึ่งแสนสี่หมื่นเก้าพันเจ็ดร้อยบาทถ้วน)

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	370,600	370,600	0
2. ค่าจ้าง	540,000	495,000	0
3. ค่าวัสดุ	635,725	635,725	0
4. ค่าใช้สอย	87,148	87,148	0
5. ค่าครุภัณฑ์	3,334,730	3,334,730	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย) ค่าสาธารณูปโภค 10 เปอร์เซ็นต์	181,497	181,497	0
รวม	5,149,700	5,149,700	0

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประภา นันทวรศิลป์.)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

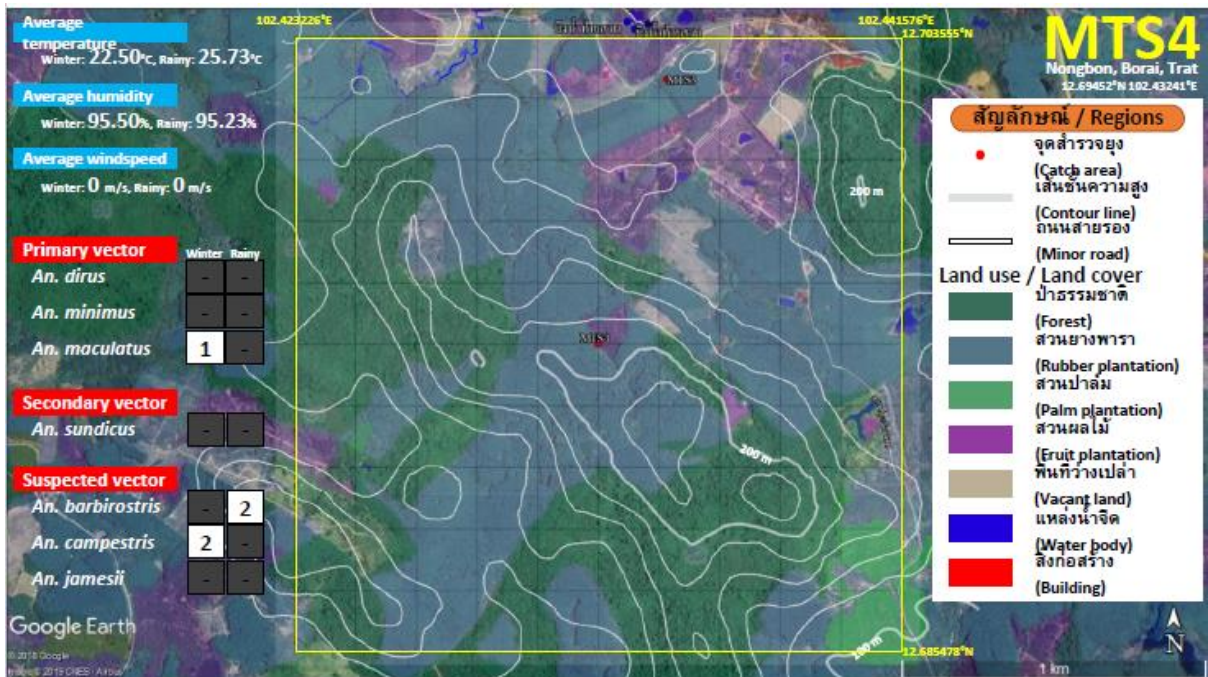
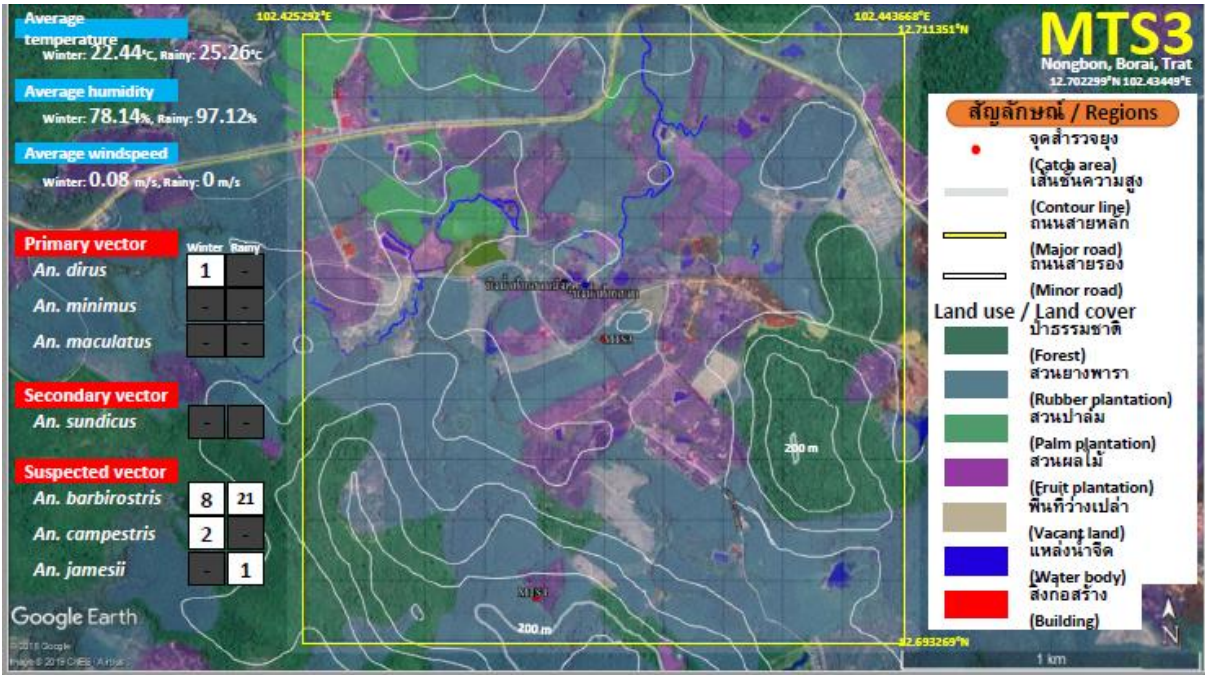
เอกสารอ้างอิง

