รายงานผลการวิจัย

โครงสร้างประชากรและความไวต่อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในประเทศไทย

โดย

นางสาวเทพนาฏ พุ่มไพบูลย์

วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยเรื่อง โครงสร้างประชากรและความไวต่อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย นางสาวเทพนาฏ พุ่มไพบูลย์

บทคัดย่อ

โครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมนั้นขึ้นอยู่กับสถานการณ์การแพร่ระบาดและสถานการณ์ที่เกี่ยวข้องกับประชาชนในบริเวณนั้นๆ ซึ่งรวมถึง อุบัติการณ์ของโรค ความหนาแน่นของพาหะนำโรค และการเคลื่อนย้ายถิ่นฐานของประชาชน การศึกษานี้แสดงให้เห็นโครงสร้างของประชากรเชื้อมาลาเรียในสี่จังหวัดซึ่งมีเขตติดต่อกับชายแดนไทย-เมียนมา ไทย-กัมพูชา ไทย-มาเลเซีย ได้แก่ จังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษและยะลา ตามลำดับ โดยวิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 ตำแหน่ง พบว่าประชากรเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก กาญจนบุรีและศรีสะเกษ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง ส่วนประชากรเชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ นอกจากนั้นยังพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเชื้อมาลาเรียจากพื้นที่ทั้งสี่จังหวัด โดยประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลามีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดอื่นๆ ในระดับสูงมาก พบลักษณะการผสมพันธุ์ในประชากรเชื้อเดียวกันในประชากรเชื้อจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดยะลา แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในจังหวัดตากและศรีสะเกษ สำหรับความไวต่อยาของเชื้อมาลาเรียสามารถทำการทดสอบได้เฉพาะเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรีเท่านั้น

กิตติกรรมประกาศ

ในขณะที่งานวิจัยชิ้นนี้ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ผู้วิจัยต้องประสบกับอุปสรรคต่างๆ ในเรื่องการลงเก็บตัวอย่างในพื้นที่และจำนวนตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ลดลงในพื้นที่ศึกษา แต่ในที่สุดงานก็เสร็จสิ้นได้ด้วยดีเนื่องจากความช่วยเหลือจากบุคคลท่านต่างๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ในโอกาสนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่มาลาเรียคลินิกทุกท่านในอำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก มาลาเรียคลินิกในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี และมาลาเรียคลินิกในอำเภอเมือง จังหวัดยะลา รวมถึงเจ้าหน้าที่มาลาเรียคลินิกในอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราดที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียในภาคสนาม และขอบคุณผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือเข้ามีส่วนร่วมในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายสนับสนุนของวิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการจัดซื้อวัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์และด้านการบริหารการเงินของโครงการ ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินการได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงชัย หาญยุทธนากร ที่กรุณาให้คำปรึกษาและสอบถามความก้าวหน้าของโครงการตลอดมา และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์สำหรับการใช้สถานที่เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียและทดสอบความไวต่อยาของเชื้อมาลาเรีย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่มีส่วนเปิดโอกาสให้ผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยเพื่อทำงานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จตามเป้าหมาย

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
วิธีการดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	11
สรุปผลการวิจัย	25
เอกสารอ้างอิง	27

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายไพรเมอร์และสีที่ใช้ติดฉลาก 7

ตารางที่ 2 การตอบสนองต่อยาต้านเชื้อมาลาเรียของเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรี 11

ตารางที่ 3 ความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) ของประชากรเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และยะลา 13

ตารางที่ 4 จำนวนอัลลีลและค่า allelic richness ของประชากรเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และยะลา 18

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดตากและจังหวัดกาญจนบุรี โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$) 18

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดตากและจังหวัดศรีสะเกษ โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$) 19

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดตากและจังหวัดยะลา โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$) 20

หน้า

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดศรีสะเกษ โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$) 20

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดยะลา โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$) 21

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดศรีสะเกษและจังหวัดยะลา โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$) 22

ตารางที่ 11 ความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) ระหว่างประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และยะลา 23

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 จำนวนของอัลลีลและความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งในประชากรเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจากพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และยะลา 15

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันถึงแม้ว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียจะมีจำนวนลดลง แต่โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ แม้ว่ามีความพยายามที่จะกำจัดโรคให้หมดไปหรือควบคุมโรคโดยอาศัยการให้การรักษาด้วยยาต้านมาลาเรียและการควบคุมประชากรของยุงพาหะ แต่ยังมีผู้ป่วยด้วยโรคนี้เป็นจำนวนมากตามจังหวัดที่มีพรมแดนติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้านได้แก่ ประเทศพม่า ลาว กัมพูชาและมาเลเซีย(Na-Bangchang and Congpuong, 2007) โดยเฉพาะในแนวชายแดนที่ติดต่อกับประเทศพม่ามีรายงานจำนวนผู้ป่วยคิดเป็นร้อยละ 50 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งประเทศรองลงมาคือ แนวชายแดนติดต่อกับประเทศมาเลเซีย พบจำนวนผู้ป่วยร้อยละ 32 (กลุ่มโรคมาลาเรีย สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2551)ถึงแม้ว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยจะลดลง แต่ปัญหาที่สำคัญจนเป็นผลทำให้ประเทศไทยต้องเปลี่ยนขนานยาที่ใช้ในการรักษามาอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ ปัญหาการดื้อต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ดื้อต่อยาต้านเชื้อมาลาเรียหลายชนิด เช่น คลอโรควิน ซัลฟาด็อกซินไพริเมททามีน เมฟโฟลควิน(White, 1999; Cowman, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแนวจังหวัดที่ติดต่อกับประเทศพม่า ได้แก่ จังหวัดตาก ระนอง และกาญจนบุรี และจังหวัดที่ติดต่อกับประเทศกัมพูชา ได้แก่ จังหวัดตราด จันทบุรี และสระแก้ว (Socheat et al., 2003) จนกระทั่งในปี 2548ประเทศไทยได้เปลี่ยนมาใช้ยาผสมอาร์ทีซูเนตในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

การที่เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆได้อย่างรวดเร็วนั้น ส่งผลให้การพัฒนายาชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษาเป็นเรื่องที่มีความจำเป็น แต่การพัฒนายานั้นต้องการทั้งเงินทุนและเวลาในการดำเนินการดังนั้นหากเราเข้าใจถึงความซับซ้อนทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นหนึ่งในสามปัจจัยหลักที่มีส่วนในการแพร่ระบาดของโรคจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุกรรมของประชากรเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลของการถ่ายเทยีนของเชื้อจากพื้นที่หนึ่งไปสู่อีกพื้นที่หนึ่ง(gene flow)และระดับของความหลากหลายของพันธุกรรมของประชากรเชื้อมาลาเรียในพื้นที่นั้นจะนำมาซึ่งความเข้าใจการแพร่กระจายของเชื้อดื้อต่อยาได้ ข้อมูลเหล่านี้จะนำไปสู่การควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป และเนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีวงชีวิตที่ซับซ้อนโดยสามารถเจริญได้ในยุงพาหะและในมนุษย์ โดยในช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุงนั้น

เชื่อว่าทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในรุ่นลูกหลานหากเกิดการผสมพันธุ์จากเชื้อมาลาเรียเพศผู้และเพศเมียที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน มีการศึกษาพบว่าอัตราการแพร่ระบาดของเชื้อ (transmission rate) (Babiker et al., 1994; Paul et al., 1995)และการเคลื่อนย้ายถิ่นฐานของคนในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ(Lum et al., 2004)ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียในบริเวณนั้นๆ(Pumpaibool et al., 2009)ทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่นั้นมีผลกระทบที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลง (dynamics) ของเชื้อดื้อยา (Ariey et al., 2003) ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ในยุงพาหะแต่ละชนิด (Collins et al., 1998) และยังส่งผลถึงการพัฒนาวัคซีนอีกด้วย (Healer et al., 2004) หากเราใช้ข้อมูลพื้นฐานของโครงสร้างประชากรของเชื้อร่วมกับการตรวจคัดกรองเชื้อดื้อต่อยาต้านมาลาเรียที่เกิดขึ้น จะสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นของเชื้อที่ดื้อต่อยาดังกล่าว รวมไปถึงการกำหนดยุทธศาสตร์ในการป้องกันโรคในพื้นที่นั้นได้อย่างถูกต้อง ซึ่งจะส่งผลให้สามารถยืดระยะเวลาในการใช้ยาต้านมาลาเรียให้คงมีประสิทธิภาพในการรักษาได้นานขึ้น (Hartl, 2004)

