



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วยเทคนิค
Multiplex Loop-mediated isothermal amplification
(Multiplex-LAMP)

ดร.อิงฟ้า สุนทราวิรัตน์

ทุนอุดหนุนงานวิจัยแบบบูรณาการ (นักวิจัยรุ่นใหม่)
งบประมาณเงินกองทุนวิจัยและพัฒนา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 019/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วยเทคนิค

Multiplex Loop-mediated isothermal amplification

(Multiplex-LAMP)

ดร.อิงฟ้า สุนทราวิรัตน์

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สรุป

การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วยเทคนิค Multiplex Loop-mediated isothermal amplification (Multiplex-LAMP)

สัญญาเลขที่ 019/2562

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณเคี้ยว แอนโดลิน่าและคณะนักวิจัยประจำหน่วยวิจัยมาลาเรียโซโคล อำเภอมะสอต จังหวัดตาก ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างยุงติดเชื้อมาลาเรียแก่ผู้วิจัย รวมถึงให้การสนับสนุน สถานที่และเครื่องมือวิจัย จนผู้วิจัยสามารถทำงานได้บรรลุวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ คุณนุกูล กองทรัพย์ และคุณบุรินทร์ ไตรรัตน์ สาธารณสุขอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด คุณรุ่งศักดิ์ ชูกำแพง หัวหน้าหน่วยควบคุมมาลาเรีย อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด ที่ได้ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างยุงในพื้นที่อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราดในเบื้องต้น ถึงแม้ว่าในท้ายที่สุดผู้วิจัยจะไม่สามารถเก็บตัวอย่างจากพื้นที่อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราดได้ แต่คำแนะนำในเบื้องต้นนั้นเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อ งานวิจัยในครั้งนี้และครั้งต่อไป

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. ประภา นันทวรศิลป์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อมาลาเรียแก่ผู้วิจัย จึงทำให้งานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนงานวิจัยแบบบูรณาการ (นักวิจัยรุ่นใหม่) งบประมาณเงินกองทุนวิจัยและพัฒนา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา สัญญาเลขที่ 019/2562

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า นางสาวอิงฟ้า สุนทราวิรัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา
ประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย) การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วยเทคนิค Multiplex Loop-mediated isothermal amplification (Multiplex-LAMP)

(ภาษาอังกฤษ) Development of malarial detection in infected mosquito using Multiplex Loop-mediated isothermal amplification (Multiplex-LAMP)

สัญญาเลขที่ 019/2562 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 150,000 บาท (หนึ่งแสนห้าหมื่นบาทถ้วน)
ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 15 เดือนพฤษภาคม 2562 ถึง 16 พฤษภาคม 2563) ซึ่ง
ได้รับการอนุมัติให้ขยายระยะเวลาการดำเนินงานวิจัยออกไปจนถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2563

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงเป็นส่วนหนึ่งของการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรค ซึ่งจะทำให้เจ้าหน้าที่ในพื้นที่สามารถประเมินสถานการณ์การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียได้ นำไปสู่การเฝ้าระวังและควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านของเครื่องมือและบุคลากรผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงที่ทำได้ง่าย ราคาไม่สูง โดยอาศัยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้อุณหภูมิเดียว (63 องศาเซลเซียส) และนำเอาหลักการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงินของสาร Bromophenol blue เมื่อค่า pH ในปฏิกิริยาเปลี่ยนเนื่องจากสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียมีปริมาณเพิ่มขึ้นมาเป็นการชี้วัดการพบเชื้อ *Plasmodium spp.* ในตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจวินิจฉัย เมื่อทำการตรวจชนิดเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างยุงติดเชื้อด้วย Multiplex-LAMP เทียบกับการตรวจด้วยวิธี Nested-PCR จำนวน 150 ตัวอย่าง พบว่า ค่า sensitivity เท่ากับ 96.4 % และค่า Specificity เท่ากับ 97.0 % แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคนิคการตรวจหาเชื่อนี้ไปใช้ในการตรวจเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในภาคสนามได้

Out put/ Out come

ชื่อผลลัพธ์	ประเภท	ปริมาณ	รายละเอียด
Colorimetric Multiplex-LAMP assay	เชิงปริมาณ	1	เทคนิคการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่มีความแม่นยำ เทียบเท่ากับการตรวจด้วยวิธี Nested-PCR โดยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ไม่ซับซ้อน อ่านผลได้ง่าย ราคาไม่สูง สามารถนำไปใช้ทำงานในภาคสนามได้ ทำให้ผู้ปฏิบัติงานป้องกันควบคุมโรคทำงานได้รวดเร็วและสะดวกมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ Bromophenol blue นั้นสามารถผันกลับได้เมื่อค่า pH เปลี่ยน ดังนั้น จึงมีข้อจำกัดว่าต้องอ่านผลทันทีเมื่อนำหลอดตรวจเชื้อออกมาจาก incubator จะให้ผลที่ชัดเจนที่สุด โดยผู้วิจัยได้ทดสอบระยะเวลาที่สีของ indicator เริ่มเปลี่ยนแปลง คือ หลังจากนำหลอดตรวจเชื้อออกมาจาก incubator 7 นาที ดังนั้นหากไม่อ่านผลในทันที สีอาจมีการเปลี่ยนแปลงภายในเวลา 7 นาที

