

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## แผนงานวิจัยเรื่อง

“พื้นฐานและแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียตามชายแดนของประเทศไทย”  
“Basic and Strategic Research on Malaria Control along Borders of Thailand”

หน่วยงานวิจัยหลัก  
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยหลัก  
ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์  
ผศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน  
ปีงบประมาณ 2549-2551

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ป่วยทุกท่านที่อุทิศเวลาและให้ความร่วมมืออย่างดียิ่ง ผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน เจ้าหน้าที่ สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง และหน่วยงานทุกแห่ง ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร คุณนภาพร ศิริพูน และคุณอารีย์ เสือก้อน WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Biological Characterization of Malaria Parasites โปรแกรมวิจัยมาลาเรีย วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์ร่วมมือเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียและทดสอบระดับความไวของเชื้อต่อยาต้านมาลาเรีย และขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2549-2551 ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการดำเนินงานวิจัย

คณะผู้วิจัย  
ตุลาคม 2551

## บทคัดย่อโครงการวิจัยที่ 1

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การวิเคราะห์เชื้อมาลาเรียชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในมนุษย์ในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศไทยโดยติดตามระยะยาว

(ภาษาอังกฤษ) Longitudinal analysis of human malaria and primate malaria in humans along international borders of Thailand

### ชื่อผู้วิจัย

1. ศ.นพ.ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ (Somchai Jongwutiwes M.D., Ph.D.)  
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
2. ผศ.ดร. จตุรงค์ พุทธิพิทย (Chaturong Putaporntip Ph.D.)  
สังกัดสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข  
โทรศัพท์ 02-590-3112 โทรสาร 02-591-8433
3. นพ.จีรพัฒน์ ศิริชัยสินธพ (Jeeraphat Sirichaisinthop M.D.)  
นายแพทย์ ระดับ 9  
ศูนย์อบรมโรคติดต่อนำโดยแมลง (สังกัดสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง)  
6 ถ.พหลโยธิน ต.ธารเกษม อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี 18120  
โทรศัพท์ 036-266142 โทรสาร 036-267586

## บทคัดย่อ

ในการสำรวจระยะยาวเกี่ยวกับการกระจายของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทยโดยการตรวจวินิจฉัยมาลาเรียโดยวิธีตรวจหาเชื้อจากฟิล์มโลหิตที่ย้อมสียิมซำภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อเพิ่มปริมาณของยีนโรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กของเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดของคน รวมทั้งเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมโนวลิไซต์ ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้มีการตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมโนวลิไซต์ในประเทศไทย แผลมมลายู เกาะบอร์เนียวในส่วนของประเทศมาเลเซียและประเทศฟิลิปปินส์ ในการศึกษานี้ได้รวบรวมตัวอย่างเชื้อมาลาเรียในปี ค.ศ. 2006 ถึง 2008 จำนวนทั้งสิ้น 1,859 ตัวอย่างจากเขตปรากฏโรคมาลาเรียตามชายแดนของประเทศไทย ผลการสำรวจตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมมานั้นพบเชื้อมาลาเรียจากการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 908 ตัวอย่าง โดยพบว่ามีร้อยละ 32.0 เป็นเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ร้อยละ 67.0 เป็นเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ร้อยละ 0.2 เป็นเชื้อพลาสโมเดียมมาลาเรียอี และร้อยละ 0.8 เป็นการติดเชื้อร่วมกันระหว่างพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ สำหรับผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสพบตัวอย่างที่มีเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้นมากกว่าวิธีการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 115 ตัวอย่างและวิธีปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอร์เรสตรวจพบการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดคิดเป็นร้อยละ 12.0 ทั้งนี้การติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดมีอุบัติการณ์สูงในประชากรเชื้อมาลาเรียจากเขตปรากฏโรคทางเหนือและตะวันตกของประเทศ เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วย 1 รายจากภาคใต้ให้ผลการตรวจเป็นบวกโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพลาสโมเดียมโนวลิไซต์ในขณะที่เชื้อมาลาเรียดังกล่าวมีลักษณะคล้ายเชื้อพลาสโมเดียมมาลาเรียอี สำหรับการวิเคราะห์สายพันธุ์ของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมจากการตรวจสอบยีนที่สร้างโปรตีนสปอร์โรซอยด์พีไอเอ็นแอสปาราจिनริช และส่วนที่ 2 ของโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยด์ชนิดที่ 1 พบว่าประชากรเชื้อดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมมีอัตราการปะปนกันของเชื้อต่างสายพันธุ์เกิดขึ้นบ่อยในประชากรเชื้อจากตอนเหนือและตะวันตกมากกว่าทางตะวันออกและทางใต้ของประเทศ ในทำนองเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์เชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ในส่วนที่ 6 ของยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยด์ชนิดที่ 1 พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์เช่นกัน อย่างไรก็ตามอัตราการปะปนกันของเชื้อต่างสายพันธุ์เกิดขึ้นใกล้เคียงกันในประชากรพลาสโมเดียมไวแวกซ์จากภูมิภาคที่แตกต่างกันของประเทศโดยพบตั้งแต่ร้อยละ 19.1 ถึง 23.2 แสดงถึงความแตกต่างกันในลักษณะการติดเชื้อปะปนกันระหว่างเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสำหรับไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียของพลาสโมเดียมโนวลิไซต์จากผู้ป่วยในการสำรวจนี้พบว่าจัดอยู่ในสายใยพันธุกรรมเดียวกับเชื้อที่พบในลิงมาแคและต่างกลุ่มจากเชื้อชนิดเดียวกันที่พบในผู้ป่วยจากเกาะซาราวัก ดังนั้นเชื้อมาลาเรียที่พบในผู้ป่วยในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามภูมิภาคในเชิงอุบัติการณ์ การกระจายชนิดของเชื้อและอัตราการติดเชื้อต่างสายพันธุ์ร่วมกันในตัวอย่างเดียวกันซึ่งมีผลกระทบต่อการวางมาตรการระดับชาติในการควบคุมโรคมาลาเรีย

## **Abstract**

A longitudinal survey of malaria species distribution in Thailand was performed by microscopy-based method using Giemsa's stained blood smears and polymerase chain reaction (PCR)-based detection using species specific primers targeting the small subunit ribosomal RNA genes of the four human malaria species and *Plasmodium knowlesi*. Human infections with *P. knowlesi* have recently been found in humans in Thailand, Malay Peninsula, Malaysian Borneo and The Philippines. During 2006-2008, a total of 1,859 blood samples from febrile patients in malaria endemic areas along international borders of Thailand were recruited in this study. Of these, 908 isolates contained malaria parasites as detected by microscopy, comprising 32.0% *P. falciparum*, 67.0% *P. vivax*, 0.2% *P. malariae* and 0.8% coinfection of *P. falciparum* and *P. vivax*. On the other hand, the results from the PCR-based method clearly outperformed those from microscopy because additional 115 positive cases and more multi-species infections (12.0%) were found by the former method. Mixed species infections were remarkably prevalent in malaria populations in northern and western endemic areas of the country. It is noteworthy that an isolate from a patient in southern Thailand gave positive test for *P. knowlesi*-specific primers while the morphology of the parasites in blood smear resembled that of *P. malariae*. Analysis of *P. falciparum* strains inferred from the genes encoding sporozoite-threonine-asparagine-rich protein and block 2 of the merozoite surface protein-1 has revealed genetic polymorphism at these loci. Importantly, multiple clone infections were more commonly identified among *P. falciparum* populations from northern and western areas than those from eastern and southern regions. Likewise, genetic polymorphism occurred in the genes encoding block 6 of *P. vivax*. However, multiple clone infections of *P. vivax* were almost equally distributed throughout all endemic regions, ranging from 19.1 to 23.2%, suggesting differential patterns of clonal mixture in *P. falciparum* and *P. vivax* populations in Thailand. Meanwhile, the mitochondrial cytochrome b sequence of *P. knowlesi* isolated from a patient in this survey was phylogenetically clustered with those derived from macaque monkeys while those from Sarawak patients were placed in a disparate clade. Therefore, malaria parasites that circulate among patients in Thailand display spatial difference in prevalence, species distribution and multiple clone infections that could have impact on a nation-wide malaria control policy.

## บทคัดย่อโครงการวิจัยที่ 2

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) วิวัฒนาการของการดื้อยาคลอโรควินของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมในประเทศไทย:  
พื้นฐานสำหรับชะลอการดื้อยาด้านมาลาเรีย

(ภาษาอังกฤษ) Evolution of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: a  
basis for decelerating anti-malarial drug resistance

ชื่อผู้วิจัย

1. ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ (Somchai Jongwutiwes M.D., Ph.D.)  
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
2. ผศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ (Chaturong Putaporntip Ph.D.)  
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944

## บทคัดย่อ

แนวทางที่สำคัญประการหนึ่งในการควบคุมโรคมาลาเรียจำเป็นต้องอาศัยการใช้จ่ายด้านมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อในผู้ป่วยอย่างสมบูรณ์ เพื่อป้องกันการเกิดโรคที่รุนแรงและระงับการแพร่กระจายของโรคสู่ผู้อื่นในชุมชน แม้ว่ายาคลอโรควินเคยมีประสิทธิภาพสูงต่อเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมยังผลให้อุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนในหลายประเทศทั่วโลก แต่การปรากฏและแพร่กระจายของเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาทั่วโลกในภายหลังนับเป็นข้อจำกัดในบทบาทของการใช้จ่ายดังกล่าวเพื่อมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียในปัจจุบัน ด้วยเหตุที่เชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาคลอโรควินมีจุดกำเนิดเพียงไม่กี่จุดและจุดกำเนิดหนึ่งคือบริเวณชายแดนของประเทศไทยและกัมพูชา ดังนั้นการวิเคราะห์ยีนคลอโรควินรีซิสแทนท์ทรานสปอร์ตเตอร์ (Pfcr1) และยีนมัลติดริฟท์รีซิสแทนท์ชนิดที่หนึ่ง (Pfmdr-1) ของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมจึงมีความสำคัญอันเป็นพื้นฐานเพื่อการเข้าใจวิวัฒนาการและการคงอยู่ของประชากรเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาคลอโรควินในประเทศไทย ในการศึกษานี้ได้รวบรวมตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมจำนวน 165 ตัวอย่างจากทั่วประเทศซึ่งเก็บรวบรวมตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991, 2003, 2005 ถึง 2007 ผลการตรวจสอบระดับการตอบสนองต่อยาคลอโรควินในหลอดทดลองพบว่ามี 18 ตัวอย่างที่ดื้อยาในระดับ  $1 \times 10^{-6}$  M ในระดับ  $5 \times 10^{-7}$  M จำนวน 139 ตัวอย่าง ในระดับ  $2 \times 10^{-7}$  M จำนวน 8 ตัวอย่าง ส่วนผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ครอบคลุมทั้งยีน Pfcr1 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบย้อนกลับพบว่าประชากรเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมในประเทศไทยมียีน Pfcr1 เพียง 2 จีโนไทป์ ได้แก่ CIETHALSESTI และ CIETLALSESTI ในโคดอนที่ 72, 74, 75, 76, 97, 144, 160, 220, 271, 326, 356 และ 371 ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อมาลาเรียที่มีจีโนไทป์ CIETHALSESTI พบมากกว่าเชื้อมาลาเรียที่มีจีโนไทป์ CIETLALSESTI อย่างชัดเจนในตัวอย่างจากแต่ละปีที่เกิดขึ้นซึ่งบ่งถึงการเกิดภาวะการคัดเลือกอย่างสมดุลหรือการเกิดภาวะการคงที่ทางพันธุกรรมของอัลลีลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลอโรควิน แม้ว่าจำนวนจีโนไทป์ของ Pfcr1 ที่พบในเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมในประเทศไทยมีเพียงไม่กี่รูปแบบแต่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Pfmdr-1 ในตัวอย่างเดียวกันพบว่ามีจำนวนจีโนไทป์มากถึง 10 แบบ แสดงว่าเชื้อมาลาเรียเหล่านี้ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มปริมาณของเชื้อจากสายพันธุ์เดียวกันแต่น่าจะมีสาเหตุจากแรงกดดันจากการคัดเลือกตามธรรมชาติที่ส่งผลต่อยีนทั้งสองที่ต่างกัน ทั้งนี้การคงอยู่อย่างมีเสถียรภาพตามกาลเวลาของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมในประเทศไทยซึ่งมียีน Pfcr1 ที่มีจำนวนจีโนไทป์อย่างจำกัดจำนวนนี้ย่อมลดโอกาสในการกลับมาปรากฏใหม่ของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลอโรควิน ข้อมูลดังกล่าวจึงนับเป็นบทเรียนที่มีความสำคัญต่อการวางมาตรการการใช้จ่ายในระดับชาติให้มีความเหมาะสมมากขึ้น

## Abstract

One of the effective malaria control strategies relies on antimalarial drug regimens that can completely eradicate parasites in infected individuals in order to prevent severe illness and abolish further disease transmission to community. Although chloroquine used to be an effective antimalarial drug against *Plasmodium falciparum* resulting in a dramatic decline in worldwide malaria incidence, the emergence and wide-spread of drug resistant strains has hindered its role in current control program. Because one of a few foci of chloroquine-resistant parasites occurred in Thailand-Cambodia border, analysis of the chloroquine-resistant transporter gene and the multidrug-resistant 1 gene of *P. falciparum* (*Pfcr1* and *Pfmdr-1*) is essential to understand the evolution and maintenance of chloroquine-resistant phenotype in malaria population in Thailand. Here, we have recruited 165 *P. falciparum* isolates collected in 1991, 2003, 2005-2007 from diverse endemic areas of the country. In vitro drug susceptibility testing has revealed that all isolates express chloroquine-resistant phenotype, characterized by the minimum inhibitory concentration of  $1 \times 10^{-6}$  M (n=18),  $5 \times 10^{-7}$  M (n=139), and  $2 \times 10^{-7}$  M (n=8). Sequence analysis of the entire *Pfcr1* gene of these isolates using templates from reverse transcriptase polymerase chain reaction amplification has shown that only two genotypes, i.e. CIETHALSESTI and CIETLALSESTI at codons 72, 74, 75, 76, 97, 144, 160, 220, 271, 326, 356 and 371, respectively, circulated in *P. falciparum* population of Thailand. It is noteworthy that the genotype CIETHALSESTI remarkably outnumbered the genotype CIETLALSESTI for all periods of parasite collection, suggesting balancing selection or genetic fixation of chloroquine-resistant alleles. Despite the paucity in number of *Pfcr1* genotypes of *P. falciparum* identified in this study, sequence analysis of the *Pfmdr-1* gene of the same isolates displayed 10 distinct genotypes, suggesting that these *P. falciparum* were not originated from a few parasite clones but rather implies that different selective pressures operate on these gene loci. The temporo-stable pattern of *Pfcr1* along with the limited number of genotypes at this locus in malaria population of Thailand may reduce the chance for the chloroquine-sensitive ones to re-emerge, an issue that requires a more rational policy of antimalarial drug use at the nation-wide level.



### บทคัดย่อโครงการวิจัยที่ 3

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การวิเคราะห์พันธุกรรมประชากรและวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัม และไวแวกซ์ในประเทศไทยเพื่อเป็นพื้นฐานในการควบคุมโรคมาลาเรีย

(ภาษาอังกฤษ) Analysis of population genetics and molecular evolution of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in Thailand: a basis for malaria control

#### ชื่อผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ (Chaturong Putaporntip Ph.D.)  
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
2. ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ (Somchai Jongwutiwes M.D., Ph.D.)  
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
3. อ. ดร. สุนีย์ สีธรรมใจ (Sune Seethamchai Ph.D.)  
สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ จ. พิจิตร  
โทรศัพท์ 055-261-000 ต่อ 3301 โทรสาร 055-261-025

## บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมประชากรและวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมฟีลซิพาร์รัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์โดยการวิเคราะห์ยีนสำหรับเอพิคอลิเมมเบรนแอนติเจนที่ 1 ของพลาสโมเดียมฟีลซิพาร์รัม (PfAMA-1) โพรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ของพลาสโมเดียมไวแวกซ์ชนิดที่ 4 (Pvmsp-4) โพรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ของพลาสโมเดียมไวแวกซ์ชนิดที่ 5 (Pvmsp-5) และเอพิคอลิเมมเบรนแอนติเจนที่ 1 ของพลาสโมเดียมไวแวกซ์ (PvAMA-1) จากตัวอย่างเชื้อชนิดละมากกว่า 240 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในเขตป्राกฏโรคของประเทศไทย โพรตีนเหล่านี้ นับว่ามีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนเนื่องจากอิมมูโนเจนจากโปรตีนเหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการทดสอบการติดเชื้อในการทดลอง ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อพลาสโมเดียมฟีลซิพาร์รัมทั้งสิ้น 242 ตัวอย่างพบ PfAMA-1 ทั้งหมด 55 แสปโปไลไทป์ โดยพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 72 ตำแหน่ง ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 56 ตำแหน่งและการแทนที่ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในส่วนเอ็คโดโดเมนของโปรตีน สำหรับการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรมพบว่ายีน PfAMA-1 มีความแตกต่างกันจัดเป็น 2 กลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (dN) มีค่ามากกว่าอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดต่อตำแหน่ง (dS) อย่างมีนัยสำคัญแสดงถึงการคัดเลือกในเชิงบวกทำให้เกิดความหลากหลายของยีนนี้ ในขณะที่เดียวกันการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvAMA-1 พบ 54 แสปโปไลไทป์ โดยพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 48 ตำแหน่ง เป็นชนิดที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 28 ตำแหน่งและการแทนที่ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในส่วนเอ็คโดโดเมนของโปรตีนเช่นเดียวกับที่พบใน PvAMA-1 อย่างไรก็ตามพบว่าค่า dS ของ PvAMA-1 มีค่ามากกว่าค่า dN อย่างมีนัยสำคัญซึ่งแสดงถึงการคัดเลือกในเชิงลบที่ส่งผลต่อความหลากหลายของยีนดังกล่าว นอกจากการคัดเลือกตามธรรมชาติแล้วคณะผู้วิจัยยังพบหลักฐานการเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมในยีนทั้งสองเนื่องจากการตรวจพบการลดลงของค่า linkage disequilibrium ที่มีนัยสำคัญระหว่างโลไซเมื่อระยะห่างระหว่างโลไซมีค่ามากขึ้น สำหรับยีน Pvmsp-4 และ Pvmsp-5 นั้นคณะผู้วิจัยพบ 38 และ 66 แสปโปไลไทป์ การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 18 และ 143 ตำแหน่ง เป็นชนิดที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 10 และ 123 ตำแหน่งตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าขอบเขตความหลากหลายของยีน Pvmsp-5 (ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่า 0.03487) มีค่ามากกว่ายีน Pvmsp-4 (ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่า 0.00104) ทั้งนี้การคัดเลือกตามธรรมชาติในยีนทั้งสองมีความแตกต่างกัน กล่าวคือการคัดเลือกในเชิงบวกสำหรับยีน Pvmsp-5 ซึ่งน่าจะเป็นผลจากแรงกดดันจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและการคัดเลือกในเชิงลบสำหรับ Pvmsp-4 อันอาจเนื่องจากข้อจำกัดในโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน โดยสรุปคณะผู้วิจัยพบว่าโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมฟีลซิพาร์รัมและพลาสโมเดียมไวแวกซ์ในประเทศไทยมีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากร ในขณะที่กระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติทั้งในเชิงลบและเชิงบวกเกิดขึ้นในยีนที่สร้างโปรตีนเหล่านี้ที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน

## Abstract

We have determined the population genetics and molecular evolution of *Plasmodium falciparum* as inferred from the apical membrane antigen-1 (*PfAMA-1*) and *P. vivax* inferred from the merozoite surface protein-4 (*Pvmsp-4*), the merozoite surface protein-5 (*Pvmsp-5*) and the apical membrane antigen-1 (*PvAMA-1*) of more than 240 clinical isolates for each species collected over 3 year period from endemic areas of Thailand. These proteins are considered to be strong malaria vaccine candidates because immunogens derived from these proteins conferred protective effect against parasite challenges in experimental trials. Of 242 *P. falciparum* isolates examined, 55 haplotypes of *PfAMA-1* were identified. In total, 72 nucleotide substitutions were observed, resulting in 56 amino acid changes and most of these changes were clustered in the ectodomains of the protein. Phylogenetic analysis has revealed that *PfAMA-1* of Thai isolates seem to be grouped into two clusters. The rate of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) significantly greater than the rate of synonymous substitutions per synonymous site (dS) in *PfAMA-1*, indicating positive selection shaping polymorphism at this locus. Meanwhile, sequence analysis of the orthologous gene in *P. vivax* has shown 54 haplotypes, 48 nucleotide substitutions and 28 amino acid exchanges. Like *PfAMA-1*, most of the substituted residues were located in the ectodomains of *PvAMA-1*. In contrast to *PfAMA-1*, we observed dS significantly outnumbered dN in *PvAMA-1*, implying that purifying selection has maintained sequence polymorphism at this locus. Besides selective pressure, we observed intragenic recombination occurred in both loci as evidenced by a remarkable decline in significant linkage disequilibrium over molecular distance and the minimum number of recombination event analysis. For *Pvmsp-4* and *Pvmsp-5*, we detected 38 and 66 haplotypes with 18 and 143 nucleotide substitutions, resulting in 10 and 123 amino acid exchanges, respectively. It is noteworthy that the extent of sequence polymorphism in *Pvmsp5* (nucleotide diversity = 0.03487) is much greater than that in *Pvmsp-4* (nucleotide diversity = 0.00104). Contrasting signatures of selection were observed in these loci characterized by negative selection in *Pvmsp-4* and positive selection in *Pvmsp-5*, implying that structural or functional constraint has limited diversity in the former locus and probably immune pressure has enhanced diversity in the latter. In conclusion, we observed panmictic structure in both *P. falciparum* and *P. vivax* populations in Thailand while differential selective pressures occurred in these loci that encode vaccine candidate proteins.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	
โครงการวิจัยที่ 1	iii
โครงการวิจัยที่ 2	vi
โครงการวิจัยที่ 3	ix
สารบัญเรื่อง	xii
สารบัญตาราง	xiv
สารบัญรูป	xv
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xviii
ภาพรวมแผนงานวิจัย	1
โครงการวิจัยที่ 1	
- บทนำ	6
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	11
- วิธีดำเนินการวิจัย	11
- ผลการวิจัย	19
- วิจารณ์ผลการวิจัย	36
- สรุปผลการวิจัย	41
- ข้อเสนอแนะ	42
- บรรณานุกรม	43
โครงการวิจัยที่ 2	
- บทนำ	47
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	50
- วิธีดำเนินการวิจัย	50
- ผลการวิจัย	55
- วิจารณ์ผลการวิจัย	60
- สรุปผลการวิจัย	63
- ข้อเสนอแนะ	64
- บรรณานุกรม	65
โครงการวิจัยที่ 3	
- บทนำ	68

- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	72
- วิธีดำเนินการวิจัย	72
- ผลการวิจัย	75
- วิเคราะห์ผลการวิจัย	96
- สรุปผลการวิจัย	98
- ข้อเสนอแนะ	99
- บรรณานุกรม	100
ประวัตินักวิจัยหลัก	104

## สารบัญตาราง

	หน้า
<b>โครงการวิจัยที่ 1</b>	
ตารางที่ 1.1 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการศึกษา	14
ตารางที่ 1.2 ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิต	19
ตารางที่ 1.3 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR	22
ตารางที่ 1.4 แสดงความแตกต่างของแต่ละ haplotype ในยีน STARP	26
ตารางที่ 1.5 แสดงผลการตรวจสอบ allele ในส่วนของ block 2 ของยีน PfmSp-1	27
ตารางที่ 1.6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีน PvMsp-1 บริเวณ block 6 จากตัวอย่างเชื้อ <i>Plasmodium vivax</i> จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ	28
ตารางที่ 1.7 แสดงผลการตรวจสอบ allele ในส่วนของยีน PvMsp-1 บริเวณ block 6 จากตัวอย่างเชื้อ <i>Plasmodium vivax</i> จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ	29
<b>โครงการวิจัยที่ 2</b>	
ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบการตอบสนองของ <i>Plasmodium falciparum</i> ต่อยา chloroquine	56
ตารางที่ 2.2 รูปแบบและจำนวนตำแหน่งที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนใน Pfcrt และการกระจายทางภูมิศาสตร์	57
ตารางที่ 2.3 รูปแบบการแทนที่ของกรดอะมิโนในยีน Pfcrt จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium falciparum</i> ในประเทศไทย	58
ตารางที่ 2.4 รูปแบบการแทนที่ของกรดอะมิโนในยีน Pfmdr1 จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium falciparum</i> ในประเทศไทย	59
ตารางที่ 2.5 ความถี่ของการแทนที่ของกรดอะมิโนใน codon ต่าง ๆ ของยีน Pfmdr1 จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium falciparum</i> ในประเทศไทย	60
<b>โครงการวิจัยที่ 3</b>	
ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการศึกษา	73
ตารางที่ 3.2 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PfAMA-1 จาก 242 ตัวอย่างในประเทศไทย	77
ตารางที่ 3.3 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PvAMA-1 จาก 241 ตัวอย่างในประเทศไทย	83
ตารางที่ 3.4 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PvMsp-4 จาก 240 ตัวอย่างในประเทศไทย	90
ตารางที่ 3.5 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PvMsp-5 จาก 240 ตัวอย่างในประเทศไทย	93

## สารบัญรูป

	หน้า
โครงการวิจัยที่ 1	
รูปที่ 1.1 (A) แผนภูมิแสดงโครงสร้างของ small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียบริเวณ สีขาวยคือ conserved block บริเวณสีดำคือ variable block และบริเวณลายทแยงคือ semiconserved block (B) ตำแหน่งของ PCR primers ที่ใช้สำหรับแยกชนิดของเชื้อมาลาเรีย	13
รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของยีน sporozoite threonine asparagine-rich protein ของ <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> แสดงตำแหน่งของ PCR primers บริเวณ conserved 5' และ 3' ของยีนแสดงด้วย พื้นที่สีดำ บริเวณ M region คือพื้นที่สีเทา บริเวณที่สร้างกรดอะมิโน 45 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุด และบริเวณที่สร้างกรดอะมิโน 10 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุดแสดงด้วยลักษณะ diagonal brick และ upward-downward diagonals.	16
รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของยีน merozoite surface protein 1 ของ <i>Plasmodium falciparum</i> แสดง ตำแหน่งของ PCR primers	17
รูปที่ 1.4 แสดงโครงสร้างของยีน merozoite surface protein 1 ของ <i>Plasmodium vivax</i> และตำแหน่ง ของ primers ที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของยีนใน block 6	18
รูปที่ 1.5 แสดงโครงสร้างของยีน small subunit ribosomal RNA ของ <i>Plasmodium</i> spp และตำแหน่ง ของ primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีน	18
รูปที่ 1.6 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> ระยะวงแหวนและระยะ female gametocyte ที่พบจากแผ่นฟิล์มโลหิตบาง	20
รูปที่ 1.7 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> ระยะวงแหวนที่พบจากแผ่นฟิล์มโลหิตหนา	20
รูปที่ 1.8 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Plasmodium vivax</i> ระยะ growing trophozoite ที่พบจากแผ่นฟิล์ม โลหิตบาง	20
รูปที่ 1.9 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Plasmodium vivax</i> ระยะ growing trophozoite ที่พบจากแผ่นฟิล์มหนา	21
รูปที่ 1.10 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Plasmodium malariae</i> ระยะ growing trophozoite ที่พบจากแผ่น ฟิล์มบาง	21
รูปที่ 1.11 แผนภูมิแสดงร้อยละของเชื้อมาลาเรียที่พบในแต่ละภูมิภาคจากการตรวจด้วยวิธี PCR ตัวเลขกำกับด้านบนสำหรับแต่ละแห่งกราฟแสดงร้อยละที่พบ	23
รูปที่ 1.12 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากยีน sporozoite threonine-asparagine- rich protein ของ <i>Plasmodium falciparum</i> ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตาม หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) โดยใช้ $\lambda$ /Hind	24
รูปที่ 1.13 การตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ block 2 ของ PfMsp-1 โดย agarose gel electrophoresis Lanes 1-14 และ 16-17 คือตัวอย่างที่ทดสอบ Lane 15 คือ DNA บอกขนาด	27
รูปที่ 1.14 Agarose gel electrophoresis แสดงการตรวจสอบ allele ใน block 6 ของ PvMsp-1	29

	โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ Salvador 1 และ Belem ดังนี้ (A) 5'-primer Salvador 1 และ 3'-primer Salvador 1, (B) 5'-primer Belem และ 3'-primer Belem, (C) 5'-primer Belem และ 3'-primer Salvador 1 และ (D) 5'-primer Salvador 1 และ 3'-primer Belem	
รูปที่ 1.15	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium malariae</i> จำนวน 5 ตัวอย่างจากภาคเหนือและทางตะวันตกของประเทศไทย	31
รูปที่ 1.16	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium ovale</i> จำนวน 4 ตัวอย่างจากภาคเหนือและทางตะวันตกของประเทศไทย	32
รูปที่ 1.17	แสดง phylogenetic tree สร้างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium malariae</i> และ <i>Plasmodium ovale</i> เปรียบเทียบกับ <i>Plasmodium vivax</i> และ <i>Plasmodium falciparum</i> จากการวิเคราะห์โดยวิธี neighbor-joining จากพื้นฐานของ Kimura-2-parameter model ค่าตัวเลขกำกับกับแขนงคือค่าร้อยละของระดับความเชื่อมั่นประเมินจากวิธี bootstrap ทั้งหมด 1,000 ครั้ง มาตรฐานกำกับด้านล่างคือความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง	33
รูปที่ 1.18	แสดง phylogenetic tree สร้างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium knowlesi</i> เปรียบเทียบกับเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันจากผู้ป่วยใน Sarawak และที่พบในลิง การวิเคราะห์โดยวิธี neighbor-joining จากพื้นฐานของ maximum composite likelihood ค่าตัวเลขกำกับกับแขนงคือค่าร้อยละของระดับความเชื่อมั่นประเมินจากวิธี bootstrap ทั้งหมด 1,000 ครั้ง มาตรฐานกำกับด้านล่างคือความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Plasmodium fragile</i> ใช้เป็นตัวแทนเคียงนอกกลุ่ม	34
รูปที่ 1.19	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mitochondrial cytochrome b ของ <i>Plasmodium knowlesi</i> จากตัวอย่างในการศึกษานี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล	35
<b>โครงการวิจัยที่ 2</b>		
รูปที่ 2.1	แสดงตัวอย่างผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณของยีน Pfcrt โดยวิธี RT-PCR, DNA บอกขนาด คือ $\lambda$ Hind III อยู่ lane ขวาสุด	56
<b>โครงการวิจัยที่ 3</b>		
รูปที่ 3.1	แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากยีน apical membrane antigen 1 ของ <i>Plasmodium falciparum</i> (PfAMA-1) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis DNA บอกขนาด (marker) คือ $\lambda$ Hind	75
รูปที่ 3.2	การกระจายของ haplotype ต่าง ๆ ของยีน PfAMA-1 ของ <i>Plasmodium falciparum</i> จากประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2005 (A), 2006 (B), 2007 (C) และรวมตลอด 3 ปี (D)	77
รูปที่ 3.3	กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PfAMA-1	79



	โดยวิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง	
รูปที่ 3.4	กราฟแสดงค่า $r^2$ ของแต่ละคู่ นิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PfAMA-1 จุดสีเทาคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดที่ดำคือค่าที่ไม่มีนัยสำคัญ	80
รูปที่ 3.5	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ในยีน PfAMA-1 โดยวิธี neighbor-joining ตัวเลขกำกับกับแขนงของ tree แสดงค่าร้อยละระดับความเชื่อมั่นของการแยกแขนง	81
รูปที่ 3.6	แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR จากยีน apical membrane antigen 1 ของ <i>Plasmodium vivax</i> (PvAMA-1) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis DNA บอกขนาด (marker) คือ $\lambda$ /Hind	82
รูปที่ 3.7	การกระจายของ haplotype ต่าง ๆ ของยีน PvAMA-1 ของ <i>Plasmodium vivax</i> จากประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2005 (A), 2006 (B), 2007 (C) และรวมตลอด 3 ปี (D)	85
รูปที่ 3.8	กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PvAMA-1 โดย วิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง	86
รูปที่ 3.9	กราฟแสดงค่า $r^2$ ของแต่ละคู่ นิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PvAMA-1 จุดสีเทาคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดที่ดำคือค่าที่ไม่มีนัยสำคัญ	87
รูปที่ 3.10	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ในยีน PvAMA-1 โดยวิธี neighbor-joining ตัวเลขกำกับกับแขนงของ tree แสดงค่าร้อยละระดับความเชื่อมั่นของการแยกแขนง	88
รูปที่ 3.11	แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR จากยีน merozoite surface protein-4 ของ <i>Plasmodium vivax</i> (PvMsp-4) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis DNA บอกขนาด (marker) คือ $\lambda$ /Hind	89
รูปที่ 3.12	กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PvMsp-4 โดย วิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง	91
รูปที่ 3.13	กราฟแสดงค่า $r^2$ ของแต่ละคู่ นิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PvMsp-4 จุดสีเทาคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดที่ดำคือค่าที่ไม่มีนัยสำคัญ	91
รูปที่ 3.14	กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PvMsp-5 โดย วิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง	95
รูปที่ 3.15	กราฟแสดงค่า $r^2$ ของแต่ละคู่ นิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PvMsp-5 จุดสีเทาคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดที่ดำคือค่าที่ไม่มีนัยสำคัญ	95

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

DNA	=	deoxyribonucleic acid
RNA	=	ribonucleic acid
SSU rRNA	=	small subunit ribosomal RNA
A	=	adenine
T	=	thymine
G	=	guanine
C	=	cytosine
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
PCR	=	polymerase chain reaction
T <sub>m</sub>	=	melting temperature
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
ddH <sub>2</sub> O	=	double distilled water
bp	=	base pair
cm	=	centrimetre
Kb	=	kilobase
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
spp.	=	species
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
UV	=	ultraviolet
°C	=	degree Celsius
%	=	percent
λ	=	lambda
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetate
KCl	=	potassium chloride
MgCl <sub>2</sub>	=	magnesium chloride
PBS	=	phosphate buffer saline
PEG	=	polyethylene glycol

## ภาพรวมแผนงานวิจัย

### พื้นฐานและแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียตามชายแดนของประเทศไทย

#### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมาลาเรีย ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขระดับโลก แม้ว่าประเทศไทยจะมีมาตรการต่างๆ ในการควบคุมโรคอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้อัตราป่วยและอัตราตายจากโรคมาลาเรียลดลงโดยลำดับ แต่เนื่องจากชาวต่างชาติจากประเทศที่มีพรมแดนติดกับประเทศไทยมีการเดินทางไปมาระหว่างพรมแดนหรือการอพยพของแรงงานต่างชาติเข้ามาในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ซึ่งชาวต่างชาติส่วนหนึ่งมีการติดเชื้อมาลาเรียจึงเป็นการเพิ่มอัตราการพบผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรีย และอาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อในประเทศไทย ดังนั้นมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียจึงต้องคำนึงถึงการนำเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ประเทศจากกลุ่มคนซึ่งเชื้อมาลาเรียเหล่านี้อาจเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการตอบสนองต่อยาด้านมาลาเรียแตกต่างไปจากเดิม และอาจก่อปัญหาในด้านการรักษาโรคในระยะยาวต่อไป อย่างไรก็ตามวิธีการวินิจฉัยโรคมาลาเรียจากการตรวจฟิล์มโลหิต แม้จะส่งผลดีต่อการรักษาอย่างทันการตามสถานพยาบาลหรือมาลาเรียคลินิกโดยทั่วไปแล้ว ด้วยข้อจำกัดของวิธีการตรวจดังกล่าว ทำให้การประเมินสถานการณ์ของโรคมาลาเรียที่แท้จริงเป็นไปได้ยาก เนื่องจากผู้ป่วยส่วนหนึ่งมีเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตต่ำกว่าที่สามารถตรวจพบได้จากการตรวจฟิล์มโลหิต ตลอดจนอาจมีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดในผู้ป่วยคนเดียวกันซึ่งมักไม่ได้รับการวินิจฉัย ดังนั้นผู้ติดเชื้อเหล่านี้จึงสามารถแพร่เชื้อต่อไปได้และเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าว อาจได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์ในด้านการตอบสนองต่อยาด้านมาลาเรียโดยไม่จำเป็น อันอาจก่อให้เกิดสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยามากขึ้นในอนาคต

นอกจากปัญหาการอพยพของชาวต่างชาติตามชายแดนของประเทศไทยแล้ว ปัญหาโรคมาลาเรียที่เกิดจากสัตว์ โดยเฉพาะจากลิงซึ่งมีประชากรจำนวนมากตามแนวชายแดนของประเทศไทยและตามแหล่งท่องเที่ยวหลายแห่งยังไม่ได้รับการประเมินโดยใช้วิธีการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ แต่จากรายงานการพบอัตราการติดเชื้อมาลาเรียชนิดที่มีลิงเป็นรังโรคในประชากรจำนวนมากที่อาศัยในหมู่เกาะบอร์เนียวตอนเหนือและการตรวจพบผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับเชืชนิดเดียวกันทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งมีประชากรลิงชนิดเดียวกันอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ย่อมมีโอกาสที่เชื้อมาลาเรียดังกล่าวอาจเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข แต่ไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้อง ดังนั้นการประเมินอัตราการตรวจพบเชื้อในลิงตามธรรมชาติและตามแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญบางแห่งรวมทั้งการศึกษาขุนพาหะนำโรคมาลาเรียดังกล่าว นอกจากจะเป็นการเฝ้าระวังโรคแล้ว ยังเป็นการสร้างความมั่นใจให้กับนักท่องเที่ยวทั้งชาวไทยและชาวต่างชาติ อันจะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจการท่องเที่ยวของประเทศ

เนื่องจากปัญหาการดื้อยาด้านมาลาเรีย ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาคลอโรควิน (chloroquine) ได้ก่อตัวครั้งแรกในประเทศไทยตามชายแดนไทย-กัมพูชา และได้มีการแพร่กระจายไปท้องถิ่นต่างๆ ทั่วประเทศ ทำให้ยาดังกล่าวไม่มีข้อบ่งชี้ในการรักษา

โรคมาลาเรียจากเชื้อชนิดนี้ แม้ว่าการเฝ้าระวังการดื้อยาด้านมาลาเรียสามารถติดตามได้จากผลการรักษา แต่การทดสอบการดื้อยาด้านมาลาเรียในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากผู้ป่วยใน ห้องปฏิบัติการจะให้ผลที่ชัดเจนและถูกต้อง รวมทั้งสามารถทดสอบโดยใช้ยาหลายชนิด จึงนับว่าเป็นการ เฝ้าระวังที่มีความถูกต้องมากกว่า นอกจากนี้การศึกษาวิวัฒนาการของการดื้อยา chloroquine ของ *Plasmodium falciparum* จากตัวอย่างเชื้อที่เก็บรวบรวมมากกว่า 20 ปี จนถึงปัจจุบันที่พบว่าเชื้อมาลาเรีย ชนิดนี้เริ่มตอบสนองต่อยา chloroquine มากขึ้นจากอดีตภายหลังจากการหยุดใช้ยา การเข้าใจวิวัฒนาการ ระดับโมเลกุล (molecular evolution) และการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมประชากร (population genetics) ของ เชื้อมาลาเรียอันเป็นผลจากยา chloroquine จะเป็นต้นแบบและเป็นแนวทางในการวางนโยบายการใช้ยา ด้านเชื้อมาลาเรียในระดับประเทศ เพื่อให้เกิดภาวะการชะลอตัวของการดื้อยาด้านมาลาเรียต่อไปในอนาคต เพื่อการควบคุมโรคที่ยั่งยืนต่อไป

## 2. เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย

### 2.1 ยุทธศาสตร์การเสริมสร้างการพัฒนาที่ยั่งยืนของประเทศ

#### ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

การศึกษาในระดับบูรณาการเพื่อควบคุมโรคมาลาเรียซึ่งครอบคลุมตั้งแต่ประชากรในเขตปრაกฏ โรค ยุงที่เป็นพาหะนำโรค เชื้อมาลาเรียตลอดจนถึงที่อาจเป็นแหล่งรังโรคสำหรับเชื้อมาลาเรีย โดย ผสมผสานวิธีการทางชีววิทยา อนุชีววิทยา และศาสตร์เกี่ยวกับวิวัฒนาการ นับเป็นการเชื่อมโยงองค์ ความรู้ด้านต่าง ๆ เข้าด้วยกันเพื่อวางมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียตามชายแดนของประเทศ เนื่องจากการวิจัยนี้ เป็นลักษณะของแผนงานวิจัยที่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญหลายสาขาวิชา รวมทั้งจะมีการ ฝึกอบรมนักวิจัยรุ่นใหม่ ซึ่งครอบคลุมถึงนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ดังนั้นผลสำเร็จของแผนงานวิจัย นอกจากจะเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถเป็นจุดเชื่อมโยงเกี่ยวกับการแก้ปัญหา มาลาเรีย ระดับประเทศแล้วยังเป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญของชาติในอนาคต

### 2.2 ยุทธศาสตร์การพัฒนาทุนทางสังคม แก้ไขปัญหาความยากจนและยกระดับคุณภาพชีวิต

#### ด้านการสาธารณสุขและการประกันสุขภาพ

แม้ว่ารัฐบาลจะมีหน่วยงานที่เกี่ยวกับการควบคุมโรคติดต่อตามชายแดนโดยเฉพาะโรคมาลาเรีย แต่ มาตรการการควบคุมโรคถูกจำกัดด้วยข้อมูลทางระบาดวิทยาที่มีความคลาดเคลื่อน ซึ่งเทคโนโลยี ทางด้านอนุชีววิทยาจะให้ความแม่นยำสูงกว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยจากฟิล์มโลหิต นอกจากนี้การเฝ้าระวัง และติดตามประชากรของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยารูปแบบต่าง ๆ ย่อมมีความสำคัญต่อการวางนโยบาย ระดับชาติในการเลือกใช้ยาควบคุมโรค รวมทั้งการวางแผนระยะยาวเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการดื้อยาด้าน เชื้อมาลาเรีย ถ้าประชากรของประเทศมีสุขภาพดีย่อมเป็นกำลังสำคัญในการยกระดับเศรษฐกิจของ ประเทศ

### 2.3 ยุทธศาสตร์เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศ

## ด้านการเป็นศูนย์กลางการท่องเที่ยวในภูมิภาคที่ยั่งยืน

การที่รัฐบาลให้ความสำคัญกับการส่งเสริมการท่องเที่ยวรวมทั้งการฟื้นฟูและพัฒนาแหล่งท่องเที่ยวตลอดจนปรับปรุงคุณภาพและมาตรฐานการบริการนั้น สำหรับแหล่งท่องเที่ยวตามธรรมชาติรวมทั้งระบบนิเวศในประเทศไทย นับเป็นส่วนที่สำคัญในการสร้างรายได้ให้กับประเทศ แต่เนื่องจากบริเวณพรมแดนระหว่างประเทศเป็นเขตปรากฏโรคมาลาเรีย รวมทั้งสิ่งที่ย้ายอยู่ตามป่าอาจเป็นแหล่งรังโรคสำหรับเชื้อมาลาเรียบางชนิดที่สามารถติดต่อสู่คนได้ นอกจากนี้ การมีรายงานว่าชาวต่างชาติที่เดินทางเข้ามาท่องเที่ยวในประเทศไทยรวมทั้งนักท่องเที่ยวชาวไทยมีการติดเชื้อมาลาเรียจากกิจกรรมการท่องเที่ยว ย่อมส่งผลกระทบต่อในเชิงลบต่อนโยบายการส่งเสริมการท่องเที่ยวของรัฐบาล ดังนั้นการทราบสถานการณ์ของโรคมาลาเรียในคนและสัตว์รวมทั้งความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากการประเมินความชุกของยุงพาหะนำโรค จะเป็นพื้นฐานในการวางมาตรการควบคุมและเฝ้าระวังโรค เพื่อไม่ให้เกิดปัญหากระทบกับเศรษฐกิจการท่องเที่ยวของประเทศ

### **2.4 ยุทธศาสตร์ความมั่นคงของชาติ การต่างประเทศ และการอำนวยความสะดวก**

#### ด้านความมั่นคง

แม้ว่าการศึกษาวินิจฉัยเกี่ยวกับการควบคุมโรคติดต่อตามชายแดนระหว่างประเทศอาจดูเหมือนไม่เกี่ยวข้องกับระบบความมั่นคงของประเทศ แต่เนื่องจากประชากรที่อยู่ตามชายแดนของประเทศมักประกอบด้วยชาวไทยและชาวต่างชาติที่เดินทางข้ามแดนเพื่อการค้าและเศรษฐกิจของชุมชน ซึ่งบริเวณดังกล่าวมักเป็นเขตปรากฏโรคมาลาเรีย ดังนั้นถ้ามีปัญหารุนแรงเกี่ยวกับการระบาดของโรคติดต่อที่เชื้อมาลาเรียอยู่ในสภาวะที่ควบคุมได้ยาก ย่อมส่งผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขระหว่างประเทศอันอาจก่อให้เกิดความขัดแย้งการกีดกันด้วยเหตุผลของโรคติดต่อ ตลอดจนชาวไทยที่อาศัยอยู่บริเวณดังกล่าวอาจขาดความเชื่อมั่นในการได้รับความคุ้มครองหรือเอาใจใส่โดยรัฐบาล ดังนั้นการวิจัยในบริบทที่เกี่ยวกับโรคติดต่อที่อยู่ตามชายแดนของประเทศเพื่อวางมาตรการควบคุมโรคย่อมส่งผลสนับสนุนความมั่นคงของชาติ และอาจป้องกันความขัดแย้งมิติใหม่ที่อาจเกิดขึ้น

สำหรับโครงการย่อยในแผนงานวิจัยพื้นฐานและแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียตามชายแดนของประเทศไทยมีดังนี้

โครงการที่ 1 การวิเคราะห์เชื้อมาลาเรียชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในมนุษย์ในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศไทยโดยติดตามระยะยาว  
(Longitudinal analysis of human malaria and primate malaria in humans along international borders of Thailand)

โครงการที่ 2 วิวัฒนาการของการดื้อยาคลอโรควินของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมในประเทศไทย: พื้นฐานสำหรับชะลอการดื้อยาด้านมาลาเรีย  
Evolution of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: a basis for decelerating anti-malarial drug resistance

โครงการที่ 3 การวิเคราะห์พันธุกรรมประชากรและวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียชนิด พัลซิพารัม และไวแวกซ์ในประเทศไทยเพื่อเป็นพื้นฐานในการควบคุมโรคมาลาเรีย  
Analysis of population genetics and molecular evolution of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in Thailand: a basis for malaria control

### 3. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

#### วัตถุประสงค์หลัก

1. สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศ โดยครอบคลุมถึงสภาวะที่ไม่สามารถตรวจพบจาฟิล์มโลหิต และการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียจากลิงที่อาจพบได้มนุษย์
2. ศึกษาระบาดวิทยาของภาวะการดื้อยาด้านมาลาเรียชนิดต่าง ของเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัม ตามบริเวณชายแดนของประเทศ โดยการทดสอบในห้องปฏิบัติการ
3. ประเมินสภาวะแนวโน้มนำการเปลี่ยนแปลงระยะยาวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลอโรควินของเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัม โดยศึกษาปัจจัยทางวิวัฒนาการที่มีผลต่อการผ่าเหล่าของยีนตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมประชากรของเชื้อมาลาเรียดังกล่าว
4. ศึกษาวิวัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงประชากรของ *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของ genes สำหรับ PfAMA-1 ของ *P. falciparum* และ genes สำหรับ PvMsp4-5 และ PvAMA 1 ของ *P. vivax* จากตัวอย่างที่ได้จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ที่เก็บรวบรวมในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

#### วัตถุประสงค์จำเพาะ

1. วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียในลิงชนิดที่สามารถติดต่อสู่มนุษย์โดยวิธีการทางอณูชีววิทยา เพื่อประเมินสภาวะการเป็นรังโรคในการถ่ายทอดเชื้อมาลาเรียสู่มนุษย์
2. ศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศไทย ชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในมนุษย์ในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศ โดยวิธี PCR และเปรียบเทียบกับผลการตรวจทางสัณฐานวิทยาจากฟิล์มโลหิต
3. ประเมินภาวะการพบเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด โดยวิธี PCR และเปรียบเทียบผลการตรวจจากหน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง หรือจากสถานพยาบาลตามท้องที่ต่าง ๆ บริเวณชายแดนประเทศไทย
4. วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสำหรับ Pfcrt และ Pfmdr1 ซึ่งควบคุมการตอบสนองต่อยาคลอโรควินของ *P. falciparum* จากตัวอย่างเชื้อที่เก็บในอดีตตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 จนถึงปัจจุบัน
5. ศึกษาวิวัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงประชากรของ *P. falciparum* จากการตรวจสอบยีนที่ควบคุมการดื้อยา เพื่อให้ทราบว่าการตอบสนองของยาคลอโรควินที่ดีขึ้นภายหลังจากหยุด

ใช้ยาไประยะหนึ่งนั้นเกิดจากการผ่าเหล่ากลับ (back mutation) ของสายพันธุ์ที่ดื้อยาหรือเกิดจากการเพิ่มปริมาณของประชากรเชื้อมาลาเรียที่ตอบสนองต่อยาคลอโรควิน ซึ่งปะปนกับสายพันธุ์ที่ดื้อยาในธรรมชาติ

6. วิเคราะห์ลำดับเบสของ genes สำหรับ PfAMA-1 ของ *P. falciparum* และ genes สำหรับ PvMsp4-5 และ PvAMA 1 ของ *P. vivax* จากตัวอย่างที่ได้จากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย ที่เก็บรวบรวมในระยะเวลาต่าง ๆ กัน
7. ศึกษาวิวัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงประชากรของ *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยอาศัยความหลากหลายของ genes ในข้อ 7 เป็นตัวติดตาม