ในการศึกษาข้อมูลด้านโครงสร้างประชากรนักวิทยาศาสตร์ใช้เครื่องมือทางชีวโมเลกุลหลายชนิดเพื่อช่วยในการอธิบายสิ่งที่เกิดขึ้นกับประชากรของเชื้อ เช่น การวิเคราะห์ความแตกต่างของประชากรเชื้อมาลาเรียโดยใช้ความแตกต่างที่เกิดขึ้นกับยีนต่างๆที่สังเคราะห์โปรตีนบนผิวของเชื้อมาลาเรีย (surface antigen) (Paul et al., 1995;Babiker et al., 1997; Paul et al., 1998; Mueller et al., 2002) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นกับโปรตีนเหล่านี้อาจมีมากหรือน้อยกว่าความเป็นจริงซึ่งไม่ได้สะท้อนให้เห็นถึงประชากรเชื้อที่มีอยู่จริงในบริเวณนั้น เนื่องจากเชื้อต้องพยายามปรับตัวเพื่อสร้างโปรตีนที่มีความหลากหลายเพื่อหลบเลี่ยงจากระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ ทำให้ผลที่ได้เป็นผลที่แสดงให้เห็นถึงทั้งประวัติศาสตร์ของประชากร (population history) และผลที่มาจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) (Escalanteet al., 2004) แต่หลังจากที่โครงการศึกษาจีโนมของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมได้เสร็จสิ้นลง ได้พบว่ามีเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อได้ นั่นคือ ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน 2-6 นิวคลีโอไทด์ ไมโครแซทเทลไลท์นี้จะกระจายอยู่ทั่วจีโนมของเชื้อมาลาเรีย (Su and Wellems, 1996) ทำให้เครื่องมือนี้มีความละเอียดเพียงพอที่จะใช้ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจากพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาด(Anderson et al., 2000; Conway et al., 2001; Wootton et al., 2002; Nair et al., 2003; Roper et al. 2003; Nashet

al., 2005)จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อใช้ไมโครแซทเทลไทล์เป็นเครื่องมือในการเปรียบเทียบโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียจากประเทศต่างๆทั่วโลก ข้อมูลที่ได้นั้นแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมากของพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ในประเทศต่างๆซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับของการเกิดโรคซึ่งถือว่าเป็นโรคประจำถิ่นในพื้นที่นั้น (level of endemicity) และความรุนแรงของการแพร่กระจายของโรค(transmission intensity) (Anderson et al., 2000) อย่างไรก็ตาม การลดลงอย่างรวดเร็วของการเกิดโรคมาลาเรียในพื้นที่ต่างๆ ทำให้โครงสร้างประชากรและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียมีความแตกต่างกันมากในแต่ละพื้นที่ ในขณะที่ระดับของการถ่ายเทยีนลดลงนั้นอาจส่งผลให้การถ่ายเทลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียระหว่างประชากรนั้นลดลงและจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียดื้อต่อยาระหว่างประชากรเชื้อได้เช่นกัน แต่ก็อาจทำให้ส่งเสริมให้อัตราการเกิดเชื้อมาลาเรียที่มีลักษณะดื้อต่อยาหลายๆชนิด (multiple resistance phenotypes) ได้มากขึ้น (Dye and Williams, 1997)เมื่อศึกษาในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยสามารถพบความแตกต่างของประชากรเชื้อมาลาเรียในแต่ละภูมิภาค โดยเชื้อมาลาเรียในภาคใต้ของประเทศมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมากกับเชื้อมาลาเรียในภูมิภาคอื่นๆ อีกทั้งยังไม่พบการกระจายตัวของเชื้อมาลาเรียจากพื้นที่หนึ่งไปสู่พื้นที่อื่นๆ (Pumpaibool et al., 2009) สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างประชากรของเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยในการแพร่ระบาดในแต่ละพื้นที่ อันได้แก่ ตัวเชื้อมาลาเรีย ยุงพาหะ และมนุษย์ที่เป็นเจ้าบ้าน (host) ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละท้องที่(Babiker and Walliker, 1997) ด้วยเหตุนี้การศึกษาโครงสร้างประชากรในบริเวณเฉพาะที่สนใจในปัญหาที่เกิดขึ้นจะช่วยทำให้เข้าใจถึงลักษณะของประชากรเชื้อและปัญหาการแพร่ระบาดที่เกิดขึ้น รวมถึงปัจจัยแวดล้อมด้านอื่นๆ เช่น พฤติกรรมของคนในพื้นที่ เมื่อทำการศึกษาพันธุศาสตร์ของเชื้อร่วมกับการเก็บข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นระบบและครบถ้วนจะช่วยให้มีความเข้าใจมากขึ้นและสามารวางแผนในการควบคุมโรคมาลาเรียได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในบริเวณแนวชายแดนไทย-กัมพูชาที่มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่ลดลง ในขณะที่การติดเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์มีเพิ่มขึ้น อุบัติการณ์ของโรคในจังหวัดภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดยะลา นราธิวาส ชุมพรและประจวบคีรีขันธ์ อยู่ในสิบจังหวัดแรกที่มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียสูงต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี 2549 อันเนื่องจากเหตุการณ์ความไม่สงบภายในประเทศทำให้เจ้าหน้าที่มาลาเรียไม่สามารถดำเนินการค้นหาผู้ป่วยได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะใน 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าโรคมาลาเรียกลับมาเป็นปัญหาสำคัญในพื้นที่จังหวัดภาคใต้ นอกจากนี้การศึกษาที่เกี่ยวเนื่องกับลักษณะของเชื้อ

มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมและการตอบสนองต่อยาของเชื้อในห้องปฏิบัติการในพื้นที่ดังกล่าวยังมีอยู่จำกัด หากมีการศึกษาเพื่อหาข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวจะทำให้เกิดประโยชน์ต่อการควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าวต่อไป

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในจังหวัดยะลานั้นมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างอย่างมากจากเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันนี้ในจังหวัดอื่นๆ แม้เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรเชื้อจากจังหวัดระนองซึ่งเป็นพื้นที่จังหวัดทางตอนใต้ของประเทศเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นเชื้อในจังหวัดยะลายังมีแนวโน้มที่จะเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อสายพันธุ์เดียว ซึ่งหากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถนำลักษณะทางพันธุกรรมที่สำคัญเช่น การดื้อต่อยาต้านมาลาเรียที่ใช้ในการรักษา และถ่ายทอดไปในเชื้อรุ่นต่อไป อาจส่งผลให้มีการระบาดของเชื้อที่ก่อความรุนแรงในพื้นที่ดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่มากขึ้นทั้งในพื้นที่เดียวกันและพื้นที่ในจังหวัดใกล้เคียง จะทำให้เห็นภาพของโครงสร้างประชากรและการเปลี่ยนแปลงของประชากรเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าวได้ดีมากยิ่งขึ้น

ความรู้พื้นฐานของลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในประชากรเชื้อมาลาเรีย และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากร เมื่อประกอบเข้ากับแนวทางที่เหมาะสมในการคัดกรองเชื้อดื้อต่อยาต้านมาลาเรียจะช่วยอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงของประชากรเชื้อดื้อต่อยาต้านมาลาเรียในพื้นที่นั้นๆได้ ซึ่งสามารถช่วยในการวางแผนการควบคุมโรคได้อีกด้วย ด้วยเหตุนี้โปรแกรมวิจัยมาลาเรีย วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงมองเห็นความสำคัญในการศึกษาโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมร่วมกับการศึกษาความไวต่อยาของเชื้อในจังหวัดชายแดนภาคใต้ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียเพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงลักษณะเฉพาะของเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าว อันจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมป้องกันโรคต่อไป

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

เก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในปี 2556 จากผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาที่มาลาเรียคลินิกในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ตราด และระนอง เมื่อได้รับการวินิจฉัยจากเจ้าหน้าที่มาลาเรียคลินิกว่าติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

โดยมีเกณฑ์ในการคัดผู้ป่วยเข้า คือ

1. อายุตั้งแต่ 15 ปี ขึ้นไป

2. เป็นผู้ติดเชื้อใหม่และยังไม่ได้รับยาต้านมาลาเรีย

เกณฑ์การคัดออก คือ

1. ผู้พบเชื้อใหม่ภายใน 28 วัน หลังจากการรักษาครั้งสุดท้าย

2. มีอาการรุนแรง ไม่รู้สึกตัว และมีความจำเป็นต้องส่งต่อไปยังโรงพยาบาล

3. มีประวัติเลือดไหลไม่หยุด

ผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ดังกล่าวข้างต้นจะได้รับข้อมูลการวิจัยและขอความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยโดยลงชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย ซึ่งการวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย กรมควบคุมโรค หลังจากนั้นผู้ป่วยได้รับการสัมภาษณ์ข้อมูลส่วนตัวและประวัติในการได้รับเชื้อมาลาเรีย เจาะปลายนิ้วผู้ป่วยเพื่อเก็บตัวอย่างเลือด โดยแบ่งเลือดผู้ป่วยเป็นสองส่วน ส่วนแรกใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ โดยจะใช้ micropipete tip ปราศจากเชื้อ สวมลูกยางดูดเลือดผู้ป่วยปริมาณ 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตรซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร500 มิลลิลิตร ผสมเลือดตัวอย่างให้เข้ากันดีกับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ นำหลอดตัวอย่างเชื้อแช่ในตู้เย็นก่อนนำกลับมาทำการเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการ หรือนำส่งทางไปรษณียภัณฑ์แบบด่วน