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงเป็นส่วนหนึ่งของการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรค ซึ่งจะช่วยให้เจ้าหน้าที่ในพื้นที่สามารถประเมินสถานการณ์การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียได้ นำไปสู่การเฝ้าระวังและควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านของเครื่องมือและบุคลากรผู้เชี่ยวชาญในการตรวจการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงที่ทำได้ง่าย ราคาไม่สูง โดยอาศัยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้อุณหภูมิเดียว (63 องศาเซลเซียส) และนำเอาหลักการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงินของสาร Bromophenol blue เมื่อค่า pH ในปฏิกิริยาเปลี่ยนเนื่องจากสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียมีปริมาณเพิ่มขึ้นมาเป็นการชี้วัดการพบเชื้อ *Plasmodium* spp. ในตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจวินิจฉัย เมื่อทำการตรวจชนิดเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างยุงติดเชื้อมี Multiplex-LAMP เทียบกับการตรวจด้วยวิธี Nested-PCR จำนวน 150 ตัวอย่าง พบว่า ค่า sensitivity เท่ากับ 96.67 % และค่า Specificity เท่ากับ 100 % แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคนิคการตรวจหาเชื้อนี้ไปใช้ในการตรวจเฝ้าระวังโรคมาลาเรียในภาคสนามได้

Abstract

The detection of malarial protozoa in *Anopheles* mosquitoes is a crucial part of surveillance and control efforts to monitor the spread of the disease, enabling local officials to assess the transmission dynamics of malaria and enhance the effectiveness of disease prevention strategies. However, there are still limitations in terms of the availability of tools and skilled personnel for conducting such tests. This study aims to apply a simple and cost-effective method for detecting malaria in mosquitoes, utilizing the Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. LAMP rapidly amplifies genetic material at a constant temperature (63°C), and the presence of *Plasmodium spp.* can be visually indicated by a color change from yellow to blue using Bromophenol blue, which changes due to a pH shift as the genetic material of the malaria pathogen increases. This method is a convenient and rapid diagnostic tool. When comparing the identification of malaria species in infected mosquito samples using Multiplex-LAMP and the conventional Nested-PCR method across 150 samples, the sensitivity was found to be 96.67% and the specificity 100%. These results demonstrate that this detection technique could be effectively utilized for malaria surveillance in field settings.

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)	2
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives)	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4

2 เนื้อเรื่อง

2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Material and method)	5
2.2 ผลการวิจัย (Result)	10

3 อภิปรายผล (Discussion)

4 สรุปและเสนอแนะ (Conclusion and application)

4.1 สรุป	
4.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป	
4.3 ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้	

5 ผลผลิต (Output)

5.1 Development of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique for Detecting Malaria in Mosquitoes	14
--	----

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	Primers สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด ด้วยเทคนิค Multiplex LAMP	5
2.2	แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วย Multiplex LAMP เทียบกับวิธี Nested PCR	11

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การให้เลือดที่ติดเชื้อมีทั้งผ่านทาง Membrane feeding	5
2.2	การนับจำนวน oocyst ในกระเพาะยุง	7
2.3	ภาพผลตรวจมาลาเรียด้วยวิธี Nested PCR และวิธี Multiplex LAMP	10

1. บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำวิจัยมาก่อน

จากการทบทวนงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยใช้เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) พบว่า LAMP เป็นวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้อุณหภูมิคงที่เพียงค่าเดียว ซึ่งต่างจากวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ LAMP ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อนำไปใช้งานในพื้นที่ไม่มีห้องปฏิบัติการและเครื่องมือมีจำกัด

จากการศึกษาในหลายพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของมาลาเรียในไทย พบว่า LAMP มีความไวและความจำเพาะในการตรวจพบเชื้อ *Plasmodium spp.* สูง มีความไว 95.7% และความจำเพาะ 100% เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธี RDTs และการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นว่า LAMP เป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียในพื้นที่ห่างไกลที่ขาดแคลนบุคลากรและเครื่องมือ

มีหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า LAMP สามารถนำไปใช้ในพื้นที่ภาคสนามได้เป็นอย่างดี ได้แก่ การใช้เทคนิค LAMP แบบตรวจด้วยสี (Colorimetric LAMP) ที่สามารถแสดงผลโดยการเปลี่ยนสีของสารเคมี ทำให้การทดสอบในพื้นที่ห่างไกลมีความสะดวกยิ่งขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ตรวจวัดขั้นสูง [Goto, 2009 #207] นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่สะดวกขึ้นโดยการใช้ความร้อนในการสกัดดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีที่สะดวกต่อการใช้งานได้ในพื้นที่ที่ขาดแคลนทรัพยากร

แต่อย่างไรก็ตาม LAMP ยังมีข้อจำกัดต่อการใช้งาน ได้แก่ ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในระหว่างการทำปฏิกิริยา ซึ่งอาจส่งผลต่อความแม่นยำในการทดสอบ นอกจากนี้ การตรวจจับเชื้อในระดับต่ำหรือการติดเชื่อมากกว่า 2 ชนิด ยังคงให้ผลที่มีความไม่ตรงกับการตรวจด้วยวิธี PCR