## โครงการวิจัยที่ 1

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การวิเคราะห์เชื้อมาลาเรียชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิง  
ที่พบในมนุษย์ในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศไทยโดยติดตามระยะยาว  
(ภาษาอังกฤษ) Longitudinal analysis of human malaria and primate malaria in humans  
along international borders of Thailand

### บทนำ

แม้ว่าในปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยจากโรคมาลาเรียและอัตราการตายจากโรคดังกล่าวได้ลดลงจากอดีตอย่างมากจากรายงานประจำปีของสำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค พบอัตราการติดเชื้อในผู้ป่วยทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2541 คือ 192,042 คน เป็นชาวไทย 125,013 คน ชาวต่างชาติ 67,029 คน ส่วนในปี พ.ศ. 2546 พบผู้ป่วยรวมทั่วประเทศจำนวน 62,526 คน ซึ่งเป็นผู้ป่วยต่างชาติ 33,983 คน ทั้งนี้ในแต่ละปีมีผู้ป่วยราวร้อยละ 35-45 เป็นชาวต่างชาติที่มีภูมิลำเนาในประเทศใกล้เคียงเดินทางมาประกอบอาชีพ หรืออพยพเข้ามาตามชายแดนของประเทศไทยทำให้เกิดปัญหาการนำเชื้อมาลาเรียเข้ามาในประเทศไทยจากการย้ายถิ่นฐานของชาวต่างชาติดังกล่าว ย่อมส่งผลกระทบต่อระบบการควบคุมโรคมาลาเรียโดยรวมอย่างชัดเจน (กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข: <http://www.thaivbd.org>)

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนมี 4 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* โดยในประเทศไทยสามารถพบได้ทุกชนิด โดยพบ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* รวมกันประมาณร้อยละ 99 จากการตรวจฟิล์มเลือดชนิดหนา โดยหน่วยงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในขณะที่เชื้อมาลาเรียอีก 2 ชนิดดังกล่าวพบได้น้อยมาก นอกจากนี้ภาวะที่มีการติดเชื้อมาลาเรียร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด พบได้ไม่เกินร้อยละ 1 อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยเกี่ยวกับความไว และความจำเพาะของการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene ในผู้ป่วยที่มีไข้และมารับการตรวจเลือดเพื่อหาเชื้อมาลาเรีย พบว่าวิธีการตรวจด้วย PCR มีความไวสูงกว่าการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตชนิดบางประมาณร้อยละ 38 และมีความไวสูงกว่าการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาประมาณร้อยละ 22 นอกจากนี้วิธี PCR สามารถตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด มากกว่าการตรวจจากแผ่นฟิล์มโลหิตอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการศึกษาอื่น (Coatney 1971; Mayxay et al 2004; Snounou & White 2004) ดังนั้นการประเมินสถานการณ์ของโรคมาลาเรียที่ถูกต้องย่อมมีข้อจำกัดถ้าอาศัยข้อมูลจากการตรวจแผ่นฟิล์มโลหิตซึ่งยังอาจให้ผลแตกต่างกันจากประสบการณ์ของผู้ตรวจวินิจฉัย แม้ว่าจะพบการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อมาลาเรียต่าง species กันในประเทศไทย

ลักษณะสำคัญประการหนึ่งของเชื้อมาลาเรีย คือ การพบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายใน species เดียวกัน ทั้งนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่เชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งเกิดขึ้นในยุงกันปล่องที่เป็นพาหะนำโรค ดังนั้นในการติดเชื้อชนิดหนึ่ง ๆ อาจประกอบด้วยสายพันธุ์จำนวนมากที่มีลักษณะทาง



พันธุกรรมและคุณลักษณะอื่น ๆ ที่แตกต่างกัน เช่น การดื้อยาต้านมาลาเรีย เป็นต้น เนื่องจากในประเทศไทยได้ประสบปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียอย่างมาก ดังนั้นการทราบขอบเขตความซับซ้อนของสายพันธุ์ ตลอดจนรูปแบบของสายพันธุ์ ที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่างจากผู้ป่วยในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* ซึ่งพบได้บ่อยในทุกภูมิภาคของประเทศ นอกจากนี้การทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาเกี่ยวกับการกระจายของสายพันธุ์ ในเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวัง การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจากอิทธิพลต่าง ๆ เช่น การย้ายถิ่น หรือผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ ต่อการแพร่กระจายของโรค ตลอดจนการวางมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียตามชายแดนของประเทศ

นอกจากปัญหาการนำเชื้อมาลาเรียเข้ามาในประเทศไทยจากการย้ายถิ่นฐานของชาวต่างชาติดังกล่าวแล้ว บริเวณพรมแดนระหว่างประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างไทยและพม่ามีสภาพทางภูมิศาสตร์ที่เอื้ออำนวยต่อการเพาะพันธุ์ยุงกันปล่องที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรีย และระบบนิเวศดังกล่าวยังเป็นแหล่งอาศัยของสัตว์ป่าหลายชนิดรวมทั้งลิงต่าง ๆ ด้วย เนื่องจากลิงบางชนิด เช่น ลิงแสม ลิงกัง และลิงวอกมีจำนวนประชากรมากในประเทศไทย แม้ว่าโดยธรรมชาติแล้วลิงเหล่านี้จะอาศัยในป่า แต่พบว่าประชากรลิงจำนวนมากมักชอบอาศัยตามชายป่าใกล้ที่อยู่อาศัยของมนุษย์ ซึ่งลิงมีโอกาสดำรงแหล่งอาหารมากกว่า อย่างไรก็ตาม ลิงเหล่านี้สามารถติดเชื้อมาลาเรียได้หลายชนิด และบางชนิดสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ ดังเช่นการตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ขณะเข้าพักในเขตชายแดนทางตอนใต้ของประเทศไทยติดกับพรมแดนไทยและพม่า (Jongwutiwes et al 2004) แม้ว่าจำนวนผู้ป่วยที่พบมีจำนวนไม่มากทั้งนี้ เนื่องจากข้อจำกัดด้านการวินิจฉัย เชื้อมาลาเรียที่พบในลิงหลายชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากการตรวจฟิล์มโลหิตคล้ายกับเชื้อมาลาเรียที่พบ ในมนุษย์ ดังนั้นการศึกษาทางระบาดวิทยาเพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในคนโดยใช้ genetic marker หลายตัวย่อมเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการเข้าใจกระบวนการเกิดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (emerging infectious diseases) โดยเฉพาะเชื้อมาลาเรียจากลิงที่อาจพบได้ในคนไทยแต่ไม่สามารถวินิจฉัยได้จากการตรวจทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากยุงที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium knowlesi* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับยุงชนิดที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียในมนุษย์และบางชนิด สามารถนำเชื้อมาลาเรียได้ทั้งชนิดที่พบในลิงและมนุษย์ การละเลยหรือการไม่ทราบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ มาลาเรียเหล่านี้ อาจเป็นสาเหตุให้เชื้อมาลาเรียที่พบในลิงปรับตัวเข้ากับมนุษย์โดยปราศจากการควบคุมแหล่ง รั้งโรคที่ถูกต้อง ตั้งแต่การติดเชื้อข้ามโฮสต์ในระยะแรก ๆ ดังนั้นข้อมูลทางระบาดวิทยาที่มีพื้นฐานที่ถูกต้อง ย่อมเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดประการหนึ่ง ในการควบคุมโรคมาลาเรียอย่างครบวงจรเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

ประสิทธิภาพของการควบคุมโรคมาลาเรียย่อมขึ้นอยู่กับความถูกต้องของข้อมูลด้านระบาดวิทยาของการติดเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุบัติการณ์ของโรคตามชนิดของเชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุ เพื่อให้สามารถวางมาตรการและแนวทางในการควบคุมโรคได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีการตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกัน แม้ว่าการควบคุมโรคมาลาเรียโดยการก่อตั้งมาลาเรียคลินิกครอบคลุมพื้นที่ปรากฏโรคกระจายทั่ว ประเทศ เพื่อให้การวินิจฉัยและการรักษาสามารถกระทำได้รวดเร็ว ส่งผลให้การแพร่กระจายของโรค และ จำนวนผู้ป่วยชาวไทยลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามการอพยพของประชาชนจากประเทศข้างเคียงที่มีพรมแดนติดกับประเทศไทยเพื่อเข้ามาประกอบอาชีพเป็นจำนวนมากย่อมส่งผลกระทบต่อระบบการควบคุมโรคมาลาเรียโดยรวมอย่างชัดเจน

เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุงกันปล่อง ดังนั้นในช่วงเวลาดังกล่าว เซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียต่างสายพันธุ์กันจึงมีโอกาสเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมส่งผลให้เชื้อมาลาเรียรุ่นถัดไปมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากเดิม หรือในขณะที่เชื้อมาลาเรียอยู่ภายใต้แรงกดดันจากกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) พันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อมาลาเรียดังกล่าวอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมและสามารถถ่ายทอดคุณลักษณะดังกล่าวไปสู่เชื้อมาลาเรียในรุ่นถัดไป ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นคือการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ ดังนั้นนอกจากการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียแล้ว การตรวจสอบคุณลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียจึงนับว่ามีความสำคัญต่อการวางมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรีย ยีนหลายชนิดที่พบความหลากหลายในธรรมชาติและมีความเหมาะสมในการใช้ตรวจสอบประชากรของเชื้อมาลาเรีย เช่น merozoite surface protein 1 ของ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax*, sporozoite threonine-asparagine-rich protein ของ *Plasmodium falciparum* ซึ่งยังไม่มีการศึกษาขอบเขตความหลากหลายจากตัวอย่างในธรรมชาติมาก่อน เป็นต้น

บนผิวของระยะสปอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด ซึ่งนอกจากจะพบโปรตีน circumsporozoite protein (CSP) (Vanderberg et al 1969) แล้วยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย โปรตีนดังกล่าวเรียกว่า sporozoite threonine-asparagine-rich protein (STARP) (Fidock et al 1994) โปรตีนดังกล่าวพบได้บนผิวของระยะสปอร์โรซอยต์ ระยะที่เชื้อมาลาเรียเริ่มเจริญในเซลล์ตับ และระยะเริ่มต้นก่อนเข้าเม็ดเลือดแดง โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78 กิโลดาลตัน มีขนาดความยาวของยีนประมาณ 2.7 กิโลเบส โดยมีโครงสร้างประกอบด้วยบริเวณ exon 2 แห่งและมีบริเวณ intron คั่นกลางขนาด 175 bp ที่มี consensus splice donor/acceptor sites ทางด้าน 5' และ 3' มีส่วนที่เป็น non-repetitive region และในส่วนกลาง มีส่วน repetitive region ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ mosaic (M) region, Rp45 region เป็นบริเวณที่มี repeat ที่มีกรดอะมิโนซ้ำกันชุดละ 45 ตัว มีทั้งหมด 2 ชุด และ Rp10 region ประกอบด้วย repeat ที่มีกรดอะมิโน 10 ตัว เรียงซ้ำกันประมาณ 26 ชุด

ลำดับเบสของยีน STARP ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด asparagine ร้อยละ 25.2 และ threonine ร้อยละ 19.3 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในการถอดรหัสยีน STARP เนื่องจากส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนดังกล่าวทำให้โปรตีนนี้มีจำนวนของ N-linked glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) site ปริมาณสูงมากถึง 38 พันธะ จากทั้งหมด ลำดับของกรดอะมิโนจากปลาย N-terminus จะมีส่วนไร้ประจุและ hydrophobic ซึ่งส่วนที่มีประจุบวกสั้นๆ อยู่หน้าหน้าและมีส่วนที่มีขั้วและประจุอยู่ตามหลัง ส่วนต่างๆดังกล่าวนี้ได้แสดงบทบาทเป็น signal sequence peptide และยังมีส่วนที่เป็น hydrophobic อีกส่วนอยู่ที่ปลาย C-terminus ซึ่งเป็นส่วนไร้ประจุและ hydrophobic สั้นๆ 2 ส่วน บริเวณ Rp45 region และ Rp10 region จะมีส่วนเหลื่อมล้ำกันอยู่ ซึ่งบริเวณ Rp45 region นั้นส่วนซ้ำทั้งสองจะถูกรักษาสภาพไว้อย่างสมบูรณ์ในระดับกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ ในทางตรงกันข้ามส่วนซ้ำ (repeats) ใน Rp10 region นั้นจะมีความยาวแตกต่างกัน อีกทั้งมีการแทนที่และขาดหายอย่างมี ลำดับของกรดอะมิโน โดยมี 24 - 26 repeat แม้ว่าจะมีการแทนที่หรือการขาดหายไปของกรดอะมิโนใน repeats เหล่านี้ แต่ส่วนใหญ่บริเวณ Rp10 repeats นั้นก็ยังคงโครงสร้าง  $\beta$ -turn structure ซึ่งเป็นตัวบอกถึงข้อจำกัดทางโครงสร้างมากกว่าที่เป็นโครงสร้างชั้นปฐมภูมิ

สำหรับระยะเมอริโซยต์ (merozoite) ของเชื้อมาลาเรียเป็นระยะที่ต้องลูกกลมเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ ดังนั้นจึงเป็นระยะที่ใช้เวลาช่วงหนึ่งเป็นอิสระในกระแสโลหิต ในช่วงเวลาสั้นๆ นี้เมอริโซยต์จึงเป็นเป้าหมายอันสำคัญระยะหนึ่งในการถูกรบกวนหรือทำลายโดยแอนติบอดีจากผู้ติดเชื้อ (Miller & Hoffman 1998) โปรตีนที่พบมากที่สุดบนผิวเมอริโซยต์เป็น glycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเรียกว่าโปรตีนบนผิวเมอริโซยต์ชนิดที่ 1 (merozoite surface protein-1, Msp-1) ซึ่งบทบาทของโปรตีนนี้ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางใน *Plasmodium falciparum* ซึ่งเรียกว่า PfMsp-1 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อประมาณ 185 ถึง 200 kDa (Holder 1988) ทั้งนี้ยังพบว่า PfMsp-1 มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูง (antigenic polymorphism) ในประชากรเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ (McBride et al 1985) อย่างไรก็ตามความหลากหลายดังกล่าวมีพื้นฐานจากยีนที่มีลักษณะเป็น allelic dimorphism จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PfMsp-1* ทำให้ทราบโครงสร้างพื้นฐานของยีน ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่มีความหลากหลายของเบสระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อสูง (variable block) บริเวณที่มีความหลากหลายปานกลาง (semi-conserved block) และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูง (conserved block) โดย variable block และ semi-conserved block มีลำดับเบสพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ (Tanabe et al 1987) ยกเว้น block 2 ซึ่งประกอบด้วย tripeptide repeats โดยมีลำดับเบสพื้นฐาน 3 รูปแบบในประชากร *Plasmodium falciparum* (Jongwutiwes et al 1992) การเกิดความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนของ PfMsp-1 เนื่องจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม (recombination) ระหว่าง *PfMsp-1* ที่มี allele ต่างกัน ในขณะที่เชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในยุงกันปล่อง (Kerr et al 1993) ทั้งนี้กลไกดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ประชากรของ *Plasmodium falciparum* ในธรรมชาติโดยอาศัยการวิเคราะห์ตามหลักการทางพันธุกรรมประชากร (Conway et al 1999) อย่างไรก็ตามอัตราการเกิด recombination อาจแตกต่างกันไปตามภูมิภาคของโลกขึ้นกับความชุกของโรคและลักษณะทางภูมิศาสตร์ของเขตปรากฏโรค (Anderson et al 2000)

PfMsp-1 เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ระยะไซซอนต์ (schizont) ในรูปของ precursor protein หลังจากนั้นเมื่อเชื้อเจริญมากขึ้นจะมีการย่อยโปรตีนดังกล่าวให้มีขนาดเล็กลงโดยกระบวนการ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรก (primary processing) จะให้โปรตีนมีขนาด 83 kDa, 30 kDa, 38 kDa และ 42 kDa สำหรับขั้นตอนที่สอง (secondary processing) ชิ้นส่วนขนาด 42 kDa จะถูกย่อยเป็น 2 ส่วนคือมีขนาด 33 kDa ซึ่งจะถูกปลดปล่อยไปตามกระแสโลหิต และขนาด 19 kDa จะถูกนำเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ (Holder 1988; Blackman et al 1993) พร้อมกับเมอริโซยต์จนเจริญเป็นระยะวงแหวน (ring stage) ชิ้นส่วนของโปรตีนซึ่งมีขนาด 19 kDa นี้เรียกว่า PfMsp-1<sub>19</sub> ประกอบด้วย epidermal growth factor (EGF)-like domain จำนวน 2 domains ซึ่งจากข้อมูลในห้องปฏิบัติการ (Blackman et al 1990) และการศึกษาในเชิงระบาดวิทยา (Egan et al 1996) พบว่า PfMsp-1 เป็นเป้าหมายที่เหมาะสมในการเป็นองค์ประกอบหนึ่งของวัคซีนป้องกัน *Plasmodium falciparum* และยังเป็นองค์ประกอบของ DNA vaccine ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างการพัฒนาและประเมินผลอย่างจริงจังในปัจจุบัน (Kumar et al 2002) อย่างไรก็ตามบริเวณอื่น ๆ ของ PfMsp-1 อาจมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพได้ ซึ่งแนวทางการศึกษานอกจากจะใช้วิธีวิเคราะห์บริเวณต่างๆ ของโปรตีนเพื่อหา protective T cell หรือ B cell epitopes แล้ว การวิเคราะห์โดยผสมผสานองค์ความรู้ทางด้านพันธุกรรมประชากร ทางด้านอิมมูโนวิทยาและระบาดวิทยาทำให้ทราบว่าแอนติบอดีต่อบริเวณ block 2 ของ PfMsp-1 มีความสัมพันธ์ผกผันกับปริมาณการตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตจากผู้ป่วยในเขตปรากฏโรคในแอฟริกาซึ่งข้อมูล

ดังกล่าวยังสอดคล้องกับการพบว่าแอนติบอดีต่อ block 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในหลอดทดลองได้และความสามารถในการยับยั้งดังกล่าวยังมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแอนติบอดี (Conway et al 1999)

สำหรับ Msp-1 ของ *Plasmodium vivax* (PvMsp-1) เชื่อว่ามีบทบาทเป็นองค์ประกอบของวัคซีนได้เช่นเดียวกับ PfMsp-1 โดยพบว่าลิงที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่มีองค์ประกอบของ PvMsp-1 เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้ในภายหลัง (Collins et al 1999; Yang et al 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ในธรรมชาติมีการสร้างแอนติบอดีต่อ PvMsp-1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูง (Mertens et al 1993; Levitus et al 1994; Soares et al 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีแอนติบอดีต่อบริเวณที่มีขนาด 42 kDa (PvMsp-1<sub>42</sub>) หรือ 19 kDa ทางด้าน C-terminus ของโปรตีน (PvMsp-1<sub>19</sub>) มีปริมาณการติดเชื้อในกระแสโลหิตน้อยกว่าผู้ที่ไม่ได้มีแอนติบอดีดังกล่าว (Ak et al 1998)

เนื่องจาก PvMsp-1 มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูงเช่นเดียวกับ PfMsp-1 แม้ว่าการศึกษามืออยู่อย่างจำกัดมากกว่า อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PvMsp-1* พบว่ามีความแตกต่างจาก *PfMsp-1* ชัดเจนกล่าวคือ ความหลากหลายในลำดับเบสมีพื้นฐานมาจาก allele มากกว่า 2 แบบในหลายบริเวณทำให้โครงสร้างของยีน *PvMsp-1* มีลักษณะที่ไม่เป็นระเบียบแบบแผนชัดเจน (mosaic organization) อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PvMsp-1* 40 ตัวอย่างจากหลายภูมิภาคของโลกพบว่าสามารถแบ่งยีนเป็น 13 block (Putaporntip et al 2002) ประกอบด้วย conserved block 7 แห่ง และ variable block 6 แห่ง โดยบริเวณ conserved block พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนมากกว่าการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนคงเดิมเล็กน้อย (ประมาณร้อยละ 55) ทั้งนี้การแทนที่ดังกล่าวส่วนใหญ่เป็น dimorphic substitution สำหรับบริเวณ block 13 ซึ่งครอบคลุมบริเวณที่ตรงกับบริเวณที่ประกอบด้วย EGF-like domain เช่นเดียวกับ *PfMsp-1*, เรียกว่า *PvMsp-1*<sub>19</sub> พบว่าบริเวณดังกล่าวมีความคงที่ของลำดับเบสสูงมาก โดยพบการแทนที่ระหว่าง G กับ A เพียงตำแหน่งเดียวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก lysine เป็น glutamic acid ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1709 ของ Salvador I strain (Pasay et al 1995; Soares et al 1999; Putaporntip et al 2000; Putaporntip et al 2002) เมื่อพิจารณาบริเวณ variable block ทั้ง 6 แห่งซึ่งประกอบด้วย block 2, 4, 6, 8 และ 12 นั้น พบว่ามีความหลากหลายของลำดับเบสสูงมาก เช่น block 2 สามารถแบ่งเป็น 3 บริเวณย่อยได้แก่ block 2a ประกอบด้วยลำดับเบสพื้นฐาน (basic type) 4 แบบ และ recombinant type 5 แบบ block 2b ประกอบด้วยลำดับเบสที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด (repeats) พบทั้งหมด 19 แบบ และ block 2c ประกอบด้วย basic type 4 แบบ และ recombinant type 6 แบบ เป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณ variable block 2 ของ *PfMsp-1* เป็นบริเวณเดียวที่มี repeats ชัดเจน แต่สำหรับ *PvMsp-1* พบ repeats ใน block 2, 6 และ 10 ดังนั้นขอบเขตความหลากหลายของ variable block ใน *PvMsp-1* จึงสูงมาก (Putaporntip et al 1997; Putaporntip et al 2000; Putaporntip et al 2002) บริเวณ variable block ของ *PvMsp-1* จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ติดตามหรือใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Plasmodium vivax* ที่ดี

การศึกษานี้เป็นการประเมินขอบเขตความหลากหลายของสายพันธุ์ในแต่ละ species ของเชื้อมาลาเรียตามชายแดนของประเทศไทยโดยใช้วิธี PCR ซึ่งให้ความไวและความแม่นยำในการตรวจสอบสูงกว่าวิธีการตรวจอื่น ๆ การตรวจนั้นนอกจากจะสามารถแยกเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดที่พบในมนุษย์แล้ว ยังสามารถแยกชนิดของมาลาเรียที่มีต้นกำเนิดจากลิงชนิดที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาได้จากตัวอย่างโลหิตผู้ที่มารับการตรวจวินิจฉัย ณ มาลาเรียคลินิก หรือหน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงหรือตามสถานพยาบาลต่าง ๆ ที่

อยู่ในอาณาบริเวณพื้นที่ศึกษา เนื่องจากการระบาดของมาลาเรียในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามฤดูกาล ดังนั้นจะทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างปีละ 2 ครั้งโดยจะดำเนินการติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3 ปี เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลของฤดูกาลต่อการกระจายของเชื้อมาลาเรียได้ชัดเจนขึ้น

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศไทยชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในมนุษย์ในผู้ป่วยตามชายแดนของประเทศโดยวิธี PCR และเปรียบเทียบกับผลการตรวจทางสัณฐานวิทยาจากฟิล์มโลหิต
2. ประเมินภาวะการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด โดยวิธี PCR และเปรียบเทียบผลการตรวจจากหน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง หรือจากสถานพยาบาลตามท้องที่ต่าง ๆ บริเวณชายแดนประเทศไทย
3. วิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียตามชายแดนของประเทศไทย
4. วิเคราะห์คุณลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในผู้ป่วยในประเทศไทย
5. ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรของเชื้อมาลาเรียในแต่ละรอบปีตามชายแดนของประเทศ

## วิธีดำเนินการวิจัย

### ประชากรตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากเขตปรากฏโรคตามชายแดนโดยครอบคลุมพื้นที่ดังต่อไปนี้ (1) ภาคเหนือ (จังหวัดตากหรือแม่ฮ่องสอนหรือเชียงใหม่หรือจังหวัดใกล้เคียง) (2) ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรีหรือจังหวัดใกล้เคียง) (3) ภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรีหรือจังหวัดใกล้เคียง) (4) ภาคใต้ (จังหวัดประจวบคีรีขันธ์หรือจังหวัดใกล้เคียง) โดยในแต่ละปีใช้ตัวอย่างประมาณ 600 ตัวอย่างซึ่งโครงการนี้เป็นโครงการต่อเนื่องดังนั้นในแต่ละปีจะใช้ตัวอย่างประมาณ 200 ตัวอย่าง

### ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้ว หรือจากหลอดเลือดดำที่แขนจากผู้ที่มีไข้และสงสัยจะติดเชื้อมาลาเรียที่เขามารับการรักษา ณ ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง หรือตามสถานพยาบาล ในจังหวัดที่ศึกษา โดยช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างแบ่งเป็น 2 ครั้งในรอบปี โดยเก็บรอบละประมาณ 3 – 4 เดือน กระทำติดต่อกัน 3 ปี

### การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิต

#### การทำแผ่นฟิล์มโลหิตบาง (thin blood film)

- หยดเลือดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาด 1 หยดประมาณ 3  $\mu$ l บริเวณปลายด้านหนึ่งของแผ่นกระจกสไลด์

- ใช้ขอบกระจกสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะหยดเลือดทำมุมประมาณ 45 องศา เลื่อนขอบกระจกสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางปลายโดยเร็วและสม่ำเสมอ เลือดจะแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางบนแผ่นกระจก ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

- นำไปจุ่มใน absolute methanol ครึ่งนาที ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

- นำมาย้อมด้วยสีโดยผสมสี Giemsa เข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 ml กับสารละลาย PBS (pH 7.2) ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วหยดสีลงบนแผ่นฟิล์มโลหิตบนกระจกสไลด์จนทั่วบริเวณที่จะย้อมทิ้งไว้ 10 นาที
- ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บไว้ตรวจหาเชื้อต่อไป

#### การทำแผ่นฟิล์มโลหิตหนา (thick blood film)

- หยดเลือดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาด 1 หยดประมาณ 5-6  $\mu$ l ตรงกลางแผ่นสไลด์
- ใช้มุมของกระจกสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะหยดเลือด แล้ววนให้เลือดเป็นแผ่กระจายออกเป็นวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 cm ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

- นำมาย้อมด้วยสีโดยผสมสียิมซาเข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 ml กับสารละลาย PBS ที่มีค่า pH 7.2 ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วหยดสีลงบนแผ่นฟิล์มโลหิตบนกระจกสไลด์จนทั่วบริเวณที่จะย้อมทิ้งไว้ 10 นาที
- ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บไว้ตรวจหาเชื้อต่อไป

#### การตรวจหาเชื้อภายในได้กล้องจุลทัศน์

- การตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตชนิดบางและชนิดหนาโดยทำการตรวจจาก 200 วงกล้องภายใต้ objective lens กำลังขยาย 100 เท่า สำหรับการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตชนิดบางอาศัยหลักการสังเกตระยะและลักษณะของเชื้อมาลาเรีย การเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน รวมทั้งลักษณะของ hemozoin ส่วนการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตชนิดหนา อาศัยลักษณะของเชื้อมาลาเรียเป็นหลักโดยเทียบกับเม็ดเลือดขาว ซึ่งมักมีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียมากกว่าฟิล์มโลหิตชนิดบาง

#### การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา

- ทำการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาโดยใช้ small subunit ribosomal RNA gene ในการวิเคราะห์ชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนและที่พบในลิง โดยมีขั้นตอนในการทำดังนี้

#### การสกัด DNA

นำตัวอย่างเลือดปริมาณ 200  $\mu$ l ที่ได้มาทำการสกัด DNA โดยใช้ QIAamp DNA mini kit ดังนี้

1. เติมนัฟเฟออร์ ATL ลงไป 180  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down
2. เติมนัฟเฟออร์ K 20  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที นำไป spin down
3. นำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดไป incubate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อให้

เม็ดเลือดแดงถูกย่อยอย่างสมบูรณ์

4. หลังจากนั้นนำไป spin down แล้วเติมนัฟเฟออร์ AL 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที

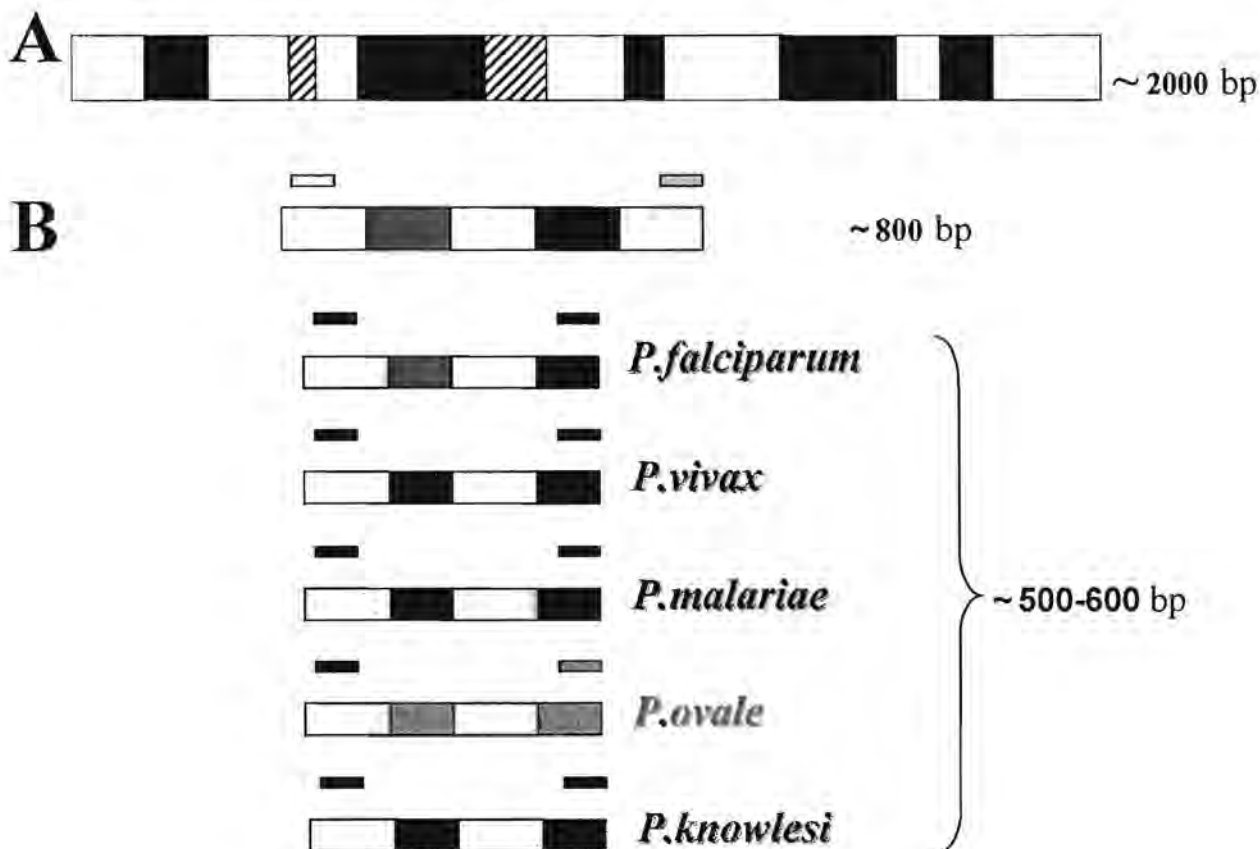
5. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที นำไป spin down

6. เติมนัฟเฟออร์ absolute ethanol 200  $\mu$ l ลงไป และผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไป spin down

7. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp spin column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

8. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด

9. เดิมบัฟเฟอร์ AW1 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิต้อง
10. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
11. เดิมบัฟเฟอร์ AW2 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิต้อง
12. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
13. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิต้อง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ส่วนที่เหลือออกให้หมด
14. นำ QIAamp spin column ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ที่สะอาด
15. เดิมบัฟเฟอร์ AE ลงไป 30  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต้อง 1 นาที
17. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิต้อง
18. คัดเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิต้อง  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR ต่อไป การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR)
- การตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่าง DNA โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ primers ที่มีลำดับเบสจากส่วนของ SSU rRNA gene ที่มีความจำเพาะคือ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi* (รูปที่ 1.1) โดยการทำให้ nested PCR ซึ่งลำดับเบสของ primer แต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 1.1



รูปที่ 1.1 (A) แผนภูมิแสดงโครงสร้างของ small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรีย บริเวณสีขาวยังคงคือ conserved block บริเวณสีดำนาคือ variable block และบริเวณลายทแยงคือ semiconserved block (B) ตำแหน่งของ PCR primers ที่ใช้สำหรับแยกชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ตารางที่ 1.1 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการศึกษารังนี้

primer name	nucleotide sequence (5' -> 3')	parasite targeted	annealing temp (°C)	amplicon length (bp)
<u>primer คู่นอก (outer primers)</u>				
UP18SF1	TGGTTGATCTTGCCAGTAG	<i>Plasmodium</i> spp.	50	1700
P18R1	CGAACGAGATCTTAACCTGCTA			
<u>primers คู่ใน (inner primers)</u>				
P18F1	GTTGCAGTTAAAACGCTCGTAG	<i>Plasmodium falciparum</i>	60	548
PFR	CATCTTTCGAGGTGACTTTTAGATTG			
P18F1	GTTGCAGTTAAAACGCTCGTAG	<i>Plasmodium vivax</i>	60	549
PVR	TTTCTCTCGGAGTTTATTCTTAGATTG			
P18F1	GTTGCAGTTAAAACGCTCGTAG	<i>Plasmodium malariae</i>	60	596
PMR	ATATGAGTGTTTCTTTTAGATAGCTTCC			
P18F1	GTTGCAGTTAAAACGCTCGTAG	<i>Plasmodium ovale</i>	60	567
POR	AAATTTCTTAGATTGCTTCCTTCA			
P18F1	GTTGCAGTTAAAACGCTCGTAG	<i>Plasmodium knowlesi</i>	60	578
PKR	CTTTTCTCTCCGAGATTAGAACTC			

1. PCR ขั้นตอนที่แรก

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียโดยใช้ primer คู่นอก (UP18SF1 และ P18R1) ที่มีความจำเพาะกับ *Plasmodium* ทุกชนิด โดยมีขั้นตอนดังนี้

นำ DNA ที่สกัดไว้เป็น DNA ต้นแบบ (DNA template) องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 15 µl ประกอบด้วย

DNA template	5	µl
forward primer (UP18SF1)	0.2	µM
reverse primer (P18R1)	0.2	µM
10X <i>ExTaq</i> Buffer	1.5	µl
dNTP mixture อย่างละ	2.5	mM
sterilized distilled water	7.03	µl
<i>TaKaRa ExTaq</i> DNA polymerase	0.3	unit/µl

นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR thermal cycler) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ในขั้นตอนแรกต้องทำการแยกสาย DNA (DNA denaturation) ก่อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย

1. การแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที

2. ขั้นตอนที่ primer จับกับ template DNA (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที



3. การสร้างสาย DNA จาก DNA ดั้งเดิม (primer extension) ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 35 รอบ และขั้นตอนการสร้างสาย DNA สมบูรณ์หลังรอบสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

#### การตรวจผลผลิต PCR โดย agarose gel electrophoresis

1. เตรียม agarose ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยชั่ง agarose 1 กรัม ละลายใน TAE บัฟเฟอร์ 100 ml
2. นำไปต้มจนเดือด เขย่าเบา ๆ ให้ agarose เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 ถึง 60°C นำไปเทลงบน gel chamber ที่จัดไว้ แล้วใส่ comb ทิ้งไว้จนแข็งตัว
3. เติม TAE ลงไปบนหน้าเจลพอท่วม เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว เพื่อช่วยให้ดึง comb ออกได้ง่ายขึ้น และเป็นการป้องกันไม่ให้หลุม (well) ในเจลแตก ค่อย ๆ ดึง comb ออกโดยดึงปลายทั้ง 2 ข้างออกพร้อม ๆ กันระวังอย่าให้มีการฉีกขาดของเจลแล้วนำไปใส่ใน electrophoresis chamber ซึ่งมี TAE อยู่ในปริมาณที่ท่วมหน้าเจล
4. นำ PCR product 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl ใช้ไมโครปิเปตต์หยอดแต่ละตัวอย่างลงในหลุมเจลโดยเรียงลำดับและจดบันทึกไว้
5. ใช้ *λ*Hind III และ marker VI เป็น DNA บอกขนาด (marker) สำหรับผลผลิต PCR รอบแรก และรอบที่สอง เพื่อเปรียบเทียบขนาดโดยประมาณของผลผลิต PCR ปิดฝา electrophoresis chamber ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า จัดให้ DNA วิ่งเข้าหาขั้วบวกใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 volts เป็นเวลา 30 นาที
6. นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 µg ต่อ µl เป็นเวลา 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจากแหล่งกำเนิดแสง (UV transilluminator) และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบ DNA ต่อไป โดยการเปรียบเทียบกับ DNA บอกขนาด

#### 2. PCR ขั้นตอนที่สอง

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียที่ได้ทำการออกแบบ primer คู่ในให้มีความจำเพาะกับ *Plasmodium* แต่ละ species ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีขั้นตอนดังนี้

นำผลผลิต PCR จาก PCR ในขั้นตอนแรกมาทำการเจือจางด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ (10 M Tris-HCl, pH 8.0 และ EDTA, pH 8.0) เพื่อเป็น DNA ดั้งเดิม สำหรับ PCR ในขั้นตอนที่สอง โดยมีองค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 10 µl ประกอบด้วย

DNA template	2	µl
forward primer (P18F1)	0.2	µM
reverse primer (species-specific primers)	0.2	µM
10X Ex Taq Buffer	1	µl
dNTP Mixture อย่างละ	2.5	mM
sterilized distilled water	6.02	µl
TaKaRa ExTaq DNA polymerase	0.25	unit/µl

นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ โดยทำให้ DNA แยกสาย (DNA denaturation) ก่อนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 96°C เป็นเวลา 1 นาที และจากนั้นตั้งอุณหภูมิและเวลาตามขั้นตอนดังนี้

1. DNA แยกสาย ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที
2. primer จับกับ template DNA ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 วินาที
3. การสร้างสาย DNA ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 40 วินาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 30 รอบ และขั้นตอนการสร้างสาย DNA สมบูรณ์ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ในขั้นตอนที่ 2 ไปทำการตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดย agarose gel electrophoresis บันทึกภาพถ่าย และนำไปวิเคราะห์ขนาดของแถบ DNA ที่ได้ต่อไป

## การวิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย

### 1. *Plasmodium falciparum*

#### 1.1 *Sporozoite threonine asparagine-rich protein gene*

สำหรับการตรวจสอบ allele โดยอาศัยความหลากหลายของ sporozoite threonine asparagine-rich protein (STARP) gene นั้นเนื่องจากปัจจุบันข้อมูลลำดับเบสในยีนดังกล่าวมีเพียง 2 ตัวอย่าง คือสายพันธุ์ 3D7 และ T9/96 ซึ่งยังไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนในการบอกขอบเขตความหลากหลายในยีนดังกล่าวได้ ดังนั้นในการศึกษาในปีที่ 1 จึงทำการเพิ่มปริมาณ DNA และหาลำดับเบส โดยตรงจากผลิตภัณฑ์ PCR จากยีนดังกล่าว โดยใช้ primer PFSTARPF0: 5'-CATAAGAAAATCTTTATACCACCAG-3' และ PFSTARPRO: 5'-TTAGTACATAAAAACACTACATATAG-3' ซึ่งผลผลิตที่ได้มีความยาวประมาณ 2 กิโลเบส ในการหาลำดับเบสนั้น จะทำการตรวจสอบโดยใช้ primers สำหรับทั้ง sense และ antisense strands ในกรณีที่พบการแทนที่ในตำแหน่งเดียวจากตัวอย่างเดียว จะทำการตรวจสอบความถูกต้องโดยการเพิ่มปริมาณ DNA ใหม่โดยใช้ genomic DNA เดิม สำหรับโครงสร้างของยีน STARP แสดงในรูปที่ 1.2

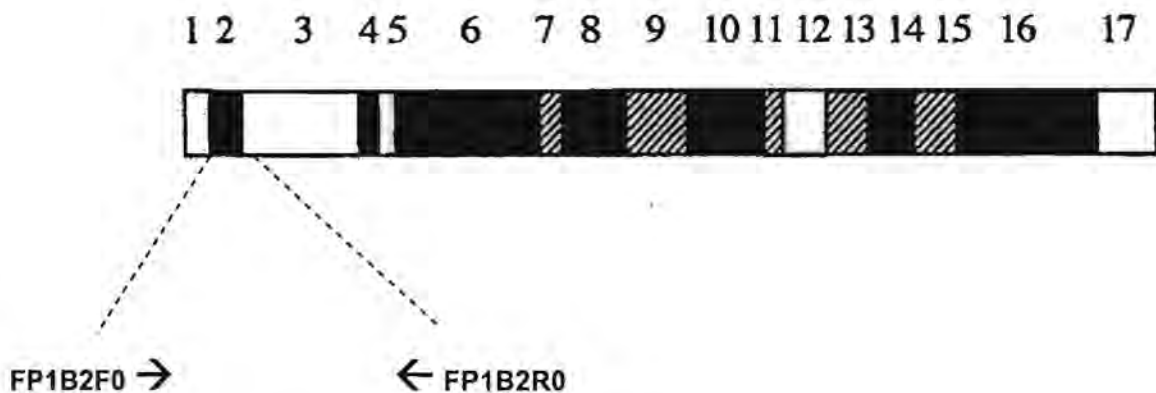


รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของยีน sporozoite threonine asparagine-rich protein ของ *Plasmodium falciparum* แสดงตำแหน่งของ PCR primers บริเวณ conserved 5' และ 3' ของยีนแสดงด้วยพื้นที่สีดำ บริเวณ M region คือพื้นที่สีเทา บริเวณที่สร้างกรดอะมิโน 45 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุดและบริเวณที่สร้างกรดอะมิโน 10 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุดแสดงด้วยลักษณะ diagonal brick และ upward-downward diagonals.

#### 1.2 *Merozoite surface protein 1 gene*

การตรวจสอบ allele ใน block 2 ของยีน merozoite surface protein 1 ของ *Plasmodium falciparum* หรือ PfMSP-1 โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณดังกล่าวโดยวิธี PCR ซึ่งครอบคลุมความยาวประมาณ 300-

600 เบส ขึ้นกับสายพันธุ์ของ สำหรับ primer ใช้ในส่วนที่ครอบคลุมด้าน 3' ของ block 1 โดยมีลำดับเบสดังนี้  
 FP1B2F0: 5'-CTAGAAGCTTTAGAAGATGC-3' ในส่วนของ reverse primer ได้ใช้ลำดับเบสจากส่วน 5' ของ  
 block 3 โดยมีลำดับเบสคือ FP1B2R0: 5'-CCATCAATTAATATTTGAAACC-3' ความยาวผลผลิต PCR ที่ได้  
 จะมีความแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย โครงสร้างของยีนและตำแหน่งของ PCR primers แสดง  
 ในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของยีน merozoite surface protein 1 ของ *Plasmodium falciparum* แสดงตำแหน่ง  
 ของ PCR primers

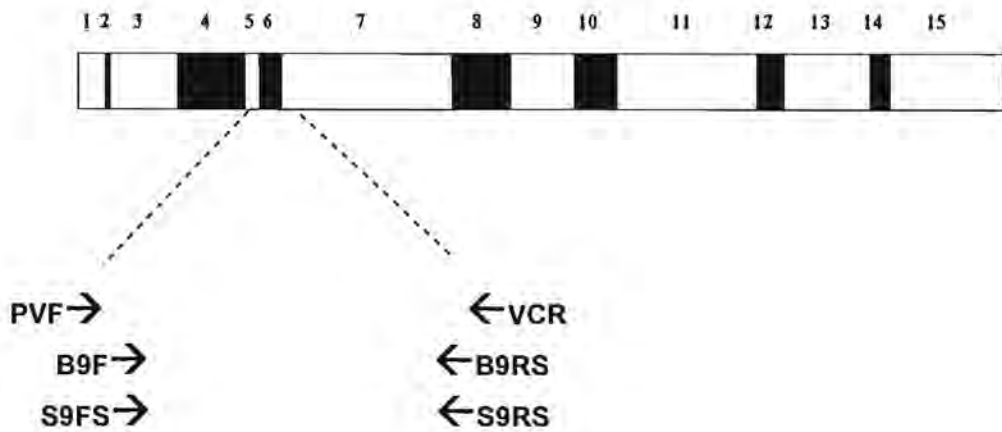
## 2. *Plasmodium vivax*

### 2.2 Merozoite surface protein 1 gene

โครงสร้างของยีนสำหรับ merozoite surface protein 1 ของ *Plasmodium vivax* หรือ PvMsp-1 มีความยาวประมาณ 5 กิโลเบส ประกอบด้วยบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับเบสระหว่างสายพันธุ์สูง (variable block) และบริเวณที่มีความคงที่ระหว่างสายพันธุ์สูง (conserved block) โดยสามารถแบ่งได้เป็น 13 blocks เนื่องจากบริเวณ block 6 ของ PvMsp-1 ซึ่งครอบคลุมความยาวประมาณ 300-500 เบสมีความหลากหลายในลำดับเบสที่สูงกว่าบริเวณอื่น ๆ ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ และบริเวณ 5' และ 3' ของ block ดังกล่าวยังสามารถจำแนกได้เป็น 2 ส่วนย่อย ดังนั้นบริเวณดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวติดตามสำหรับการตรวจสอบ allele โดยใช้วิธี PCR ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น สำหรับ PCR primer คู่แรก คือ PVF: 5'-CCAGTGTTTCGTACATCTTTAAACC-3' และ VCR: 5'-AATTGCACGTGGCGCCGCTGCACTTGCTGC-3' ส่วน PCR primer คู่ใน มี 4 primers ได้แก่

- (1) B9F: 5'-CCAAGCCGGCAGCGTCAGCGCCAGTGACCA-3'
- (2) B9RS: 5'-TGCTGGTGTGGCTGATAC-3'
- (3) S9FS: 5'-AGATATAGTGGCAAAGGGACAA-3'
- (4) S9RS: 5'-TTGTTGAACTTGTGCTGCTTG-3'

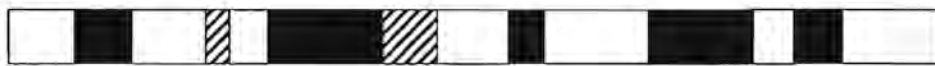
รายละเอียดเกี่ยวกับตำแหน่งของ primers แสดงในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 แสดงโครงสร้างของยีน merozoite surface protein 1 ของ *Plasmodium vivax* และตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของยีนใน block 6

### 3. *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale*

เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของยีนต่างๆ ของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* ยังไม่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางดังนั้นจึงไม่มี genetic marker ที่เหมาะสม ใดๆก็ตามการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสำหรับ small subunit ribosomal RNA หรือ SSU rRNA gene จึงมีประโยชน์ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ สำหรับโครงสร้างของยีนดังกล่าวในเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันจะมีลักษณะที่คล้ายกันดังแสดงในรูปที่ 1.5



Forward →

← Reverse

รูปที่ 1.5 แสดงโครงสร้างของยีน small subunit ribosomal RNA ของ *Plasmodium* spp และตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีน

### 4. *Plasmodium knowlesi*

สำหรับข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียชนิดที่สามารถก่อโรคได้ในคนนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัดเช่นกัน ดังนั้นในทำนองเดียวกับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSU rRNA gene และ mitochondrial DNA ในส่วนของ cytochrome b จึงมีประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวเบื้องต้น

## ผลการวิจัย

### 1. ประชากรตัวอย่าง

ได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดจากพื้นที่ปรากฏโรคมาลาเรียในจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมากตามชายแดนโดยครอบคลุมพื้นที่ภาคเหนือ 730 ตัวอย่าง ภาคตะวันตก 514 ตัวอย่าง ภาคตะวันออก 178 ตัวอย่าง และภาคใต้ 437 ตัวอย่าง รวมจำนวนทั้งสิ้น 1,859 ตัวอย่าง

### 2. ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิต

ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างเลือดที่เก็บจากผู้ป่วย ด้วยกล้องจุลทรรศน์จากการทำแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดหนาและบาง และย้อมฟิล์มเลือดด้วยสี Giemsa เพื่อทำการวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อในแต่ละตัวอย่าง แสดงผลดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิต

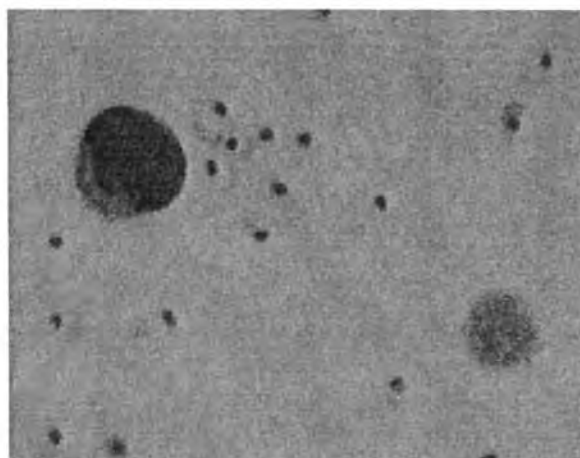
ภาค	จำนวนทั้งหมด (ร้อยละ)	พบเชื้อทั้งหมด (ร้อยละ)	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อมาลาเรียจากกล้องจุลทรรศน์				ไม่พบเชื้อ ทั้งหมด (ร้อยละ)
			<i>P. f</i>	<i>P. v</i>	<i>P. m</i>	<i>P. f + P. v</i>	
เหนือ	730 (39.3)	445 (61.0)	145 (32.6)	293 (65.8)	0 (0.0)	7 (1.6)	285 (39.0)
ตะวันตก	514 (27.6)	118 (23.0)	63 (53.4)	54 (45.8)	1 (0.8)	0 (0.0)	396 (77.0)
ตะวันออก	178 (9.6)	109 (61.2)	32 (29.4)	77 (70.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	69 (38.8)
ใต้	437 (23.5)	236 (54.0)	51 (21.6)	184 (78.0)	1 (0.4)	0 (0.0)	201 (46.0)
รวม	1,859 (100.0)	908 (48.8)	291 (32.0)	608 (67.0)	2 (0.2)	7 (0.8)	951 (51.2)

หมายเหตุ *P. f* = *Plasmodium falciparum*, *P. v* = *Plasmodium vivax*, *P. m* = *Plasmodium malariae*

ตารางที่ 1.2 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียพบว่าจำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจทั้งหมดพบการติดเชื้อมาลาเรีย 908 รายคิดเป็นร้อยละ 48.8 ในจำนวนนี้พบตัวอย่างที่มีการติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียว 901 ราย คิดเป็นร้อยละ 99.2 และพบการติดเชื้อมาร่วมกันระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* เพียง 7 ราย ในภาคเหนือ คิดเป็นร้อยละ 0.8 และพบว่าสัดส่วนของการพบเชื้อ *Plasmodium vivax* สูงกว่า *Plasmodium falciparum* ในทุกภาคโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2 เท่ายกเว้นในภาคตะวันตก ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium malariae* ในผู้ป่วยที่พบจากฟิล์มโลหิตหนาและบาง แสดงดังรูปที่ 1.6 - 1.10



รูปที่ 1.6 แสดงลักษณะของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ระยะวงแหวนและระยะ female gametocyte ที่พบจากแผ่นฟิล์มโลหิตบาง



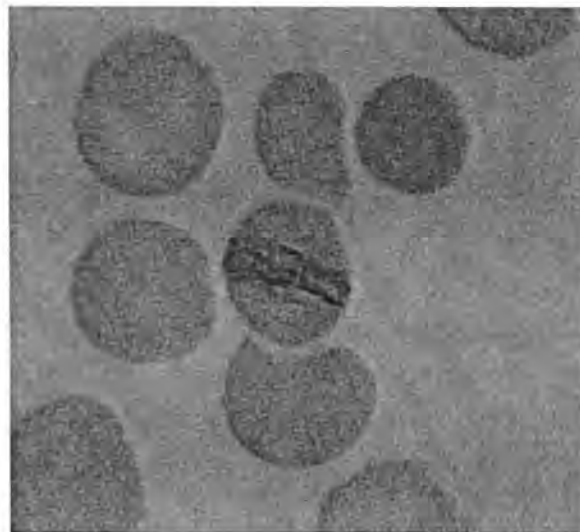
รูปที่ 1.7 แสดงลักษณะของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ระยะวงแหวนที่พบจากแผ่นฟิล์มโลหิตหนา



รูปที่ 1.8 แสดงลักษณะของเชื้อ *Plasmodium vivax* ระยะ growing trophozoite ที่พบจากแผ่นฟิล์มโลหิตบาง



รูปที่ 1.9 แสดงลักษณะของเชื้อ *Plasmodium vivax* ระยะ growing trophozoite ที่พบจากแผ่นฟิล์มหนา



รูปที่ 1.10 แสดงลักษณะของเชื้อ *Plasmodium malariae* ระยะ growing trophozoite ที่พบจากแผ่นฟิล์มบาง

### 3. ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR

ผลการตรวจ DNA ของตัวอย่างเลือดที่เก็บได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยใช้ primers ที่มีลำดับเบสจากส่วนของ SSU rRNA gene ที่จำเพาะกับ *Plasmodium* ทุกชนิดในการทำ PCR รอบแรก ด้วย primer คู่นอก จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำ PCR รอบที่สองโดยใช้ primer คู่ในที่มีความจำเพาะกับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด ลำดับเบสของ primers ที่ใช้ทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 1.1

เมื่อทำการตรวจสอบแถบ DNA ของผลผลิต PCR จากรอบที่สองที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis โดยวัดเทียบกับขนาดของผลผลิตที่ได้กับ DNA มาตรฐาน สามารถแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในผู้ป่วย แสดงผลดังตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR จำแนกตามภูมิภาคและจำนวนเชื้อที่พบ

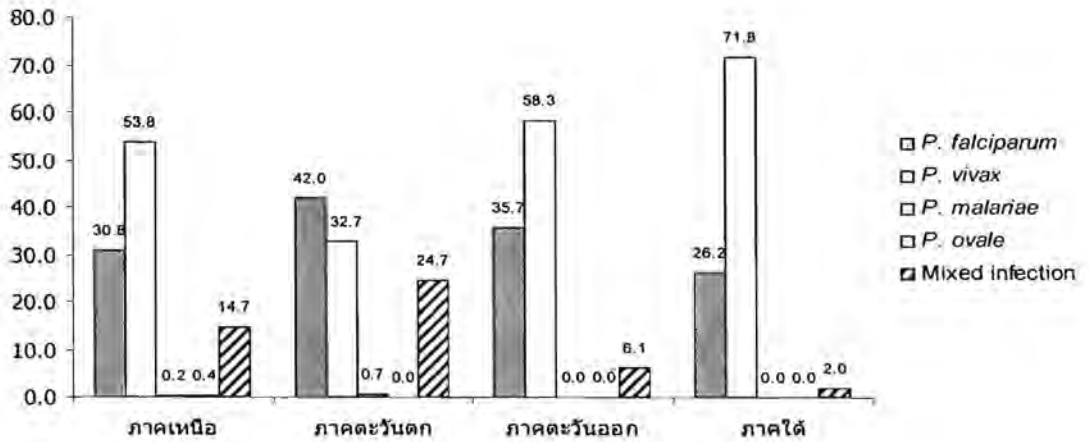
ภาค	จำนวนทั้งหมด (ร้อยละ)	พบเชื้อทั้งหมด (ร้อยละ)	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR (ร้อยละ)											ไม่พบเชื้อ (ร้อยละ)
			<i>P.f</i>	<i>P.v</i>	<i>P.m</i>	<i>P.o</i>	<i>P.k</i>	<i>P.f+</i> <i>P.v</i>	<i>P.f+</i> <i>P.m</i>	<i>P.v+</i> <i>P.m</i>	<i>P.v+</i> <i>P.o</i>	<i>P.m+</i> <i>P.o</i>	<i>P.f+</i> <i>P.v</i> <i>+P.m</i>	
เหนือ	730 (39.3)	496 (67.9)	153 (30.8)	267 (53.8)	1 (0.2)	2 (0.4)	0 (0.0)	71 (14.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.2)	234 (32.1)
ตะวันตก	514 (27.6)	150 (29.2)	63 (42.0)	49 (32.7)	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	32 (21.3)	2 (1.3)	2 (1.3)	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	364 (70.8)
ตะวันออก	178 (9.6)	115 (64.6)	41 (35.7)	67 (58.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (6.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	63 (35.4)
ใต้	437 (23.5)	262 (50.0)	70 (26.7)	185 (70.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.4)	6 (2.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	175 (40.0)
รวม	1,859 (100.0)	1023 (55.0)	327 (32.0)	568 (55.5)	2 (0.2)	2 (0.2)	1 (0.1)	116 (11.3)	2 (0.2)	2 (0.2)	1 (0.1)	1 (0.1)	1 (0.1)	836 (45.0)

หมายเหตุ *P.f* = *Plasmodium falciparum*, *P.v* = *Plasmodium vivax*, *P.m* = *Plasmodium malariae*, *P.o* = *Plasmodium ovale* และ *P.k* = *Plasmodium knowlesi*.