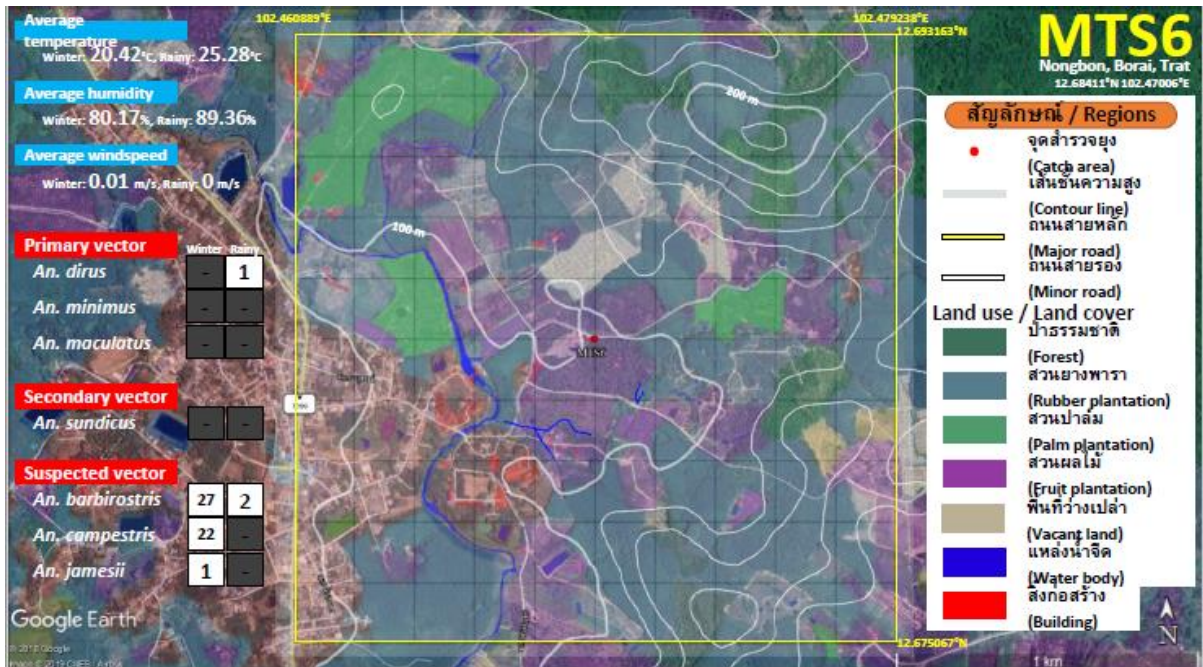
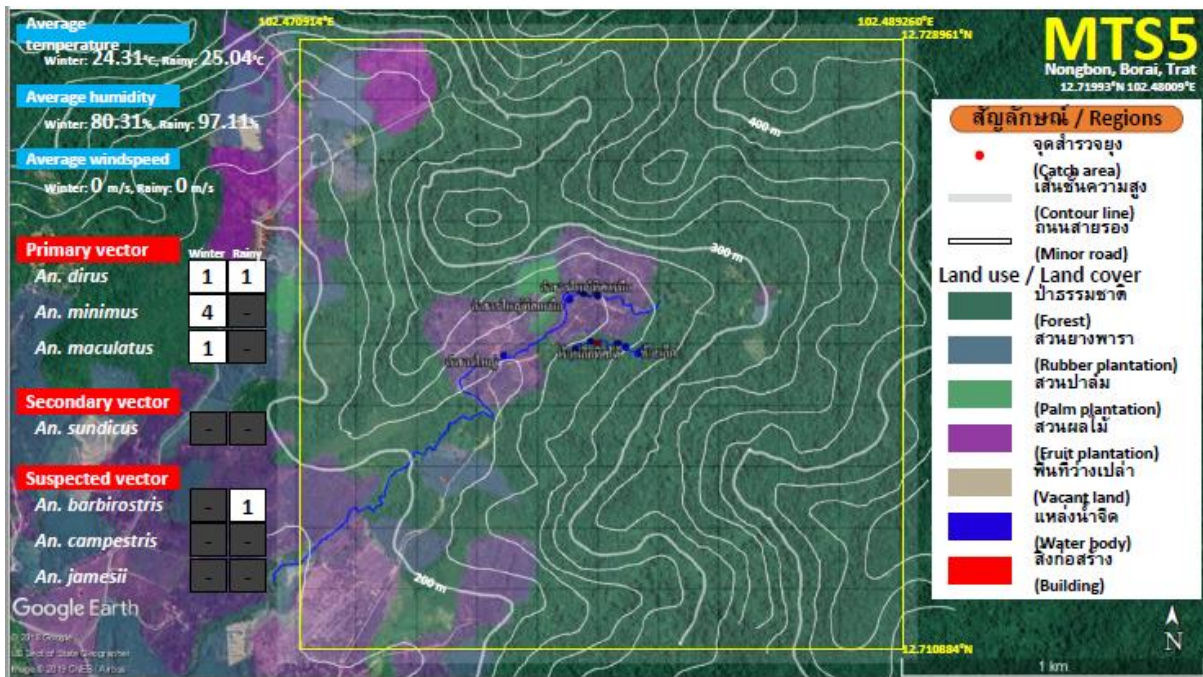
1. Kaewwaen W, Bhumiratana A. Landscape ecology and epidemiology of malaria associated with rubber plantations in Thailand: integrated approaches to malaria ecotoping. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2015;2015:909106.
2. Bhumiratana A, Sorosjinda-Nunthawarasilp P, Kaewwaen W, Maneekan P, Pimnon S. Malaria-associated rubber plantations in Thailand. *Travel Med Infect Dis.* 2013;11(1):37-50.
3. Musset L, Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, et al. Emergence of *Plasmodium vivax* Resistance to Chloroquine in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(11).
4. Noisang C, Prosser C, Meyer W, Chemoh W, Ellis J, Sawangjaroen N, et al. Molecular detection of drug resistant malaria in Southern Thailand. *Malar J.* 2019;18(1):275.
5. Mint Deida J, Ould Khalef Y, Mint Semane E, Ould Ahmedou Salem MS, Bogreau H, Basco L, et al. Assessment of drug resistance associated genetic diversity in Mauritanian isolates of *Plasmodium vivax* reveals limited polymorphism. *Malar J.* 2018;17(1):416.
6. Silva SR, Almeida ACG, da Silva GAV, Ramasawmy R, Lopes SCP, Siqueira AM, et al. Chloroquine resistance is associated to multi-copy *pvcrt-o* gene in *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2018;17(1):267.
7. Kittichai V, Nguitragool W, Ngassa Mbenda HG, Sattabongkot J, Cui L. Genetic diversity of the *Plasmodium vivax* multidrug resistance 1 gene in Thai parasite populations. *Infect Genet Evol.* 2018;64:168-77.
8. Tantiamornkul K, Pumpaibool T, Piriyaongsa J, Culleton R, Lek-Uthai U. The prevalence of molecular markers of drug resistance in *Plasmodium vivax* from the border regions of Thailand in 2008 and 2014. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2018;8(2):229-37.
9. Ngassa Mbenda HG, Das A. Molecular evidence of *Plasmodium vivax* mono and mixed malaria parasite infections in Duffy-negative native Cameroonians. *PLoS One.* 2014;9(8):e103262.
10. Marques MM, Costa MR, Santana Filho FS, Vieira JL, Nascimento MT, Brasil LW, et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):342-7.
11. Lawpoolsri S, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Cui L, Kiattibutr K, Rachaphaew N, et al. Epidemiological profiles of recurrent malaria episodes in an endemic area along the Thailand-Myanmar border: a prospective cohort study. *Malar J.* 2019;18(1):124.

