



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของยีนที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอโรโซइटของพลาสโมเดียม
ฟัลซิพารัม โดยเทคนิค Nested PCR-HMA

Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Gene
Using Nested PCR-HMA

โดย

รศ. ดร. กัญญนันท์ กฤษศิริวุฒินันท์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2555

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณแนวชายแดนของประเทศ งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรม และการติดเชื้อสายพันธุ์ผสม โดยการพัฒนาวิธีตรวจด้วยเทคนิค Nested PCR-Heteroduplex mobility assay (HMA) ใช้ตรวจวิเคราะห์ ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนบนผิวเมอโรโซยต์ (*Pfmsp1*) block2 ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากจากการตรวจตัวอย่างเลือดจำนวน 79 ตัวอย่าง ที่เก็บบนกระดาดกรองจากผู้ติดเชื้อ *P. falciparum* ในพื้นที่ระบาดของเชื้อมาลาเรียใน 3 ภูมิภาคของประเทศไทย ผลการทดลองพบว่า *P. falciparum* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงถึง 23 สายพันธุ์ โดยพบมากที่สุดที่ภาคตะวันตก จำนวน 20 สายพันธุ์ พบน้อยที่สุดที่ภาคใต้จำนวน 7 สายพันธุ์ และพบผู้ติดเชื้อผสมมากกว่า 1 สายพันธุ์ คิดเป็น 35.44% โดย multiplicity of infection (MOI) เฉลี่ยเท่ากับ 1.35 จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี HMA นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านระบาดวิทยา และการตรวจกรองการติดเชื้อใหม่ และการติดเชื้อซ้ำของเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมป้องกันและรักษาโรคมาลาเรีย

คำสำคัญ ความหลากหลายทางพันธุกรรม, พลาสโมเดียมฟัลซิพารัม,

Abstract

KEY WORD

: Genetic diversity, *Plasmodium falciparum*, *Pfmsp1*,
Nested PCR, Heteroduplex Mobility Assay

Malaria is still a public health problem in Thailand especially in the border parts. This is the study on the genetic diversity and genotype multiplicity of *Plasmodium falciparum* in Thailand. The development of nested PCR-heteroduplex mobility assay (HMA) of PfMSP-1 (block 2) for genetic variation detection was performed. Seventy-nine *P. falciparum* infected blood were collected on filter paper from patients in three regions of endemic area of Thailand, north, west and south. The results showed high allelic diversity, 23 PfMSP-1 allelic variations. The most allelic variations found in western of Thailand (20 variants) and the least found in southern of Thailand (7 variants). There were 28 (35.44%) infected patients who carried multiple *P. falciparum* genotypes and the average of multiplicity of infection (MOI) was 1.35. The results indicated that this technique can be applied to use as epidemiologic study tool for identifying recrudescence and new infection which is very essential for prevention, control and drug treatment of malaria infection.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ DNA ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ K1 และ ผศ.ดร.วารุณี เงินงามเลิศ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ DNA ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ MAD20 มาใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ดร.สุเมธ วจนรจนา ผศ.รตท.หญิง ดร.อัครารวรรณ ทองมี ผศ.ดร.วนิดา พงศ์สถาพร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง vertical gel electrophoresis ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนักเทคนิคการแพทย์หญิงอุษณี สุทธิวงศ์ โรงพยาบาลพลพหลพยุหเสนา จังหวัดกาญจนบุรี นักเทคนิคการแพทย์ศักดิ์ชัย เสตพันธ์ โรงพยาบาลไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี นักเทคนิคการแพทย์หญิงจันทนา ส่วนสวัสดิ์ โรงพยาบาลแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน นักเทคนิคการแพทย์สุไลมาน อาแว โรงพยาบาลเบตง จังหวัดยะลา นักเทคนิคการแพทย์ฟามีละห์ มีดิง โรงพยาบาลบันนังสตา จังหวัดยะลา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยา คุณจิราภรณ์ มัชฌมกุล โรงพยาบาลกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่เอื้อให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บส่งตรวจ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิตที่สนับสนุนทุนวิจัย

ผู้ดำเนินการวิจัย

(รศ. ดร. กัญญนันท์ กฤษศิริวุฒินันท์)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ง
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ	1
1. ที่มาของปัญหา	1
2. ทบทวนเอกสาร	2
2.1 เชื้อก่อโรคมมาลาเรียและการติดต่อ	2
2.2 สถานการณ์การติดเชื้ในประเทศไทย	3
2.3 อาการของโรคมมาลาเรีย	3
2.4 สถานการณ์การค้ายา	5
2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยีน <i>Pfmsp1</i>	7
2.6 Genetic variation	9
2.7 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ	14
4. ขอบเขตงานวิจัย	14
5. ประโยชน์ที่ได้รับ	14
บทที่ 2	15
ระเบียบวิธีการวิจัย	15
วิธีการทดลอง	15
การวิเคราะห์ข้อมูล	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3	
ผลการทดลอง	
1. ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างตรวจ	30
2. การพัฒนาวิธี Nested PCR- HMA	30
3. ผลการตรวจ genetic diversity ของ <i>Pfmsp1</i> gene ของ <i>P. falciparum</i> โดยวิธี Nested PCR-HMA	41
4. วิธี Multiplex nested PCR-RFLP สำหรับศึกษาอินดิเคอร์ <i>Pfmdr1</i> 86 และ <i>Pfprt</i> 76	43
บทที่ 4	
สรุปและวิจารณ์	53
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	65
ประวัติผู้วิจัย	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ Multiplex Nested PCR ครั้งที่ 1	21
2.2 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ Multiplex Nested PCR ครั้งที่ 2	22
2.3 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ RFLP	23
2.4 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ Nested PCR ครั้งที่ 1	24
2.5 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ Nested PCR ครั้งที่ 2	24
2.6 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ PCR-HMA	27
3.1 แสดงข้อมูลทั่วไปตัวอย่างตรวจแยกตามภูมิภาค	31
3.2 แสดงตัวอย่างตรวจแยกตามความหนาแน่นของ parasitemia (parasite/ μ l) โดยแบ่งตามภูมิภาค	31
3.3 แสดงจำนวนตัวอย่างตรวจจัดกลุ่มตามระดับความหนาแน่นของ parasitemia	32
3.4 ผลการทดสอบความแม่นยำของค่า Mobility index (MI) ของ Ref/K1 heteroduplex โดยวิธี Nested PCR-HMA	38
3.5 ผลการทดสอบความแม่นยำของค่า Mobility index (MI) ที่ตำแหน่งการเคลื่อนที่ single stranded reference DNA โดยวิธี Nested PCR-HMA	39
3.6 การทดสอบเพื่อประเมินคุณภาพของการศึกษา Genetic diversity โดยวิธี Nested PCR- HMA จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เชื้อจากผู้ป่วย 10 ตัวอย่าง	40
3.7 แสดงผลของ Allele variation No.ของ <i>P. falciparum</i> โดยวิธี Nested PCR-HMA	44
3.8 จำนวน allele variation ของ <i>P. falciparum</i> ศึกษาโดยวิธี Nested PCR-HMA	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

3.9	ผลการสำรวจ Multiplicity of <i>P. falciparum</i> infection โดยวิธี Nested PCR-HMA	45
3.10	แสดงจำนวน parasitemia ของ <i>P. falciparum</i> (parasite/ μ l) กับจำนวนของสายพันธุ์ของเชื้อ จากการศึกษาโดยวิธี Nested PCR-HMA	46
3.11	จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับ I-V แยกตาม ภูมิภาค	47
3.12	จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับ I-V แยกตามสัญชาติ	48
3.13	จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับ I-V เทียบกับ ปริมาณ Parasitemia	51
3.14	แสดงผลการศึกษา Genotype ของ <i>Pfmdr1</i> gene ที่ตำแหน่ง codon 86 และ <i>Pfprt</i> gene ที่ตำแหน่ง codon 76 ใน <i>P. falciparum</i> ที่แยกได้ใน จังหวัดกาญจนบุรีและสุราษฎร์ธานี โดยวิธี Multiplex nested PCR-RFLP	51
3.15	แสดงผลการศึกษา Genotype ของ <i>Pfmdr1</i> 86 ใน <i>P. falciparum</i> และ Multiplicity	51
3.16	จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับสัมพันธ์กับการเกิด mutant <i>Pfmdr1</i> 86 gene และ <i>Pfprt</i> 76 gene	52

รูปที่

1.1	แสดงโครงสร้างของยีน <i>msh1</i> ของเชื้อ <i>Plasmodium. falciparum</i>	8
1.2	ภาพแสดงหลักการการเข้าคู่กันของ heteroduplex	11
2.1	แสดงการอ่านผลการเคลื่อนที่ของ Homoduplex และ Heteroduplex	28
3.1	แสดงผล PCR product ของ <i>pfmsp1</i> gene โดยวิธี Nested PCR	33
3.2	แสดงผล Heteroduplex Mobility assay (HMA) พบ heteroduplex ระหว่าง สายพันธุ์ MAD20 (Ref) กับสายพันธุ์ KI	34
3.3	แสดงผล Heteroduplex Mobility assay (HMA) ระหว่าง ตัวอย่างตรวจ กับ reference DNA	35
3.4	แสดงผล Heteroduplex Mobility assay (HMA) ระหว่าง reference DNA กับตัวอย่างตรวจในตำแหน่งการเคลื่อนที่ต่างๆกัน	36
3.5	แสดงผล PCR product ของ <i>pfmdr1</i> gene และ <i>pfprt</i> gene	49
3.6	แสดงผล PCR product ของ Multiplex nested PCR –RFLP ของ <i>pfmdr1</i> gene ที่ตำแหน่ง codon 86 และ <i>pfprt</i> gene ที่ตำแหน่ง codon 76	50

สัญลักษณ์และคำย่อ

μl	=	Microliter
μM	=	Micromolar
A	=	Adenine
ApoI	=	<i>Arthrobacter protophormiae I</i>
bp	=	Base pair
C	=	Cytosine
CQ	=	Chloroquine
CSP	=	Sporozoite surface protein
D	=	Aspartic acid
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxynucleotide triphosphate
DW	=	Distilled water
g	=	Gram
G	=	Guanine
HMA	=	Heteroduplex Mobility Assay
K	=	Lysine
Kb	=	Kilo base pair
M	=	Mutation
MI	=	Mobility index
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
MOI	=	Multiplicity of infection
MQ	=	Mefloquine
MSP	=	Merozoite surface protein
mRNA	=	messenger Ribonucleic acid
N	=	Asparagine
°C	=	Degree celcius
PCR	=	Polymerase chain reaction
<i>P.F</i>	=	<i>Plasmodium falciparum</i>

<i>Pfcr1</i>	=	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine drug resistance transporter
<i>Pfmdr1</i>	=	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
<i>Pfmsp1</i>	=	<i>Plasmodium falciparum</i> merozoite surface protein 1
<i>P.M</i>	=	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P.V</i>	=	<i>Plasmodium vivax</i>
QN	=	Quinine
RAPD	=	Random amplified Polymorphism of DNA
RBC	=	Red blood cell
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	=	Round per minute
RT-PCR	=	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SP	=	Sulfladoxine-Pyrimethamine
SSCP	=	Single Stranded Conformation Polymorphism
T	=	Threonine
T	=	Thymine
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	=	Melting temperature
UV	=	Ultraviolet
W	=	Wild type
WBC	=	White blood cell
Y	=	Tyrosine

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาของปัญหา

ปัจจุบันโรคมาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขระดับโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เช่น เอเชีย อเมริกา ยุโรป และแอฟริกาเหนือ รวมทั้งประเทศไทย มีประชากรจำนวนกว่า 655,000 ราย ที่เสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียต่อปี ผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี (WHO, 2012) มาลาเรียทำให้เกิดอาการไข้จับสั่น อาจมีอาการแทรกซ้อน ทำให้มาลาเรียขึ้นสมองและทำให้เสียชีวิตได้ (Kiwunuka, et al., 2009) สำหรับประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อเฉลี่ยต่อปีประมาณ 0.19 ต่อ 1,000 ประชากร (พ.ศ. 2552-2555) และพบว่ามี การติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* มากที่สุดในเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคน 5 ชนิด คือ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* (กรมควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง, 2555) จากการรายงานพบว่า ปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการติดเชื้อมาลาเรีย เช่น การอาศัยในที่ที่เป็นแหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะบริเวณเขตชายแดน ซึ่งมีป่าไม้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ผลกระทบจากการอพยพเคลื่อนย้าย หรือลักลอบของแรงงานต่างด้าวเข้าสู่ประเทศไทย ซึ่งส่วนใหญ่มาจากพื้นที่ชุกชุมโรค เช่น พม่า กัมพูชา และลาว ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อมากขึ้น และปัจจัยจากตัวเชื้อเองซึ่งมีกลไกการสร้างความหลากหลายของพันธุกรรม ทำให้เชื้อหลบหนีจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และคือต่อยาด้านมาลาเรียมากขึ้น ส่งผลให้เป็นอุปสรรคสำคัญในการควบคุมการแพร่ระบาด และการพัฒนาวัคซีน

การศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของเชื้อ สามารถศึกษาจากความหลากหลายของยีนต่างๆ เช่น ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนในบางระยะของเชื้อ หรือโปรตีนที่ผิวของเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน เช่น โปรตีนที่ผิวของสปอโรซอइट (sporozoite surface protein; CSP) โปรตีนที่ผิวของเมอโรซอइट (merozoite surface protein; MSP) เป็นต้น ในปัจจุบันพบว่ายีน *Pfmsp1* (*P. falciparum* merozoite surface protein 1) เป็นยีนที่มีลำดับเบสใน block-2 ที่มีความผันแปรสูง ซึ่งใช้เป็น genetic marker ในการแยกสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี (Snounou, et al., 1993; Snounou & Beck, 1998; Ngerngarmert, et al., 2005) และในปัจจุบันมีการนำเทคนิค Nested PCR-Heteroduplex Mobility Assay (Nested PCR-HMA) ใช้ตรวจกรองความหลากหลายของพันธุกรรมหรือการเกิด mutation เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีความไวสูง สามารถตรวจสอบทั้งความต่างของขนาด ความต่างของลำดับเบส และโครงสร้างรูปแบบของ DNA ได้

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำเทคนิคดังกล่าวมาศึกษาในเชื้อ *P. falciparum* ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี Nested PCR-HMA เพื่อตรวจสอบความหลากหลาย (genetic variation) ของ *Pfmsp1* gene โดยศึกษาในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย เช่น จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดยะลา และจังหวัดแม่ฮ่องสอน การพัฒนาวิธีดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ การตรวจการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ การติดตามการรักษา และการตรวจกรองการติดเชื้อใหม่ (reinfection) และการติดเชื้อซ้ำ (recrudescence) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านระบาดวิทยาและการรักษาต่อไป

2. ทบทวนเอกสาร

2.1 เชื้อก่อโรคมาลาเรียและการติดต่อ

โรคมาลาเรียหรือไข้มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่มียุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะ โดยเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นโปรโตซัวใน Genus *Plasmodium* ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในคนมี 5 ชนิด ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* เชื้อชนิดที่พบได้บ่อยในการติดเชื้อมากที่สุด คือ *P. falciparum* มักทำให้เกิดอาการรุนแรงและถึงแก่ชีวิตได้มาก การติดเชื้อมาลาเรียมีการแพร่กระจายได้ทั่วไปในเอเชีย อเมริกากลางและตอนใต้ และแอฟริกาตอนเหนือ (จิรพัฒน์ ศิริชัยสินธพ, 2549)

เชื้อมาลาเรียในคนทั้ง 5 ชนิด มีวงจรชีวิตของการเจริญการเจริญเติบโตแต่ละระยะ ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

2.1.1 เชื้อมาลาเรียระยะผสมพันธุ์ เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นภายในยุงก้นปล่อง โดยเริ่มจากที่ยุงก้นปล่องเพศเมียกัด และดูดเลือดผู้ป่วยที่เป็นไข้มาลาเรีย เชื้อมาลาเรียที่ประกอบไปด้วยระยะมีเพศและไม่มีการมีเพศก็จะเข้าไปในกระเพาะอาหารของยุง เชื้อเพศผู้จะเจริญเติบโตและเคลื่อนที่ได้ เมื่อพบกับเซลล์สืบพันธุ์ตัวเมียจะปฏิสนธิ เกิดเป็นตัวอ่อน (zygote) กระบวนการดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