จากตารางที่ 1.3 พบการติดเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างทั้งหมด 1,023 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 1,859 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55.5 พบว่ามีผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวจำนวนทั้งสิ้น 900 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.0 ทั้งนี้การติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ชนิดเดียวพบในผู้ป่วย 327 รายและ *Plasmodium vivax* ชนิดเดียวพบในผู้ป่วย 568 ราย สำหรับการติดเชื้อ 2 ชนิดมี 122 ราย และยังพบการติดเชื้อร่วมกัน 3 ชนิดในผู้ป่วย 1 รายในภาคเหนือ การติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดคิดเป็นร้อยละ 12.0 ของ นอกจากนี้จะเห็นว่าการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดพบได้ในภาคเหนือและตะวันตกมากกว่าภาคตะวันออกและภาคใต้

สำหรับชนิดของเชื้อมาลาเรียที่ทั้งหมดพบการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* จำนวน 446 ราย (ร้อยละ 38.9) *Plasmodium vivax* จำนวน 688 ราย (ร้อยละ 60.0) *Plasmodium malariae* จำนวน 8 ราย (ร้อยละ 0.7) *Plasmodium ovale* จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 0.4) และ *Plasmodium knowlesi* จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.1) ทั้งนี้พบเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium vivax* มากกว่า *Plasmodium falciparum* ในทุกภาค ยกเว้นภาคตะวันตกพบ *Plasmodium falciparum* มากกว่า *Plasmodium vivax* เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 1.11





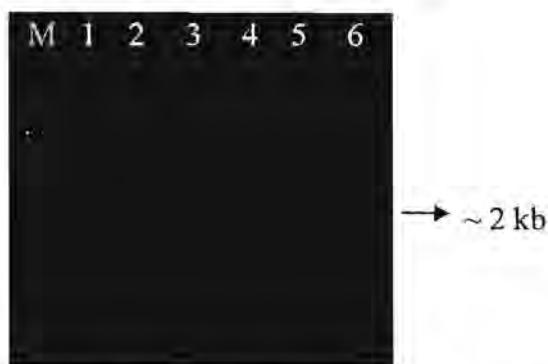
รูปที่ 1.11 แผนภูมิแสดงร้อยละของเชื้อมาลาเรียที่พบในแต่ละภูมิภาคจากการตรวจด้วยวิธี PCR ตัวเลขกำกับด้านบนสำหรับแต่ละแท่งกราฟแสดงร้อยละที่พบ

สำหรับสัดส่วนของการตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* พบว่าในปี ค.ศ. 2005 เชื้อมาลาเรีย *Plasmodium vivax* มีมากกว่า *Plasmodium falciparum* 1.47 เท่า ในปีถัดมาไม่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว โดยพบว่า *Plasmodium vivax* มีมากกว่า 1.48 เท่า สำหรับแนวโน้มในปี ค.ศ. 2007 พบว่า *Plasmodium vivax* มีมากกว่า *Plasmodium falciparum* 1.39 เท่า อย่างไรก็ตาม แนวโน้มดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตลอด 3 ปีที่เก็บรวบรวมตัวอย่างในการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดนั้นแม้ว่าจะมีอุบัติการณ์แตกต่างกันตามภูมิภาคแล้ว แต่โดยรวมในแต่ละปีพบว่ามีร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่มีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันชัดเจนในแต่ละปีที่ศึกษาคือปีละประมาณร้อยละ 11 ถึง 13 ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการกระจายของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยมีแนวโน้มนิ่งที่ในหลายมิติในแต่ละปีที่ศึกษา

#### 4. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

##### 4.1 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน STARP ของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากการใช้ primer คือ STARPF0 และ STARPR0 ซึ่งครอบคลุมยีน STARP จากการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จำนวน 300 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ  $\lambda$ /Hind III พบว่าผลผลิตที่นำมาวิเคราะห์มีขนาดประมาณ 2,000 bp ดังแสดงในรูปที่ 1.12 ซึ่งเป็นขนาดที่อยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษา และตัวอย่างส่วนใหญ่พบทั้งแถบดีเอ็นเอเข็มสามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนและมีบางตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอจาง ทั้งนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับปริมาณของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากบางตัวอย่างมีดีเอ็นเออยู่น้อยเกินไปและเก็บไว้เป็นเวลานานเมื่อนำมาใช้ในการทดลองจึงให้แถบดีเอ็นเอที่จางกว่าตัวอย่างอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ไม่พบแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบในตัวอย่างเดียวกัน



รูปที่ 1.12 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากยีน sporozoite threonine-asparagine-rich protein ของ *Plasmodium falciparum* ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด (marker) โดยใช้  $\lambda/Hind$

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน STARP โดยสุ่มเลือกตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์จำนวน 124 ตัวอย่างพบว่ามีความหลากหลายในจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของยีนแตกต่างกันตามตัวอย่างที่ศึกษาโดยมีขนาด 1847, 1877, 1982 และ 2024 เบส ซึ่งเมื่อพิจารณาในระดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 20 haplotypes

ทั้งนี้เพื่อให้การอ้างอิงเป็นไปในทิศทางเดียวกันตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ในยีน STARP จะยึดหลักจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ T9/96 จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดพบว่าในส่วนของ exon 1 ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 72 ตัว มีการแทนที่ของ codon เพียง 2 ตำแหน่ง ได้แก่ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 13 พบการเปลี่ยนแปลงจาก T เป็น A ทำให้ codon เปลี่ยนจาก phenylalanine เป็น isoleucine และนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 20 พบการเปลี่ยนแปลงจาก G เป็น A ทำให้ codon เปลี่ยนจาก arginine เป็น lysine ในส่วนของ exon 2 ประกอบด้วยบริเวณ M region ซึ่งครอบคลุม 330 นิวคลีโอไทด์นั้น ไม่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ ในทำนองเดียวกันไม่พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Rp45 region ซึ่งเป็นบริเวณที่สร้างกรดอะมิโน 45 ตัว แต่พบว่าบางตัวอย่างมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดที่ซ้ำกันนี้จำนวน 1 ชุด

ในส่วนของบริเวณที่มี codon ซ้ำกันเป็นชุด 10 ตัว หรือ Rp10 region พบความแตกต่างของจำนวนชุดตั้งแต่ 25 ถึง 28 ชุด ทั้งนี้ในแต่ละชุดของ repeats ในบริเวณนี้พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่ง ได้แก่ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 823 พบการเปลี่ยนแปลงจาก C เป็น A ทำให้ codon เปลี่ยนจาก threonine เป็น lysine นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1155 พบการเปลี่ยนแปลงจาก G เป็น A ทำให้ codon เปลี่ยนจาก aspartic acid เป็น asparagines นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1225 พบการเปลี่ยนแปลงจาก A เป็น T ทำให้ codon เปลี่ยนจาก lysine เป็น isoleucine นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1230 พบการเปลี่ยนแปลงจาก A เป็น C ทำให้ codon เปลี่ยนจาก threonine เป็น proline นอกจากนี้ยังพบว่า repeat unit ที่ 15 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ repeat unit ที่ 14 และ 16 ในทำนองเดียวกัน repeat unit ที่ 21 และ 22 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ repeat unit ที่ 18 และ 19 และ repeat unit ที่ 23 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ repeat unit ที่ 24 และ 25

สำหรับบริเวณ intron พบว่ามีความผันแปรในจำนวน AT repeats ดังในตารางที่ 1.4 แสดงความแตกต่างของแต่ละ haplotype ในยีน STARP จะพบว่าจำนวน AT-repeats ใน intron มีจำนวนผันแปรตั้งแต่ 7 repeat units จนถึง 16 repeat units บริเวณ intron ยังเป็นส่วนที่มี adenine และ thymine เป็นองค์ประกอบมากถึงร้อยละ 91 อย่างไรก็ตามนอกจากความผันแปรในจำนวน repeat units แล้ว ไม่พบว่าตัวอย่างใดมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ intron เลย นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบร้อยละของ thymine ในส่วน

ที่เป็น codon ใน repeats ของ Rp45 และ Rp10 เปรียบเทียบกับบริเวณอื่นที่ไม่มี repeats พบว่า codons ใน ส่วนของ repeats มีร้อยละของ thymine มากกว่าบริเวณอื่นที่ไม่มี repeats อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับ การวิเคราะห์ codons ในส่วนของ repeats ในยีนอื่น ๆ (Verra & Hughes, 1999)

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน STARP ของ *Plasmodium falciparum* โดยการคำนวณ nonsynonymous substitutions ต่อ nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions ต่อ synonymous site (dS) พบว่า ค่า dN และ dS ใน exon 1 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ใน exon 2 พบว่า dN มากกว่า dS อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน exon 2 อยู่ภายใต้อิทธิพลของ การคัดเลือกตามธรรมชาติ ซึ่งอาจหมายถึงการมี epitope ที่มีบทบาทต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ในบริเวณดังกล่าว

สำหรับผลการตรวจ allele ของยีน STARP จำนวน 200 ตัวอย่างโดยพิจารณาจากขนาดของยีนพบว่าการใช้ primers ที่เพิ่มปริมาณ DNA ของยีนทั้งหมดไม่สามารถจำแนกขนาดที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้อย่าง ชัดเจน ดังนั้นแม้ว่ายีนนี้จะมีความแตกต่างในบางตำแหน่งในระดับนิวคลีโอไทด์แต่ไม่สามารถใช้เป็นตรวจสอบ allele ของยีนจากการวัดขนาดของผลผลิต PCR

#### 4.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน PfMsp-1 ใน block 2 ของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

จากการเพิ่มปริมาณ DNA ใน block 2 ของยีน PfMsp-1 เพื่อตรวจสอบ allele ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากประชากรตัวอย่างจำนวน 300 ตัวอย่างที่พบการติดเชื้อชนิดนี้เพียงชนิดเดียว พบว่าให้ผลบวก จากการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 279 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 93 โดยตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่มีรูปแบบของยีน PfMsp-1 ในส่วนของ block 2 เพียงรูปแบบเดียวพบจำนวน 204 ตัวอย่างหรือคิด เป็นร้อยละ 73.1 ตัวอย่างที่มีรูปแบบของยีน 2 รูปแบบมีจำนวน 58 ตัวอย่างหรือร้อยละ 20.7 สำหรับตัวอย่างที่มีรูปแบบของยีนมากถึง 3 รูปแบบพบ 17 ตัวอย่างหรือร้อยละ 6.1 ทั้งนี้ในแต่ละท้องถิ่นพบการติดเชื้อปะปนกัน มากกว่า 1 สายพันธุ์แตกต่างกัน โดยพบว่า *Plasmodium falciparum* ในภาคเหนือและตะวันตกมีอัตราการตรวจ พบ allele ใน block 2 ของ PfMSP-1 มากกว่า 1 allele ในตัวอย่างเดียวกันใกล้เคียงกัน ส่วนเชื้อมาลาเรียชนิด ดังกล่าวในภาคใต้พบการติดเชื้อมากกว่า 1 allele ในตัวอย่างเดียวกันน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของ ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดแตกต่างกันขึ้นกับแต่ละตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 11.13 และตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.4 แสดงความแตกต่างของแต่ละ haplotype ในยีน STARP

Haplotype	n	Exon 1		AT-repeats unit in intron	45-repeat unit	Exon 2							
		codon				codon				10-repeat unit			
		5	7			264	374	428	430	#15	#21	#22	#23
1a	5	F	R	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
1b	4	F	R	11	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
1c	1	F	R	13	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
2	27	F	R	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	-----	PDNNNTKTIS
3a	8	F	R	7	1	T	D	K	T	-----	-----	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
3b	1	F	R	8	1	T	D	K	T	-----	-----	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
4	32	F	R	7	1	T	N	K	T	-----	-----	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
5	1	F	R	7	2	T	D	K	T	-----	-----	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
6	1	F	R	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	-----	PDNNNTKTIS
7a	14	F	R	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
7b	2	F	R	10	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
8	14	F	K	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
9	4	F	R	7	1	K	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
10	4	F	K	7	1	K	D	K	T	NNNTDIILTD	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
11	2	F	K	7	2	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
12	2	F	K	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	-----	PDNNNTKTIS
13	2	F	K	7	1	T	D	K	P	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
14	3	F	R	7	1	T	D	I	P	-----	DNNNNNTNTKA	-----	PDNNNTKTIS
15	2	I	R	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
16	1	F	R	13	2	T	D	K	T	NNNTDTISTD	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
17	2	F	K	7	1	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	PDNNNTKTIS
18	2	F	R	7	2	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	TDNNNTKIIS	-----
19	2	F	K	12	2	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	-----	PDNNNTKTIS
20	1	F	R	16	2	T	D	K	T	-----	DNNNNNTNTKA	-----	-----

n = number of isolates in this study including 3 sequences in the GenBank databases under the accession numbers XM001348922 (clone 3D7), Z26314 (clone T9/96) and AF209925 (strain FCC1/HN).

ตารางที่ 1.5 แสดงผลการตรวจสอบ allele ในส่วนของ block 2 ของยีน PfMsp-1

ภาค	จำนวนที่ทดสอบ	จำนวนที่ให้ผลบวก	จำนวนแถบผลผลิต PCR (%)		
			1 แถบ	2 แถบ	3 แถบ
เหนือ	225	185	120 (64.9)	49 (26.5)	16 (8.6)
ตะวันตก	97	80	63 (78.8)	14 (17.5)	3 (3.7)
ตะวันออก	48	33	30 (90.9)	3 (9.1)	0
ใต้	76	64	62 (96.9)	2 (3.1)	0
รวม	446	362	275 (76.0)	68 (18.8)	19 (5.2)



รูปที่ 1.13 การตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ block 2 ของ PfMsp-1 โดย agarose gel electrophoresis Lanes 1-14 และ 16-17 คือตัวอย่างที่ทดสอบ Lane 15 คือ DNA บวกขนาด

## 5. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium vivax*

### 5.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน PvMsp-1 ใน block 6 ของเชื้อ *Plasmodium vivax*

ในส่วนของ block 6 ของ PvMsp-1 เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงโดยลำดับกรดอะมิโนมีความแตกต่างระหว่าง Salvador 1 strain และ Belem strain อย่างมาก นอกจากนี้บริเวณดังกล่าวยังเกิดมีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกันทั้งสอง ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน 5' และ 3' อาจไม่มีความสัมพันธ์ หนึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Belem ทางด้าน 3' ยังมีความแตกต่างกัน 2 แบบคือ Belem แบบ A และ Belem แบบ B

จากการตรวจสอบ allele ของ block 6 ของ PvMsp-1 โดยใช้ตัวอย่าง *Plasmodium vivax* จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศจำนวน 446 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกจากการตรวจดังกล่าวจำนวน 362 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลลบ 84 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างที่มีความหนาแน่นของเชื้อต่ำ เนื่องจากการตรวจหาชนิดของเชื้อ มาลาเรียอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีน small subunit ribosomal RNA ซึ่งเป็นยีนที่มีหลายชุดต่อ

genome ในขณะที่ยีน PvMsp-1 เป็นยีนที่มีเพียง 1 ชุด ดังนั้นความไวในการตรวจหา allele ของ PvMsp-1 จึงต่ำกว่าการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรีย ในการตรวจหา allele PvMsp-1 จากตัวอย่างในภาคเหนือจำนวน 185 ตัวอย่างพบว่า 120 ตัวอย่างให้ผลผลิต PCR ที่มีแถบเดียวคิดเป็นร้อยละ 64.9 ตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR 2 แถบซึ่งหมายถึงมีการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่มี PvMsp-1 ที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 ชนิด จำนวน 49 ตัวอย่างหรือร้อยละ 26.5 และตัวอย่างที่มีผลผลิต PCR 3 แถบพบ 16 ตัวอย่างหรือคิดเป็นร้อยละ 8.6 ในขณะที่ตัวอย่างจากทางตะวันตกของประเทศพบอัตราการกระจายของตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR จำนวน 1 แถบ 2 แถบ และ 3 แถบ คิดเป็นร้อยละ 78.8, 17.5 และ 3.7 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ได้จากภาคเหนือของประเทศ ในทางตรงข้ามตัวอย่างจากภาคตะวันออกของประเทศไทยพบว่าให้ผลผลิต PCR แถบเดียวและ 2 แถบคิดเป็นร้อยละ 90.9 และ 9.1 ตามลำดับและจากภาคใต้พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR แถบเดียวร้อยละ 96.9 และ 2 แถบ ร้อยละ 3.1 เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium vivax* จากภาคตะวันออกและจากภาคใต้ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR 3 แถบเลย (ตารางที่ 1.6)

ตารางที่ 1.6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของยีน PvMsp-1 บริเวณ block 6 จากตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium vivax* จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ

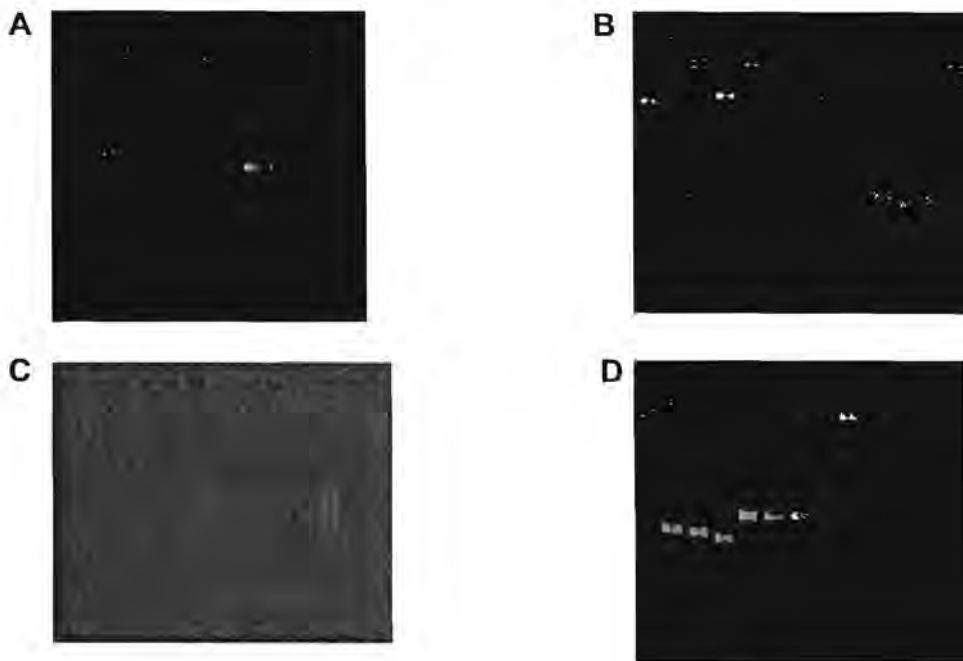
ภาค	จำนวนที่ทดสอบ	จำนวนที่ให้ผลบวก	จำนวนแถบผลผลิต PCR (%)		
			1 แถบ	2 แถบ	3 แถบ
เหนือ	340	302	232 (76.8)	51 (16.9)	19 (6.3)
ตะวันตก	83	77	61 (79.2)	11 (14.3)	5 (6.5)
ตะวันออก	74	65	50 (76.9)	15 (23.1)	0
ใต้	191	178	144 (80.9)	34 (19.1)	0
รวม	688	622	487 (78.3)	111 (17.8)	24 (3.9)

ในการตรวจสอบ allele ใน block 6 ของ PvMsp-1 นั้นนอกจากจะพบความแตกต่างในจำนวนแถบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นแล้วยังพบว่าขนาดของผลผลิต PCR ในแต่ละกลุ่ม allele มีความแตกต่างกัน สำหรับตัวอย่างผลผลิต PCR เมื่อใช้ primers ในการตรวจสอบต่างกันแสดงในรูปที่ 1.14

การกระจายของ allele ใน block 6 ของ PvMsp-1 ตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศแสดงในตารางที่ 1.7 จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมด 688 ตัวอย่างพบว่าประกอบด้วยผลผลิต PCR จำนวน 781 แถบ โดย allele ที่พบบ่อยที่สุดคือ 5'-Salvador 1-3'- Salvador 1 ซึ่งพบร้อยละ 44.0 รองลงมาคือ allele 5'-Salvador 1-3'- Belem B พบร้อยละ 36.0 สำหรับ allele 5'-Belem-3'-Belem พบร้อยละ 12.5 ส่วน allele 5'-Salvador 1-3'- Belem A พบได้น้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 7.4 ในขณะที่ allele 5'-Belem-3'-Salvador 1 ไม่พบในทุกตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างจากภาคเหนือและทางตะวันตกของประเทศมีการกระจายของ allele ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน ในขณะที่ตัวอย่างจากภาคตะวันออกและภาคใต้มีการกระจายของ allele แตกต่างไป โดย

ตัวอย่าง *Plasmodium vivax* จากภาคใต้มีเพียง 2 alleles คือ 5'-Salvador 1-3'-Salvador 1 พบร้อยละ 36.3 และ allele 5'-Salvador 1-3'-Belem B พบมากถึงร้อยละ 63.7

รูปที่ 1.14 Agarose gel electrophoresis แสดงการตรวจสอบ allele ใน block 6 ของ PvMsp-1 โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ Salvador 1 และ Belem ดังนี้ (A) 5'-primer Salvador 1 และ 3'-primer Salvador 1, (B) 5'-primer Belem และ 3'-primer Belem, (C) 5'-primer Belem และ 3'-primer Salvador 1 และ (D) 5'-primer Salvador 1 และ 3'-primer Belem



ตารางที่ 1.7 แสดงผลการตรวจสอบ allele ในส่วนของยีน PvMsp-1 บริเวณ block 6 จากตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium vivax* จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ

ภาค	Block 6 Allele ของ PvMsp-1 (%)					รวม
	Sal1-Sal1	Belem-Belem	Sal1-BelemA	Sal1-BelemB	Belem-Sal1	
เหนือ	176 (45.0)	71 (18.2)	36 (9.2)	108 (27.6)	0	391
ตะวันตก	43 (43.9)	13 (13.3)	9 (9.2)	33 (33.6)	0	98
ตะวันออก	48 (60.0)	14 (17.5)	13 (16.3)	5 (6.2)	0	80
ใต้	77 (36.3)	0	0	135 (63.7)	0	212
รวม	344 (44.0)	98 (12.5)	58 (7.4)	281 (36.0)	0	781

## 6. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium malariae*

ตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR ในการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium malariae* จำนวน 6 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างจากภาคเหนือจำนวน 2 ตัวอย่างและตัวอย่างจากภาคใต้จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้นำมาเพิ่มปริมาณ DNA ครอบคลุมยีน small subunit ribosomal RNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 2,174 เบส การวิเคราะห์ลำดับเบสใช้ DNA template จาก recombinant plasmid subclone จากการวิเคราะห์พบว่ายีนดังกล่าวมีความแตกต่างกันเล็กน้อย (microheterogeneity) ระหว่างแต่ละตัวอย่างที่ศึกษา พบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จำนวน 26 ตำแหน่ง แสดงว่าในกลุ่มของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium malariae* ที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเช่นเดียวกับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* สำหรับรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในรูปที่ 1.15

## 7. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium ovale*

สำหรับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium ovale* จำนวน 4 ตัวอย่างที่ได้จากภาคเหนือและทางตะวันตกของประเทศนั้น พบว่ายีน small subunit ribosomal RNA มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งเช่นกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบทุกตัวอย่างพบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 86 ตำแหน่ง ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 1.16 อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบสายใยพันธุกรรม (phylogeny) กับยีนเดียวกันในเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium falciparum* โดยอาศัยวิธี Neighbor-joining และใช้ Kimura-2-parameter model พบว่าเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดอยู่ในตำแหน่งแขนงที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามเชื้อมาลาเรีย species เดียวกันยังคงอยู่ใน clade เดียวกัน ทั้งนี้ยีน small subunit ribosomal RNA ของ *Plasmodium ovale* มีความใกล้ชิดกับ *Plasmodium vivax* มากกว่า *Plasmodium malariae* ส่วน *Plasmodium falciparum* มีความแตกต่างจากเชื้อมาลาเรียทั้ง 3 ชนิดชัดเจน (รูปที่ 1.17)

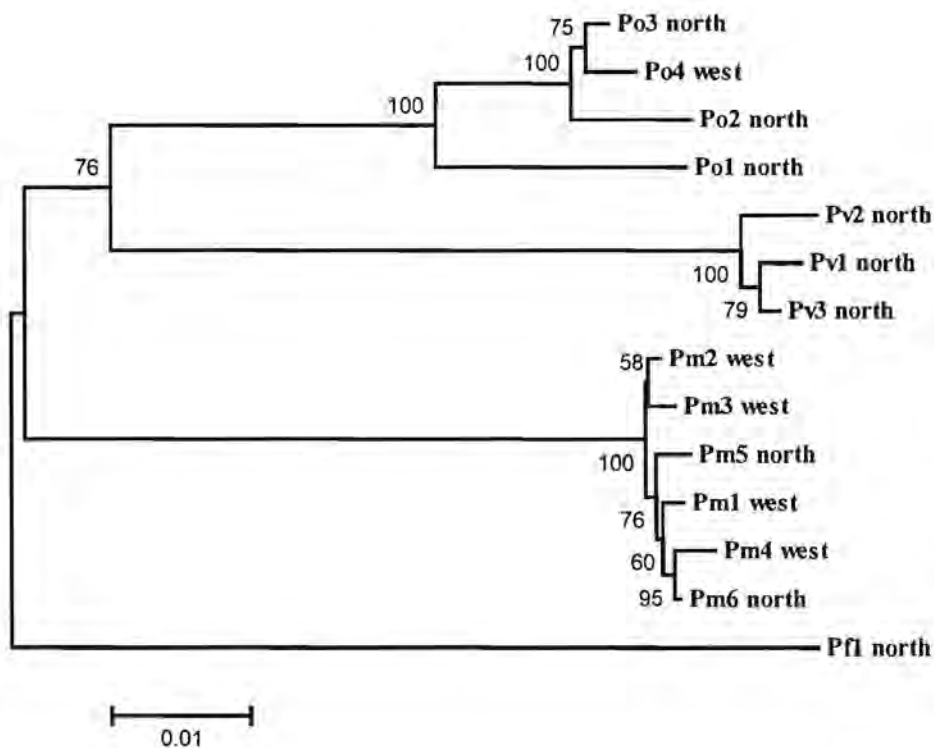


Pm1_west	AACTGGTGTG ATCTTGOCAG TAGTCATATG CTTGTCTCAA AGAITAAGCC ATGCAAGTGA AAGTATATGC ATATTTTATA TGTAGAANCT GCGAAGGCT	[ 100]
Pm1_west	CAITAAACA GTTATAGTCT ACTTGCACAT TTTTATAA GGATAACTAC GAAAAGCTGT AGCTAATACT TGCITTAATA CTCFIAATC TTATATGTTT	[ 205]
Pm6_north	.....G.....	[ 205]
Pm1_west	TTCAGIATGT ATTGTAAAG OCTTATAAGA GAAAAGTTTA TTAACATAAG GAATATAAC AAAGAAGTAA CACATAATAA ATTTOGATTT ATTTAGTGTG	[ 305]
Pm5_north	.....T.....	[ 305]
Pm1_west	TATCAATCGA GTTTCGACOC TATOGGCTTT TGATGTTAGG GTATTGGCCT AACATGGCTA TGAOGGGTAA OGGGGAATTA GAGTTCGATTT OCGGAGGGG	[ 405]
Pm2_west	.....A.....	[ 405]
Pm3_west	.....A.....	[ 405]
Pm4_west	.....A.....	[ 405]
Pm5_north	.....A.....	[ 405]
Pm6_north	.....A.....	[ 405]
Pm1_west	AGCCTGAGAA ATAGCTACCA CATCTAAGGA AGGCAGCAGG CGGGTAAATT ACCCAATCTT AAAGAAGAGA GGTAGTGACA AGAATAACA ATGCAAGGCC	[ 505]
Pm1_west	AAATTTGGT TTTGCAATTG GAATGATGGG AATTTAAAC CTTCCAGAA GGCAATTGA GGGCAAGTCT GGTGCCAGCA GCGGGTAA TTCCAGCTCC	[ 606]
Pm5_north	.....A.....	[ 606]
Pm1_west	AATAGGTAT ATTTAAATTG TTGCAGTAA AACGCTGTA GTTGAATTC AAGGAATCAA TATTTAAGT AATGCTTTGT ATATTTATAA CAAAGTGTGA	[ 707]
Pm3_west	.....G.....	[ 707]
Pm1_west	CGTAAAGAT AAAAGCCAAG CGTATATTT TTTCGTATC ATTGTGTTT ATTAGTATAT ATATGGTTC TTATTATAAA AATGATCTT TTTAAATTC	[ 807]
Pm2_west	.....G.....	[ 807]
Pm3_west	.....A.....	[ 807]
Pm4_west	.....A.....	[ 807]
Pm5_north	.....A.....	[ 807]
Pm6_north	.....A.....	[ 807]
Pm1_west	TTTTGTATAA TTTTATATG ATGGGAATTT TGTTACTTTG AGTAAATAG AGTGTCAA GCAAACAGTT AAAACAGTTT CTGTGTTGA ATACTACGC	[ 910]
Pm4_west	.....G.....	[ 910]
Pm6_north	.....G.....	[ 910]
Pm1_west	ATGGAATAAC AAAATGAAAC AAGTCAGAAT TTTGTCTTT TTCTTATTT TGGCTTAGTT ACGATTAATA GGAGTAGCTT GGGGGCATTT GTATTCAGAT	[1012]
Pm3_west	.....A.....	[1012]
Pm4_west	.....G.....	[1012]
Pm1_west	GTCAGAGGTG AAATCTTAG ATTTCTGGA GACAAGCAAC TGGAAAGCA TTTGCTAAA ATACITOCAT TAAACAAGAA CGAAAGTAA GGGAGTGAAG	[1112]
Pm2_west	.....G.....	[1112]
Pm1_west	ACGATCAGAT ACGTGTAA TCTTAACCAT AAACATAGCC GACTAGGTGT TGGATGATAG AGTAAAAAT AAAAGAGACA TTCATATGAG TGTTCITTTT	[1216]
Pm1_west	AGATAGCTTC CTTCAAGTAC TTATGAGAAA TCAAAGCTT TGGTCTCG GGGAGTATT CGGGCAAGG AGAAAGTAA AAGAATGAC GGAAGGGCAC	[1316]
Pm5_north	.....G.....	[1316]
Pm1_west	CACCAGGOST GGAGCTTGG GCTTAATTTG ACTCAACAG GGGAACTCA CTAGTTAAG ACAAGAGTAG GATTGACAGA TTAATAGCTC TTCTCGATT	[1416]
Pm2_west	.....T.....	[1416]
Pm3_west	.....T.....	[1416]
Pm4_west	.....T.....	[1416]
Pm5_north	.....T.....	[1416]
Pm6_north	.....T.....	[1416]
Pm1_west	TCTTGGATGG TGATGCATGG CCGTTTTAG TTGIGAAATA TGATTTGCTT GGTAAATTC GATAAGAAC GAGATCTAA CCTGCTAATT AGCGTAAAT	[1516]
Pm1_west	ACACTATATT CTTAAGTAA ATTAGAATAT AGATAAATG TGCTAATTTT GATTAATAA TTAGAATGTT TTTTATAA AAACGTCTT TTCCCTTTTT	[1617]
Pm5_north	.....G.....	[1617]
Pm1_west	TTCTAATAA TGCAATTTA TTTTTTTCT TTTTGTGAT AAGAATGAT TTGCTAATTT GTAAAGCTTC TTAGAGGAAC GATGTGTGTC TAACACAAGG	[1719]
Pm2_west	.....C.....	[1719]
Pm3_west	.....C.....	[1719]
Pm4_west	.....C.....	[1719]
Pm5_north	.....C.....	[1719]
Pm1_west	AAGTTAAGG CAACAACAGG TCTGTGATGT CCTTATGTA ACTAGGCTGC ACGGTGCTA CACTGATATG TATAAGAGT AITTAATAAT ATATATCTTG	[1819]
Pm1_west	TTATGTTATA CGAATTTCTA TATGATGCA TACAAGAAAT ATATAGTTT CCTCCACTGA AAAGTGTAGG TAATCTTTTT CAATACATAT CGTATGGGG	[1919]
Pm2_west	.....G T.....	[1919]
Pm3_west	.....T.....	[1919]
Pm1_west	ATAGATATT GCAATTAATA ATCTTGAAG AGGAATGCTT AGTAAGCATG ATTCATCAGA TTGTGCTGAC TACGTCCCTG CCTTTGTAC ACAAGGGGG	[2019]
Pm4_west	.....C.....	[2019]
Pm1_west	TGCTCTAC CGATGAAAG ATATGATGAA TTGTTGGAC AAGGAAAAG GTTTTTATT CTTTTTCTG GAAAAATGT AAATCTATC TTTTAAAGGA	[2123]
Pm3_west	.....G.....	[2123]
Pm1_west	AGGAGAGTC GTAACAAGT TTCCGTAGGT GAACCTGGG AAGGATCATT A	[2174]
Pm4_west	.....A.....	[2174]

รูปที่ 1.15 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium malariae* จำนวน 5 ตัวอย่างจากภาคเหนือและทางตะวันตกของประเทศไทย

Po1_north	AAOCIGGTTG	ATCTTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGICTCAA	AGATTAAGCC	ATGCAAGTGA	AAGTATAATG	ATATTTTATA	TGTAGAAGCT	GCGAAGGCT	[ 100]
Po1_north	CATTAAAACA	GTTATAATCT	ACTTGAATTT	TCTACTTACA	AGGATAACTA	CGGAAAAGCT	GTAGCTAATA	CTTGCTTTAA	TGGGTTTCAA	TCCTTTTGA	[ 202]
Po2_north	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....T.T	[ 202]
Po3_north	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....T.A.....	[ 202]
Po4_west	.....	.....C.....	.....C.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....T.A.....	[ 202]
Po1_north	TTCOCGGTA	TGTAAGTGT	AAGCCTTAA	GAAAGAGTT	TATAACTTAA	GGAATTAATA	CAAAGAGTA	ACACATAATA	AGGTTGCCTT	ATTTAGTGTG	[ 305]
Po2_north	G..TTA.....	.....	.....T.....	.....G.A.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....	[ 305]
Po3_north	C..TTA.....	.....	.....	.....G.A.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....	[ 305]
Po4_west	C..TTA.....	.....	.....A.....	.....G.A.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....	[ 305]
Po1_north	TATCAATGA	GTTTCAGAC	TATCAGCTT	TGATGTTAGG	GTATTGGCT	AACATGGCTA	TGAOGGTAA	CGGGAAATTA	GAGTTGAT	COGGAGAGG	[ 405]
Po2_north	.....	.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 405]
Po1_north	AGCCTGAGA	ATAGCTACCA	CATCTAAGGA	AGGCAGCAGG	CGGTAATTT	ACCCAATCT	AAAGAAGAGA	GGTAGTGACA	AGAAGTACA	ATACAAGGC	[ 505]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	[ 505]
Po3_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	[ 505]
Po4_west	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	[ 505]
Po1_north	ATTTCATGT	TITGATATG	GAATGATGG	AAITTAAGC	CTTCCAAA	TTCAATTTGA	GGCAAGTCT	GSTGCCAGCA	GOOCCGTTA	TTCAGCTCC	[ 606]
Po1_north	AATAGCGTAT	AITAAAATG	TTCAGTTAA	AAGCCTGT	GTGAATTTC	AAAGAATCAA	TATTTAAGT	AATACITTTG	CTATAAGATG	CTTAGACAAT	[ 731]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.T.....	.....G.....	[ 731]
Po3_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....G.....	[ 731]
Po4_west	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.T.....	.....G.....	[ 731]
Po1_north	ACAAGGATC	TGTTCTTTG	ATTCTTTATG	CAAAATGTT	TCTATTATA	AAAGGGTTC	TTTTTAAAT	CTCTTTTGT	ATTGTATTG	GAGATTTGT	[ 841]
Po2_north	.....	.....C.....	.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....A.....	.....C.A.A.....	.....T.....	.....C.....	[ 841]
Po3_north	.....	.....C.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....A.....	.....C.A.A.....	.....T.....	.....C.....	[ 841]
Po4_west	.....	.....C.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....A.....	.....C.A.A.....	.....T.....	.....CA.....	[ 841]
Po1_north	TACTTTAGT	AAATTAGAGT	GTCAAAGCA	AACAGTTAA	GCATTTTACT	GCGTTTGAAT	ACTACAGCAT	GGAAATCAA	AATTTAACA	GCAGAAATC	[ 942]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....	[ 942]
Po3_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....C.....	[ 942]
Po4_west	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....C.....	[ 942]
Po1_north	TGTTCTTTT	TCTATTTTG	GCTTAGTTAC	GATTAATAGG	AGTAGCTTGG	GGCATTTTG	ATTACAGATG	CAGAGGTAA	ATTCTTAGAT	TTTCTGGAGA	[1044]
Po2_north	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1044]
Po3_north	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1044]
Po4_west	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1044]
Po1_north	CAAACTACT	CGAAAGCAT	TGCTAAAAT	ATTTCATTA	ATCAAGAAAG	GAAGTTAAGG	GAGTGAAGAC	GATCAGATAC	CGTGTAACT	TAAACATAA	[1144]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	[1144]
Po3_north	.....	.....	.....	.....C.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	[1144]
Po4_west	.....	.....	.....	.....C.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	[1144]
Po1_north	ACTATAACAA	CTAGGTTTGG	GATGAAAAGT	TTTTAAATA	GAGATTCT	TTCGAAAT	TCTTAGATG	CTCTTTTCT	TACCTTATGA	GAAATCAAG	[1252]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1252]
Po3_north	.....	.....G.G.....	.....	.....GA.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1252]
Po4_west	.....	.....G.G.....	.....	.....GA.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1252]
Po1_north	TCTTTGGTT	CTGGGGGAG	TATTGGGCA	AGGAGAAAG	TAAAAGAAAT	TGAAGAAAG	GCAACACAG	GCGTGGGCT	TGGGCTTAA	TTTACTCAA	[1352]
Po2_north	.....	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	[1352]
Po1_north	CACGGGAAA	CTCAGTAGT	TAAGACAGA	GTAGGATGA	CAGATTAATA	GCTCTTCTT	GATTTCTTGG	ATGGTATGC	ATGGGCTTT	TTAGTTGGG	[1452]
Po1_north	AATATGATT	GCTGGTTAA	TTCGATAAC	GAAAGAGATC	TAACTTCT	AATTAGGCGC	GAATAGTTA	TATCTTATG	TGAATTTGA	TATAGGAA	[1553]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....CT.....	.....T.....	[1553]
Po3_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....CT.....	.....T.....	[1553]
Po4_west	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....CT.....	.....T.....	[1553]
Po1_north	TTTCTTAT	TGAAGAATA	CATTAGATA	CATTAATG	TCTTTTCC	TATCTTCT	AATTCGAA	TCAATGCTT	TCTTTTTC	ATAAGAAIT	[1667]
Po2_north	.....	.....	.....	.....TA.....	.....	.....T.A.....	.....T.T.....	.....	.....T.T.....	.....G.....	[1667]
Po3_north	.....	.....	.....	.....TA.....	.....	.....T.A.....	.....T.T.....	.....	.....T.T.....	.....G.....	[1667]
Po4_west	.....	.....	.....	.....TA.....	.....	.....T.A.....	.....T.T.....	.....	.....T.T.....	.....G.....	[1667]
Po1_north	ACTCGTTGA	TGTAAAGCT	TCTAGAGGA	AGGAGTGG	TCTAACACAA	GGAAGTTAA	GGCAACAA	GCTCTTGT	GTCCTAGAT	GAATAGGCT	[1767]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1767]
Po3_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1767]
Po4_west	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1767]
Po1_north	GCAAGGTC	TACAGTATA	TGTATAACA	GTTACTAAA	ATATACITTT	GTTAGGTTAT	TATACITTT	TCAATTTGA	TAGTTTCT	CCACTGAAA	[1882]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....C.....	.....A.....	.....C.....	.....G.C.....	[1882]
Po3_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....C.....	.....A.....	.....C.....	.....G.C.....	[1882]
Po4_west	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.A.....	.....C.....	.....A.....	.....C.....	.....G.C.....	[1882]
Po1_north	GTTAGGTTA	TCTTTATCAG	TACATATGT	GATGGGATA	GATTTATGCA	ATTATTAACT	TTGAAGAGG	AATGCTAGT	AAGCATGAT	CATCAGATTG	[1982]
Po2_north	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1982]
Po1_north	TGCTACTAC	GTCCTGCT	TTTGTACACA	CGGCGGTC	CTCTACCGA	TTGAAGATA	TGATGAATG	TTTGGACAAG	AAAAGAAAGA	ATTATATTT	[2083]
Po2_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GA.....	.....	[2083]
Po3_north	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GA.....	.....	[2083]
Po4_west	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GA.....	.....	[2083]
Po1_north	TTTTTTTCTG	GAATAAGCT	AAATCTTATC	TTTTAAAGGA	AGGAGAAGTC	GTAACAAGG	TTCGTTAGG	GAACTGGG	AAGGATCAT	A [2174]	[ 2174]

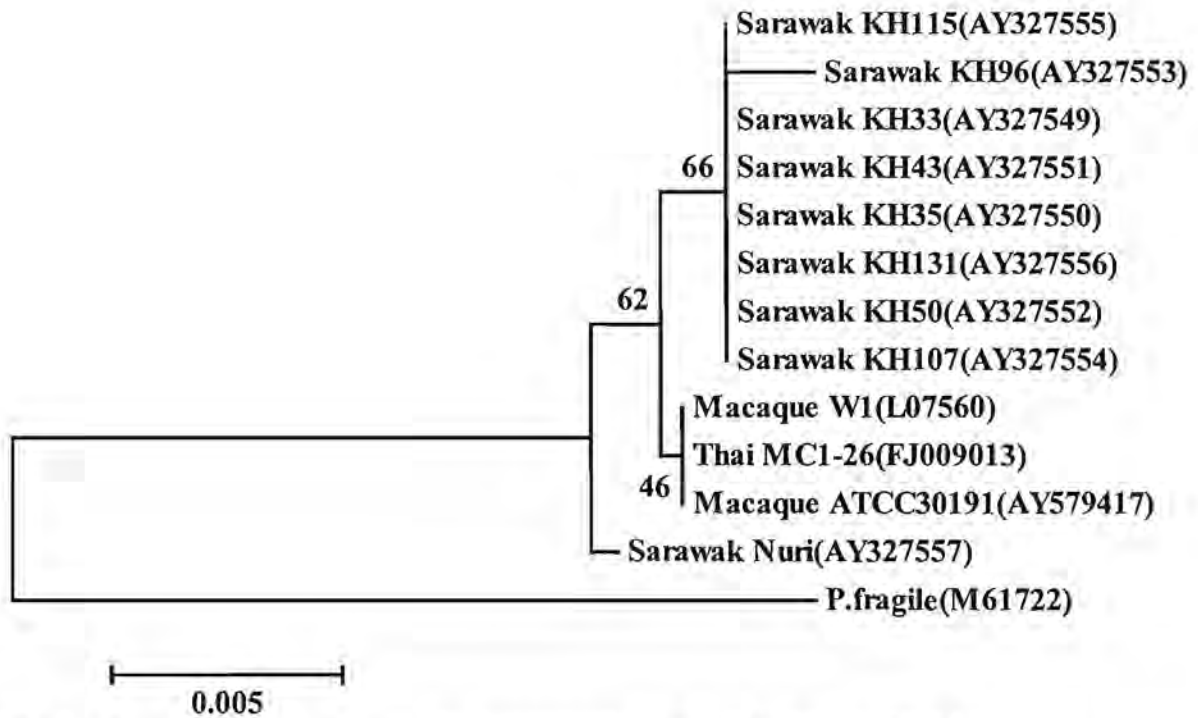
รูปที่ 1.16 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium ovale* จำนวน 4 ตัวอย่างจากภาคเหนือและทางตะวันตกของประเทศไทย



**รูปที่ 1.17** แสดง phylogenetic tree สร้างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* เปรียบเทียบกับ *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium falciparum* จากการวิเคราะห์โดยวิธี neighbor-joining จากพื้นฐานของ Kimura-2-parameter model ค่าตัวเลขกำกับกับแขนงคือค่าร้อยละของระดับความเชื่อมั่นประเมินจากวิธี bootstrap ทั้งหมด 1,000 ครั้ง มาตรการกำกับด้านล่างคือความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง

#### 8. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium knowlesi*

ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* โดยการตรวจจากฟิล์มโลหิตไม่พบเชื้อ ดังกล่าวแต่พบว่า เชื้อมาลาเรียที่มีสัญญาณคล้าย *Plasmodium malariae* จำนวน 1 ตัวอย่างจากภาคใต้ให้ผลบวกต่อ primers ที่จำเพาะต่อ *Plasmodium knowlesi* โดยวิธี PCR เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน small subunit ribosomal RNA และเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในฐานข้อมูลสากลพบว่าเชื้อมาลาเรียที่พบในการศึกษานี้มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อชนิดเดียวกันที่มีการแพร่ระบาดในประเทศมาเลเซียโดยพบว่า phylogenetic tree มีการแยกสายวิวัฒนาการจากกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 11.8)



**รูปที่ 1.18** แสดง phylogenetic tree สร้างจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน small subunit ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* เปรียบเทียบกับเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันจากผู้ป่วยใน Sarawak และที่พบในลิง การวิเคราะห์โดยวิธี neighbor-joining จากพื้นฐานของ maximum composite likelihood ค่าตัวเลขกำกับแขนงคือค่าร้อยละของระดับความเชื่อมั่นประเมินจากวิธี bootstrap ทั้งหมด 1,000 ครั้ง มาตรกำกับด้านล่างคือความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Plasmodium fragile* ใช้เป็นตัวเทียบเคียงนอกกลุ่ม

ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mitochondrial cytochrome b ของตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในการศึกษานี้ (MC1-26) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล ได้แก่ พบว่า AF069621, AY598141 และ AY22797 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันทั้งสิ้น 8 ตำแหน่ง ทั้งนี้พบ deletion/insertion 3 ตำแหน่ง และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง โดยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในยีนดังกล่าวในตัวอย่าง MC1-26 ที่ต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล พบเพียง 1 ตำแหน่ง แสดงว่าแม้จะพบความหลากหลายในยีนสำหรับ small subunit ribosomal RNA มากแต่อาจเนื่องมาจากยีน mitochondrial cytochrome b อาจมีข้อจำกัดในหน้าที่หรือโครงสร้างที่สูงกว่ายีนสำหรับ small subunit ribosomal RNA อย่างไรก็ตามการพบความคล้ายคลึงในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mitochondrial cytochrome b นั้นย่อมเป็นข้อสนับสนุนผลการตรวจโดย PCR ว่าตัวอย่างดังกล่าวคือเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* จริงดังแสดงในรูปที่ 11.9

```

#P.knowlesi_AF069621 TGG AAT TAC GGG TTG CTG AIT TTA GGT AIT ATA TTC TTT ATA CAA ATA TTA ACA GGT GIA TTT TTA GCT
#P.knowlesi_AY598141 ... .. .T ..A ..T ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... .. .T ..A ..T ... ..
#MCl-26 ... .. .T ..A ..T ... ..

#P.knowlesi_AF069621 AGT CGT TAT ACT CCA GAA AIT TCT TAC GCA TAC TAC AGT ATA CAA CAT AIT TTA AGA GAA TTA TGG AGT
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 GGA TGG TGT TTT AGA TAT ATG CAT GCT ACA GGT GCA TCT CIT GIA TTT TTA TTA ACT TAT TTA CAT AIT
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 TTA AGA GGA TTA AAT TAT TCA TAT TTA TAT CIA CCA TTA TCA TGG ATA TCA GGA TTA AIC ATA TTT GCA
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..C...
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 TTA TTT ATA GTT ACA GCT TTT ATA GGT TAT GTT TTA CCT TGG GGA CAA ATG AGT TAT TGG GGT GCA ACT
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 GTC ATA ACT AAT TTA TTA TCT TCA AIT CCA GIA TTA GTC AIT TGG TTA TGT GGA GGA TAT ACA GIA AGT
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 GAT CCA ACA AIT AAA AGA TTT TTT GIA TTA CAT TTT ATA CIT OCT TTT GIA GCA TTA TGT AIT GIA TTT
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 ATA CAT ATA TTC TTT TTA CAT TTA CAT GGT AGC ACT AAT OCT TTA GGG TAT GAT ACA GCT TTA AAA ATA
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 OCC TTC TAT CCA AAT CIA TTA AGT CIT GAT GIA AAA GGA TTT AAT AAT ATA TTT ATA TTA TTC TTA TTA
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..C...

#P.knowlesi_AF069621 CAA AGT AIT TTT GGT ATA AIT CCA TTA TCT CAT CCA GAT AAT GCT ATA TTA GIT AAT ACA TAT GIT ACA
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 CCA AIT CAA AIT GIT OCT GAA TGG TAC TTT TTA CCA TTT TAT GCA ATG TTA AAA ACA ATA OCT AGT AAA
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 ACA GCA GGT TTA TTA AIT GIT TTA GCA TCT TTA CAA TTA TTA TTT TTA TTA GCT GAA CAA AGA AGT TTA
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 ACT ACT ATA ATA CAA TTT AAA ATG ACA TTT GGT GCT AGA GAA TAT TCA GIA CCA ATG ATA TGG TTT ATG
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 TGT TCA TTC TAT GCT TTA TTA TGG AIT GGA TGT CAA TTA CCA CAA GAT AIT TTC AIT TTA TAT GGT GGT
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

#P.knowlesi_AF069621 TTA TTT ATA ATA TTA TTC TTC TTT AGT GGA TTA TTT ACA CIT GIT CAT TAT AAA AGA ACA CAT TAT GAT
#P.knowlesi_AY598141 ... ..
#P.knowlesi_AY722797 ... ..
#MCl-26 ... ..