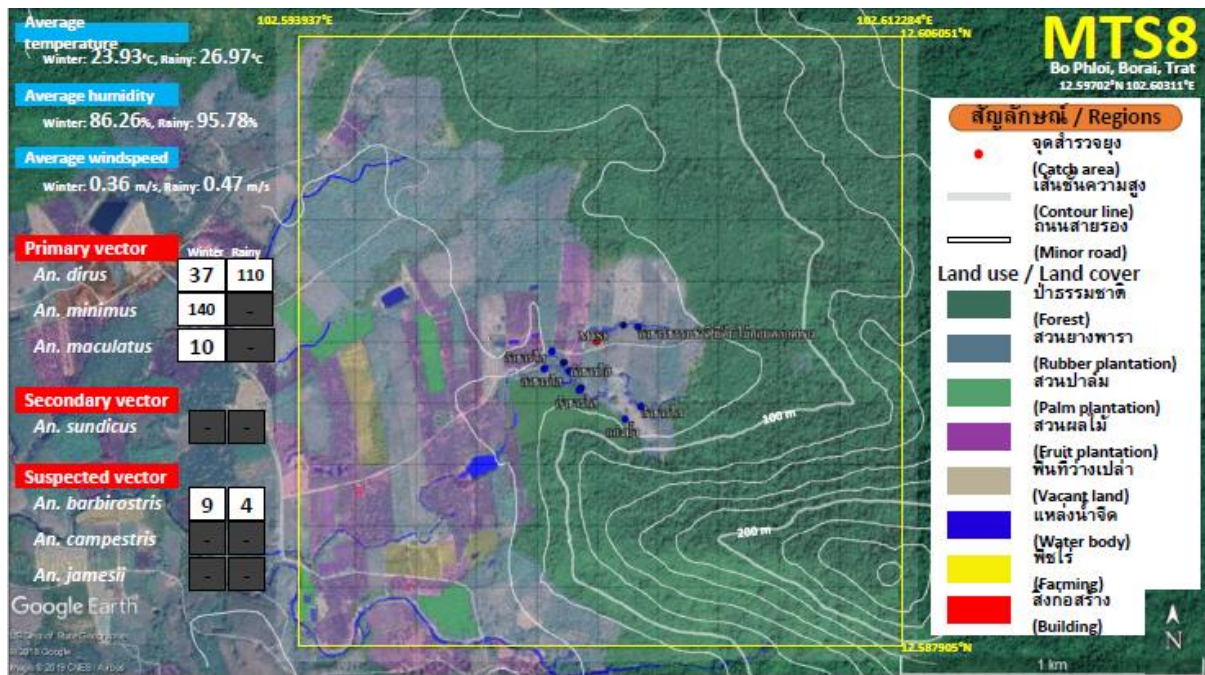
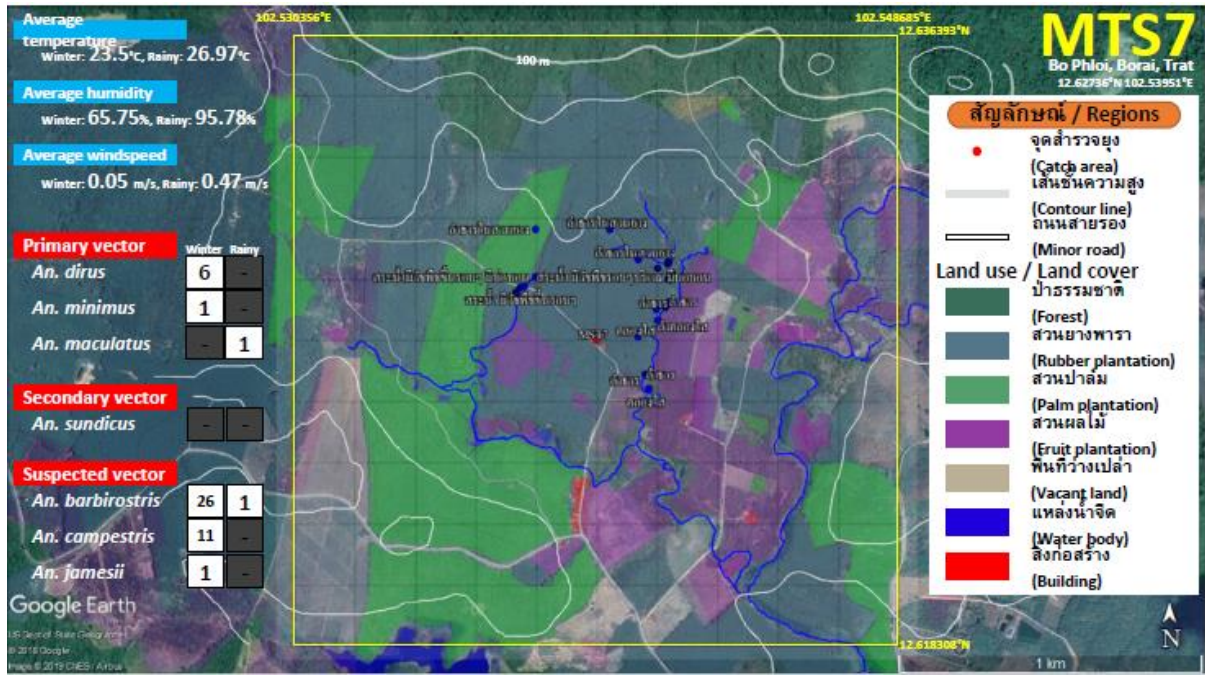
12. Martin TCS, Vinetz JM. Asymptomatic *Plasmodium vivax* parasitaemia in the low-transmission setting: the role for a population-based transmission-blocking vaccine for malaria elimination. *Malar J.* 2018;17(1):89.
13. Dicko A, Roh ME, Diawara H, Mahamar A, Soumare HM, Lanke K, et al. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of *Plasmodium falciparum* transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(6):627-39.
14. Bjorkman AB. Asymptomatic low-density malaria infections: a parasite survival strategy? *Lancet Infect Dis.* 2018;18(5):485-6.
15. Gruenberg M, Moniz CA, Hofmann NE, Wampfler R, Koepfli C, Mueller I, et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. *Malar J.* 2018;17(1):55.
16. Rossi G, Vernaeve L, Van den Bergh R, Nguon C, Debackere M, Abello Peiri C, et al. Closing in on the Reservoir: Proactive Case Detection in High-Risk Groups as a Strategy to Detect *Plasmodium falciparum* Asymptomatic Carriers in Cambodia. *Clin Infect Dis.* 2018;66(10):1610-7.
17. Naeem MA, Ahmed S, Khan SA. Detection of asymptomatic carriers of malaria in Kohat district of Pakistan. *Malar J.* 2018;17(1):44.
18. Kassaza K, Operario DJ, Nyehangane D, Coffey KC, Namugosa M, Turkheimer L, et al. Detection of *Plasmodium* Species by High-Resolution Melt Analysis of DNA from Blood Smears Acquired in Southwestern Uganda. *J Clin Microbiol.* 2018;56(1).
19. Roman DNR, Rosalie NNA, Kumar A, Luther KMM, Singh V, Albert MS. Asymptomatic *Plasmodium malariae* infections in children from suburban areas of Yaounde, Cameroon. *Parasitol Int.* 2018;67(1):29-33.
20. Lima G, Arroyo Sanchez MC, Levi JE, Fujimori M, Da Cruz Caramelo L, Sanchez AR, et al. Asymptomatic infections in blood donors harbouring *Plasmodium*: an invisible risk detected by molecular and serological tools. *Blood Transfus.* 2018;16(1):17-25.