พิเศษ เลือดตัวอย่างส่วนที่ 2 ปริมาณ 50ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในถุงพลาสติก เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

แต่เนื่องจากจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในจังหวัดตราดมีจำนวนน้อยมาก คือ 4 ราย จากมาลาเรียคลินิกในอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการติดเชื้อมากที่สุดในจังหวัดตราด จึงศึกษาตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจากจังหวัดศรีสะเกษซึ่งได้จากโครงการศึกษาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในผู้ป่วย จำนวน 14 ตัวอย่าง และเปลี่ยนพื้นที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดระนองเป็นจังหวัดยะลา เนื่องจากอุบัติการณ์ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในจังหวัดระนองในปีที่ลงพื้นที่เก็บตัวอย่างนั้นมีน้อยมาก

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการ

เมื่อได้รับตัวอย่างเชื้อมาลาเรียนำตัวอย่างเชื้อปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนอาหารเหลวส่วนบนทิ้งเหลือส่วนที่เป็นเม็ดเลือดแดง ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัม 10%ลงไป 0.4 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆให้เข้ากัน แล้วดูดใส่จานหลุม(96Well Plate)หลุมละ 100 ไมโครลิตร จะได้ประมาณ 4 หลุม นำจานหลุมใส่ในโถดูดความชื้นจุดเทียน ปิดฝาเปิดช่องระบายอากาศเมื่อเทียนใกล้ดับปิดช่องระบายอากาศ จะได้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ ประมาณ 5-8% นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมงและหยดเลือดใหม่ (เลือดที่ไม่มีเชื้อ 25% Haematocrit) 1 หยดทุก 4 วัน ในกรณีที่เชื้อจากผู้ป่วยมีจำนวนสูงมากจะต้องหยดเลือดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงจะต้องแบ่งเลือดออกมาเพื่อทำฟิล์มโลหิตแบบบาง ย้อมด้วยสียิมซาตรวจสอบลักษณะและระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรีย

ทำการทดสอบการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมต่อยา 5 ชนิด ได้แก่ ไพริเมทามีน คลอโรควิน ควินิน เมโฟลควิน อาร์ทิซูเนต โดยทำการเตรียมเชื้อให้อยู่ในระยะ ring form 3-5% จากนั้นเตรียมเชื้อมาลาเรียให้เป็น 0.5% เพื่อใช้สำหรับทดสอบการตอบสนองต่อยา เตรียมยาที่จะทดสอบให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางยาในหลอดทดลองโดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 10% ซีรัม ให้ได้ความเข้มข้น 10 50 100 200 500 1,000 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมได้ครอบคลุมทั้งเชื้อที่ไวต่อยาและเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านมาลาเรีย จากนั้นนำยาแต่ละความเข้มข้นใส่ในจานหลุม 96

well plate โดยในหลุมแรกของแถวใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา 100 ไมโครลิตรเพื่อเป็นหลุมควบคุม หลุมถัดไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาที่ต้องการทดสอบจากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูงหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเชื้อมาลาเรียที่เตรียมไว้ใส่ลงในทุกหลุมๆ ละ 10 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เลือดและอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกัน นำจานหลุมใส่ในโถดูดความชื้น จะเทียน ปิดฝา เมื่อเทียนใกล้ดับปิดช่องระบายอากาศ แล้วนำไปบ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำเลือดจากแต่ละหลุมออกมาทำฟิล์มโลหิตแบบบาง ย้อมสียิมซา และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเชื้อจากฟิล์มโลหิตของแต่ละหลุม ความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อตายหมด ถือเป็นค่าความไวต่อยาของเชื้อ (minimum inhibitory concentration) โดยมีเชื้อมาลาเรียโคลนบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นตัวควบคุม

4. สกัดดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี Chelex extraction(Kain and Lanar, 1991)

ตัดกระดาษกรองที่มีตัวอย่างเลือดผู้ป่วย แช่ในสารละลาย phosphate buffer saline ที่มี 0. 5%saponinที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน (overnight) จากนั้นล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่เตรียมไว้ใส่ในmicrocentrifugetube ขนาด 1. 5มิลลิลิตร ที่มี 5% chelex-100 resin ที่ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไป vortex เพื่อให้สายดีเอ็นเอหลุดออกมาจากกระดาษกรอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสใส่หลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.การหาจีโนไทป์ของเชื้อมาลาเรียด้วยไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 7ตำแหน่ง

ใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7ตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซมต่างๆซึ่งติดสารฟลูโอเรสซีน ดังแสดงในตารางที่ 1ในการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอในช่วงที่สนใจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายไพรเมอร์และสีที่ใช้ติดฉลาก

Locus (code)	Sequence of primers	Fluorescent dye
TA80 (P04)	F: CTACTTATGTATCATCCAAT R: TAATTGATGTTTGTAATTGT	6-Fam
ARP2 (P17)	F: TATGAACATTAACGAAGA R: ATTTTTATCCTGAGAGCC	Hex
TA1 (P18)	F1:CTACATGCCTAATGAGCA R:TTTTATCTTCATCCCCAC F2:CCGTCATAAGTGCAGAGC	6-Fam
Polyα (P20)	R1 : ATCAGATAATTGTTGGTA F : AAAATATAGACGAACAGA R2 : GAAATTATAACTCTACCA	Tet
TAA60 (P21)	F1 : CTCAAAGAAAAATAATTCA R : AAAAAGGAGGATAAATACAT F2 : TAGTAACGATGTTGACAA	Tet
ARA2 (P22)	F1 : GTACATATGAATCACCAA R : GCTTTGAGTATTATTAATA F2 : GAATAAACAAAGTATTGCT	Hex
Pfg377 (P23)	R1 : TTATGTTGGTACCGTGTA F : GATCTCAACGGAAATTAT R2 : TTATCCCTACGATTAACA	Hex
PfPK2 (P24)	R1 : CCTCAGACTGAAATGCAT F : CTTTCATCGATACTACGA R2 : AAAGAAGGAACAAGCAGA	Hex

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายไพรเมอร์และสีที่ใช้ติดฉลาก (ต่อ)

Locus (code)	Sequence of primers	Fluorescent dye
TAA87 (P25)	F1 : ATGGGTTAAATGAGGTACA R : ACATGTTCATATTACTCAC F2 : AATGGCAACACCATTCAAC	Tet
TAA109 (P26)	F1 : TGGGAACATCATAAGGAT R : CCTATACCAAACATGCTAAA F2 : GGTTAAATCAGGACAACAT	6-Fam
TAA81 (P27)	F1:GAAGAAATAAGGGAAGGT R:TTTCACACAACACAGGATT F2:TGGACAAATGGGAAAGGATA	6-Fam
C1M8 (P33)	F:AGTATTATTATTACCACTACT R:GAAGGCTAATACAATTGGTA	Tet

การทำ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอนั้นใช้หลักการ hemi-nested PCR เป็นการทำ PCR 2 รอบ โดยรอบที่สองจะใช้ primer เส้นที่ใช้ในรอบแรกและส่วนอีกเส้นหนึ่งเป็น primer ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสซีนสำหรับไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งที่ 18 20 21 22 23 24 25 26 และ 27 ส่วนไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งที่ 4 17 และ 33 ทำ PCR เพียงรอบเดียว การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ PCR และสภาวะที่ใช้มีดังนี้

1. ตำแหน่งที่ 18 20 21 22 23 24 25 26 และ 27

การทำ PCR รอบแรก ในปฏิกิริยา 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นหรือปริมาณ
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	1.5 ไมโครลิตร
Deoxynucleoside triphosphate	80 ไมโครโมลาร์
Primer (each)	0.75 พิโคโมล
$MgCl_2$	5 มิลลิโมลาร์

Taq DNA polymerase (Promega)	0.2 ยูนิต

โดยใช้สภาวะดังนี้

1. Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที
2. Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. Annealing	42 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	40 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. Extension	65 องศาเซลเซียส	40 วินาที (ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 25 รอบ)
5. Final extension	65 องศาเซลเซียส	2 นาที