สรุปได้ว่า LAMP เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีทรัพยากรจำกัด ใช้งานง่าย รวดเร็ว และมีความไวสูง ทำให้ LAMP เป็นเครื่องมือสำคัญในการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรคมาลาเรีย อย่างไรก็ตาม การพัฒนาและปรับปรุงเทคโนโลยีต่อไปจะยิ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและการใช้งานในภาคสนามให้มากยิ่งขึ้น

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงเป็นส่วนหนึ่งของการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรค ซึ่งจะทำให้เจ้าหน้าที่ในพื้นที่สามารถประเมินสถานการณ์การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียได้ นำไปสู่การเฝ้าระวังและควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านของเครื่องมือและบุคลากรผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ เนื่องจากวิธีการตรวจในปัจจุบันคือการผ่ายุงเพื่อหาถุงติดเชื้อและส่งตรวจยืนยันชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ มีต้นทุนสูง และต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่สามารถทำการตรวจในภาคสนามได้ ส่งผลให้การวางแผนมาตรการในการเฝ้าระวังจึงไม่สามารถทำได้ทันที

การพัฒนาเครื่องมือการตรวจเชื้อมาลาเรียภาคสนามที่มีความไวและความถูกต้องในการตรวจที่เจ้าหน้าที่และคนในชุมชนสามารถนำมาใช้งานได้ จะช่วยเสริมให้ระบบการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของโรคมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงประยุกต์การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงโดยอาศัยเทคนิค LAMP ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้อุณหภูมิเดียว 63 องศาเซลเซียส โดยค่า pH ของน้ำยาที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจะมีค่าประมาณ 3 และเมื่อมีปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ DNA เกิดขึ้น ค่า pH จะเปลี่ยนแปลงเป็น 4-4.5 ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำสาร Bromophenol blue มาเติมลงไปปฏิกิริยาเพื่อให้เห็นการเกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจนขึ้น ลดปัญหาการแปลผลที่ผิดพลาด เนื่องจาก Bromophenol blue จะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน จึงสามารถแปลผลได้อย่างชัดเจนหากพบเชื้อในหลอดปฏิกิริยา ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคนี้ขึ้นเพื่อตรวจมาลาเรียในยุงซึ่งมีความแม่นยำ ใช้งานง่าย ราคาถูกและทราบผลเร็ว โดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และจะทำการทดสอบประสิทธิภาพโดยเปรียบเทียบผลการตรวจกับวิธี Nested-PCR

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วยเทคนิค Multiplex Loop-mediated isothermal amplification (Multiplex-LAMP) โดยอาศัยการเกิดสีเป็นตัวชี้วัดการพบเชื้อ

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

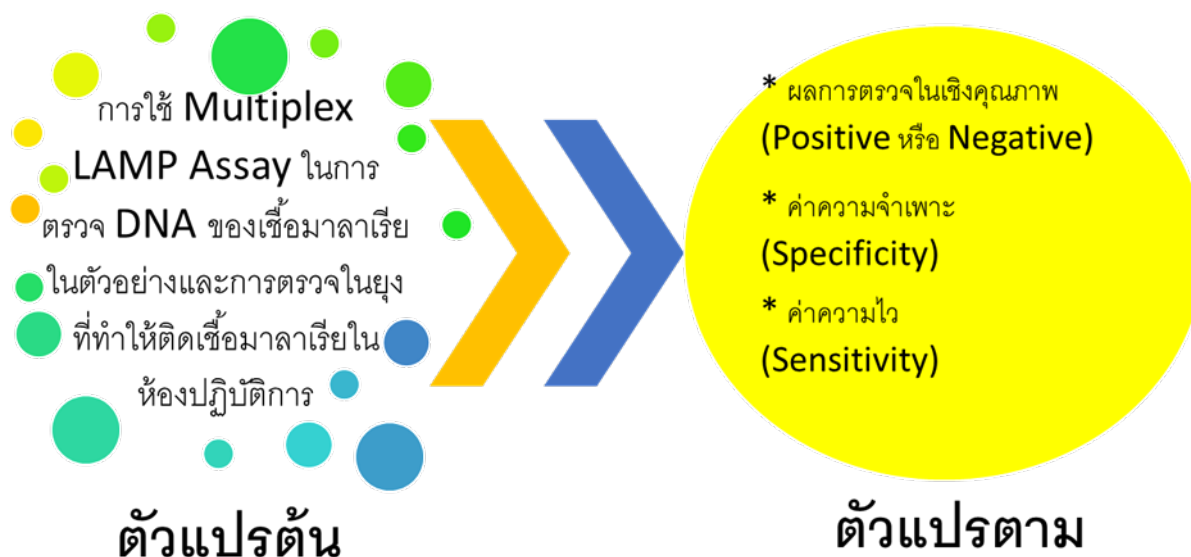
1.4.1 ยีนที่ผู้วิจัยจะนำมาเป็นเป้าหมายของการออกแบบ Primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดคือ 18sRNA โดยจะทำการดึงข้อมูลลำดับเบสของยีนจากฐานข้อมูล NCBI และ PLASMODB

1.4.2 ตัวอย่าง DNA ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด ชนิดละ 1 ตัวอย่าง ที่จะใช้เป็น Positive control นำมาจากสำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี

1.4.3 ตัวอย่างยุงติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 150 ตัวอย่าง ที่จะใช้ทดสอบ เป็นซากยุงติดเชื้อมาลาเรียที่ได้มาจากการเลี้ยงและทำให้ยุงติดเชื้อแต่ละชนิดในห้องปฏิบัติการโรคมาลาเรีย ศูนย์วิจัยมาลาเรียโซโคล อำเภอมะนัง จังหวัดตาก

