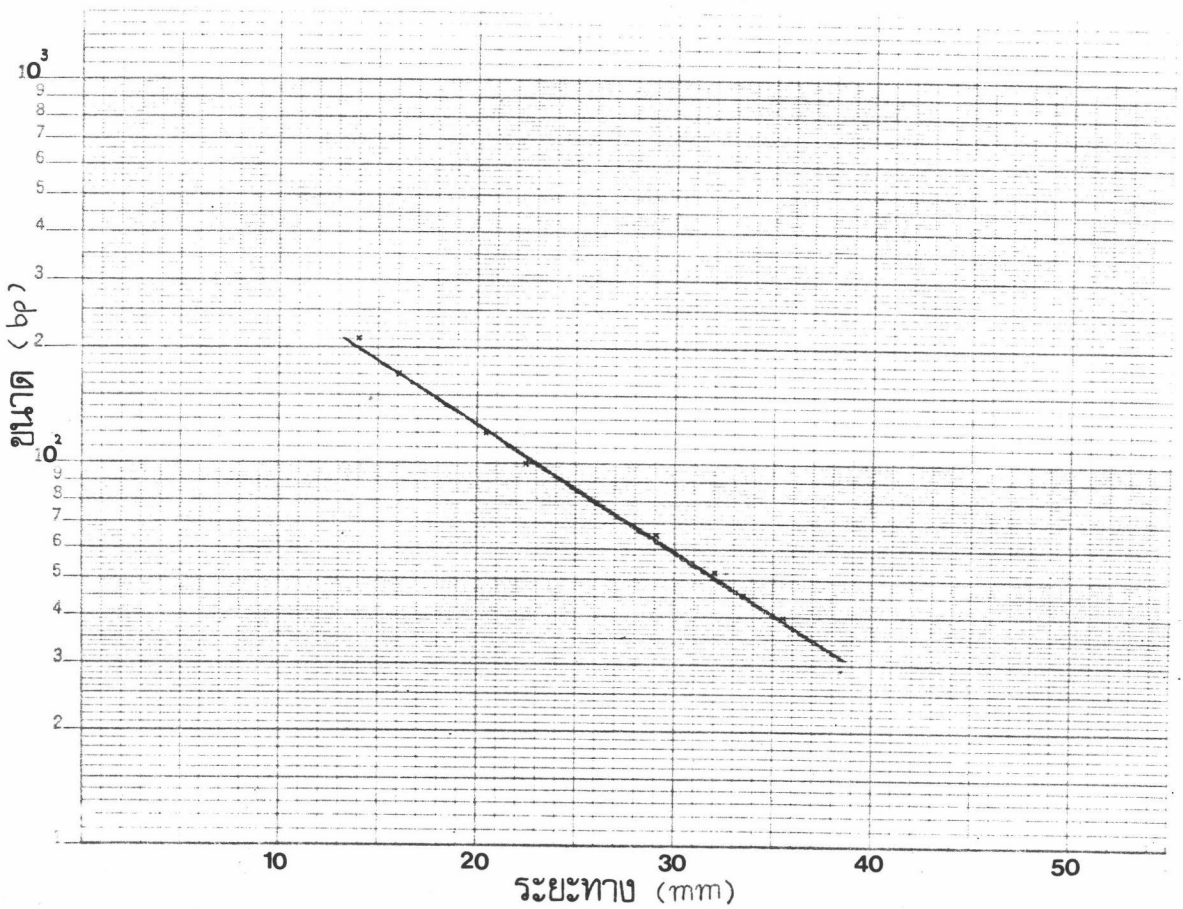
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาความหลากหลายของยีน MSP-1 และ MSP-2 ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมที่เก็บรวบรวมจากผู้ป่วยใน 4 พื้นที่จำนวน 97 ไอโซเลตและ 3 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย 17 ไอโซเลตและ 3 สายพันธุ์ จากอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 20 ไอโซเลต จากอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 40 ไอโซเลต จากอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด และจำนวน 20 ไอโซเลต จากอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมตามวิธีของ Foley และคณะ (Foley et al., 1992) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR เมื่อนำผลิตผลที่ได้ไปผ่านกระบวนการอิเลคโทรโฟรีซีสใน 1.5 % อะกาโรสเจลและย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์พบว่า ผลิตผล PCR ที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน สามารถหาขนาดผลิตผล PCR ได้โดยการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอนั้นๆกับดีเอ็นเอมาตราฐานที่ทราบขนาดโดยใช้ DNA molecular weight marker VI (pBR328/*Bgl* I + pBR328/*Hinf* I) (Boehringer)เป็นดีเอ็นเอมาตราฐานในการเปรียบเทียบ กราฟมาตราฐานซึ่งเขียนขึ้นจากค่าระยะทางของการเคลื่อนที่และค่า log ของขนาดโมเลกุลมีลักษณะเป็นเส้นตรง (รูปที่ 11) เมื่อนำผลิตผล PCR ที่ผ่านกระบวนการเซาน์เทิร์นบลอตมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 จำนวน 3 อัลลีล คือ K1 MAD20 และ RO33 MSP-2 จำนวน 2 อัลลีล คือ IC1 และ FC27 ผลที่ได้จากการศึกษาในแต่ละพื้นที่นั้น สรุปได้ดังตารางที่ 4-9 และรูปที่ 12-26



รูปที่ 11 แสดงกราฟมาตราฐานซึ่งเขียนขึ้นจากค่าระยะทางของการเคลื่อนที่กับค่า log ของขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตราฐาน (DNA molecular weight marker VI)

ตารางที่ 4 ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 17 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์

ไอโซเลต	จำนวนแถบที่ปรากฏบนเจล		อัลลีล				
			MSP-1 / bp			MSP-2 / bp	
	MSP-1	MSP-2	K1	MAD20	RO33	IC1	FC27
1.T101	1	2	-	470	-	680/620**	-
2.T108	2	2	-	500	450	680	500
3.T111	2	2	540	450	450	-	-
4.T113	2	1	500	430	-	540	-
5.T114	1	2	-	450	450	520	500
6.T115	1	1	470	-	-	-	470
7.T116	1	1	500	500	-	-	-
8.T120	1	1	500	500	-	520	-
9.T123	1	1	450	-	450	470	470
10.T128	1	1	-	450	-	-	-
11.T130	1	1	460	-	-	640	-
12.T131	1	1	460	-	-	640	-
13.T132	1	1	-	480	-	-	-
14.T133	1	1	-	480	-	-	-
15.T134	1	1	-	480	-	-	480
16.T135	1	1	-	-	450	-	480
17.T136	1	1	-	-	450	-	480
18.T9/94*	1	1	-	450	-	540	-
19.T9/94(M1-1)b3*	1	1	-	450	-	540	-
20.T9/94(M1-1)b6*	1	1	-	450	-	540	-

* = สายพันธุ์ **=ไฮบริไดซ์กับอัลลีลเดียวกันแต่มีขนาดต่างกัน - =ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์

รูปที่ 12 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

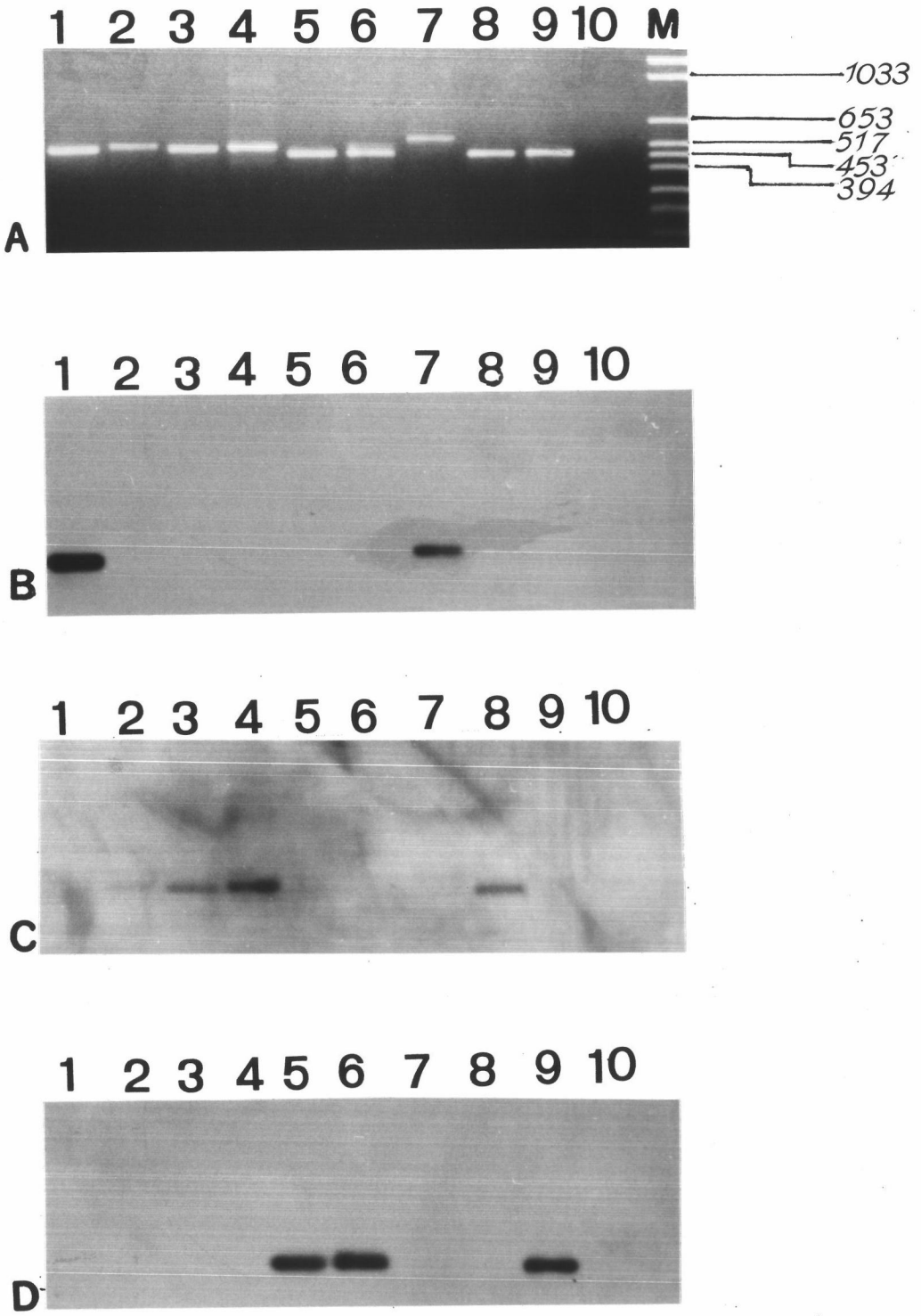
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1

C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20

D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33

1=T131	2=T132	3=T133	4=T134	5=T135
6=T136	7=3D7	8=HB3	9=RO33	10=negative control

M=molecular weight marker


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M
1033
653
517
453
394
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
C
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
D

รูปที่ 13 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

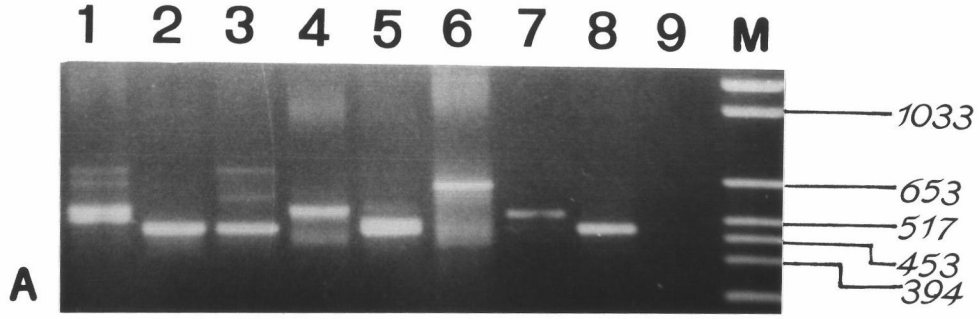
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

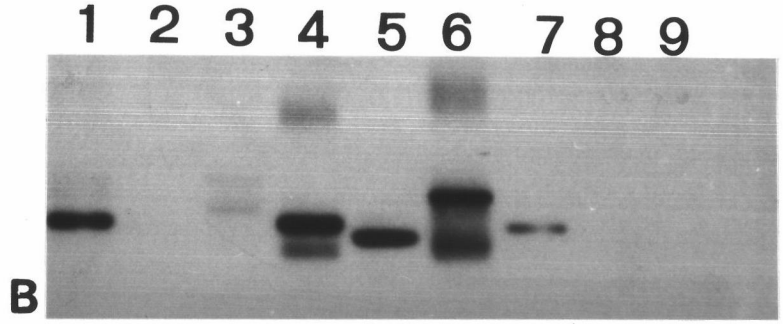
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1