การทำ PCR รอบที่สอง ในปฏิกิริยา 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นหรือปริมาณ
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	1 ไมโครลิตร
Deoxynucleoside triphosphate	80 ไมโครโมลาร์
Primer (each)	2 พิโคโมล
$MgCl_2$	4 มิลลิโมลาร์
Taq DNA polymerase (Promega)	0.2 ยูนิต

โดยใช้สภาวะดังนี้

1. Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที
2. Denaturation	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที
3. Annealing	45 องศาเซลเซียส	20 วินาที
4. Extension	65 องศาเซลเซียส	30 วินาที (ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ)
5. Final extension	65 องศาเซลเซียส	2 นาที

2. ตำแหน่งที่ 4 17 และ 33

การทำ PCR ในปฏิกิริยา 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

	ความเข้มข้นหรือปริมาณ
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	1.5 ไมโครลิตร
Deoxynucleoside triphosphate	80 ไมโครโมลาร์
Primer (each)	2 พิโคโมล

$MgCl_2$	4 มิลลิโมลาร์
Taq DNA polymerase (Promega)	0.2 ยูนิต

โดยใช้สภาวะดังนี้

1. Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	
2. Denaturation	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
3. Annealing	45 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
4. Extension	65 องศาเซลเซียส	30 วินาที	(ทำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ)
5. Final extension	65 องศาเซลเซียส	2 นาที	

หลังจากทำ PCR แล้วส่งวิเคราะห์ความยาวของส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer (ABI 3730XL DNA Analyzer) โดยเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์กับ internal size standardด้วย Peak Scanner Software v1.0

3. วิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลที่ได้ในรูปของความยาวอัลลีลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ FSTAT version 2.9.4 ซึ่งจะได้พารามิเตอร์ต่างๆที่ใช้อธิบายโครงสร้างประชากรของเชื้อนอกจากนั้นใช้ Wilcoxon signed-rank test ในการเปรียบเทียบค่า alleleic richness ของประชากรเชื้อในพื้นที่ต่างๆโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 22.0

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ข้อมูลทั่วไปของเชื้อมาลาเรียตัวอย่าง

สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมได้จำนวน 28 25 และ 50 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจวินิจฉัยโรค ณ มาลาเรียคลินิกในอำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอเมืองยะลา จังหวัดยะลา ตามลำดับ รวม 103 และตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดศรีสะเกษจำนวน 14 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 117 ตัวอย่าง

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียและการทดสอบการตอบสนองต่อยาต้านเชื้อมาลาเรีย

จากตัวอย่าง 103 ตัวอย่าง เชื้อมาลาเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการมีจำนวน 18 ตัวอย่าง โดยเป็นเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรีเพียงจังหวัดเดียว ส่วนเชื้อมาลาเรียตัวอย่างจากจังหวัดตากเมื่อนำเพาะเลี้ยงพบว่าเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราเกือบทั้งหมด สำหรับเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลาไม่สามารถเพาะเลี้ยงขึ้นถึงแม้ว่าจะไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียให้เพิ่มจำนวนได้ในห้องปฏิบัติการแล้ว จึงนำเชื้อมาลาเรียดังกล่าวมาทดสอบยาต้านเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด ได้แก่ ไพริเมทามีน คลอโรควิน ควินิน เมโฟลควิน และอาร์ทิมิซินิน โดยยา 2 ชนิดแรก เป็นยาที่เลิกใช้ในการรักษาการติดเชื้อมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ส่วนยาสองชนิดหลังเป็นยาขนานแรกที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน จากการทดสอบพบว่า เชื้อมาลาเรียตัวอย่างจากจังหวัดกาญจนบุรี มีความไวต่อยาไพริเมทามีน อยู่ในช่วง 100 – 200 ไมโครโมลาร์ สำหรับยาคลอโรควิน เชื้อมาลาเรียตัวอย่างมีความไวต่อยาคลอโรควินที่ 200 – 1,000 นาโนโมลาร์ สำหรับยาควินิน เชื้อมาลาเรียตัวอย่างมีความไวต่อยาควินิน ในช่วง 300 – 1,000 นาโนโมลาร์ สำหรับยาเมโฟลควิน เชื้อมาลาเรียตัวอย่างมีความไวต่อยาเมโฟลควิน ในช่วง 100 – 500 นาโนโม ส่วนยาอาร์ทีมิซินิน เชื้อมาลาเรียตัวอย่างมีความไวต่อยาอาร์ทีมิซินิน ในช่วง 20 – 50 นาโนโมลาร์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การตอบสนองต่อยาต้านเชื้อมาลาเรียของเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรี

จังหวัด/ ชนิดยา	ไพริเมทามีน (ไมโครโมลาร์)	คลอโรควิน (นาโนโมลาร์)	ควินิน (นาโนโมลาร์)	เมโฟลควิน (นาโนโมลาร์)	อาร์ทิมิซินิน (นาโนโมลาร์)
กาญจนบุรี	166.67±38.35	538.89±181.95	744.44±301.41	333.33±174.89	40.00±14.55

3. ความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียตัวอย่าง

เมื่อทำการวิเคราะห์หารูปแบบของจีโนไทป์ของเชื้อมาลาเรียตัวอย่างด้วยตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 12 ตำแหน่ง พบว่า ไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง ARP2 และ C1M8 เป็นตำแหน่งที่ตัวอย่างจำนวนมากไม่ให้ผลิตภัณฑ์ จึงไม่นำ 2 ตำแหน่งนี้มาวิเคราะห์ จึงเหลือตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่งในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจากทั้งสี่จังหวัด จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตากทั้งหมด 28 ตัวอย่าง มีตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่เกิดจากการติดเชื้อหลายสายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 3 ตัวอย่าง และอีกหนึ่งตัวอย่างไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ PCR ได้ครบทั้ง 10 ตำแหน่ง จึงมีตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมเพียงหนึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์ 24 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรี ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง มีตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่เกิดจากการติดเชื้อหลายสายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 2 ตัวอย่าง และอีก 3 ตัวอย่างไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ PCR ได้ครบทั้ง 10 ตำแหน่ง จึงมีตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมเพียงหนึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์ 20 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดศรีสะเกษ ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง มีตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่เกิดจากการติดเชื้อหลายสายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่มีตัวอย่างที่ไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ PCR ได้ครบทั้ง 10 ตำแหน่ง จึงมีตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมเพียงหนึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์ 13 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลา ทั้งหมด 50 ตัวอย่าง มีตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่เกิดจากการติดเชื้อหลายสายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 1 ตัวอย่าง และอีก 8 ตัวอย่างไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ PCR ได้ครบทั้ง 10 ตำแหน่ง จึงมีตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมเพียงหนึ่งสายพันธุ์บริสุทธิ์ 41 ตัวอย่าง ด้วยเหตุนี้จึงมีตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่สามารถทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในทั้ง 10 ตำแหน่งและเป็นตัวอย่างเชื้อที่มีเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมเพียงโคลนเดียวซึ่งจะสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่ออธิบายความหลากหลาย

และโครงสร้างประชากรด้วยโปรแกรม FSTAT ต่อไป จำนวนตัวอย่างทั้งหมดมี 98 ตัวย่าง โดยเป็นตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตาก 24 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรี 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดศรีสะเกษ 13 ตัวอย่างและตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลา 41 ตัวอย่าง

หลังจากนำข้อมูลขนาดของอัลลีลของเชื้อตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ FSTAT version 2.9.4 พบว่า ประชากรเชื้อมาลาเรียของจังหวัดตาก มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.58 ± 0.19 ประชากรเชื้อมาลาเรียของจังหวัดกาญจนบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.56 ± 0.19 ประชากรเชื้อมาลาเรียของจังหวัดศรีสะเกษ มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.57 ± 0.17 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและสามารถสรุปได้ว่าประชากรเชื้อมาลาเรียทั้งสามพื้นที่มีความหลากหลายพันธุกรรมในระดับปานกลาง ส่วนประชากรเชื้อมาลาเรียของจังหวัดยะลา มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.22 ± 0.24 สำหรับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของเชื้อตัวอย่างจากจังหวัดตาก อยู่ในช่วง 0.10 – 0.77 (ตำแหน่ง TA109 บนโครโมโซมที่ 6 และ TAA81 บนโครโมโซมที่ 5) ส่วนเชื้อตัวอย่างจากจังหวัดกาญจนบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งอยู่ในช่วง 0.10 – 0.74 (ตำแหน่ง TA1 บนโครโมโซมที่ 6 และ TAA60 บนโครโมโซมที่13) ส่วนตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดศรีสะเกษ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งอยู่ในช่วง 0.15 – 0.74 (ตำแหน่ง TA109 บนโครโมโซมที่ 6 ส่วน TAA81 และ ARA2 บนโครโมโซมที่ 5 และ 11 มีความหลากหลายมากที่สุด) สำหรับตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งอยู่ในช่วง 0.00 – 0.49 (ตำแหน่ง TAA60 TAA81 ARA2 Poly-α และ TA80 บนโครโมโซมที่ 13 5 11 4 และ 10 ตามลำดับ ส่วน PfPK2 และ TA1 บนโครโมโซม12 และ 6 มีความหลากหลายมากที่สุด) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) ของประชากรเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และยะลา