2.1.2 การแบ่งตัวแบบไม่มีเพศ ภายในตัวอ่อนของเชื้อมาลาเรียจะแบ่งตัวเป็นรูปร่างคล้ายเข็มปลายแหลม เรียกว่า สปอโรซอइट (sporozoite) มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง มีการเจริญเติบโตเพิ่มขนาดและจำนวนมากขึ้น จากนั้นผนังเชื้อมาลาเรียจะแตกออก sporozoite เคลื่อนสู่ช่องว่างภายในลำตัวของยุง และเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุง เชื้อระยะนี้อยู่ในต่อมน้ำลายของยุงและมีอายุได้นาน 59 วัน

2.1.3 ระยะในตับ เป็นระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญในคน เมื่อยุงที่มีเชื้อมาลาเรียในระยะ sporozoite มากัดคน ก็จะปล่อยเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต และ sporozoite จะเข้าสู่เซลล์ตับ ซึ่งมีการเพิ่มขนาดโดยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ มีขนาดโตขึ้นจำนวนหลายพันตัว เรียกระยะนี้ว่า

merozoite ทั้งนี้ sporozoite ของเชื้อ *P.falciparum* เมื่อเข้ามาที่ตับจะแบ่งตัวทันที แต่ sporozoite ของ เชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* และ *P.ovale* บางส่วนเมื่อเข้าสู่เซลล์ตับแล้ว จะมีการหยุดพักการเจริญ ช่วงขณะ ระยะเวลาที่หยุดพักนี้แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์และชนิดของมาลาเรีย เชื้อระยะหยุดพักนี้ เป็นสาเหตุของการเกิดอาการไข้กลับ (relapse) ในผู้ป่วยมาลาเรียภายหลังได้ และเรียกเชื้อมาลาเรีย ระยะนี้ว่า hypnozoite

2.1.4 เชื้อมาลาเรียระยะอยู่ในเม็ดเลือดแดง เป็นระยะที่เชื้อมาลาเรียมีการเจริญแบ่งตัวเพิ่ม จำนวนในเม็ดเลือดแดงของคน โดยเริ่มจากการแตกออกของเซลล์ตับมาเป็นอิสระภายนอกช่วงระยะ สั้นๆ แล้วเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โดยการเคลื่อนที่เข้าไปเกาะติดเม็ดเลือดแดง แล้วเคลื่อนตัวเข้าสู่ เม็ดเลือดแดง เชื้อมาลาเรียจะเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและทำลายเม็ดเลือดแดง ระยะนี้เป็นระยะที่ ใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียในเลือดของผู้ป่วย (สมชาย จงวุฒิเวศย์และอุษา ทิสยากร, 2549)

2.2 อาการของโรคมาลาเรีย

อาการของโรคมาลาเรียจะปรากฏหลังจากได้รับเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ร่างกาย โดยขึ้นกับระยะ พักตัว (Incubation period) ของเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วย ซึ่งเป็นระยะตั้งแต่ถูกยุงกัดจนผู้ป่วยเริ่มมี อาการ โดยเฉลี่ยแล้วใช้เวลาประมาณ 10-14 วัน อาการจะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย ใน ระยะเริ่มแรกอาจมีอาการคล้ายไข้หวัด คือ ปวดศีรษะ มีไข้ต่ำๆ คลื่นไส้ ปวดเมื่อยตามตัว เบื่ออาหาร อาการเหล่านี้ขึ้นกับระยะการเจริญของเชื้อในร่างกายคน ระยะที่เชื้อเจริญเต็มที่แล้วเม็ดเลือดแดง แตกออกทำให้อาการจับไข้เป็นเวลา โดยทั่วไปจึงแบ่งอาการของโรคมาลาเรียเป็น 3 ระยะ คือ

2.2.1 ระยะหนาวสั่น (cool stage) ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง หนาวสั่น ผิวหนังซิด อาเจียน เป็น ระยะเวลา 5-60 นาที

2.2.2 ระยะร้อน (hot stage) ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะ บางรายปวดศีรษะมาก อาจปวดลึก เข้าไปในกระบอกตา กระสับกระส่าย เพื่อ ระบายน้ำ ชีพจรเต้นเร็ว คลื่นไส้ อาเจียน หน้าแดง ผิวหนังแดงและแห้ง เป็นระยะเวลา 2-6 ชั่วโมง

2.2.3 ระยะเหงื่อออก (sweating stage) ผู้ป่วยมีเหงื่อออกชุ่มตัว อุณหภูมิร่างกายลดลงอย่าง รวดเร็ว อ่อนเพลีย ระยะนี้กินเวลา 2-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นผู้ป่วยไม่มีอาการจับไข้ รู้สึกสบายคืออยู่ ประมาณ 1-2 วัน แล้วแต่ชนิดของเชื้อ แล้วจึงจับไข้อีก

2.3 สถานการณ์การติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย

จากรายงานผู้ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2552-255 เฉลี่ย 0.19 ต่อ 1000 คน ส่วนในปี พ.ศ. 2555 พบผู้ป่วยมาลาเรียทั้งประเทศจำนวน 676 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 0.02 ต่อ

ประชากร 1000 คน อัตราส่วนการติดเชื้อระหว่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* เท่ากับ 1:1.6 (สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2555)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ป่วยโรคมาลาเรียในช่วง 2 เดือนของปี พ.ศ. 2555 และปี พ.ศ. 2554 พบว่าจำนวนผู้ป่วยไทยมีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียลดลงร้อยละ 27.25 และผู้ป่วยต่างชาติลดลงร้อยละ 47.64 ทั้งนี้แนวโน้มของโรคมาลาเรียในบางที่มีโอกาสสูงขึ้นได้ เนื่องจากพบแรงงานต่างชาติเพิ่มสูงขึ้นในจังหวัดจันทบุรี จึงต้องมีการเฝ้าระวังผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าวให้มากขึ้น (สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2555)

จังหวัดที่มีผู้ป่วยมาลาเรียชาวไทยสูงสปีดอันดับแรก ได้แก่จังหวัดตากจำนวน 443 ราย คิดเป็นร้อยละ 40.02 แม่ฮ่องสอน 119 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.75 สุราษฎร์ธานี 84 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.59 อุบลราชธานี 81 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.32 กาญจนบุรี 80 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.23 ศรีสะเกษ 77 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.96 จันทบุรี 70 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.32 ยะลา 60 ราย คิดเป็น ร้อยละ 5.42 ระนอง 49 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.42 และตราด 44 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.97 (ตารางที่ 1.6) (สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, 2555)

สถานการณ์โรคมาลาเรียในประเทศไทย ตามการรายงานของสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรคพบว่า จำนวนผู้ป่วยมาลาเรียของไทยระหว่างปี พ.ศ. 2552–2555 มีการติดเชื้อมาลาเรียลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นเพราะประเทศไทยสามารถดำเนินการควบคุมป้องกันการแพร่เชื้อมาลาเรียตามนโยบายของค์การอนามัยโลกได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากเดิมเมื่อ 10 ปีก่อน ผู้ป่วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยจะมีมากถึงปีละกว่า 1 แสนคน แต่ปัจจุบันเหลือเพียงปีละกว่า 2 หมื่นคนเท่านั้น และมีถึง 29 จังหวัด ในภาคกลางที่กลายเป็นพื้นที่ปลอดการระบาดของโรคมาลาเรีย

แม้ว่าประเทศไทยจะประสบความสำเร็จในการควบคุมป้องกันโรคมาลาเรีย แต่ยังมีบางพื้นที่ ที่การระบาดของโรคอาจมีโอกาสูงขึ้นเนื่องจากการเข้ามาของผู้อพยพ และแรงงานต่างชาติที่มีจำนวนมาก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน เพชรบุรี และตราด โดยเฉพาะคนแรงงานต่างชาติ ที่ไม่ได้ขึ้นทะเบียนซึ่งมีอยู่มากกว่า 2 ล้านคนซึ่งจะไม่มีสวัสดิการรักษาพยาบาล และไม่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันจึงอาจจะกลายเป็นต้นตอของการแพร่เชื้อได้ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังผู้ป่วยมาลาเรียในพื้นที่ดังกล่าวให้มากขึ้น และยังคงต้องอาศัยความร่วมมือในการดำเนินงานกับประเทศเพื่อนบ้านในการแก้ปัญหาการเคลื่อนย้ายของประชากร นอกจากนี้ปัญหาแรงงานต่างชาติแล้วยังมีปัญหาร่างคว้นที่ต้องได้รับการแก้ไข คือ ปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยา และการระบาดของยาปลอม บริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา แนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียจึงต้องอาศัยระบบการเฝ้าระวังที่เข้มแข็ง และต่อเนื่องตลอดจนการพัฒนาบุคลากรให้มีความรู้ และทักษะในการดำเนินงานป้องกันควบคุมโรคมาลาเรียรวมทั้งการกระจายอำนาจเพื่อให้หน่วยงานระดับท้องถิ่นมีบทบาทดำเนินงานป้องกันควบคุมมาลาเรียที่ต้องดำเนินงานควบคู่ไปกับการจัดทำ

มาตรฐานงาน เพื่อให้หน่วยงานระดับท้องถิ่นสามารถดำเนินงานได้ด้วยตนเอง (กรมควบคุมโรค, 2555)

นอกจากนี้จากรายงานต่างๆ ซึ่งให้เห็นว่าประเทศไทย และประเทศเพื่อนบ้านได้แก่ พม่า กัมพูชา ลาว และมาเลเซีย ยังคงต้องเฝ้าระวัง และควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื่อมีการดื้อยาที่ใช้รักษามากขึ้น โดยเฉพาะในประเทศไทย พม่า ซึ่งมีผู้ป่วยสูงขึ้น โดยลำดับ ทำให้มีการรักษาที่ยุ่ยากซับซ้อนมากขึ้น และมีโอกาสการแพร่กระจายของการติดเชื้อมากขึ้นด้วย (Chaijaroenkul et al., 2010)

2.4 สถานการณ์การดื้อยา

การดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย หมายถึง ความสามารถของเชื้อในการดำรงชีวิต หรือเพิ่มจำนวนได้ หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านมาลาเรียในขนาดที่เกยกำจัดเชื้อได้ หรือขนาดสูงกว่าที่ผู้ป่วยทนยาขนาดนั้นได้ คำนิยามนี้ใช้มากกับปรากฏการณ์เชื้อ *P. falciparum* ระยะไรเฟสที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยที่ดื้อต่อยา

2.4.1 การประเมินการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย

การดื้อยามีระดับแตกต่างกันตั้งแต่ดื้อน้อยๆ คือปานกลาง จนถึงดื้อมาก ได้กำหนดมาตรฐาน และแบ่งชนิดการดื้อยาดังต่อไปนี้

Sensitive (S) = เชื้อมาลาเรียหมดภายใน 7 วันหลังผู้ป่วยได้รับยา และเชื้อไม่กลับมาภายใน 28 วัน

Resistance (R1) = เชื้อมาลาเรียหมดไปภายใน 7 วัน แต่กลับตรวจพบเชื้ออีกภายใน 28 วัน

Resistance (R2) = เชื้อลดลงมากแต่ไม่หมดใน 7 วัน

Resistance (R3) = เชื้อกลับมีมากขึ้นหรือไม่ลดลงหรือลดลงเพียงเล็กน้อยไม่ถึง 25% ของจำนวนเชื้อก่อนการรักษาหลังให้ยา 48 ชั่วโมง (ตระหนักจิต หารินสุต และคณะ, 2534)

2.4.2 ปัญหาที่เกิดจากการดื้อยา

ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียเพิ่มมากขึ้น เพราะผู้ป่วยต้องกลับมารักษาซ้ำอีกหลายครั้ง และมีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น

2.4.3 อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *P. falciparum*

เชื้อ *P. falciparum* คือต่อยา Chloroquine พบทั่วประเทศไทยทางแถบตะวันออกเฉียงเหนือชายแดนไทย-กัมพูชา (ตราด จันทบุรี ปราจีนบุรี ระยอง) เชื้อดื้อยามาก ไม่เฉพาะต่อ Chloroquine เท่านั้น แต่กับ Blood schizonticide ทุกชนิด ส่วนทางแถบตะวันตก (ตาก กาญจนบุรี)

เชื้อคือน้อย เชื้อ *P. falciparum* ที่คือน่าจะเกิดบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา ที่มีพลาสมาและทับทิมสยาม คนจากทุกภาคของประเทศเดินทางไปบริเวณนั้น และเกือบทุกคนเป็นมาลาเรีย เมื่อกลับบ้านก็นำเชื้อคือน่าจะกลับมาด้วย เชื้อคือน่าจะกระจายไปทั่วประเทศไทยหรืออาจกล่าวได้ว่าที่ใดมีเชื้อ *P. falciparum* ที่นั่นมีเชื้อคือน่าจะ Chloroquine ประปนอยู่ด้วย ซึ่งจะมากหรือน้อยเท่านั้น (Congpuong, et al., 2005)

เชื้อ *P. falciparum* คือคือน่าจะ Chloroquine มีถิ่นกำเนิด 2 แห่ง คือ โคโลมเบียในทวีปอเมริกาใต้ และประเทศไทยในชายแดนกัมพูชา ที่โคโลมเบียมีการแพร่กระจายของเชื้อไปทั่วอเมริกา กลางด้านเหนือจนถึงแถบตะวันออกของคลองปานามา และกระจายลงล่างทั่วทวีปอเมริกาใต้ ยกเว้น อาร์เจนตินา ปารากวัย และเปรู ซึ่งไม่มีเชื้อ *P. falciparum* แพร่กระจายอยู่บริเวณดังกล่าว (Abdoulaye, et al., 2001)

ทางด้านเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การแพร่กระจายของเชื้อ *P. falciparum* ที่คือน่าจะ Chloroquine แพร่กระจายไปรอบทิศจากชายแดนไทย-กัมพูชา กระจายลงใต้เข้ามาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ถึงวานูวาตูทางด้านตะวันออก และเหนือเข้าเวียดนาม ไปจนถึงเกาะไต้หวันและตอนใต้ของจีนแผ่นดินใหญ่ ทางตะวันตกกระจายเข้าพม่า บังกลาเทศ อินเดีย ปากีสถาน อัฟกานิสถาน อิหร่าน และเขตร้อนของทวีปแอฟริกา จะเห็นได้ว่าตั้งแต่เริ่มพบว่าเชื้อ *P. falciparum* คือคือน่าจะ Chloroquine เชื้อกระจายไปทั่วโลก

Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) เมื่อเชื้อ *P. falciparum* คือคือน่าจะ Chloroquine ก็ได้เปลี่ยนไปใช้ SP แทน อัตราการหายขาดจาก SP 2 เม็ดมากกว่า 90% จึงใช้ SP ในการรักษา จากนั้นอัตราการหายคือน่าจะลดลง เหลือไม่ถึง 10% แต่ในบางท้องถิ่นในทางเหนือ และใต้ของประเทศไทย อัตราการหายคือน่าจะยังคงสูงอยู่ ส่วนยา metakelfin ซึ่งเป็นยาผสมของ Sulfalene กับ Pyrimethamine ก็ให้ผลพอๆ กับประเทศอื่นๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ลาว เวียดนาม พม่า มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย อเมริกาใต้ (บราซิล โคโลมเบีย และประเทศในกลุ่มน้ำอเมซอน) แอฟริกา (เคนยา แทนซาเนีย) พบว่ามีเชื้อคือน่าจะผสมนี้ (Congpuong, et al., 2005)