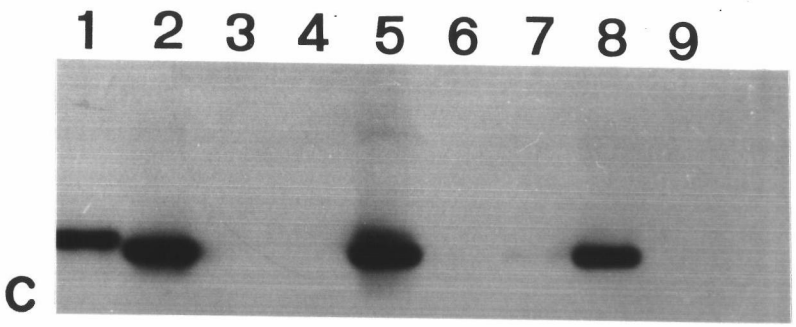
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27

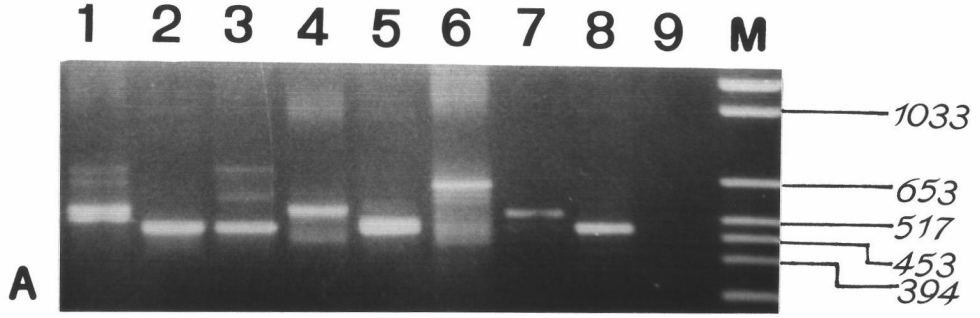
1=T114	2=T115	3=T116	4=T120	5=T123
6=T130	7=3D7	8=HB3	9=negative control	

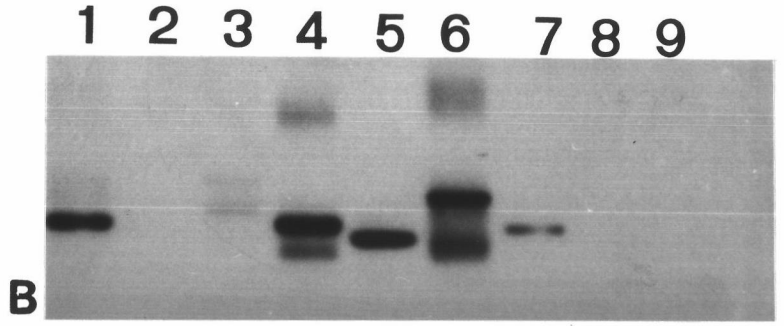
M=molecular weight marker

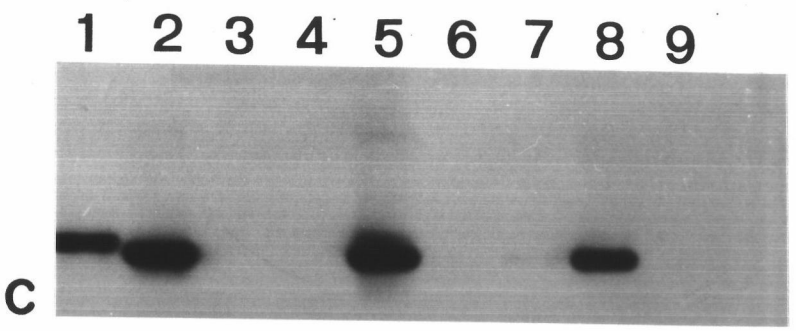

1 2 3 4 5 6 7 8 9 M
1033
653
517
453
394
A


1 2 3 4 5 6 7 8 9
B

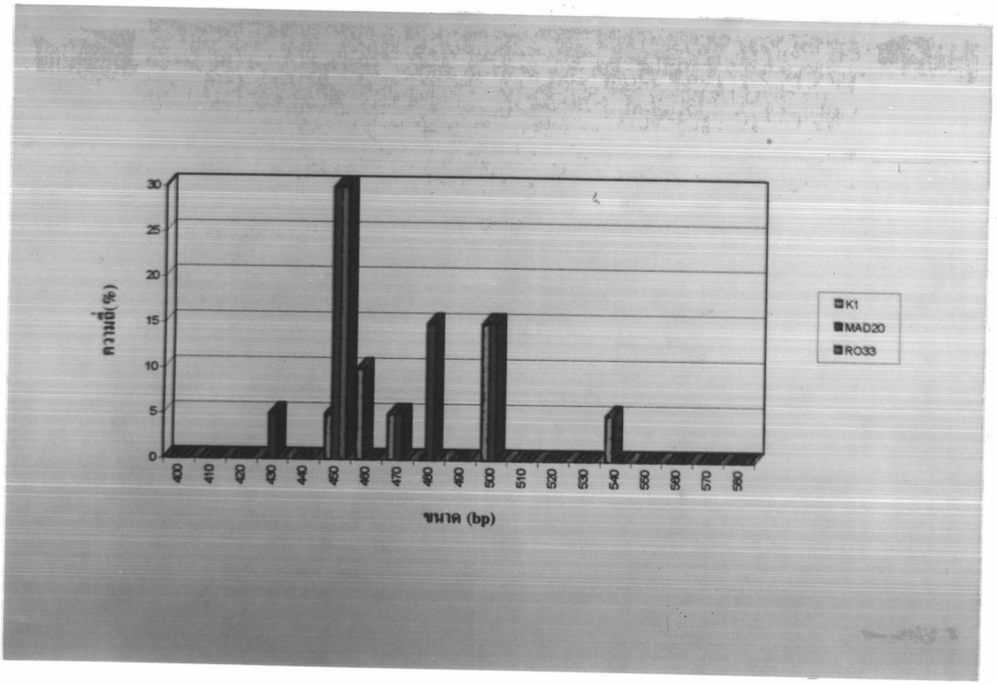

1 2 3 4 5 6 7 8 9
C


1 2 3 4 5 6 7 8 9 M
1033
653
517
453
394
A

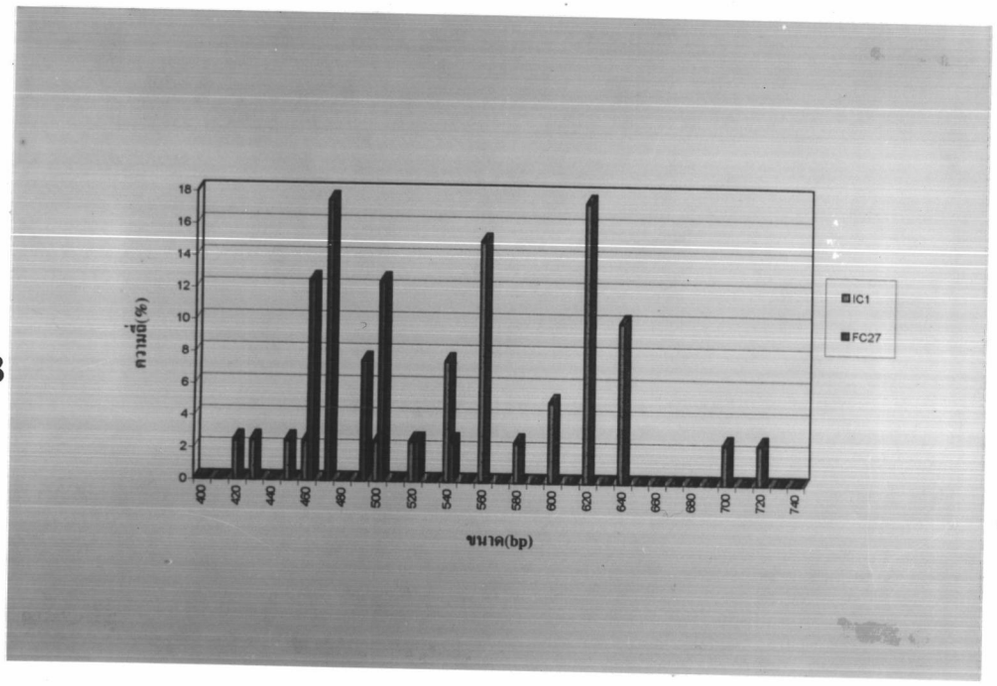

1 2 3 4 5 6 7 8 9
B


1 2 3 4 5 6 7 8 9
C

A



B



รูปที่ 14 กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

A: MSP-1

B: MSP-2

ตารางที่ 4 และรูปที่ 12-14 แสดงผลการศึกษาของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ที่เก็บจากอำเภอแม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 17 ไอโซเลตและ 3 สายพันธุ์ เมื่อทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 พบว่า 8 ไอโซเลต (40%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 จำนวน 14 ไอโซเลต (70%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และจำนวน 6 ไอโซเลต (30%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 ในจำนวนนี้พบว่า 7 ไอโซเลต (35%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามมากกว่า 1 ชนิด แสดงให้เห็นว่าประชากรในแต่ละไอโซเลตเป็นประชากรผสม (mixed infection) สามารถจำแนกรูปแบบการติดเชื้อแบบผสมออกได้เป็น 4 แบบดังนี้ ชนิด K1/MAD20 จำนวน 3 ไอโซเลต (15%) (T113, T116 และ T120) ชนิด K1/RO33 จำนวน 1 ไอโซเลต (5%) (T123) ชนิด MAD20/RO33 จำนวน 2 ไอโซเลต (10%) (T108 และ T114) และชนิด K1/MAD20/RO33 จำนวน 1 ไอโซเลต (5%) (T111) เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่า จำนวน 8 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 450-540 คู่เบส โดยพบขนาด 450 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (T123) ขนาด 460 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (T130 และ T131) ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (T115) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (T113, T116 และ T120) และขนาด 540 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (T111) สำหรับ 14 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 นั้น พบว่าผลิตผล PCR มีขนาดระหว่าง 430-500 คู่เบส โดยพบขนาด 430 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (T113) ขนาด 450 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลตและ 3 สายพันธุ์ (T111, T114, T128, สายพันธุ์ T9/94, สายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 และสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b6) ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (T101) ขนาด 480 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (T132, T133, T134) และขนาด 500 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (T108, T116 และ T120) และจำนวน 6 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 นั้น พบว่ามีขนาดผลิตผล PCR ขนาด 450 คู่เบส (T108, T111, T114, T123, T135 และ T136) เมื่อพิจารณาจากจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลพบว่า 3 ไอโซเลต (T108, T111 และ T113) มีจำนวนแถบของ MSP-1 บนเจล 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยไอโซเลต T108 พบว่าแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 ในไอโซเลต T111 พบว่าแถบที่มีขนาด 540 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และRO33 และในไอโซเลต T113 พบว่าแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 430 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20

สำหรับผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่ดังกล่าวพบว่า จำนวน 11 ไอโซเลต (55%) สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 จำนวน 7 ไอโซเลต (35%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 และจำนวน 5 ไอโซเลต (25%) ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด (T111, T116, T128, T132 และ T133) และพบว่า 3 ไอโซเลตสามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งชนิด IC1 และ FC27 (T108, T114 และ T123) เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่า จำนวน 11 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 470-680 คู่เบส โดยพบขนาด 470 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (T123) ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (T114 และ T120) ขนาด 540 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลตและ 3 สายพันธุ์ (T113, สายพันธุ์ T9/94, สายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 และสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b6) ขนาด 620 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (T101) ขนาด 640 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (T130 และ T131) และขนาด 680 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (T101 และ T108) และจำนวน 7 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 นั้นมีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 470-500 คู่เบส โดยพบขนาด 470 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (T115 และ T123) ขนาด 480 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (T134, T135 และ T136) และขนาด 500 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (T108 และ T114) เมื่อพิจารณาจากจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลพบว่า 4 ไอโซเลต (T101, T108, T111 และ T114) มีจำนวนแถบบนเจล 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน ในไอโซเลต T101 พบว่าแถบที่มีขนาด 680 และ 620 คู่เบสทั้งสองแถบนี้ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ในไอโซเลต T108 แถบที่มีขนาด 680 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ไอโซเลต T114 แถบที่มีขนาด 520 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต T114 แถบที่มีขนาด 520 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 แต่ในไอโซเลต T111 ถึงแม้ว่าจะมีแถบปรากฏบนเจล 2 แถบก็ตาม แต่ไม่ให้ผลการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด

ตารางที่ 5 ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 20 ไอโซเลต

ไอโซเลต	จำนวนแถบที่ปรากฏบนเจล		อัลลีล				
			MSP-1 / bp			MSP-2 / bp	
	MSP-1	MSP-2	K1	MAD20	RO33	IC1	FC27
1.TP4	1	1	-	450	450	580	-
2.TP7	1	1	-	450	450	580	-
3.TP13	1	2	450	450	-	580	500
4.TP17	1	2	-	450	-	560/410**	-
5.TP18	1	1	-	500	-	680	-
6.TP20	1	1	450	450	450	440	660
7.TP21	2	1	540	500	-	560	-
8.TP25	1	1	-	450	-	580	-
9.TP26	2	1	540	460	-	660	-
10.TP34	2	2	-	500	450	560	500
11.TP40	1	2	-	500	-	600/500**	-
12.TP43	1	2	-	500	-	600/450**	-
13.TP44	1	1	-	-	450	680	-
14.TP46	1	3	450	-	450	600/560/430**	430
15.TP50	1	2	-	520	-	600	-
16.TP55	1	3	-	500	-	680/450/430**	-
17.TP87	1	1	-	500	-	-	410
18.TP90	1	1	-	-	450	430	430
19.TP122	1	1	-	450	450	520	-
20.TP143	1	2	-	450	450	600/450**	-

**=ไฮบริไดซ์กับอัลลีลเดียวกันแต่มีขนาดต่างกัน -=ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์

รูปที่ 15 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี

A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1

C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20

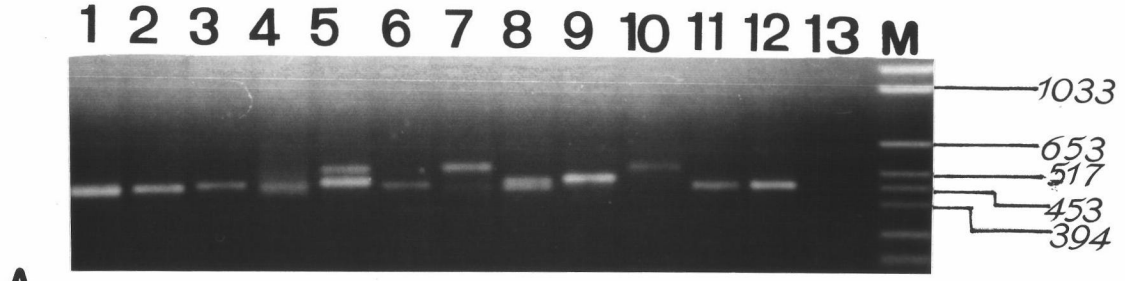
D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33

1=TP13 2=TP17 3=TP18 4=TP20 5=TP21

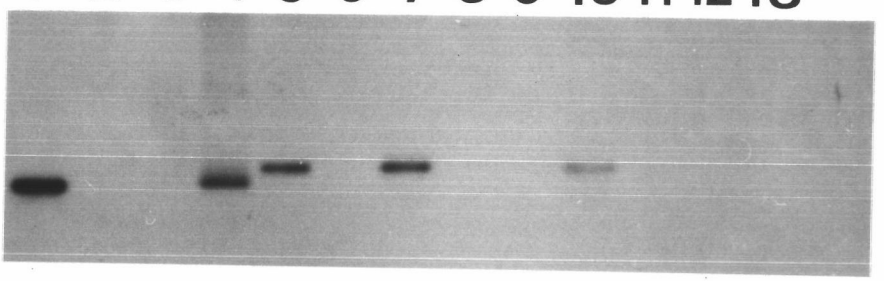
6=TP25 7=TP26 8=TP34 9=TP40 10=3D7

11=HB3 12=RO33 13=negative control

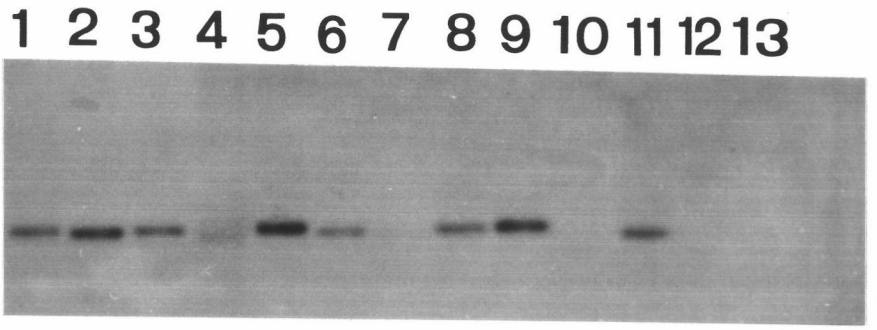
M=molecular weight marker


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M
1033
653
517
453
394

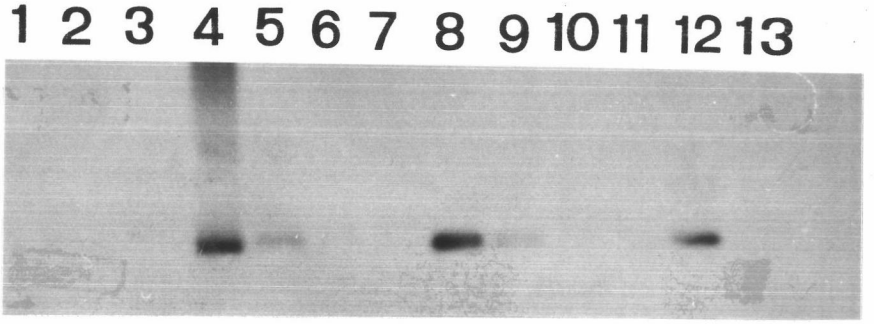
A


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

B


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

C


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

D

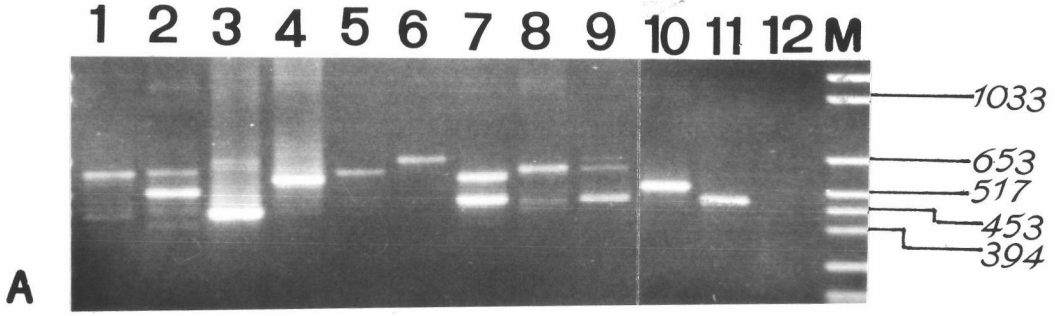
รูปที่ 16 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี

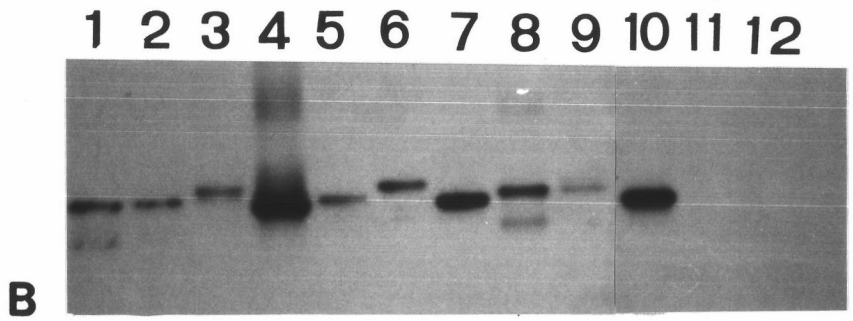
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

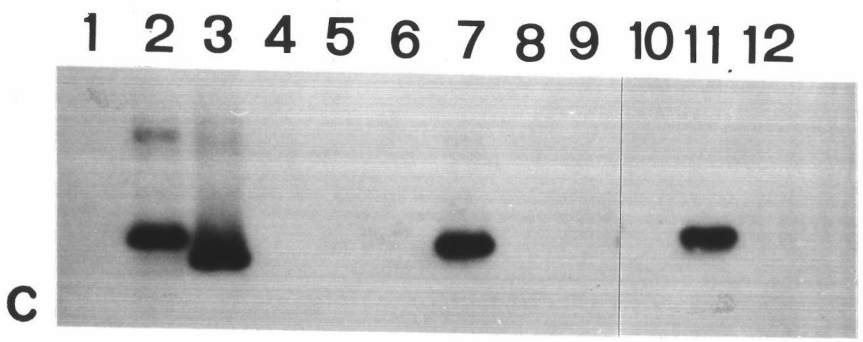
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1

C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27

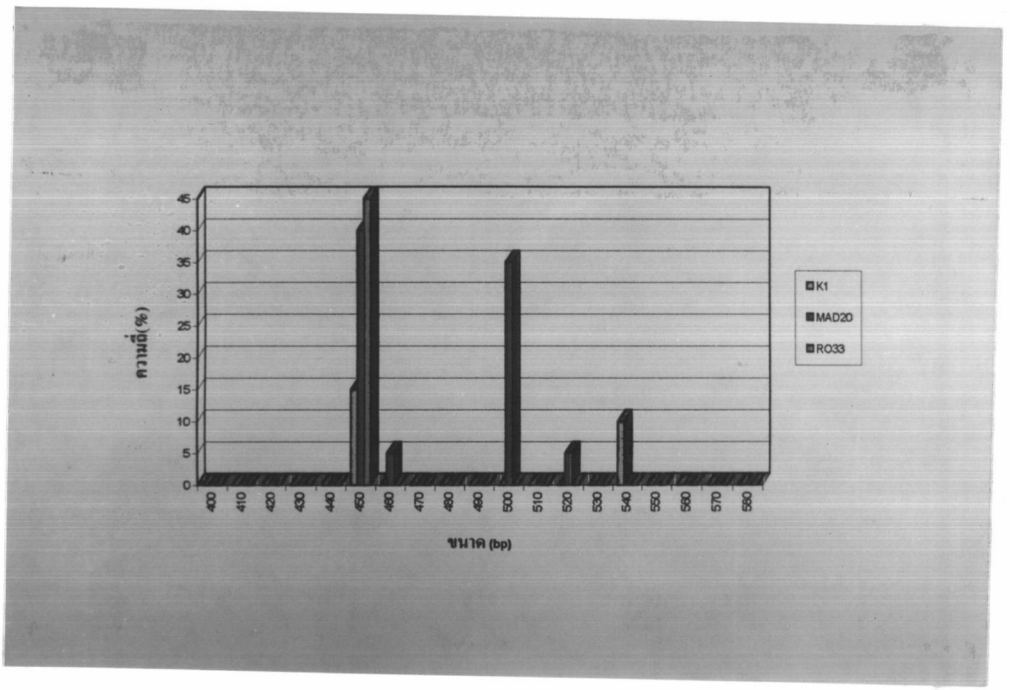
1=TP4	2=TP13	3=TP20	4=TP21	5=TP25
6=TP26	7=TP34	8=TP40	9=TP50	10=3D7
11=HB3	12=negative control		M=molecular weight marker	