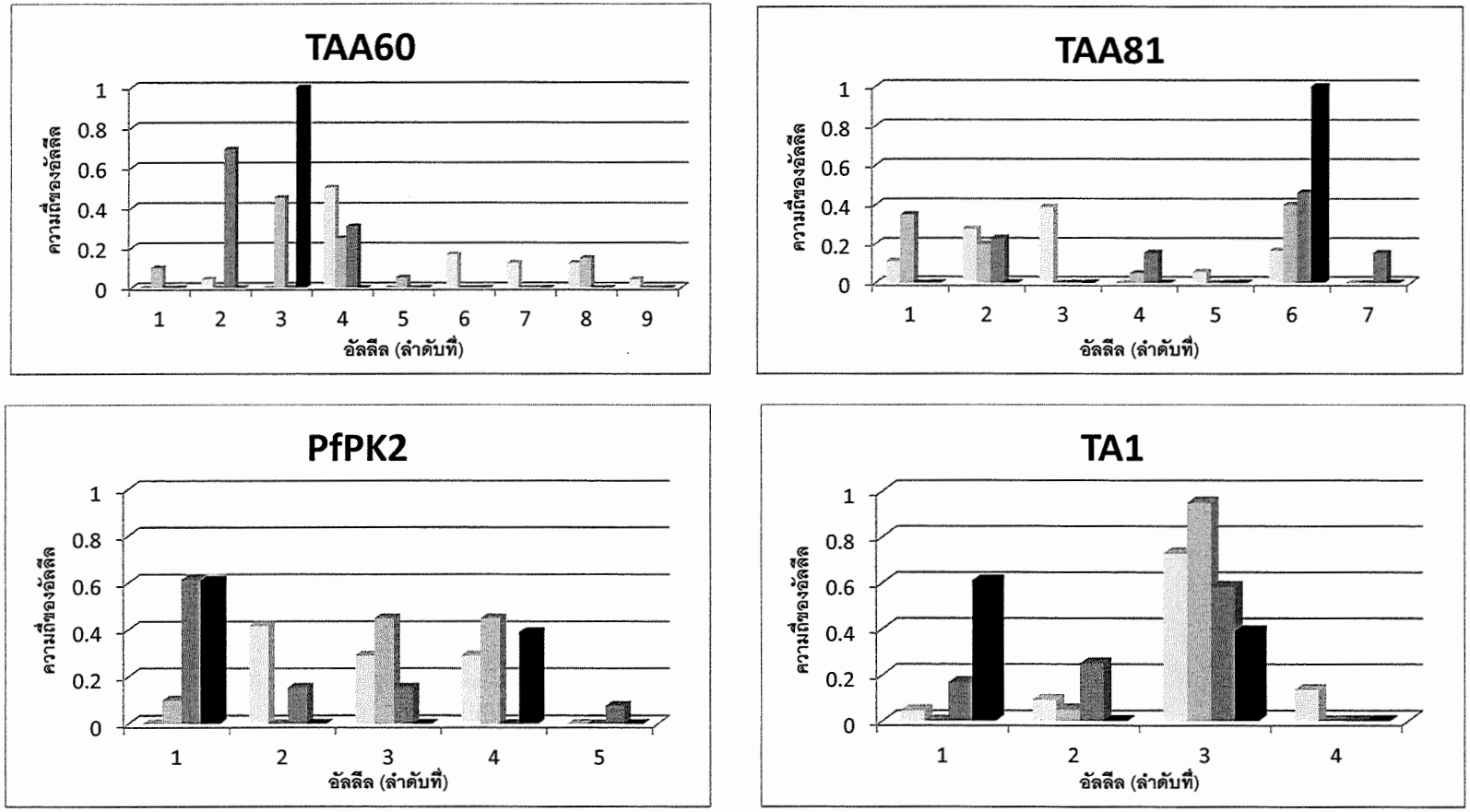
	ตาก	กาญจนบุรี	ศรีษะเกษ	ยะลา
จำนวนตัวอย่าง	24	20	13	41
PfPK2	0.69	0.62	0.62	0.49
TAA87	0.57	0.67	0.62	0.47
TA1	0.46	0.10	0.62	0.49
Poly α	0.67	0.67	0.64	0.00
TAA60	0.72	0.74	0.46	0.00
ARA2	0.63	0.63	0.74	0.00
Pfg377	0.53	0.53	0.59	0.26
TA80	0.66	0.48	0.54	0.00
TA109	0.10	0.48	0.15	0.46
TAA81	0.77	0.71	0.74	0.00
H_S±SD	0.58±0.19	0.56±0.19	0.57±0.17	0.22±0.24

เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของอัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งต่างๆ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1 พบจำนวนอัลลีลมากที่สุด 9 อัลลีล ที่ตำแหน่ง TAA60 และ Poly – α จำนวนอัลลีลน้อยที่สุด 3 อัลลีล ที่ตำแหน่ง TA80 นอกจากนั้นพบว่าความถี่ของอัลลีลหลักที่พบในตำแหน่ง Poly-α ของประชากรทั้งสี่พื้นที่นั้นแตกต่างกัน คือ การกระจายตัวของอัลลีลในตำแหน่ง Poly-α ประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตากกระจายตัวอยู่ในอัลลีลลำดับที่ 6 เชื้อมาขาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรีจะกระจายตัวอยู่ในอัลลีลลำดับที่ 2 ส่วนประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดศรีสะเกษจะมีการกระจายตัวอยู่ในอัลลีลลำดับที่ 5 สำหรับประชากรเชื้อมาลเรียจากจังหวัดยะลามีการกระจายตัวอยู่ในอัลลีลลำดับที่ 9 ตามลำดับ และประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตากยังมีการกระจายอัลลี

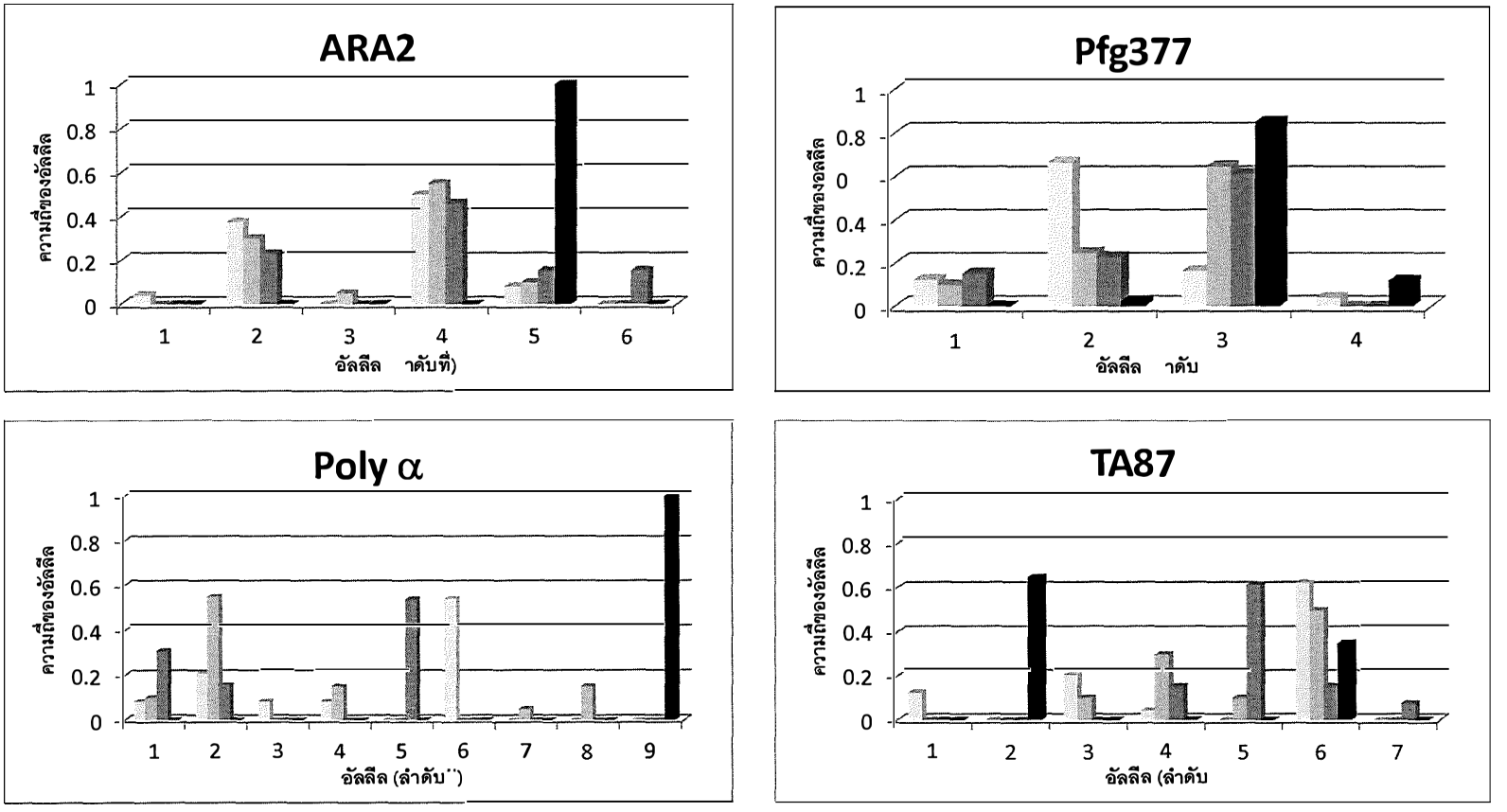
ลของตำแหน่ง PfPK2 และ Pfg377 ที่มีลักษณะแตกต่างจากประชากรอื่น ประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรีมีการกระจายอัลลีลของตำแหน่ง TA60 แตกต่างจากประชากรเชื้ออื่นๆ นอกจากนั้นประชากรเชื้อจากจังหวัดศรีสะเกษยังมีการกระจายอัลลีลของตำแหน่ง TA60 และ TA87 ที่แตกต่างจากประชากรเชื้ออื่น ยิ่งไปกว่านั้นประชากรเชื้อมาลาเรียจากยะลามีการกระจายอัลลีลของตำแหน่ง TA60 TAA81 TA1 ARA2 และ TA87 ที่แตกต่างจากประชากรเชื้อจากพื้นที่อื่น ซึ่งการกระจายตัวของอัลลีลที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้โครงสร้างประชากรทั้งสามมีความแตกต่างกัน ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ FSAT ต่อไป

ตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งที่มีจำนวนอัลลีลมากที่สุด คือ TAA60 และ Poly α มีจำนวน 9 อัลลีล ส่วนตำแหน่งที่มีจำนวนอัลลีลน้อยที่สุด คือ TA80 มีจำนวน 3 อัลลีล

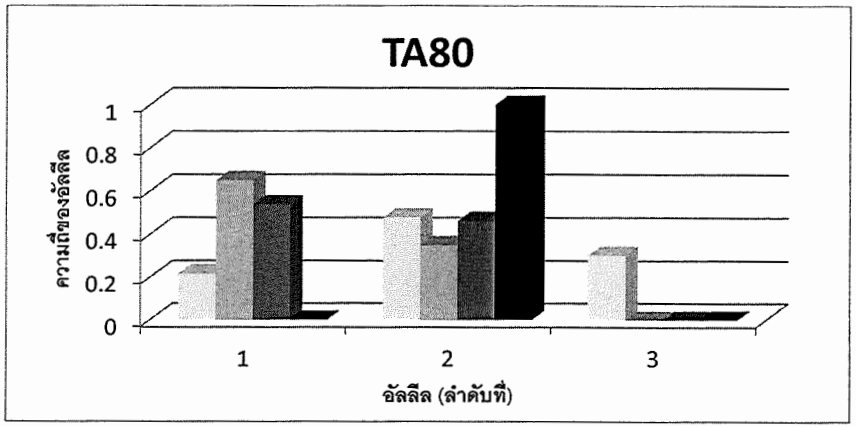
เมื่อพิจารณาจำนวนอัลลีลที่พบในประชากรของเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยนำค่า allelic richness (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นค่าของจำนวนอัลลีลของแต่ละประชากรที่โปรแกรมคำนวณขึ้น ค่านี้จะไม่ขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างซึ่งอาจไม่เท่ากันในแต่ละประชากร ทำให้สามารถนำค่านี้มาเปรียบเทียบเพื่อดูว่าในแต่ละประชากรมีอัลลีลของตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์ที่พบมากน้อยต่างกันหรือไม่ โดยใช้ Wilcoxon signed-rank test ในการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตากและกาญจนบุรีมีจำนวนอัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ในแต่ละตำแหน่งไม่แตกต่างจากประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดศรีสะเกษ แต่ประชากรเชื้อจากจังหวัดยะลามีจำนวนอัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ในแต่ละตำแหน่งน้อยกว่าประชากรเชื้อจากจังหวัดตาก กาญจนบุรีและจังหวัดศรีสะเกษอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

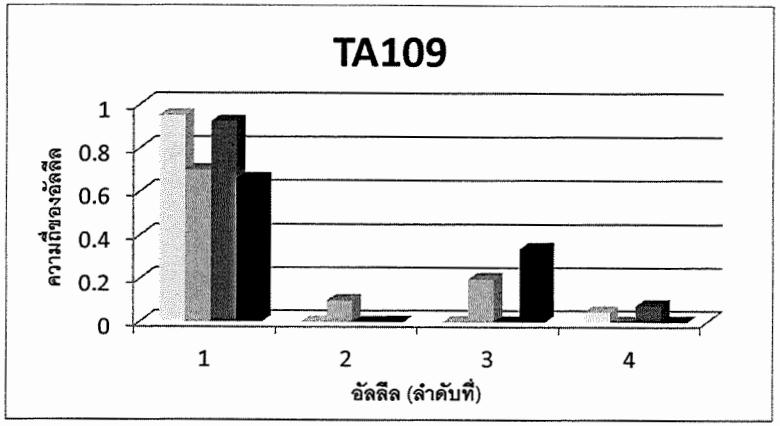


รูปที่ 1 จำนวนของอัลลีลและความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งในประชากรเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากพื้นที่จังหวัดตาก ☐ กาญจนบุรี ☐ ศรีสะเกษ ☐ และยะลา ■



รูปที่ 1 (ต่อ) จำนวนของอัลลีลและความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งในประชากรเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากพื้นที่จังหวัดตาก ☐ กาญจนบุรี ☐ ศรีสะเกษ ☐ และยะลา ■





รูปที่ 1 (ต่อ) จำนวนของอัลลีลและความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งในประชากรเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากพื้นที่จังหวัดตาก ☐ กาญจนบุรี ☐ ศรีสะเกษ ■ และยะลา ■

ตารางที่ 4 จำนวนอัลลีลและค่า allelic richness ของประชากรเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และยะลา

	ตาก		กาญจนบุรี		ศรีสะเกษ		ยะลา	
จำนวนตัวอย่าง	24		20		13		41	
PfPK2	3§	(3.0)*	3	(3.0)	4	(4.0)	2	(2.0)
TAA87	4	(3.7)	4	(4.0)	4	(4.0)	2	(2.0)
TA1	4	(3.8)	2	(1.8)	3	(3.0)	2	(2.0)
Poly α	5	(4.8)	5	(4.8)	3	(3.0)	1	(1.0)
TAA60	6	(5.5)	5	(4.8)	2	(2.0)	1	(1.0)
ARA2	4	(3.7)	4	(3.8)	4	(4.0)	1	(1.0)
Pfg377	4	(3.7)	3	(3.0)	3	(3.0)	3	(2.5)
TA80	3	(3.0)	2	(2.0)	2	(2.0)	1	(1.0)
TA109	2	(1.8)	3	(3.0)	2	(2.0)	2	(2.0)
TAA81	5	(4.9)	4	(3.8)	4	(4.0)	1	(1.0)

§ จำนวนอัลลีล

*allelic richness

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดตากและจังหวัดกาญจนบุรี โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Tak	10	3.7976	1.07026	1.82	5.49
Kanchanaburi	10	3.4064	1.03535	1.85	4.82

	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Z	p
Negative Ranks	7[a]	5.57	39.00	-1.172[d]	0.241
Positive Ranks	3[b]	5.33	16.00		
Ties	0[c]				
Total	10				

a. Kanchanaburi < Tak

b. Kanchanaburi > Tak

c. Kanchanaburi = Tak

d. Based on positive ranks

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดตากและจังหวัดศรีสะเกษ โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Tak	10	3.7976	1.07026	1.82	5.49
Srisaket	10	3.0991	0.87533	2.00	4.00