Quinine รายงานการคือน่าจะ Quinine เริ่มพบที่บราซิล แต่ไม่ก่อให้เกิดปัญหา เพราะไม่มีการแพร่กระจาย ประเทศไทยเริ่มใช้ Quinine ที่เชียงใหม่ การรักษาได้ผลดี ไม่มีรายงานการคือน่าจะ และต่อมา มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เริ่มมีการคือน่าจะ การรักษาด้วย Quinine ยังเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูง อัตราการหายเกือบ 100% แต่เมื่อใช้ Quinine มากขึ้น อัตราการหายคือน่าจะลดลงเหลือประมาณ 75% เท่านั้น จึงให้ยา Tetracycline อัตราการหายเพิ่มเป็น 100% ปัจจุบันก็ยังคือน่าจะ มีประสิทธิภาพสูง อัตราการหายขาดมากกว่า 90%

Mefloquine จากการศึกษาประสิทธิภาพของยา Mefloquine พบว่าอัตราการหายสูง กว่า 90% แต่ไม่แนะนำให้ใช้ยาตัวเดียว เพราะเชื้อมาลาเรียจะปรับตัวคือน่าจะได้เร็ว จากผลการศึกษา

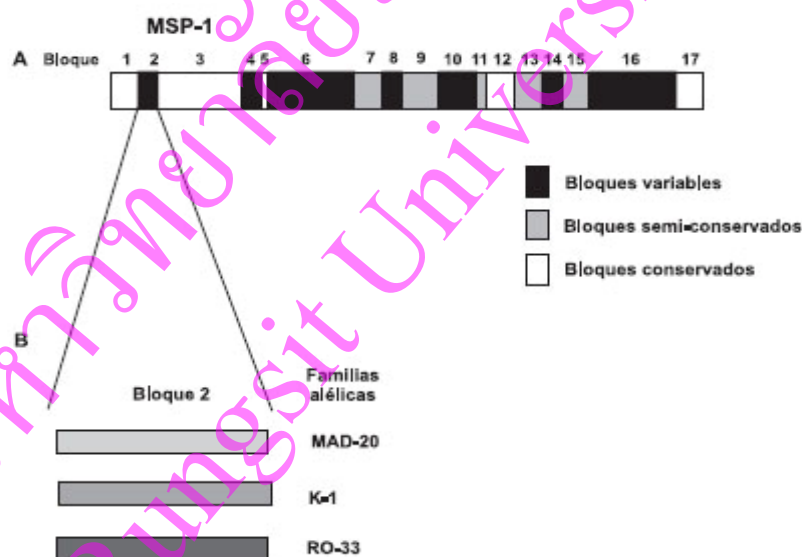
ในหลอดทดลองพบว่า ถ้าให้ SP ร่วมด้วยจะชะลอการเกิดการดื้อยาได้ องค์การอนามัยโลกแนะนำ ให้ใช้ยา 3 ชนิดร่วมกัน คือ Mefloquine , Sulfadoxine , Pyrimethamine มีอัตราการหาย 98% ใช้รักษาผู้ป่วยทั่วประเทศ และต่อมาอัตราการหายขาดลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 66% จะเห็นได้ว่า เชื้อ *P. falciparum* ได้พัฒนาให้ดื้อต่อยาต้านมาลาเรียทุกชนิด ต่างกันที่จะดื้อได้เร็วหรือช้าเท่านั้น พวกยาที่มีฤทธิ์นาน เช่น Chloroquine , Sulfadoxine , Pyrimethamine , Mefloquine การดื้อยาจะเกิดขึ้นเร็ว 5-6 ปีก็ดื้อแล้ว เพราะเชื้อมีเวลาสัมผัสกับยานาน มีเวลาที่จะปรับตัว ส่วน Quinine มีฤทธิ์สั้น เชื้อจะดื้อยาช้า เพราะเชื้อมีเวลาสัมผัสกับยาสั้น ไม่มีเวลาพอที่จะปรับตัว การให้ยาพร่ำเพรื่อ งดกินยาโดยไม่มีการควบคุม ซื้อยากินเอง ได้รับยาไม่เต็มขนาด เชื้อตายไปบ้างเหลือรอดอยู่บ้าง พวกที่เหลือรอดเหล่านี้จะปรับตัวให้ดื้อยา เชื้อดื้อยานี้จะไปจับกับผู้ป่วยเมื่อผู้ป่วยย้ายถิ่น และจะช่วยแพร่เชื้อดื้อยาไปยังคนอื่น การป้องกันการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาจึงต้องให้ gametocytocidal และ sporontocidal drug แก่ผู้ป่วยมาลาเรียทุกคน (Congpuong, et al., 2005)

2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยีน *Pfmsp1*

เนื่องจากโรคมมาลาเรียที่เกิดจาก *P. falciparum* เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขมากกว่า เชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ดังนั้นจึงมีการศึกษาอนุชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้มากกว่าชนิดอื่นๆ จากการศึกษาพบว่า *P. falciparum* ประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 14 แท่ง โดยโครโมโซมแต่ละแท่งมีขนาดแตกต่างกัน และโครโมโซมแท่งเดียวกันในเชื้อต่างสายพันธุ์กันมักมีขนาดแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีขนาด genome แตกต่างกันด้วย ลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งใน genome ของ *P. falciparum* คือ การที่ DNA ประกอบด้วยเบส adenine (A) และ Thymine (T) สูงถึงร้อยละ 80 ในขณะที่จุลชีพอื่น เช่น *Escherichia coli* มีองค์ประกอบของ A และ T ใกล้เคียงกับ Guanine (G) และ Cytosine (C) เป็นต้น ส่วน *P. vivax* มีปริมาณของ A และ T รวมกันประมาณ ร้อยละ 70 โครโมโซมของ *P. falciparum* ตอนปลายสุดของโครโมโซมแต่ละด้านของเชื้อประกอบด้วยบริเวณที่เรียกว่า telomere ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสที่เรียงซ้ำกัน (repeat) เป็นชุดสั้นๆ โดยมีเบส G เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก เรียกว่า G-rich repeats จากการศึกษา telomere ของเชื้อมาลาเรียหลายชนิดพบว่าประกอบด้วยลำดับเบส 7 ตัวซ้ำกันเป็นชุด ส่วนบริเวณที่ถัดเข้ามาจากบริเวณ telomere ด้านใน เรียกว่า subtelomere ซึ่งครอบคลุมความยาวประมาณ 20-40 กิโลเบส ประกอบด้วย repeats ทั้งหมด 6 แบบได้แก่ (1). Repeats ที่มีเบส 7 ตัว (7-bp-repeats) (2). Repeats ที่มีเบส 164 ตัว (164-bp-repeats) (3). Repeats ที่มีเบส 135 ตัว (135-bp-repeats) (4). Repeats ที่มีเบส 63 ตัว (63-bp-repeats) (5). Repeats ที่มีเบส 21 ตัว (21-bp-repeats) (6). Repeats ที่มีเบส 105 ตัว (105-bp-repeats) โดย repeats เหล่านี้พบในทุกโครโมโซม เรียกว่า telomere-associated repetitive elements (TARE) repeats ที่พบในยีนที่สร้างโปรตีนของเชื้อมาลาเรียมักมีขนาดสั้นกว่า repeats ที่พบในส่วนที่ไม่ใช่ยีน เช่น Merozoite surface

protein 1 ซึ่ง repeats มีเพียงช่วงสั้นๆ ทางด้าน 5' ของยีนเรียกว่า tripeptide repeats แบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่คือ MAD20 , K1 และ RO33 ซึ่งการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน codon และจำนวนหน่วยของ tripeptide repeats ของ 2 กลุ่มแรกมีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย ส่วนกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย repeats ในระดับนิวคลีโอไทด์ แต่ไม่มี repeats ในระดับกรดอะมิโน (สมชาย จงวุฒิเวศย์และอุษา ทิทยากร, 2549)

Merozoite surface protein 1 gene (*Pfmsp1*) เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 และยีนนี้มีความผันแปรของลำดับเบสสูง โดยจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Pfmsp1* ทำให้ทราบโครงสร้างพื้นฐานของยีนดังกล่าวซึ่งแบ่งออกได้เป็น 17 block (รูปภาพที่ 1.1) โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีความผันแปรของเบสระหว่างสายพันธุ์สูง (variable block) จำนวน 7 block กลุ่มที่มีความผันแปรของลำดับเบสปานกลาง (semiconserved block) จำนวน 5 block และ กลุ่มที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูง (conserved block) จำนวน 5 block (Snounou, et al., 1999)



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของยีน *mSP1* ของเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งแบ่งเป็น 17 block ประกอบด้วย conserved block (สีขาว) จำนวน 5 block , variable block (สีดำ) จำนวน 7 block และ semi-conserved block (สีเทา) จำนวน 5 block ซึ่งใน block-2 จะมีรูปแบบของ family allele 3 รูปแบบ คือ MAD20 , K1 และ RO33 (Ngermngarmert, et al., 2005)

กลไกสำคัญที่ทำให้เกิดความผันแปรของยีน *Pfmsp-1* คือการเกิด Meiosis recombination ในยุงก้นปล่อง (*Anopheles mosquito*) โดยขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของการระบาดของเชื้อ ซึ่งการเกิด Recombination จะเกิดขึ้นในพื้นที่ที่มีการระบาดสูง (Kiwanuka, et al., 2009) จากการศึกษามี

การรายงานว่า ความแตกต่างของ block-2 ที่มีความผันแปรของลำดับเบสสูง แบ่ง allelic variation ได้ 3 ชนิดที่สำคัญคือ MAD20 , K1 และ RO33 ซึ่งบริเวณดังกล่าวใช้เป็น genetic marker และเป็นตัวบ่งบอก alleles type มากกว่าบริเวณอื่นๆ แต่ความถี่ของการเกิด alleles family จะแตกต่างกันตามพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อ (Kiwanuka, et al., 2009)

ความสำคัญของยีน *Pfmsp-1* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนชั้นมาบนผิวของ Merozoite เป็น glycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก โดยมีน้ำหนักของโมเลกุลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อประมาณ 185 ถึง 200 กิโลดาลตัน เรียกว่า โปรตีนบนผิว merozoite ชนิดที่ 1 (Merozoite surface protein 1) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่อยู่บนผิวของ merozoite มีหน้าที่ในการยึดเกาะกับเม็ดเลือดแดง เพื่อให้ merozoite ลูกกลมเข้าเม็ดแดงตัวใหม่ได้ (สมชาย จงวุฒิเวศย์ และอุษา ทิศยากร, 2549) นอกจากนี้ Merozoite surface protein 1 ยังมีคุณสมบัติมีความเป็น Antigen สูง จึงทำให้ถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย (Aubouy, et al., 2003)

ความสำคัญในการศึกษา Genotype ของยีน *Pfmsp-1* พบว่าจากรายงานการวิจัยต่างๆ ได้ศึกษาความหลากหลายของยีน *Pfmsp-1* เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยกสายพันธุ์ (สมชาย จงวุฒิเวศย์, 2549) ทำให้ทราบ และอธิบายข้อมูลในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อตามพื้นที่ต่างๆ ร่วมกับปัจจัยด้านระบาดวิทยาของเชื้อ ความหลากหลายของยีน *Pfmsp-1* สามารถบอกถึงการติดเชื้อซ้ำได้ (recrudescence) (Brockman, et al., 1999) ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อมีการดื้อยาต้านมาลาเรีย ซึ่งทำให้รู้ถึงประสิทธิภาพของยาที่มีผลต่อการรักษา

2.6 Genetic variation

Genetic variation คือ การตรวจเพื่อหาความแตกต่างของพันธุกรรมระดับยีนในแต่ละสายพันธุ์ การศึกษาหา genotype ส่วนใหญ่เพื่อศึกษาการเกิด mutation ซึ่งสามารถศึกษาได้หลายวิธี เช่น Restriction Fragment length Polymorphism (RFLP), Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP), Heteroduplex Mobility Assay (HMA) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม วิธีที่ดีที่สุดคือ DNA sequencing แต่มีข้อเสียคือมีราคาแพง

Heteroduplex Mobility Assay (HMA) เป็นเทคนิคการตรวจสอบการกลายพันธุ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน (gene polymorphism) โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของโมเลกุล DNA สายคู่ (double stranded DNA) ที่เรียกว่า DNA mobility ตามขนาดและรูปร่างของ DNA ขั้นตอนการตรวจสอบ คือ นำ Product ที่ได้จากการทำ PCR ไปผ่านความร้อนหรือใช้ denaturing agent เพื่อให้ DNA สายคู่แยกออกจากกัน เป็น DNA สายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนประมาณ 90-95 °C เพื่อทำลายพันธะ hydrogen ระหว่างสายของ DNA ทำให้ได้ DNA สายเดี่ยวสองสาย และจากนั้นก็

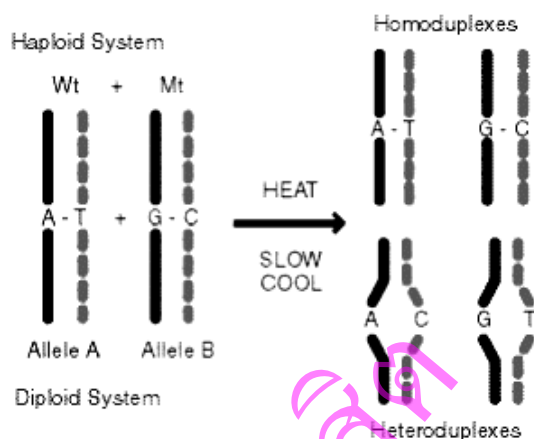
เข้าสู่ขั้นตอน reannealing โดยจะลดอุณหภูมิลงทำให้สายของ DNA เข้าคู่กันใหม่ (Nollau & Wagener, 1997)

สาย DNA ทั้งสองสายที่มีการเข้าคู่กันของลำดับเบสที่เป็นเบสคู่สมกันโดยสมบูรณ์จะเรียกว่า homoduplex ซึ่งเกิดลักษณะโครงสร้าง และรูปร่างของ DNA (conformation structure) ที่เป็นรูปแบบจำเพาะแบบหนึ่ง และจะเคลื่อนที่ใน polyacrylamide gel ไปได้ไกลกว่าการเข้าคู่กันของ DNA ที่มีลำดับเบสคู่สมไม่สมบูรณ์ เช่น การเกิดเบสผิดไป (mismatch) การเกิดเบสหายไป (deletion) หรือเพิ่มขึ้น (insertion) จะทำให้ DNA สายปกติเข้าคู่กับ DNA ที่มีลำดับเบสเปลี่ยนไป เกิดเป็น heteroduplex ทำให้ลักษณะโครงสร้าง และรูปร่างของ DNA เปลี่ยนไป และมีการเคลื่อนที่ช้าลง โดยอัตราการเคลื่อนที่จะต่างจาก DNA ที่ปกติมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความต่างของลำดับเบส ทั้งในแง่ของจำนวน และตำแหน่งที่แตกต่างไป ยิ่งต่างกันมากเท่าไรก็จะเห็นความต่างของตำแหน่งการเคลื่อนที่ต่างกันมากเท่านั้น โดยพบว่าวิธีการนี้จะสามารถสังเกตเห็นความต่างของแถบ DNA ได้ชัดเจนเมื่อมีลำดับเบสที่ต่างกันตั้งแต่ 2 เบสขึ้นไป และเป็นวิธีที่สามารถศึกษาได้กับ DNA ขนาดเล็ก 200 bp จนถึงขนาด 600 bp ได้ดี

หลักการนี้ถูกนำมาตรวจหาการกลายพันธุ์ (mutation) โดยการนำ DNA สายปกติหรือ wild type ทำปฏิกิริยากับ DNA เป้าหมายที่มีลำดับเบสผิดไป (mutant) หลังเกิด renaturation แล้ว นำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจแถบ (band) DNA โดยการย้อมด้วย ethidium bromide หรือย้อมด้วย silver stain จะพบการเคลื่อนที่ของสาย DNA ที่แตกต่างกันระหว่าง homoduplex (การเข้าคู่กันของสาย DNA wild type กับสาย DNA wild type หรือสายที่ mutant กับสายที่ mutant) และโครงสร้าง Heteroduplex (การเข้าคู่กันของสาย DNA wild type กับสาย DNA mutant) ดังรูปที่ 1.2