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M
1033
653
517
453
394
A

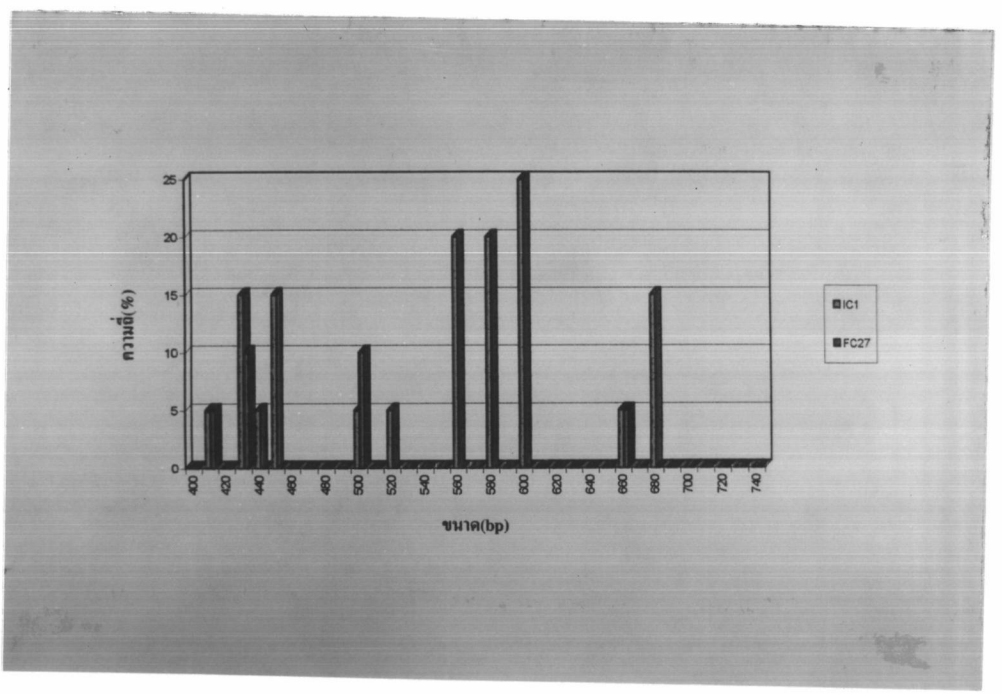

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
B


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
C

A



B



รูปที่ 17 กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี

A: MSP-1

B: MSP-2

ตารางที่ 5 และรูปที่ 15-17 แสดงผลการศึกษาของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ที่เก็บจากอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 พบว่า 5 ไอโซเลต (25%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 จำนวน 17 ไอโซเลต (85%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และจำนวน 9 ไอโซเลต (45%)ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 และพบว่ามี 10 ไอโซเลต (50%) สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามมากกว่า 1 ชนิด สามารถจำแนกรูปแบบการติดเชื้อแบบผสมออกได้เป็น 4 แบบดังนี้ ชนิด K1/MAD20 จำนวน 3 ไอโซเลต (15%) (TP13, TP21 และ TP26) ชนิด K1/RO33 จำนวน 1 ไอโซเลต (5%) (TP46) ชนิด MAD20/RO33 จำนวน 5 ไอโซเลต (25%) (TP4, TP7, TP34, TP122 และ TP143) ชนิด K1/MAD20/RO33 จำนวน 1 ไอโซเลต (5%) (TP20) เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่า จำนวน 5 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับ ดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 450-540 คู่เบส โดยพบขนาด 450 คู่เบส จำนวน 3 ไอโซเลต (TP13, TP20 และ TP46) และขนาด 540 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (TP21 และ TP26) สำหรับ 17 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 450-520 คู่เบส โดยพบขนาด 450 คู่เบสจำนวน 8 ไอโซเลต (TP4, TP7, TP13, TP17, TP20, TP25, TP122 และTP143) ขนาด 460 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลต (TP26) ขนาด 500 คู่เบส จำนวน 7 ไอโซเลต (TP18, TP21, TP34, TP40, TP43, TP55 และ TP87) และขนาด 520 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลต (TP50) และจำนวน 9 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33นั้น มีขนาดผลิตผล PCR 450 คู่เบส (TP4, TP7, TP20, TP34, TP44, TP46, TP90, TP122 และ TP143) เมื่อพิจารณาจากจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลพบว่า 3 ไอโซเลต (TP21, TP26 และ TP34) มีจำนวนแถบบนเจล 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน ในไอโซเลต TP21 แถบที่มีขนาด 540 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบส ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ในไอโซเลต TP26 แถบที่มีขนาด 540 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 460 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และในไอโซเลต TP34 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33

ส่วนผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่ดังกล่าวพบว่า จำนวน 19 ไอโซเลต (95%) สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 และจำนวน 6 ไอโซเลต (30%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 และพบว่า 5 ไอโซเลต (25%) สามารถไฮบริไดซ์กับ

ดีเอ็นเอติดตามทั้งชนิด IC1 และ FC27 (TP13, TP20, TP34, TP46 และTP90) เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่า จำนวน 19 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 410-680 คู่เบส โดยพบขนาด 410 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TP17) ขนาด 430 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (TP43, TP55 และ TP143) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TP40) ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TP122) ขนาด 560 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต (TP17, TP21, TP34 และ TP46) ขนาด 580 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต (TP4, TP7, TP13 และ TP25) ขนาด 600 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต (TP40, TP43, TP46, TP50 และ TP143) ขนาด 660 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TP26) และขนาด 680 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (TP18, TP44 และ TP55) และจำนวน 6 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 นั้นมีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 410-660 คู่เบส โดยพบขนาด 410 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TP87) ขนาด 430 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (TP46 และ TP90) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (TP13 และ TP34) และขนาด 660 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TP20) เมื่อพิจารณาจากจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลพบว่า 7 ไอโซเลต (TP13, TP17, TP34, TP40, TP43, TP50 และ TP143) มีจำนวนแถบบนเจล 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน ในไอโซเลต TP13 แถบที่มีขนาด 580 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TP17 แถบที่มีขนาด 560 และ 410 คู่เบสทั้งสองแถบนี้ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ในไอโซเลต TP34 แถบที่มีขนาด 560 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TP40 แถบที่มีขนาด 600 และ 500 คู่เบสทั้งสองแถบนี้ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ในไอโซเลต TP43 แถบที่มีขนาด 600 และ 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ในไอโซเลต TP50 แถบที่มีขนาด 600 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไม่ให้ผลไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด และในไอโซเลต TP143 แถบที่มีขนาด 600 และ 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นอกจากนี้ยังพบว่า 2 ไอโซเลต (TP46 และ TP55) มีจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลถึง 3 แถบ ในไอโซเลต TP46 แถบที่มีขนาด 600, 560 และ 430 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 และแถบที่มีขนาด 430 ยังสามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ด้วย ในไอโซเลต TP55 พบว่า แถบที่มีขนาด 680, 450 และ 430 สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1

ตารางที่ 6 ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด จำนวน 40 ไอโซเลต

ไอโซเลต	จำนวนแถบที่ปรากฏบนเจล		อัลลีล				
			MSP-1 / bp			MSP-2 / bp	
	MSP-1	MSP-2	K1	MAD20	RO33	IC1	FC27
1.TD2	1	2	-	500	-	620	470
2.TD3	1	2	-	500	-	620/540**	-
3.TD7	3	1	540	520/450**	-	-	500
4.TD8	1	2	-	500	-	720	470
5.TD13	1	1	450	450	-	620	-
6.TD16	1	1	-	420	-	-	470
7.TD21	2	2	500	490	-	620	470
8.TD27	1	1	-	500	-	-	500
9.TD32	1	1	500	500	-	-	470
10.TD33	1	2	500	500	-	520	500
11.TD36	2	2	-	560/500**	-	-	540/500**
12.TD37	2	3	500	560/500**	-	580/540**	470
13.TD43	1	2	560	560	-	600	-
14.TD50	2	2	580	560	-	540	470
15.TD378	2	1	560	450	450	640	-
16.TD379	2	2	560	450	450	560	490
17.TD380	2	1	560	450	450	560	-
18.TD381	2	1	560	450	450	-	490
19.TD384	2	2	560	500	-	-	-
20.TD385	1	1	450	450	450	560	-

**=ไฮบริไดซ์กับอัลลีลเดียวกันแต่มีขนาดต่างกัน -=ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์

ตารางที่ 6 (ต่อ) ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดของผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด จำนวน 40 ไอโซเลต

ไอโซเลต	จำนวนแถบที่ปรากฏบนเจล		อัลลีล				
			MSP-1 / bp			MSP-2 / bp	
	MSP-1	MSP-2	K1	MAD20	RO33	IC1	FC27
21.TD386	2	1	580	500	-	-	490
22.TD387	2	2	580	500	-	600	460
23.TD388	3	2	580	500/450**	450	700/620**	-
24.TD395	1	1	-	450	450	620	-
25.TD397	2	1	500	-	450	-	-
26.TD413	1	1	-	450	450	640	-
27.TD427	2	2	500	450	450	640/430**	-
28.TD431	1	2	-	450	-	640	460
29.TD433	2	1	500	500	450	-	460
30.TD434	2	2	-	500	450	560/460**	460
31.TD436	2	1	-	510	450	-	-
32.TD439	2	1	-	500	450	420	-
33.TD443	2	2	-	460/400**	-	500	460
34.TD445	1	1	-	460	-	560	-
35.TD446	2	1	-	450/430**	450	-	-
36.TD452	1	1	460	-	-	560	-
37.TD459	1	1	-	-	450	-	-
38.TD460	1	2	-	460	-	620/450**	-
39.TD502	1	1	-	470	-	-	500
40.TD503	1	1	-	410	-	-	520

**=ไฮบริไดซ์กับอัลลีลเดียวกันแต่มีขนาดต่างกัน -=ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์

รูปที่ 18 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด

A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1

C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20

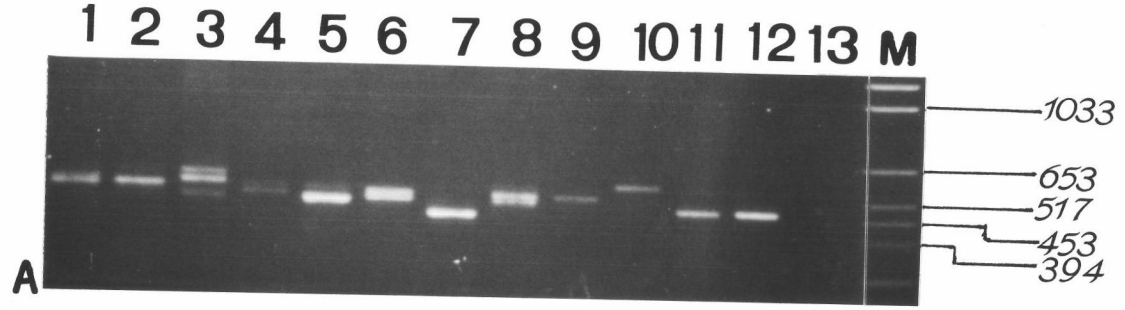
D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33

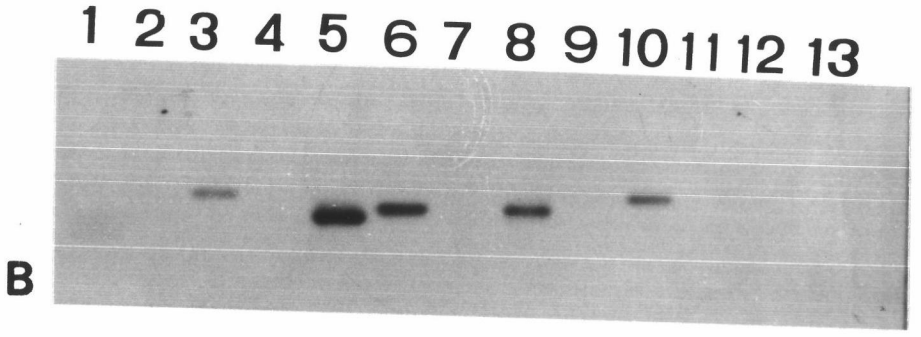
1=TD2 2=TD3 3=TD7 4=TD8 5=TD13

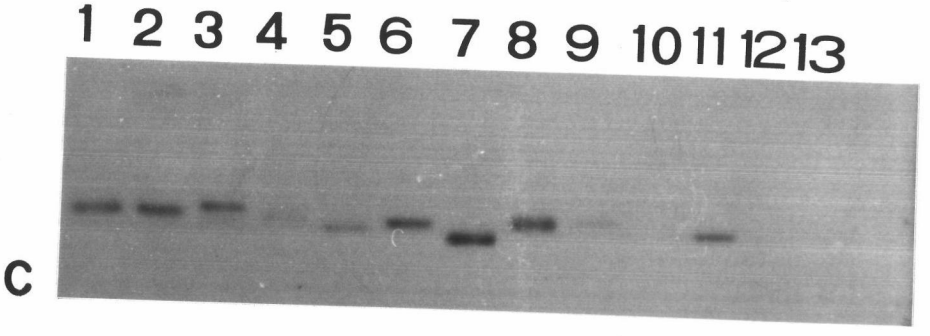
6=TD14 7=TD16 8=TD21 9=TD27 10=3D7

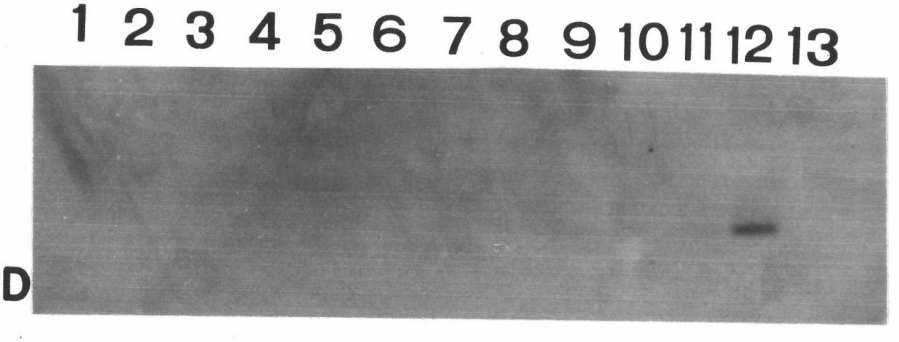
11=HB3 12=RO33 13=negative control

M=molecular weight marker


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M
1033
653
517
453
394
A


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
B


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
C


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
D

รูปที่ 19 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด

A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1

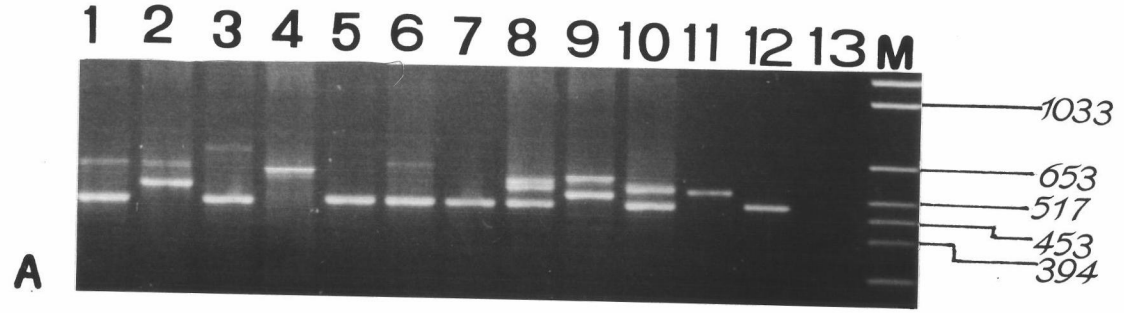
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27