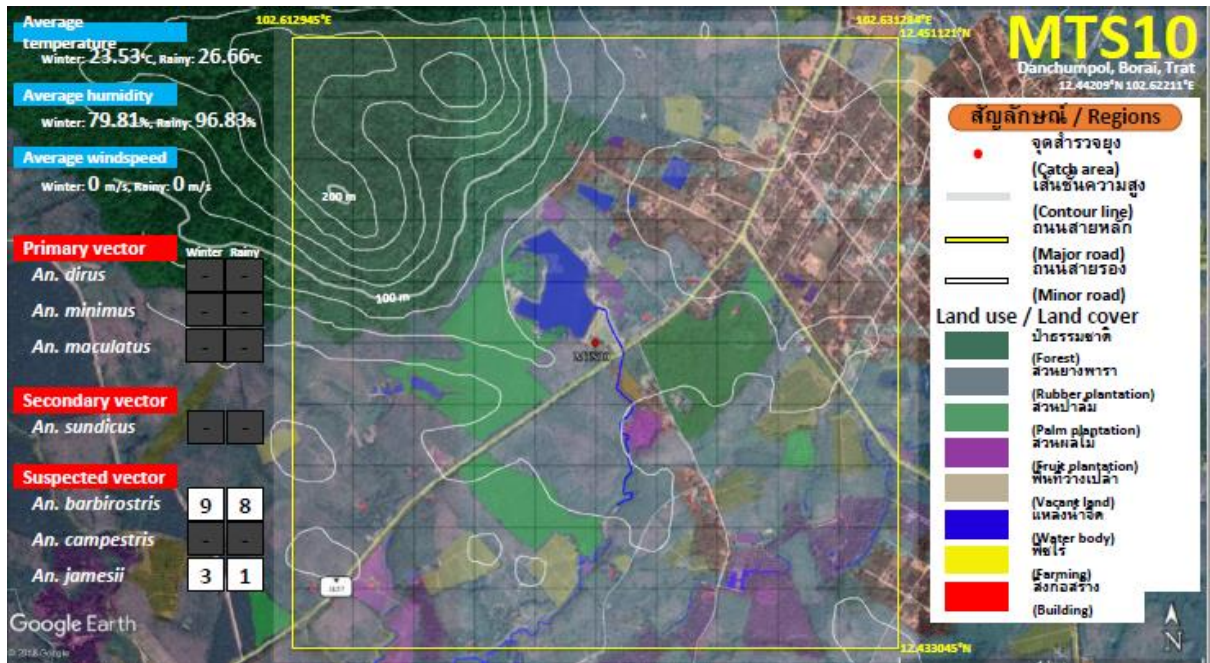
Appendices

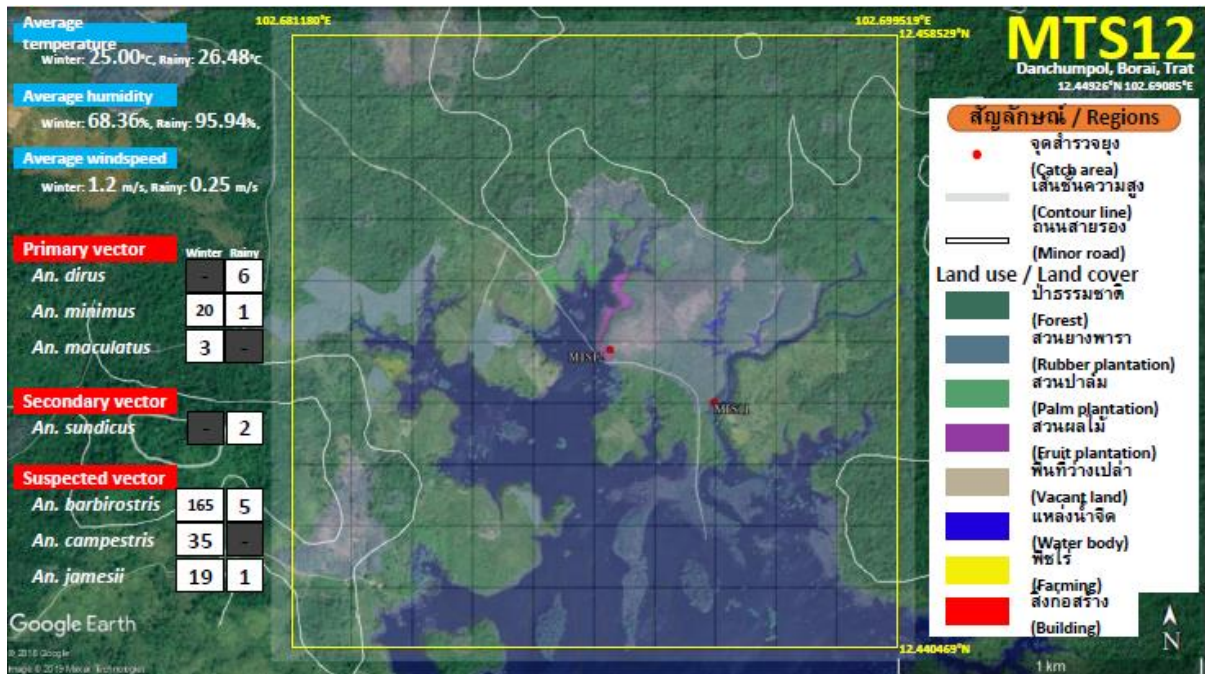