เทคนิค Heteroduplex Mobility Assay มีความไวของวิธี ในการตรวจหา DNA ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) มากกว่าการตรวจหาการ mutation ด้วยวิธีอื่นๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบัน ยกเว้นวิธีการตรวจหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing) heteroduplex mobility assay มีประสิทธิภาพสูงเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ในการตรวจจำนวนมาก และเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์แยกแยะตัวอย่างตรวจที่มีหลายๆ strains อยู่ด้วยกันได้ ทั้งยังสามารถศึกษาความหลากหลายของ species, strains และความผันแปรของลำดับเบสจากตัวอย่างตรวจได้

การวัดค่า Heteroduplex Mobility index (MI) หาได้จาก ระยะห่างจากจุดกึ่งกลางของแถบ heteroduplex / ระยะห่างจากจุดกึ่งกลางของแถบ homoduplex (Heteroduplex mobility assay, ค้นเมื่อ 15 มีนาคม 2553)



รูปที่ 1.2 ภาพแสดงหลักการการเข้าคู่กันของวิธี Heteroduplex

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่ได้นำวิธี HMA ไปใช้ศึกษา genotype ได้แก่ งานวิจัยของ Wang และ Hiruki (Wang & Hiruki, 2001) ได้ใช้วิธี HMA สำหรับใช้แยก และหาความแตกต่างของ phytoplasmas ใน Aster Yellows Group และ Clover Proliferation ซึ่งพบว่าวิธี HMA สามารถแยกความแตกต่างได้มากกว่าวิธี RFLP และสามารถตรวจสอบการเพิ่มขึ้น หรือลดลงของลำดับเบส เมื่อลำดับเบสมีขนาด 500 bp สามารถตรวจสอบได้อย่างง่ายดาย ส่วนงานวิจัยของ Joanna และคณะ ในปี 2001 ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างของไวรัส Influenza A ในสัตว์สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับ HMA เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR จะพบไวรัสทั้งหมด 15 subtype และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HMA การศึกษาครั้งนี้พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส Influenza A ที่มาจากสัตว์ปีก แยกได้จากประเทศ Hong Kong เป็น H9N2 (HK/1073/99) ซึ่งสายพันธุ์ที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับ Q9/HK/G1/97 referent PCR product มาก จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า HMA เป็นวิธีที่ง่ายและมีความไวในการตรวจหา M gene ของเชื้อไวรัส Influenza A นอกจากนี้วิธี RT-PCR Heteroduplex ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยีนอื่นๆ ของไวรัส Influenza ได้ (Ellis, et al., 2001)

ในปัจจุบันการอาศัยเทคนิค PCR-HMA ยังไม่พบว่ามีรายงานในการนำมาประยุกต์ใช้กับการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *P. falciparum* แต่อย่างไรก็ตาม มีการพัฒนานำวิธี HMA แต่ตรวจจับโดยใช้ DNA ตรวจสอบติดฉลากกับสารรังสีเพื่อตรวจหา genotype ของ *P. falciparum* โดยเรียกวิธีนี้ว่า Heteroduplex tacking assay (HTA) วารุณีและคณะ (Ngrenngarmleat, et al., 2005) ได้ทำการศึกษา Genotyping เพื่อใช้ในการแยก subtype ของ *P. falciparum* โดยใช้วิธี Heteroduplex tracking assay

(HTA) เปรียบเทียบกับวิธีที่ Nested PCR พบว่า วิธี HTA สามารถวิเคราะห์ความหลากหลายของ *Pfmsp1* ที่มีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงได้ 47% และลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยได้ 18% และสามารถตรวจพบลำดับเบสที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงได้ 35% แสดงให้เห็นว่า HTA มีความไวในการวิเคราะห์หาความหลากหลายของ alleles *Pfmsp1* มากกว่าวิธี Nested PCR วิธี HTA เป็นวิธีที่ง่าย มีความละเอียดสูง และมีความไวในการศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสได้มาก ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรียต่อไปได้ แต่ข้อจำกัดของวิธี HTA คือ เป็นวิธีที่ใช้สารกัมมันตรังสีในการตรวจสอบ ซึ่งอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยใช้สารเรืองแสงหรือสารชีวเคมีในการตรวจสอบต่อไปในอนาคตได้

การศึกษา Genotype ของ *P. falciparum* ถูกนำมาเชื่อมโยงให้เข้าใจถึงการดื้อยา หรือการรักษาการเกิดการติดเชื้อซ้ำจากสายพันธุ์ดื้อยา รวมทั้งเพื่อการใช้ข้อมูลออกแบบวัคซีนให้ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ โดยอาศัยการศึกษาความหลากหลายของยีน *Pfmsp-1* เช่น การศึกษาเพื่อประโยชน์ด้านการใช้ยา การบอกละการ recrudescence หรือ reinfection ได้แก่ รายงานของ Brockman และคณะ ปี ค.ศ.1999 (Brockman, et al., 1999) วิจัยเกี่ยวข้องกับการกลับมาเป็นซ้ำของเชื้อซึ่งมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาที่พบในประเทศไทย พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่มีการดื้อยาต้านมาลาเรีย โดยทำการศึกษาผลของยาต้านมาลาเรียต่อ *msp-1*, *msp-2* และ *glurp* ทั้งก่อนและหลังการรักษาเพื่อเปรียบเทียบการกลับมาเป็นซ้ำและการติดเชื้อใหม่ ซึ่งผู้วิจัยใช้วิธี PCR-RFLP ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบขนาดยีนทั้ง 3 ชนิดของผู้ป่วยทั้งก่อนและหลังการรักษา พบว่าสามารถตรวจแยกผู้ป่วยจำนวน 26 ราย จาก 69 ราย (38%) ที่มีการกลับมามีอาการอีกครั้งหนึ่งภายหลังการรักษาแล้วเป็นเวลา 62 วัน ซึ่งอาจแสดงถึงการรักษาที่ไม่ได้ผล จะมีประโยชน์ในการเลือกใช้ยารักษาต่อไป และมีผู้ป่วยจำนวน 36 ราย จาก 69 ราย (52%) มีการติดเชื้อแบบใหม่ภายหลังการรักษา

ในปี ค.ศ. 2003 Matsuo และคณะ (Matsuo, et al., 2003) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Mefloquine ต่อการรักษาการติดเชื้อ *P. falciparum* ในชายแดนไทย-พม่า เป็นการศึกษา polymorphism ของยีน *msp-1* พบรูปแบบ alleles 3 รูปแบบ คือ K1, MAD20 และ RO33 จากการสำรวจครั้งที่ 1 พบรูปแบบของ haplotype ทั้งหมด 89 แบบ และมี haplotype ที่แตกต่างกัน 12 haplotype จากนั้นทำการรักษาผู้ป่วยด้วยยา Mefloquine เมื่อทำการตรวจซ้ำพบรูปแบบของ haplotype ลดลงเหลือ 68 แบบ และมี haplotype ที่แตกต่างกัน 8 haplotype จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ยา Mefloquine มีผลต่อ haplotype ของยีน *msp-1* คือ จำนวน haplotype มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และรูปแบบความถี่ของ haplotype ไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการรักษาด้วยยา Mefloquine

การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ในถิ่นต่างๆ ทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย เช่น จากงานวิจัยเรื่องความแตกต่างของยีน *msp-1* และ *msp-2* ในประชากรไทยของ Snounou และ

คณะ ในปี (Snounou, et al., 1999) โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่คลินิกชายแดนไทย-กัมพูชาทั้งหมด 4 ครั้ง ในช่วงเวลา 3 เดือน วิเคราะห์ด้วยวิธี PCR จากจำนวนผู้ป่วย 133 ราย พบว่าเป็นยีน *msh-1* allele K1 จำนวน 51 ราย (38.35%) พบว่าเป็น allele MAD20 จำนวน 124 ราย (93.23 %) และ allele RO33 9 ราย (6.77%) และพบว่าเป็นยีน *msh-2* allele FC27 จำนวน 101 ราย (75.94%) และ allele 3D7/IC จำนวน 117 ราย (87.96%) ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า ยีน *msh-2* มี polymorphism มากที่สุด และพบว่า *msh-1* ยีน MAD20-family allele C และ D มีจำนวนมากกว่า allele อื่นๆ ใน family เดียวกัน, *msh-2* ยีน FC27-family allele B และ C มีจำนวนมากและเป็น allele ที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนี้การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อ *P. falciparum* ทางแถบตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย โดย Joshi และคณะ (Joshi, et al., 2007) พบว่าเป็นพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดและมีอัตราการดื้อยาสูง (Dev, et al., 2001) โดยความหลากหลายของ *msh-1* จะพบมากทางแถบตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วน *msh-2* จะพบมากทางแถบตะวันออกเฉียงใต้ แสดงให้เห็นว่าการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่ของประเทศมีความแตกต่างกัน และการแพร่ระบาดที่แตกต่างกันนี้มีผลต่อการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่ โดยพบว่าเชื้อมาลาเรียที่มี alleles K1 จะมีอัตราการดื้อยาสูงมากกว่าเชื้อมาลาเรียที่มี alleles อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายของยีน *msh-1* และ *msh-2* มีรูปแบบการกระจายตัวเหมือนทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ละตินอเมริกาและปาปัวนิวกินี (Paul, et al., 1995; Paul, et al., 1998; Ariey, et al., 1999; Haddad, et al., 1999; Gomez, et al., 2002; Montoya, et al., 2003; Sharma, et al., 2006;)

จากการศึกษาสายพันธุ์ของ *P. falciparum* ในประเทศปากีสถาน โดย Ghanchi และคณะ (Ghanchi, et al., 2010) ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษตั้งแต่ปี ค.ศ. 2005-2007 พบว่า gene ที่บ่งชี้ถึงสายพันธุ์ของมาลาเรีย คือ *msh-1* (ซึ่งแยกเป็น Allele K1 MAD20 และ RO33) และ *msh-2* (ซึ่งแยกเป็น Allele FC27 และ 3DC 7/IC) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ติดเชื้อเพียงชนิดเดียว พบแบบแผนของ genotype ของ *msh-1* 25 แบบ นั่นคือ K1 จำนวน 12 แบบ, MAD20 จำนวน 8 แบบและ RO33 จำนวน 5 แบบ และจากจำนวน 236 ราย มี 51 ราย (22%) พบแบบแผนของ genotype ของ *msh-2* 33 แบบ นั่นคือ FC27 จำนวน 14 แบบ และ 3D7/IC จำนวน 19 แบบ จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถแยกความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ *P. falciparum* ได้หลายสายพันธุ์

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *P. falciparum* โดยใช้ความหลากหลายของยีน *Pfmsp-1* ด้วยวิธี Nested PCR-HMA ที่พัฒนาขึ้น
2. เพื่อศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย

4. ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการพัฒนาวิธี Nested PCR-HMA และนำมาศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *P. falciparum* ในเขตพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ซึ่งเป็นแหล่งชุกชุมของโรค รวมทั้งสิ้นประมาณ 80 ตัวอย่าง

5. ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพวิธีตรวจกรองความหลากหลายของเชื้อ *P. falciparum* ด้วยวิธี Nested PCR-HMA ที่พัฒนาขึ้น
2. ทราบถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ *P. falciparum* ที่มีการระบาดในประเทศไทย
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยา เพื่อประโยชน์ด้านแนวทางการรักษา และป้องกันการระบาดต่อไป

บทที่ 2

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การออกแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยประยุกต์ใน สาขาวิชาปรสิตวิทยา โดยระเบียบวิจัยเชิงทดลอง ศึกษาพัฒนาการตรวจกรองความหลายหลายของเชื้อ *P. falciparum* โดย Nested PCR-HMA ที่แยกได้จากประเทศไทย จากยีน *Pfmsp1* ที่ตำแหน่ง block 2 โดยการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี thick film, thin film และใช้ Whatman filter paper strip โดยการเก็บตัวอย่างจาก จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดยะลา จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดแม่ฮ่องสอน โดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการย้อมด้วยสี Giemsa และทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เท่านั้น ทำการตรวจศึกษายีน *Pfmsp1* ที่ตำแหน่ง block 2 ด้วยวิธี Nested PCR-HMA และศึกษา genotype ของ *Pfmdr1* 86 และ *Pfprt* 76 ด้วยวิธี Multiplex nested PCR-RFLP (จารูวรรณ กรานเกตุและคณะ, 2552)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 เครื่องมือ

- 2.1.1 Microcentrifuge (Spectrafuge16M)/Nation Labnet Co. Edison / USA.
- 2.1.2 Mini-Microcentrifuge (Tomos)/TOMOS Life Science Group /USA.
- 2.1.3 UV Transluminatation (Tfx-20.M)/Vilber Lourmat /France
- 2.1.4 Vortex Mixer (VTX-3000L)/Laboratory& Medical Supplies/Japan
- 2.1.5 Thermal cycler (TC-3000)/Chemoscience (Thailand) Co.LYD/USA.
- 2.1.6 Hot Plate & Magnetic Stirrer (VS-130stl)/Vision Scienyific Co., LTD/ Korea
- 2.1.7 Micropepette (Discovery Comfort), 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000/Pacific Science Co., LTD/Poland
- 2.1.8 Mini-Run Gel Electrophoresis sysem (GE-100)/Biure Technology Co., LYD/USA.
- 2.1.9 Water bath (W350t)/Memmert GmbH+Co.KG/Germany
- 2.1.10 Autoclave (H-8LL)/Enshinki/Japan
- 2.1.11 Hot air oven (USO)/Memmert/Germany
- 2.1.12 Electrophoresis chamber (AE-6100)/Atto Corporation/Japan
- 2.1.13 Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-RAD) /Scientific/ China
- 2.1.14 Glass plate 0.75 mm 10x10 cm. (Bio-RAD) /Scientific /China

2.1.15 Sample Combs 0.75 mm 10x10 cm. (Bio-RAD)/Scientific /China

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 Pipette Tips, 1,000 μ l, 5-10 μ l/Scientific Co., /USA.