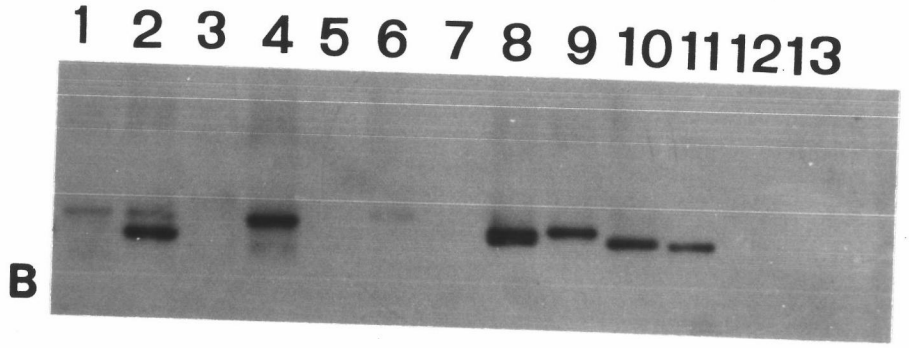
1=TD2 2=TD3 3=TD8 4=TD13 5=TD16

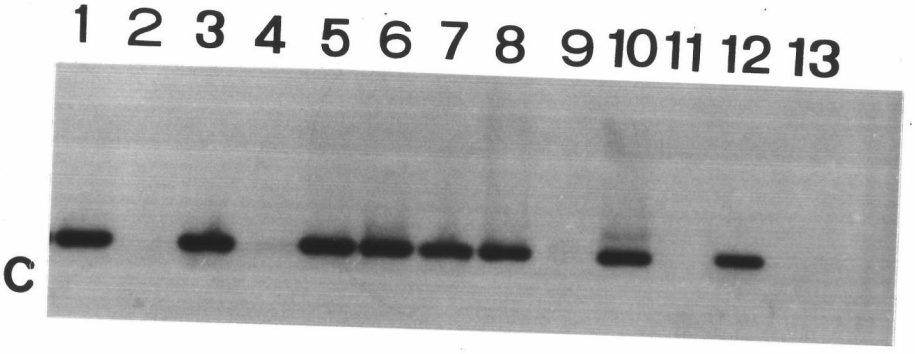
6=TD21 7=TD32 8=TD37 9=TD43 10=TD50

11=3D7 12=HB3 13=negative control

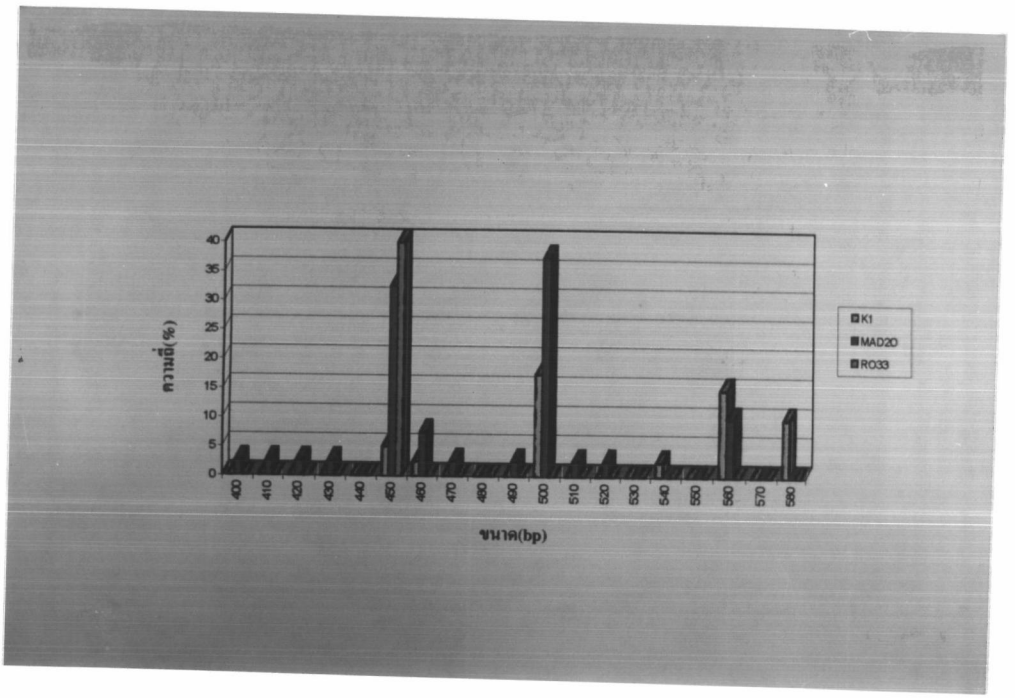
M=molecular weight marker


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M
1033
653
517
453
394
A

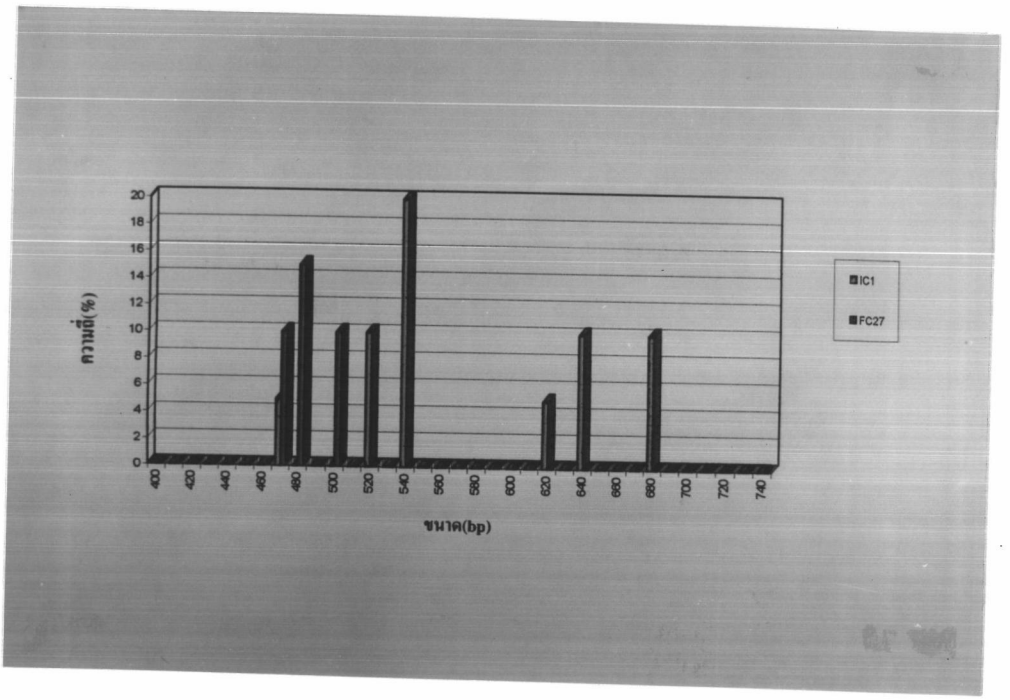

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
B


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
C

A



B



รูปที่ 20 กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด

A: MSP-1

B: MSP-2

ตารางที่ 6 และรูปที่ 18-20 แสดงผลการศึกษาของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ที่เก็บจากอำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด จำนวน 40 ไอโซเลต เมื่อทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 พบว่า 21 ไอโซเลต (52.5%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 จำนวน 37 ไอโซเลต (92.5%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และจำนวน 16 ไอโซเลต (40%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 และพบว่า 26 ไอโซเลต (65%) สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามมากกว่า 1 ชนิด สามารถจำแนกรูปแบบการติดเชื้อแบบผสมออกได้เป็น 4 แบบดังนี้ ชนิด K1/MAD20 จำนวน 11 ไอโซเลต (27.5%) (TD7, TD13, TD21, TD32, TD33, TD37, TD43, TD50, TD384, TD386 และ TD387) ชนิด K1/RO33 จำนวน 1 ไอโซเลต (2.5%) (TD397) ชนิด MAD20/RO33 จำนวน 6 ไอโซเลต (15%) (TD395, TD413, TD434, TD436, TD439 และ TD446) ชนิด K1/MAD20/RO33 จำนวน 8 ไอโซเลต (20%) (TD387, TD397, TD380, TD381, TD385, TD388, TD427 และ TD433) เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่าจำนวน 21 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับ ดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 450-580 คู่เบส โดยพบขนาด 450 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (TD13 และ TD385) ขนาด 460 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลต (TD452) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 7 ไอโซเลต (TD21, TD32, TD33, TD37, TD397, TD427 และ TD433) ขนาด 540 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD7) ขนาด 560 คู่เบส จำนวน 6 ไอโซเลต (TD43, TD378, TD379, TD380, TD381 และ TD384) และขนาด 580 คู่เบส จำนวน 4 ไอโซเลต (TD50, TD386, TD387 และ TD388) สำหรับ 37 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 นั้น พบว่าผลิตผล PCR มีขนาดระหว่าง 400-560 คู่เบส โดยพบขนาด 400 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD16) ขนาด 430 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD446) ขนาด 450 คู่เบสจำนวน 13 ไอโซเลต (TD7, TD13, TD378, TD379, TD380, TD381, TD385, TD388, TD395, TD413, TD427, TD431 และ TD446) ขนาด 460 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (TD443, TD445 และ TD460) ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD502) ขนาด 490 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD21) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 15 ไอโซเลต (TD2, TD3, TD8, TD27, TD32ล TD33, TD36, TD37, TD384, TD386, TD387, TD388, TD433, TD434 และ TD439) ขนาด 510 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD436) ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD7) และขนาด 560 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต (TD36, TD37, TD43 และ TD50) และจำนวน 16 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 นั้นพบว่า มีขนาดผลิตผล PCR 450 คู่เบส (TD378, TD379, TD380, TD381, TD385, TD388, TD395, TD397, TD413, TD427, TD433, TD434, TD436, TD439, TD446

และ TD459) เมื่อพิจารณาจากจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลพบว่า 19 ไอโซเลต (TD21, TD36, TD37, TD50, TD378, TD379, TD380 ,TD381, TD384, TD386, TD387, TD397, TD427, TD433, TD434, TD436, TD439, TD443 และ TD446) มีจำนวนแถบบนเจล 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน ในไอโซเลต TD21 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 490 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ในไอโซเลต TD36 แถบที่มีขนาด 560 และ 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ในไอโซเลต TD37 แถบที่มีขนาด 560 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 และ MAD20 ในไอโซเลต TD50 แถบที่มีขนาด 580 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 560 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ในไอโซเลต TD378, TD379, TD380 และ TD381 แถบที่มีขนาด 560 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และ RO33 ในไอโซเลต TD384 แถบที่มีขนาด 560 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ในไอโซเลต TD386 และ TD387 แถบที่มีขนาด 580 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ในไอโซเลต TD397 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 ในไอโซเลต TD427 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และ RO33 ในไอโซเลต TD433 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 และ MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 ในไอโซเลต TD434 และ TD439 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 ในไอโซเลต TD436 แถบที่มีขนาด 510 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 ในไอโซเลต TD443 แถบที่มีขนาด 460 และ 400 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และในไอโซเลต TD446 แถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และ RO33 ส่วนแถบที่มีขนาด 430 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 นอกจากนี้ยังพบว่า 2 ไอโซเลต (TD7 และ TD388) มีจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลถึง 3 แถบ ในไอโซเลต TD7 นั้นแถบที่มีขนาด 540 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 520 และ 450 คู่เบส

ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และในไอโซเลต TD383 แถบที่มีขนาด 580 คู่เบส ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และ RO33

สำหรับผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่ดังกล่าวพบว่าจำนวน 25 ไอโซเลต (62.5%) สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 จำนวน 21 ไอโซเลต (52.5%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 และจำนวน 5 ไอโซเลต (12.5%)ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด (TD384, TD397, TD436, TD446 และ TD459) และพบว่า 11 ไอโซเลต (27.5%) สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งชนิด IC1 และ FC27 (TD2, TD8, TD21, TD33, TD37, TD50, TD379, TD387, TD431, TD434 และ TD443) เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่า จำนวน 25 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 420-720 คู่เบส โดยพบขนาด 420 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD439) ขนาด 430 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD427) ขนาด 450 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD460) ขนาด 460 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD434) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD443) ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD33) ขนาด 540 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (TD3, TD37 และ TD50) ขนาด 560 คู่เบสจำนวน 6 ไอโซเลต (TD379, TD380, TD385, TD434 TD445 และ TD452) ขนาด 580 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD37) ขนาด 600 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (TD43 และ TD387) ขนาด 620 คู่เบสจำนวน 7 ไอโซเลต (TD2, TD3, TD13, TD21, TD388, TD395 และ TD460) ขนาด 640 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต (TD378, TD413, TD427 และ TD431) ขนาด 700 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD388) และขนาด 720 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD8) และจำนวน 21 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 460-540 คู่เบส โดยพบขนาด 460 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต (TD387, TD431, TD433, TD434 และ TD443) ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 7 ไอโซเลต (TD2, TD8, TD16, TD21, TD32, TD37 และ TD50) ขนาด 490 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (TD379, TD381 และ TD386) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต (TD7, TD27, TD33, TD36 และ TD502) ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD503) และขนาด 540 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (TD36) เมื่อพิจารณาจากจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลพบว่า 17 ไอโซเลต (TD2, TD3, TD8, TD21, TD33, TD36, TD43, TD50, TD379, TD384, TD387, TD388, TD427, TD431, TD434, TD443 และ TD460) มีจำนวนแถบบนเจล 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน ในไอโซเลต TD2

แถบที่มีขนาด 620 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 470 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD3 แถบที่มีขนาด 620 และ 540 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ในไอโซเลต TD8 แถบที่มีขนาด 720 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 470 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD21 แถบที่มีขนาด 620 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 470 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD33 แถบที่มีขนาด 520 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD36 แถบที่มีขนาด 540 และ 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD43 แถบที่มีขนาด 600 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 520 ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด ในไอโซเลต TD50 แถบที่มีขนาด 540 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 470 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD379 แถบที่มีขนาด 560 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 490 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD384 แถบที่มีขนาด 540 และ 490 คู่เบสไม่ให้ผลการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด ในไอโซเลต TD387 แถบที่มีขนาด 600 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 460 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD388 แถบที่มีขนาด 700 และ 620 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ในไอโซเลต TD427 แถบที่มีขนาด 640 และ 430 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ในไอโซเลต TD431 แถบที่มีขนาด 640 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 460 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ในไอโซเลต TD434 แถบที่มีขนาด 560 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 460 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 และ FC27 ในไอโซเลต TD443 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 460 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 และในไอโซเลต TD460 แถบที่มีขนาด 620 และ 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลต TD37 มีแถบปรากฏบนเจลถึง 3 แถบโดยแถบที่มีขนาด 580 และ 540 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 470 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27

ตารางที่ 7 ผลการไฮบริไดเซชันและขนาดผลิตผล PCR ของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 20 ไอโซเลต

ไอโซเลต	จำนวนแถบที่ปรากฏบนเจล		อัลลีล				
			MSP-1 / bp			MSP-2 / bp	
	MSP-1	MSP-2	K1	MAD20	RO33	IC1	FC27
1.S3	2	2	480	450	450	580	500
2.S70	2	1	500	450	-	680	-
3.S76	1	3	480	480	-	600	600/500/400**
4.S77	1	1	450	450	-	-	500
5.S79	1	1	450	450	450	-	500
6.S90	2	1	480	480/450**	450	740	-
7.S92	1	1	-	500	-	580	-
8.S98	2	1	500	450	-	-	560
9.S102	1	1	450	450	450	-	500
10.S103	2	2	-	500/450**	450	600/430**	-
11.S105	1	1	450	450	-	-	500
12.S107	1	2	-	450	450	500	450
13.S109	1	1	-	500	-	-	-
14.S110	2	1	500	450	450	-	470
15.S111	1	2	450	450	450	600/520**	-
16.S114	1	2	450	-	450	640	450
17.S118	1	2	450	450	450	600	-
18.S125	1	1	-	-	450	560	-
19.S127	1	2	470	-	-	560/450**	-
20.S128	1	1	450	-	-	-	450

**=ไฮบริไดซ์กับอัลลีลเดียวกันแต่มีขนาดต่างกัน -=ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์

รูปที่ 21 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 ในพื้นที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด K1

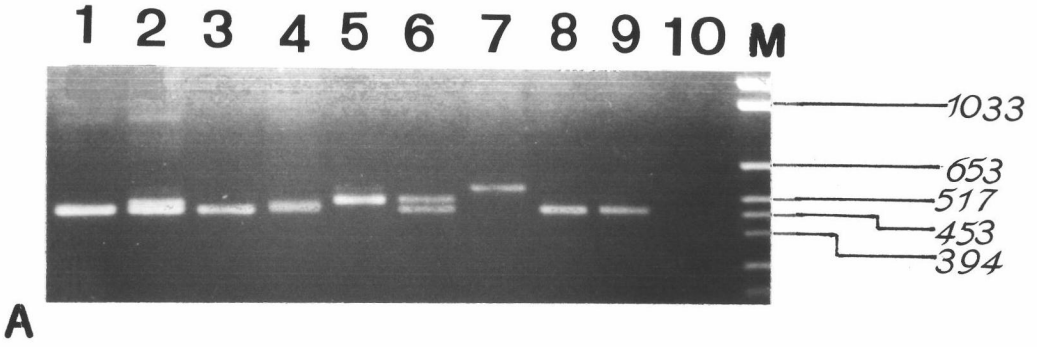
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20

D: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33

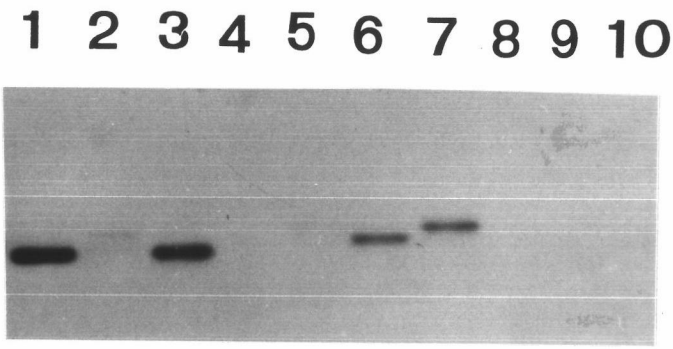
1=S102 2=S103 3=S105 4=S107 5=S109

6=S110 7=3D7 8=HB3 9=RO33 10=negative control

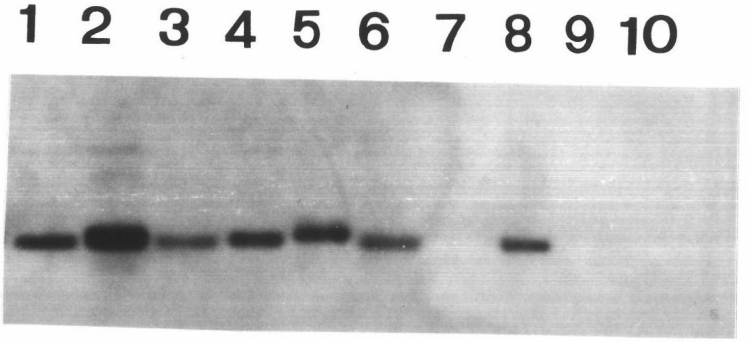
M=molecular weight marker


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M
1033
653
517
453
394

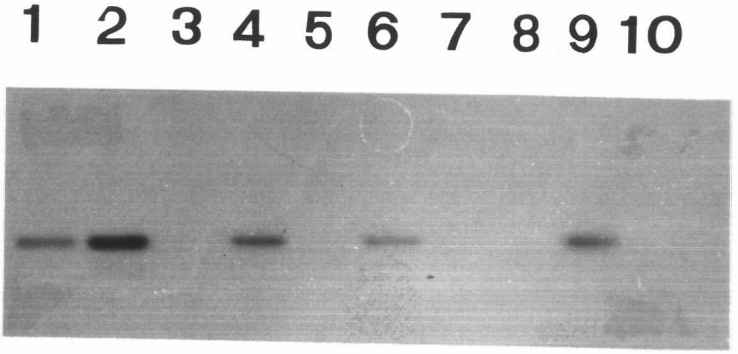
A


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

B


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

C


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

D

รูปที่ 22 แสดงผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

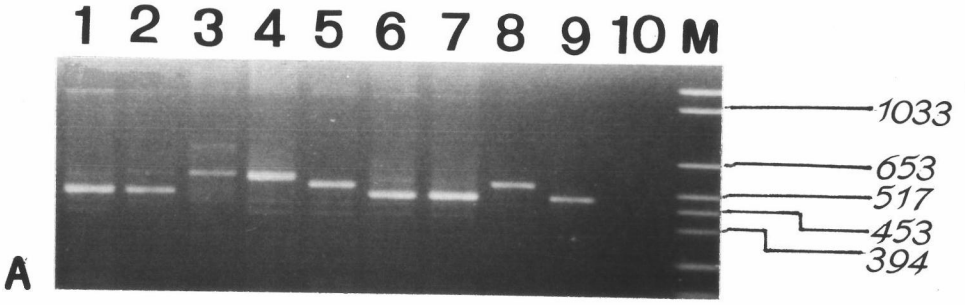
A: ผลิตผล PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล

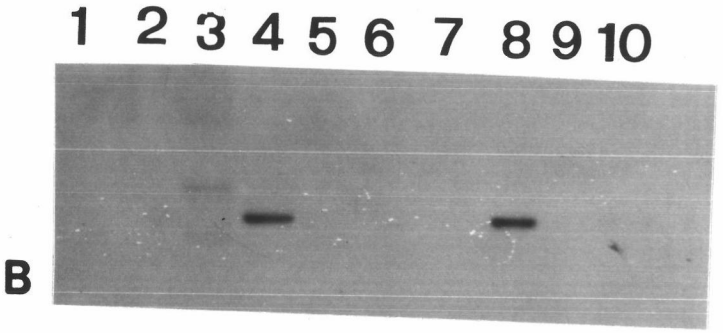
B: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1

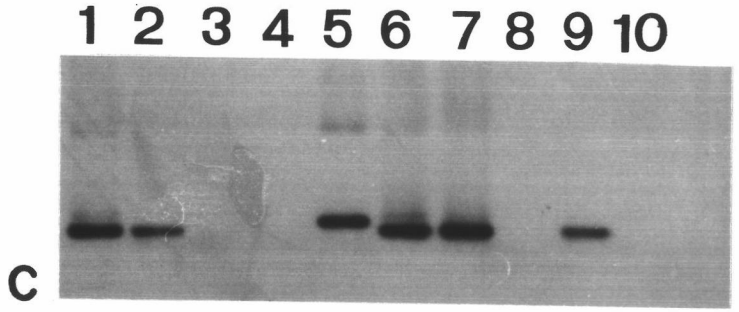
C: autoradiography จากการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27