```

รูปที่ 11.9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mitochondrial cytochrome b ของ *Plasmodium knowlesi* จากตัวอย่างในการศึกษานี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล

## วิจารณ์ผลการวิจัย

วิธีการตรวจจากฟิล์มโลหิตยังเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ทั้งหมดไม่มากเกินไป รวมทั้งวัสดุที่ใช้มีราคาย่อมเยา ตลอดจนการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียและการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย สามารถดำเนินการโดยบุคลากรที่ผ่านการฝึกอบรมได้อย่างดี วิธีการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตยังเหมาะสมกับการนำไปใช้ในสถานพยาบาลทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตปრაภูโรคที่กระจายอยู่หลายท้องที่ ซึ่งครอบคลุมเขตปრაภูโรคมาลาเรียทั่วประเทศ ภายใต้การดำเนินงานของสำนักงานควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข นอกจากนี้การให้ยารักษาอย่างเหมาะสมตามภาวะการณของการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในแต่ละท้องที่ ตลอดจนการเฝ้าติดตามผู้ป่วยอย่างเป็นระบบ ได้ส่งผลให้การควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทยประสบผลดีกว่าประเทศใกล้เคียงอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามในบางท้องที่เช่น บริเวณจังหวัดชายแดนภาคใต้ติดกับประเทศมาเลเซียที่มีภาวะความไม่สงบทางการเมือง ปัจจัยดังกล่าวได้ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการควบคุมโรคมาลาเรียในพื้นที่เหล่านี้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้บนพื้นฐานของความสำเร็จดังกล่าวเกิดจากการสร้างระบบตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการพร้อมกับการสร้างระบบกำกับมาตรฐานของการตรวจดังกล่าว อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดเรื่องเวลาและอื่น ๆ ทำให้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับมาลาเรียจึงมีการเลือกใช้วิธีตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาเพียงอย่างเดียว แม้ว่าวิธีตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนามีความไวสูงกว่าวิธีตรวจจากฟิล์มโลหิต แต่ในทางปฏิบัติที่มีข้อจำกัดเรื่องเวลาทำให้ความไวในการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดหนาอาจสูงกว่าชนิดบาง 10 ถึง 30 เท่า (Trape 1985) รวมทั้งสามารถลดเวลาในการตรวจหาเชื้อได้ดีกว่าการตรวจจากฟิล์มโลหิตชนิดบาง แต่ความจำเพาะในการตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรียมักจำกัดเพียง 2 ชนิดคือ *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* นอกจากนี้ขีดจำกัดของการตรวจพบเชื้อมาลาเรียยังขึ้นกับปริมาณเชื้อมาลาเรียในตัวอย่างเลือด ตลอดจนความละเอียดและทักษะของจุลทรรศน์กร สำหรับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มโลหิตมักให้ความไวที่ต่ำเมื่อปริมาณเชื้อในกระแสเลือดน้อยกว่า 10 หรือ 50 ตัวต่อไมโครลิตร (Payne 1988; Bruce-Chwatt 1993)

ในการประเมินการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดหนาโดยหน่วยงานทั่วประเทศในกำกับของกระทรวงสาธารณสุขในปี พ.ศ. 2549 พบว่าการตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดในผู้ป่วยมีจำนวนเพียงประมาณร้อยละ 0.5 ซึ่งจากการใช้ตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ในการศึกษานี้พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* คิดเป็นร้อยละ 0.4 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามจากการตรวจโดยวิธี PCR พบว่าตัวอย่างที่มีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด มีมากถึงร้อยละ 12 ทั้งนี้อาจเนื่องจากความคลาดเคลื่อนจากการตรวจของจุลทรรศน์กรหรือจากการพบระยะวงแหวนที่ไม่สามารถจำแนก species ของเชื้อมาลาเรียได้อย่างจำเพาะ ตลอดจนการติดเชื้อร่วมกันที่มีปริมาณเชื้อต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจพบได้จากกล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งการมีระยะ hypnozoite แอบแฝงอยู่ จากการศึกษาพบว่าการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันพบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศ แต่พบมากในบริเวณภาคเหนือและตะวันตกมากกว่าทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ซึ่งมีอัตราการติดเชื้อของประชากรต่ำกว่า ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่การติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันนั้นมีปัจจัยต่าง ๆ ที่จะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแพร่เชื้อ เช่น ชนิดของยุงพาหะ เป็นต้น กล่าวคือ

*Anopheles dirus* สามารถนำได้ทั้ง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* ในขณะที่ *Anopheles maculatus* สามารถนำ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium malariae* ส่วน *Anopheles gambiae* ซึ่งเป็นยุงพาหะหลักในทวีปแอฟริกา สามารถนำเชื้อมาลาเรียได้ทั้ง 4 species ซึ่งการวินิจฉัยภาวะของการติดเชื้อร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดได้ต่ำกว่าที่เป็นจริงจากการตรวจด้วยฟิล์มเลือดชนิดหนา ย่อมส่งผลกระทบต่อ การควบคุมโรคมาลาเรียในด้านต่าง ๆ กล่าวคือ การรักษาที่เกิดขึ้นจึงมีเฉพาะสำหรับเชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบจากฟิล์มเลือดและเนื่องจากเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียได้แตกต่างกัน ดังนั้นภายหลังจากเชื้อมาลาเรียชนิดหนึ่งได้ถูกกำจัดไปแล้วเชื้อที่เหลืออยู่ที่ไม่ตอบสนองต่อยา ย่อมมีโอกาสเจริญต่อไปจนทำให้ผู้ติดเชื้อยังคงมีอาการของโรค ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากการที่ผู้ติดเชื้อต้องสูญเสียวันทำงานมากขึ้น ในขณะที่เชื้อที่ไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัยจะมีโอกาสแพร่เชื้อต่อไปได้อีก ซึ่งการให้ยาต้านมาลาเรียที่จำเพาะต่อเชื้อชนิดหนึ่งย่อมส่งผลต่อเชื้ออีกชนิดหนึ่งให้ได้รับยาต้านมาลาเรียที่มีผลไม่สมบูรณ์ย่อมเป็นการสร้างสภาวะที่เอื้อต่อการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียให้มีโอกาสติดต่อยาต้านมาลาเรียมากขึ้น ในทางตรงข้ามถ้าใช้ผลการตรวจจากฟิล์มเลือดชนิดหนาในการประเมินสภาวะหรือประสิทธิภาพของมาตรการหนึ่ง ๆ ในการควบคุมโรคนั้น ความสามารถในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดได้ต่ำกว่าปกติจากการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดในผู้ป่วยแต่ละรายย่อมทำให้ผลการประเมินดังกล่าวเกิดความคลาดเคลื่อนอย่างมากได้ ในทำนองเดียวกันในกรณีของการประเมินประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรีย การตรวจหาภาวะติดเชื้อปะปนกันได้ต่ำกว่าปกติอย่างมากย่อมทำให้การประเมินประสิทธิภาพของยา ดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนสูง ดังนั้นการประยุกต์ใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไวสูงกว่า เช่นวิธี PCR จึงมีความเหมาะสมในบางสภาวะการณณ์ แม้ว่าวิธีการตรวจโดย PCR ไม่สามารถนำมาทดแทนวิธีการตรวจจากฟิล์มโลหิตโดยทั่วไปได้อันเนื่องมาจากค่าใช้จ่ายและระยะเวลาที่ใช้มากกว่า (Mayxay et al 2001; Siripoon et al 2002)

การติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดกันหรือการติดเชื้อผสมอาจได้รับการวินิจฉัยจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายหลังจากการประเมินประสิทธิภาพของการรักษาเชื้อที่ตรวจพบในครั้งแรก (Mason et al 2001) ซึ่งอัตราที่ตรวจพบมักมีค่าการประเมินที่ต่ำกว่าจริงเนื่องจากเชื้อที่แฝงอยู่อาจถูกกำจัดจากยาที่ใช้รักษาเชื้อชนิดที่วินิจฉัยได้ ดังนั้นเชื้อมาลาเรียที่แฝงอยู่นั้นจึงไม่ได้รับการวินิจฉัย และในกรณีการตรวจพบเชื้อในภายหลังมักเป็นเชื้อที่ติดต่อยาต้านมาลาเรียที่ใช้ในการรักษาเชื้อที่วินิจฉัยได้ในครั้งแรก หรือเป็นเชื้อที่มีระยะแฝงในเซลล์ตับ เช่น *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium ovale* ผลกระทบที่เกิดขึ้นอันเนื่องจากการตรวจไม่พบการติดเชื้อร่วมกันจะทำให้เกิดกระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียมีโอกาสพัฒนาการดื้อยาได้มากขึ้น โดยเชื้อที่ยังคงความไวต่อยาได้ถูกทำลายไป เช่น การติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* ถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาเฉพาะ *Plasmodium falciparum* จะทำให้ *Plasmodium vivax* มีโอกาสสัมผัสกับยาชนิดต่าง ๆ โดยไม่จำเป็นมากกว่าการได้รับยาคลอโรควินเพียงชนิดเดียวในการทำลายระยะ asexual blood stages นอกจากนี้ขนาดของยาไพโรมาควินที่ใช้ทำลายระยะ gametocyte ของ *Plasmodium falciparum* เพื่อป้องกันการแพร่เชื่อนั้นไม่สามารถทำลายระยะ hypnozoite ของ *Plasmodium vivax* ได้ ในทางตรงข้ามในกรณีที่ *Plasmodium vivax* ได้รับการวินิจฉัยและรักษา แต่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* แฝงอยู่นั้น ภายหลังจากการรักษาผู้ป่วยย่อมเกิดอาการของโรคได้อีกจากเชื้อชนิดหลัง เนื่องจากการดื้อยาคลอโรควินของ *Plasmodium falciparum* ที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ภาวะดังกล่าวย่อมส่งผลต่อการสูญเสียทางเศรษฐกิจของชาติจากค่าใช้จ่ายซ้ำซ้อนในการแสวงหาการรักษาที่ต้องเกิดขึ้นอีก รวมทั้งยังเป็นการเพิ่มระยะเวลาของการ

สูญเสียแรงงาน (Amexo et al 2004) ในปัจจุบันมีการตั้งข้อสังเกตว่าการติดเชื่อผสมนั้นอาจเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันข้ามชนิดของเชื้อมาลาเรีย (cross-species immunity) โดยเชื่อว่า *Plasmodium vivax* อาจทำให้ภาวะความรุนแรงของการติดเชื่อ *Plasmodium falciparum* ลดลง หรือในทางตรงข้ามผลการเกิด dyserythropoiesis จาก *Plasmodium falciparum* อาจลดปริมาณ reticulocyte ลงจึงเป็นการลดโอกาสที่ระยะ merozoite ของ *Plasmodium vivax* จะลุกลามเข้าเม็ดเลือดแดง อย่างไรก็ตามการศึกษาสภาวะดังกล่าวจากการติดตามผู้ป่วยที่ติดเชื่อในธรรมชาติย่อมให้ผลการศึกษาที่คลาดเคลื่อนจากความจริงอันเนื่องจากข้อจำกัดของข้อมูลทางระบาดวิทยาที่อาศัยผลการตรวจจากแผ่นฟิล์มโลหิตเพียงอย่างเดียว

การติดเชื่อมาลาเรียแต่ละครั้งผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อปะปนกันมากกว่า 1 ชนิด หรือในการติดเชื่อมาลาเรียชนิดเดียวกันผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละสายพันธุ์ ในการติดตามประชากรย่อยในระดับสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละตัวอย่าง หรือแต่ละชนิด จำเป็นต้องอาศัยการศึกษาหรือทดสอบคุณลักษณะที่มีความแตกต่างกันอันเป็นผลจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย เช่น การทดสอบไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) ต่าง ๆ (Thaithong et al 1981) การทดสอบระดับการตอบสนองต่อยาของเชื้อมาลาเรียแต่ละสายพันธุ์ (Thaithong et al 1981) หรือ การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยตรงในกรณีของ *Plasmodium falciparum* พบว่ามี genetic marker หลายชนิดที่มีความเหมาะสมในการตรวจสอบหรือติดตาม เช่น ยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอโรโซยด์ชนิดที่ 1 (merozoite surface protein 1, Msp-1) ยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอโรโซยด์ชนิดที่ 2 (merozoite surface protein 2, Msp-2) และ glutamate rich protein (GLURP) ซึ่งประโยชน์โดยตรงจากการใช้ genetic marker เหล่านี้ในการติดตามหรือแยกความแตกต่างของสายพันธุ์แล้ว Msp-1 และ Msp-2 (Jongwutiwes et al 1992; Putaporntip et al 2002; Viriyakosol et al 1995) ยังเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย ดังนั้นจึงมีประโยชน์โดยอ้อมในการประเมินลักษณะของเชื้อในประเทศว่ามีรูปแบบของ allele เป็นแบบใด เพื่อเตรียมพร้อมต่อการใช้วัคซีนที่พึงมีในอนาคต

แม้ว่าความหลากหลายของ PfMSP-1 เกิดจากยีนที่มีลักษณะพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ (allelic dimorphism) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PfMSP-1 ทำให้ทราบโครงสร้างพื้นฐานของยีนดังกล่าวว่าประกอบด้วยบริเวณที่มีความหลากหลายของเบสระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อสูง (variable block) บริเวณที่มีความหลากหลายปานกลาง (semi-conserved block) และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูง (conserved block) โดย variable block และ semi-conserved block มีลำดับเบสพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบซึ่งสามารถจำแนกเป็น 17 บริเวณ (block) (Tanabe et al 1987) ยกเว้น block 2 ประกอบด้วย tripeptide repeats ที่มีลำดับเบสพื้นฐาน 3 รูปแบบได้แก่ MAD20-type, K1-type และ RO33-type ซึ่ง 2 แบบแรกพบความหลากหลายในจำนวนและลำดับเบสทั้งหมดมากกว่า 50 แบบ ดังนั้นบริเวณดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมในการทดสอบหรือติดตามลักษณะและจำนวน allele ที่พบใน *Plasmodium falciparum* แต่ละตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วย (Jongwutiwes et al 1992) การเกิดความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนของ PfMSP-1 เนื่องจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่าง PfMSP-1 ที่มี allele ต่างกัน (intragenic recombination) ในขณะที่เชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในยุงกันปล้อง (Kerr et al 1994) ทั้งนี้กลไกดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ประชากรของ *Plasmodium falciparum* ในธรรมชาติโดยอาศัยการวิเคราะห์ตามหลักการทางพันธุกรรมประชากร อย่างไรก็ตาม



ตามอัตราการเกิด recombination อาจแตกต่างกันไปตามภูมิภาคของโลกขึ้นกับความชุกของโรคมาลาเรียและลักษณะทางภูมิศาสตร์ของเขตปรากฏโรค (Anderson et al 2000)

สำหรับ Msp-1 ของ *Plasmodium vivax* (PvMsp-1) เชื่อว่ามีบทบาทเป็นองค์ประกอบของวัคซีนได้เช่นเดียวกับ PfMsp-1 โดยพบว่าลิงที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่มีองค์ประกอบของ PvMsp-1 สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียดังกล่าวได้ (Collin et al 1999; Yang et al 1999) ผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ในธรรมชาติมีการสร้างแอนติบอดีต่อ PvMsp-1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูง (Mertens et al 1993; Levitus et al 1994; Soares et al 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีแอนติบอดีต่อส่วน C-terminus ของ PvMsp-1 บริเวณที่มีขนาด 42 กิโลดาลตัน (PvMsp-1<sub>42</sub>) หรือ 19 กิโลดาลตัน (PvMsp-1<sub>19</sub>) มักมีปริมาณการติดเชื้อในกระแสโลหิตต่ำกว่าผู้ที่ไม่มีแอนติบอดีดังกล่าว (Ak et al 1998)

เนื่องจาก PvMsp-1 มีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนสูงเช่นเดียวกับ PfMsp-1 แม้ว่าการศึกษามืออยู่อย่างจำกัดมากกว่า ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMsp-1 พบว่ามีความแตกต่างจากยีน PfMsp-1 ชัดเจนกล่าวคือ ความหลากหลายในลำดับเบสมีพื้นฐานมาจาก รูปแบบของยีนหรืออัลลีล (allele) มากกว่า 2 แบบในหลายบริเวณทำให้โครงสร้างของยีน PvMsp-1 มีลักษณะที่ไม่เป็นระเบียบแบบแผนชัดเจน (mosaic organization) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMsp-1 โดยใช้ ตัวอย่างจากหลายภูมิภาคของโลกพบว่าสามารถแบ่งยีน PvMsp-1 เป็น 13 block (Putaporntip et al 2002) ซึ่งประกอบด้วย conserved block 7 แห่ง และ variable block 6 แห่ง โดยบริเวณ conserved block พบการแทนที่ของเบสใน codon ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงมากกว่าการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนคงเดิมเล็กน้อยประมาณร้อยละ 5 ทั้งนี้การแทนที่ดังกล่าวส่วนใหญ่เกิดจากการแทนที่ของเบสเพียง 2 ชนิดในแต่ละตำแหน่ง (dimorphic substitution)

สำหรับบริเวณ block 13 ซึ่งครอบคลุมส่วนที่ตรงกับบริเวณที่ประกอบด้วย EGF-like domain เช่นเดียวกับ PfMsp-1<sub>19</sub> เรียกว่า PvMsp-1<sub>19</sub> ในทำนองเดียวกันพบว่าบริเวณดังกล่าวมีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนที่ดีและมีความคงที่ของลำดับเบสสูงมากกว่าบริเวณเดียวกันใน PfMsp-1<sub>19</sub> โดยพบการแทนที่ระหว่างเบส G กับเบส A เพียงตำแหน่งเดียว ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก lysine เป็น glutamic acid ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1,709 ของ Salvador I strain เมื่อพิจารณาบริเวณ variable block ทั้ง 6 แห่งซึ่งประกอบด้วย blocks 2, 4, 6, 8 และ 12 นั้น พบว่ามีความหลากหลายของลำดับเบสสูงมาก เช่น block 2 สามารถแบ่งเป็น 3 บริเวณย่อยได้แก่ block 2a ประกอบด้วยลำดับเบสพื้นฐาน (basic type) 4 แบบ และลักษณะลูกผสม (recombinant type) 5 แบบ ส่วน block 2b ประกอบด้วยลำดับเบสที่เรียงซ้ำกันเป็นชุดโดยพบทั้งหมด 19 แบบ และ block 2c ประกอบด้วยลำดับเบส basic type 4 แบบ และ recombinant type 6 แบบ เป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณ variable block 2 ของ PfMsp-1 เป็นบริเวณเดียวที่มี repeats ชัดเจน แต่สำหรับ PvMsp-1 พบ repeats ใน block 2, 6 และ 10 ด้วย ดังนั้นขอบเขตความหลากหลายของ variable block ใน PvMsp-1 จึงสูงมากกว่า PfMsp-1 (Putaporntip et al 1997; Putaporntip et al 2000) ดังนั้นนอกจาก PvMsp-1 จะมีบทบาทในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนแล้ว บริเวณ variable block ของ PvMsp-1 ยังมีความเหมาะสมสำหรับใช้ติดตามหรือใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Plasmodium vivax* ได้ดี

นอกจาก Msp-1 แล้วยังมีโปรตีนบนผิวของระยะ sporozoite และระยะที่เชื้อมาลาเรียเริ่มเจริญในเซลล์ตับ เรียกว่า sporozoite threonine- and asparagine-rich protein (STARP) ที่มีความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจน โดยยีนที่สร้างโปรตีนดังกล่าวมีความยาว 2 กิโลเบส ประกอบด้วย intron 1 แห่ง อยู่ใกล้กับปลายด้าน

5' จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน STARP จากตัวอย่าง T9/96 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของ *Plasmodium falciparum* ที่ปรับตัวเข้ากับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการกับตัวอย่างจากประเทศจีนและแอฟริกา พบว่าส่วน 5' และ 3' ของยีนมีความคงที่ของลำดับเบสสูง ในขณะที่ส่วนกลางของยีน STARP จากสายพันธุ์ T9/96 ซึ่งครอบคลุมความยาวกว่า 1 กิโลเบสนั้น มีลำดับเบสที่มีลักษณะเป็น repeats ที่สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ (1) M region หรือ mosaic region (2) Rp45 region เป็นบริเวณที่มี repeats ที่มีกรดอะมิโนซ้ำกันชุดละ 45 ตัว มีทั้งหมด 2 ชุด และ (3) Rp10 region ประกอบด้วย repeats ที่มีกรดอะมิโน 10 ตัว เรียงซ้ำกันประมาณ 26 ชุด เป็นที่น่าสังเกตว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนกลางของ STARP มักเป็นกรดอะมิโนชนิด hydrophilic อย่างไรก็ตามขอบเขตความหลากหลายของยีน STARP ยังไม่ทราบชัดเจนเนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลลำดับเบสของยีนดังกล่าวจาก 3 ตัวอย่างเท่านั้น (Fidock et al 1994a) แม้ว่าจะมีการศึกษาความหลากหลายของยีน STARP จากตัวอย่างที่ได้จากเขตปรากฏโรคบางแห่ง แต่การศึกษาดังกล่าวเป็นการตรวจสอบเพียงขนาดความยาวของยีนเท่านั้น (Fidock et al 1994b) ซึ่งไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างในระดับกรดอะมิโนได้

สำหรับหน้าที่ของโปรตีน STARP ต่อระยะ sporozoite นั้นยังไม่ทราบชัดเจน แต่จากการศึกษาผลของแอนติบอดีต่อ STARP กับการลุกลามของระยะ sporozoite เข้าสู่เซลล์ตับนั้นพบว่า แอนติบอดีดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของ sporozoite ได้อย่างมีประสิทธิภาพถึงร้อยละ 90 ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลของแอนติบอดีต่อ CSP ในการยับยั้งระยะ sporozoite ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ตับ และยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการลุกลามดังกล่าวของแอนติบอดีต่อ STARP มีความแปรผันโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดี (Pasquetto et al 1997) และจากการทดลองใช้ synthetic peptide จากส่วนต่าง ๆ ของโปรตีน STARP เพื่อทำการเกาะติดกับเซลล์ตับในหลอดทดลองพบว่ามี synthetic peptide อย่างน้อย 12 ชนิด สามารถเกาะติดกับเซลล์ตับได้ดีมาก โดยพบว่า peptide เหล่านี้พบได้ทั้งส่วน N-terminus บริเวณส่วนกลางที่มี repeats และทางด้าน C-terminus ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนว่า STARP มีส่วนสำคัญในขั้นตอนการเกาะติดของ sporozoite กับเซลล์ตับในขั้นตอนการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ (Lopez et al 2003) การศึกษาศักยภาพของ STARP ในการเป็นวัคซีนนั้น พบว่าเมื่อใช้ synthetic peptide ที่ผ่นกว่าส่วนของ STARP เข้ากับส่วนของ LSA1, LSA3 และ SALSA พบว่า peptide ดังกล่าวสามารถกระตุ้นทั้ง T cell และ B cell ได้ดี รวมทั้งยังมีความจำเพาะต่อโปรตีนเหล่านี้ที่อยู่บนผิวของ sporozoite และระยะเริ่มแรกที่เชื้อมาลาเรียเจริญในเซลล์ตับทั้งในกรณีที่ใช้ลิง *Aotus* (Perlaza et al 1998) และ ลิง chimpanzee (BenMohamed et al 2004) ในการทดลอง

แม้ว่าโรคมาลาเรียในมนุษย์มีสาเหตุจากเชื้อ *Plasmodium* ที่แตกต่างกัน 4 species แต่เชื้อมาลาเรียที่มีต้นกำเนิดจากลิงสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ และอาจพบว่าเป็นปัญหาสำคัญในเขตปรากฏโรคบางแห่งดังเช่น การพบการระบาดของมาลาเรียจากการติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* มากกว่าครึ่งหนึ่งเกิดจากเชื้อมาลาเรียชนิดนี้บนเกาะบอร์เนียว แม้ว่าผู้วิจัยตรวจพบผู้ป่วย 1 รายในประเทศไทยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ แต่การที่ประชากรลิงแสม (*Macaca fascicularis*) อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทยและลิงชนิดนี้จัดเป็นโฮสต์ในธรรมชาติของมาลาเรียดังกล่าว ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะพบการติดเชื้อมาลาเรียที่มีต้นกำเนิดจากลิงได้ในกลุ่มผู้ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยเช่นกัน การตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่มีต้นกำเนิดจากลิงชนิดที่มีศักยภาพ ในการก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium inui*, *Plasmodium simium* และ *Plasmodium brasilianum* เป็นต้น (Knowles & Gupta 1932; Chin et al 1965; Deane et al 1966; Coatney 1971; Fong et al 1971; Most 1973; Singh et al 2004; Jongwutiwes et al 2004) ย่อมไม่สามารถ

กระทำได้โดยอาศัยการตรวจทางสัณฐานวิทยาจากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดหนา แม้ว่าเชื้อมาลาเรียเหล่านี้อาจมีข้อแตกต่างในรายละเอียด เมื่อสังเกตจากแผ่นฟิล์มโลหิตชนิดบางแต่การตรวจดังกล่าวย่อมต้องอาศัยทักษะและประสบการณ์จากผู้มีความรู้ความสามารถเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรียในลิงเท่านั้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ใน SSU rRNA gene แตกต่างกัน และมีความจำเพาะสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (Snounou et al 1993; Kimura et al 1997) ดังนั้นวิธีการตรวจทาง PCR ย่อมลบลบขีดจำกัดในการตรวจหาชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงที่มีข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน gene ดังกล่าว อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียจากลิงที่พบในคนในส่วนของ mitochondrial DNA ย่อมช่วยให้เข้าใจการเกิดวิวัฒนาการของการเกิดโรคข้ามโฮสต์ของเชื้อมาลาเรียของลิง เพื่อประโยชน์ในการหาแนวทางเฝ้าระวังหรือป้องกันโรคต่อไป

## ข้อสรุป

1. จากการศึกษาตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อมาลาเรีย 1,859 ตัวอย่างและผู้ที่มีไข้และสงสัยว่าจะติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 908 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบผลการตรวจจากฟิล์มโลหิตที่ย้อมสี Giemsa และวิธี PCR ที่เพิ่มปริมาณ DNA ของ SSU rRNA gene ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดที่ก่อโรคในคนและ *Plasmodium knowlesi* พบว่าวิธี PCR ให้ผลบวกต่อการตรวจ 1,023 ตัวอย่าง โดยพบว่ามีผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวจำนวนทั้งสิ้น 900 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.0 ทั้งนี้การติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ชนิดเดียวพบในผู้ป่วย 327 รายและ *Plasmodium vivax* ชนิดเดียวพบในผู้ป่วย 568 ราย สำหรับการติดเชื้อ 2 ชนิดมี 122 ราย และยังพบการติดเชื้อร่วมกัน 3 ชนิดในผู้ป่วย 1 รายในภาคเหนือ การติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิดคิดเป็นร้อยละ 12.0 ของ นอกจากนี้จะเห็นว่าการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดพบได้ในภาคเหนือและตะวันตกมากกว่าภาคตะวันออกและภาคใต้

2. พบการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* จำนวน 446 ราย (ร้อยละ 38.9) *Plasmodium vivax* จำนวน 688 ราย (ร้อยละ 60.0) *Plasmodium malariae* จำนวน 8 ราย (ร้อยละ 0.7) *Plasmodium ovale* จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 0.4) และ *Plasmodium knowlesi* จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.1) ทั้งนี้พบเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium vivax* มากกว่า *Plasmodium falciparum* ในทุกภาค ยกเว้นภาคตะวันตกพบ *Plasmodium falciparum* มากกว่า *Plasmodium vivax* เล็กน้อย

3. อุบัติการณ์ของการติดเชื้อผสมมีแนวโน้มนำที่พบได้ในภาคเหนือและตะวันตกมากกว่าที่พบในภาคใต้และตะวันออกของประเทศ

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน STARP พบว่ามีความหลากหลายในจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของยีนแตกต่างกันตามตัวอย่างที่ศึกษาโดยมีขนาด 1847, 1877, 1982 และ 2024 เบส ซึ่งเมื่อพิจารณาในระดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 20 haplotypes

5. เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน STARP โดยการคำนวณ nonsynonymous substitutions ต่อ nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions ต่อ synonymous site (dS) พบว่า ค่า dN และ dS ใน exon 1 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ใน exon 2 พบว่า dN มากกว่า dS อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน exon 2 อยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกตามธรรมชาติ

6. เพื่อตรวจสอบ allele ของ block 2 ของยีน PfmSp-1 ในเชื้อ *Plasmodium falciparum* พบว่า ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากภาคเหนือและตะวันตกมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อหลายสายพันธุ์มากกว่าตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากภาคตะวันออกและภาคใต้

7. เพื่อตรวจสอบ allele ของ block 6 ของยีน PvMsp-1 ในเชื้อ *Plasmodium vivax* พบว่าตัวอย่างเชื้อ มาลาเรียจากภาคเหนือและตะวันตกมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อหลายสายพันธุ์มากกว่าตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากภาคตะวันออกและภาคใต้เช่นเดียวกับที่พบในประชากร *Plasmodium falciparum*

8. พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi*

### ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียจาก *Plasmodium knowlesi* ในประเทศไทยค่อนข้างต่ำและการ ติดเชื้อดังกล่าวมักพบร่วมกับการติดเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ดังนั้นการตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรียนี้โดยวิธี PCR เพื่อวินิจฉัยจึงมีความจำเป็น

2. ควรมีการนำวิธี PCR เพื่อการตรวจและประเมินสถานการณ์ของโรคในบางท้องที่โดยการสุ่ม ตัวอย่างจากพื้นที่ที่มีปัญหาการควบคุมโรค

3. ควรมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อมาลาเรียของลิงในคนต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง บริเวณที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อ และบริเวณที่มีลิงที่มีศักยภาพในการเป็นรังโรค

### ผลสัมฤทธิ์จากงานวิจัยในรูปการเผยแพร่ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ

ผู้พิมพ์	Jongwutiwes S, Putaporntip C, Karnchaisri K, Seethamchai S, Hongsrimuang T, Kanbara H.
ชื่อเรื่อง	Positive selection on the <i>Plasmodium falciparum</i> sporozoite threonine-asparagine-rich protein: Analysis of isolates mainly from low endemic areas.
วารสารที่ตีพิมพ์	<b>Gene</b> ปี 2008 volume 410 หน้า 139-46 ค่า impact factor = 2.721
ผู้พิมพ์	Putaporntip C, Hongsrimuang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongwutiwes S
ชื่อเรื่อง	Differential prevalence of <i>Plasmodium</i> infections and cryptic <i>P. knowlesi</i> malaria in humans, Thailand
วารสารที่ตีพิมพ์	<b>Journal of Infectious Diseases</b> (in press) ค่า impact factor = 6.035

## บรรณานุกรม

กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข: <http://www.thaivbd.org>

- Ak M, Jones TR, Charoenvit Y, et al. Humoral immune responses against *Plasmodium vivax* MSP1 in humans living in a malaria endemic area in Flores, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1998;29:685-691.
- Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. Lancet. 2004;364:1896-8.
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Biol Evol 2000;17:1467-1482.
- BenMohamed L, Thomas A, Druilhe P. Long-term multiepitopic cytotoxic-T-lymphocyte responses induced in chimpanzees by combinations of *Plasmodium falciparum* liver-stage peptides and lipopeptides. Infect Immun 2004;72:4376-4384.
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. J Exp Med 1990;172:379-382.
- Blackman MJ, Chappel JA, Shai S, Holder AA. A conserved parasite serine protease processes the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. Mol Biochem Parasitol 1993;62:103-114.
- Bruce-Chwatt LJ. Essential malariology. 3rd ed. London; Edward Arnold, 1993.
- Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. Science 1965;149:865.
- Coatney GR. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both?. Am J Trop Med Hyg 1971;20:795-803.
- Collins WE, Kaslow DC, Sullivan JS, et al. Testing the efficacy of a recombinant merozoite surface protein (MSP-1(19) of *Plasmodium vivax* in Saimiri boliviensis monkeys. Am J Trop Med Hyg 1999;60:350-6.
- Conway DJ, Roper C, Oduola AMJ, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, Curtis CF, Greenwood BM. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:4506-4511.
- Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. Bull World Health Organ 1966;35:805-8.
- Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, Holder AA, Riley EM. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. J Infect Dis 1996;173:765-769.
- Fidock DA, Bottius E, Brahimi K, Moelans II, Aikawa M, Konings RN, Certa U, Olafsson P, Kaidoh T, Asavanich A, Guerin-Marchand C, Druilhe P. Cloning and characterization of a novel *Plasmodium*

- falciparum* sporozoite surface antigen, STARP. Mol Biochem Parasitol 1994;64:219-232.
- Fidock DA, Sallenave-Sales S, Sherwood JA, Gachihi GS, Ferreira-da-Cruz MF, Thomas AW, Druilhe P. Conservation of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein gene, STARP, in field isolates and distinct species of *Plasmodium*. Mol Biochem Parasitol 1994;67:255-267.
- Fong YL, Cadigan FC, Coatney GR. A presumptive case of naturally occurring *Plasmodium knowlesi* malaria in man in Malaysia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1971;65:839-40.
- Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, Yanagi T, Kanbara H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. Mol Biochem Parasitol 1992;51:81-89.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human in Thailand. Emerg Infect Dis 2004.
- Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. Prog Allergy 1988;41:72-97.
- Kerr PJ, Randford-Cartwright LC, Walliker D. Proof of intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1994;66:241-248.
- Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitol Int 1997;46:91-5.
- Knowles R, Das Gupta BM. A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man. Ind Med Gaz 1932;67:301-20.
- Kumar S, Epstein JE, Richie TL, Nkrumah FK, Soisson L, Carucci DJ, Hoffman SL. A multilateral effort to develop DNA vaccines against falciparum malaria. Trends Parasitol 2002;18:129-135.
- Levitus G, Mertens F, Speranca MA, Camargo LM, Ferreira MU, del Portillo HA. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg 1994;51:68-76.
- Lopez R, Garcia J, Puentes A, Curtidor H, Ocampo M, Vera R, Rodriguez LE, Suarez J, Urquiza binding regions in *Plasmodium falciparum* sporozoite-threonine-asparagine-rich protein (STARP). Vaccine 2003; 21:2404-2411.
- Mason DP, Pattarapotikul J, Chindanond D, Supavej S, Wongcharoenyong S, Naing, Lwin T, Silachamroon U, Looareesuwan S. Malaria in southern Thailand: relationship between parasitaemia and disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95:418-9.
- Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton PN, White NJ. Mixed-species malaria infections in humans. Trends Parasitol 2004;20:233-40.
- Mertens F, Levitus G, Camargo LM, Ferreira MU, Dutra AP, Del Portillo HA. Longitudinal study of naturally acquired humoral immune responses against the merozoite surface protein 1 of

- Plasmodium vivax* in patients from Rondonia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:383-392.
- McBride JS, Newbold CI, Anand R. Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* 1985;161:160-180.
- Miller LH, Hoffman SL. Research toward vaccines against malaria. *Nature Med* 1998;4:520-524.
- Most H. *Plasmodium cynomolgi* malaria: accidental human infection. *Am J Trop Med Hyg* 1973;22:157-8.
- Pasay MC, Cheng Q, Rzepczyk C, Saul A. Dimorphism of the C terminus of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Mol Biochem Parasitol* 1995;70:217-219.
- Pasquetto V, Fidock DA, Gras H, Badell E, Eling W, Ballou WR, Belghiti J, Tartar A, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. *Eur J Immunol* 1997;27:2502-2513.
- Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ.* 1988;66:621-6.
- Perlaza BL, Arevalo-Herrera M, Brahim K, Quintero G, Palomino JC, Gras-Masse H, Tartar A, Druilhe P, Herrera S. Immunogenicity of four *Plasmodium falciparum* preerythrocytic antigens in *Aotus lemurinus* monkeys. *Infect Immun* 1998;66:3423-3428.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:49-56.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* 2000;109:111-119.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, et al. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16348-16353.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004;363:1017-24.
- Siripoon N, Snounou G, Yamogkul P, Na-Bangchang K, Thaithong S. Cryptic *Plasmodium falciparum* parasites in clinical *P. vivax* blood samples from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96:70-1.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993;58:283-92.
- Snounou G, White NJ. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol* 2004;20:333-9.

- Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop* 1999;72:13-24.
- Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 1987;195:273-287.
- Thaithong S, Sueblinwong T, Beale GH. Enzyme typing of some isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75:268-70
- Thaithong S, Beale GH, Chutmongkonkul M. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: an in vitro study of isolates mainly from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77:228-31.
- Trape JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79:181-4.
- Vanderberg J, Nussenzweig R, Most H. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V. In vitro effects of immune serum on sporozoites. *Mil Med* 1969;134:1183-1190.
- Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Petcharapirat P, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, Snounou G. Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ*. 1995;73:85-95.
- Yang C, Collins WE, Sullivan JS, Kaslow DC, Xiao L, Lal AA. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in Saimiri monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Immun* 1999;67:342-349



## โครงการวิจัยที่ 2

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) วิวัฒนาการของการดื้อยาคลอโรควินของพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมในประเทศไทย:  
พื้นฐานสำหรับชะลอการดื้อยาด้านมาลาเรีย

(ภาษาอังกฤษ) Evolution of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: a basis  
for decelerating anti-malarial drug resistance

### บทนำ

อุปสรรคสำคัญประการหนึ่งในการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทยและเป็นปัญหาระดับโลกคือการที่เชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Plasmodium falciparum* เกิดการดื้อยาหลายชนิดที่ใช้บำบัดโรคมาลาเรีย อาทิ chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, mefloquine, quinine, atovaquone และ artesunate ส่งผลให้การกำหนดมาตรฐานการรักษาโรคมาลาเรียในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามท้องที่ต่างๆ ในเขตปรากฏโรคซึ่งมีระดับการดื้อยาแตกต่างกันเพื่อให้สามารถคงประสิทธิภาพของการรักษาผู้ป่วยให้เกิดผลดีที่สุด เช่น บริเวณพื้นที่จังหวัดตาก ตรวศ และจันทบุรี จัดเป็นบริเวณที่เชื้อมาลาเรียดื้อยา mefloquine ในระดับสูงกว่าพื้นที่อื่นๆ ในประเทศไทย เป็นต้น

แม้ว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* เกิดการดื้อยา chloroquine โดยพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2506 ในบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา ซึ่งการดื้อยาดังกล่าวเกิดขึ้นประมาณ 12 ปี หลังจากมีการใช้ยา chloroquine เพื่อการบำบัดและป้องกันมาลาเรียอย่างแพร่หลาย เชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาดังกล่าวได้มีการแพร่กระจายทุกพื้นที่ของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2525 ทำให้การใช้ยา chloroquine สำหรับ *Plasmodium falciparum* ต้องยุติลง อย่างไรก็ตามยาคู่นี้ยังมีประโยชน์และมีการใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจาก *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* หรือ *Plasmodium malariae*

กลไกการดื้อยา chloroquine เกิดจากการที่เชื้อมาลาเรียที่ดื้อยา สามารถเพิ่มอัตราการขับถ่ายยาออกจาก acid vesicle ในไซโตพลาซึมได้รวดเร็วจนทำให้ระดับยาที่เหลืออยู่ในเซลล์มาลาเรียลดต่ำลงจนไม่มีผลในการทำลายเชื้อ การใช้ยา chloroquine ในการบำบัดโรคมาลาเรียอย่างแพร่หลายในอดีตส่งผลให้ประชากรของ *Plasmodium falciparum* ที่ตอบสนองต่อยา chloroquine ลดจำนวนลงและเชื้อที่ดื้อยาเพิ่มประชากรมากขึ้น จากการศึกษาการตอบสนองของ *Plasmodium falciparum* ที่เก็บรวบรวมจากผู้ป่วยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 จนถึง 2528 ต่ระดับความเข้มข้นของยา chloroquine ในหลอดทดลองพบว่าตัวอย่างเชื้อที่เก็บในปี 2527 และ 2528 เริ่มตอบสนองต่อยา chloroquine มากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องจากอิทธิพลจากการคัดเลือกประชากร *Plasmodium falciparum* โดยยาดังกล่าวลดลง หรืออาจหายไปในช่วงเวลาหนึ่ง ทำให้ประชากรเชื้อมาลาเรียที่มีความไวต่อยา chloroquine มีโอกาสเพิ่มปริมาณประชากรได้มากขึ้น ในทางตรงข้ามเชื้อมาลาเรียอาจเกิดกระบวนการผ่าเหล่าย้อนกลับ (back mutation) ภายหลังจากแรงกดดันจากยา (drug pressure) ได้ลดลงหรือหายไป ดังนั้นการเข้าใจกระบวนการเปลี่ยนแปลง ของประชากรเชื้อมาลาเรีย โดยอิทธิพลของยาดังแต่อดีตจนถึงปัจจุบันโดยศึกษา

gene ที่ควบคุมการดื้อยาต้าน มาลาเรียของ *Plasmodium falciparum* จะเป็นแนวทางสำคัญในการบริหารยา การวางแผนนโยบายการใช้ยา การเฝ้าระวังการ ดื้อยาของเชื้อมาลาเรียได้ดีขึ้นจนสามารถควบคุมโรคได้อย่างมี หลักการ ดังนั้นการเข้าใจวิวัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงลักษณะประชากรของเชื้อมาลาเรียจึงเป็นพื้นฐาน สำคัญอย่างยิ่ง

การที่เชื้อมาลาเรียเกิดการดื้อยาต้านมาลาเรียหรือไม่นั้น ไม่ได้เกิดจากผลของตัวยาโดยตรงกล่าวคือ ยา ที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียไม่มีฤทธิ์ในการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่า (mutagenic effect) ในพันธุกรรมของเชื้อ มาลาเรีย แม้ว่ายาเหล่านี้มีผลเพียงเล็กน้อยในการชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าใน *Salmonella* (Chatterjee et al 1998) แต่เนื่องจากใน กระบวนการลอกแบบ DNA ในขณะที่เซลล์แบ่งตัวซึ่งอาจเกิดการผิดพลาดโดยธรรมชาติ ในขั้นตอนการนำนิวคลีโอไทด์ที่ complementary กับที่อยู่บนสาย DNA ต้นแบบ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าว เกิดขึ้นได้ตลอดเวลาในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดแต่เกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำมาก การดื้อยาของ *Plasmodium falciparum* ต่อ chloroquine นั้นเชื่อกันว่าเกิดขึ้นอยู่แล้วในธรรมชาติในอัตราประมาณ 1 ใน  $10^{20}$  (หรือร้อยล้านล้านล้าน) (Su et al 1997) แต่ปัจจัยอื่นๆ มีผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อยา เช่น การใช้ยาไม่เหมาะสม หรือให้ยาในระดับต่ำกว่ามาตรฐานของการรักษา เป็นต้น (Wongsrichanalai et al 2002)

สำหรับกลไกทางพันธุกรรมที่ควบคุมการดื้อยา chloroquine ของ *Plasmodium falciparum* นั้นอยู่ ภายใต้อาการ แสดงออกของ gene อย่างน้อย 2 ชนิด ชนิดที่มีความเกี่ยวข้องมากที่สุดคือ (1) chloroquine-resistant transporter หรือ Pfcrt ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 7 ประกอบด้วย 13 exons (Fidock et al 2000; Djimde et al 2001) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ Pfcrt gene ในสายพันธุ์ที่มีระดับการตอบสนองต่อยา ดังกล่าวแตกต่างกันจากหลายภูมิภาคทั่วโลก พบความสัมพันธ์ระหว่างการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้ กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 76 เปลี่ยนไปโดยสายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อ chloroquine จะเป็น lysine ในขณะที่สาย พันธุ์ที่ดื้อยาเป็น threonine (Dorsey et al 2001; Mayor et al 2001; Mehlotra et al 2001; Abdel-Muhsin et al 2004; Huaman et al 2004) นอกจากนี้ยังพบพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน codon อื่น ๆ ใน Pfcrt gene ได้แก่ 72, 74, 75, 144, 160, 220, 271, 326, 356 และ 371 ซึ่งการแทนที่ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตาม ภูมิภาคของโลก (Chen et al 2003; Vieira et al 2004; Vathsala et al 2004; Nagesha et al 2003) (2) multiple drug resistance 1 (Pfmdr1) ซึ่งอยู่บน โครโมโซมแท่งที่ 5 พบว่าการแทนที่ของ nucleotide ใน codon 86, 1034, 1042 และ 1246 มีความสัมพันธ์กับ การดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย (Foote et al 1990) และพบว่ากลไก การเพิ่มจำนวนชุดของ gene (gene amplification) มีความ สำคัญต่อการคุณลักษณะการดื้อยาของเชื้อต่อ mefloquine และ halofantrine ด้วย (van ES et al 1994; Ekong et al 1993) อย่างไรก็ตามพบว่า รูปแบบของ allele ของ Pfcrt และ Pfmdr1 ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อมาลาเรียเกิด การแลกเปลี่ยน พันธุกรรมระหว่างการสืบพันธุ์แบบใช้เพศในยุงกันปล่องที่เป็นพาหะและเนื่องจาก gene ทั้ง 2 ชนิดอยู่บนคนละ โครโมโซมจึงสามารถแยกเป็นอิสระจากกันในกระบวนการปฏิสนธิของเชื้อมาลาเรีย (Adagut et al 2001)

เป็นที่น่าสังเกตว่าการดื้อยา chloroquine ของ *Plasmodium falciparum* มีจุดเริ่มต้นแตกต่างกัน ประมาณ 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณพรมแดนประเทศไทย-กัมพูชา และบริเวณประเทศโคลอมเบียในอเมริกากลาง

หลังจากนั้น การแพร่กระจายของสายพันธุ์ที่ดื้อยาได้ดำเนินไปตามภูมิภาคต่างๆ อย่างมากจนถึงปัจจุบัน สำหรับประเทศ ต่างๆ ในทวีปแอฟริกาการแพร่กระจายดังกล่าวเกิดขึ้นชัดเจนประมาณปลายทศวรรษที่ 70 ส่งผลให้มีผู้เสียชีวิต จากโรคมalariaเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากและการใช้ chloroquine เพื่อรักษาโรคมalariaเรียก *Plasmodium falciparum* ต้องยุติลงในหลายพื้นที่ (Wongsrichanalai et al 2002) อย่างไรก็ตามภายหลังจาก การหยุดใช้ยา chloroquine ระยะเวลาหนึ่งกลับพบว่า ประชากร *Plasmodium falciparum* มีการตอบสนองต่อยา chloroquine เป็นสัดส่วนเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่หยุดใช้ยา ในหลายประเทศในทวีปแอฟริกา ดังเช่น การศึกษาในประเทศมาลาวี พบว่าในปี พ.ศ. 2541 พบเชื้อที่ยังคงตอบสนองต่อยา chloroquine เพียงร้อยละ 3 แต่ในปี พ.ศ. 2543 กลับพบเพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 47 ซึ่งการหยุดใช้ยา ดังกล่าวเริ่มขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2536 (Mita et al 2003) แสดงว่าการใช้ยา chloroquine มีอิทธิพลสำคัญต่อการคัดเลือกลักษณะ ประชากรรวมทั้งพันธุกรรม ของประชากร (population genetics) ของ *Plasmodium falciparum* อย่างชัดเจน นอกจากนี้ การพบสัดส่วน ของเชื้อที่ตอบสนองต่อยา chloroquine ได้ดีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้นเป็นการชี้โดยอ้อมว่าเชื้อ มาลาเรียที่มีพันธุกรรมที่ดื้อต่อยา chloroquine อาจมีความสามารถในการเจริญได้ไม่ด้อยเท่ากับ สายพันธุ์ที่ ตอบสนองดีต่อยาดังกล่าว

การเข้าใจวิวัฒนาการของการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย นับว่ามีความสำคัญต่อการวางแผน ทางการควบคุมโรคมalariaเรียด้วยยาด้านมาลาเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้ในปัจจุบัน โดยการดื้อยา chloroquine นับเป็น แม่แบบและบทเรียนที่ดีในการบริหารและวางนโยบายการใช้ยาด้านมาลาเรียเพื่อให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ ชั่วที่สุด นอกเหนือจากการใช้ยาด้านมาลาเรียที่มีผลต่อเชื้อหลายๆ ระยะเวลาพร้อมกัน เพื่อลดโอกาสการกลายพันธุ์ ของเชื้อ โดยอาศัยหลักการใช้ยาด้านไวรัสโรคเอดส์ (human immunodeficiency virus-1, HIV-1) (Autran et al 1997) แม้ว่าหลักการ ดังกล่าวน่าจะส่งผลดีต่อการรักษามalariaเรีย แต่ถ้าพิจารณาถึงลักษณะทางพันธุกรรม อัตราการกลายพันธุ์และ ชีวิตวิทยาของจุลชีพทั้ง 2 ชนิด จะพบว่ามี ความแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง กล่าวคือเชื้อ มาลาเรียมีพันธุกรรมที่เป็น DNA มีอัตราการกลายพันธุ์ในธรรมชาติต่ำกว่าไวรัส HIV-1 หลายพันเท่า (Perrino et al 1989; Roberts et al 1988; Preston et al 1988) และในการสืบพันธุ์แบบ ใช้เพศของเชื้อมาลาเรียมีการ แลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม (meiotic recombination) อันเป็นขั้นตอนหนึ่งที่ทำให้ เกิดความหลากหลายทาง พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียมีกลไกที่แตกต่างจากไวรัส HIV-1 ซึ่งมีองค์ประกอบ พันธุกรรมเป็น RNA อย่าง เด่นชัด (Walliker et al 1983)

เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียได้เริ่มก่อตัวครั้งแรกในชายแดนไทย-กัมพูชา และประเทศไทยมี มาตรการการเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งหน่วยวิจัยมาลาเรีย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ดำเนินการเฝ้า ระวัง ทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียและเก็บรักษาตัวอย่างเชื้อเป็นระยะเวลานานกว่า 25 ปี (Thaithong et al 1983a; 1983b; 1984; 1985; 1988a; 1988b) ดังนั้น การวิเคราะห์ Pfcrt และ Pfmdr1 จากตัวอย่างในอดีต เปรียบเทียบกับตัวอย่างในปัจจุบันจะช่วยให้ทราบวิวัฒนาการของการดื้อยา chloroquine และปรากฏการณ์ที่ เชื้อมาลาเรียเริ่มมีความไวต่อยา chloroquine ภายหลังจาก หยุดใช้ยาดังกล่าวเพื่อรักษาโรคมalariaเรียจาก

*Plasmodium falciparum*

การศึกษานี้เป็นการประเมินสภาวะในการเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ที่เกิดการดื้อต่อยา chloroquine ในประเทศไทยโดยเป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงระยะยาวจากอดีตซึ่งจะใช้ ตัวอย่างที่หน่วยวิจัยมาลาเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้เก็บรวบรวมในอดีตจากเขตปรากฏโรคหลายท้องที่โดย ศาสตราจารย์กิตติคุณ สดศรี ไทยทอง และจะทำการเก็บรวบรวมเพิ่มในช่วงเวลาที่กำหนด โดยใช้กลุ่มตัวอย่างเชื้อที่มีช่วงเวลากการเก็บแตกต่างกันประมาณ 3-5 ปี เนื่องจากใน ธรรมชาติอาจพบการติดเชื้อร่วมกันในผู้ป่วยระหว่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา chloroquine และสายพันธุ์ ที่ตอบสนองต่อยาดังกล่าว ดังนั้นในกรณีที่พบสัญญาณซ้อนกันของลำดับเบสของ Pfcr1 gene และ Pfmdr1 gene ใน electropherogram จะทำการ subclone genes จากตัวอย่างดังกล่าวเพื่อแยกสายพันธุ์ที่ต่างกันออกจาก กันโดยจะหาลำดับเบสจาก recombinant DNA ที่ถูกเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้ หลักการทาง population genetics และ molecular evolution

### วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์ลำดับเบสของ genes สำหรับ Pfcr1 และ Pfmdr1 ซึ่งควบคุมการตอบสนองของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ต่อยา chloroquine จากตัวอย่างเชื้อที่เก็บในอดีตตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991 จนถึงปัจจุบัน
2. ศึกษาวิวัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงประชากรของ *Plasmodium falciparum* จากการตรวจสอบ genes ที่ควบคุมการดื้อยาเพื่อให้ทราบว่า การตอบสนองของยา chloroquine ที่ดีขึ้นในระยะหลังจกหยุดใช้ยาไป ระยะหนึ่งเกิดจากการผ่าเหล่ากลับ (back mutation) ของสายพันธุ์ที่ดื้อยาหรือเกิดจากการเพิ่มปริมาณของประชากรเชื้อมาลาเรียที่ตอบสนองต่อยา chloroquine ซึ่งมีปะปนกับสายพันธุ์ที่ดื้อยาในธรรมชาติ

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### ตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium falciparum*

ตัวอย่าง *Plasmodium falciparum* จากผู้ป่วยซึ่งได้ทำการเก็บรวบรวมตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991 จนถึงปัจจุบัน และได้รับการตรวจระดับความไวของเชื้อต่อยา chloroquine ตลอดจนยาอื่นๆ อีกหลายขนานและได้เก็บให้คงสภาพชีวิตภายใต้อุณหภูมิต่ำ โดยหน่วยวิจัยมาลาเรีย สถาบันวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย และตัวอย่างเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยบริเวณจังหวัดตามชายแดนของประเทศไทย ซึ่งจะเก็บรวบรวม ติดต่อกันอีก 3 ปี จำนวน 60 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างที่จะใช้วิเคราะห์ทั้งสิ้นประมาณ 165 ตัวอย่าง

#### การทดสอบการตอบสนองของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ต่อยา chloroquine

นำเชื้อมาลาเรียที่ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจนเจริญดีแล้ว และส่วนใหญ่อยู่ในระยะวงแหวน (ring form) มีจำนวนเชื้ออย่างน้อยตั้งแต่ 1% ขึ้นไปนำมาทดสอบการตอบสนองต่อยาตามวิธีของ Thaithong et al. 1983 ตามขั้นตอนดังนี้

1. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้และจะทำการทดสอบการตอบสนองต่อยา พร้อมกับทำฟิล์มเลือดชนิดบางเพื่อตรวจสอบ % parasitaemia ตั้งแต่ก่อนทำการเจือจางเชื้อ

2. ทำการล้าง un-infected red blood cells เตรียมไว้สำหรับใช้เจือจางเชื้อมาลาเรียที่จะทดสอบการตอบสนองต่อยา ปริมาณขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ (ควรเตรียมไว้มากกว่าปริมาณที่จะใช้จริง)

3. ทำการเจือจางยาที่จะใช้ทดสอบได้แก่ chloroquine ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัม (completed medium) ให้มีความเข้มข้นในหน่วย Molar (M) chloroquine ดังนี้  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$  และ control ที่ปราศจากยา

4. เติมน้ำที่เจือจางในแต่ละความเข้มข้นลงในหลุมของ TC-96 micro-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเพิ่มหลุมที่ไม่มียา (มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมเท่านั้น) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control) เชื้อเจริญเป็นปกติ TC-micro-well plate: Column 1-12 → malaria parasites ที่จะทำการทดสอบการตอบสนองต่อยา Row A-H → control wells (A1-A12) and drug dilution wells (B-H=1-12) at each dilution

5. ดูดเชื้อที่ต้องการทดสอบการตอบสนองต่อยาจากจานเพาะเชื้อใส่ลงในหลอดทดลอง (หลอดเซนตริฟิวจ์ทิวบ์กันแหลมปากกว้างมีขีดบอกปริมาตรเพื่อใช้คู่กับปิเปตทิฟไฟด์ เพราะถ้าปากหลอดแคบจะไม่สามารถปิเปตทิฟไฟด์เข้าไปดูดเลือดได้) นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที แล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ทิ้งไปเหลือไว้ปริมาตร 1 เท่าของ packed cell เพื่อทำให้เป็น 50% haematocrit แล้วทำการเจือจางเชื้อให้มีจำนวนเชื้อ 0.2-0.5 % ด้วยเลือดที่ล้างเตรียมไว้ พร้อมทำฟิล์มเลือดชนิดบางไว้นับจำนวนเชื้อตั้งต้นจากนั้นเติมเชื้อที่เจือจางแล้วลงในแต่ละหลุมของ TC-96 micro-well plate ที่เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา (กลุ่มควบคุม) และมียาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไว้เรียบร้อยแล้วหลุมละ 10 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เลือดผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (หมุน plate ไป-มาในทิศทางตาม-ทวนเข็มนาฬิกา)

6. นำ TC-96 micro-well plate วางลงในเตสสิเคเตอร์ จุดเทียนเพื่อทำให้บรรยากาศภายในเตสสิเคเตอร์มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) ประมาณ 5-8% (candle jar method) นำไปป้อนในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ตั้งแต่วันแรกลงในแต่ละหลุม ตำแหน่งเดิม (วันแรกที่ 0 ชั่วโมง) และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้งเมื่อครบ 48 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นจึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อวันแรก, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง รวมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 300 ไมโครลิตรต่อหลุมต่อความเข้มข้นต่อหนึ่งเชื้อ

8. เมื่อครบ 72 ชั่วโมงให้นำแต่ละ plate มาวางเอียงทำมุมประมาณ 30-45 องศากับพื้นเพื่อให้เลือดตกตะกอนมาทางด้านล่างของหลุม เตรียม label กระดาษสไลด์ที่จะใช้ทำฟิล์มเลือด เมื่อเลือดตกตะกอนดีแล้วให้ใช้ปิเปตทิฟขนาด 200 ไมโครลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไปแล้วดูดเฉพาะเลือดชั้น ๆ ขึ้นมาทำฟิล์มเลือดชนิดบางในแต่ละหลุมโดยเริ่มทำฟิล์มเลือดจากหลุมที่มีความเข้มข้นสูงสุดไปหาลดต่ำสุด และตามด้วยหลุมที่ไม่มียาดากสไลด์ทั้งหมดให้แห้ง แล้วจึง fix สไลด์ทั้งหมดด้วย absolute methyl alcohol นำไปย้อมด้วยสีจิมซา เพื่อใช้ตรวจหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียที่ทำการทดสอบยาได้ 95-100%

(MIC, Minimum Inhibitory Concentration) ในการทดสอบยาทุก ๆ ครั้ง ควรจะต้องมีเชื้อที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ ที่รู้ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

การเตรียม DNA ของเชื้อมาลาเรีย (สำหรับการศึกษายีน Pfmdr1)

นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 200  $\mu$ l ที่ได้มาทำการสกัด DNA โดยใช้ QIAamp DNA mini kit ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

1. เติมน้ำฟเฟออร์ ATL ลงไป 180  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down
2. เติมน้ำ proteinase K 20  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที นำไป spin down
3. นำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดไป incubate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อให้เม็ดเลือดแดงถูกย่อยอย่างสมบูรณ์
4. หลังจากนั้นนำไป spin down แล้วเติมน้ำฟเฟออร์ AL 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที
5. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที นำไป spin down
6. เติมน้ำ absolute ethanol 200  $\mu$ l ลงไป และผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไป spin down
7. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp spin column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
8. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
9. เติมน้ำฟเฟออร์ AW1 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
10. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
11. เติมน้ำฟเฟออร์ AW2 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
12. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
13. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดบัฟเฟออร์ส่วนที่เหลือออกให้หมด
14. นำ QIAamp spin column ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ที่สะอาด
15. เติมน้ำฟเฟออร์ AE ลงไป 30  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
17. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
18. ดูดเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR ต่อไป

การเตรียม RNA ของเชื้อมาลาเรีย (สำหรับการศึกษายีน Pfcr1)

1. นำตัวอย่างเลือดที่เก็บรักษาไว้ใน RNA later ที่อุณหภูมิ -80°C มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย (thawing)

2. นำมาปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที
3. ตูดส่วนบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาสกัด RNA ด้วย RNA Blood Mini Kit (Qiagen) ตามขั้นตอนในข้อ 4 ต่อไป
4. ตูดตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เดิมบัฟเฟอร์ EL ลงไปในอัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากัน
5. Incubate ส่วนผสมในข้อ 4 ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10-15 นาที (ในระหว่าง incubate ให้ mix เป็นช่วงสั้น ๆ ประมาณ 2 ครั้ง)
6. นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นตูดส่วนใสทิ้ง
7. เดิมบัฟเฟอร์ EL ให้ปริมาณเป็น 2 เท่าของตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ได้ ผสมให้เข้ากัน
8. นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นตูดส่วนใสทิ้งให้หมด
9. เดิมบัฟเฟอร์ RLT (ที่เติม beta-mercaptoethanol แล้ว) 350 ul (กรณีที่มีปริมาตรของเลือดน้อยกว่า 0.5 ml) หรือ 600 ul (กรณีที่มีปริมาตรของเลือดอยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.5 ml)
10. ตูด lysate ที่ได้จากข้อ 9 ลงใน QIAshredder spin column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด นาน 2 นาที หลังจากนั้นทิ้งส่วน QIAshredder spin column ไป เก็บส่วน lysate ที่ได้ไว้
11. เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 เท่า (350 ul หรือ 600 ul) ลงในส่วน homogenized lysate ที่ได้จากข้อ 10 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไปเปิด (ห้ามนำไปปั่น)
12. ตูดส่วนผสมทั้งหมดในข้อ 11 ลงใน QIAamp spin column ที่อยู่ใน collection tube นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งส่วนของเหลวและ collection tube ไป
13. นำ QIAamp spin column จากข้อ 12 ไปใส่ใน collection tube ใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 700 ul ลงใน column และปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งส่วนของเหลวและ collection tube ไป
14. นำ QIAamp spin column จากข้อ 13 ไปใส่ใน collection tube ใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ul ลงใน column และปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งส่วนของเหลวและ collection tube ไป
15. นำ QIAamp spin column จากข้อ 14 ไปใส่ใน collection tube ใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ul ลงใน column และปั่นที่ความเร็วสูงสุด 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนของเหลวและ collection tube ไป
16. นำ QIAamp spin column จากข้อ 15 ไปใส่ใน collection tube ใหม่ และนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุด 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
17. นำ QIAamp spin column จากข้อ 16 ไปใส่ในหลอด 1.5 ml ใหม่ที่สะอาด เติม RNase-free water ลงไป 30-50 ul ตรงบริเวณ column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

### การเตรียมและเพิ่มปริมาณ cDNA (สำหรับการศึกษายีน Pfcrt)

1. เตรียมอุปกรณ์ที่จะใช้ในขั้นตอนต่าง ๆ ให้ปราศจาก RNase โดยใช้ 0.1% DEPC ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป autoclave เพื่อกำจัด DEPC ที่เหลือ

2. เตรียม reaction mixture ซึ่งมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

2.1 MgCl <sub>2</sub> (5 mM)	2	ul
2.2 10X RT buffer	1	ul
2.3 RNase free water	3.75	ul
2.4 dNTP mixture (1 mM)	1	ul
2.5 RNase Inhibitor (1 unit/ul)	0.25	ul
2.6 AMV reverse transcriptase (0.25 unit/ul)	0.5	ul
2.7 Oligo dT-Adapter primer (0.125 uM)	0.5	ul
2.8 DNA sample	1	ul

3. ทำการสร้างสาย complementary DNA โดย incubate ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที อุณหภูมิ 99°C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 5 นาที

4. ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ในส่วนของยีน Pfcrt ซึ่งใน PCR mixture มีส่วนประกอบดังนี้

4.1 DNA template	2	ul
4.2 forward primer	0.2	ul
4.3 reverse primer	0.2	uM
4.4 10X <i>Ex Taq</i> Buffer	1	ul
4.5 dNTP Mixture อย่างละ	2.5	mM
4.6 sterilized distilled water	6.02	ul
4.7 <i>TaKaRa ExTaq</i> DNA polymerase	0.25	unit/ ul

5. PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR thermal cycler) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

5.1 ในขั้นตอนแรกต้องทำการแยกสาย DNA (DNA denaturation) ก่อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย

5.2 การแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที

5.3 ขั้นตอนที่ primer จับกับ template DNA (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที

5.4 การสร้างสาย DNA จาก DNA ดั้งเดิม (primer extension) ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที



โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 35 รอบ และขั้นตอนการสร้างสาย DNA สมบูรณ์หลังรอบสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

#### การตรวจผลิตผล PCR โดย agarose gel electrophoresis

1. เตรียม agarose ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยชั่ง agarose 1 กรัม ละลายใน TAE บัฟเฟอร์ 100 ml
2. นำไปต้มจนเดือด เขย่าเบา ๆ ให้ agarose เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 ถึง 60°C นำไปเทลงบน gel chamber ที่จัดไว้ แล้วใส่ comb ทิ้งไว้จนแข็งตัว
3. เติม TAE ลงไปบนหน้าเจลพอท่วม เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว เพื่อช่วยให้ดึง comb ออกได้ง่ายขึ้น และเป็นการป้องกันไม่ให้หลุม (well) ในเจลแตก ค่อย ๆ ดึง comb ออกโดยดึงปลายทั้ง 2 ข้างออกพร้อม ๆ กันระวังอย่าให้มีการฉีกขาดของเจลแล้วนำไปใส่ใน electrophoresis chamber ซึ่งมี TAE อยู่ในปริมาณที่ท่วมหน้าเจล
4. นำ PCR product 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl ใช้ไมโครปิเปตต์หยอดแต่ละตัวอย่างลงในหลุมเจลโดยเรียงลำดับและจัดบันทึกไว้
5. ใช้ *MHind* III และ marker VI เป็น DNA บอกขนาดสำหรับผลิตผล PCR รอบแรกและรอบที่สอง เพื่อเปรียบเทียบขนาดโดยประมาณของผลิตผล PCR ปิดฝา electrophoresis chamber ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า จัดให้ DNA วิ่งเข้าหาขั้วบวกใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 volts เป็นเวลา 30 นาที
6. นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 µg ต่อ µl เป็นเวลา 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจากแหล่งกำเนิดแสง (UV transilluminator) และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบ DNA ต่อไป โดยการเปรียบเทียบกับ DNA บอกขนาด

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และรูปแบบของแถบ DNA วิเคราะห์ข้อมูลโดยอาศัยหลักการของ population genetics และ molecular evolution

### ผลการวิจัย

#### ผลการทดสอบความไวของยาในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบความไวของยา chloroquine จากตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะเยือกแข็งและจากการเก็บรวบรวมจากผู้ติดเชื้อมาลาเรียในปี ค.ศ. 1991, 2003, 2005, 2006 และ 2007 จำนวนทั้งสิ้น 165 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีระดับ MIC ที่  $5 \times 10^{-7}$  M โดยตัวอย่างที่ให้ผลดังกล่าวมีร้อยละ 84.3 (139 ตัวอย่าง) และตัวอย่างที่มีระดับ MIC ที่  $1 \times 10^{-6}$  M มีร้อยละ 10.9 (18 ตัวอย่าง) และตัวอย่างที่มีระดับ MIC ที่  $2 \times 10^{-7}$  M มีร้อยละ 4.8 (8 ตัวอย่าง) สำหรับรายละเอียดผลการทดสอบยาในแต่ละปีแสดงในตารางที่ 2.1 เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อที่ให้ผลระดับ MIC ที่  $2 \times 10^{-7}$  M พบเฉพาะในปี ค.ศ. 1991 และ 2003 แต่ไม่พบในปี ค.ศ. 2004-2007 ซึ่งอาจแสดงถึงการเพิ่มระดับการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียมากขึ้นหลังช่วงปี ค.ศ. 2003 อย่างไรก็ตามแนวโน้มดังกล่าวควรได้รับการยืนยันจากการวิเคราะห์ตัวอย่างมากขึ้นในปีต่อไป

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบการตอบสนองของ *Plasmodium falciparum* ต่อยา chloroquine

ปีที่เก็บตัวอย่างเชื้อ ค.ศ.	จำนวนตัวอย่างที่มีค่า minimum inhibitory concentration ของยา chloroquine		
	$2 \times 10^{-7}$ M	$5 \times 10^{-7}$ M	$1 \times 10^{-6}$ M
1991	6	45	4
2003	2	24	0
2004	0	22	3
2005	0	12	0
2006	0	11	1
2007	0	25	10
รวม	8	139	18

### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน Pfcrt

เนื่องจากยีน Pfcrt เป็นยีนที่ประกอบด้วย 13 exons และมี introns คั่นระหว่าง exons เหล่านี้ และเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ใน intron หลายแห่งประกอบด้วย homopolymer ของ adenine หรือ thymine รวมทั้งการมีสัดส่วนของ adenine และ thymine สูงมากถึงร้อยละ 90 คุณลักษณะดังกล่าวจึงเป็นอุปสรรคต่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ intron แม้จะมีขนาดสั้น ดังนั้นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละ exon จึงประสบปัญหาจากการไม่สามารถใช้ primer จากส่วนของ intron ได้ ดังนั้นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของ genomic DNA จึงไม่สามารถบรรลุผลได้ง่าย จึงต้องใช้วิธีการเพิ่มปริมาณ DNA จาก messenger RNA ของยีน Pfcrt โดยวิธี reverse transcriptase (RT) PCR ซึ่งตัวอย่างผลผลิต PCR ที่ได้แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงตัวอย่างผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณของยีน Pfcrt โดยวิธี RT-PCR, DNA บอกลำดับคือ  $\lambda$ Hind III อยู่ lane ขวาสุด

เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Pfcrt พบว่าประกอบด้วย codon ทั้งหมด 424 ตัวโดยประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,272 ตำแหน่ง จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Pfcrt จากตัวอย่างที่ได้จากภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์และทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 12 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง codon ที่ 72, 74, 75, 76, 97, 144, 160, 220, 271, 326, 356 และ 371 โดยตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ที่ไวต่อยา chloroquine มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวดังนี้ cysteine, methionine, asparagines, lysine, histidine, alanine, leucine, alanine, glutamic acid, asparagine, isoleucine และ arginine ทั้งนี้ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 76 เป็นตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา chloroquine มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจำนวน haplotype บนพื้นฐานของการแทนที่ของกรดอะมิโนเหล่านี้พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 14 แบบ โดยเมื่อพิจารณาถึงจำนวนการเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน codon เหล่านี้พบการแทนที่สำหรับแต่ละ haplotype ที่แตกต่างกัน โดยพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ได้มากถึง 9 ตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยา chloroquine นอกจากนี้ haplotype ที่พบยังมีความแตกต่างกันตามภูมิภาค ในขณะที่บาง haplotype พบได้ร่วมกันในหลายภูมิภาค (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.2 รูปแบบและจำนวนตำแหน่งที่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนใน Pfcrt และการกระจายทางภูมิศาสตร์

Allele	No. of Mutations	Pfcrt genotype												Distribution
		72	74	75	76	97	144	160	220	271	326	356	371	
I	0	C	M	N	K	H	A	L	A	Q	N	I	R	All regions
II	6	C	I	E	K	H	A	L	S	E	S	I	I	Africa
III	8	C	I	E	T	H	A	L	S	E	S	T	I	Asia, Africa
IV	7	C	I	E	T	H	A	L	S	E	S	I	I	Asia, Africa
V	9	C	I	E	T	L	A	L	S	E	S	T	I	Asia
VI	?	C	I	E	T	L	?	?	A	E	S	T	I	Asia
VII	?	C	I	D	T	?	?	?	S	?	?	?	?	Asia
VIII	5	C	M	E	T	Q	A	L	S	Q	N	I	T	South America
IX	4	C	M	N	T	H	A	L	S	Q	D	L	R	South America
X	4	C	M	N	T	H	T	Y	A	Q	D	I	R	Asia
XI	4	C	M	N	T	H	T	Y	A	Q	D	L	R	Asia
XII	?	C	M	N	N	?	?	?	?	?	?	?	?	Asia
XIII	5	S	M	N	T	H	A	L	S	Q	D	L	R	South America, Oceania
XIV	5	S	M	N	T	H	T	Y	A	Q	D	I	R	Asia

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน Pfcrt จากตัวอย่างทั้งหมด 165 ตัวอย่าง พบว่ามีการแทนที่ของ codon ทั้งหมด 9 ตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ตอบสนองดีหรือมีความไวต่อยา chloroquine ซึ่งตรงกับ allele ที่ III (ดูตารางที่ 2.1) โดยพบทั้งหมด 156 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 94.5 และอีก 9 ตัวอย่างที่เหลือหรือร้อยละ 5.5 พบการเปลี่ยนแปลงของ codon ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ตรงกับ allele ที่ V เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างที่เก็บตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นต้นมาพบว่าทุกตัวอย่างมีการแทนที่ของ codon 9 ตำแหน่ง ในขณะที่ allele ที่ V ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของ codon น้อยกว่าสามารถพบได้แม้จะพบในอัตราที่ต่ำ อย่างไรก็ตามในตำแหน่ง codon ที่ 76 พบว่าทุกตัวอย่างมีกรดอะมิโนเป็น threonine ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเชื้อมาลาเรียทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ในการศึกษานี้ล้วนมีคุณลักษณะที่ดื้อต่อยา chloroquine

ตารางที่ 2.3 รูปแบบการแทนที่ของกรดอะมิโนในยีน Pfcrt จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในประเทศไทย

Year collected	Allele			
	CIETLALSESTI		CIETHALSESTI	
	No. of samples	Frequency (%)	No. of samples	Frequency (%)
1991	5	3.0	50	30.3
2003	3	1.8	23	13.9
2004	0	0	25	15.2
2005	0	0	12	7.3
2006	0	0	12	7.3
2007	0	0	35	21.2
รวม	8	4.8	157	95.2

#### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน Pfmdr1

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Pfmdr1 จากทั้งหมด 165 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างที่มีมาก่อน พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง โดย 6 ตำแหน่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดดังนี้ 256T→A (Tyr86Asn), 550A→T (Tyr184Phe), 3100A→T (Ser1034Cys), 3124A→G (Asn1042Asp), 3677T→A (Phe1226Tyr), 3736G→T (Asp1246Tyr) 3888A→C (Ser1296Ser) และ 3894A→ (Ser1298Ser) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจากการวิเคราะห์ตัวอย่างจากประเทศไทยสามารถจำแนกยีน Pfmdr1 ได้เป็น 10 haplotypes (ตารางที่ 2.3) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอ

โอไทด์ใน codon ที่ 1034 และ 1246 ไม่พบในทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ในการศึกษานี้ เป็นที่น่าสังเกตว่าการเปลี่ยนแปลงของ codon ที่ 86 จาก asparagine เป็น tyrosine นั้นพบในตัวอย่างทั้งหมด 156 ตัวอย่างหรือร้อยละ 94.5 (ตารางที่ 2.4) ซึ่งจากการศึกษาของ Mita และคณะ (Mita et al 2006) พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของ codon ที่ 76 ใน Pfcrt จาก lysine เป็น threonine มักมีความสัมพันธ์กับการดื้อยา chloroquine ในระดับที่สูง

ตารางที่ 2.4 รูปแบบการแทนที่ของกรดอะมิโนในยีน Pfmdr1 จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในประเทศไทย

Allele	Nucleotide substitutions at 256/550/3100/3124/3677/3736/3888/3894	Amino acid at 86/184/1034/1042/1226/1246/1296/1298	No. of Isolates	Frequency (%)
I	T/A/A/A/T/A/A	Y/Y/S/N/Y/D/S/P	9	5.5
II	A/T/A/A/T/A/A	N/F/S/N/F/D/S/P	59	35.8
III	A/T/A/G/T/A/A	N/F/S/D/F/D/S/P	15	9.1
IV	A/T/A/A/T/C/C	N/F/S/N/F/D/S/P	1	0.6
V	A/A/A/A/T/A/A	N/Y/S/N/F/D/S/P	33	20.0
VI	A/T/A/A/T/C/A	N/F/S/N/F/D/S/P	2	1.2
VII	A/T/A/A/T/A/C	N/F/S/N/F/D/S/P	7	4.2
VIII	A/T/A/G/T/A/A	N/F/S/D/F/D/S/P	1	0.6
IX	A/A/A/A/A/A/A	N/Y/S/N/Y/D/S/P	27	16.4
X	A/T/A/A/A/A/A	N/F/S/N/Y/D/S/P	11	6.7

ตารางที่ 2.5 ความถี่ของการแทนที่ของกรดอะมิโนใน codon ต่าง ๆ ของยีน Pfmdr1 จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในประเทศไทย

Position-Nucleotide	Position-Amino acid	No of Isolate	Frequency (%)
256-T	86-asparagine	9	5.5
256-A	86-tyrosine	156	94.5
550-A	184-tyrosine	69	41.8
550-T	184-phenylalanine	96	58.2
3100-A	1034-serine	165	100.0
3100-T	1034-cysteine	0	0.0
3124-A	1042-asparagine	149	90.3
3124-G	1042-aspartic acid	16	9.7
3677-T	1226-phenylalanine	118	71.5
3677-A	1226-lysine	47	28.5
3736-G	1246-aspartic acid	165	100.0
3736-T	1246-tyrosine	0	0.0
3888-A	1296-serine	162	98.2
3888-C	1296-serine	3	1.8
3894-A	1298-proline	157	95.1
3894-C	1298-proline	8	4.9

### วิจารณ์ผลการวิจัย

ปัญหาการดื้อยาด้านมาลาเรียของ *Plasmodium falciparum* ได้ส่งผลกระทบต่อความควบคุมโรคมาลาเรียในหลายภูมิภาคของโลก สำหรับยาที่มีความสำคัญและได้รับการศึกษาถึงกลไกการดื้อยารวมทั้งข้อมูลทางระบาดวิทยาเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยา ได้แก่ ยาคลอโรควิน (chloroquine) ยาในกลุ่มที่ต้านการทำงานของเอนไซม์ dihydrofolate reductase ของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่ ยาไพริเมตตามีน (pyrimethamine) และโปรกวานิล (proguanil) ตลอดจนยาในกลุ่มซัลฟา (sulfa) การเข้าใจต้นกำเนิด (origin) ตลอดจนการแพร่กระจายและรูปแบบการแพร่กระจาย (pattern of spread) ย่อมมีประโยชน์พื้นฐานในการวางมาตรการเพื่อการควบคุมการดื้อยาในประชากรของเชื้อมาลาเรียต่อไป สำหรับรายละเอียดเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาด้านมาลาเรียที่สำคัญมีในบทที่ 4 ว่าด้วยอนุชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย

การดื้อยา chloroquine ของ *Plasmodium falciparum* เกิดจากการแทนที่ของ codon ตำแหน่งที่ 78 ในยีน chloroquine-resistant transporter (*Pfcr1*) ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก lysine เป็น threonine และพบการเปลี่ยนแปลง codon ในตำแหน่งอื่น ๆ ได้อีกอย่างน้อย 13 ตำแหน่ง (Djimde et al 2001; Talisuna et al 2004) เมื่อพิจารณารูปแบบการแทนที่ของกรดอะมิโนในยีน *Pfcr1* จากตัวอย่างเชื้อที่มีต้นกำเนิดจากหลายภูมิภาคใน

โลกพบว่ามีคุณสมบัติคล่องกับรายงานทางระบาดวิทยาเกี่ยวกับต้นกำเนิดและการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของการดื้อยา chloroquine สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มได้แก่ (1) กลุ่มเชื้อมาลาเรียจากเอเชียและแอฟริกา (2) กลุ่มเชื้อจากประเทศในทวีปอเมริกาใต้ และ (3) กลุ่มเชื้อจากแถบปาปัวนิวกินี (Anderson et al 2005) เนื่องจากระยะเวลาตั้งแต่มีการใช้ยา chloroquine เพื่อรักษาโรคมาลาเรียอย่างกว้างขวางจนเริ่มพบเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาตั้งกล่าวนั้นใช้เวลาประมาณ 12 ปี และการแพร่กระจายของ *Plasmodium falciparum* ที่ดื้อยาชนิดนี้จากต้นกำเนิดบริเวณพรมแดนไทยและกัมพูชาไปจนถึงบริเวณตะวันออกของทวีปแอฟริกาใช้เวลามากถึง 17 ปี (Payne et al 1987) ดังนั้นการแพร่กระจายดังกล่าวจึงเกิดขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปจากประเทศหนึ่งสู่อีกประเทศหนึ่ง โดยไม่ได้เกิดขึ้นอย่างก้าวกระโดด เนื่องจากการแทนที่ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันใน codon หนึ่ง ๆ อาจเกิดขึ้นได้โดยไม่เกี่ยวข้องกัน เช่น สายวิวัฒนาการที่แตกต่างกันแต่ผลลัพธ์มีความพ้องกันโดยบังเอิญ (homoplasy) ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา chloroquine โดยเฉพาะอย่างยิ่งลำดับเบสของ microsatellite ที่พบเป็นจำนวนมากใน genome ของเชื้อมาลาเรียและมีหลาย allele สำหรับแต่ละ locus จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ microsatellite ที่อยู่รอบ ๆ ยีน *Pfcr1* ซึ่งมีระยะห่างจากยีนแต่ละด้านภายในระยะ 5 กิโลเบสในโครโมโซมแท่งที่ 7 โดยอาศัยหลักการที่ว่าเชื้อมาลาเรียที่มาจากจุดกำเนิดเดียวกันจะมีรูปแบบของ microsatellite haplotype ที่เหมือนกัน จากการวิเคราะห์ดังกล่าวพบว่าจุดเริ่มต้นของการดื้อยา chloroquine เกิดขึ้นสอดคล้องกับการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อที่ดื้อยาดังกล่าวข้างต้นและพบว่าจุดกำเนิดของเชื้อที่ดื้อยาในทวีปอเมริกาใต้มี 2 จุดที่แตกต่างกันชัดเจน (Fidock et al 2000; Wootton et al 2002) นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Pfcr1* ของ *Plasmodium falciparum* จากประเทศกัมพูชาและฟิลิปปินส์พบว่ามีความแตกต่างจากที่ปรากฏในภูมิภาคอื่น ๆ (Chen et al 2003) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จุดกำเนิดของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยา chloroquine อาจมีมากกว่า 4 จุด อย่างไรก็ตามเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยา chloroquine ที่พบในทวีปแอฟริกา มีจุดกำเนิดจากการแพร่กระจายไปจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Anderson et al 2005; Wellems et al 2001)

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *Pfcr1* จาก 165 ตัวอย่างในการศึกษานี้โดยใช้ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในปี ค.ศ. 1991, 2003, 2004, 2005, 2006 และ 2007 โดยพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีจำนวนตำแหน่งที่เกิดการแทนที่ของ codon มากถึง 9 ตำแหน่งซึ่งพบมากถึงร้อยละ 95.2 ในขณะที่ *Pfcr1* ที่มีการเปลี่ยนแปลงของ codon 8 ตำแหน่ง พบเพียงร้อยละ 4.8 และเป็นที่น่าสังเกตแม้ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์อาจมีจำนวนไม่มากแต่การพบว่าเชื้อมาลาเรียบางตัวอย่างมี *Pfcr1* ที่มีการเปลี่ยนแปลงของ codon 8 ตำแหน่งในปี ค.ศ. 1991 และ 2003 แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในปี ค.ศ. 2004-2007 อาจเนื่องจากอิทธิพลของการคัดเลือกเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ที่ดื้อต่อยา chloroquine ยังมีการดำเนินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลายาวนานจากการที่ยา chloroquine ยังใช้ได้ผลดีในการรักษามาลาเรียจากเชื้ออื่น ๆ นอกจากนี้ในการติดตามธรรมชาติพบว่าผลการตรวจชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุโดยวิธี PCR พบว่าผู้ป่วยราวร้อยละ 20 มีการติดเชื้อร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นด้วยปัจจัยที่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทยที่ได้รับแรงกดดันจากยาอย่างต่อเนื่อง

ร่วมกับการที่เชื้อ *Plasmodium falciparum* อาจติดเชื้อปะปนกับเชื้อมาลาเรียอื่นในปริมาณน้อยมากจนไม่ได้รับการวินิจฉัยนั้น (Sirippon et al) ทำให้ *Plasmodium falciparum* ได้รับการคัดเลือกจากยา chloroquine

การเปลี่ยนแปลงของยีน multidrug resistance transporter ของ *Plasmodium falciparum* (*Pfmdr1*) เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะคือ (1) การเปลี่ยนแปลงของ codon ในยีนซึ่งเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่งโดยตำแหน่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเสริมการดื้อยา chloroquine คือการเปลี่ยนแปลงจาก asparagine เป็น tyrosine ในตำแหน่งที่ 86 (Foote et al 1989; Duraisingh et al 1997) แต่การดื้อยา chloroquine มีพื้นฐานหลักมาจากการเปลี่ยนแปลงของ codon ในตำแหน่งที่ 76 ของยีน *Pfcr1* (Djimde et al 2001) และ (2) การเพิ่มจำนวนชุด (copy number amplification) ของยีน *Pfmdr1* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการดื้อยา mefloquine อีกทั้งมีความสัมพันธ์กับการดื้อยา quinine และ อนุพันธ์ของยาในกลุ่มartemisinin (Pickard et al 2003; Price et al 2004) จากการศึกษาการแทนที่ของ codon ในยีน *Pfmdr1* ร่วมกับการวิเคราะห์ microsatellite ที่อยู่รอบ ๆ ยีนดังกล่าวพบว่ารูปแบบ haplotype ของ microsatellite นี้มีความหลากหลายต่ำมากแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงใน codon นี้มีจุดเริ่มต้นเพียงไม่กี่แห่ง ในขณะที่การเพิ่มจำนวนชุดของ *Pfmdr1* มีจุดเริ่มต้นเกิดขึ้นเพียงไม่กี่แห่งเช่นกัน (Pickard et al 2003; Price et al 2004)

ในแต่ละปีมีผู้เดินทางข้ามประเทศประมาณ 500 ล้านคน และในจำนวนนี้มีประชากรราว 80 ล้านคนเดินทางเข้าไปในประเทศที่เป็นเขตปรากฏโรคมาลาเรีย ดังนั้นผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียจากภูมิภาคอื่นจึงเสมือนเป็นผู้ช่วยให้มีการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียไปในเขตอื่นที่มีุงพาหะ ทั้งนี้โอกาสดังกล่าวย่อมขึ้นกับความชุกและอัตราการกัดคนของยุงพาหะนำโรคมาลาเรียในแต่ละท้องถิ่น (Ryan and Kain 2000) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาไปตามภูมิภาคต่าง ๆ เช่น (Hastings and Watkins 2005)

(1) อัตราการรักษาโรคมาลาเรียในแต่ละภูมิภาค โดยพบว่าการใช้ยา chloroquine เป็นเวลานานเพื่อการรักษาหรือป้องกันโรคมาลาเรียมีความสัมพันธ์กับการเกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย

(2) ลักษณะพันธุกรรมประชากรของเชื้อมาลาเรีย กล่าวคือถ้ามีการถ่ายทอดพันธุกรรมจากกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่มีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมเป็นหลัก ลักษณะประชากรของเชื้อมาลาเรียดังกล่าวจะเอื้อต่อการเกิดการดื้อยาที่มีความซับซ้อนทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น

(3) ปริมาณเชื้อมาลาเรียในคน เนื่องจากโอกาสที่จะพบการผ่าเหล่าเกิดขึ้นในผู้ที่มีปริมาณเชื้อมาลาเรียในร่างกายมากซึ่งมักพบในผู้ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียมาก่อน (non-immune) ย่อมมีโอกาสเกิดได้มากกว่าผู้ที่มีปริมาณเชื้อในร่างกายน้อยกว่า หรือในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบางส่วนต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (semi-immune)

(4) ระยะเวลาครึ่งชีวิต (half-life) ของยาด้านมาลาเรียที่ยาวนอกจากจะส่งผลต่อการใช้ยาได้ง่ายและมีความครอบคลุมได้สูงแล้ว ยาดังกล่าวยังมีโอกาสทำลายเชื้อมาลาเรียที่อาจเหลืออยู่ในภายหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่ายาที่มีระยะเวลาครึ่งชีวิตที่สั้น เป็นต้น



การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิด *P.falciparum* นับตั้งแต่ระยะแรกๆ ของการหยุดใช้ยา chloroquine และติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรดังกล่าวในช่วงระยะเวลาต่อมา จนถึงปัจจุบัน จะทำให้เข้าใจลักษณะประชากรของมาลาเรียภายหลังจากอิทธิพลของการคัดเลือก สายพันธุ์จากยา chloroquine ได้ลดลงหรือหายไป ข้อมูลดังกล่าวมีประโยชน์ในการวางนโยบายหรือ วางมาตรการของการใช้ยา สำหรับโรคมมาลาเรียเพื่อให้เกิดสภาวะการชะลอตัวของการดื้อยาต้าน มาลาเรียในประชากรส่วนใหญ่ของเชื้อ มาลาเรีย การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ genes ที่ควบคุมการดื้อยา chloroquine ในเชิงวิวัฒนาการระดับ โมเลกุล จะทำให้ทราบอัตราการผ่าเหล่าและอิทธิพลของยาในการเกิดการเปลี่ยนแปลงประชากรของ มาลาเรีย โดยอาศัยข้อมูลจากอดีตจนถึงปัจจุบัน ผลการวิเคราะห์ในการศึกษานี้สามารถนำมาเป็นแม่แบบในการพยากรณ์ ปัญหาการดื้อยาต้านมาลาเรียในอนาคตและจะเป็นพื้นฐานที่ดีต่อการควบคุม โรคมมาลาเรียในกลุ่มประชากร จำนวนมากต่อไป การเลือกตัวอย่างที่ใช้ศึกษาจากเขตปรากฏโรคต่างกันจะทำให้ทราบแนวโน้มของอัตราการ แพร่ กระจายของประชากรเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยา chloroquine ไปตามเขตปรากฏโรคมมาลาเรียต่างๆ ใน อดีต จนถึงปัจจุบันได้ ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการกำหนดนโยบายเพื่อสกัดกั้นการดื้อยา ไม่ให้เกิดการ แพร่กระจายอย่างรวดเร็วต่อไปในอนาคต

เนื่องจากปรากฏการณ์ที่กลับมาพบเชื้อมาลาเรียที่ยังคงตอบสนองต่อการรักษาด้วย chloroquine กลับ เพิ่มขึ้นภายหลังจากการเลิกใช้ยาดังกล่าวในหลายประเทศในแอฟริกา ซึ่งในประเทศไทยแม้ว่าจะหยุด ใช้ยา chloroquine ในการรักษามาลาเรียที่เกิดจาก *Plasmodium falciparum* แต่ยาดังกล่าวยังคงใช้รักษามาลาเรีย จาก *Plasmodium vivax* ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้อาจมี *Plasmodium falciparum* ปะปนโดยไม่ได้รับการวินิจฉัย ดังนั้น ประชากรของ *Plasmodium falciparum* จำนวนหนึ่ง ในประเทศไทยอาจยังคง ถูกคัดเลือกโดยยา chloroquine มาโดยตลอด ซึ่งนับเป็นสภาวะที่ต่างจากแอฟริกาที่ *Plasmodium vivax* มีอุบัติการณ์ต่ำมาก การกลับมา ตอบสนองต่อยา chloroquine อาจเกิดจากการที่เชื้อที่ยังตอบสนองต่อยามีโอกาส เพิ่มปริมาณมากขึ้นภายหลังจากปัจจัย การถูกคัดเลือกด้วยยาดังกล่าวยุติลงหรือน้อยลงหรืออาจเกิดจากการผ่าเหล่ากลับ (back mutation) ของ สายพันธุ์ที่ดื้อยาทำให้เชื้อมาลาเรียกลับมาตอบสนองต่อยาได้ใหม่ ดังนั้นการทราบกลไกและ อุบัติการณ์ ของการที่เชื้อมาลาเรียกลับมาตอบสนองต่อยา chloroquine ได้อีกจะช่วยกำหนดระยะเวลา การใช้ยาในการ ควบคุมโรคในระดับประเทศ เช่น ให้มีช่วงการใช้ยานานหนึ่งสลับกันกับยานานอื่น เพื่อชะลออัตราการดื้อยา ของเชื้อมาลาเรียต่อไปในอนาคตทำให้การควบคุมโรคได้อย่างยั่งยืนต่อไป อันจะเป็นการประหยัต์ทรัพยากรของ ประเทศ

### ข้อสรุป

1. ผลการทดสอบความไวของยาในห้องปฏิบัติการของยา chloroquine จากตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะ เยือกแข็งและจากการเก็บรวบรวมจากผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรียในปี ค.ศ. 1991, 2003, 2005, 2006 และ 2007 จำนวนทั้งสิ้น 165 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีระดับ MIC ที่  $5 \times 10^{-7}$  M โดยตัวอย่างที่ให้ผลดังกล่าวมีร้อยละ

84.3 และตัวอย่างที่มีระดับ MIC ที่  $1 \times 10^{-6}$  M มีร้อยละ 10.9 และตัวอย่างที่มีระดับ MIC ที่  $2 \times 10^{-7}$  M มีร้อยละ 4.8

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *Pfcr*t จากตัวอย่างทั้งหมด 165 ตัวอย่าง พบว่ามีการแทนที่ของ codon ทั้งหมด 9 ตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ตอบสนองดีหรือมีความไวต่อยา chloroquine ซึ่งตรงกับ allele ที่ III โดยพบทั้งหมด 156 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 94.5 และอีก 9 ตัวอย่างที่เหลือหรือร้อยละ 5.5 พบการเปลี่ยนแปลงของ codon ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ตรงกับ allele ที่ V

3. ตัวอย่างที่เก็บตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นต้นมาพบว่าทุกตัวอย่างมีการแทนที่ของ codon 9 ตำแหน่ง ในขณะที่ allele ที่ V ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของ codon น้อยกว่าสามารถพบได้แม้จะพบในอัตราที่ต่ำ อย่างไรก็ตามในตำแหน่ง codon ที่ 76 พบว่าทุกตัวอย่างมีการดออะมิโนเป็น threonine ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเชื้อมาลาเรียทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ในการศึกษานี้ล้วนมีคุณลักษณะที่ต่อต่อยา chloroquine

4. ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfmdr*1 จากทั้งหมด 165 ตัวอย่าง พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง โดย 6 ตำแหน่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดดังนี้ 256T → A (Tyr86Asn), 550A → T (Tyr184Phe), 3100A → T (Ser1034Cys), 3124A → G (Asn1042Asp), 3677/T → A (Phe1226Tyr), 3736G → T (Asp1246Tyr) 3888A → C (Ser1296Ser) และ 3894A → (Ser1298Ser) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจากการวิเคราะห์ตัวอย่างจากประเทศไทยสามารถจำแนกยีน *Pfmdr*1 ได้เป็น 10 haplotypes การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ใน codon ที่ 1034 และ 1246 ไม่พบในทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์

5. เป็นที่น่าสังเกตว่าการเปลี่ยนแปลงของ codon ที่ 86 จาก asparagine เป็น tyrosine นั้นพบในตัวอย่างทั้งหมด 156 ตัวอย่างหรือร้อยละ 94.5 ซึ่งจากการศึกษาของ Mita และคณะ (Mita et al 2006) พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของ codon ที่ 76 ใน *Pfcr*t จาก lysine เป็น threonine มักมีความสัมพันธ์กับการต่อยา chloroquine ในระดับที่สูง

### ข้อเสนอแนะ

1. เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อที่ให้ผลระดับ MIC ที่  $2 \times 10^{-7}$  M พบเฉพาะในปี ค.ศ. 1991 และ 2003 แต่ไม่พบในปี ค.ศ. 2004-2007 ซึ่งอาจแสดงถึงการเพิ่มระดับการต่อยาของเชื้อมาลาเรียมากขึ้นหลังช่วงปี ค.ศ. 2003 อย่างไรก็ตามแนวโน้มดังกล่าวควรได้รับการยืนยันจากการวิเคราะห์ตัวอย่างมากขึ้นในปีต่อไป

2. ควรมีการศึกษา genetic marker อื่นในตัวอย่างที่ศึกษานี้เพื่อตรวจสอบว่า ประชากรที่เลือกมาศึกษานี้ไม่มีลักษณะของ clonal population structure

3. เนื่องจาก haplotype ของยีน *Pfcr*t ในประเทศไทยพบเพียง 2 รูปแบบซึ่งเป็นชนิดที่แสดงถึงการต่อต่อยาคลอโรควินในระดับสูง อันอาจเกิดจากภาวะ genetic fixation ของ resistant alleles ดังนั้นมาตรการควบคุมการใช้ยาดังกล่าวในการรักษามาลาเรียจากเชื้อ *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium ovale* จึงไม่น่ามีผลในการลดการต่อยาในกลุ่มดังกล่าวดังที่เกิดขึ้นในประเทศมาลี

## บรรณานุกรม

- Abdel-Muhsin AM, Mackinnon MJ, Ali E, Nassir el-KA, Suleiman S, Ahmed S, et al. Evolution of drug-resistance genes in *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission in Eastern Sudan. *J Infect Dis* 2004;189:1239-44.
- Adagut IS, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: linkage disequilibrium between loci in chromosomes 7 and 5 and chloroquine selective pressure in Northern Nigeria. *Parasitology* 2001;123:219-24.
- Anderson TJ, Roper C. The origins and spread of antimalarial drug resistance: lessons for policy makers. *Acta Trop* 2005;94:269-280.
- Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997;277:112-6.
- Chatterjee T, Mukhopadhyay A, Khan KA, Giri AK. Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine. *Mutagenesis* 1998;13:619-24.
- Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, Baker J, Peters JM, et al. pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3500-5.
- Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* 2001;344:257-63.
- Dorsey G, Kanya MR, Singh A, Rosenthal PJ. Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* pfcrt and pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J Infect Dis* 2001;183:1417-20
- Duraisingh MT, Drakeley CJ, Muller O, et al. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the pfmdr 1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology* 1997; 114:205-211.
- Ekong RM, Robson KJ, Baker DA, Warhurst DC. Transcripts of the multidrug resistance genes in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*
- Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000;6:861-71
- 1993;106:107-15
- Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 1989;57:921-930.
- Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1990;345:255-8.
- Hastings IM, Watkins WM. Intensity of malaria transmission and the evolution of drug resistance. *Acta Trop* 2005;94:218-229.