2.2.2 Micro tube, 0.2 ml, 1.5 ml/Bioscience Inc. /USA.

2.2.3 PCR tube/Bioscience Inc. /USA.

2.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

2.3.1 Agarose/Vivantis Ltd. /UK

2.3.2 Boric Acid/Monteison Group/USA.

2.3.3 Tris[Hydroxymethyl]amino-methan/Sigma Chemical.Co/USA.

2.3.4 Ethylenediaminetetra-acetic acid di-sodium salt (EDTA)/Ajax Finechem/
NewZealand

2.3.5 Oligonucleotide Primer/Ward Medic Ltd., Partnership/Thailand

2.3.6 Chelex®100 Molecular Biology Grade Resin/Bio-Rad Laboratories/ Canada

2.3.7 Giemsa stain/Merck KGaA/Germany

2.3.8 KH_2PO_4 /Merck KGaA/Germany

2.3.9 Na_2HPO_4 /Merck KGaA/Germany

2.3.10 *i-Taq*TM DNA polymerase (5U/ μ l)/iNtRON Biotechnology /Korea

2.3.11 10x PCR buffer (w/ 20mM MgCl_2)/ iNtRON Biotechnology /Korea

2.3.12 10x MgCl_2 free PCR buffer/ iNtRON Biotechnology /Korea

2.3.13 10mM dNTPs (2.5 mM each)/ iNtRON Biotechnology /Korea

2.3.14 25 mM MgCl_2 / iNtRON Biotechnology /Korea

2.3.15 100 bp DNA Ladder/invitrogen/USA

3. วิธีการทดลอง

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง

การประมาณตัวอย่างเพื่อสำรวจหา Genotyping ของ *Pfmsp1* ที่ตำแหน่ง block 2 ของเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทย ซึ่งมีความชุกของยีน *Pfmsp1* variation ประมาณร้อยละ 25 (P = 0.25) (Brockman, et al., 1999; Snounou, et al., 1999; Matsuo, et al., 2003)

$$\text{จากสูตร} \quad n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 P(1-P)}{e^2}$$

$$\text{กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% หรือ } \alpha = 0.05$$

$$Z_{\alpha/2} = 1.96$$

กำหนดให้ $e = 0.1$ (ยอมรับให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ 10%)

$$n = \frac{(1.96)^2 \times (0.25) \times (0.75)}{(0.1)^2}$$

$$= 72 \text{ ตัวอย่าง}$$

3.2 การเก็บตัวอย่าง

โดยเก็บจากห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล ในจังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดยะลา และจังหวัดแม่ฮ่องสอน โดยเก็บจากเลือดที่เจาะจากเส้นเลือดดำที่แขน ใส่สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA แล้วเก็บด้วยวิธี thick film, thin film อย่างละ 1 แผ่น และ หยดใส่ Whatman filter paper stirp ประมาณ 100 μ l จำนวน 2 แผ่น รวบรวมใส่ถุง Zip lock ใส่ในกล่องที่มีสารกันความชื้น และกันกระแทกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปราศจากความร้อน นำกลับมาทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

3.3 การทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 การย้อม blood smears ด้วย Giemsa stain

3.3.1.1 การเตรียม stock สี Giemsa

- 1) Giemsa powder
- 2) Glycerol
- 3) Absolute ethanol

วิธีการเตรียม

บด Giemsa powder ด้วยครกบดสี โดยเติม glycerol ในปริมาณเล็กน้อย แล้วค่อยๆ เติม giemsa และเติม glycerol ต่อไปโดยใช้ Giemsa 7.5 กรัม glycerol 250 ml บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นเติม Absolute ethanol 750 ml ล้างสีออกจากครกให้หมด เก็บใส่ขวดแล้วนำไปบ่มในตู้บอุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส เปิดจุกทิ้งไว้วันาน 2-3 วันจึงนำไปใช้ได้ ก่อนให้นำไปละลายใน Phosphate buffer โดยใช้ความเข้มข้นสี Giemsa 20%

3.3.1.2 การเตรียม Phosphate buffer pH 6.8

- 1) KH_2PO_4
- 2) Na_2HPO_4
- 3) Distilled water

วิธีการเตรียม

สารละลาย A ชั่ง KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml ละลายสาร B ชั่ง NaHPO_4 9.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml เวลาใช้ นำสารละลาย A 50.8 ml ผสมกับสารละลาย B 49.2 ml เขย่าให้เข้ากันจะได้ Phosphate buffer ที่มี pH ประมาณ 6.8

3.3.1.3 การเตรียม 20% Giemsa

โดยการนำ Phosphate buffer pH 6.8 มา 80 ml เติม Stock สี Giemsa 20 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำไปใช้ได้

3.3.1.4 ขั้นตอนการย้อมสี Giemsa

การย้อมสีฟิล์มเลือดชนิดบาง (Thin blood smear)

- 1) ทำการตรึงฟิล์มเลือดด้วย Absolute ethanol เป็นเวลา 30 นาที
- 2) เตรียมสีย้อมจาก Stock สี โดยใช้ PBS buffer pH 6.8 เป็นตัวเจือจาง เพื่อให้สารละลายมีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยใช้สี 20 ส่วน ใน PBS buffer 80 ส่วน ทำการผสมให้เข้ากัน สารละลายสีนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งเพื่อให้ได้คุณภาพการย้อมที่ดีที่สุด
- 3) นำสไลด์ที่ต้องการย้อมแช่ลงในภาชนะที่บรรจุสารละลายสีในข้อ 2 ที่ไว้ 40 นาที
- 4) ล้างสีส่วนเกินออกโดยใช้ประปาแล้วทิ้งให้แห้ง

การย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนา (Thick blood film)

คล้ายกับการย้อมฟิล์มเลือดชนิดบาง ยกเว้นไม่ต้องตรึงด้วย Absolute ethanol ในกรณีที่ต้องการลดเวลาการย้อมอาจเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายสี

3.3.1.5 การวินิจฉัยเชื้อ *P. falciparum* โดยวิธี Microscopic examination

รายงาน Negative เมื่อตรวจดูใน thick, thin blood film แล้วไม่พบเชื้อ

รายงาน Positive เมื่อตรวจดูใน thick, thin blood film แล้วพบเชื้อ

จากนั้นนับจำนวนของเชื้อมาลาเรียแล้วคำนวณเป็น Parasites per μl

3.3.1.6 การนับจำนวนของเชื้อมาลาเรีย (parasites per μl)

นับจำนวนเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง 100 เซลล์ (%) และคำนวณเพื่อรายงาน ผล เป็น Parasites/ μl ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{RBC 100 cells นับ parasite ได้} &= N \\
 \text{RBC } 5 \times 10^6 \text{ cell นับ parasite ได้} &= \frac{N \times 5 \times 10^6 / \mu\text{l}}{100} \\
 &= N \times 5 \times 10^4 / \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

(Kirsten, et.al, 2008)

3.3.2 การสกัด DNA จากกระดาศกรองโดยวิธี Chelex extraction (Kirsten, et.al, 2008)

3.3.2.1 นำ Whatman filter paper strip 2 strip ตัดเป็นชิ้นเล็กใส่ใน microtube

3.3.2.2 เติม DW sterile 300 μl พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไป Mix 30

วินาที

3.3.2.3 คูดส่วนใส 300 μl ใส่ใน microtube ที่มี DW sterile 1,000 μl

3.3.2.4 พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไป Mix 30 วินาที

3.3.2.5 นำไปปั่น 12,000 rpm 3 นาที คูดส่วนใสทิ้ง 1,000 μl และเก็บตะกอนไว้

3.3.2.6 นำตะกอนที่ได้ มาเติม Chelex 150 μl นำไป Incubate 56°C นาที แล้วนำไป

Vortex mix 10 วินาที

3.3.2.7 นำไปต้มในหม้อเดือด (100°C) 8 นาที นำไป Vortex mix 10 วินาที

3.3.2.8 นำไปปั่น 12,000 rpm 3 นาที คูดส่วนใสไว้ เก็บไว้ที่ -20°C

3.3.3 น้ำยาและสารเคมีสำหรับการทำ PCR-HMA

1. Tris-Borate-EDTA (TBE, 10x)

ละลาย Tris base 108 กรัม, Boric acid 55 กรัม และ EDTA 9.3 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร เก็บสารเคมีที่เตรียมได้ในอุณหภูมิห้อง

2. Tris-HCl (1M, pH 7.4)

ละลาย Tris base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 7.4 โดยเติม Conc.HCl 70 ml และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำสารเคมีที่ได้ไป autoclave และเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง

3. Annealing buffer (10x)

ละลาย NaCl 0.584 กรัม ในน้ำกลั่น 5 ml เติม Tris-Cl (1M, pH 7.4) ลงไป 1 ml เติม EDTA (0.5M pH 8.0) 0.4 ml ลงไป จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 ml โดยน้ำกลั่น

4. DNA loading Buffer (6x)

0.25% (w/v) Bromphenol Blue

0.25% (w/v) Xylene Cyanol FF

30% (v/v) Glycerol in H₂O

เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 °C

5. Ethidium Bromide Stock Solution (10 mg/ml)

ละลาย ethidium bromide 100 mg ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 ml ทำการเจือจางเป็น 0.5 µg/ml เมื่อต้องการใช้ และปิดภาชนะที่ใส่ ethidium bromide ที่เตรียมได้ในอุณหภูมิ 4°C

6. Polyacrylamide gel solution (12% T) Total 5 ml

30% (w/v) Acrylamide: 0.8% (w/v) Bis-Acrylamode	1.60	ml
(10x) TBE buffer	0.50	ml
Distilled water	2.90	ml
25% ammonium persulphate (freshly prepared)	14.0	µl
TEMED	1.75	µl

3.3.4 การตรวจหา genotype ของยีนคือยีน *Pfmdr1* ตำแหน่งที่ codon 86 และยีน *Pfprt* ที่ตำแหน่ง codon 76 โดยวิธี Multiplex nested PCR (Maria, et.al, 2006)

Multiplex Nested PCR เป็นการเพิ่มจำนวน *Pfmdr1* gene และ *Pfprt* gene ในหลอดเดียวกัน โดยทำปฏิกิริยา 2 ครั้ง เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะ

1.) การทำ PCR ครั้งที่ 1 ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวน gene รอบนอก โดยใช้ primer 2 คู่ โดยการเติมน้ำยาต่างๆ ตามในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ Multiplex Nested PCR ครั้งที่ 1

Reagents	Final concentration	Final volume (25µl)
PCR Buffer(10x)	1x	2.0 µl
DNA template		3.0 µl
C1Fw (10µM)	1.2 µM	3.0 µl
C1Rew (10µM)		
M1Fw (10µM)	0.8 µM	2.0 µl
M1Rev(10µM)		
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ µl)	1.4 U	7.0 µl
dNTPs (2mM)	0.4 mM	5.0 µl
MgCl ₂ (25mM)	2.5 mM	2.5 µl
DW		0.5 µl

(Maria, et al., 2006)

PCR cycle condition

Initial Denaturation, 94°C 3 min

Amplification 45 cycles

Denaturation at 94°C, 30 sec

Annealing at 56°C, 30 sec

Extention at 60°C, 30 sec

Final extension at 60°C 3 min

PCR Primer sequence (Maria, et al., 2006)

Pfprt K76T

C1Fw 5' ATTCGTACCAATTCCTGAACT 3'

C1Rev 5' CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC 3'

Pfmdr1 N86Y

M1Fw 5' AAGAGGTTGAAAAGAGTTGAAC 3'

M1Rev 5' CCGTTAATAATAAATACACGCAG 3'

2.) การทำ PCR ครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนเฉพาะ gene เป้าหมาย (*Pfmdr1* gene และ *Pfprt* gene) โดยการเติมน้ำยาต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 2.2 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ Multiplex Nested PCR ครั้งที่ 2

Reagent	Final concentration	Final volume (25µl)
PCR Buffer (10x)	1x	2.0 µl
DNA template (1 st Amplification)		2.0 µl
C2Fw (10µM)	1.2 µM	3.0 µl
C2Rev (10µM)		
} Primer <i>pfprt</i>		
M2Fw (10µM)	0.6 µM	1.5 µl
M2Rev (10µM)		
} Primer <i>pfmdr1</i>		
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/µl)	1.4 U	7.0 µl
dNTPs (2mM)	0.4 mM	5.0 µl
MgCl ₂ (25mM)	2.5 mM	2.5 µl
DW		2.0 µl

(Maria, et.al., 2006)

PCR cycle condition

Initial Denaturation, 94°C 3 min

Amplification 40 cycles

Denaturation at 94°C, 30 sec

Annealing at 47°C, 30 sec

Extention at 68°C, 30 sec

Final extension at 64°C 3 min

PCR Primer sequence (Maria, et al., 2006)

Pfprt K76T

C2Fw 5' TGTGCTCATGTCTTTAAACTT 3'

C2Rev 5' CAAAACATATAGTTTACCAATTTTG 3'

Pfmdr1 N86Y

M2Fw 5' AGAGTACCGCTGAATTATTTAG 3'

M2Rev 5' CCTGAACTCACTTGTCTAAAT 3'

3.3.5 การศึกษา genotype ของ *Pfmdr1* 86 และ *Pfprt* 76 โดยวิธี RFLP

วิธี RFLP เป็นการนำ PCR product ของยีน *Pfmdr1* และยีน *Pfprt* มาตัดด้วย Enzyme ApoI โดยใช้ น้ำยาและสารเคมีในการทำ RFLP analysis ดังนี้

ตารางที่ 2.3 ตารางน้ำยาและสารเคมีในการทำ RFLP

Reagent	Final volume(30µl)
Water nuclease free (DW sterile)	8.5µl
10X Fast Digest Buffer	1.0µl
Fast Digest Enzyme	1.0µl
<i>Pfmdr1/pfprt</i> multiplex PCR product	7.0µl

(Pacific Science Co., LTD/Thailand)

Incubate ที่ 37°C 5 นาที

Incubate ที่ 80°C 5 นาที

ทำ Gel electrophoresis

Enzyme ApoI ตัดตำแหน่งที่จำเพาะของ DNA ที่มีลำดับเบสดังแสดง

5'...R|AATTY...3'

3'...YTTAA|R...5' (ลำดับเบสที่เป็น restriction site ของยีน *Pfmdr1* 86 และยีน *Pfcr1* 76 แสดงในภาคผนวก)

3.3.5.1 การวิเคราะห์ PCR product โดย Agarose gel electrophoresis (Maria, et.al., 2006)

1.) เตรียม 5X TBS

1.1 Tris Base	27	g
1.2 Boric Acid	13.75	g
1.3 0.5 M EDTA	0.37	g
1.4 Distilled water	400	ml

2.) เตรียม 1X TBS 500 ml

2.1 บีเปิด 5X TBS	100	ml
2.2 Distilled water	400	ml

3.) Run gel electrophoresis

- 3.1 ละลายผง Agarose ให้มีความเข้มข้น 2% ใน 100 ml 1X TBS buffer
- 3.2 นำไปหลอมในเตาไมโครเวฟจนวุ้นละลาย (ประมาณ 2 นาที)
- 3.3 จากนั้นรอให้เย็น จึงเทสารที่ได้ลงใน sample comb และปล่อยให้เย็นตามอุณหภูมิห้อง หลังจากที่เจลแข็งตัว เจลอยู่ในลักษณะที่คล้ายพลาสติก
- 3.4 ค้างซีหรือออก และย้ายเจลลงใน Chamber ที่เติม 1X TBS ท่วม gel
- 3.5 เตรียมตัวอย่าง DNA โดยผสมสารตัวอย่างกับ Loading dye ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิล์ม และทำการ load ลงใน well ที่เตรียมไว้
- 3.6 ปิดฝา Chamber แล้วต่อสายไฟให้ด้านของตัวอย่างอยู่ด้านขั้วลบ เนื่องจาก DNA จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกประมาณ 25 นาที
- 3.7 เสร็จแล้วเอาแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย Ethidium bromide ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
- 3.8 นำแผ่นเจลไปวางบนกล่องที่แสงอัลตราไวโอเล็ต จะเห็นแถบ DNAเรืองแสงใต้เครื่อง UV transilluminator บันทึกภาพไว้ศึกษาต่อ

3.3.5.2 การอ่านผล Multiplex Nested PCR-RFLP

หลังจากทำ Nested PCR ทั้ง 2 รอบแล้ว จะได้ยีน *Pfmdr1* ซึ่งมีขนาด 418 bp และยีน *Pfcr1* ซึ่งมีขนาด 145 bp จากนั้นใช้ enzyme ApoI ในการตัดยีน *Pfmdr1* และยีน *Pfcr1*

Enzyme ApoI จะตัดยีน *Pfmdr1* 86 และ *Pfprt* 76 ที่ไม่มี mutation (wild type) PCR product จะถูกตัดเป็น 2 ท่อน จะเห็น DNA 2 band คือ ขนาด 239 bp และ 179 bp (*Pfmdr1* 86) และขนาด 98 bp และ 47 bp (*Pfprt* 76) ถ้ายีน *Pfmdr1* 86 และ *Pfprt* 76 ที่มีการเกิด mutation Enzyme ApoI จะไม่สามารถตัด gene ทั้งสองได้ จึงเห็น DNA 1 band เท่านั้น

3.3.6 การตรวจหายีน *Pfmsp1* ที่ตำแหน่ง block 2 โดยวิธี Nested PCR

เป็นการเพิ่มจำนวน gene *Pfmsp1* 2 รอบ โดยใช้ primer 2 คู่ ใช้ primer คู่แรกเพื่อเพิ่ม gene *Pfmsp1* ใน block 1-block 4 และใช้ primer คู่ที่สองเพื่อเพิ่ม gene *Pfmsp1* ใน block 2 ซึ่งเป็น block ที่มีการผันแปรมากที่สุด

ตารางที่ 2.4 แสดงน้ำยาและสารเคมีในการทำ Nested PCR ครั้งที่ 1

Reagent	Final concentration	Final volume (20 μ l)
(10x) PCR Buffer containing 15 mM MgCl ₂	1X	10 μ l
(10 nM) dNTPs	125 μ M	1.25 μ l
Forward Primer (5.0 uM, M1-OF)	250 μ M	5 μ l
Reverse Primer (4.18 uM, M1-OR)	250 μ M	6 μ l
DW		70.35 μ l
(5U/ μ l) DNA polymerase	0.4 / 20 μ l rxn	0.4 μ l
DNA template		1 μ l

(Snounou, et al., 1999)

