

<b>ชื่อเรื่อง</b>	การพัฒนาชุดน้ำยาตรวจนับและแยกระยะของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีโฟลไซโตเมตรี
<b>คณะผู้วิจัย</b>	บุษนา หมั่นดี*, คณิตร์ ช่างสม*, อังคณา แซ่เจ็ง**, รัชนิวรรณ ศรีหิรัญรัตน์*
<b>หน่วยงาน</b>	*แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ **กลุ่มโรคติดต่อมาโดยแมลง สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 (ศูนย์มาลาเรีย เดิม) เชียงใหม่ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียบนฟิล์มเลือดชนิดหนาและบางเป็นวิธีมาตรฐานแต่มีข้อจำกัดหลายประการ ได้มีการใช้การตรวจด้วยวิธี flow cytometry แต่วิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน จึงมีการใช้วิธี flow cytometry แบบใหม่ที่ง่ายและรวดเร็วกว่าวิธีเดิม โดยใช้น้ำยาที่สามารถจะสลายเม็ดเลือดแดงและย้อมสี DNA ของเชื้อมาลาเรียได้ในคราวเดียว ซึ่งทำให้สามารถจะแยกระยะของเชื้อมาลาเรียได้โดยอาศัยความเข้มของแสง fluorescent ที่จับอยู่กับ DNA ของเชื้อมาลาเรีย เพื่อพัฒนาชุดน้ำยาดันแบบสำหรับการตรวจนับและแยกระยะของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี flow cytometry แบบใหม่ และเปรียบเทียบผลการศึกษากับวิธี flow cytometry แบบเดิม ได้เตรียม lysing solutions โดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ detergent (hexadecyltrimethyl ammonium bromide; CTAB) ที่สามารถจะสลายเม็ดเลือดแดงได้หมด แล้วเตรียม lysing and staining solutions โดยหาชนิดของสีย้อม DNA (acridine orange; AO, thiazole orange; TO and propidium iodide; PI) และความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นใช้น้ำยาที่เตรียมได้ศึกษาเลือดตัวอย่างที่

184608

ไม่มีเชื้อมาลาเรีย (คนปกติ 13 ราย, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย 13 ราย) เลือกผู้ป่วยมีอาการที่ให้ผลลบกับฟิล์มเลือดชนิดหนา (6 ราย) และเลือกผู้ป่วยมีอาการที่ให้ผลบวกกับฟิล์มเลือดชนิดหนา (1 ราย) โดยเลือดตัวอย่างทุกรายจะทำการตรวจด้วยวิธี flow cytometry แบบเดิมควบคู่ไปด้วย น้ำยาที่เตรียมได้มีความเข้มข้นของ CTAB 0.05 g/l และใช้สี AO ที่ความเข้มข้น 3 mg/l พบว่าบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตัวเชื้อมาลาเรีย ยังอยู่ใกล้กับบริเวณของเศษเม็ดเลือดแดง และไม่สามารถที่จะแยกกระยะได้อย่างสมบูรณ์ ในการทดสอบกับเลือดตัวอย่างไม่สามารถจะเปรียบเทียบได้เนื่องจากตัวอย่างที่เป็น positive samples มีจำนวนน้อย และการนับ %positive ของ 2 วิธีนี้มีความแตกต่างกัน สรุปน้ำยาที่เตรียมได้ยังต้องมีการพัฒนาให้มีความไว และความจำเพาะในการทดสอบนี้มากขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้วินิจฉัยผู้ป่วย แต่สามารถจะใช้ในการติดตามการดื้อยา และการแยกกระยะของเชื้อได้

**Title** Development of reagent kit for enumeration and staging of malarial parasites by flow cytometry

**Authors** Yuttana Munde\*, Don Changsom\*, Aungkana Saejeng\*\*, Ratchaneewan Srihirunrat\*

**Affiliation** \*Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

\*\* Vector-Born Disease Group, Office of Disease Control Region 10 (Former Malaria Center 10), Chiang Mai, Department of Disease Control, Ministry of Public Health.

---

The microscopic examination of thick and thin blood film to examine malarial parasite is simple but time- and labor-consuming. Flow cytometry can be used as malarial detected systems. However the previous procedures are insufficient sensitivity and/or too complicated. The rapid, simple and sensitive system by simultaneously lysed red blood cells and stained malarial DNA with fluorescent dyes was needed. With this procedure the size and DNA fluorescent intensity can be used for staging of malarial parasite. To develop the prototype-reagent for enumeration and staging of malarial parasites by flow cytometric system. Searching for appropriate concentration of the detergent (hexadecyltrimethylammonium bromide; CTAB) and fluorescent

dyes (acridine orange; AO, thiazole orange; TO and propidium iodide; PI) then the prepared reagent was used on non-malarial infected samples (normal = 13 and thalassemia = 13), patient samples with positive (n=1) and negative (n=6) on thick blood film.  $6 \times 10^6$  RBCs were added to 1 mL of developed hemolysing and staining solution, then incubated for 3 min at 35°C before applied to flow cytometer. All samples were determined in parallel with the original flow cytometric method of DNA fluorescent staining inside the RBC. The concentration of detergent was used at 0.05 g/l and 3 mg/l of AO was chosen to use as fluorescent dye. The scattergram of positive control sample showed particles which expected to be the parasite area but slightly overlapping with erythrocyte ghost area. The numbers of malarial parasites in the samples were too low. Therefore comparison with the parasitemia measured by microscopic examination and original flow cytometric method were invalid. This reagent is needed to be developed further for more sensitivity and specificity. New and better detergent and its appropriate concentration for complete red blood cell lysis but remain the malarial parasites are needed. However, this system is not appropriate for diagnostic malaria but very useful in staging and evaluation of drug-susceptibility testing.