- Huaman MC, Roncal N, Nakazawa S, Long TT, Gerena L, Garcia C, Solari L, et al. Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and in vitro susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:461-6.
- Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, et al. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcr) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* 2001;183:1413-6.
- Mehlota RK, Fujioka H, Roepe PD, Janneh O, Ursos LM, Jacobs-Lorena V, et al. Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in association with pfcr polymorphism in Papua New Guinea and South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12689-94.
- Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, et al. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:413-5.
- Nagesha HS, Casey GJ, Rieckmann KH, Fryauff DJ, Laksana BS, Reeder JC, et al. New haplotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcr) gene among chloroquine-resistant parasite isolates. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:398-402.
- Payne D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 1987;3:241-246.
- Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, et al. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in pfmdr1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2418-2423.
- Perrino FW, Preston BD, Sandell LL, Loeb LA. Extension of mismatched 3' termini of DNA is a major determinant of the infidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8343-7.
- Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988;242:1168-71.
- Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet* 2004;364:438-447.
- Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988; 242:1171-3.
- Ryan ET, Kain KC. Health advice and immunizations for travelers. *N Engl J Med* 2000;342: 1716-1725.
- Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE. Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell* 1997;91:593-603.
- Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:235-254.
- Thaithong S, Beale GH, Chutmongkonkul M. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: an in vitro study of isolates mainly from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77(2):228-31.
- Thaithong S. Clones of different sensitivities in drug-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Bull World Health Organ* 1983;61(4):709-12.

- Thaithong S, Beale GH, Fenton B, McBride J, Rosario V, Walker A, Walliker D. Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984;78(2): 242-5.
- Thaithong S, Beale GH. Susceptibility of Thai isolates of *Plasmodium falciparum* to artemisinin (qinghaosu) and artemether. *Bull World Health Organ* 1985;63(3):617-9.
- Thaithong S, Suebsaeng L, Rooney W, Beale GH. Evidence of increased chloroquine sensitivity in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:37-8.
- Thaithong S, Beale GH, Chutmongkonkul M. Variability in drug susceptibility amongst clones and isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:33-6.
- van Es HH, Karcz S, Chu F, Cowman AF, Vidal S, Gros P, Schurr E. Expression of the plasmodial *pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. *Mol Cell Biol* 1994;14:2419-28.
- Vathsala PG, Pramanik A, Dhanasekaran S, Devi CU, Pillai CR, Subbarao SK, et al. Widespread occurrence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr1*) gene haplotype SVMNT in *Plasmodium falciparum* malaria in India. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:256-9.
- Vieira PP, Ferreira MU, Das Gracas Alecrim M, Alecrim WD, Da Silva LH, Sihuinha MM, et al. *pfcr1* Polymorphism and the Spread of Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis* 2004;190:417-24.
- Walliker D. The genetic basis of diversity in malaria parasites. *Adv Parasitol* 1983;22:217-59.
- Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 2001;184:770-776.
- Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002;2:209-18.
- Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, et al. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002;418:320-323.

### โครงการวิจัยที่ 3

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การวิเคราะห์พันธุกรรมประชากรและวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม และไวแวกซ์ในประเทศไทยเพื่อเป็นพื้นฐานในการควบคุมโรคมาลาเรีย

(ภาษาอังกฤษ) Analysis of population genetics and molecular evolution of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in Thailand: a basis for malaria control

#### บทนำ

การประยุกต์องค์ความรู้ทางด้านพันธุกรรมประชากร (population genetics) รวมทั้งวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (molecular evolution) ในการศึกษาจุลชีพก่อโรคนับว่ามีความสำคัญต่อการเข้าใจระบาดวิทยาของโรคติดเชื้ออุบัติใหม่/อุบัติซ้ำ (emerging/re-emerging infectious diseases) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของเชื้อที่มีคุณลักษณะแตกต่างไปจากเดิมที่อาจก่อโรคระบาดหรือก่อปัญหาในด้านการรักษาและการควบคุมโรคในระยะยาว แม้ว่าปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะประชากรของจุลชีพก่อโรคอาจเกิดขึ้นจากภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป แต่ผลกระทบจากการวางมาตรการในการรักษา การป้องกัน หรือควบคุมโรค มักส่งผลต่อลักษณะประชากรของจุลชีพซึ่งอาจเกิดขึ้นในลักษณะของการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) หรือเกิดขึ้นจากผลของ genetic drift ดังนั้นภายหลังจากมาตรการในการควบคุมโรคถูกดำเนินการไประยะหนึ่ง มักเกิดปัญหาในด้านประสิทธิผลของมาตรการดังกล่าวในระยะยาวต่อไป

มาลาเรียเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตของประชากรในเขตปรากฏโรค สาเหตุสำคัญเกิดจากการติดเชื้อ *P. falciparum* แต่การติดเชื้อ *P. vivax* นับเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยในประชากรโลก ประมาณ 70-80 ล้านคนต่อปี อันส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการพัฒนาประเทศ ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการควบคุมโรคมาลาเรียคือการขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับลักษณะพันธุกรรมประชากรของเชื้อ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะมีประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญต่อการออกแบบวัคซีนป้องกันมาลาเรียซึ่งเป็นมาตรการใหม่ที่จะมีการนำมาใช้เพื่อควบคุมโรคมาลาเรียในอนาคตอันใกล้ โดยมีปัจจัยสำคัญคือการผลิตและประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรค เนื่องจากลักษณะภูมิคุ้มกันต่อโรคมาลาเรียส่วนใหญ่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละ species ของเชื้อรวมทั้งมีความจำเพาะต่อระยะที่เชื้อเจริญเติบโต ตลอดจนมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นวัคซีนที่น่าจะให้ผลดีจึงต้องมาจากโปรตีนจากหลายระยะ และควรครอบคลุมสายพันธุ์ต่าง ๆ ให้ได้มากที่สุด เนื่องจากภูมิคุ้มกันดังกล่าวมักไม่เกิดการป้องกันข้ามสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามโปรตีนที่น่าจะมีบทบาทสำคัญในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนมักมีความหลากหลายในรูปแบบของ gene ที่สร้างโปรตีน ส่งผลให้คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนแตกต่างกันไปด้วยในปัจจุบันการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนมักอาศัยองค์ความรู้จากการวิจัยโดยใช้เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สายพันธุ์ที่ปรับตัวให้เข้ากับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ หรือ *P. vivax* สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีในลิงที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งรูปแบบ

ของโปรตีนที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์เหล่านี้มักไม่ใช่ตัวแทนที่ดีสำหรับเชื้อมาลาเรียที่พบในธรรมชาติ ดังนั้นองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับลักษณะพันธุกรรมประชากรตลอดจนขอบเขตของความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบของวัคซีนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนในภาคสนามเพื่อให้ได้ผลดีกับเชื้อที่พบในประเทศไทย

องค์ความรู้เกี่ยวกับพันธุกรรมประชากร และวิวัฒนาการระดับโมเลกุลมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการวางมาตรการในการควบคุมโรคที่ยั่งยืน ในส่วนของโรคมาลาเรียนั้นการศึกษาวิจัยในศาสตร์แขนงดังกล่าวยังมีอยู่อย่างจำกัด และมักไม่เป็นการศึกษาจากตัวอย่างที่รวบรวมอย่างเป็นระบบและไม่มีการดำเนินการในระยะยาว ทำให้ภาพรวมขององค์ความรู้ทางด้านนี้ยังขาดความสมบูรณ์ ทั้งนี้ความรู้เกี่ยวกับพันธุกรรมประชากรและวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเชื้อมาลาเรียสามารถใช้เป็นแนวทางในการวางมาตรการหรือประกอบการตัดสินใจในการวางนโยบายการใช้ยุทธวิธีในการควบคุมโรคอย่างมีหลักการ รวมทั้งสามารถเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าโปรตีนหรือส่วนของโปรตีนชนิดใดของเชื้อมาลาเรียน่าจะกระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการออกแบบวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย (Tibayrence et al 1996; Awadalla et al 2003; van Belkum et al 2001; Morgan et al 2001)

จากข้อมูลการศึกษาพันธุกรรมประชากรของเชื้อมาลาเรียซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด โดยใช้ตัวอย่างเชื้อจากภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก พบว่าข้อสรุปเกี่ยวกับพันธุกรรมประชากรของ *Plasmodium falciparum* ยังมีความขัดแย้งกัน โดยกลุ่มหนึ่งพบว่าพันธุกรรมประชากรของ *P. falciparum* มีลักษณะเป็น clonal expansion กล่าวคือ สายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้มีการเพิ่มประชากรจากแต่ละสายพันธุ์ (clone) ซึ่งมีลักษณะคงเดิมในประชากรรุ่นถัดไป หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เกิดขึ้นในยุงพาหะไม่มีความสำคัญต่อการเกิดรูปแบบที่หลากหลายของแต่ละสายพันธุ์ โดยเชื่อว่าการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมในขณะการปฏิสนธิเกิดขึ้นน้อยมากจึงไม่มีนัยสำคัญในการกำหนดรูปแบบประชากรของเชื้อมาลาเรีย (Urduaneta et al 2001; Tibayrence et al 1996; 1990) ซึ่งถ้าข้อคิดดังกล่าวถูกต้อง มาตรการหนึ่ง ๆ ที่ใช้ในการควบคุมโรคมาลาเรีย เช่นการใช้ยาด้านมาลาเรีย หรือการใช้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพไม่สมบูรณ์ (imperfect vaccine) จะไม่ส่งผลกระทบต่ออย่างชัดเจนต่อการคัดเลือกสายพันธุ์ ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อจึงไม่เพิ่มขึ้นและไม่ีผลกระทบต่อมาในรูปแบบของการเกิดสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะที่เป็นปัญหาต่อการควบคุมโรคในภายหลัง เช่น การดื้อยาเพิ่มขึ้น ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น หรือการเกิดสายพันธุ์ที่สามารถหลบเลี่ยงประสิทธิภาพของวัคซีน เป็นต้น (Gandon et al 2003; 2001) ในทางตรงข้าม นักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งพบว่าพันธุกรรมประชากรของ *P. falciparum* มีลักษณะเป็น panmixia กล่าวคือ กระบวนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมมีความสำคัญในขณะที่เชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุงกันปัส (Walliker et al 1987; Conway et al 1999; Putaporntip et al 1997; 2002; Sakihama et al 1999; Babiker et al 1994) ทั้งนี้ความหลากหลายในสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียที่เป็นองค์ประกอบของประชากรของเชื้อนั้นถูกกำหนดด้วยอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในเขตปรากฏโรคร่วมกับขอบเขตความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรมาลาเรียที่ปรากฏอยู่เดิมในท้องที่ ดังนั้นการใช้มาตรการหนึ่ง ๆ ในการควบคุมโรค เช่น การใช้ยาด้านมาลาเรีย หรือการใช้วัคซีน

ที่มีประสิทธิภาพไม่สมบูรณ์ย่อมส่งผลกระทบต่อการศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ถ้าแต่ละ gene สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมอย่างเป็นอิสระต่อกัน โดยไม่อยู่ภายใต้อิทธิพลของ selective sweep หรือ background selection แล้ว ลักษณะประชากรแบบ panmixia อาจเอื้อต่อการเกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่รวมคุณลักษณะของเชื้อที่สามารถหลบเลี่ยงจากการถูกทำลายโดยปัจจัยหลาย ๆ อย่างไปพร้อมกัน ซึ่งถ้าสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนมากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ จะทำให้มาตรการต่าง ๆ ที่ใช้ร่วมกันในการควบคุมโรคเผชิญกับความล้มเหลวไปพร้อม ๆ กันในระยะยาว

เนื่องจากการแทนที่ของลำดับเบสของ DNA (nucleotide substitution) หรือการผ่าเหล่า (mutation) เกิดขึ้นตลอดเวลาในกระบวนการลอกแบบ DNA ขณะเซลล์แบ่งตัว แต่เกิดขึ้นด้วยอัตราที่ต่ำมากและอัตราที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันไปในแต่ละส่วนของสาย DNA โดยทั่วไปการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นมักไม่ทำให้อัตราการแทนที่ของเบสที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (nonsynonymous substitution rate, dN) แตกต่างจากอัตราการแทนที่ของเบสที่ไม่ทำให้อัตราการเปลี่ยนชนิด (synonymous substitution rate, dS) อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในกรณีที่ gene มีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างโปรตีนที่เป็นเป้าหมายต่อการถูกทำลายจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ระบบภูมิคุ้มกันของคน หรืออยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกตามธรรมชาติแล้ว dN จะมีค่ามากกว่า dS อย่างมีนัยสำคัญ (Hughes and Hughes 1995) ซึ่ง gene หรือส่วนของ gene ดังกล่าวมักเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่เป็น T cell epitopes เช่นในกรณีของ circumsporozoite protein ของ *P. falciparum* (PfCSP) (Hughes 1991) หรือ thrombospondin-related adhesive protein ของ *P. falciparum* (PfTRAP) และของ *P. vivax* (PvTRAP) (Jongwutiwes et al 1994; 1998; Putaporntip et al 2001) เป็นต้น นอกจากนี้การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราความถี่ของ allele ระหว่างประชากร (inter-population variance) ของเชื้อมาลาเรีย อาจช่วยทำนายตำแหน่งของโปรตีนที่เป็นเป้าหมายต่อการตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ซึ่งโปรตีนหรือส่วนของโปรตีนดังกล่าวอาจมีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน (Conway et al 2000) เป็นต้น

ในปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียกำลังถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยหลักการรวมโปรตีนหรือองค์ประกอบของโปรตีนจากส่วนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องจากแต่ละระยะในวงจรชีวิตของมาลาเรีย โดยเป้าหมายที่สำคัญได้แก่ (1) pre-erythrocytic vaccine เป็นวัคซีนที่กระตุ้นให้เกิด antibodies ที่มีฤทธิ์ยับยั้งไม่ให้ sporozoites ลุกกลามเข้าสู่เซลล์ตับรวมทั้งกระตุ้น cytotoxic T-lymphocytes เพื่อให้ทำลายเซลล์ตับที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ในโปรตีนที่สำคัญและมีการศึกษาประสิทธิภาพของการเป็นวัคซีน และมีการพัฒนาในหลายรูปแบบมากที่สุดคือ circumsporozoite protein ซึ่งโครงสร้างของโปรตีนที่สำคัญประกอบด้วย B-cell epitope บริเวณส่วนกลางของโปรตีนซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเรียงซ้ำกันเป็นชุด และส่วน C-terminal ซึ่งประกอบด้วย T helper และ cytotoxic T cell epitopes ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนที่มีความหลากหลายสูงขึ้นไปกับภูมิภาคตามแหล่งที่มาของเชื้อ (Jongwutiwes et al 1994; Nardin et al 1999; Nussenzweig et al 1997; 1994) สำหรับโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนคือ TRAP ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 6 domains และประกอบด้วย T cell epitopes หลายตำแหน่ง จากการวิเคราะห์ PfTRAP gene และ PvTRAP gene จากตัวอย่างในธรรมชาติ



พบการแทนที่ของลำดับเบสหลายตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนใน domains ที่ 2, 3 และ 4 อยู่ภายใต้กลไก positive selection ซึ่งบริเวณดังกล่าวตรงกับ T cell epitopes หลายตำแหน่ง (Jongwutiwes et al 1998; Putaporntip et al 2001, Prieur et al 2004; Schneider et al 2001; Dolo et al 1999; Flanagan et al 1999) (2) blood-stage vaccine ซึ่งมีเป้าหมายหลักคือ การยับยั้งการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดง โปรตีนที่มีการศึกษามากที่สุดและมีศักยภาพสูงในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนคือ merozoite surface protein 1 (Msp-1) ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180-200 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยส่วนที่มีลำดับกรดอะมิโน (หรือลำดับเบส) ที่มีความคงที่สูงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน (conserved blocks) ส่วนที่มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงปานกลางเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ (semi-conserved blocks) และส่วนที่มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความผันแปรสูง (variable blocks) (Holder 1994; Tanabe et al 1987; Jongwutiwes et al 1991) สำหรับโปรตีนที่สำคัญรองลงมาคือ merozoite surface protein 2 (Msp-2) (Smythe et al 1991) ซึ่งพบเฉพาะใน *P. falciparum* และ *P. reichenowi* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียของลิงชิมแปนซี นอกจากนี้ยังมีโปรตีนบนผิว merozoite ที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนอีกหลายชนิด เช่น merozoite surface protein 3 (Msp-3), merozoite surface protein 4 (Msp-4) และ merozoite surface protein-5 (Msp-5) (Oeuvray et al 1994; Goschnick et al 2004) ทั้งนี้ Msp-4 และ Msp-5 ของ *P. falciparum* มีความคงที่ของลำดับเบสระหว่างสายพันธุ์สูง (Jongwutiwes et al 2002) ในขณะที่ขอบเขตความหลากหลายของลำดับเบสใน gene Msp-4 และ Msp-5 ของ *P. vivax* ยังไม่มีการศึกษาจากตัวอย่างในธรรมชาติเลย (3) sexual stage vaccine อาศัยหลักการที่ antibodies ต่อ gametocyte/gamete ของเชื้อมาลาเรียสามารถยับยั้งกระบวนการปฏิสนธิของเชื้อในยุงก้นปล่อง เนื่องจากวัคซีนชนิดนี้ประกอบด้วย antigen ที่ไม่พบในขณะที่เชื้อมาลาเรียอยู่ในคน ดังนั้นปัจจัยจาก positive selection โดยภูมิคุ้มกันของคนจึงไม่เป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาวัคซีนชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม sexual stage vaccine ป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยแพร่เชื้อต่อไปแต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ที่ได้รับวัคซีนชนิดนี้ (Kaslow 2002) ดังนั้นการศึกษาพันธุกรรมประชากรตลอดจนการศึกษาขอบเขตความหลากหลายของ gene หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ pre-erythrocytic stage vaccine และ asexual blood-stage vaccine จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียในเขตปรากฏโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยในระยะเวลาต่าง ๆ กันจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเตรียมความพร้อมเกี่ยวกับนวัตกรรมที่จะเกิดขึ้นในอนาคตอันใกล้ นอกจากนี้ความหลากหลายในรูปแบบของ gene เหล่านี้ยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวติดตามหรือตัวบ่งชี้ถึงผลกระทบจากมาตรการต่าง ๆ ที่ใช้ควบคุมโรคมาลาเรีย รวมทั้งการเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อมาลาเรียระหว่างภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศถ้าประชากรของเชื้อมาลาเรียมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในลักษณะจำเพาะตามภูมิภาคของเขตปรากฏโรค

## วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์ลำดับเบสของ genes สำหรับ PfAMA-1 ของ *P. falciparum* และ genes สำหรับ PvMsp4-5 และ PvAMA-1 ของ *P. vivax* จากตัวอย่างที่ได้จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยที่เก็บรวบรวมในระยะเวลาต่าง ๆ กัน
2. ศึกษาวิวัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงประชากรของ *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยอาศัยความหลากหลายของ genes ในข้อ 1 เป็นตัวติดตาม

## วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ตัวอย่างเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax*

เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* จากผู้ป่วยประมาณปีละ 160 รายชนิดละ 80 ตัวอย่างต่อปี รวมทั้งสิ้นตลอดโครงการชนิดละ 240 ตัวอย่าง

การเตรียม DNA ของเชื้อมาลาเรีย

นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 200  $\mu$ l ที่ได้มาทำการสกัด DNA โดยใช้ QIAamp DNA mini kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เติมนัฟเฟออร์ ATL ลงไป 180  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down
2. เติมนัฟเฟออร์ K 20  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที นำไป spin down
3. นำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดไป incubate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อให้เม็ดเลือดแดงถูกย่อยอย่างสมบูรณ์
4. หลังจากนั้นนำไป spin down แล้วเติมนัฟเฟออร์ AL 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที
5. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที นำไป spin down
6. เติมนัฟเฟออร์ absolute ethanol 200  $\mu$ l ลงไป และผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไป spin down
7. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp spin column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
8. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
9. เติมนัฟเฟออร์ AW1 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
10. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
11. เติมนัฟเฟออร์ AW2 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
12. นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด

13. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ส่วนที่เหลือออกให้หมด

14. นำ QIAamp spin column ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ที่สะอาด

15. เติมบัฟเฟอร์ AE ลงไป 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

17. นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

18. ดูดเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR ต่อไป  
การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยครอบคลุมบริเวณ coding region ทั้งหมดของยีน PfAMA-1 ของเชื้อ *Plasmodium falciparum*, PvAMA-1, PvMsp-4 และ PvMsp-5 ของ *Plasmodium vivax* ใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับยีนแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 3.1 เนื่องจากยีน PvMsp-4 และ PvMsp5 เป็นยีนที่อยู่ใกล้กัน ใน ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ครอบคลุมทั้ง 2 ยีน เพื่อการวิเคราะห์ ซึ่งนอกจากจะลดขั้นตอนการทำ PCR แล้วยังสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนทั้งสองในการหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว

**ตารางที่ 3.1** แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

primer name	nucleotide sequence (5' -> 3')	gene targeted	annealing temp (°C)	amplicon length (bp)
PfAMA-1-F PfAMA-1-R	CAAATTAATGTACTTGTATAAATTGTAC CAACGTCTGATATAATCAGCTTCTC	PfAMA-1	60	1,866
PvAMA-1-F PvAMA-1-R	CATTCTAGCGGTTACTTCCA GATGGAGAAGCCATACTACTAA	PvAMA-1	60	1,686
PvMsp-4-F0 PvMsp-5-R0	ATGAAGGTGGCCTACTTTTTG CTTTGTCTTGGCTGTGTTGA	PvMsp-4, intergenic region, PvMsp-5	60	~3,000

สำหรับการดำเนินการมีขั้นตอนดังนี้

นำ DNA ที่สกัดไว้เป็น DNA ดั้งแบบ (DNA template) องค์กรประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 15 µl ประกอบด้วย

DNA template	5	µl
forward primer (UPS18SF1)	0.2	µM
reverse primer (P18R1)	0.2	µM
10X ExTaq Buffer	1.5	µl
dNTP mixture อย่างละ	2.5	mM

sterilized distilled water	7.03	μl
TaKaRa ExTaq DNA polymerase	0.3	unit/μl

นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR thermal cycler) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ในขั้นตอนแรกต้องทำการแยกสาย DNA (DNA denaturation) ก่อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย

1. การแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที
2. ขั้นตอนที่ primer จับกับ template DNA (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที
3. การสร้างสาย DNA จาก DNA ต้นแบบ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 35 รอบ และขั้นตอนการสร้างสาย DNA สมบูรณ์หลังรอบสุดท้าย ใช้ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

#### การตรวจผลผลิต PCR โดย agarose gel electrophoresis

1. เตรียม agarose ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยชั่ง agarose 1 กรัม ละลายใน TAE บัฟเฟอร์ 100 ml
2. นำไปต้มจนเดือด เขย่าเบา ๆ ให้ agarose เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 ถึง 60°C นำไปเทลงบน gel chamber ที่จัดไว้ แล้วใส่ comb ทิ้งไว้จนแข็งตัว
3. เติมน้ำ TAE ลงไปบนหน้าเจลพอท่วม เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว เพื่อช่วยให้ดึง comb ออกได้ง่ายขึ้น และเป็นการป้องกันไม่ให้หลุม (well) ในเจลแตก ค่อย ๆ ดึง comb ออกโดยดึงปลายทั้ง 2 ข้างออกพร้อม ๆ กันระวังอย่าให้มีการฉีกขาดของเจลแล้วนำไปใส่ใน electrophoresis chamber ซึ่งมี TAE อยู่ในปริมาณที่ท่วมหน้าเจล
4. นำ PCR product 5 μl ผสมกับ loading dye 1 μl ใช้ไมโครปิเปตต์หยอดแต่ละตัวอย่างลงในหลุม เจลโดยเรียงลำดับและจดบันทึกไว้
5. ใช้  $\lambda$ /Hind III และ marker VI เป็น DNA บอกรขนาด (marker) สำหรับผลผลิต PCR รอบแรก และรอบที่สอง เพื่อเปรียบเทียบขนาดโดยประมาณของผลผลิต PCR ปิดฝา electrophoresis chamber ต่อขั้ว อิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า จัดให้ DNA วิ่งเข้าหาขั้วบวกใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 volts เป็นเวลา 30 นาที

6. นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 μg ต่อ μl เป็นเวลา 15 นาที นำไปดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจากแหล่งกำเนิดแสง (UV transilluminator) และถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบ DNA ต่อไป โดยการเปรียบเทียบกับ DNA บอกรขนาด

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และรูปแบบของแถบ DNA วิเคราะห์ข้อมูลโดยอาศัยหลักการของ population genetics และ molecular evolution การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัย

โปรแกรม Clustal\_X การคำนวณอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยการหาค่า nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions per synonymous site (dS) การหาค่านัยสำคัญโดย t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 การวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยอาศัยวิธี neighbor-joining โดยใช้ parameter ของ Nei และ Gajubori การตรวจสอบการเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมโดยการหาค่า minimum number of recombination events (Rm) การหาค่าระดับความหลากหลายของยีนโดยวิเคราะห์ค่า nucleotide diversity และการหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยหาค่า haplotype diversity พร้อมกับค่า standard deviation

## ผลการวิจัย

### ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน PfAMA-1

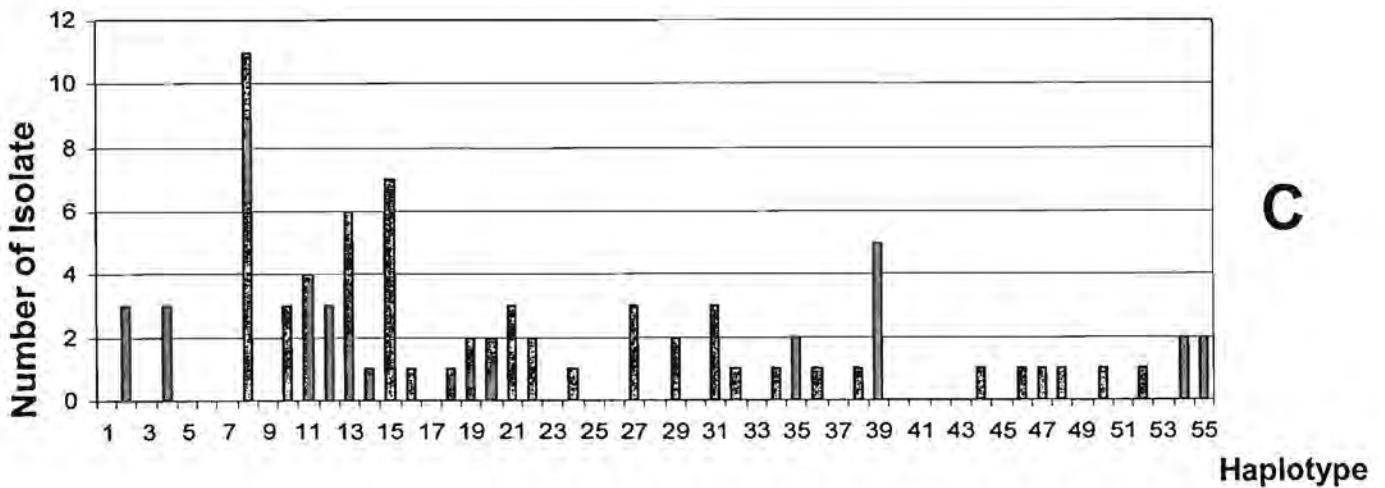
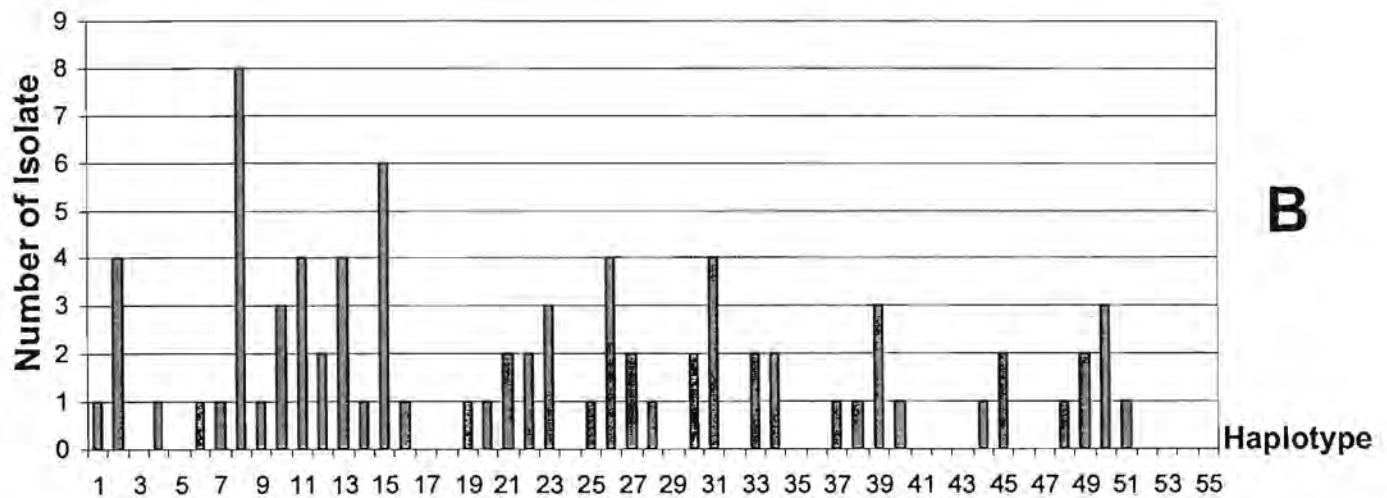
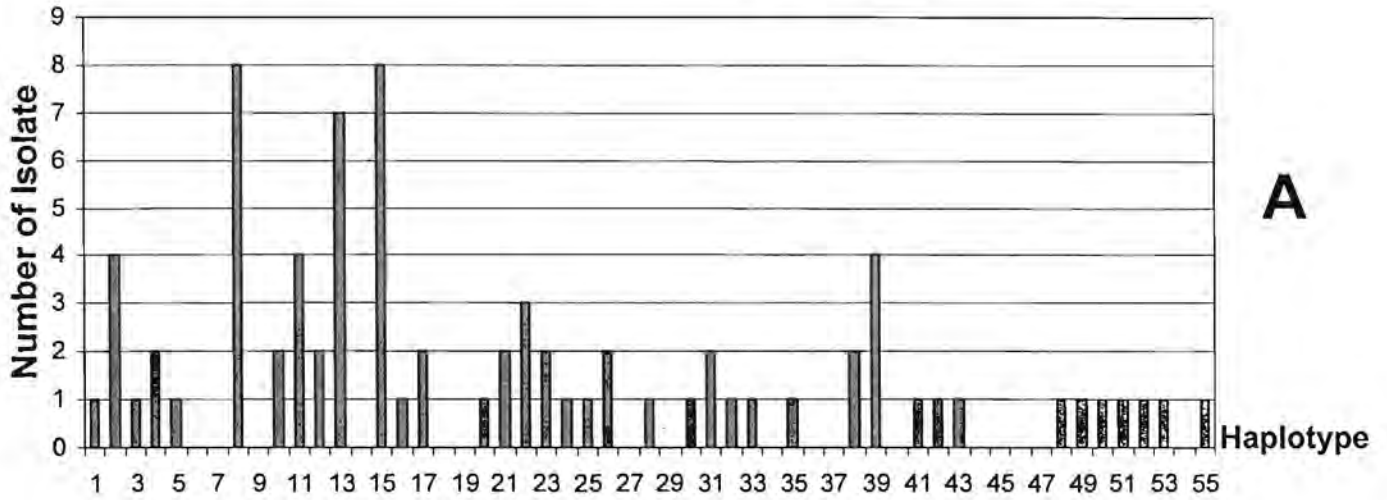
การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน PfAMA-1 จากการใช้ primers PfAMA-1-F และ PfAMA-1-R พบว่าให้ผลผลิต PCR แถบเดี่ยวในขนาดที่ถูกต้องดังแสดงในรูปที่ 3.1

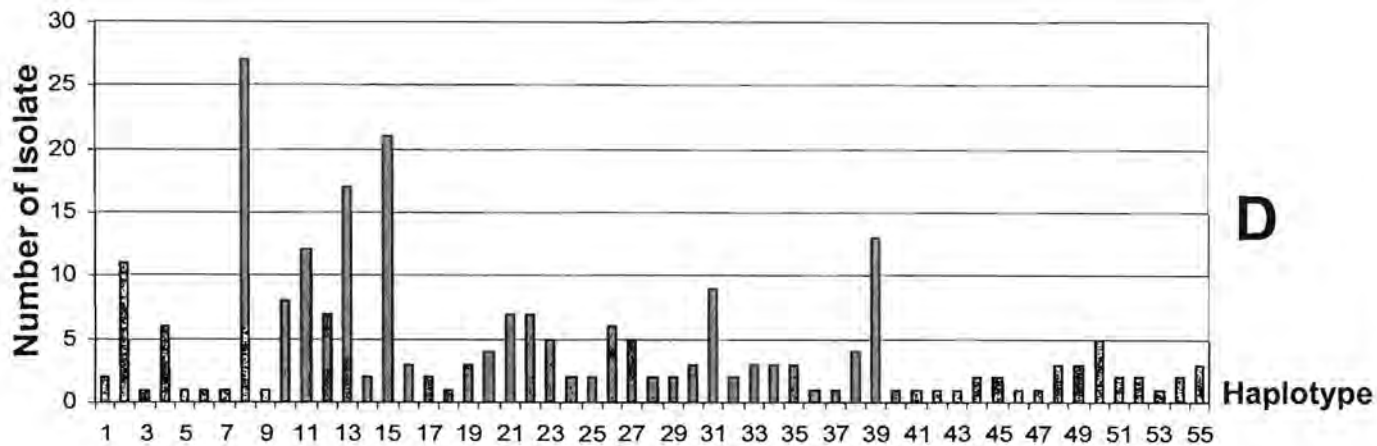


รูปที่ 3.1 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากยีน apical membrane antigen 1 ของ *Plasmodium falciparum* (PfAMA-1) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis DNA บอกรขนาด (marker) คือ  $\lambda$ Hind

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PfAMA-1 ทั้งหมด 242 ตัวอย่าง พบว่าบริเวณ coding region ประกอบด้วยจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,866 ตัวหรือประกอบด้วย 622 codons ซึ่งในแต่ละตัวอย่างไม่พบการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ในยีนนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบทั้งหมด 242 ตัวอย่าง พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 72 ตำแหน่ง โดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 56 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3.2) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PfAMA-1 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 55 แบบ (haplotypes) อย่างไรก็ตามพบว่าความถี่ของการกระจายสำหรับแต่ละ haplotype มีค่าแตกต่างกันโดยพบว่า haplotype ที่พบมากที่สุดคือ haplotype VIII โดยพบทั้งหมด 27 ตัวอย่างหรือร้อยละ 11.2 รองลงมาคือ haplotype XV, XIII และ XXXIX พบร้อยละ 8.7, 7.0 และ 5.4 ตามลำดับ (รูปที่ 3.2 D)

เป็นที่น่าสังเกตว่าการกระจายของ haplotype ในแต่ละปีมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ haplotype ที่พบมากที่สุดได้บ่อยมีความคงที่ในแต่ละปีทำการเก็บรวบรวมตัวอย่าง (รูปที่ 3.2 A, B และ C)





รูปที่ 3.2 การกระจายของ haplotype ต่าง ๆ ของยีน PfAMA-1 ของ *Plasmodium falciparum* จากประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2005 (A), 2006 (B), 2007 (C) และรวมตลอด 3 ปี (D)

ตารางที่ 3.2 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PfAMA-1 จาก 242 ตัวอย่างในประเทศไทย

Haplotype	ตำแหน่งกรดอะมิโน						
	111	1111111222	2222222222	2233333444	4444444455	555555	
	335556667	7788999000	0023444688	8900399000	0334589900	134888	
	5460261272	3579067014	6750235723	5608235345	7598153635	234149	
I	YNDEEHYNTG	NDELMDHFFD	EYIKDKKEKL	EDEENRKNTTE	QIHDKKAMRF	RAKEHN	
II	.K.....K.E	.....Q...	K.....	.....	.NN...DIN.	K.....	
III	.K..Q.....	.Y...E...	K.....IS	Q.KQIH....	...NM.DIN.	.....	
IV	.N.....E	K.N...Q...	..NE...Q..	QHKQ.....RK	.....DIN.	K.....	
V	.K.....E	.....Q...	.....	.....	.....DIN.	K.N...	
VI	..N.....	...I.DD.N	..N.YE....	.HK..P..RK	.....I....	.....	
VII	.K.....	.....Q...	.....	.....	.....IN.	K.....	
VIII	.K..Q.....	.Y...DLL.	.D...Q...	QHKQ.H....	.....D...	..N...	
IX	.K.....E	..D...DD..	..N.Y..Q..	..KQ.H....	.....D...	..N..T	
X	.....K.	...I..D...	..N.YN...S	Q.K..H..RK	.....IDIN.	K.....	
XI	.K..Q....E	..K...Q...	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.DIN.	K.....	
XII	..N.....E	K.N...Q...	..NEY...IS	QHK..H..RK	.....I.IN.	K.....	
XIII	.K.....	..N..NGD.N	..NE...Q.S	Q.K..H..RK	.....I....	.....	
XIV	.K..Q....E	..K...Q...	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.D...	..NQD.	
XV	.K.....K.	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H..R.	.....D...	..NQ.T	
XVI	.K.....K.	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H..RK	.....I....	.....	
XVII	.KHK...K.E	..NP..DLL.	.DN.....S	Q...H..RK	.....ID..Y	.....	
XVIII	.K..Q....E	..K...Q...	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.D...	..NQ..	
XIX	.K.....K.	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H..R.	.....DIN.	K.....	
XX	.K..Q..K.E	.....DR..	..N.YNN..S	Q.K.....RK	.N...IDIN.	K.....	
XXI	.K.....E	..K...QR..	..N.YN.Q.S	Q.....	.NN...DIN.	K.NQ..	
XXII	.....K.E	..K.....	..NEY...IS	Q.KQ.H....	H.N.M.D...	.....	
XXIII	..N.....E	K.N...Q...	..NEY...IS	Q...H..RK	.....I.IN.	K.....	
XXIV	.K..Q....E	.YK...DLL.	.DN.YN...S	Q...H..RK	.....IDIN.	K.....	
XXV	.K.....K.	..N.INGD..	..N.YN.Q..	.....H..R.	.....D...	..NQ.T	
XXVI	.K..Q....E	..K...Q...	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.D...	..N...	
XXVII	.K..Q....E	K.N...Q...	..NEY...IS	QHK..H..RK	.....I.IN.	K.....	
XXVIII	.K.....K.	..N.I.DRV.	..N.YE.Q..	Q...HR.RK	.....I.IN.	K.....	

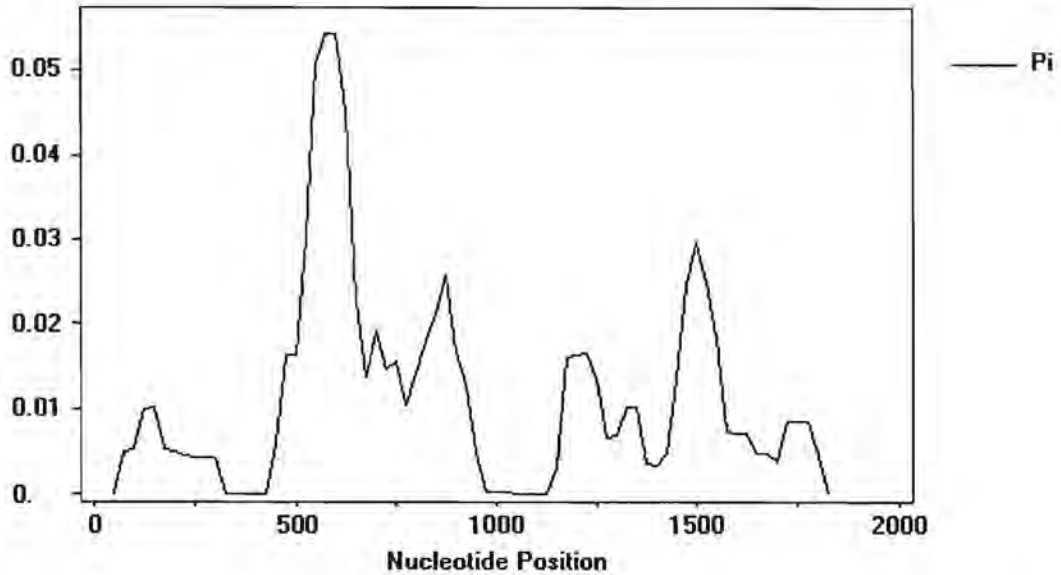
ตำแหน่งกรดอะมิโน

Haplotype

	111	1111111222	2222222222	2233333444	4444444455	555555
	335556667	7788999000	0023444688	8900399000	0334589900	134888
	5460261272	3579067014	6750235723	5608235345	7598153635	234149
XXIX	.K.....E	K.N...DLL.	.D.....Q..	QHKQ.H....	....M.DIN.	..NQDK
XXX	.....E	K.N...Q...	..NEY...IS	QHK..H..RK	.....D.N.	K.....
XXXI	.K.....E	..K...Q...	K.....IS	Q.K.....	..NN...DIN.	KTN...
XXXII	.K.....K.	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H.TR.	.....D...	..NQ.T
XXXIII	.....K.	...I.DD.N	..N.YE....	.HK..H..RK	.....I....	.....
XXXIV	.....K.	..N.INGD.N	..NE.....S	Q.K..H..RK	.....IDIN.	K.....
XXXV	.K.....K.	...I..D..	..N.YN...S	Q.K..H..RK	.....IDIN.	K.....
XXXVI	.....	..D.....	..NEY...S	Q.K..H..RK	.....I.IN.	K.....
XXXVII	.....K.	...I.DD.N	..N.YE....	.HK..H..RK	.....I....	.....
XXXVIII	.K.....E	K.N...DR..	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.D...	.....
XXXIX	.K..Q.....	.Y...DLL.	.DN.YN.Q.S	Q....H..RK	.....IDIN.	K.....
XL	..N.Q....E	..K...QR..	..N.YN.Q.S	Q.....	..NN...DIN.	K.NQ..
XLI	.K.....K.	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H..RK	.....IDIN.	K.NQ.T
XLII	.K.....	K.N.INGD.N	..NE.....S	Q.KQI....	..NN...D...	.....
XLIII	.K.....	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H..R.	.....D...	..NQ.T
XLIV	.K.....K.	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H..R.	.....D...	.....
XLV	.K..Q.....	..D...DLL.	.D.E...Q.S	QHKQ.H....	.....I..N.	K.N...
XLVI	.....	...I..D..	..N.YN...S	Q.K..H..RK	.....IDIN.	K.....
XLVII	.....E	..K...Q...	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.D...	..N...
XLVIII	.K.....K.	K.N.INGD.N	..NE.....S	Q.K..H..RK	.....M.DIN.	..NQDK
XLIX	.K..Q...PE	..K...Q...	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.D...	..N...
L	.K...PC.K.	..N.INGD.N	..N.YN.Q..	.....H..R.	.....D...	..NQ.T
LI	.K..Q.....	..K...DLL.	.DNE.....S	Q.K..H..RK	.....I....	.....
LII	.K..Q....E	..K...Q...	K.....IS	Q.KQ.H....	H.N.M.DIN.	K.....
LIII	.K.....	..N...GLL.	.D.E...Q.S	QHKQ.H....	.....N.	K.....
LIV	FK..Q....E	K.N...Q...	..NEY...IS	QHK..H..RK	.....I.IN.	K.....