PCR cycle condition

Initial Denaturation, 95°C 15 min

Amplification 25 cycles

Denaturation at 94°C 1 min

Annealing at 58°C 2 min

Extention at 72°C 1 min

Final extension at 72°C 2 min

PCR Primer Sequence (Snounou, et al., 1999)

*m*sp1 gene

M1-OF 5' CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG 3'

M1-OR 5' CTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA 3'

ตารางที่ 2.5 แสดงน้ำยาและสารเคมีในการทำ Nested PCR ครั้งที่ 2 (Snounou, et al., 1999)

Reagent	Final concentration	Final volume (20µl)
(10x) PCR Buffer containing 15 mM MgCl ₂	1X	10 µl
(10 mM) dNTPs	125 µM	1.25 µl
Forward Primer (7.93 uM, C1F)	250 µM	5 µl
Reverse Primer (6.73 uM, C3R)	250 µM	6 µl
DW		70.35 µl
(5U/ul) DNA polymerase	0.4 / 20 µl rxn	0.4 µl
DNA template		1 µl

PCR cycle condition

Initial Denaturation , 95°C 15 min

Amplification 24 cycles

Denaturation at, 94°C 1 min

Annealing at 50°C, 2 min

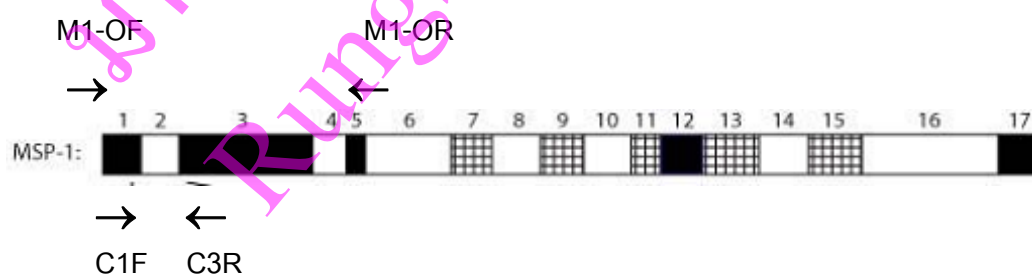
Extention at 72°C, 2 min

Final extension at, 72°C 2 min

PCR Primer Sequence (Ngermngarmlet, et al., 2005)

C1-F 5' GAAGATGCAGTATTGACAGG 3'

C3-R 3' TGATTGGTTAAATCAAAGAG 5'



3.3.6.1 การอ่านผล

นำ PCR product รอบ 2 ไป run 1.8% agarose gel (วิธีทำหน้า 40) จะได้ band ขนาด ระหว่าง 300-400 bp ของ *Pfmsp1* gene

3.3.7 การทำ genetic diversity โดย Nested PCR-HMA

เป็นการอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของ DNA สายคู่ ซึ่งการเคลื่อนที่ของสาย DNA สายคู่จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความแตกต่างของลำดับเบสที่มีการเข้าคู่กัน และแสดงผลการเคลื่อนที่ของ DNA โดยนำไป run ใน polyacrylamide gel และทำการย้อมด้วย Ethidium bromide เพื่ออ่านผลต่อไป (Ngerngarmert, et al., 2005)

3.3.7.1 Known Sequence Control (Recombinant clones) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *Pfmsp1* family MAD20 โดยได้จากการ cloning ของ insert specific base sequence ใน plasmid DNA และสกัด plasmid DNA นำมาเป็น reference DNA (Ngerngarmert, et al., 2005)

3.3.7.2 K1 Control (K1 culture) เชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์เดี่ยวบริสุทธิ์ (K1) ที่ได้จากการ culture เป็น control ในการตรวจสอบการเกิด heteroduplex กับ reference DNA สายพันธุ์ MAD20

Known Sequence Control (Recombinant clones) (Ngerngarmert, et al., 2005)

(MAD20 family)

```
AF22 : GAAGATGCAGTATTGACAGGTTATAGTTTTATTTCAAAGGAAAAATGGT: 50
      ATTAAATGAAGGAACAAGTGGAAACAGCTGTTACAACACTAGTACACCTGGTT: 100
      CAGGTGGTTCAGTTACTTCAGGTGGTTCAGTTACTTCAGGTGGTTCAGGT: 150
      GGTTCAGTTGCTTCAGTTGCTTCAGTTGCTTCAGTTGCTTCAGGTGGTTC: 200
      AGGTAATTCAGGACGTACAAATCCTTCAGATAATTCAAGTGATTCAGATG: 250
      CTAAATCTACGCTGATTTAAAACATAGAGTTCAAATTACTTGTTCACT: 300
      ATTAAAGAACTCAAATATCCCGAACTCTTTGATTTACCCAATCA : 344
```

(K1 family)

```
AF63 : GAAGATGCAGTATTGACAGGTTATGGTTTTATTTATAAGGAAAAATGAT : 50
      CTTAAATGAAGAAGAAATTAATAAAGGTGCAAGTGCTCAAAGTGGTA : 100
      CAAGTGGTACAAGTGGTACAAGTGGTACAAGTGGTCCAAGTGGTCCAAGT : 150
      GGTACAAGTCCATCATCTCGTTCAAACACTTTACCTCGTTCAAATACTTC : 200
      ATCTGGTGCAAGCCCTCCAGCTGATGCAAGCGATTTCAGATGCTAAATCTT : 250
      ACGCTGATTTAAAACACAGAGTACGAAATTACTTGTTCACTATTAAGAA : 300
      CTCAAATATCCCGAACTCTTTGATTTACCCAATCA: 335
```

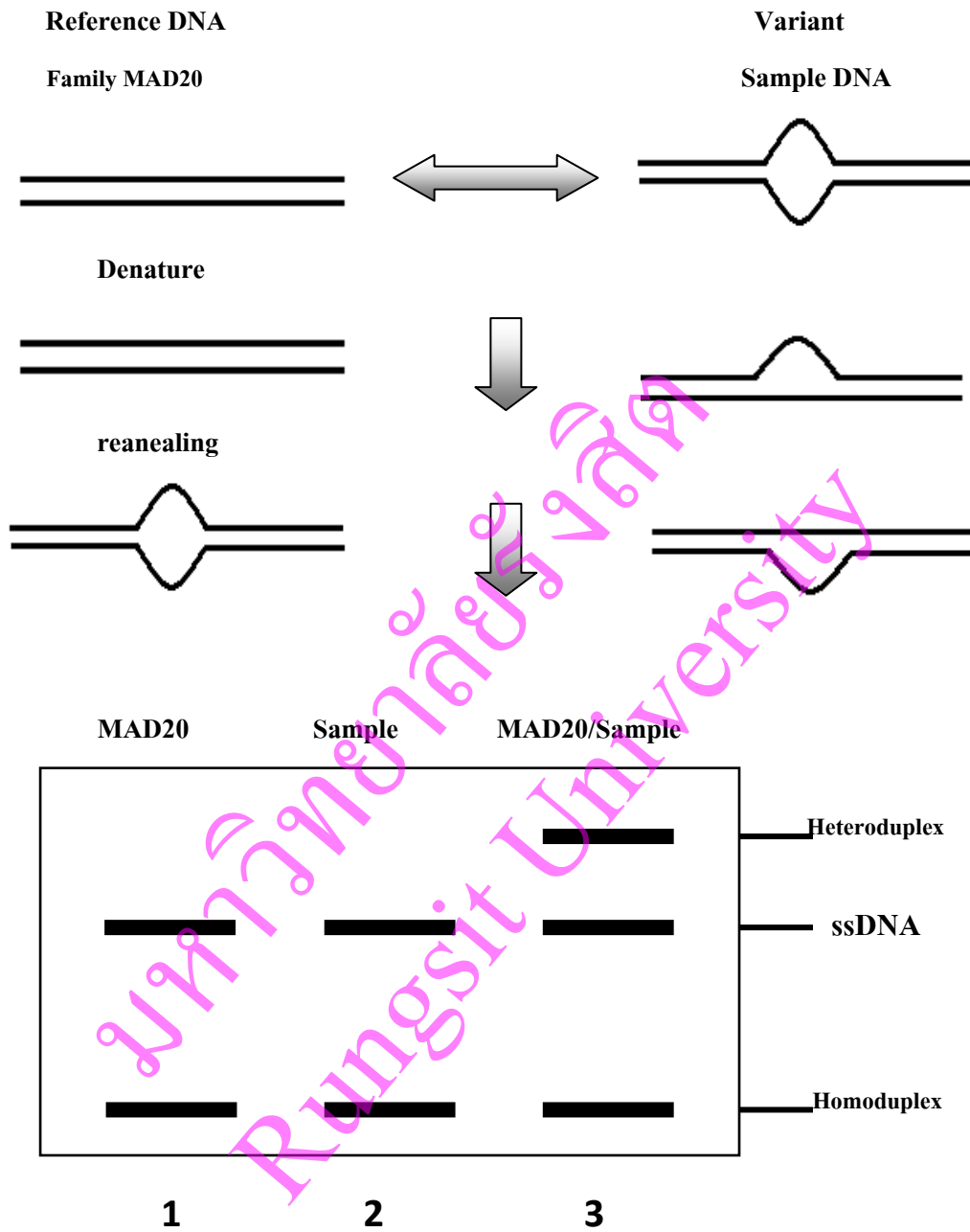
3.3.8 วิธีทำ Nested PCR-HMA

นำ PCR product รอบที่ 2 มาทำปฏิกิริยาการเข้าคู่กันกับ reference DNA สายพันธุ์ MAD20 โดยใส่น้ำยาและสารเคมี ดังตารางที่ 2.6 โดยใช้ปริมาตรเท่ากัน 2 แบบคือ อย่างละ 2 μ l และ 5 μ l โดยให้เกิด denature ที่ 98° C 3 นาที และ 5 นาที ใช้สภาวะ reannealing ที่อุณหภูมิ 4 °C นานอย่างน้อย 15 นาที และนำไป run polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6%, 8% และ 12% โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 10 mA

ตารางที่ 2.6 น้ำยาและสารเคมีในการทำ PCR-HMA (Ngerngarmert, et al., 2005)

Reagent	Final volume (12 μ l)
PCR product containing the block-2 of <i>Pfmsp1</i> ซึ่งมีขนาดระหว่าง 300-400 bp	5 μ l
10X Annealing Buffer	1 μ l
Reference DNA ที่จำเพาะต่อ MAD20	5 μ l
DNA loading Buffer (6X)	1 μ l

ตัวอย่างการแปลผลการทำ HMA



รูปที่ 2.1 แสดงการอ่านผลการเคลื่อนที่ของ Homoduplex และ Heteroduplex

การอ่านผล HMA

หลังจากนำ PCR Product ที่ได้จาก sample ต่างๆ หรือ DNA target ทำปฏิกิริยากับ reference DNA สายพันธุ์ MAD20 แล้วนำไปย้อมด้วย Ethidium bromide จากนั้นตรวจสอบ band ของ DNA โดยใช้เครื่อง UV Translumination อ่านผล band ของ DNA เทียบกับ band ของ reference DNA (MAD20) ตัวอย่างเช่น lane ที่ 1 จะเห็น homoduplex ของ MAD20 เพียง band เดียว ส่วน lane ที่ 2 เป็น sample เพียงอย่างเดียว และ lane ที่ 3 เป็น sample ที่ผสมกับ reference DNA จะเห็นว่าพบแถบของ heteroduplex 1 band ที่ lane ที่ 1 และ 2 และพบ 2 band ใน lane ที่ 3 ในกรณีที่เชื่อ mismatch กับ reference DNA กับ MAD20 จะเป็น heteroduplex จะเห็นการเคลื่อนที่ช้ากว่า homoduplex ที่เกิดจาก complete match เล็กน้อย แสดงว่าเชื่อในตัวอย่างนี้อาจมี ลำดับเบสที่ต่างไปจากสายพันธุ์ที่ใช้เป็น reference DNA (รูปที่ 2.1) จากนั้นทำการนับจำนวน band แล้วจะทำการวัดการเคลื่อนที่ของ homoduplex และ heteroduplex เพื่อคำนวณหาค่า Mobility index (MI) เพื่อวิเคราะห์ genetic diversity ต่อไป

$$\text{Mobility index (MI)} = \frac{\text{ระยะจากด้านล่างของหลุมถึงกึ่งกลางของแถบ Heteroduplex}}{\text{ระยะจากด้านล่างของหลุมถึงกึ่งกลางของแถบ Homoduplex}}$$

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ศึกษาความหลากหลายของ *Pfmsp1* gene ของเชื้อ *P. falciparum* กับความชุกของยีนคือ *Pfmdr1* 86 และ *Pfprt* 76 โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา เช่น ค่าเฉลี่ย ร้อยละ
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของ parasitemia กับสายพันธุ์ของเชื้อ โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test
3. ศึกษาความสัมพันธ์ของ parasitemia โดยแยกตามภูมิภาค และ allele variation โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis Test และ Mann-Whitney U test
4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ หรือ Multiplicity of infection (MOI) กับการติดเชื้อในแต่ละภูมิภาค โดยใช้สถิติ Fisher's exact test
5. กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา genetic diversity ของเชื้อ *P. falciparum* โดยศึกษาความหลากหลายของ *Pfmsp1* gene ด้วยวิธี Nested PCR-HMA ซึ่งจะทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดเพื่อ amplify *Pfmsp1* gene ด้วยวิธี Nested PCR จากนั้นนำ PCR product ไปตรวจ genetic diversity ด้วยวิธี Heteroduplex Mobility Assay (HMA) ที่ได้พัฒนาขึ้น ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้รับตัวอย่างตรวจจากเลือดที่เก็บด้วยวิธี thick film, thin film และ Whatman filter paper strip โดยการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 79 ตัวอย่างจาก 4 จังหวัดใน 3 ภูมิภาค คือภาคเหนือ (จังหวัดแม่ฮ่องสอน), ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี) และภาคใต้ (จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดยะลา) การเก็บตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553

1. ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างตรวจ

จากตารางที่ 3.1 แสดงข้อมูลจำนวนตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด 79 ตัวอย่าง โดยได้รับตัวอย่างตรวจจากภาคตะวันตกมากที่สุด คือ 51 ตัวอย่าง (64.60%) จากภาคใต้ 17 ตัวอย่าง (21.50%) และภาคเหนือน้อยที่สุด คือ 11 ตัวอย่าง (13.90%) ในจำนวนตัวอย่างตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เป็นผู้ป่วยที่มีสัญชาติไทยมากที่สุดจำนวน 61 ราย (77.22%) รองลงมาคือ สัญชาติกะเหรี่ยง จำนวน 10 ราย (12.66%), สัญชาติพม่าจำนวน 5 ราย (6.33%) และสัญชาติลาวกับสัญชาติมอญรวมแล้วจำนวน 3 ราย ตามลำดับ

การศึกษานี้ได้นำตัวอย่าง thick และ thin blood film ทั้งหมดมาทำการย้อมด้วยสี Giemsa จากนั้นทำการตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อ *P. falciparum* และนับจำนวน parasitemia รายงานเป็น parasite/ μ l จากตารางที่ 3.2 พบว่าจำนวนตัวอย่างตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่าง เมื่อคำนวณ parasitemia เฉลี่ย โดยคำนวณค่า median พบว่าภาคเหนือมีค่าเฉลี่ยของ parasitemia สูงที่สุดคือ 33.75×10^3 parasite/ μ l รองลงมาเป็นภาคตะวันตกคือ 25.00×10^3 parasite/ μ l ตามลำดับ ส่วนภาคใต้มีค่า parasitemia ต่ำที่สุด คือ 17.50×10^3 parasite/ μ l โดยรวมทั้งหมด 79 ตัวอย่างพบว่ามีความแตกต่างค่า parasitemia เฉลี่ยเท่ากับ 23.75×10^3 parasite/ μ l ค่าสูงสุดเท่ากับ 128.22×10^3 parasite/ μ l และค่า parasitemia ต่ำสุดเท่ากับ 2.50×10^3 parasite/ μ l โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 11.26×10^3 parasite/ μ l จากการทดสอบทางสถิติ (Kruskal-Wallis Test) พบว่าค่า parasitemia ในแต่ละภูมิภาคไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3.1 แสดงข้อมูลทั่วไปตัวอย่างตรวจแยกตามภูมิภาค