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย



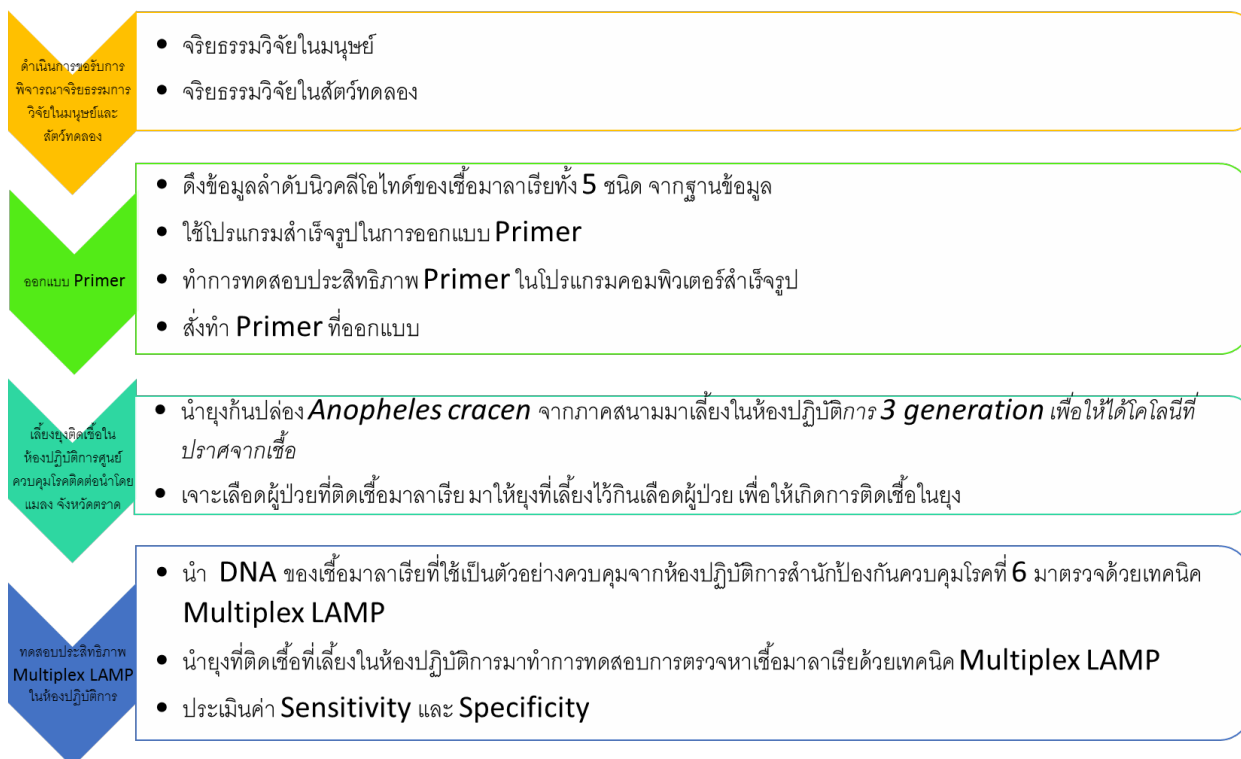
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เทคนิคการตรวจมาลาเรียในยุงที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์เป็นในชุดตรวจหาเชื้อก่อโรคอื่นๆ ที่ยุ่งเป็นพาหะ เช่น ไข้เลือดออก ชิคุนกุนยา เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถไปใช้เป็นชุดตรวจหาการติดเชื้อในคนได้อีกด้วย

2. เนื้อเรื่อง

2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย



ตารางที่ 2.1 Primers สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด ด้วยเทคนิค Multiplex LAMP

เชื้อโปรโตซัวก่อโรค มาลาเรียในคน	Primers
<i>Plasmodium falciparum</i>	5'ATTTAAACCTTCCCAGAGTAAC3'/5'GAATTTCACTCTGACATCTG3'
<i>Plasmodium vivax</i>	5'GACTTTCTTTGCTTCGGCTTG3'/5'GAATTTACCTCTGACATCTG3'
<i>Plasmodium malariae</i>	5'TGTATATTTATAACAAAGTTGTAC3'/5'GAATTTACCTCTGACATCTG3'
<i>Plasmodium ovale</i>	5'CAAGATGCTTAGACAATACAACG3'/5'GAATTTACCTCTGACATCTG3'
<i>Plasmodium knowlesi</i>	5'CTTTATGTGCGCATCCTCTAC3'/GAATTTACCTCTGACATCTG3'

การตรวจสอบความถูกต้องของ Primer

LAMP มีลักษณะเฉพาะที่ใช้ไพรเมอร์ 5 ชุด ซึ่งแต่ละชุดถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคน 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยมีความจำเพาะต่อยีน 18S rRNA ดึงข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคมลาเรียทั้ง 5 ชนิดจาก GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ตรวจสอบลำดับ base sequence ด้วย โปรแกรม Bio-Edit วิเคราะห์การเกิด Primer-dimer และโครงสร้าง hair-pin โดยใช้ OligoAnalyzer (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>)

การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วย Multiplex LAMP

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวน (amplified) โดยใช้ primer 5 คู่ ตามที่แสดงในตารางที่ 2.1 เริ่มต้นการดำเนินปฏิกิริยา LAMP โดยใช้อุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 25 µl (reaction mixture) 1.6 mM inner primers, 0.2 mM outer primers, 0.8 mM loop primers, 1.4 mM dNTPs, 0.6 M betaine, 20 mM Tris-HCL, 10 mM KCl, 10 mM, (NH₄)₂ SO₄, 8 mM MgSO₄, 0.1%, Tween 20, 8 U Bst DNA polymerase และ ตัวอย่าง DNA 5 ไมโครลิตร เติม Bromophenol blue 5 µl โดยเตรียม LAMP reaction จำนวน 25 ไมโครลิตร ในหลอดทดสอบ จากนั้นบ่มที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำออกมาแช่น้ำแข็งทันที แล้วเติม Bst DNA polymerase (New England Biolabs) (8.0 U) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมด ไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใน heat block เป็นเวลา 60 นาที และจะหยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การเลี้ยงยุงและการทำให้ยุงติดเชื้อมาลาเรีย

การเลี้ยงยุง

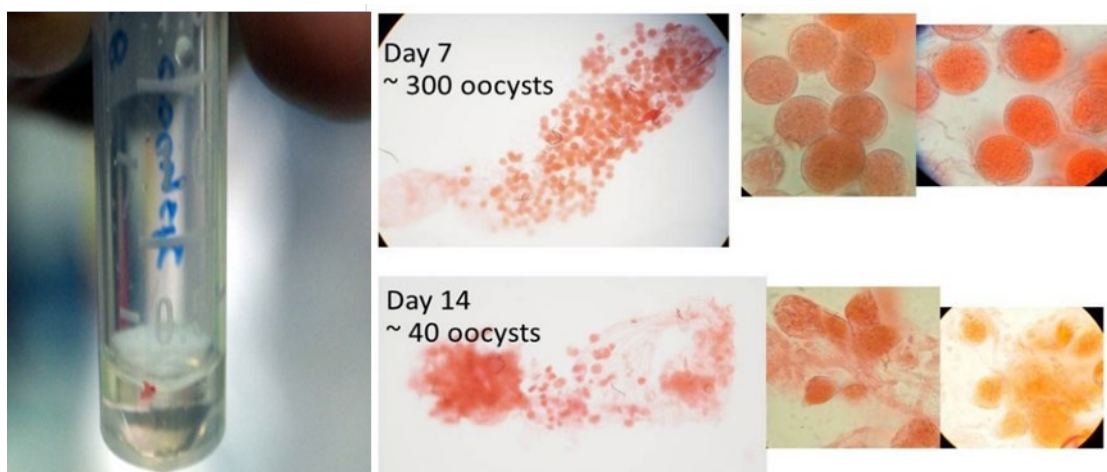
Anopheles dirus (*An. carstens*) ถูกเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมาตรฐานในห้องแมลงที่อุณหภูมิ 26-28°C ความชื้น 80% ไข่จะถูกวางในถาดพลาสติกที่มีน้ำกลั่น ให้อาหารลูกน้ำเป็นเวลา 14 วันด้วย Tetramin® เมื่อเข้าสู่ระยะตัวโม่ง จะนำถาดไปวางไว้ในกรงเพื่อรอให้กลายเป็นยุงโตเต็มวัย ให้อาหารยุงตัวเต็มวัยโดยใช้สารละลายด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคส 10% และวิตามิน 5% (Multilim syrup) ยุงตัวเมียที่มีอายุ 4-7 วันจะถูกนำมาใช้ในการทดลอง

การทำให้ยุงติดเชื้อ

ผู้ป่วยรายบุคคลจะได้รับเอกสารยินยอมให้เข้าร่วมงานวิจัยในหน่วยมาลาเรียโซโคล อำเภอมะสอ จังหวัดตาก เป็นรายบุคคลเมื่อมีผลการตรวจพบเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจะเจาะเลือดผู้ป่วย 3 mL เพื่อนำมาทำการนับจำนวนเชื้อระยะสืบพันธุ์ (gametocytemia) ในเลือด จะทำการนับจำนวน/เซลล์เม็ดเลือดแดง 500 เซลล์ จากนั้นนำเลือดที่ติดเชื้อไปป้อนให้กับยุงที่เพาะเลี้ยงในพื้นที่ปิด ให้เลือดผ่าน membrane feeding system ยุงที่ดูดเลือดเต็มที่แล้วจะถูกคัดเลือกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26-28°C ความชื้นสัมพัทธ์ 80% ในห้องแมลงที่ปลอดภัย หลังจาก 4-16 ยุงที่รอดชีวิตทั้งหมดจะถูกตรวจหา oocysts ในกระเพาะของยุงเพื่อนับจำนวน oocyst และนำไปแช่ใน lysis buffer เพื่อทำการทดสอบตรวจหา DNA ด้วยเทคนิค LAMP เทียบกับเทคนิค Nested PCR ต่อไป