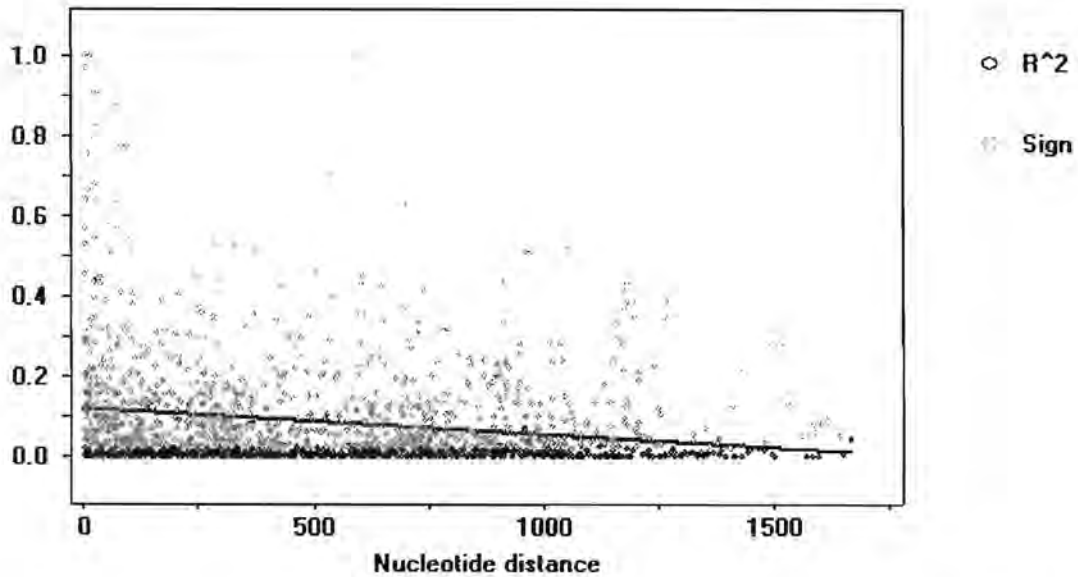
เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน PfAMA-1 พบว่า nucleotide diversity มีค่า 0.01113 และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.00011 จากการเปรียบเทียบค่า nucleotide diversity โดยวิธี sliding window analysis พบว่าค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลงมากน้อยขึ้นกับบริเวณต่าง ๆ ของยีนโดยพบว่า ในส่วนที่ตรงกับ external domain ของโปรตีนมีค่า nucleotide diversity สูงกว่าส่วนอื่น ๆ (รูปที่ 3.3) และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 72 ตำแหน่งนั้นเป็นการแทนที่ชนิดที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด 63 ตำแหน่ง และการแทนที่ชนิดที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด 9 ตำแหน่ง ค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ synonymous nucleotide diversity มีค่า 0.00263 และค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ nonsynonymous nucleotide diversity มีค่า 0.01331 และค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน (average number of nucleotide differences, k) มีค่า 20.7636 เมื่อพิจารณาถึงโอกาสที่จะสุ่มเลือกตัวอย่างที่มี haplotype เดียวกันจากประชากรเชื้อมาลาเรียที่ทำการวิเคราะห์หรือค่า haplotype diversity มีค่า 0.963 โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.005





รูปที่ 3.3 กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PfAMA-1 โดยวิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง

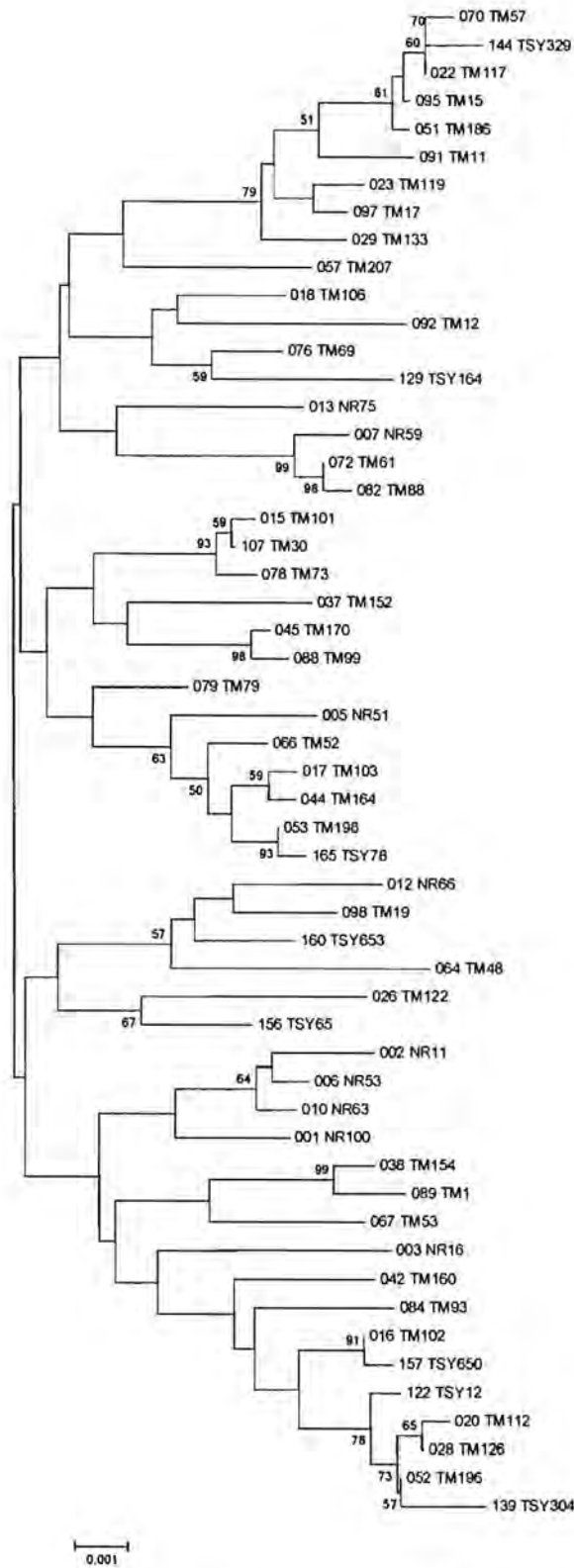
เนื่องจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในยีน PfAMA-1 มีหลายรูปแบบและเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ค่า linkage disequilibrium ระหว่างแต่ละคู่ของนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบการเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมที่อาจเป็นสาเหตุของความหลากหลายดังกล่าว จากการวิเคราะห์พบว่าค่า  $r^2$  ที่มีนัยสำคัญมีจำนวนลดลงอย่างมากตามระยะห่างของคู่นิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเกิด recombination ในยีน PfAMA-1 (รูปที่ 3.4) ในทำนองเดียวกันจากการคำนวณค่า minimum number of recombination event หรือค่า Rm จากการเปรียบเทียบคู่นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 2,346 คู่ภายในยีนดังกล่าวพบว่ามีค่า potential recombination site ทั้งหมดมากถึง 27 ตำแหน่ง



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงค่า  $r^2$  ของแต่ละคู่นิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PfAMA-1 จุดสี่เหลี่ยมคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดที่ดำคือค่าที่ไม่มีนัยสำคัญ

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์โดยการหาความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ในยีน PfAMA-1 จากตัวอย่างต่าง ๆ ของประเทศไทยโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่าโครงสร้างของ tree ดังกล่าวมีการแยกแขนงเป็น 2 กลุ่มใหญ่ และภายในแต่ละกลุ่มมีการแบ่งเป็นย่อยอย่างละ 2 กลุ่มย่อย อย่างไรก็ตามระดับความเชื่อมั่นของการแยกแขนงเหล่านี้มีค่าค่อนข้างต่ำ (รูปที่ 3.5) ดังนั้น haplotype ในยีน PfAMA-1 จึงไม่มีการแยกเป็นกลุ่ม family ที่ชัดเจนเหมือนกับยีน PfMsp-1 และ PfMsp-2

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยการหาค่า nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions per synonymous site (dS) การหาค่าที่มีนัยสำคัญโดย t-test ของยีน PfAMA-1 โดยคัดเลือกเฉพาะ haplotype ที่แตกต่างกัน พบว่า dN มีค่า  $0.0137 \pm 0.0020$  ส่วนค่า dS มีค่า  $0.0027 \pm 0.0013$  ซึ่งค่า dN มีค่ามากกว่าค่า dS อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) ความแตกต่างดังกล่าวแสดงถึงการเกิด positive selection ในยีน PfAMA-1



รูปที่ 3.5 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ในยีน PfAMA-1 โดยวิธี neighbor-joining ตัวเลขกำกับแขนงของ tree แสดงค่าร้อยละระดับความเชื่อมั่นของการแยกแขนง

### ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน PvAMA-1

ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน PvAMA-1 โดยวิธี PCR จากการใช้ primers PvAMA-1-F และ PvAMA-1-R พบว่าให้ผลผลิตที่มีขนาดเดียวกันในทุกตัวอย่างที่ศึกษาดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากยีน apical membrane antigen 1 ของ *Plasmodium vivax* (PvAMA-1) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis DNA บอกรขนาด (marker) คือ  $\lambda$ /Hind

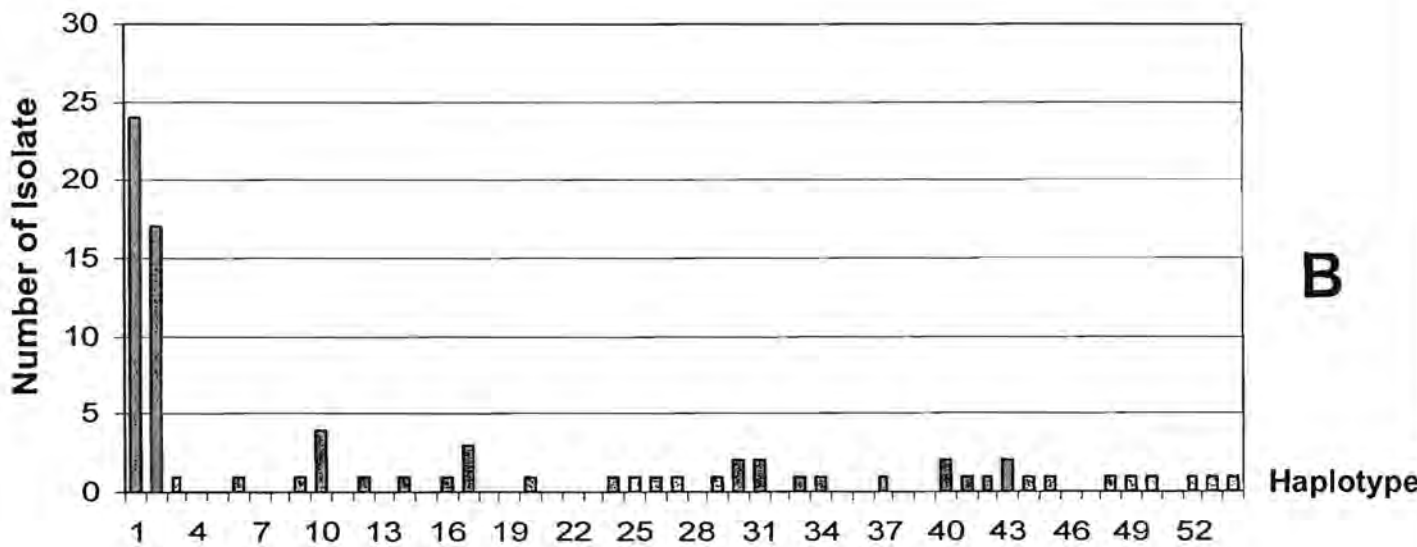
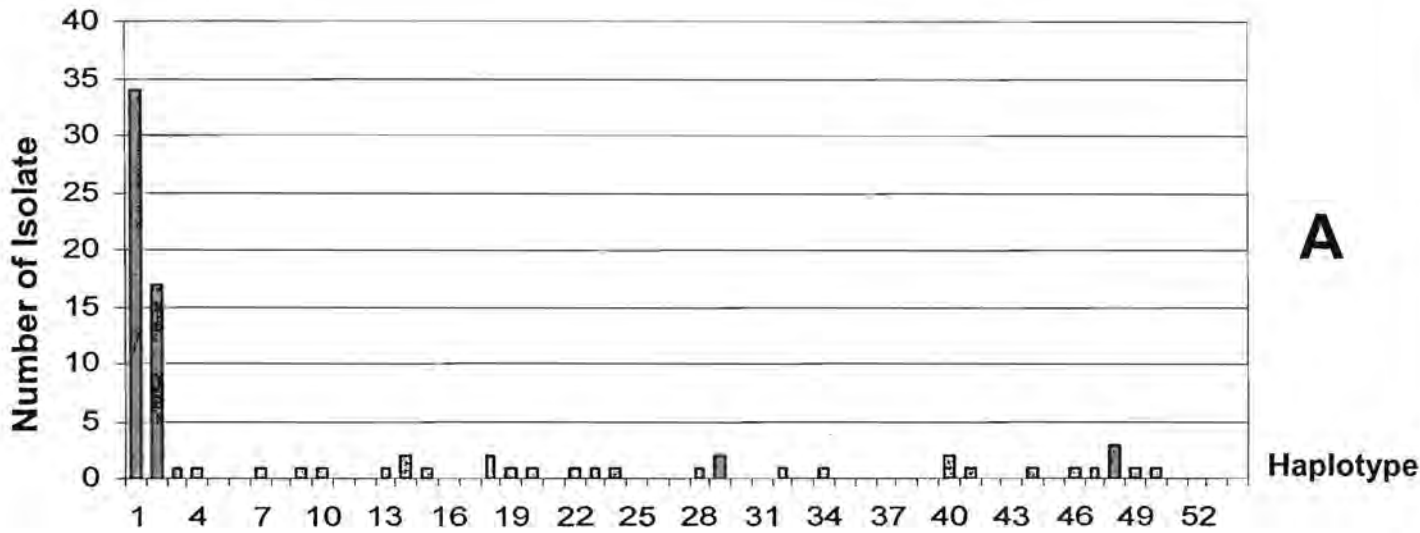
ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ coding region ของยีน PvAMA-1 ซึ่งประกอบด้วยจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,686 ตัวหรือประกอบด้วย 562 codons ทั้งหมด 241 ตัวอย่าง พบว่าในแต่ละตัวอย่างไม่พบการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ในยีนนี้เช่นเดียวกับ PfAMA-1 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบทั้งหมด พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 48 ตำแหน่งโดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 28 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3.3) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PvAMA-1 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 54 แบบ (haplotypes) นอกจากนี้ยังพบว่าความถี่ของการกระจายสำหรับแต่ละ haplotype มีค่าแตกต่างกันในทำนองเดียวกับ PfAMA-1 โดย haplotype ที่พบมากที่สุดคือ haplotype I โดยพบทั้งหมด 86 ตัวอย่างหรือร้อยละ 35.7 รองลงมาคือ haplotype II พบร้อยละ 20.7 เป็นที่น่าสังเกตว่า haplotype ที่เหลือส่วนใหญ่พบเพียงอย่างละ 1 – 7 ตัวอย่าง และเป็นที่น่าสังเกตว่า haplotypes ที่พบมากที่สุดและพบมากรองลงมา นั้นมีความคงที่ในแต่ละปีที่ศึกษา (รูปที่ 3.7)

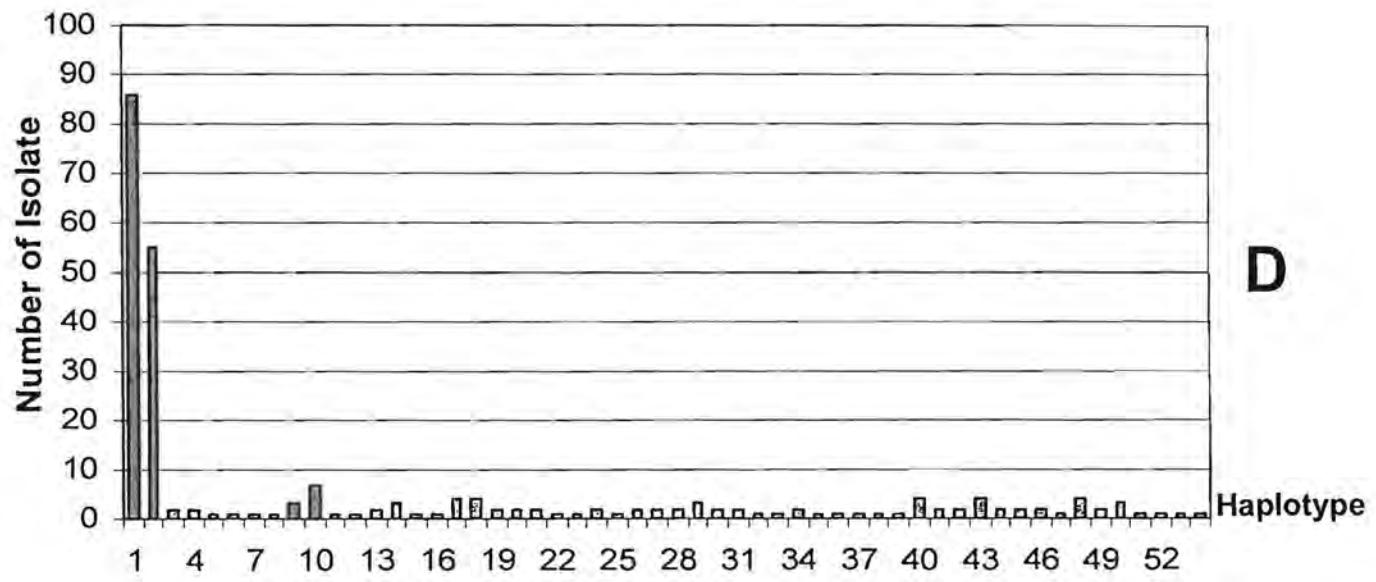
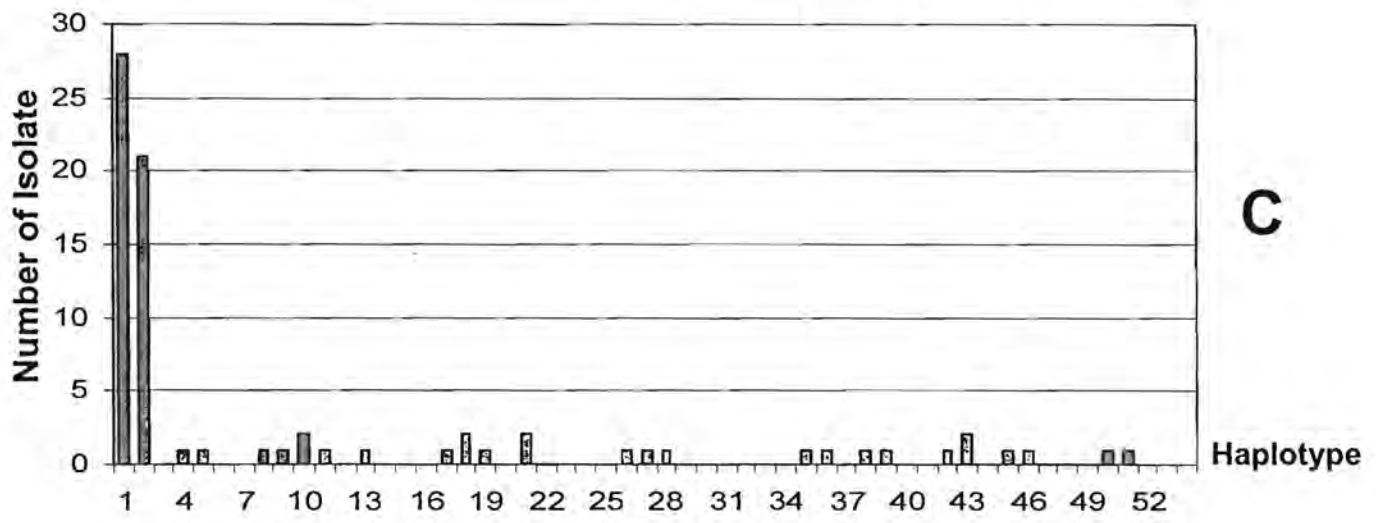
ในทำนองเดียวกันเมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน PvAMA-1 พบว่า nucleotide diversity มีค่า 0.00593 และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.00026 จากการเปรียบเทียบค่า nucleotide diversity โดยวิธี sliding window analysis พบว่าค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลงมากน้อยขึ้นกับบริเวณต่าง ๆ ของยีนโดยพบว่าในส่วนที่ตรงกับ external domain ของโปรตีนมีค่า nucleotide diversity สูงกว่าส่วนอื่น ๆ (รูปที่ 3.8) ค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ synonymous nucleotide diversity มีค่า 0.0064 และค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ

ตารางที่ 3.3 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PvAMA-1 จาก 241 ตัวอย่างในประเทศไทย

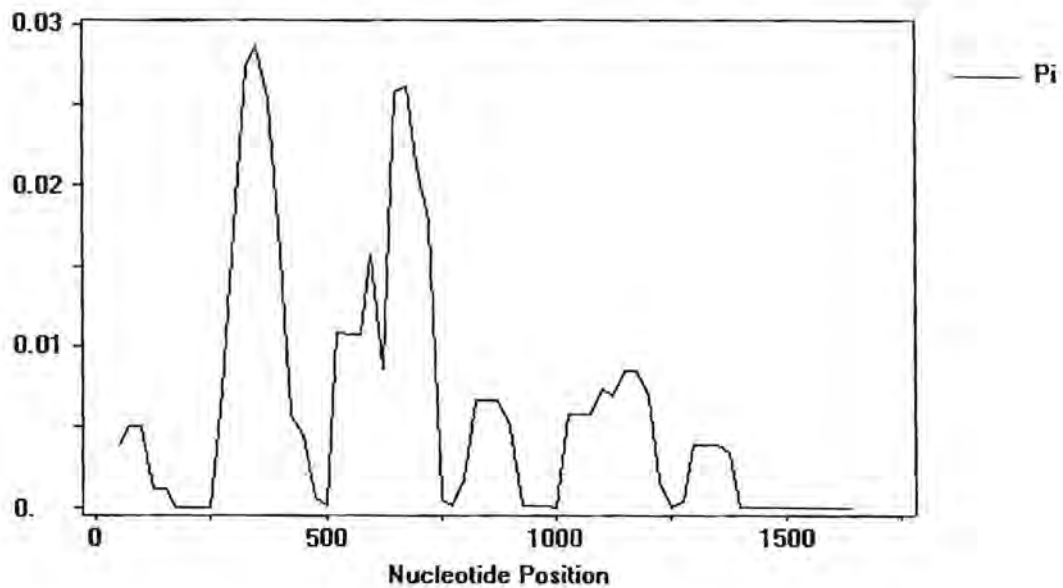
ตำแหน่งกรดอะมิโน			
Haplotype	11111111	1111222222	2333333344 4
	2401123344	4689112257	8158888803 4
	5272700201	5390087837	8320245908 5
I	QGATGKNNIA	ARKEPVESGK	ERKQVRESKH N
II	H..K.R....	..EKSL....	G.N..... D
III	.....	.....	.....R.. .
IV	HVDK.R....	....S.VD.E	G..R.L.... .
V	.....R..LE	...KS.VD.E	G....P..R. .
VI	.....L..	..N.S.VD.E	G..... .
VII	..DK.R....	..EK.....	.....EP.... .
VIII	...KRRKDL.	E.EK.....E	G....L.... .
IX	.....R..LE	..K..VD..	G....P.... .
X	.....	..EKS....E	G....P.... .
XI	..DK.R....	....S.....	G.....D.R. .
XII	..D.....	..NK.....	..... .
XIII	.....	.....	..N...D.R. .
XIV	HV.K.R....	..EKSL....	G.N..... .
XV	..DK.R....	....S.VD..	G....P.... .
XVI	..D..R..LE	...KS.VD.E	G....P..R. .
XVII	.....	..NK.....	..... .
XVIII	.....R..LE	..K..VD..	.....P.... .
XIX	..DK.R....	..EKS.K...	..N..... .
XX	.....	..EK.....	..E..... .
XXI	..DK.R..LE	..EK.....	.....L.... .
XXII	.....	....S.VD..	G..... .
XXIII	.....R..LE	....S.....	.....E...R. .
XXIV	..DK.R....	..EKS.VD..	...R.L.... .
XXV	..DK.R....	E...S.VD..	G..R.L.... .
XXVI	..DK.R....	..EKS.K...	.....P.... .
XXVII	.....RKDL.	....S.VD..	G....P.... .
XXVIII	..DK.R....	..NKS.VD..	...R.P.... .
XXIX	...K.R....	..EKS.VD..	G..... .
XXX	.....R.DLE	..K..VD..	G....PD..R D
XXXI	..NK.R....	.....	.....D.R. .
XXXII	...K.R....	..EKS....E	G.N..PK.R. .
XXXIII	..V..R....	....S.VD.E	..... .
XXXIV	..DK.R....	....S.VD..	G.N..... .
XXXV	.....R..LE	..EKS.VD.E	G....P..R. .
XXXVI	.....R..LE	..EK.....	G....P..R. .
XXXVII	HV.K.R....	..EKSL....	G..... .
XXXVIII	.....	..K..S.VD.E	G..... .
XXXIX	.....	....S.VD..	..... .
XL	.....	.....	.....R.P.... .
XLI	...K.R....	..EKS.VD.E	G.....D.R. .
XLII	...K.R..LE	..EK.....	G....L..R. .
XLIII	...K.R...E	..EKS.VD.E	G....P.... .
XLIV	.....R..LE	..NK..VD..	..I...PK.R. .
XLV	...KRR.DL.	E.NK..VDE.	G..R.PQ... .
XLVI	..DK.R....	..EK.....E	G....L...R D
XLVII	HVDK.R....	..EKS.....	..NR.L.... .
XLVIII	.....R..L.	..EK..VD..	..... .
XLIX	..DK.R....	....S.....	G....P..R. .
L	.....R..L.	..NK.....	.....L.... .
LI	HV.K.R....	..EKS.VD.E	G....L.... .
LII	.....R..LE	..NK..VD..	..N..PK.R. .
LIII	...K.RKDL.	E.EKS.....	...R.L.... .
LIV	.....RKD..	..EK.....	G..R.L.... .

nonsynonymous nucleotide diversity มีค่า 0.0058 และค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน (average number of nucleotide differences, k) มีค่า 9.99849 ซึ่งมีค่าต่ำกว่า PfAMA-1 มาก เมื่อพิจารณาถึงโอกาสที่จะสุ่มเลือกตัวอย่างที่มี haplotype เดียวกันจากประชากรเชื้อมาลาเรียที่ทำการวิเคราะห์หรือค่า haplotype diversity มีค่า 0.789 โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.029





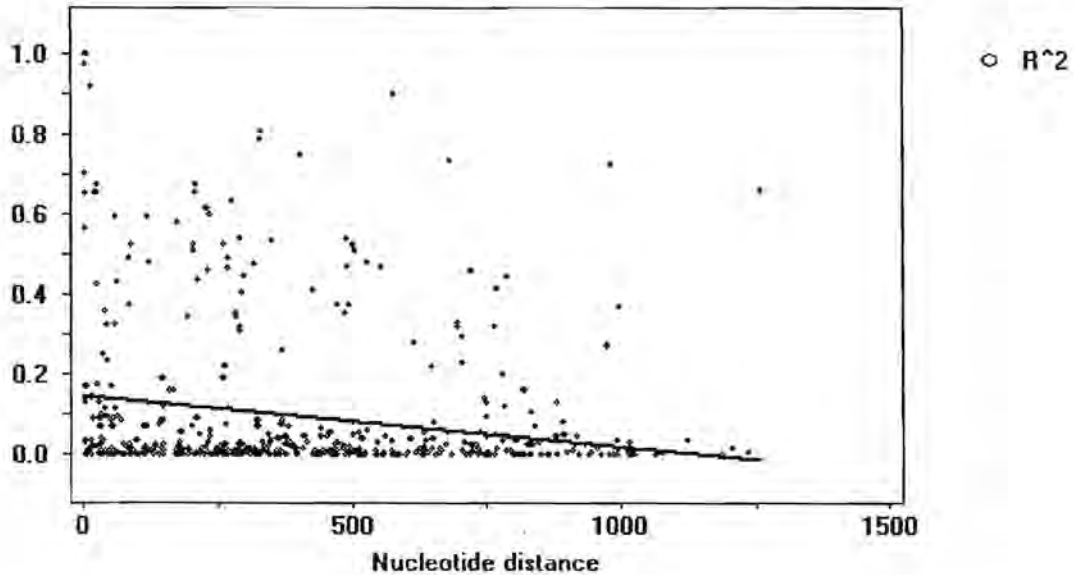
รูปที่ 3.7 การกระจายของ haplotype ต่าง ๆ ของยีน PvAMA-1 ของ *Plasmodium vivax* จากประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2005 (A), 2006 (B), 2007 (C) และรวมตลอด 3 ปี (D)



**รูปที่ 3.8** กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PvAMA-1 โดยวิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง

ในการวิเคราะห์ค่า linkage disequilibrium ระหว่างแต่ละคู่ นิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบการเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมในยีน PvAMA-1 พบว่าคู่ นิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้วิเคราะห์ได้มีทั้งสิ้น 277 คู่ ผลการวิเคราะห์พบว่าคู่ที่มีนัยสำคัญโดยการทดสอบด้วย Fisher's exact test มีทั้งสิ้น 123 คู่ โดยค่า  $r^2$  ที่มีนัยสำคัญมีจำนวนลดลงอย่างมากตามระยะห่างของคู่ นิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเกิด recombination ในยีน PvAMA-1 (รูปที่ 3.9) ในทำนองเดียวกันจากการคำนวณค่า minimum number of recombination event หรือค่า Rm จากการเปรียบเทียบคู่ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 946 คู่ภายในยีนดังกล่าวพบว่ามีค่า potential recombination site ทั้งหมดมากถึง 14 ตำแหน่ง

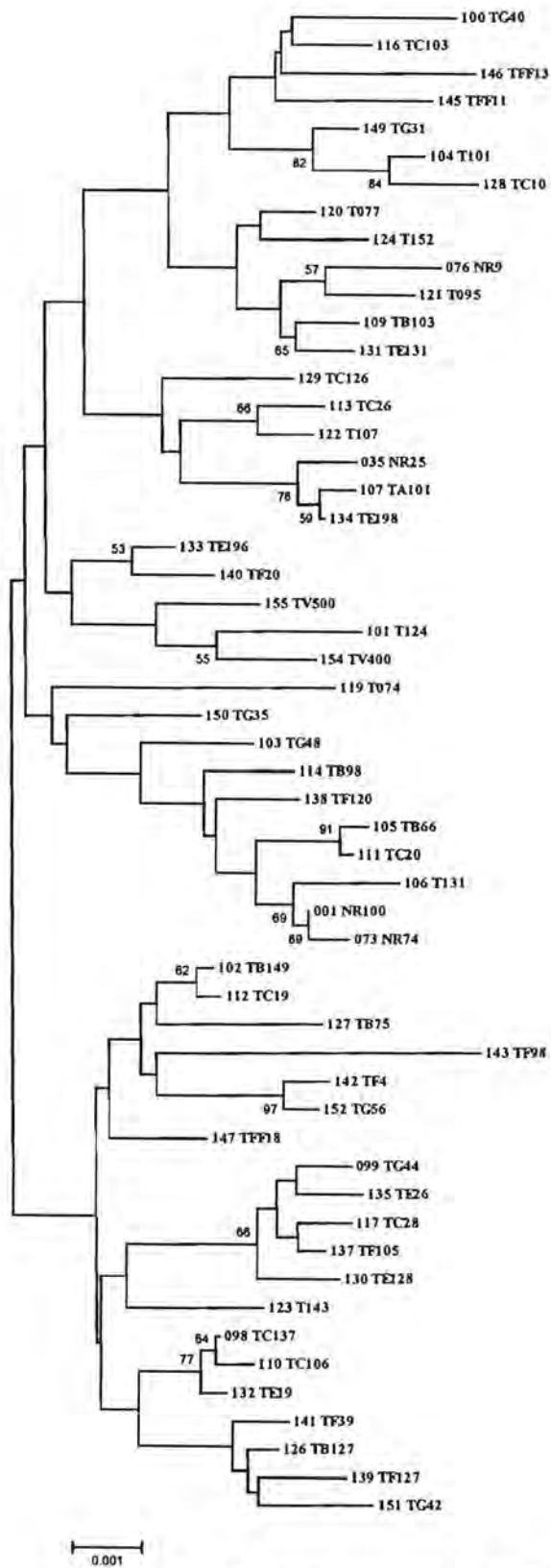




รูปที่ 3.9 กราฟแสดงค่า  $r^2$  ของแต่ละคู่นิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PvAMA-1 จุดสีเทาคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดสีดำคือค่าที่ไม่มีนัยสำคัญ

สำหรับการวิเคราะห์โดยการหาความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ในยีน PvAMA-1 จากตัวอย่างที่ศึกษาโดยการสร้าง phylogenetic tree พบว่าโครงสร้างของ tree ดังกล่าวมีการแยกแขนงเป็น 2 กลุ่มใหญ่ และภายในแต่ละกลุ่มมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อย อย่างไรก็ตามระดับความเชื่อมั่นของการแยกแขนงเหล่านี้มีค่าค่อนข้างต่ำ (รูปที่ 3.10) ดังนั้น haplotype ในยีน PvAMA-1 จึงไม่มีการแยกเป็นกลุ่ม family ที่ชัดเจน เช่นเดียวกับยีน PfAMA-1

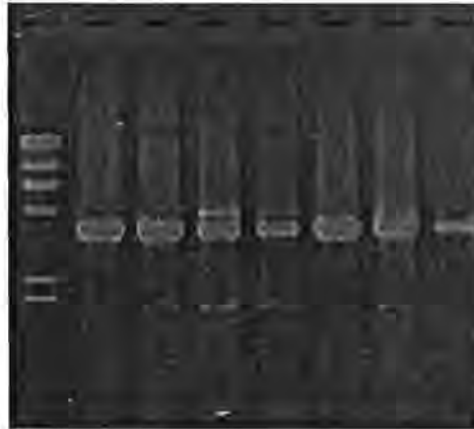
นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยการหาค่า nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions per synonymous site (dS) การหาค่านัยสำคัญโดย t-test ของยีน PvAMA-1 โดยคัดเลือกเฉพาะ haplotype ที่แตกต่างกัน พบว่า dN มีค่า  $0.0082 \pm 0.0018$  ส่วนค่า dS มีค่า  $0.0066 \pm 0.0022$  ซึ่งค่า dN มีค่ามากกว่าค่า dS แต่ไม่มีนัยสำคัญ ( $t = 0.563, p > 0.05$ ) แสดงถึงการเกิด neutral evolution ในยีน PvAMA-1 ในภาพรวม



รูปที่ 3.10 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ในยีน PvAMA-1 โดยวิธี neighbor-joining ตัวเลขกำกับแขนงของ tree แสดงค่าร้อยละระดับความเชื่อมั่นของการแยกแขนง

### ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน PvMsp-4

จากการใช้วิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน PvMsp-4 โดยใช้ primers ซึ่งครอบคลุมยีนทั้ง PvMsp-4 และ PvMsp-5 พบว่าให้ผลผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อยดังแสดงในรูปที่ 3.11



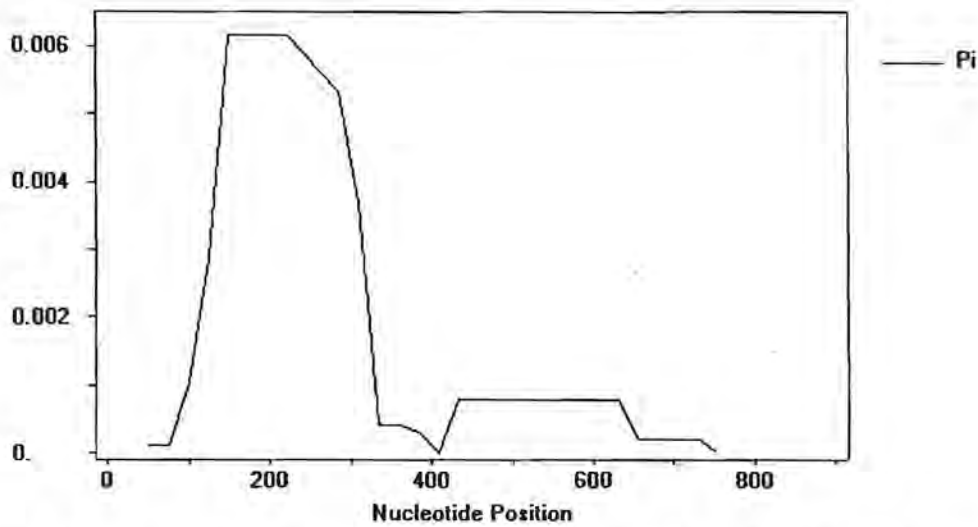
รูปที่ 3.11 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR จากยีน merozoite surface protein-4 ของ *Plasmodium vivax* (PvMsp-4) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis DNA บอกรขนาด (marker) คือ  $\lambda$ /Hind

จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน PvMsp-4 มีจำนวนแตกต่างกันขึ้นกับตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยพบจำนวนนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 654 ตัวหรือ 218 codons จนถึง 762 ตัวหรือ 254 codons ทั้งนี้เนื่องจากยีน PvMsp-4 มีบริเวณที่เป็น repeats จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสิ้น 240 ตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบทั้งหมด พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ซึ่งไม่นับรวมในส่วนของ repeats จำนวน 18 ตำแหน่ง โดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้เกิดกรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 10 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3.4) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PvMsp-4 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 38 แบบ (haplotypes) นอกจากนี้ยังพบว่าความถี่ของการกระจายสำหรับแต่ละ haplotype มีค่าแตกต่างกัน

สำหรับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน PvMsp-4 พบว่า nucleotide diversity มีค่า 0.00129 และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.00024 จากการเปรียบเทียบค่า nucleotide diversity โดยวิธี sliding window analysis พบว่าค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยขึ้นกับบริเวณต่าง ๆ ของยีน (รูปที่ 3.12) ค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ไม่ทำให้เกิดกรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ synonymous nucleotide diversity มีค่า 0.00216 และค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ nonsynonymous nucleotide diversity มีค่า 0.00104 และค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน (average number of nucleotide differences,  $k$ ) มีค่า 0.76463 เมื่อพิจารณาถึงโอกาสที่จะสุ่มเลือกตัวอย่างที่มี haplotype เดียวกันจากประชากรเชื่อมมาลาเรียที่ทำการวิเคราะห์หรือค่า haplotype diversity มีค่า 0.329 โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.044

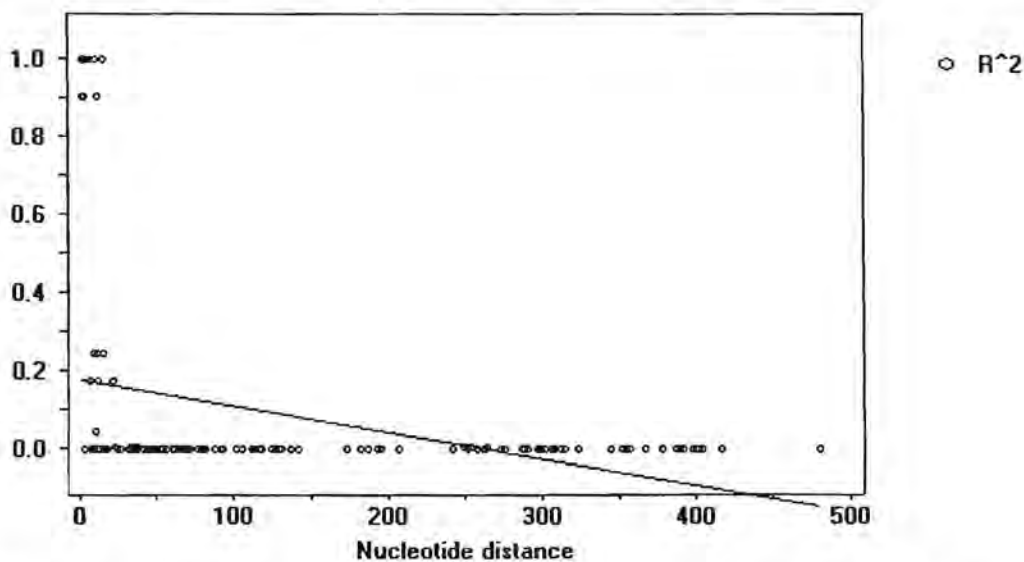
ตารางที่ 3.4 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PvMsp-4 จาก 240 ตัวอย่างในประเทศไทย

Haplotype	ตำแหน่งกรดอะมิโน								
	2555556666 3034561234	6667777778 5790123781	8888888899 2345678901	1111111111 9114455555 21589012345	1111111111 5555666666 6789012345	11111111222 6667788899334 6782334569021			
I	RA----	G----	-S----	DGL-	-----	-DS-----	----DHGDDH	GDDH----	GDDDH
II	..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.....N
III	..	GSSG.	-----	-----	-----	..D-----	-----	....Q-----	.....N
IV	..	-----	..GSSG.	-----	-----	-Y.D----	HGD DHGD.	.....	.....N
V	..	-----	-----	-----	-----	..D-----	-----	-----	.....N
VI	..	GSSGD-	-----	-----	-----	..DHGDDHGD	DHGD.	....Q-----	.....N
VII	..	-----	-----	-----	-----	..D-----	-----	-----	.....N
VIII	..	-----	-----GDS-	-----GLS	G..DH-----	-----	-----	-----	.....N
IX	..	-----	-----	-----GLS	G..	-----	-----	-----	.....N
X	..	S-----	-----	-----	-----	..DHGDDHGD	DHGD.	....Q-----	.....N
XI	..	-----	-----G	LSG-----	-----	..DHG-----	----D.	....Q-----	.....N
XII	..	-----	-----GDS-	-----GLS	G..DH-----	-----	-----	-----	.....N
XIII	..	GSSG.SSG	G.-----	-----	-----	..DHG-----	----D.	-----	.....N
XIV	..	-----	-----G	LSG---GLS	G..DHGDDHGD	DHGD.	.....	.....	..N.N
XV	..	-----	-----GDS-	-----GLS	G..	-----	-----	-----	.....N
XVI	..	-----	-----G.SD	---SSGGLS	G..	-----	-----	----Q-----	.....N
XVII	K.	-----	-----	-----	-----	..D-----	-----	-----	.....N
XVIII	..	-----	-----GDSG	SSGDSSGGLS	G..DHG-----	----D.	-----	-----	.....N
XIX	..	....SSG	G.-----	-----	-----	..DHGDDHGD	DHGD.	.....	..N.N
XX	..	-----	-----	-----	-----	..---DDHGD	DHGD.	.....	..N.N
XXI	..	-----	-----	-----	-----	..D---HGD	DHGD.	-----	.....N
XXII	..	-----	-----	-----	-----	..DHGDDHGD	DHGD.	....GDDQ.	.....N
XXIII	..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.....N
XXIV	..	GASG.	-----	-----	-----	-----	-----	....Q-----	.....N
XXV	..	-----	-----	-----	-----	-----	----D.	-----	.....N
XXVI	..	-----	-----	-----	-----	..DHGDDHGD	DHGD.	....Q-----	.....N
XXVII	..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	....Q-----	.....N
XXVIII	..	-----	-----	-----	-----	-----	DHGD.	-----	.....N
XXIX	..	-----	-----	-----	-----	..DHGDDHGD	DHGD.	-----	.....N
XXX	..	-----	-----	-----	-----	..---DHGD	DHGD.	....Q-----	.....N
XXXI	..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.....N
XXXII	..	-----	-----	-----	-----	..D-----	-----	....Q-----	.....N
XXXIII	..	-----	-----	-----	-----	-----	-----	....Q-----	.....N
XXXIV	..	-----	-----	-----	-----	..D-----	-----	-----	.....N
XXXV	..	-----	-----	-----	-----	..L-----	-----	-----	.....N
XXXVI	..	-----	-----	-----	-----	..L-----	-----	....Q-----	.....N
XXXVII	..	-----	-----I	-----	-----	..D-----	-----	-----	.....N
XXXVIII	..	-----	-----	-----	-----	..	-----	....Q-----	..NN



รูปที่ 3.12 กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PvMsp-4 โดยวิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง

การวิเคราะห์ค่า linkage disequilibrium ระหว่างแต่ละคู่ของนิวคลีโอไทด์ในยีน PvMsp-4 พบว่าคู่ของนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้วิเคราะห์ได้มีทั้งสิ้น 153 คู่ ผลการวิเคราะห์พบว่าคู่ที่มีนัยสำคัญโดยการทดสอบด้วย Fisher's exact test มีทั้งสิ้น 19 คู่ โดยค่า  $r^2$  ที่มีนัยสำคัญมีจำนวนลดลงอย่างมากตามระยะห่างของคู่ของนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเกิด recombination ในยีน PvMsp-4 (รูปที่ 3.13) ในทำนองเดียวกันจากการคำนวณค่า minimum number of recombination event หรือค่า Rm จากการเปรียบเทียบคู่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 153 คู่ ภายในยีนดังกล่าวพบว่ามีค่า potential recombination site ทั้งหมด 1 ตำแหน่ง



รูปที่ 3.13 กราฟแสดงค่า  $r^2$  ของแต่ละคู่ของนิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PvMsp-4 จุดสีเทาคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดสีดำคือค่าที่ไม่มีนัยสำคัญ

ผลการเปรียบเทียบอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยการหาค่า nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions per synonymous site (dS) การหาค่านี้สำคัญโดย t-test ของยีน PvMsp-4 โดยคัดเลือกเฉพาะ haplotype ที่แตกต่างกัน พบว่า dN มีค่า  $0.0019 \pm 0.0010$  ส่วนค่า dS มีค่า  $0.0043 \pm 0.0020$  ซึ่งค่า dN มีค่ามากกว่าค่า dS แต่ไม่มีนัยสำคัญ ( $t = 1.073, p > 0.05$ ) แสดงถึงการเกิด neutral evolution ในยีน PvMsp-4 ในภาพรวม

สำหรับการหาความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype ของ PvMsp-4 โดยการสร้าง phylogenetic tree นั้น ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ในที่นี้เนื่องจากความแตกต่างของแต่ละ haplotype ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของ repeats ซึ่งมีทั้งการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของ repeat units ดังนั้น topology ของ tree จึงขึ้นอยู่กับความเร็วลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างมาก

### ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน PvMsp-5

ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMsp-5 พบว่าจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน PvMsp-4 มีจำนวนแตกต่างกันขึ้นกับตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยพบจำนวนนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1149 ตัวหรือ 383 codons จนถึง 1173 ตัวหรือ 391 codons ทั้งนี้เนื่องจากยีน PvMsp-5 มีบริเวณที่เป็น repeats เช่นเดียวกับ PvMsp-4 จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งสิ้น 240 ตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบทั้งหมด พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จำนวน 143 ตำแหน่ง โดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 123 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3.5) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PvMsp-5 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 66 แบบ (haplotypes) นอกจากนี้ยังพบว่าความถี่ของการกระจายสำหรับแต่ละ haplotype มีค่าแตกต่างกัน

ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน PvMsp-5 พบว่า nucleotide diversity มีค่า 0.03487 และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.00123 จากการเปรียบเทียบค่า nucleotide diversity โดยวิธี sliding window analysis พบว่าค่าดังกล่าวเปลี่ยนแปลงมากน้อยขึ้นกับบริเวณต่าง ๆ ของยีน (รูปที่ 3.14) ค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ synonymous nucleotide diversity มีค่า 0.01741 และค่า nucleotide diversity ในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดหรือ nonsynonymous nucleotide diversity มีค่า 0.03986 และค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน (average number of nucleotide differences, k) มีค่า 39.22914 เมื่อพิจารณาถึงโอกาสที่จะสุ่มเลือกตัวอย่างที่มี haplotype เดียวกันจากประชากรเชื่อมาลาเรียที่ทำการวิเคราะห์หรือค่า haplotype diversity มีค่า 0.904 โดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.019

สำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยการหาค่า nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions per synonymous site (dS) การหาค่านี้สำคัญโดย t-test ของยีน PvMsp-5 โดยคัดเลือกเฉพาะ haplotype ที่แตกต่างกัน พบว่า dS มีค่า  $0.0240 \pm 0.0058$  ส่วนค่า dN มีค่า  $0.0494 \pm 0.0050$  ซึ่งค่า dN มีค่ามากกว่าค่า dS แต่ไม่มีนัยสำคัญ ( $t = 3.317, p < 0.01$ ) แสดงถึงการเกิด positive selection ในยีน PvMsp-5

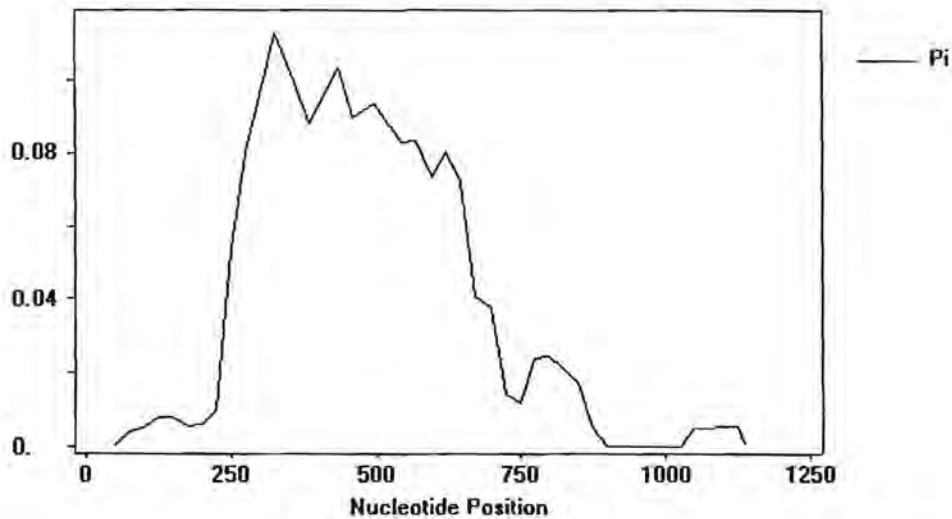
### ตารางที่ 3.5 การแทนที่ของกรดอะมิโนใน PvMsp-5 จาก 240 ตัวอย่างในประเทศไทย