สัญชาติ	ภูมิภาคที่สำรวจ N, (%)					รวม
	North	West	South			
	แม่ฮ่องสอน	กาญจนบุรี	สุราษฎร์ธานี	ยะลา	รวม	
ไทย	11, (100.00)	34, (66.70)	7, (87.50)	9, (100)	16, (94.12)	61, (77.22)
กะเหรี่ยง	0, (0.00)	10, (19.60)	0, (0.00)	0, (0.00)	0, (0.00)	10, (12.66)
พม่า	0, (0.00)	4, (7.80)	1, (12.50)	0, (0.00)	1, (5.88)	5, (6.33)
ลาว	0, (0.00)	1, (2.00)	0, (0.00)	0, (0.00)	0, (0.00)	1, (1.27)
มอญ	0, (0.00)	2, (3.90)	0, (0.00)	0, (0.00)	0, (0.00)	2, (2.53)
รวม	11, (13.90)	51, (64.60)	8, (10.10)	9, (11.40)	17, (21.50)	79, (100)

ตารางที่ 3.2 แสดงตัวอย่างตรวจแยกตามความหนาแน่นของ parasitemia (parasite/ μ l) โดยแบ่งตามภูมิภาค

ข้อมูลตัวอย่างตรวจ	ภูมิภาคที่สำรวจ			รวม	P-value
	North	West	South		
จำนวนตัวอย่างตรวจ N, (%)	11, (13.9)	51, (64.6)	17, (21.5)	79, (100)	
ค่า parasitemia เหนือ (parasite/ μ l $\times 10^3$)	33.75	25.00	17.50	23.75	0.058
ค่า parasitemia สูงสุด (parasite/ μ l $\times 10^3$)	40.38	79.75	8.50	79.75	
ค่า parasitemia ต่ำสุด (parasite/ μ l $\times 10^3$)	10.00	2.50	7.50	2.50	
SD (parasite/ μ l $\times 10^3$)	11.53	12.82	1.99	11.26	

หมายเหตุ ค่า parasitemia เหนือ ที่แสดงเป็นค่า median

จากการจัดกลุ่มตามระดับความหนาแน่นของ parasitemia เป็น 3 ระดับคือ ระดับต่ำ (<10,000 parasite/ μ l), ระดับกลาง (10,000-100,000 parasite/ μ l) และ ระดับสูง (>100,000 parasite/ μ l), โดยแยกตามภูมิภาค ดังแสดงในตารางที่ 3.3 พบว่าตัวอย่างตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่มีค่า parasitemia อยู่ในระดับกลาง คือจำนวน 55 ตัวอย่าง (69.62%) และในทุกภูมิภาค พบว่าส่วนใหญ่มีค่า parasitemia อยู่ในระดับกลาง คิดเป็น 63.64%, 68.62% และ 76.47% ในภาคเหนือ, ภาคตะวันตก และภาคใต้ ตามลำดับ ในภาคเหนือพบผู้ติดเชื้อที่มีค่า parasitemia ใน

ระดับต่ำเพียง 1 ราย (9.09%) ในขณะที่ในภาคใต้มีผู้ติดเชื้อที่ติดเชื้อในระดับต่ำจำนวนมากคือ 4 ราย (23.25%) และไม่พบผู้ติดเชื้อที่มี parasitemia ในระดับสูง

ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนตัวอย่างตรวจ จัดกลุ่มตามระดับความหนาแน่นของ parasitemia

Parasitemia (parasite/ μ l)	จำนวนตัวอย่างตรวจของภูมิภาคที่สำรวจ N, (%)			รวม N, (%)
	North	West	South	
< 10,000 (Low)	1, (9.09)	8, (15.69)	4, (23.53)	13, (16.46)
10,000 - 100,000 (Medium)	7, (63.64)	35, (68.62)	13, (76.47)	55, (69.62)
> 100,000 (High)	3, (27.27)	8, (15.69)	0, (0.00)	11, (13.92)
รวม	11, (100.00)	51, (100.00)	17, (100.00)	79, (100.00)

2. การพัฒนาวิธี Nested PCR-HMA

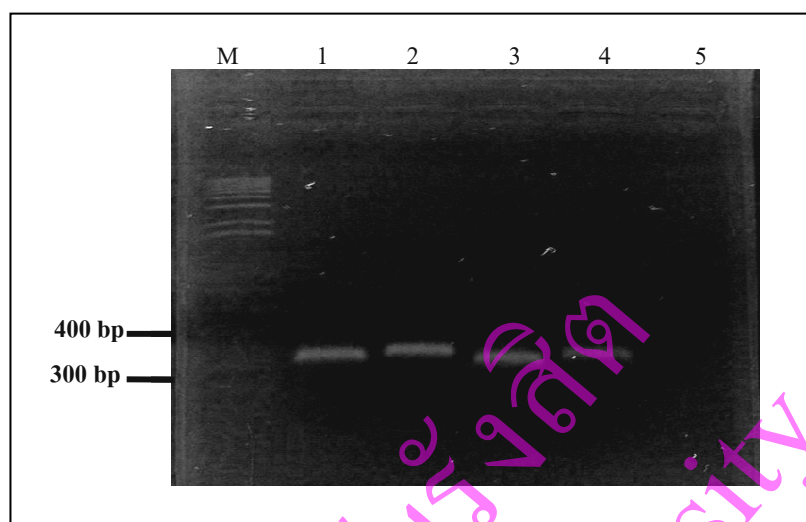
2.1 ผลการ amplify *Pfmsp1* gene โดยวิธี Nested PCR

การศึกษา *Pfmsp1* gene ทำการเก็บตัวอย่างเลือดด้วยวิธี Whatman filter paper strip จากตัวอย่างตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่าง ทำการสกัด DNA โดยวิธี Chelex (Kirsten, et al., 2008) จากนั้นนำ DNA มาทำ Nested PCR โดย amplify *Pfmsp1* gene ในตำแหน่ง block 2 (Snounou, et al., 1999) และติดตามผล PCR product โดยการทำให้ 1.8% agarose gel electrophoresis ซึ่งจะได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 300-400 bp จากการศึกษารุ่นนี้พบว่า ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เมื่อทำ Nested PCR จะได้ PCR product ที่มี *Pfmsp1* gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 300-400 bp ครบทั้ง 79 ตัวอย่าง จึงประสบความสำเร็จในการ amplify *Pfmsp1* gene คิดเป็น 100% และพบว่าวิธีนี้สามารถ amplify gene จากตัวอย่างเลือดที่มี parasitemia ต่ำที่สุดคือ 2.5×10^3 parasite/ μ l (หรือเท่ากับ 0.05% infected RBC)

เนื่องจาก *Pfmsp1* gene บริเวณ block 2 มีความผันแปรของลำดับเบสสูง จึงทำให้มีขนาดของ PCR product ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถตรวจหา genetic variation ได้หลากหลาย ซึ่งจากทั้งหมด 79 ตัวอย่าง พบว่าสามารถสังเกตความต่างของ band ใน 3 ตำแหน่งเท่านั้นและอยู่ระหว่าง 300-400 bp ดังแสดงในรูปที่ 3.1

ข้อจำกัดนี้เกิดเนื่องจากการติดตามผล PCR product โดยการทำให้ agarose gel electrophoresis ศึกษาได้เฉพาะขนาดของ DNA เท่านั้น และขนาดของ DNA ที่มีจำนวนเบสต่างกันเล็กน้อยเช่น 1-5 bases จะแยกความแตกต่างของตำแหน่งของ band ไม่ได้ รวมทั้งหากมีลำดับของเบสแตกต่างกันแต่

จำนวนเบสเท่ากันก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้เช่นกัน จึงได้นำ PCR product ดังกล่าวไปศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ด้วยวิธี HMA ที่ได้พัฒนาขึ้น



รูปที่ 3.1 แสดงผล PCR product ของ *Pfmsp1* gene โดยวิธี Nested PCR

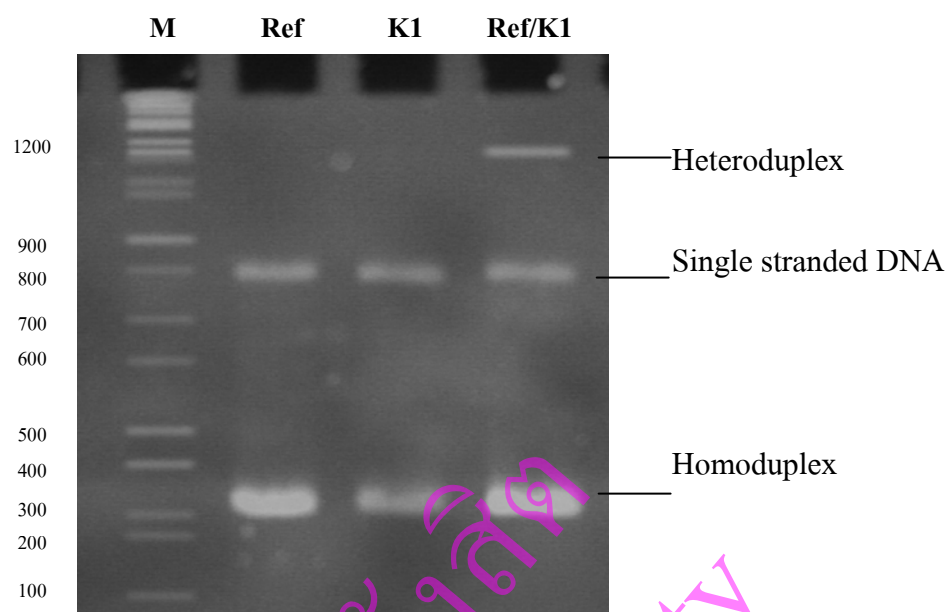
M คือ DNA marker (100 bp)

Lane ที่ 1-4 คือ ตัวอย่างตรวจที่พบ *Pfmsp1* gene

Lane ที่ 5 คือ Negative control (ใส่ DW แทน DNA template)

2.2 การหาสถานะเหมาะสมของวิธี HMA

ในการทำ HMA ครั้งนี้ได้เลือก *Pfmsp1* gene ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ MAD20 เป็น reference DNA ซึ่งมีขนาด 344 bp (ลำดับเบสแสดงในหน้าที่ 43) โดย reference DNA ได้จากการ insert specific base sequence clone ใน plasmid DNA ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วารุณี เงินงามเลิศ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล และเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์เดี่ยวบริสุทธิ์ (K1) ที่ได้จากการ culture เป็น control ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เมื่อทำการสกัด DNA แล้ว นำ DNA ของ reference DNA (Ref.) สายพันธุ์ MAD20 และ K1 มา amplify *Pfmsp1* gene โดยวิธี Nested PCR จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาเข้าคู่กันโดยวิธี HMA โดยใช้ปริมาตรเท่ากัน 2 แบบคือ อย่างละ 2 μ l และ 5 μ l โดยให้เกิด denature ที่ 98° C 3 นาที และ 5 นาที ใช้สภาวะ reannealing ที่อุณหภูมิ 4°C นานอย่างน้อย 15 นาที และนำไป run polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6%, 8% และ 12% โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 10 mA



รูปที่ 3.2 แสดงผล Heteroduplex Mobility assay (HMA) พบ heteroduplex ระหว่าง สายพันธุ์ MAD20 (Ref) กับสายพันธุ์ K1 ที่ได้จากการ culture โดยใช้ 12% polyacrymide gel และใช้ กระแสไฟฟ้า 10 mA ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที

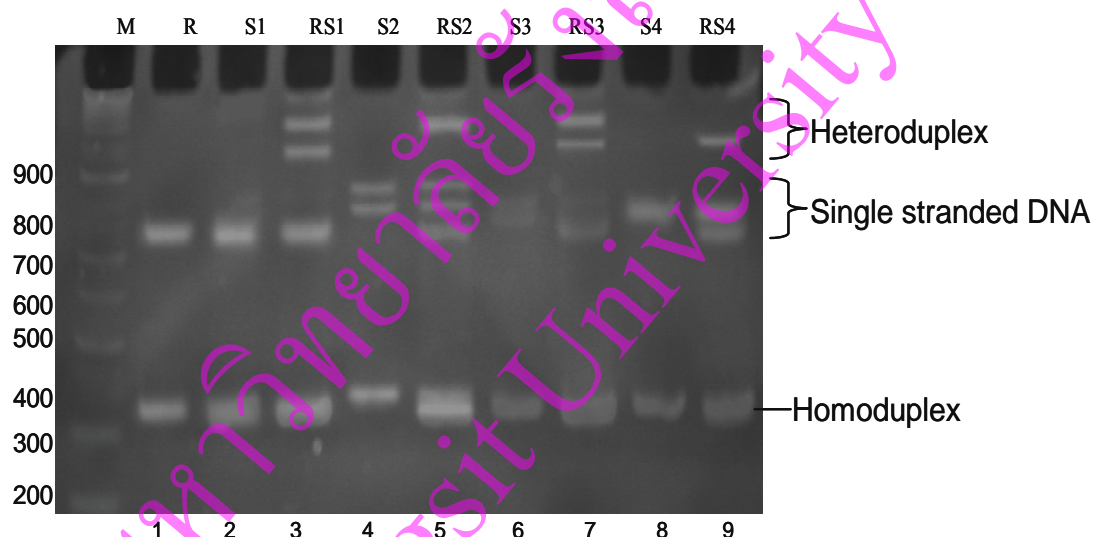
ผลการทดลองพบว่า reference DNA และ *P. falciparum* สายพันธุ์ K1 เกิด heteroduplex band ให้เห็น 1 band (รูปที่ 3.2) แสดงถึงความถูกต้องของวิธี HMA ในการตรวจเชื้อ control 1 สายพันธุ์ที่มีลำดับเบสแตกต่างจาก reference DNA และเกิด homoduplex เพียง 1 band ไม่พบ heteroduplex band ใน lane Ref และ lane K1 ซึ่งเป็นการใส่ DNA ของเชื้อเพียงชนิดเดียวในแต่ละ lane ดังกล่าว และจากการทดสอบพบว่า จะเกิด heteroduplex band ได้ชัดที่สุดเมื่อใช้ปริมาณของ reference และ K1 PCR product อย่างละ 5 μ l ใช้เวลา denature 3 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3.2 (ใช้เวลา 5 นาที ได้ผลเช่นเดียวกัน) ใช้ 12% polyacrylamide gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 10 mA และใช้เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที (ผลการทดลองในสถานะอื่นๆ แสดงในภาคผนวก)

2.3 การอ่านผล Genetic diversity ของ *Pfmsp1* gene โดย Heteroduplex Mobility assay (HMA) ซึ่งใช้ reference DNA สายพันธุ์ MAD20

จากรูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของ band ที่เกิดขึ้น 3 แบบ คือ homoduplex คือ band ที่เคลื่อนที่เร็วที่สุดเกิดจากการเข้าคู่กันของ reference DNA เอง หรือ DNA ของตัวอย่างตรวจเอง hetroduplex คือ band ที่เคลื่อนที่ช้าที่สุดเกิดจากการเข้าคู่กันระหว่าง reference DNA กับ DNA ของตัวอย่างตรวจ และ single stranded DNA ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอน reannealing ที่มีการเข้าคู่กันอย่าง

อิสระของ reference DNA กับ DNA ของตัวอย่างตรวจโดยการลดอุณหภูมิ ทำให้เหลือ DNA สายเดี่ยวบางส่วนไม่ได้กลับเข้าคู่จึงเหลือเป็น band ของ single stranded DNA

จากการใช้ reference DNA นำมาทำ HMA ใน lane R จะใส่ reference DNA เพียงอย่างเดียว เป็น control reference DNA ใน lane S1 ใส่ตัวอย่างตรวจ S1 เพียงอย่างเดียวเป็น control ตัวอย่างตรวจ S1 ส่วน lane RS1 ใส่ reference DNA และตัวอย่างตรวจผสมกัน เมื่อ run polyacrymide gel อ่านผลโดยเทียบกับ lane ที่ 1 และ lane ที่ 2 ซึ่งจะเห็น band ของ heteroduplex 2 bands เกิดขึ้น ส่วนตัวอย่างตรวจ S2 เห็น band ของ heteroduplex 1 band, ตัวอย่างตรวจ S3 เห็น band ของ heteroduplex 2 bands และตัวอย่างตรวจ S4 เห็น band ของ heteroduplex 1 band (รูปที่ 3.3) เมื่ออ่านผลโดยการนับจำนวน band แล้วจะทำการวัดการเคลื่อนของ homoduplex และ heteroduplex เพื่อคำนวณหาค่า Mobility index (MI) เพื่อนำไปวิเคราะห์ genetic diversity ต่อไป