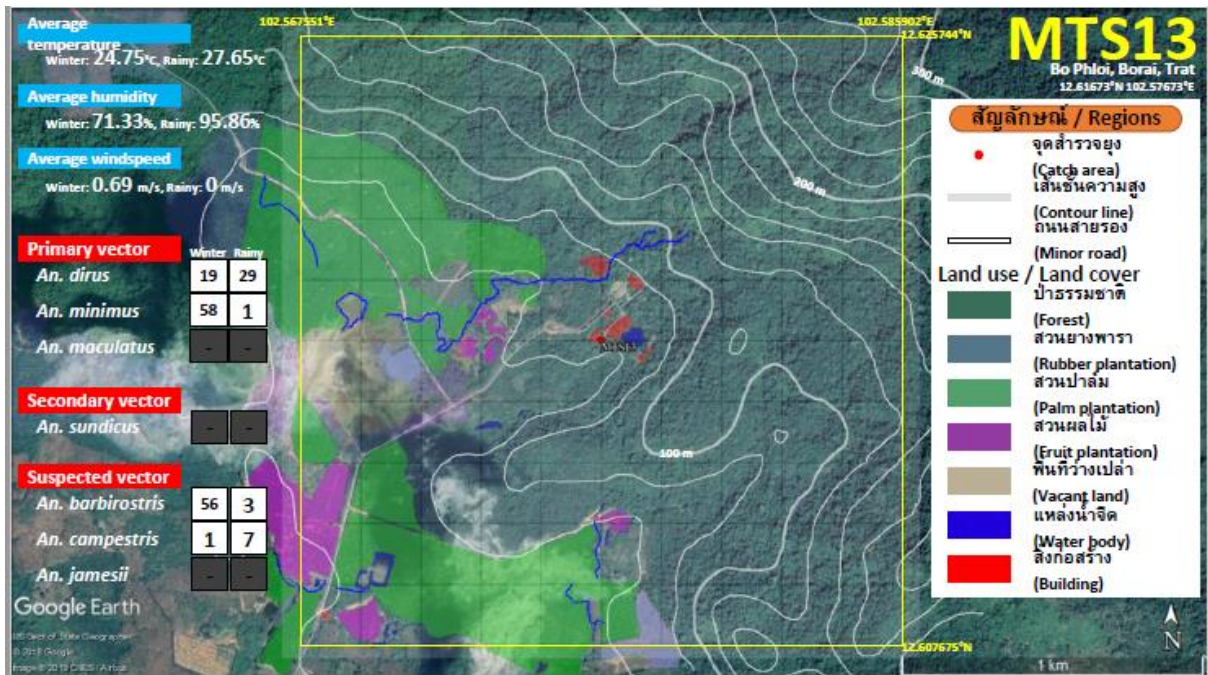








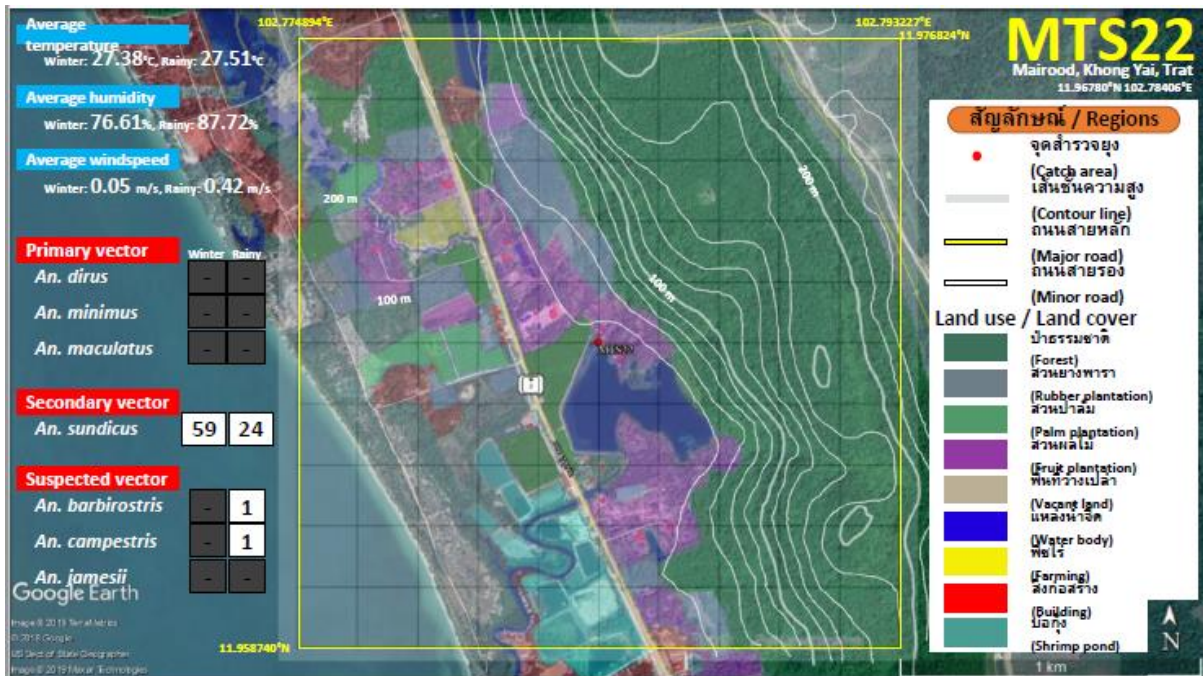