ภาพที่ 2.1 การให้เลือดที่ติดเชื้อกับยุงผ่านทาง Membrane feeding



ภาพที่ 2.2 การนับจำนวน oocyst ในกระเพาะอุ้ง

การสกัด DNA จากกระเพาะอุ้ง

นำซากอุ้งติดเชื้อมาตัดขาและปีกออก ตัดแยกส่วนหัวและลำตัว แยกใส่ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 20 mL โดยแยกตามแหล่งที่เก็บ วัน เวลา และชนิดที่เก็บ จากนั้นเติม PBS buffer และ 1% saponin ลงไป 180 μ L บดชิ้นส่วนของอุ้งให้ละเอียดด้วยปลายทิว หลังจากนั้น incubate ที่ อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 20,000g 2 นาที และทิ้ง supernatant จากนั้นเติม PBS buffer 100 μ L แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 20,000g 2 นาที แล้วนำไปวางไว้ใน heat block นาน 10 นาที จากนั้นนำออกมาปั่นเหวี่ยง 20,000g 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ลอยอยู่ใน supernatant มาใช้ในการ ดำเนินการต่อไป

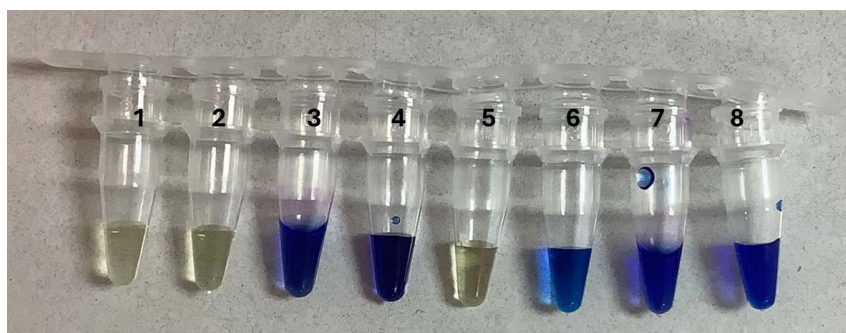
การตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและยุงด้วยวิธี Nested-PCR

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 นาทีและ 72°C 1 นาทีตามด้วย 72°C 10 นาทีวิเคราะห์ผลด้วย 3 % agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide สำหรับ Primer ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Nested PCR มีดังนี้

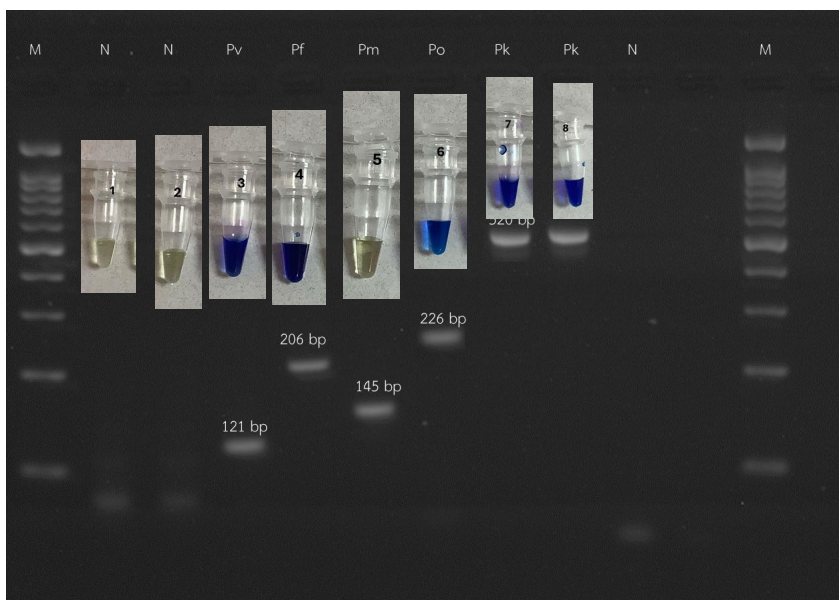
Primer 5' Sequence 3'

rPLU1 (F)	TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA
rPLU5 (R)	CTTGTTGTTGCCTTAACTTC
rFAL1 (F)	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT
rFAL2 (R)	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC
rVIV1 (F)	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC
rVIV2 (R)	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA
rMAL1 (F)	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC
rMAL2 (R)	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA
rOVA1 (F)	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA
rPLU2 (R)	ATCTAAGAATTTACCTCTGACATCTG
PkR1550	GAGTTCTAATCTCCGGAGAGAAAAGA
PkF1140	GATTCATCTATTAAAAATTTGCTTC

ผลการตรวจเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด ในยุงที่ติดเชื้อ ด้วยเทคนิค Multiplex LAMP เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค Nested PCR



(a)



(b)

M: DNA ladder; N: Negative, Pv: *Plasmodium vivax*, Pf: *Plasmodium falciparum*, Pm: *Plasmodium malariae*, Po: *Plasmodium ovale*, Pk: *Plasmodium knowlesi*

ภาพที่ 2.3 แสดงแถบ DNA ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดที่ตรวจด้วยวิธี Nested PCR บน agarose gel เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide (b) เปรียบเทียบกับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดที่ตรวจด้วยเทคนิค LAMP และมีการเติม Bromophenol blue ลงไปในหลอดปฏิกิริยา (a) พบว่าในหลอดปฏิกิริยาที่ 5 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสี ถึงแม้ว่าผลตรวจ Nested-PCR จะปรากฏแถบ DNA ของ *Plasmodium malariae* เมื่อทำการวัด pH มีค่า pH = 3.6 ในขณะที่ pH หลอดปฏิกิริยา Neagtive control มีค่า pH = 3.0 จึงมีความเป็นไปได้ที่ปริมาณ DNA ของ *Plasmodium malariae* มีปริมาณน้อย จึงทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่ทำให้เกิดสีได้ โดยจำนวน oocyst ใน midgut ของ *Plasmodium malariae*