1=S77	2=S79	3=S90	4=S92	5=S98
6=S102	7=S105	8=3D7	9=HB3	10=negative control

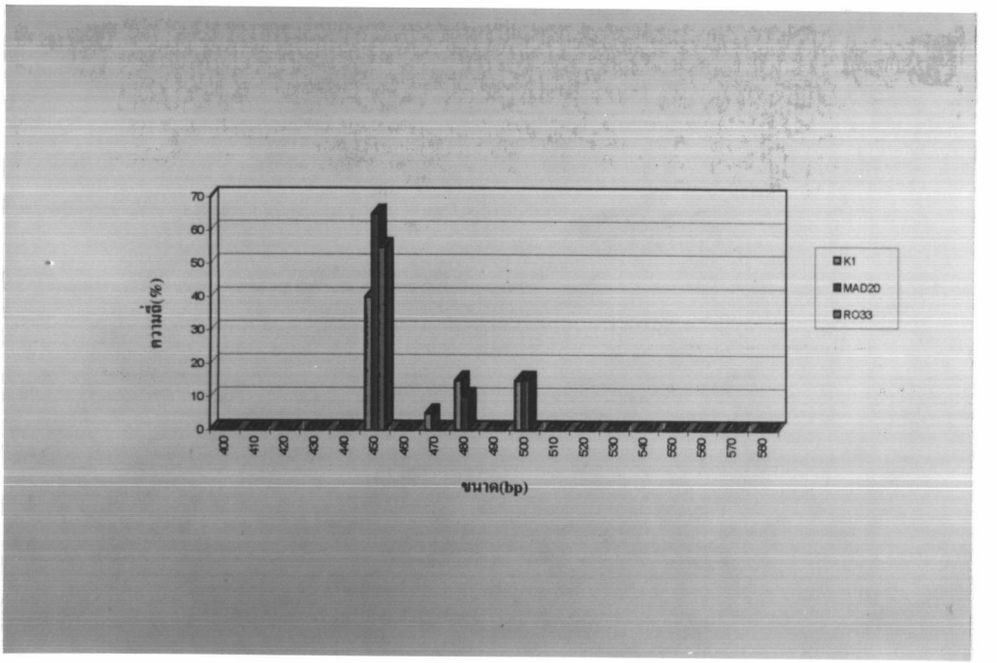
M=molecular weight marker


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M
1033
653
517
453
394
A

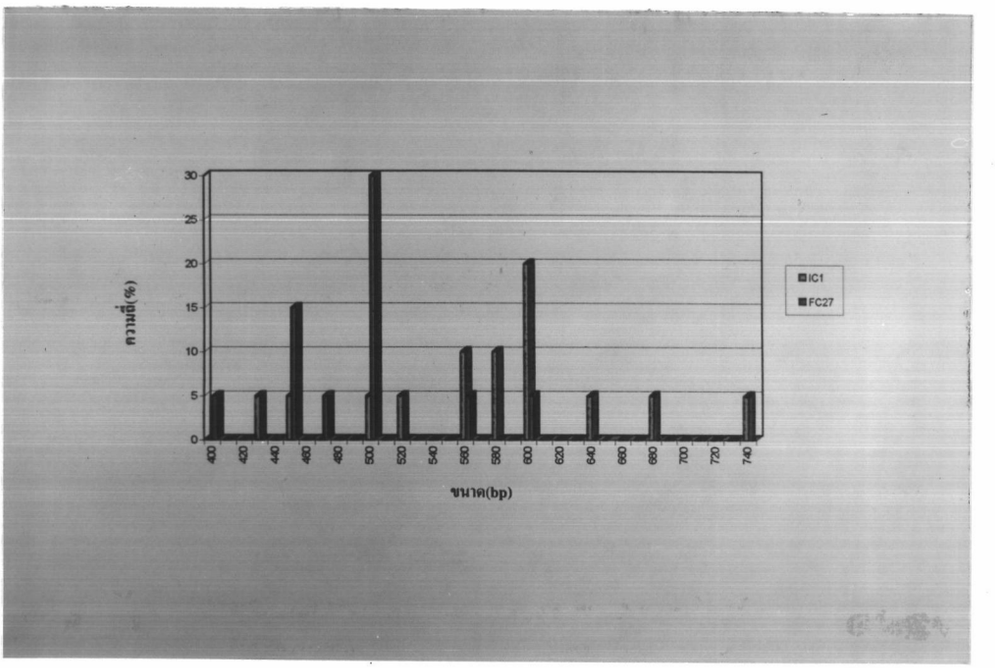

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
B


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
C

A



B



รูปที่ 23 กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

A: MSP-1

B: MSP-2

แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบส ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และ RO33 และในไอโซเลต S110 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอ ติดตามชนิด MAD20 และ RO33

สำหรับผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 ในพื้นที่ดัง กล่าวพบว่า 12 ไอโซเลต (60%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 จำนวน 11 ไอโซเลต (55%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 และจำนวน 1 ไอโซเลต (5%) ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอ ติดตามทั้งสองชนิด (S109) และพบว่า 4 ไอโซเลต (20%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งชนิด IC1 และ FC27 (S3, S76, S107 และ S114) เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่าจำนวน 12 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 430-740 คู่เบส โดยพบขนาด 430 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S103) ขนาด 450 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลต (S127) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S107) ขนาด 520 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลต (S111) ขนาด 560 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (S125 และ S127) ขนาด 580 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต (S3 และ S92) ขนาด 600 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต (S76, S103, S111 และ S118) ขนาด 640 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S114) ขนาด 680 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S70) และขนาด 740 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S90) และจำนวน 11 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับ ดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 400-600 คู่เบส โดยพบขนาด 400 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S76) ขนาด 450 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต (S107, S114 และ S128) ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S110) ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 6 ไอโซเลต (S3, S76, S77, S79, S102 และ S105) ขนาด 560 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต (S98) และขนาด 600 คู่เบส จำนวน 1 ไอโซเลต (S76) เมื่อพิจารณาจากจำนวนแถบที่ปรากฏบนเจลพบว่า 7 ไอโซเลต (S3, S103, S107, S111, S114, S118 และ S127) มีจำนวนแถบบนเจล 2 แถบที่มีขนาดแตกต่างกัน ใน ไอโซเลต S3 แถบที่มีขนาด 580 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ไอโซเลต S103 แถบที่มีขนาด 600 และ 430 คู่เบสทั้ง สองแถบนี้ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ไอโซเลต S107 แถบที่มีขนาด 500 คู่เบส ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม ชนิด FC27 ในไอโซเลต S111 แถบที่มีขนาด 600 และ 520 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ไอโซเลต S114 แถบที่มีขนาด 640 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มี

ขนาด 450 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 ไอโซเลต S118 แถบที่มีขนาด 600 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 ส่วนแถบที่มีขนาด 520 คู่เบสไม่ให้ผลไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด และในไอโซเลต S127 แถบที่มีขนาด 560 และ 450 คู่เบสทั้งสองแถบนี้ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลต S76 มีแถบปรากฏบนเจล 3 แถบ โดยแถบที่มีขนาด 600 คู่เบสไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 และ FC27 ส่วนแถบที่มีขนาด 500 และ 400 คู่เบสไฮบริไดซ์ กับ ดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27

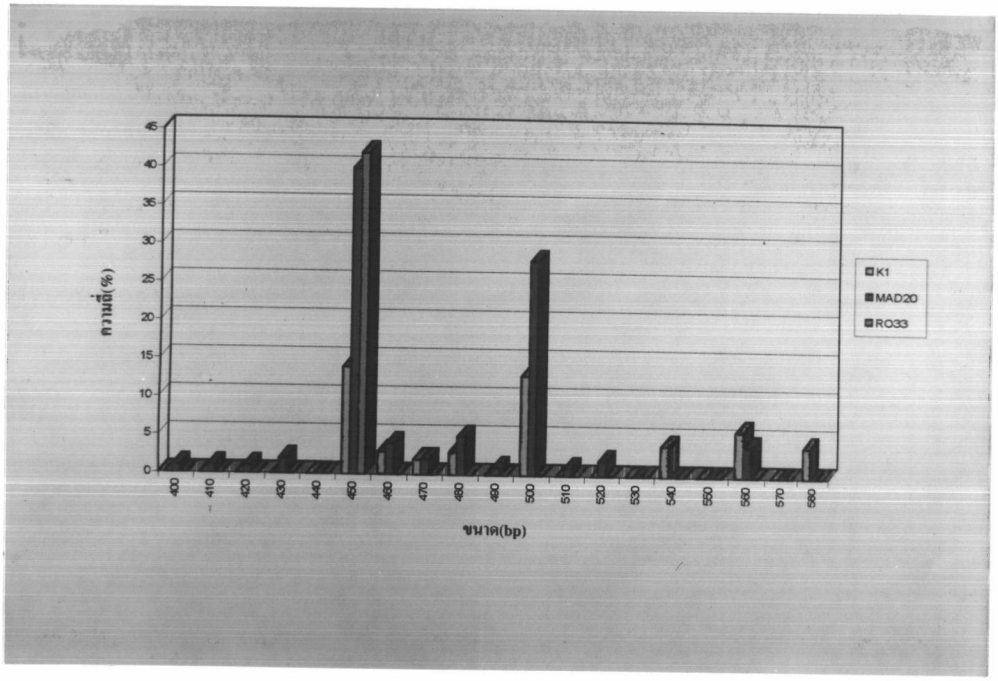
ตารางที่ 8 สรุปผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 จากผู้ป่วยใน 4 พื้นที่ จำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์ ตามรูปแบบของการไฮบริไดซ์

Place	No. of isolate/ clone	K1	MAD20	RO33	K1/MAD20	K1/RO33	MAD20/RO33	K1/MAD20/RO33
Mae-Sod, Tak	17/3	3	8	2	3	1	2	1
Thongpapoom, Kanchanaburi	20	0	8	2	3	1	5	1
Borai, Trad	40	1	12	1	11	1	6	8
Sriracha, chonburi	20	2	2	1	5	1	2	7
Total	97/3	6	30	6	22	4	15	17

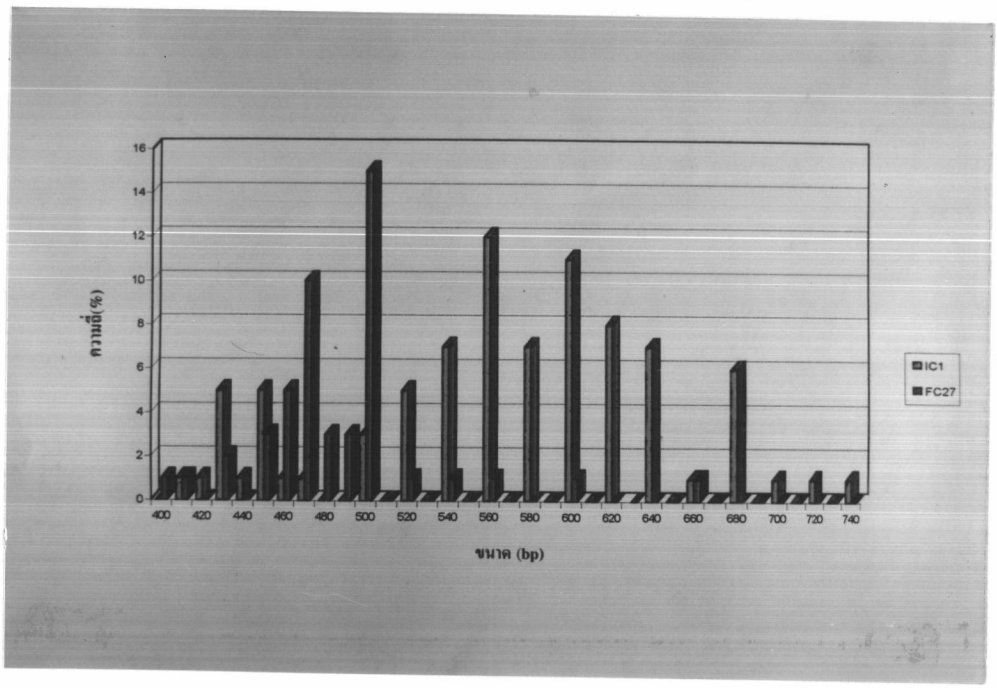
ตารางที่ 9 สรุปผลการไฮบริไดเซชันระหว่างดีเอ็นเอของเชื้อ P. falciparum กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 จากผู้ป่วยใน 4 พื้นที่ จำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์ตามรูปแบบของการไฮบริไดซ์

Place	No. of isolate/ clone	IC1	FC27	IC1/FC27	not hybridize
Mae-Sod, Tak	17/3	8	4	3	5
Thongpapoom, Kanchanaburi	20	14	1	5	0
Borai, Trad	40	14	10	11	5
Sriracha, chonburi	20	8	7	4	1
Total	97/3	44	22	23	11