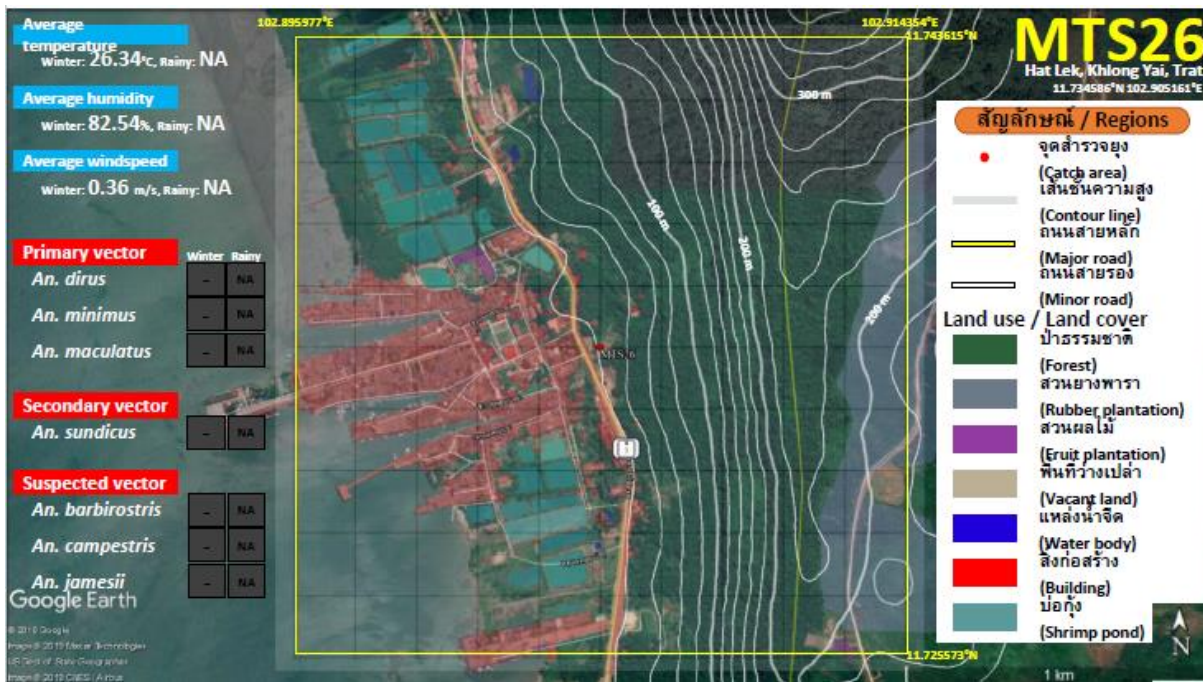
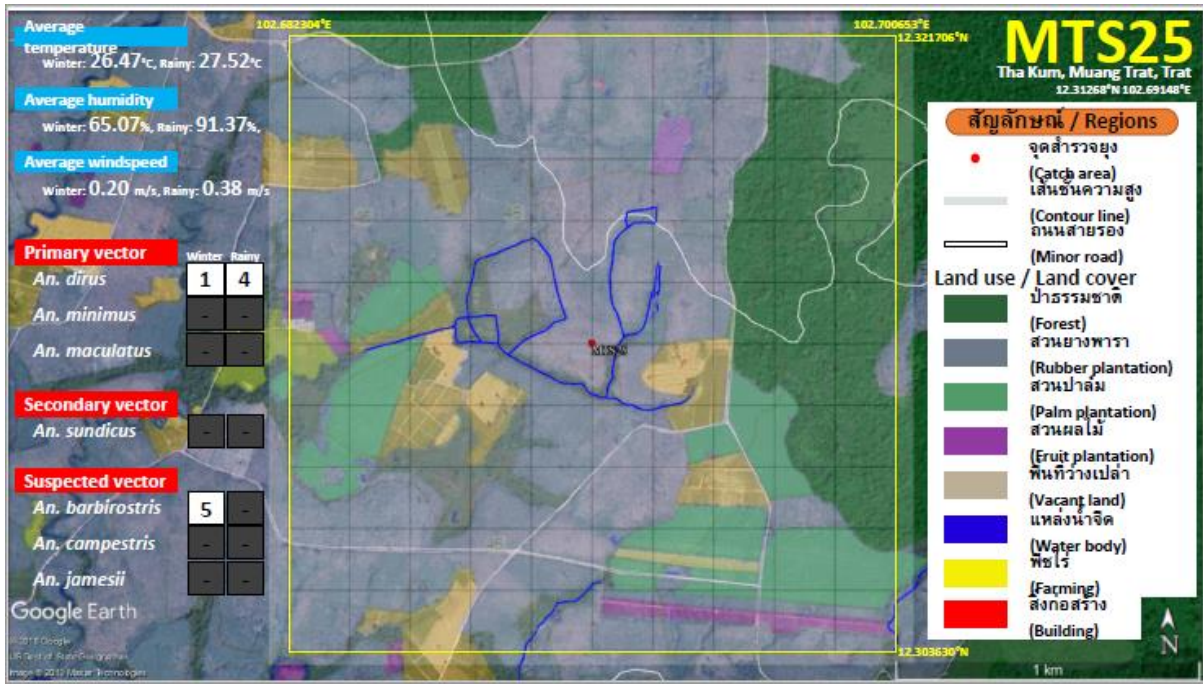