จากยุงตัวที่ 5 มีเพียง 17 oocyst เมื่อเทียบกับจำนวน oocysts ของเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นในยุงแต่ละตัว จะมีค่าเฉลี่ย = 132 oocysts

ตารางที่ 2.2 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วย Multiplex LAMP เทียบกับวิธี Nested PCR

Method	True positive	True negative	False Positive	False negative
Nested PCR	150	0	0	0
Multiplex LAMP	145	13	0	5

สามารถคำนวณค่า sensitivity และ specificity ได้ดังนี้

$$1. \text{ Sensitivity (ความไว) } = \frac{TP}{TP+FN} = \frac{145}{145+5} = 0.9667 \text{ หรือ } 96.67\%$$

$$2. \text{ Specificity (ความจำเพาะ) } = \frac{TN}{TN+FP} = \frac{13}{13+0} = 1 \text{ หรือ } 100\%$$

ดังนั้น ค่า sensitivity ของ Multiplex LAMP คือ 96.67% และค่า specificity คือ 100%

3. อภิปรายและวิจารณ์

จากผลการศึกษานี้พบว่าเทคนิค Multiplex LAMP สามารถใช้ตรวจหาเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, และ *P. knowlesi*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า Sensitivity ที่ 96.67% และค่า Specificity ที่ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่า LAMP เป็นเทคนิคที่ไวและมีความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ในพื้นที่ห่างไกลหรือในภาคสนามที่ขาดแคลนอุปกรณ์และบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ

อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีข้อจำกัดในกรณีที่ปริมาณเชื้อมีน้อย เช่น เชื้อ *Plasmodium malariae* ซึ่งปริมาณ DNA ที่ตรวจพบอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่ส่งผลต่อการแปลผลผ่านการเปลี่ยนสีของสารเคมีที่ใช้ ทำให้บางกรณี LAMP ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อย ถึงแม้ว่า Nested PCR จะสามารถตรวจพบได้ก็ตาม

4. สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัย (conclusion)

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า Multiplex LAMP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด โดยมีความไวสูงและความจำเพาะสูงมาก สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การใช้สาร Bromophenol blue ในการตรวจทำให้การแปลผลสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม การตรวจในกรณีที่ปริมาณเชื้อน้อยอาจต้องใช้เทคนิคอื่นๆ เสริมเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจจับ

4.2 ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์

การเพิ่มความไวของการตรวจในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อย: ควรพัฒนาเทคนิคการสกัดและเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจจับเชื้อในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อย ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการตรวจไม่พบในกรณีเชื้อที่ปริมาณต่ำ

การประยุกต์ใช้ LAMP ในการตรวจหาโรคอื่นๆ: จากผลการศึกษานี้สามารถนำเทคนิค LAMP ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคที่มีการถ่ายทอดผ่านแมลงหรือแมลงพาหะชนิดอื่น เช่น ไข้เลือดออก หรือชิคุนกุนยา

5. Output

งานวิจัยนี้มีผลลัพธ์ที่สำคัญในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ Multiplex LAMP สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิดในยุงที่ติดเชื้อ โดยสามารถสรุปผลลัพธ์สำคัญดังนี้

การพัฒนาเทคนิค Multiplex LAMP

ได้มีการพัฒนาเทคนิค Multiplex LAMP ที่สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, และ *Plasmodium knowlesi*) ได้ในคราวเดียวกัน ทำให้ประหยัดเวลาและทรัพยากรเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวินิจฉัยทีละชนิด

ประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัย

ผลการตรวจวินิจฉัยแสดงให้เห็นว่า Multiplex LAMP มีค่า Sensitivity เท่ากับ 96.67% และ ค่า Specificity เท่ากับ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Nested PCR ทำให้เทคนิคนี้มีความแม่นยำสูงในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย

การใช้งานภาคสนาม

เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นนี้เหมาะสมกับการใช้งานในภาคสนามหรือในพื้นที่ที่มีทรัพยากรจำกัด เนื่องจากไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนและสามารถแสดงผลได้ผ่านการเปลี่ยนสีของสาร Bromophenol blue ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว

ข้อเสนอแนะในการพัฒนาต่อยอด

งานวิจัยนี้เปิดโอกาสในการนำเทคนิค LAMP ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคอื่นๆ ที่ยุงหรือแมลงพาหะชนิดอื่นๆ เป็นพาหะ รวมถึงการพัฒนาเทคนิคเพิ่มเติมสำหรับการตรวจวินิจฉัยในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัย

ผลกระทบที่คาดว่าจะได้รับ

การใช้งานในระบบสาธารณสุข

เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือเสริมในการเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ที่มีการระบาด หรือในพื้นที่ที่ยุงเป็นพาหะของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยให้การวางแผนและดำเนินการในการควบคุมโรคทำได้ทันเวลา

การประยุกต์ใช้ในโรคอื่นๆ

เทคนิค LAMP สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับยุงหรือแมลงพาหะ เช่น ไข้เลือดออก หรือโรคชิคุนกุนยา ทำให้ระบบการเฝ้าระวังโรคมีความครอบคลุมและแม่นยำมากขึ้น