	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Z	p
Negative Ranks	6[a]	7.00	42.00	-1.478[d]	0.139
Positive Ranks	4[b]	3.25	13.00		
Ties	0[c]				
Total	10				

a. Srisaket < Tak

b. Srisaket > Tak

c. Srisaket = Tak

d. Based on positive ranks

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดตากและจังหวัดยะลา โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Tak	10	3.7976	1.07026	1.82	5.49
Yala	10	1.5478	0.59476	1.00	2.48

	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Z	p
Negative Ranks	9[a]	6.00	54.00	-2.2.701[d]	0.007
Positive Ranks	1[b]	1.00	1.00		
Ties	0[c]				
Total	10				

a. Yala < Tak

b. Yala > Tak

c. Yala = Tak

d. Based on positive ranks

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดศรีสะเกษ โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kanchanaburi	10	3.4064	1.03535	1.85	4.82
Srisaket	10	3.0991	0.87533	2.00	4.00

	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Z	p
Negative Ranks	3[a]	7.33	22.00	-0.059[d]	0.953
Positive Ranks	6[b]	3.83	23.00		
Ties	1[c]				
Total	10				

a. Srisaket < Kanchanaburi

b. Srisaket > Kanchanaburi

c. Srisaket = Kanchanaburi

d. Based on positive ranks

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดยะลา โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kanchanaburi	10	3.4064	1.03535	1.85	4.82
Yala	10	1.5478	0.59476	1.00	2.48

	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Z	p
Negative Ranks	9[a]	6.00	54.00	-2.703[d]	0.007
Positive Ranks	1[b]	1.00	1.00		
Ties	0[c]				
Total	10				

a. Yala < Kanchanaburi

b. Yala > Kanchanaburi

c. Yala = Kanchanaburi

d. Based on positive ranks

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบจำนวนอัลลีลที่พบในตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งของประชากรเชื้อจากจังหวัดศรีสะเกษและจังหวัดยะลา โดย Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Srisaket	10	3.0991	0.87533	2.00	4.00
Yala	10	1.5478	0.59476	1.00	2.48

	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Z	p
Negative Ranks	9[a]	6.00	54.00	-2.703[d]	0.007
Positive Ranks	1[b]	1.00	1.00		
Ties	0[c]				
Total	10				

a. Yala < Srisaket

b. Yala > Srisaket

c. Yala = Srisaket

d. Based on positive ranks

ประชากรเชื้อมาลาเรียจากทั้งสี่จังหวัดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p = 0.008 โดยความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตากและจังหวัดกาญจนบุรี (F_{ST}) มีค่าเท่ากับ 0.1338 ถือว่ามีความแตกต่างในระดับปานกลาง (0.05-0.15) ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตากและจังหวัดศรีสะเกษ (F_{ST}) มีค่าเท่ากับ 0.1915 และความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดศรีสะเกษ (F_{ST}) มีค่าเท่ากับ 0.1557 ซึ่งค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0.15 – 0.25 นั้นถือว่าประชากรทั้งสองมีความแตกต่างกันทางด้านพันธุกรรมสูง สำหรับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลาและจังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ มีค่าเท่ากับ 0.5300 0.4748 0.5152 ตามลำดับ ซึ่งค่ามากกว่า 0.25 ถือว่าประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดจังหวัดเหล่านี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลาในระดับสูงมาก (ตารางที่ 11) และประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลามีความแตกต่างจากประชากรเชื้อจังหวัดตาก ศรีสะเกษและ

กาญจนบุรีเป็นลำดับลดหลั่นกันลงมา ทั้งนี้มีแนวโน้มว่าความแตกต่างลดลงตามระยะห่างระหว่างพื้นที่ที่ลดลง

ตารางที่ 11 ความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) ระหว่างประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตาก กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และยะลา

F_{ST}	ตาก (24 ตัวอย่าง)	กาญจนบุรี (20 ตัวอย่าง)	ศรีสะเกษ (13 ตัวอย่าง)	ยะลา (41 ตัวอย่าง)
ตาก	-	0.1338*	0.1915*	0.5300*
กาญจนบุรี		-	0.1557*	0.4748*
ศรีสะเกษ			-	0.5152*
ยะลา				-

มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.008$

จากการวิเคราะห์ไม่พบ linkage disequilibrium ระหว่างตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์ใดๆ ในประชากรเชื้อจากจังหวัดตากและศรีสะเกษ แต่พบ linkage disequilibrium ระหว่างตัวติดตามไมโครแซทเทลไลท์ 5 คู่ คือ ตำแหน่ง TA60 และ PfPK2 ตำแหน่ง TA60 และ ARA2 ตำแหน่ง TAA81 และ Poly-α ตำแหน่ง TAA81 และ TA87 ตำแหน่ง Poly-α และ TA80 ในประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรี ส่วนประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลาพบ linkage disequilibrium ในเกือบทุกตำแหน่งที่ทำการทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิด inbreeding ในประชากรเชื้อนี้

พบรูปแบบของจีโนไทป์ของเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตาก 19 รูปแบบ จากเชื้อมาลาเรียทั้งหมด 24 ตัวอย่าง มี 4 จีโนไทป์ที่มีเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน โดยมีหนึ่งจีโนไทป์มีเชื้อมาลาเรีย 3 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกัน ส่วนอีก 3 จีโนไทป์มีเชื้อมาลาเรีย 2 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกันในแต่ละจีโนไทป์ ส่วนรูปแบบของจีโนไทป์ของเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรีมีทั้งหมด 9 รูปแบบ จากเชื้อมาลาเรียทั้งหมด 20 ตัวอย่าง มีจีโนไทป์ 5 รูปแบบที่มีเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน โดยมีสองจีโนไทป์มีเชื้อมาลาเรีย 2 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกัน มี 2 จีโนไทป์มีเชื้อมาลาเรีย 3 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกัน และอีกหนึ่งจีโนไทป์มีเชื้อ 6 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกัน สำหรับเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดศรีสะเกษ มีรูปแบบของจีโนไทป์ 9 รูปแบบ จากเชื้อมาลาเรียทั้งหมด 13 ตัวอย่าง มีจีโนไทป์ 3 รูปแบบที่มีเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1

ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน มี 2 จีโนไทป์มีตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย 2 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกันในแต่ละจีโนไทป์ และอีกจีโนไทป์หนึ่งมีตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย 3 ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน สำหรับเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลา มีรูปแบบจีโนไทป์ 12 รูปแบบ จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียทั้งหมด 41 ตัวอย่าง มีจีโนไทป์ 8 รูปแบบที่มีเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน โดยมี 3 จีโนไทป์มีเชื้อมาลาเรีย 2 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกันในแต่ละจีโนไทป์ มี 2 จีโนไทป์มีเชื้อมาลาเรีย 3 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกัน มี 2 จีโนไทป์มีเชื้อมาลาเรีย 5 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกันในแต่ละจีโนไทป์ และอีกหนึ่งจีโนไทป์มีเชื้อ 15 ตัวอย่างที่มีรูปแบบเดียวกัน ไม่พบเชื้อมาลาเรียจากต่างพื้นที่จีโนไทป์เหมือนกัน

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องปฏิบัติการได้สำเร็จคิดเป็นร้อยละ 72 จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดกาญจนบุรีเพียงจังหวัดเดียว สาเหตุในการเพาะเลี้ยงเชื้อจากจังหวัดอื่นๆ ไม่สำเร็จส่วนใหญ่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อด้วยเชื้อรา เนื่องจากพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ที่มีความชื้นในบรรยากาศสูง มีลมพัดผ่านในบริเวณที่เก็บตัวอย่างเลือดและอาจเกิดจากการทำความสะอาดปลายนิ้วผู้ป่วยที่ไม่ดีเพียงพอซึ่งในกรณีหลังนี้จะเห็นการปนเปื้อนด้วยเชื้อราได้ทันทีหลังการเพาะเลี้ยงในวันที่ 2 หรือ 3 ซึ่งการให้เจ้าหน้าที่มาลาเรียคลินิกเป็นผู้เก็บตัวอย่างให้และทำการจัดส่งมายังห้องปฏิบัติการเป็นข้อจำกัดของคณะผู้วิจัยที่ไม่สามารถอยู่ในพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียได้เป็นเวลานาน เนื่องจากปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียลดลงโดยตลอด โดยเฉพาะจำนวนเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม เทคนิคในการเก็บเลือดจากผู้ป่วยจึงต้องมีการพัฒนาให้ง่ายขึ้นและสะดวกต่อการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ภาคสนามและการจัดส่งซึ่งจะต้องพัฒนาต่อไป สำหรับเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมจากจังหวัดยะลาที่เพาะเลี้ยงไม่ขึ้นเลยจากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ปัญหาของการเพาะเลี้ยงมิได้เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา แต่กรณีที่พบคือ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีจำนวนเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดค่อนข้างน้อย และเชื้อค่อนข้างปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเพาะเลี้ยงได้ยากกว่าเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดอื่นๆ โดยใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนนานกว่าหรือเข้าสู่ระยะอาศัยเพศได้ง่ายกว่าเชื้อมาลาเรียจากพื้นที่อื่นๆ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อในจังหวัดยะลามีความแตกต่างจากประชากรเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดอื่นๆ เป็นอย่างมากตั้งแต่ได้มีการศึกษามาในปี 2549 เป็นต้นมาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในจังหวัดนี้ก็ยังคงมีความแตกต่างจากเชื้อในพื้นที่อื่น ซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมอื่นๆ ของเชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลานี้มีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป

สำหรับความไวต่อยาของเชื้อมาลาเรียต่อยาไพริเมทามีน คลอโรควิน ควินิน เมโฟลควินและอาร์ทิมิซินิน เนื่องจากจำนวนตัวอย่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงขึ้นและใช้ในการทดสอบความไวต่อยามีจำนวนไม่มากนัก และมีเพียงเชื้อตัวอย่างจากจังหวัดเดียวที่เพาะเลี้ยงขึ้นจึงไม่ทำการเปรียบเทียบความไวต่อยา

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี และศรีสะเกษนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันโดยประชากรเชื้อมาลาเรียของจังหวัดตากมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.58 ± 0.19 ประชากรเชื้อมาลาเรียของจังหวัดกาญจนบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.56 ± 0.19 และประชากรเชื้อมาลาเรียของจังหวัดศรีสะเกษ มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.57 ± 0.17 สรุปได้ว่าประชากรเชื้อมาลาเรียในสามพื้นที่มีความหลากหลายพันธุกรรมในระดับปานกลาง สำหรับเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลา มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_S) เท่ากับ 0.22 ± 0.24 ซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ เมื่อทดสอบความแตกต่างของโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียจากทั้งสี่จังหวัดพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรของเชื้อมาลาเรียจากทั้งสี่จังหวัด โดยจังหวัดยะลามีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตาก กาญจนบุรี และศรีสะเกษและความแตกต่างนั้นเป็นความแตกต่างในระดับสูงมาก คือ 0.530 0.475 และ 0.515 ตามลำดับ ซึ่งอาจมีผลมาจากความห่างไกลของพื้นที่ (isolation by distance) ไม่พบตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่มีจีโนไทป์เดียวกันในสี่จังหวัด ซึ่งไม่แสดงให้เห็นถึงการถ่ายเทยีนระหว่างพื้นที่ แต่ทั้งนี้ในสภาพความเป็นจริงไม่สามารถสรุปได้ว่าไม่มีการเคลื่อนย้ายของประชากรเชื้อระหว่างพื้นที่เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บได้ยังมีปริมาณน้อย นอกจากนั้นยังพบลักษณะการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน (inbreeding) ในประชากรเชื้อจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดยะลาซึ่งหากเชื้อมีลักษณะเฉพาะ เช่น มียีนที่ดื้อต่อยา ก็อาจทำนายได้ว่าเชื้อจะสามารถแพร่กระจายลักษณะยีนดังกล่าวไปในกลุ่มประชากรเชื้อในพื้นที่นั้นได้

เอกสารอ้างอิง

1. กลุ่มโรคมาลาเรีย สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์ไข้มาลาเรียปีงบประมาณ 2551. http://www.thaivbd.org
2. Anderson, T.J.C., Haubold, B., William, J.T., Estrada-Franco, J.G., Richardson, L., Mollinedo, R. et al. (2000) Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol. Biol. Evol. 17(10): 1467-1482.
3. Anderson, T.J.C., Su, X-Z., Bockerie, M., Lagog, M., and Day, K.P. (1999) Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger prick blood samples. Parasitol. 119: 113-126.
4. Ariey, F., Duchemin, J-B., Robert V. (2003)Metapopulation concepts applied to falciparum malaria and their impacts on the emergence and spread of chloroquine resistance. Infect. Genet.Evol. 2:185-192.
5. Babiker, H.A., Lines, J., Hill, W.G., and Walliker, D. (1997) Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with différent malaria endemicity in East Africa. Am J. Trop. Med. Hyg. 56(2): 141-147.
6. Babiker, H.A., Ranford-Cartwright, L.C., Currie, D., Charlwood, J.D., Billingsley, P., Teuscher, T. and Walliker, D. (1994) Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Parasitol. 109: 413-421.
7. Babiker, H.A. and Walliker, D. (1997) Current views on the population structure of *Plasmodium falciparum*: implications for control. Parasitol Today. 13(7): 262-267.
8. Collins, W.E., Nguyen-Dinh, P., Sullivan, J.S., Morris, C.L., Galland, G.G., Richardson, B.B., Nesby, S. (1998) Adaptation of a strain of *Plasmodium vivax* from Mauritania to New World monkeys and anopheline mosquitoes. J.Parasitol.84:619-621
9. Conway, D.J., Machado, R.L.D., Singh, B., Dessert, P., Mikes, Z.S., Povoa, M.M. et al. (2001) Extreme geographical fixation of variation in the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein gene *Pfs48/45* compared with microsatellite loci. Mol. Biochem. Parasitol. 115: 145-156.
10. Cowman, A.F. (2001) Functional analysis of drug resistance in *Plasmodium falciparum* in the post-genomic era. Int. J. Parasitol. 31: 871-878.
11. Dye, C., Williams, B.G. (1997)Multigenic drug resistance among inbred malaria parasites.Proc. R. Soc.Lond. B264:61-67.

12. Escalante, A.A., Cornejo, O.E., Rojas, A., Udhayakumar, V., Lal, A.A.(2004)Assessing the effect of natural selection in malaria parasites.Trends.Parasitol.20:388-395.

13. Hartl, D.L. (2004) The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity. Nature. Rev. 2: 15-22.

14. Healer, J., Murphy, V., Hodder, A.N., Masciantonio, R., Gemmill, A.W., Anders, R.F., Cowman, A.F., Batchelor, A. (2004)Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. Mol.Microbiol.52:159-168.

15. Lum, J.K., Kaneko, A., Tanabe, K., Takahashi, N., BjÖrkman, A., and Kobayakawa, T. (2004) Malaria dispersal among islands: human mediated *Plasmodium falciparum* gene flow in Vanuatu, Melanesia. Acta. Tropica. 90: 181-185.

16. Mueller, I., Kaiok, J., Reeder, J.C., and Cortés, A. (2002) The population structure of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* during an epidemic of malaria in the eastern highlands of Papua New Guinea. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67(5): 459-464.

17. Na-Bangchang, Kand Congpuong, K. (2007) Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. Tohoku J. Exp. Med. 211: 99-113.

18. Nair, S., William, J.T., Brockman, A., Paiphun, L., Mayxay, M., Newton, P.N. et al. (2003) A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in Southeast Asian malaria parasites. Mol. Biol. Evol. 20(9): 1526-1536.

19. Nash, D., Nair, S., Mayxay, M., Newton, P.N., Guthmann, J-P., Nosten, F. et al. (2005) Selective strength and hitchhiking around two anti-malarial resistance genes. Proc. R. Soc. B. 272: 1153-1161.

20. Paul, R.E.L., Hackford, I., Brockman, A., Muller-Graf, C., Price, R., Luxemburger, C., White, N.J., Nosten, F., and Day, K.P. (1998) Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the Northwestern border of Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58(2): 195-203.

21. Paul, R.E.L., Packer, M.J., Walmsley, M., Lagog, M., Ranford-Cartwright, L.C., Paru, R. and Day, K.P. (1995) Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. Science 269: 1709-1711.

22. Pumpaibool, T., Arnathau, C., Durand, P., Kanchanakhan, N., Siripoon, N.,Suegorn, A. et al. (2009) Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand, a low transmission country. Malar. J. 8: 155.

23. Roper, C., Pearce, R., Bredenkamp, B., Gumede, J., Drakeley, C., Mosah, C. et al. (2003) Antifolate antimalarial resistance in southeast Agrica: a population-based analysis. Lancet. 361: 1174-1181.

24. Socheat, K., Denis, M.B., Fandeur, T., Zhang, Z., Yang, H., Xu, J. et al. (2003) Mekong malaria. II. Update of malaria, multi-drug resistance and economic development in the Mekong region of Southeast Asia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 34(4): 1-102.

25. Su, X-Z. andWellems, T.E. (1996) Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. Genomics. 33: 430-444.

26. White, N. (1999) Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 354: 739-749.

27. Wootton, J.C., Feng, X., Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Baruch, D.I. et al. (2002) Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. Nature. 418: 320-323.