		ตำแหน่งกรดอะมิโน														
Haplotype	1111	11111	11111111	111111111	11111111	111111	111111111	11111111	11111111	11111111	111112	2222222	2222222222	222222222233		
2334555899	9999990000	00001	11111112	22222223	33333334	444445	55555556	66666667	77777777	88888889	99990	0000111	2222222445	555666777756		
6491345913	4567890125	67890	12567890	123567890	12345670	123790	124567890	12345680	12345689	12456780	12390	1345279	1235678670	469248124793		
I	VAQSANRNEE	QGPPSGEDTE	ETKKE	ATDGEK-E	PSDQAQKVD	STVTGAEK	DEQPEE	KMTLGGSD	HTDDGNDG	E-GGDND	NQGDGKEE	G-GDG	KDDGSD	AAP-GDAKHD	PGDEEPPGEYD	
II	.....S.K	KDST.....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD..	PAAPD... ..NS..	Q.....-	.....	QG.....E	D....GG	.KENS	E.N.A..	T..ER.DE..	.....Q.HG		
III	.....SKD	KD.QTEG...	GKDNA	.A..-EVR	...K..E..	....D..	E....D	RL..I...	N...K..	.GD..G..	.P.EE.GG	.KE..	..HEEE..	...-...E..	.....D.KHG	
IV	.....	.....E.AP.	.....K.-	.....E.N	....D..	...K..	....D.D.	....EG..	.RD...E	D..N..GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	..GK...Q.H.		
V	.....S.	KDST.....K	K.DNA	.A..-VG	.....E.N	....D..	...K..	....D.EK..	..G.K..	.GD..G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE..	...-...E..	R.....D.KHG	
VI	..HRVD...	.....E.AP.	GKDNA	DA....-	...K..QI.	PAT.DK.E	G.NSKD	RLP.N...	N..N.K.	QG.....	.....	..N....	T..E....	R.....SD.KHG		
VII	.....SK.	KDST.....GKNA	.A..K.V.	.G.SGD.H	PAAPD... ..NS.D	RL..N.E.	...G.K.-	.....G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE..	...-...E..	R.....D.KHG			
VIII	.....S.K	KDST.....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD..	PAAPD... ..NS..	Q.....-	.....	QG.....E	D....GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	..G...Q.HG		
IX	.....S.	KDSR...H.K	K.DNA	.A..-VG	.....E.N	....D.K.	....D	RL..N...	N...K..	.....G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE..	...-...E.H	..G...Q.HG	
X	.....S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A..K.V.	...K..QI.	PAT.DK.E	G.NSKD	RLP.N...	N..N.K.	QG.....	.....	..N...E.	T..-...E..	Q...K..D.HG		
XI	..HRVD...	.....E.AP.	GKDNA	DA....-	...K..QI.	PAT.DK.E	G.NSKD	RLP.N...	N..N.K.	QG.....	.....	..N....	T..E....	R.....SD.KHG		
XII	.....SK.	KDST.....K	GKDNA	.A...V.	..E.SGY.	P...D..	K...K	....D.D.	....EGR	.RD...E	D....GG	.KENS	E.N.A..	T..ER.DE..	R.....D.KHG	
XIII	..HRVD...	.....E.AP.	GKDNA	DA....-	...K..QI.	PAT.DK.E	G.NSKD	RLP.N...	N..N.K.	QG.....	.....	..N....	T..E....	R.....SD.KHG		
XIV	.....SK.	KDST.....K	..DNA	.A..V-G	.....G..	.....S.	Q.....	.....	Q.....	.....GG	.KENS	E.N.A..	T..ER.DE..	..G...Q.HG		
XV	.....SKD	KD.QTEG...	GKD.A	.A..-EVR	...K..E..	....D..	E....D	RL..N...	N...K..	.GD..G..	.P.EE.GG	.KE..	..HEEE..	...-N.E..	.....D.KHG	
XVI	.....	.....	.....	.A..-VG	...K..Q..	P...D..E	G.NSKD	RLP.D...	N...K..	.RD...E	D..N..GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	.....D.KHG	
XVII	.....SK.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	R-.....	.....	.....E	...E...E..	Q...K..D.HG				
XVIII	.....SK.	KDST.....K	K.GNA	.A..-VG	.....E.N	....D..	K.SKD	RLP.D.EK..	..G.K..	.GD..GDE	.PE..NGG	..E..	..HEEE..	...-...E..	R.....D.KH.	
XIX	.....	.....E.AP.	.....K.-	.....E.N	....D..	N...K..	....D.D.	....EG..	.RD...E	D..N..GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..ER..	.....Q.H.		
XX	.....SKD	KD.QTEG...	GKDNA	.A..-EVR	...N..E..	....D..	E....D	RL..I...	N...K..	.GD..G..	.P.EE.GG	.KE..	..HEEE..	...-...E..	.....D.KHG	
XXI	.....S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A..-EVR	T...E.N	....D..	K.SKD	RLP.D.EK..	..G.K..	.GD..G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE..	...-...E..	R.....D.KHG	
XXII	.....S.K	KDST.....K	K.DNA	.A...V.	..E.SGD..	PAAPD... ..NS..	Q.....	...G.K..	.GD..G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE..	...-...E..	Q.....D.H.		
XXIII	..HRVD...	.....E.AP.	GKDNA	DA....-	...K..QI.	PAT.DK.E	G.NSKD	RLP.N...	N..N.K.	QG.....	.....	..N....	T..E....	R.....SD.KHG		
XXIV	.....	.....E.AP.	.....K.-	.....E.N	....D..	N...K..	....D.D.	....EG..	.RD...E	D..N..GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	.....Q.H.		
XXV	..V....S.K	KDST.....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD..	PAAPD... ..NS..	Q.....	.....	QG.....E	D....GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	..G...Q.HG		
XXVI	.....S.K	KDST.....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD..	PAAPD... ..NS..	Q.....	.....	QG...GDE	.PE..NGG	D-E..	.G.E..N	T..E...E..	..G...Q.HG		
XXVII	..HRVD.S.K	KDST.....GKNA	.A...V.	...K..Q.	PAT.DK..	.....	.....	R.....	.....GG	.KENS	E.N.A..	T..ER.DE..	..G...Q.H.			
XXVIII	..HRVD.S.D	KD...E.AP.	.....V.	...K..Q.	PAT.DK..	.....	.....	R.....E	D....GG	.KENS	E.N.A..	T..ER.DE..	R.....D.KHG			
XXIX	.....S.K	KDST.....K	GKDNA	.A...V.	...K..Q.	PAT.DK..	.....	R.....E	D....GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	..G...Q.HG			
XXX	.....S.	KDST.....K	K.DNA	.A..K-VG	.....E.N	....D..	...K..	....D.D.	....EG..	.RD...E	D..N..GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	.....Q.H.	
XXXI	.....	.....E.AP.	.....K.-	.....E.N	....D..	N...K..	....D.D.	....EG..	.RD...E	D..N..GG	.KENS	E.N.A..	TT.ER..E..	.....Q.HG		
XXXII	.....	.....E.AP.	.....K.-	.....E.N	....D..	N....	.....	R.....	.....GG	.KENS	E.N.A..	T..ER.DE..	Q.....Q.HG			
XXXIII	.....S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A..K.V.	...K..QI.	PAT.DK.E	G.NSKD	RLP.N...	N..N.K.	QG.....	.....	..NS	E.N.A..	TT.ER..E..	..G...Q.HG	
XXXIV	.....SK.	KDST.....GKNA	.A..K.V.	..E.SGD..	PAAPD... ..NS.D	RL..N.E.	...G.K.-	.....G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE..	...-...E..	R.....D.KHG			
XXXV	.....S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A..-EVR	T...E.N	....D..	K.SKD	RLP.D.EK..	..G.K..	.GD..GDE	.PE..NGG	..E..	..HEEE..	...-...E..	..GK...Q.HG	
XXXVI	.....SK.	KDST.....K	K.GNA	.A..-VG	.....E.N	....D..	K.SKD	RLP.D.EK..	..G.K..	.GD..GDE	.PE..NGG	..E..	..HEEE..	...-...E..	R.....SD.KH.	
XXXVII	.....S.	.....K	..DNA	.A..-EVR	R...E.E.	P...D..E	G.NSKD	RLP.D...	N...K..	D.....	.P.EE.GG	..E..	..HEEE..	...-...E..	.....D.KHG	
XXXVIII	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	K...K	....D.D.	....EGR	.RD...E	D....GG	.KENS	E.N.A..	T..ER.DE..	R.....D.KHG

ตำแหน่งกรดอะมิโน

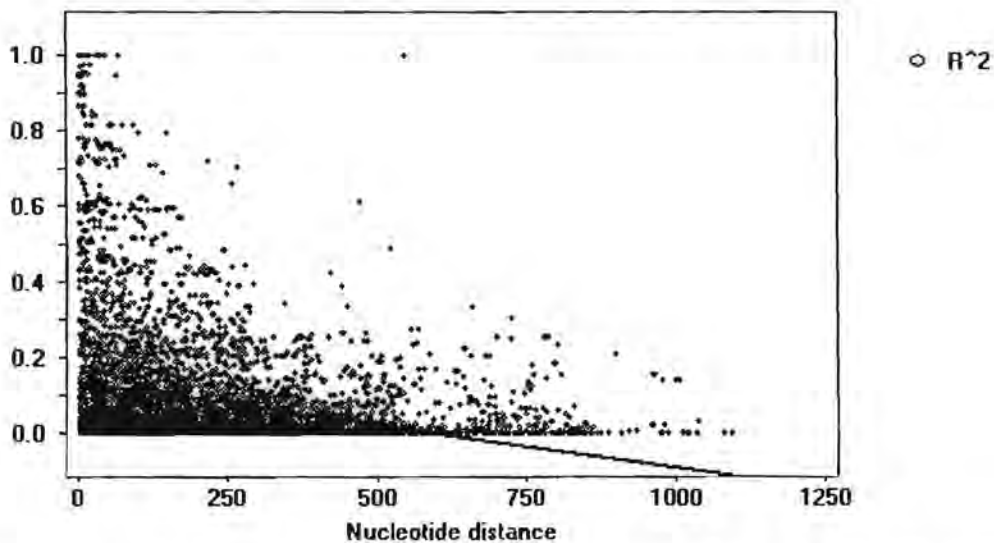
Haplotype	1111	11111	11111111	111111111	111111111	111111	111111111	11111111	11111111	11111111	111112	2222222	222222222	22222222223	
2334555899	9999990000	00001	11111112	22222223	33333334	444445	55555556	66666667	77777777	88888889	99990	0000111	2222222445	555666777756	
6491345913	4567890125	67890	12567890	123567890	12345670	123790	124567890	12345680	12345689	12456780	12390	1345279	1235678670	469248124793	
XXXIX	.....S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A...V-R	..E...Q.N	....D...	.K.SKD	RLP.N...	N..N.K..	QG.....	.....	-....	.N...E.	FRG...E..	..G....Q.HG
XL	.....SKD	KD.QTEG...	GKDNA	.A...-EVR	...K..E.	....D...	E....D	RL..I...	NP...K..	.GD..G..	.P.EE.GG	.KE..	..HEEE.	...-...E..	.....D.KH.
XLI	.....SKD	KD.QTEG...	GKDNA	.A...-EVR	...K..E.	....D...	E....D	RL..N...	N...KGR	.RD...E	D...GG	.KENS	E.N.A.	T..-...E..	.....K..Q.H.
XLII	.....SKD	KD.QTEG...	GKDNA	.A...-EVR	...K..E.	....D...	E....D	RL..I...	N...K..	.GD..G..	.P.EE.GG	.KE..	..HEEE.	...-...E..	.....D.KH.
XLIII	..HR..Q...	.....E.AP.	.....	...K.-	.....E.N	....D...	N.....	.....	.....	R.....	.....GG	.KENS	E.N.A.	T..ER.DE..	Q.....Q.HG
XLIV	.....S.K	KDST....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD.	PAAPD...	..NS..	Q.....-	.....	QG.....E	D...G.	.KENS	E.N.A.	T..ER.DE..	Q.....Q.H.
XLV	.....S.K	KDST....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD.	PAAPD...	..NS..	Q.....-	.....	QG.....E	D...GG	.KENS	E.I.A.	T..ER.DE..	R.....Q.HG
XLVI	F.....S.K	KDST....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD.	PAAPD...	..NS..	Q.....-	.....	QG.....	.....	.....	.....E.	...E...E..	..G....Q.HG
XLVII	.....K..	.....E.AP.	.....	...K..E.	.....	.....S.	Q.....	.....	.....	Q.....	.....	.....	.....E.	...E...E..	..G....Q.HG
XLVIII	.....SKD	KD.QTEG...	GKDNA	.A...-EVR	...K..E.	....D...	E....D	RL..I...	N...K..	.GD..G..	.P.EE.GG	.KE..	..HEEE.	...-...E..	.....G....Q.HG
XLIX	.....S.K	KDST....K	K.DNA	.A...V.	..EKSGD.	PAAPD...	..NS..	Q.....-	.....	QG.....E	D...GG	.KENS	E.N.A.	T..ER.DE..	R.....Q.HG
L	.....S..	KDSR...H.K	K.DNA	.A...V.	...K..E.N	....D.K.	....D	RL..N...	N...K..	---G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE.	...-...E.H	..G....Q.HG
LI	..HR...SK.	KDST...K..	GKDNA	.AN...V.	..E.SGY.	P...D...	.K...K	....D...M	I...EGR	.RD...E	D...GG	.KENS	E.N.A.	T..ER.DE..	R.....D.KHG
LII	.....S..	.....K	..DNA	.A...-EVG	.R...E..	P...D..E	G.NSKD	RLP.D...	N...K..	D.....	.P.EE.GG	..E..	..HEEE.	...-...H	.....D.KHG
LIII	.....SK.	KDST...K..	GKDNA	.AN...V.	..E.SGY.	P...D...	.K...K	....D..D.	....EGR	.RD...E	D...GG	.KENS	E.N.A.	T..ER.DE..	R.....D.KH.
LIV	.....SK.	KDST...AP.	.....	...K..E.	.....Q.	.....S.	Q.....	.....	.....	Q.....E	D...GG	.KENS	E.N.A.	TT.ER..E..	..G....Q.HG
LV	..HRVD.S.K	KDST.....	GKDNA	.A...V.	...K..Q.	PAT.DK..	.....	.....	.....	R.....E	D...GG	.KENS	E.N.A.	TT.ER..E..	.....Q.H.
LVI	.....S..	KDST....K	..DNA	.A...-EVG	.....E.	....D...	.....Q.	....D..	..N.K.	QG.....	.P.EE.GG	D-E..	..HEEE.	...-.....	.....D..H.
LVII	.....S..	KDST....K	..DNA	.A...-EVG	.....E.	....D...	.....Q.	....D..	..N.K.	QG.....	.P.EE.GG	D-E..	..HEEE.	T..E..D..	.....D..H.
LVIII	.....S..	.....	.....-EK.	.....	.....N.E.	.....G.K.	---G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE.	...-.....	.....D.KHG			
LIX	.....S..	.....	.....-EK.	.....	.....N.E.	.....G.K.	---G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE.	...-...H	.....D.KHG			
LX	.....S..	KDST.....	GKDNA	.A..K.V.	..E.SGD.	PAAPD...	..NS.D	RL..N.R.	N..N.K..	QG.....	.....	...-.....E..	...E.....	.....D.KH.	
LXI	..HRVD.S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A..K.V.	..E.SGD.	PAAPD...	..NS.D	RL..N.E.	...G.K..	.GD..GDE	.PE..NGG	D-E..	.G.E...	T..E.....	.....D.KH.
LXII	...VD.S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A..K.V.	...K..Q.	PAT.DK.E	G.NS.D	RLP.D...	N...K..	DD.....	.P.EE.GG	..E..	..HEEE.	...-.....	.....D.KH.
LXIII	.....S.D	KD.QTEG...	GKDNA	.A...-EVG	T...E.N	....D...	.K.SKD	RLP.D.EK.	...G.K..	.GD..GDE	.PE..NGG	..E..	..HEEE.	...-.....	.....D.KH.
LXIV	.....S..	.....	.....A...-EVG	.....E.	.....N.E.	.....G.K.	---G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE.	...-...H	.....D.KHG			
LXV	.....S..	KDST....K	..DNA	.A...-VG	.....E.	....D...	.....Q.	....D..	..EG.	.RD...E	D...GG	.EENS	E.N.A.	T..E..D..	.....D..H.
LXVI	.....S..	.....	.....NE.	.....-EK.	.....D...	.....N.E.	.....G.K.	---G..	.P.EE.GG	..E..	..HEEE.	...-.....	.....D.KHG		





รูปที่ 3.14 กราฟแสดงความผันแปรของค่า nucleotide diversity ตามส่วนต่าง ๆ ของยีน PvMsp-5 โดยวิเคราะห์ทุก 100 นิวคลีโอไทด์และเลื่อนครั้งละ 25 ตำแหน่ง

การวิเคราะห์ค่า linkage disequilibrium ระหว่างแต่ละคู่ นิวคลีโอไทด์ในยีน PvMsp-5 พบว่าคู่ นิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้วิเคราะห์ได้มีทั้งสิ้น 8,646 คู่ ผลการวิเคราะห์พบว่าคู่ที่มีนัยสำคัญโดยการทดสอบด้วย Fisher's exact test มีทั้งสิ้น 3,991 คู่ โดยค่า  $r^2$  ที่มีนัยสำคัญมีจำนวนลดลงอย่างมากตามระยะห่างของคู่ นิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเกิด recombination ในยีน PvMsp-5 (รูปที่ 3.15) ในทำนองเดียวกันจากการคำนวณค่า minimum number of recombination event หรือค่า Rm จากการเปรียบเทียบคู่ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 12,090 คู่ภายในยีนดังกล่าวพบว่ามีค่า potential recombination site ทั้งหมด 32 ตำแหน่ง



รูปที่ 3.15 กราฟแสดงค่า  $r^2$  ของแต่ละคู่ นิวคลีโอไทด์ตามระยะห่างของยีน PvMsp-5 จุดสีเทาคือค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจุดที่ดำคือค่าที่ไม่มีความนัยสำคัญ

## วิจารณ์ผลการวิจัย

Apical membrane antigen-1 หรือ MA-1 เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งอยู่บนผิวของระยะ merozoite เมื่อ merozoite บุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดงจะมีโปรตีนดังกล่าวมาสะสมอยู่บริเวณ apical end ของ merozoite เป็นจำนวนมาก เชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของ merozoite โปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วย กรดอะมิโน 622 ตัว (Marshall et al., 1989) จากการศึกษาของ Oliveira และคณะ (Oliveira et al., 1996) พบ AMA-1 จำนวน 9 allele และได้แบ่งเปปไทด์ของ AMA-1 ออกเป็นบริเวณต่าง ๆ (block) ทั้งหมด 12 บริเวณโดยอาศัยระดับความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนบริเวณต่าง ๆ ผลจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า บริเวณที่ 4 เป็นบริเวณที่มีความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนมากที่สุด บริเวณดังกล่าวครอบคลุมตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 160 ถึง 210 โดยประมาณ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ก็ครอบคลุมบริเวณดังกล่าวเช่นกัน (กรดอะมิโนที่ 151 ถึง 295) ต่อมา Crewther และคณะ (Crewther., 1996) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับตำแหน่งของพันธะ disulfide ใน AMA-1 และได้แบ่ง AMA-1 ออกเป็นส่วนต่าง ๆ 5 ส่วน ได้แก่ (1) prosequence ครอบคลุมกรดอะมิโนที่ 1 ถึง 137 (2) domain I ครอบคลุมกรดอะมิโนที่ 138 ถึง 308 (3) domain II ครอบคลุมกรดอะมิโนที่ 309 ถึง 420 (4) domain III ครอบคลุมกรดอะมิโนที่ 421 ถึง 535 และ (5) transmembrane ครอบคลุมกรดอะมิโนที่ 536 ถึง 622 ต่อมา Verra และ Hughes (Verra and Hughes., 2000) ได้ทำการเปรียบเทียบอัตราการถูกแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนต่าง ๆ เหล่านี้ และพบว่า domain I เป็นส่วนที่มีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด และการแทนที่ใน domain นี้ และทุก ๆ ส่วนของ AMA-1 เป็นการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดไป (non – synonymous substitution) มากกว่าการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนคงชนิดเดิม (synonymous substitution) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกัน คือ พบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AMA-1 ในบริเวณที่ทำการศึกษาทั้งสิ้น 25 ตำแหน่งซึ่งทุกตำแหน่งที่เกิดการแทนที่นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนทั้งสิ้น ลักษณะที่มีการแทนที่แบบ non – synonymous substitution นี้ เชื่อว่าน่าจะเป็นผลจากการที่เชื้อต้องเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมตลอดเวลา เพื่อหลบเลี่ยงการถูกตรวจจับโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Lat et al., 1996) การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของ AMA-1 อันเกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่พบในการศึกษานี้ มีผลให้คุณสมบัติบางประการของกรดอะมิโนที่ถูกแทนที่ได้แก่ คุณสมบัติการมีขั้ว และชนิดของประจุ เปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนใหญ่ มีเพียง 3 ตำแหน่ง จาก 20 ตำแหน่งเท่านั้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 190 ซึ่งมีการแทนที่ระหว่าง methionine และ isoleucine ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 197 ซึ่งมีการแทนที่ระหว่าง glutamic acid และ aspartic acid และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 201 ซึ่งมีการแทนที่ระหว่าง phenylalanine และ leucine

นอกจากนี้เมื่อนำลักษณะการแทนที่ของกรดอะมิโนจาก allele ต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษานี้ร่วมกับอีก 7 allele จากประเทศไทยเช่นกัน แต่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มาเปรียบเทียบกับ allele ที่ได้จากภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก รวมทั้งอีก 51 allele ที่ได้จากการศึกษาในประเทศไนจีเรียของ Conway และคณะ (Polley and Conway, 2001) พบว่ามีกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ถูกแทนที่ในกลุ่ม allele ที่ได้จากประเทศไนจีเรีย แต่ไม่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนในตำแหน่งนั้น ๆ ในกลุ่ม allele ที่ได้จากประเทศไทย ตำแหน่งดังกล่าวนี้มี 4 ตำแหน่ง

ได้แก่ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 189 ซึ่งเป็นการแทนที่ระหว่าง leucine และ proline ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 199 ซึ่งเป็นการแทนที่ระหว่าง arginine และ lysine ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 228 ซึ่งเป็นการแทนที่ระหว่าง asparagine และ lysine และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 199 ซึ่งเป็นการแทนที่ระหว่าง lysine และ glutamic acid นอกจากนี้ยังพบว่า ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 201 มีการแทนที่ระหว่าง phenylalanine และ leucine เท่านั้นสำหรับ allele ที่ได้จากประเทศไทย แต่สำหรับ allele ที่ได้จากการศึกษาในประเทศไนจีเรีย ยังพบการแทนที่ของ serine ในตำแหน่งดังกล่าวอีกแบบหนึ่งด้วย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า AMA-1 ที่ได้จากเชื้อ *P. falciparum* จากผู้ป่วยในประเทศไนจีเรีย ดังจะเห็นได้จากผลของการศึกษาที่พบความหลากหลายของกรดอะมิโนในบริเวณที่ทำการศึกษาเพียง 19 แบบ ในขณะที่การศึกษาความหลากหลายของกรดอะมิโนของ AMA-1 ในบริเวณเดียวกันในประเทศไนจีเรีย พบความหลากหลายถึง 51 รูปแบบ ส่วน allele AMA-XX1 ซึ่งได้จากการศึกษาของ Oliveira (Oliveira et al., 1996) เป็น allele จากผู้ป่วยในจังหวัดตาก ซึ่งมีลักษณะการแทนที่ของกรดอะมิโนแตกต่างจาก allele อื่น ๆ ที่ได้จากประเทศไทยค่อนข้างมากและพบการแทนที่ของกรดอะมิโนเช่นนี้เพียง allele เดียว ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก allele ดังกล่าวเกิด mutation ที่พบได้ยากหรืออาจเกิดจากความผิดพลาดในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ จากที่กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การแทนที่ของกรดอะมิโนของ AMA-1 นั้นมีหลายลักษณะ ซึ่งเป็นผลมาจากการศึกษาที่เชื่อเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของตัวเอง เพื่อหลบเลี่ยงจากการถูกตรวจจับและทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งจาก T-cell ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรับรู้และกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย (Lat et al., 1996)

อย่างไรก็ตามแม้ AMA-1 จะมีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนสูง แต่จากการศึกษาของ Escalante และคณะ (Escalante et al., 1998) แสดงให้เห็นว่ายังมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่มีระดับความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนระดับสูงและใกล้เคียงกับ AMA-1 ซึ่งมักเป็นโปรตีนของระยะ merozoite และ sporozoite เป็นส่วนใหญ่ เช่น merozoite surface protein 1 (MSP-1) merozoite surface protein 2 (MSP-2) และ CSP เป็นต้น โปรตีนของระยะดังกล่าวนี้มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนมากกว่าโปรตีนของระยะมีเพศของเชื้อ เช่น Pfs-25 เป็นต้น การเปรียบเทียบความหลากหลายดังกล่าวนี้ใช้ค่า nucleotide diversity (ค่าเฉลี่ยการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์) เป็นดัชนีในการเปรียบเทียบโดยค่า nucleotide diversity ที่มากขึ้น แสดงถึงความหลากหลายที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า AMA-1, CSP และ MSP-1 มีค่า nucleotide diversity เป็น 0.01635, 0.00645 และ 0.08792 ตามลำดับ ในขณะที่ Pfs-25 มีค่า nucleotide diversity เพียง 0.00357 ซึ่งความแตกต่างของระดับความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรตีนบนระยะ merozoite และ sporozoite กับโปรตีนบนระยะมีเพศของเชื้อ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนบนผิวของระยะ merozoite และ sporozoite สามารถปรับเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อหลบเลี่ยงการถูกตรวจจับและตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าเชื้อในระยะมีเพศ

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) ต่อมา AMA-1 ของเชื้อมาลาเรียเกิดขึ้น ในขณะที่ระยะ merozoite กำลังจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง จะมีการเคลื่อนย้ายไปโปรตีน AMA-1 มาสะสมอยู่ในส่วน apical end และระยะ merozoite เป็นจำนวนมาก AMA-1 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนจะกระตุ้น helper T-cell

บริเวณ CD4 ซึ่งเป็น accessory molecule หรือ receptor แล้วจึงส่งสัญญาณเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เกิดกระบวนการ transcription ของ cytokine gene และ cytokine receptor gene ใน nucleus ทำให้เกิดการสร้างและหลั่งสาร cytokine ในที่สุดหลังจากนั้น cytokine ที่ถูกหลั่งออกมาจาก helper T-cell จะกระตุ้น B-lymphocyte หรือ B-cell ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AMA-1 เพื่อทำลายเชื้อในขณะที่ cytokine อีกส่วนหนึ่ง จะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของ cytokine T-cell เพื่อให้ทำหน้าที่เสริมกับแอนติบอดีในการกำจัดเชื้อ (Abbas et al., 1991)

merozoite surface protein 4 (Msp-4) และ merozoite surface protein 5 (Msp-5) ของ *Plasmodium falciparum* เป็นโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกัน คือประมาณ 40 กิโลดาลตัน โปรตีนทั้งสองชนิดนี้ปรากฏที่ผิวของ merozoite ทางด้าน C-terminus ของโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วย epidermal growth factor (EGF)-like domain (Marshall et al 1997) เช่นเดียวกับที่พบใน Msp-1 ทั้งนี้ใน *Plasmodium falciparum* โปรตีน Msp-4 และ Msp-5 เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างจากยีนที่แยกกันชัดเจนแม้ว่ายีนทั้ง 2 จะอยู่ใกล้ชิดกัน จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน Msp-4 และ Msp-5 ของ *Plasmodium falciparum* พบว่ายีนทั้ง 2 ชนิดมีความหลากหลายต่ำ (Wang et al 2002; Jongwutiwes et al 2002; Polson et al 2005) และจากการศึกษาข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าผู้ที่ไม่มีแอนติบอดีต่อ Msp-4 มีความสัมพันธ์กับการพบปริมาณเชื้อในกระแสเลือดน้อยกว่าผู้ที่ไม่มีแอนติบอดีดังกล่าว (Kedzierski et al 2000)

สำหรับ Msp-4 และ Msp-5 ของ *Plasmodium vivax* นั้นพบว่า Msp-4 มีความหลากหลายมากในบางบริเวณของยีนซึ่งสูงกว่าที่พบใน *Plasmodium falciparum* ในขณะที่ Msp-5 มีความคงที่ของลำดับเบสในยีนสูง (Putaporntip et al 2005) สำหรับ Msp-4 และ Msp-5 ของเชื้อมาลาเรียของหนูเป็นยีนเดียวกันจึงเรียกว่า Msp-4/5 ซึ่งในการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน Msp-4/5 ของ *Plasmodium yoelii* เพื่อเป็นวัคซีนในหนูทดลองพบว่าสามารถกระตุ้นให้หนูเกิดภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันได้ (Kedzierski et al 2000; 2001) ดังนั้น Msp-4 และ Msp-5 จึงมีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน PvMsp-4 จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจำนวนมากซึ่งเก็บรวบรวมจากหลายภูมิภาคของประเทศไทย พบว่ามีความหลากหลายต่ำกว่า PvMsp-5 โดยค่า nucleotide diversity และ haplotype diversity ล้วนมีค่าต่ำกว่า ดังนั้นถ้าผลการศึกษาทางอิมมูโนวิทยาพบว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมีบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีแล้ว ความหลากหลายที่มีอยู่อย่างจำกัดใน PvMsp-4 โปรตีนดังกล่าวจึงไม่น่าจะได้รับผลกระทบจากปัญหาการความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน

## ข้อสรุป

1. ในการวิเคราะห์ apical membrane antigen-1 ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากผู้ป่วยในประเทศไทย พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 72 ตำแหน่ง โดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 56 ตำแหน่ง โดยพบว่าการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PfAMA-1 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 55 แบบ

(haplotypes) ทั้งนี้การแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมเป็นสาเหตุของความหลากหลายดังกล่าว และการกระจายของ haplotype ในแต่ละปีมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน

2. เมื่อเปรียบเทียบอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยการหาค่า nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN) เปรียบเทียบกับ synonymous substitutions per synonymous site (dS) พบว่าค่า dN มีค่ามากกว่าค่า dS อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) ความแตกต่างดังกล่าวแสดงถึงการเกิด positive selection ในยีน PfAMA-1

3. พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ 48 ตำแหน่งในยีน PvAMA-1 โดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 28 ตำแหน่ง การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PvAMA-1 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 54 haplotypes ทั้งนี้ haplotypes ที่พบมากที่สุดและพบมากรองลงมา นั้นมีความคงที่ในแต่ละปีที่ศึกษา

4. ผลการเปรียบเทียบอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์โดยการหาค่า dN เปรียบเทียบกับ dS พบว่า ค่า dN มีค่ามากกว่าค่า dS แต่ไม่มีนัยสำคัญ แสดงถึงการเกิด neutral evolution ในยีน PvAMA-1 ในภาพรวม

5. จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน PvMsp-4 มีจำนวนแตกต่างกันขึ้นกับตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยพบจำนวนนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 654 ตัวหรือ 218 codons จนถึง 762 ตัวหรือ 254 codons พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ซึ่งไม่นับรวมในส่วนของ repeats จำนวน 18 ตำแหน่ง โดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 10 ตำแหน่ง การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PvMsp-4 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 38 haplotypes

6. ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMsp-5 พบว่าจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน PvMsp-4 มีจำนวนแตกต่างกันขึ้นกับตัวอย่างที่วิเคราะห์โดยพบจำนวนนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1149 ตัวหรือ 383 codons จนถึง 1173 ตัวหรือ 391 codons เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบทั้งหมด พบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จำนวน 143 ตำแหน่ง โดยการแทนที่ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดทั้งหมด 123 ตำแหน่ง การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ทำให้เกิด PvMsp-5 ที่แตกต่างกันทั้งหมด 66 haplotypes

### ข้อเสนอแนะ

1. การคงที่ในการกระจายของ haplotypes ในยีนที่สร้างโปรตีนที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียในการศึกษานี้ นับเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวัคซีนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อในประเทศไทยและข้อมูลดังกล่าวยังเป็นพื้นฐานในการติดตามการดำรงอยู่หรือการเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อมาลาเรีย ทั้ง 2 ชนิดที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศ

2. ควรมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างที่มีมีการติดเชื้อมากกว่า 1 clone เพื่อให้เห็นภาพรวมของโอกาสที่เชื้อมาลาเรียจะถ่ายทอดพันธุกรรมหรือแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมในยุงพาหะ

3. ควรมีการศึกษาภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแต่ละ haplotype เพื่อให้ทราบขอบเขตของ antigenic cross-reactivity อันมีความสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียต่อไป

## บรรณานุกรม

- Abbas AK, Williams ME, Burstein HJ, Chang TL, Bossu P, Lichtman AH. Activation and functions of CD4+ T-cell subsets. *Immunol Rev*. 1991;123:5-22.
- Awadalla P. The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nat Rev Genet* 2003;4:50-60.
- van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:547-60.
- Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Currie D, Charlwood JD, Billingsley P, Teuscher T, Walliker D. Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 1994;109:413-21.
- Conway DJ, Roper C, Oduola AM, Arnot DE, Kremsner PG, Grobusch MP, Curtis CF, Greenwood BM. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ;96:4506-11.
- Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AM, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med* 2000;6:689-92.
- Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun*. 1996;64:3310-7.
- Dolo A, Modiano D, Doumbo O, Bosman A, Sidibe T, Keita MM, Naitza S, Robson KJ, Crisanti A. Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. *Parassitologia* 1999;41:425-8.
- Escalante AA, Lal AA, Ayala FJ. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics*. 1998;149:189-202.
- Flanagan KL, Plebanski M, Akinwunmi P, Lee EA, Reece WH, Robson KJ, Hill AV, Pinder M. Broadly distributed T cell reactivity, with no immunodominant loci, to the pre-erythrocytic antigen thrombospondin-related adhesive protein of *Plasmodium falciparum* in West Africans. *Eur J Immunol* 1999;29:1943-54.
- Gandon S, Mackinnon MJ, Nee S, Read AF. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature* 2001;414:751-6.
- Gandon S, Mackinnon M, Nee S, Read A. Imperfect vaccination: some epidemiological and evolutionary consequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2003;270:1129-36.
- Goschnick MW, Black CG, Kedzierski L, Holder AA, Coppel RL. Merozoite surface protein 4/5 provides protection against lethal challenge with a heterologous malaria parasite strain. *Infect Immun* 2004;72:5840-9.
- Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, Uemura H, Kanbara H. Coexistence of GP195 alleles of *Plasmodium falciparum* in a small endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1991;44:299-305.
- Jongwutiwes S, Tanabe K, Hughes MK, Kanbara H, Hughes AL. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Am J Trop Med Hyg*

- 1994;51:659-68.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Kanbara H, Tanabe K. Variation in the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92:349-53.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Friedman R, Hughes AL. The extent of nucleotide polymorphism is highly variable across a 3-kb region on *Plasmodium falciparum* chromosome 2. *Mol Biol Evol* 2002;19:1585-90.
- Kedzierski L, Black CG, Coppel RL. Immunization with recombinant *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 protects mice against lethal challenge. *Infect Immun* 2000;68:6034-6037.
- Kedzierski L, Black CG, Stowers AW, Goschnick MW, Kaslow DC, Coppel RL. Comparison of the protective efficacy of yeast-derived and *Escherichia coli*-derived recombinant merozoite surface protein 4/5 against lethal challenge by *Plasmodium yoelii*. *Vaccine* 2001;19:4661-4668.
- Holder AA. Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. *Parasitology* 1994;108:S5-18.
- Hughes AL. Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (*Plasmodium* spp.): evidence for positive selection on immunogenic regions. *Genetics* 1991;127:345-53.
- Hughes MK, Hughes AL. Natural selection on *Plasmodium* surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 1995;71:99-113.
- Kaslow DC. Transmission-blocking vaccines. *Chem Immunol* 2002;80:287-307. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8343-7.
- Marshall VM, Peterson MG, Lew AM, Kemp DJ. Structure of the apical membrane antigen I (AMA-1) of *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;37:281-3.
- Marshall VM, Coppel RL. Characterisation of the gene encoding adenylosuccinate lyase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;88:237-241.
- Morgan U, Ochman H, Renaud F, Tibayrenc M. Population genetics and population biology: what did they bring to the epidemiology of transmissible diseases? An e-debate. *Infect Genet Evol* 2001;1:161-6.
- Nardin E, Zavala F, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Pre-erythrocytic malaria vaccine: mechanisms of protective immunity and human vaccine trials. *Parassitologia* 1999;41:397-402.
- Nussenzweig RS, Zavala F. A malaria vaccine based on a sporozoite antigen. *N Engl J Med* 1997;336:128-30.
- Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira MC, Tartar A, Druilhe P. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood* 1994;84:1594-602.
- Oliveira DA, Udhayakumar V, Bloland P, Shi YP, Nahlen BL, Oloo AJ, Hawley WE, Lal AA. Genetic conservation of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 (AMA-1). *Mol Biochem Parasitol*. 1996;76:333-6.

- Polley SD, Conway DJ. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. *Genetics*. 2001;158:1505-12.
- Polson HE, Conway DJ, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O, Longacre S. Gene polymorphism of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins 4 and 5. *Mol Biochem Parasitol* 2005;142:110-115.
- Prieur E, Gilbert SC, Schneider J, Moore AC, Sheu EG, Goonetilleke N, Robson KJ, Hill AV. A *Plasmodium falciparum* candidate vaccine based on a six-antigen polyprotein encoded by recombinant poxviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:290-5.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:49-56.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tia T, Ferreira MU, Kanbara H, Tanabe K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. *Gene* 2001;268:97-104.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16348-53.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Ferreira MU, Udomsangpetch R, Cui L, Kanbara H. Selective pressures and intragenic recombination in the genes encoding merozoite surface proteins 4 and 5 of *Plasmodium vivax*. *Vivax Research 2005 and beyond*. Rockville, USA. December 9-10, 2005
- Sakihama N, Kimura M, Hirayama K, Kanda T, Na-Bangchang K, Jongwutiwes S, Conway D, Tanabe K. Allelic recombination and linkage disequilibrium within Msp-1 of *Plasmodium falciparum*, the malignant human malaria parasite. *Gene* 1999;230:47-54.
- Schneider J, Langermans JA, Gilbert SC, Blanchard TJ, Twigg S, Naitza S, Hannan CM, Aidoo M, Crisanti A, Robson KJ, Smith GL, Hill AV, Thomas AW. A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the *Plasmodium falciparum* TRAP antigen in chimpanzees. *Vaccine* 2001;19:4595-602.
- Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AM, Kemp DJ, Anders RF. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1751-5.
- Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 1987;195:273-87.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2414-8.
- Tibayrenc M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annu Rev Microbiol*.



1996;50:401-29.

Tibayrenc M, Lal A. Self-fertilization, linkage disequilibrium, and strain in *Plasmodium falciparum*. *Science* 1996;271:1300-1.

Urdaneta L, Lal A, Barnabe C, Oury B, Goldman I, Ayala FJ, Tibayrenc M. Evidence for clonal propagation in natural isolates of *Plasmodium falciparum* from Venezuela. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6725-9.

Verra F, Hughes AL. Evidence for ancient balanced polymorphism at the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;105:149-53.

Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, Corcoran LM, Burkot TR, Carter R. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 1987;236:1661-6.

Wang L, Marshall VM, Coppel RL. Limited polymorphism of the vaccine candidate merozoite surface protein 4 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;120:301-303.

### ประวัติผู้วิจัยหลัก

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์  
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Somchai Jongwutiwes
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330  
โทรศัพท์ 02-2528181 ต่อ 3685  
โทรสาร 02-2524963  
e-mail: fmedsjw@md.chula.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม)	วิทยาศาสตร์ การแพทย์	2525
จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2527
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Protozoology	2536

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Medical Parasitology, Molecular Parasitology,  
Molecular Population Genetics
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
  - 6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
    1. Molecular evolution of *Plasmodium vivax*
    2. Molecular analysis of the cpg40 gene of *Cryptosporidium* isolated from HIV-infected patients
  - 6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

### ผลงานตีพิมพ์

1. Teeranaipong P, Ohashi J, Patarapotikul J, Kimura R, Nuchnoi P, Hananantachai H, Naka I, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Tokunaga K. A Functional Single-Nucleotide

Polymorphism in the CR1 Promoter Region Contributes to Protection against Cerebral Malaria. **Journal of Infectious Diseases** 2008 Oct 27.

2. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Hughes AL. Differential selective pressures on the merozoite surface protein 2 locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. **Gene** 2008;427:51-7.

3. Putaporntip C, Seethamchai S, Suvannadhat V, Hongsriruang T, Sattabongkot J, **Jongwutiwes S**. Selective pressure on the merozoite surface protein-1 genes of *Plasmodium vivax*, *P. knowlesi* and *P. cynomolgi*. **Asian Biomedicine** 2008;2:123-34

4. Seethamchai S, Putaporntip C, Malaivijitnond S, Cui L, **Jongwutiwes S**. Malaria and *Hepaticystis* species in wild macaques, southern Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2008;78:646-53.

5. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Karnchaisri K, Seethamchai S, Hongsriruang T, Kanbara H. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein: analysis of isolates mainly from low endemic areas. **Gene** 2008;410:139-46.

6. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Charoenkorn M, Iwasaki T, Endo T. Morphologic and molecular characterization of *Isospora belli* oocysts from patients in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2007;77:107-12.

7. Yang Z, Miao J, Huang Y, Li X, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Gao Q, Udomsangpetch R, Sattabongkot J, Cui L. Genetic structures of geographically distinct *Plasmodium vivax* populations assessed by PCR/RFLP analysis of the merozoite surface protein 3beta gene. **Acta Tropica** 2006;100:205-12.

8. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Iwasaki T, Kanbara H, Hughes AL. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 2006;146:105-8.

9. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. **Molecular Biology and Evolution** 2005;22:1733-9.

10. Juarez SI, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Ichinose A, Yanagi T, Kanbara H. In vitro cultivation and electron microscopy characterization of *Trachipleistophora anthropophthera* isolated from the cornea of an AIDS patient. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 2005;52:179-90.

11. Pariyakanok L, **Jongwutiwes S**. Keratitis caused by *Trachipleistophora anthropoptera*. *Journal of Infection* 2005;51:325-8.
12. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human in Thailand. *Emerging Infectious Diseases* 2004;10:2211-3.
13. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Chantachum N, Sampatanukul P. Jejunal perforation caused by morphologically abnormal *Taenia saginata saginata* infection. *Journal of Infection* 2004;49:329-8.
14. Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim MY, Kim DW, **Jongwutiwes S**, Tanabe K. A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitology International* 2003;52:229-36.
15. **Jongwutiwes S**, Sampatanukul P, Putaporntip C. Recurrent isosporiasis over a decade in an immunocompetent host successfully treated with pyrimethamine. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2002;34:859-62.
16. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2002;99:16348-53.
17. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Friedman R, Hughes AL. The extent of nucleotide polymorphism is highly variable across a 3-kb region on *Plasmodium falciparum* chromosome 2. *Molecular Biology and Evolution* 2002;19:1585-90.
18. Tiangtip R, **Jongwutiwes S**. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Tropical Medicine and International Health* 2002;7:357-64.
19. **Jongwutiwes S**, Tiangtip R, Yentakarm S, Chantachum N. Simple method for long-term copro-preservation of *Cryptosporidium* oocysts for morphometric and molecular analysis. *Tropical Medicine and International Health* 2002;7:257-64.
20. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Tia T, Ferreira MU, Kanbara H, Tanabe K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. *Gene* 2001;268:97-104.
21. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000;109:111-9.

22. **Jongwutiwes S**, Silachamroon U, Putaporntip C. *Pentatrachomonas hominis* in empyema thoracis. ***Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*** 2000;94:185-6.
23. **Jongwutiwes S**, Pariyakanok L, Charoenkorn M, Yagita K, Endo T. Heterogeneity in cyst morphology within isolates of *Acanthamoeba* from keratitis patients in Thailand. ***Tropical Medicine and International Health*** 2000;5:335-40.
24. **Jongwutiwes S**, Charoenkorn M, Sitthichareonchai P, Akaraborvorn P, Putaporntip C. Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. ***Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*** 1999;93:398-400.
25. Thisyakorn U, **Jongwutiwes S**, Vanichsetakul P, Lertsapcharoen P. Visceral leishmaniasis: the first indigenous case report in Thailand. ***Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*** 1999 Jan-Feb;93:23-4.
26. Sakihama N, Kimura M, Hirayama K, Kanda T, Na-Bangchang K, **Jongwutiwes S**, Conway D, Tanabe K. Allelic recombination and linkage disequilibrium within Msp-1 of *Plasmodium falciparum*, the malignant human malaria parasite. ***Gene*** 1999;230:47-54.
27. Wanke CA, Cohan D, Thummakul T, **Jongwutiwes S**, Grayson ML, Hammer SM, Hanvanich M. Diarrheal disease in patients infected with human immunodeficiency virus in Bangkok, Thailand. ***American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*** 1999;60:871-4.
28. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Kanbara H, Tanabe K. Variation in the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. ***Molecular and Biochemical Parasitology*** 1998;92:349-53.
29. **Jongwutiwes S**, Chantachum N, Kraivichian P, Siriyasatien P, Putaporntip C, Tamburrini A, La Rosa G, Sreesunpasirikul C, Yingyoud P, Pozio E. First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. ***Clinical Infectious Diseases*** 1998;26:111-5.
30. Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. ***Molecular and Biochemical Parasitology*** 1997;84:49-56.
31. **Jongwutiwes S**, Putaporntip C. The merozoite surface protein 2 (MSP2) gene of *Plasmodium falciparum* from a Thai isolate. ***Journal of the Medical Association of Thailand*** 1996;79:S33-9.

32. Kaneko O, **Jongwutiwes S**, Kimura M, Kanbara H, Ishii A, Tanabe K. *Plasmodium falciparum*: variation in block 4 of the precursor to the major merozoite surface proteins in natural populations. *Experimental Parasitology* 1996;84:92-5.
33. **Jongwutiwes S**, Tanabe K, Hughes MK, Kanbara H, Hughes AL. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1994;51:659-68.
34. **Jongwutiwes S**, Tanabe K, Kanbara H. Sequence conservation in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1993;59:95-100.
35. **Jongwutiwes S**, Tanabe K, Nakazawa S, Yanagi T, Kanbara H. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1992;51:81-9.
36. **Jongwutiwes S**, Tanabe K, Nakazawa S, Uemura H, Kanbara H. Coexistence of GP195 alleles of *Plasmodium falciparum* in a small endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991;44:299-305.
37. **Jongwutiwes S**, Kraivichian P, Kulkumthorn M, Sitthichareonchai P, Jaroenkorn M. Cryptosporidiosis among orphanage children in Thailand: a one year prospective study. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health* 1990;21:458-64.
38. **Jongwutiwes S**, Teeravanichpong S, Kraivichian P. Cryptosporidiosis: report of a case with life-threatening diarrhea. *Journal of the Medical Association of Thailand* 1990;73:234-8.
39. Srisawai P, **Jongwutiwes S**, Kulkumthorn M. Lingual gnathostomiasis: a case report. *Journal of the Medical Association of Thailand* 1988;71:285-8.

6.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน

1. แผนงานวิจัยเรื่อง “ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย”

ระยะเวลา 1 ปี

ทุนสนับสนุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2551

Ad hoc Reviewer

1. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
2. Clinical Infectious Diseases
3. Expert Review of Anti-infective therapy

4. Acta Tropica

5. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

International Advisory Board for Journal

1. Tropical Medicine and Health (ISSN 1348-8945)

[An official journal of the Japanese Association of Tropical Medicine]

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์  
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Chaturong Putaporntip
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330  
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ  
10330  
โทรศัพท์ 2564000-02 ต่อ 3685 โทรสาร-02  
2524963  
e-mail: [fmedcpt@md.chula.ac.th](mailto:fmedcpt@md.chula.ac.th)

4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	วิทยาศาสตร์	2534
จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต	สัตววิทยา	2538
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Parasitology	2546

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Medical Parasitology  
Molecular Biology  
Population Genetics

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

- Merozoite surface protein1 of *Plasmodium vivax* (PvMsp-1): sequence analysis, population genetics and evolution
- Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax*: analysis of the genes encoding merozoite surface proteins 4 and 5 (PvMsp-4/5)

6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

ผลงานตีพิมพ์

1. Teeranaipong P, Ohashi J, Patarapotikul J, Kimura R, Nuchnoi P, Hananantachai H, Naka I, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Tokunaga K. A Functional Single-Nucleotide Polymorphism in the CR1 Promoter Region Contributes to Protection against Cerebral Malaria. **Journal of Infectious Diseases** 2008 Oct 27.



2. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Hughes AL. Differential selective pressures on the merozoite surface protein 2 locus of *Plasmodium falciparum* in a low endemic area. **Gene** 2008;427:51-7.
3. **Putaporntip C**, Seethamchai S, Suvannadhat V, Hongsrimumang T, Sattabongkot J, Jongwutiwes S. Selective pressure on the merozoite surface protein-1 genes of *Plasmodium vivax*, *P. knowlesi* and *P. cynomolgi*. **Asian Biomedicine** 2008;2:123-34
4. Seethamchai S, **Putaporntip C**, Malaivijitnond S, Cui L, Jongwutiwes S. Malaria and *Hepaticystis* species in wild macaques, southern Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2008;78:646-53.
5. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Karnchaisri K, Seethamchai S, Hongsrimumang T, Kanbara H. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein: analysis of isolates mainly from low endemic areas. **Gene** 2008;410:139-46.
6. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Charoenkorn M, Iwasaki T, Endo T. Morphologic and molecular characterization of *Isospora belli* oocysts from patients in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2007;77:107-12.
7. Yang Z, Miao J, Huang Y, Li X, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Gao Q, Udomsangpetch R, Sattabongkot J, Cui L. Genetic structures of geographically distinct *Plasmodium vivax* populations assessed by PCR/RFLP analysis of the merozoite surface protein 3beta gene. **Acta Tropica** 2006;100:205-12.
8. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Iwasaki T, Kanbara H, Hughes AL. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 2006;146:105-8.
9. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. **Molecular Biology and Evolution** 2005;22:1733-9.
10. Juarez SI, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Ichinose A, Yanagi T, Kanbara H. In vitro cultivation and electron microscopy characterization of *Trachipleistophora anthropoptera* isolated from the cornea of an AIDS patient. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 2005;52:179-90.
11. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human in Thailand. **Emerging Infectious Diseases** 2004;10:2211-3.

12. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Chantachum N, Sampatanukul P. Jejunal perforation caused by morphologically abnormal *Taenia saginata saginata* infection. *Journal of Infection* 2004;49:329-8.
13. Jongwutiwes S, Sampatanukul P, **Putaporntip C**. Recurrent isosporiasis over a decade in an immunocompetent host successfully treated with pyrimethamine. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2002;34:859-62.
14. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2002;99:16348-53.
15. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Friedman R, Hughes AL. The extent of nucleotide polymorphism is highly variable across a 3-kb region on *Plasmodium falciparum* chromosome 2. *Molecular Biology and Evolution* 2002;19:1585-90.
16. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Tia T, Ferreira MU, Kanbara H, Tanabe K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. *Gene* 2001;268:97-104.
17. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000;109:111-9.
18. Jongwutiwes S, Silachamroon U, **Putaporntip C**. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000;94:185-6.
19. Jongwutiwes S, Charoenkorn M, Sitthichareonchai P, Akaraborvorn P, **Putaporntip C**. Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1999;93:398-400.
20. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Kanbara H, Tanabe K. Variation in the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1998;92:349-53.
21. Jongwutiwes S, Chantachum N, Kraivichian P, Siriyasatien P, **Putaporntip C**, Tamburrini A, La Rosa G, Sreesunpasirikul C, Yingyourd P, Pozio E. First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. *Clinical Infectious Diseases* 1998;26:111-5.

22. **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaihong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1997;84:49-56.
23. Jongwutiwes S, **Putaporntip C**. The merozoite surface protein 2 (MSP2) gene of *Plasmodium falciparum* from a Thai isolate. *Journal of the Medical Association of Thailand* 1996;79:S33-9.

6.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน

1. แผนงานวิจัยเรื่อง "ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย"

ระยะเวลา 1 ปี

ทุนสนับสนุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2551

2. มาลาเรียของลิงมาแคกในประเทศไทย ;ระบาดวิทยาระดับโมเลกุล

โครงสร้างประชากร สายใยพันธุกรรม และวิวัฒนาการ

ระยะเวลา 3 ปี

ทุนสนับสนุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปี 2549-2551