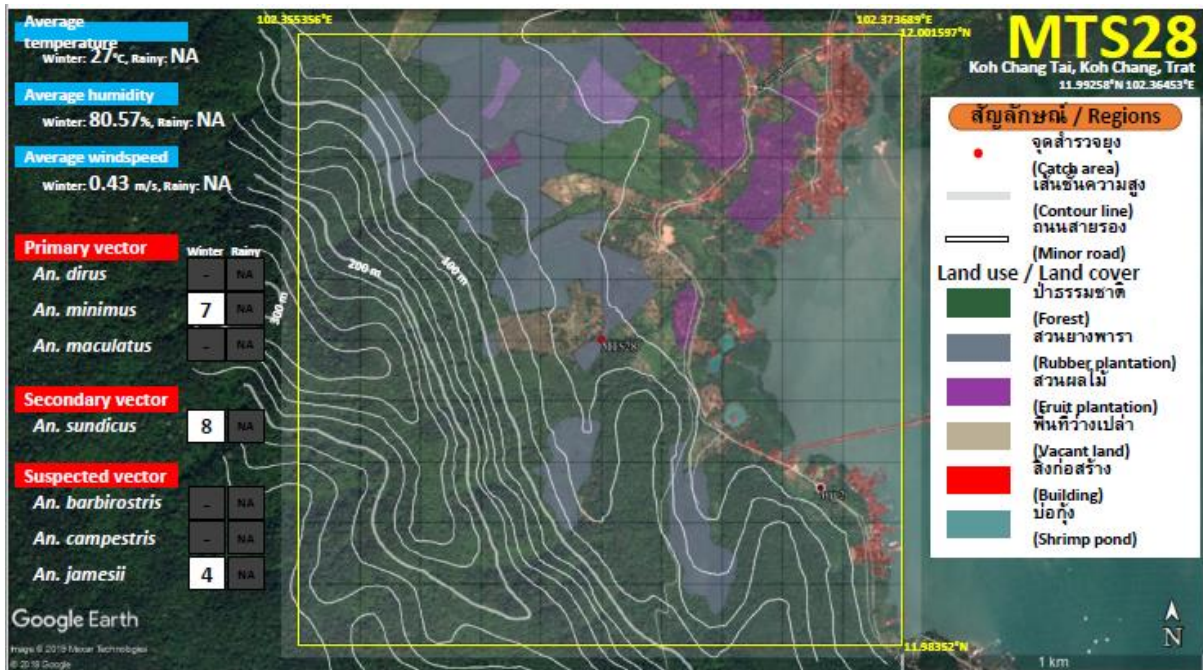


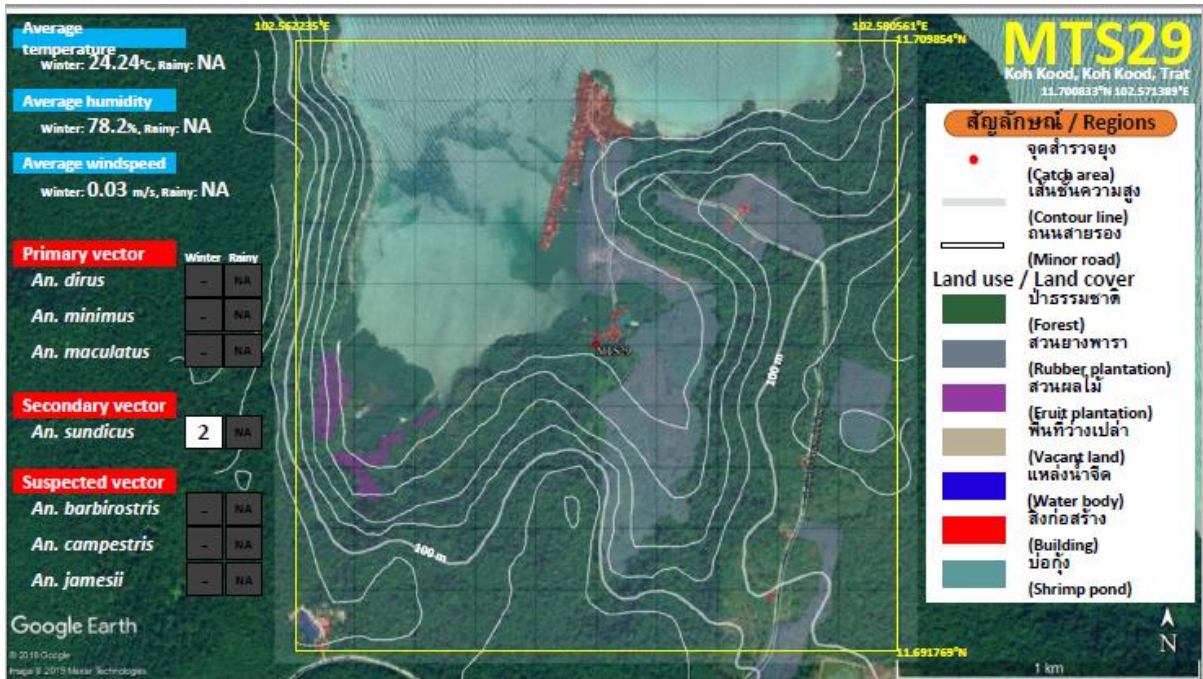












MTS1



MTS2



MTS3



MTS4



MTS5



MTS6



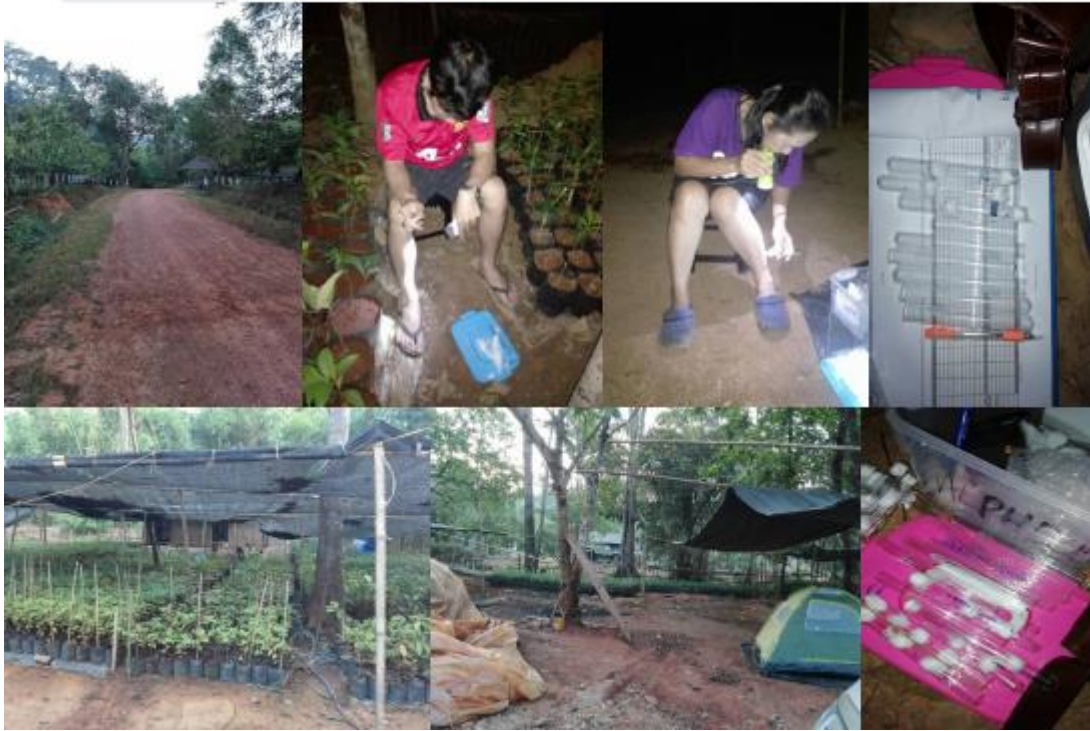
MTS7



MTS8



MTS9



MTS10



MTS11



MTS12



MTS13



MTS14



MTS15



MTS16



MTS17



MTS18



MTS19



MTS20



MTS21



MTS22



MTS23



MTS24



MTS25



MTS26



MTS27



MTS28



MTS29



MTS30