A



B

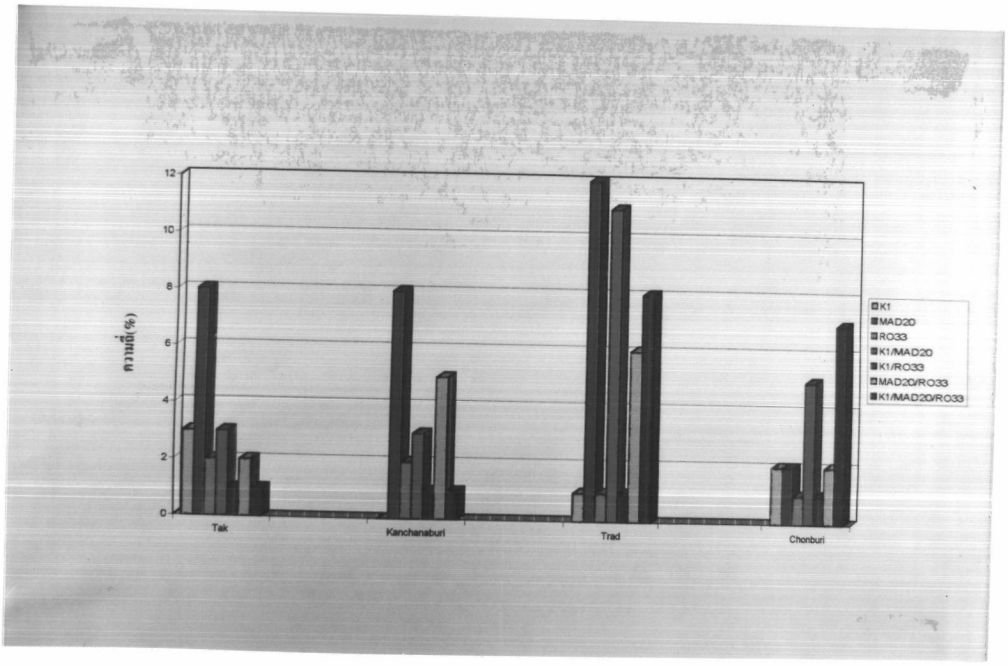


รูปที่ 24 กราฟแสดงความถี่ของขนาดอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่ 4 จังหวัด จำนวน 97 ไอโซเลต 3 สายพันธุ์

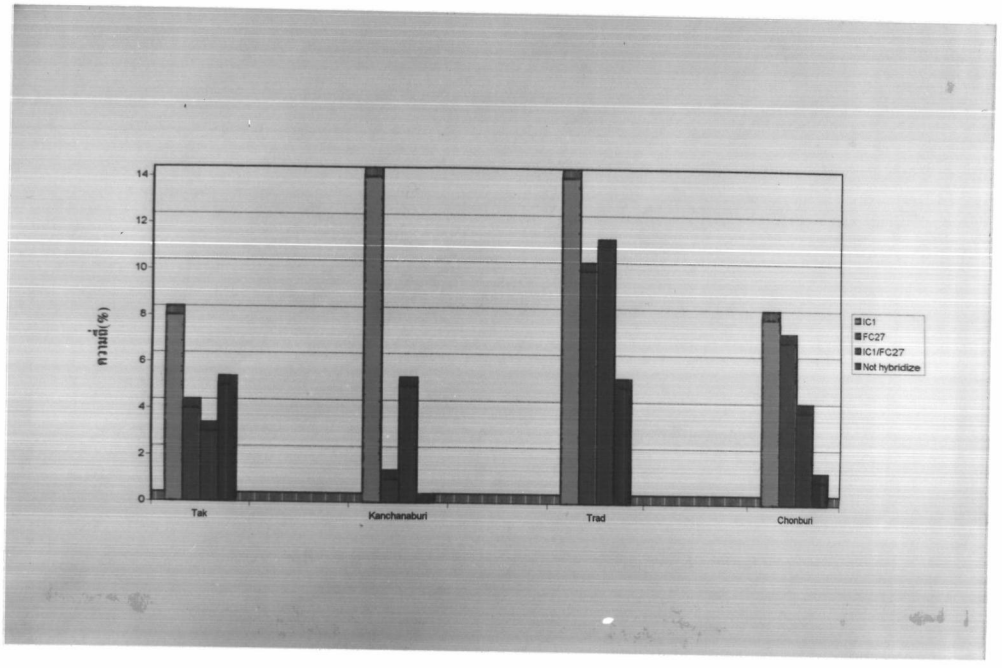
A: MSP-1

B: MSP-2

A



B

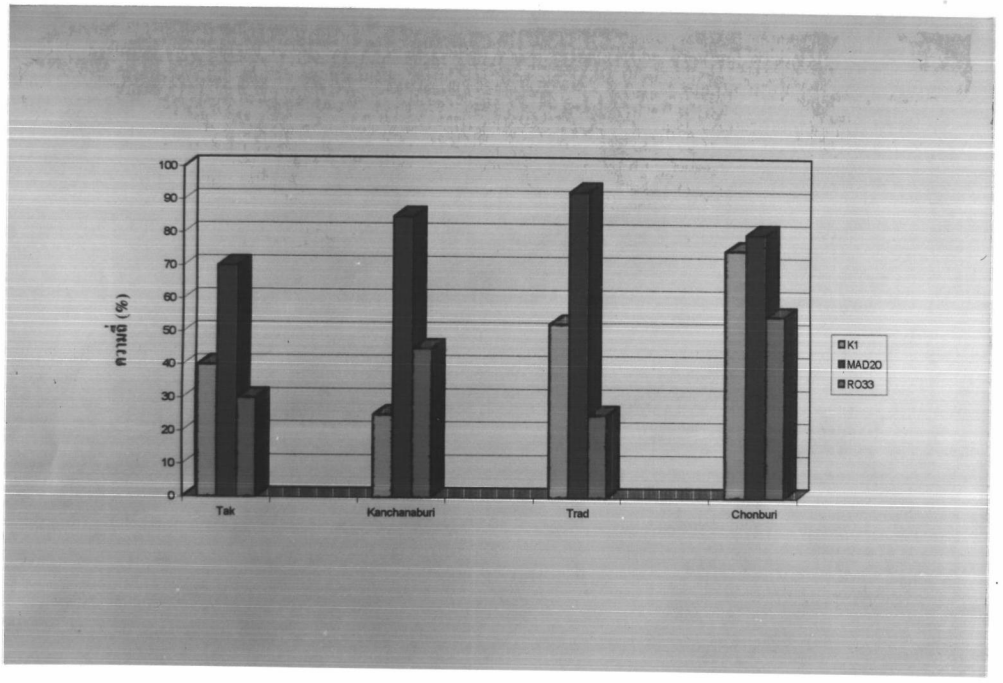


รูปที่ 25 กราฟแสดงความถี่ของรูปแบบอัลลีล MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ตราด และชลบุรี

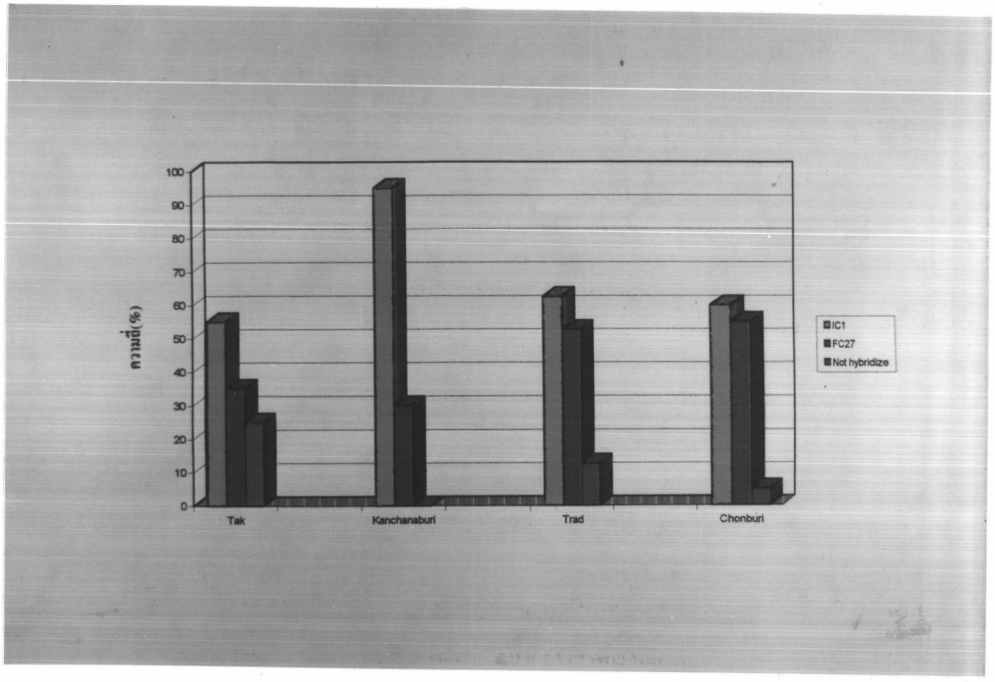
A: MSP-1

B: MSP-2

A



B



รูปที่ 26 กราฟแสดงการกระจายของ MSP-1 และ MSP-2 ในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ตราด และชลบุรี

A: MSP-1

B: MSP-2

ตารางที่ 8-9 และรูปที่ 24 - 26 สรุปผลการไฮบริไดเซชันของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ที่เก็บรวบรวมจากผู้ป่วยใน 4 พื้นที่ จำนวน 97 ไอโซเลตและ 3 สายพันธุ์ เมื่อทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-1 พบว่า 49 ไอโซเลต (49%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 จำนวน 84 ไอโซเลต (84%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 และจำนวน 42 ไอโซเลต (42%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 และพบว่ามี 58 ไอโซเลตสามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามมากกว่า 1 ชนิด สามารถจำแนกตามรูปแบบของการไฮบริไดซ์ได้ดังตารางที่ 6 โดยพบชนิด K1 จำนวน 6 ไอโซเลต(6%) ชนิด MAD20 จำนวน 30 ไอโซเลต (30%) ชนิด RO33 จำนวน 6 ไอโซเลต (6%) ชนิด K1/MAD20 จำนวน 22 ไอโซเลต (22%) ชนิด K1/RO33 จำนวน 4 ไอโซเลต (4%) ชนิด MAD20/RO33 จำนวน 15 ไอโซเลต (15%) และชนิด K1/MAD20/RO33 จำนวน 17 ไอโซเลต (17%) ผลิตผล PCR ของ MSP-1 มีขนาดระหว่าง 400-580 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่าจำนวน 49 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด K1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 450-580 คู่เบส โดยพบขนาด 450 คู่เบสจำนวน 14 ไอโซเลต ขนาด 460 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต ขนาด 480 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 13 ไอโซเลต ขนาด 540 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต ขนาด 560 คู่เบสจำนวน 6 ไอโซเลต และขนาด 580 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต สำหรับจำนวน 84 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด MAD20 นั้นมีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 400-560 คู่เบส โดยพบขนาด 400 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 410 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 420 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 430 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต ขนาด 450 คู่เบสจำนวน 40 ไอโซเลต ขนาด 460 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต ขนาด 480 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต ขนาด 490 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 28 ไอโซเลต ขนาด 510 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต และขนาด 560 คู่เบสจำนวน 4 ไอโซเลต และสำหรับจำนวน 42 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด RO33 นั้นพบว่ามีขนาดผลิตผล PCR 450 คู่เบส

สำหรับผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อยีน MSP-2 นั้นพบว่า จำนวน 67 ไอโซเลต (67%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 จำนวน 45 ไอโซเลต (45%) ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 และจำนวน 11 ไอโซเลต (11%) ไม่ให้ผลไฮบริไดซ์ และพบว่า 23 ไอโซเลต (23%) สามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งชนิด IC1 และ FC27 ผลิตผล

PCR มีขนาดระหว่าง 400-740 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบผลการไฮบริไดเซชันกับขนาดผลิตผล PCR พบว่าจำนวน 67 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด IC1 นั้น มีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 410-470 คู่เบส โดยพบขนาด 410 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 420 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 430 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต ขนาด 440 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 450 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต ขนาด 460 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต ขนาด 540 คู่เบสจำนวน 7 ไอโซเลต ขนาด 560 คู่เบสจำนวน 12 ไอโซเลต ขนาด 580 คู่เบสจำนวน 7 ไอโซเลต ขนาด 600 คู่เบสจำนวน 11 ไอโซเลต ขนาด 620 คู่เบสจำนวน 8 ไอโซเลต ขนาด 640 คู่เบสจำนวน 7 ไอโซเลต ขนาด 660 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 680 คู่เบสจำนวน 6 ไอโซเลต ขนาด 700 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 720 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต และขนาด 740 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต สำหรับจำนวน 45 ไอโซเลตที่ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามชนิด FC27 นั้นมีขนาดผลิตผล PCR ระหว่าง 400-660 คู่เบส โดยพบขนาด 400 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 410 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 430 คู่เบสจำนวน 2 ไอโซเลต ขนาด 450 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต ขนาด 460 คู่เบสจำนวน 5 ไอโซเลต ขนาด 470 คู่เบสจำนวน 10 ไอโซเลต ขนาด 480 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต ขนาด 490 คู่เบสจำนวน 3 ไอโซเลต ขนาด 500 คู่เบสจำนวน 15 ไอโซเลต ขนาด 520 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 540 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 560 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต ขนาด 600 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต และขนาด 660 คู่เบสจำนวน 1 ไอโซเลต