รายงานสรุปการเงิน

สัญญาเลขที่ ๐๑๙/2562 โครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทย่อยงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงด้วยเทคนิค Multiplex Loop-mediated
isothermal amplification (Multiplex-LAMP)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) อิงฟ้า สุนทรวีรัตน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) ๑๖ พฤษภาคม ๒๕๖๒ ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) ๓๐ เมษายน
๒๕๖๓ ระยะเวลาดำเนินการ.....๑.....ปี-..... เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) ๑๖ ตุลาคม ๒๕๖๒-
๒๕๖๓

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ ๑ (๕๐%) ๗๕,๐๐๐ บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี ๔ ตุลาคม ๒๕๖๒

งวดที่ ๒ (๔๐%) ๖๐,๐๐๐ บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี ๒๕ ธันวาคม ๒๕๖๒

งวดที่ ๓ (๑๐%).....บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี.....

รวม ๑๓๕,๐๐๐ (หนึ่งแสนสามหมื่นห้าพันบาทถ้วน)

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน			
2. ค่าจ้าง	๑๘,๐๐๐	๑๘,๐๐๐	
3. ค่าวัสดุ	๑๐๒,๐๐๐	๙๑,๐๐๐	๑๑,๐๐๐
4. ค่าใช้สอย	๒๐,๐๐๐	๒๐,๐๐๐	
5. ค่าครุภัณฑ์			
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ -ค่าธรรมเนียมขอรับพิจารณาจริยธรรม ในสัตว์ทดลอง	๑๐,๐๐๐	๖,๐๐๐	๔,๐๐๐
รวม	๑๕๐,๐๐๐	๑๓๕,๐๐๐	๑๕,๐๐๐



(นางสาวอิงฟ้า สุนทรวีรัตน์)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

1. Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **BioTechniques**, 46(3), 167-172. <https://doi.org/10.2144/000113072>
2. Ocker, R., Prompunjai, Y., Chutipongvivate, S., & Karanis, P. (2016). Malaria diagnosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in Thailand. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 58, 27. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658027>
3. Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Han, E.T., Bantuchai, S., & Buates, S. (2014). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, 52(5), 1471-1477. <https://doi.org/10.1128/JCM.03313-13>
4. Logeshwari, R., Gopalakrishnan, C., Kamalakannan, A., Ramalingam, J., & Saraswathi, R. (2022). A colorimetric hydroxy naphthol blue based loop-mediated isothermal amplification detection assay targeting the β -tubulin locus of *Sarocladium oryzae* infecting rice seed. **Frontiers in Plant Science**, 13, 1077328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1077328>
5. Hong, G.-B., Hsu, J.-P., Chuang, K.-J., & Ma, C.-M. (2022). Colorimetric detection of 1-naphthol and glyphosate using modified gold nanoparticles. **Sustainability**, 14(17), 10793. <https://doi.org/10.3390/su141710793>
6. Nguyen, T.K., Jun, H., Louis, J.M., Mazigo, E., Lee, W.J., Youm, H.C., et al. (2024). Enhancing malaria detection in resource-limited areas: A high-performance colorimetric LAMP assay for *Plasmodium falciparum* screening. **PLOS ONE**, 19(2), e0298087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298087>
7. Alhamid, G., Tombuloglu, H., Motabagani, D., et al. (2022). Colorimetric and fluorometric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for diagnosis of SARS-CoV-2. **Functional & Integrative Genomics**, 22, 1391-1401. <https://doi.org/10.1007/s10142-022-00900-5>
8. Tambo, M., Mwinga, M., & Mumbengegwi, D.R. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and polymerase chain reaction (PCR) as quality assurance tools for

rapid diagnostic test (RDT) malaria diagnosis in northern Namibia. **PLOS ONE**, 13(12), e0206848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206848>

9. Anthony, T. G., Trueman, H. E., Harbach, R. E., & Vogler, A. P. (2000). Polymorphic microsatellite markers identified in individual *Plasmodium falciparum* oocysts from wild-caught *Anopheles* mosquitoes. *Parasitology*, 121 (Pt 2), 121-126.
10. Arez, A. P., Pinto, J., Palsson, K., Snounou, G., Jaenson, T. G., & do Rosario, V. E. (2003). Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *Am J Trop Med Hyg*, 68(2), 161-168.
11. Arnot, D. E., Barnwell, J. W., Tam, J. P., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S., & Enea, V. (1985). Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science*, 230(4727), 815-818.
12. Barnadas, C., Kent, D., Timinao, L., Iga, J., Gray, L. R., Siba, P., . . . Zimmerman, P. A. (2011). A new high-throughput method for simultaneous detection of drug resistance associated mutations in *Plasmodium vivax* dhfr, dhps and mdr1 genes. *Malar J*, 10, 282. doi: 10.1186/1475-2875-10-282
13. Barnadas, C., Tichit, M., Bouchier, C., Ratsimbao, A., Randrianasolo, L., Raherinjafy, R., . . . Menard, D. (2008). *Plasmodium vivax* dhfr and dhps mutations in isolates from Madagascar and therapeutic response to sulphadoxine-pyrimethamine. *Malar J*, 7, 35. doi: 10.1186/1475-2875-7-35