รูปที่ 3.3 แสดงผล Heteroduplex Mobility assay (HMA) ระหว่าง ตัวอย่างตรวจ กับ reference DNA

M คือ DNA marker (100 bp)

R คือ Reference DNA

S1 คือ ตัวอย่างที่ 1

RS1 คือ ตัวอย่างตรวจที่ 1 ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

S2 คือ ตัวอย่างที่ 2

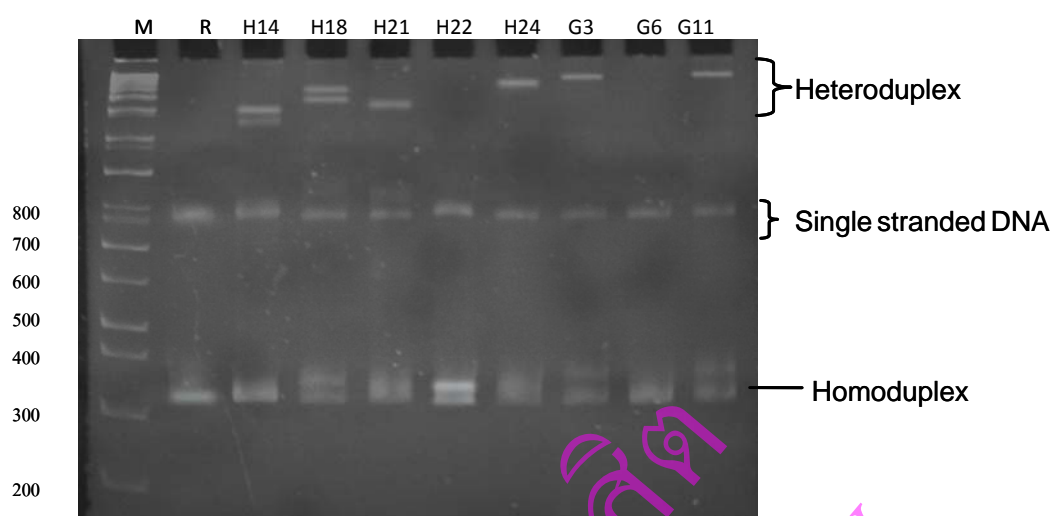
RS2 คือ ตัวอย่างตรวจที่ 2 ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

S3 คือ ตัวอย่างที่ 3

RS3 คือ ตัวอย่างตรวจที่ 3 ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

S4 คือ ตัวอย่างที่ 4

RS4 คือ ตัวอย่างตรวจที่ 4 ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA



รูปที่ 3.4 แสดงผล Heteroduplex Mobility assay (HMA) ระหว่าง reference DNA กับตัวอย่างตรวจ ในตำแหน่งการเคลื่อนที่ต่างๆกัน

M คือ DNA marker (100 bp)

R คือ Reference DNA

H14 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

H18 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

H21 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

H22 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่ 4 ที่เกิด Homoduplex 2 bands

H24 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

G3 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

G6 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่เกิด Homoduplex เหมือน reference DNA

G11 คือ ตัวอย่างตรวจ ที่เกิด Heteroduplex กับ reference DNA

จากรูปที่ 3.4 แสดงให้เห็นการเกิด heteroduplex แต่ละ band ระหว่าง reference DNA กับตัวอย่างตรวจที่เลือกมาทำปฏิกิริยา เพื่อแสดงถึงความแตกต่างกันของ *P. falciparum* ในตัวอย่างตรวจในการ run polyacrylamide gel ใน gel เดียวกัน จะเห็นว่าตัวอย่างตรวจ H14, H18 จะเห็น band ของ heteroduplex 2 bands มีตำแหน่งต่างกันทั้ง 4 bands ตัวอย่างตรวจ H24, G3, G11 เห็น band ของ heteroduplex 1 band ในตำแหน่งต่างกัน แสดงว่าเป็น *P. falciparum* ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากการที่เชื่อมีลำดับเบส หรือจำนวนเบสต่างกันจึงเกิดการสร้าง heteroduplex รูปแบบ

ต่างๆ กัน ทำให้มีการเคลื่อนที่ต่างๆ กัน ส่วนตัวอย่างตรวจ H22 ไม่เห็น band ของ heteroduplex แต่เห็น band ของ homoduplex 2 bands (shift จากตำแหน่ง heteroduplex ของ Reference) แสดงว่าเชื้อมีลำดับเบสที่ต่างกันมากระหว่าง reference DNA กับตัวอย่างตรวจ จึงไม่สามารถจับกันได้จึงไม่เกิด heteroduplex และตัวอย่างตรวจ G6 ไม่เกิด heteroduplex ระหว่างตัวอย่างตรวจกับ reference DNA และเกิด homoduplex เพียง 1 band เท่านั้น (ไม่มี shift) แสดงว่ามีความเหมือนกับ reference DNA

2.4 Method validation

2.4.1 ความแม่นยำ (precision) เพื่อตรวจสอบค่า MI ของการทดสอบ HMA

ทดสอบโดยใช้เชื้อ *P. falciparum* ที่ได้จากการ culture ซึ่งเป็นสายพันธุ์ K1 นำมาสกัด DNA ด้วยวิธี Chelex จากนั้นนำมาทำ Nested PCR ซึ่งจะได้ PCR product ที่มี *Pfmsp1* gene และทำการทดสอบ HMA โดยใช้ MAD Reference DNA ทำซ้ำทั้งหมด 10 ครั้ง พบว่าค่า MI (%) ของ heteroduplex band ที่ได้มีความแปรปรวนในระดับที่ยอมรับได้คือ $CV < 10\%$ โดยมี CV เท่ากับ 5.59% ดังแสดงในตารางที่ 3.4 แสดงว่าการทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำสูง และการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของ ssDNA ของ reference DNA (MAD20) ทำการทดสอบซ้ำ 20 ครั้ง พบว่าได้ค่า MI (%) ที่มีความแปรปรวนที่ยอมรับได้เช่นกันคือ $CV < 10\%$ ($CV=8.26\%$) ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบความแม่นยำของค่า Mobility index (MI) ของ Ref/K1 heteroduplex โดยวิธี Nested PCR-HMA

ครั้งที่	MI(%) ของ heteroduplex ของ Ref/K1
1	13.98
2	14.76
3	13.49
4	15.22
5	13.22
6	14.26
7	13.43
8	15.45
9	14.99
10	14.86
\bar{X}	14.36
SD	0.80
CV	5.59 %

ตารางที่ 3.5 ผลการทดสอบความแม่นยำของค่า Mobility index (MI) ที่ตำแหน่งการเคลื่อนที่ single stranded reference DNA โดยวิธี Nested PCR-HMA

ทดสอบครั้งที่	MI (single stranded of MAD20), (%)
1	38.74
2	51.01
3	42.99
4	47.80
5	45.00
6	43.37
7	45.35
8	45.45
9	45.71
10	39.74
11	46.05
12	39.47
13	44.29
14	51.00
15	43.37
16	45.35
17	46.45
18	45.71
19	44.71
20	53.71
\bar{X}	45.27
SD	3.74
CV	8.26%

2.4.2 ความแม่นยำ (precision) เพื่อตรวจสอบจำนวน heteroduplex band และ allele variation No.

จากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ตรวจสอบว่าการจัด allele variation No. ตามเงื่อนไขที่กำหนดขึ้น (ตารางที่ 3.7) จะได้ผลเหมือนเดิมหรือไม่ และตรวจ reproducibility ของการเกิดจำนวน heteroduplex band โดยการตรวจตัวอย่างซ้ำด้วยวิธี HMA ในแต่ละตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ตรวจทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ผลการทดสอบมีค่า MI (%) จัดอยู่ใน alleles variation No. เดิมทั้งหมด และได้จำนวน band ของ heteroduplex จำนวนเท่าเดิมทุกตัวอย่าง (100%) ดังแสดงในตารางที่ 3.6

2.4.3 การทดสอบความถูกต้อง Accuracy

ในที่นี้ นำเชื้อที่ทราบว่าเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ และทราบลำดับเบส 1 ตัวอย่างคือ *P. falciparum* (K1) ซึ่งมีลำดับเบสต่างจาก reference DNA (similarity 77%) เมื่อทดสอบ HMA พบว่าเกิด heteroduplex เพียง 1 band และพบ homoduplex 1 band เมื่อทดสอบกับ Reference DNA อย่างเดียว หรือ K1 DNA อย่างเดียว ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีของหลักการ HMA จึงให้ค่าความถูกต้องของการทดสอบเท่ากับ 100% แสดงว่าการทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำสูง และความถูกต้องสูง เชื่อถือได้

ตารางที่ 3.6 แสดงการทดสอบเพื่อประเมินคุณภาพของการศึกษา Genetic diversity โดยวิธี Nested PCR- HMA จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ในเชื้อจากผู้ป่วย 10 ตัวอย่าง

ทดสอบครั้งที่	ตัวอย่างตรวจ No	จำนวน band	MI (%) Band 1	allele variation No, Band 1	MI (%) Band 2	allele variation No, Band 2
1	H14	2	16.52	17	17.37	18
2	H14	2	15.97	17	16.96	18
3	H14	2	16.21	17	17.29	18
1	H18	2	8.70	8	8.82	10
2	H18	2	9.40	8	9.35	10
3	H18	2	8.89	8	9.05	10
1	H25	2	7.09	6	15.18	16
2	H25	2	7.69	6	15.74	16
3	H25	2	7.12	6	15.42	16
1	G3	1	5.48	4	-	-
2	G3	1	6.18	4	-	-
3	G3	1	5.78	4	-	-

ตารางที่ 3.6 แสดงการทดสอบเพื่อประเมินคุณภาพของการศึกษา Genetic diversity โดยวิธี Nested PCR-HMA จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ในเชื้อจากผู้ป่วย 10 ตัวอย่าง (ต่อ)

ทดสอบครั้งที่	ตัวอย่างตรวจ No	จำนวน band	MI (%) Band 1	allele variation No Band 1	MI (%) Band 2	allele variation No Band 2
1	G11	1	5.32	3	-	-
2	G11	1	4.72	3	-	-
3	G11	1	5.02	3	-	-
1	P61	0	0.00	25	-	-
2	P61	0	0.00	25	-	-
3	P61	0	0.00	25	-	-
1	S48	2	5.13	3	14.48	15
2	S48	2	5.43	3	15.00	15
3	S48	2	4.93	3	14.31	15
1	BT16	0	0.00	26	-	-
2	BT16	0	0.00	26	-	-
3	BT16	0	0.00	26	-	-
1	P8	2	8.25	7	5.99	4
2	P8	2	7.95	7	5.49	4
3	P8	2	8.45	7	6.05	4
1	S68	0	0.00	25	0.00	-
2	S68	0	0.00	25	1.00	-
3	S68	0	0.00	25	2.00	-

3. ผลการตรวจหา genetic diversity ของ *Pfmsp1* gene ของ *P. falciparum* โดยวิธี Nested PCR-HMA

3.1 Genetic diversity

P. falciparum ที่ศึกษาโดยวิธี Nested PCR-HMA ถูกจำแนกความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ (genetic diversity) โดยอาศัยค่า MI ของการเคลื่อนที่ของ heteroduplex ซึ่งถูกจัดแบ่งเป็น MI range (%) เพื่อจัดเป็น allele variation No. โดยแต่ละช่วงของค่า MI (%) ดังกล่าว ถูกกำหนดโดยสมมุติฐานที่ว่าความคลาดเคลื่อนใดๆ ในการทดสอบแต่ละครั้ง เช่น การเคลื่อนที่ของ heteroduplex

ในการ run gel แต่ละครั้ง การวัดระยะทาง หรือการเปลี่ยนแปลงของการเตรียมน้ำยา สารเคมีใดๆ จะถูกกำหนดให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เป็นค่ากำหนดแต่ละช่วง

ดังนั้นจึงใช้การวัดตำแหน่งของ heteroduplex ของ reference DNA กับ K1 DNA และคำนวณค่า MI (%) ในการทำ HMA ซ้ำ 10 ครั้ง (ตารางที่ 3.4) เพื่อหาความแปรปรวนของผลการทดสอบ โดยคำนวณค่า X, SD ซึ่งได้ค่า SD เท่ากับ 0.8 และนำค่า 0.8 มากำหนด MI range ในแต่ละช่วง และเรียกชื่อเป็น allele variation No 1-26 ดังตารางที่ 3.7

สำหรับความหมายของค่า MI คือ ค่า MI ต่ำ แสดงว่า *P. falciparum* สายพันธุ์นั้นมี heteroduplex เคลื่อนที่ช้า (slow migration) ซึ่งจะเป็นสายพันธุ์ที่มีลำดับเบสแตกต่างจาก reference DNA มากที่สุด ในทางตรงกันข้าม heteroduplex ที่เคลื่อนที่เร็ว (rapid migration) จะมีค่า MI สูง ซึ่งแสดงว่า *P. falciparum* สายพันธุ์นั้นมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ reference DNA มาก หมายความว่า MI (%) แปรผันตรงกับ similarity ของ base homology ระหว่าง reference กับ ตัวอย่างตรวจ

ในการศึกษา HMA ของ *Pfmsp1* gene ทั้งหมด 79 ตัวอย่าง ในครั้งนี้พบว่า heteroduplex มีระยะทางในการเคลื่อนที่ที่มีค่า MI (%) ระหว่าง 3.95-21.84 และตรวจพบทั้งหมด 108 isolates ส่วน single stranded DNA จะเคลื่อนที่มาประมาณครึ่งหนึ่งของระยะทางเคลื่อนที่ของ homoduplex โดยมีค่า MI (%) ประมาณ 45 เมื่อนำผลการตรวจ HMA มาจัดกลุ่ม allele variation ตามค่า MI (%) range ที่กำหนดข้างต้น พบว่าการศึกษาโดยการพัฒนาวิธี Nested PCR-HMA และใช้ *P. falciparum* MAD20 เป็น reference DNA ครั้งนี้ สามารถตรวจพบ allele variation ของ *Pfmsp1* block 2 ได้ทั้งสิ้น 23 variants และพบว่า allele variation No. 25 (No heteroduplex band, same homoduplex migration) พบมากที่สุดคือ 22 isolates (20.36%) รองลงมาคือ allele variation No. 6 (9.26%) และกลุ่มที่พบน้อยที่สุดคือ allele variation No. 12, 18 และ 19 ซึ่งจำนวนที่ตรวจพบมีเพียงกลุ่มละ 1 isolates เท่านั้น (0.93%) (ตาราง ที่ 3.7)

จากตารางที่ 3.7 แสดงผลการศึกษา genetic diversity โดยแยกตามภูมิภาคและจังหวัด จากจำนวนที่ตรวจพบทั้งหมด 108 isolates พบว่าภาคตะวันตกตรวจพบเชื้อ 73 isolates (67.59%) ซึ่งมี allele variation มากที่สุดถึง 20 variants ส่วนภาคเหนือจำนวนที่ตรวจพบทั้งหมด 17 isolates (15.74%) มี allele variation เท่ากับ 11 variants และ ภาคใต้จำนวนที่ตรวจพบเชื้อทั้งหมด 18 isolates (16.67) มี allele variation เท่ากับ 7 variants โดยกลุ่มของ allele variation ภูมิภาคต่างๆ แสดงไว้ในตารางที่ 3.8 จากการศึกษพบว่าเชื้อที่มี allele variation No. 4, 6 และ 26 พบร่วมกันในทุกภูมิภาค และพบว่าสายพันธุ์ที่พบบ่อยในแต่ละภูมิภาคแตกต่างกัน คือ ภาคเหนือพบ allele variation No. 10 มากที่สุด ส่วนภาคตะวันตกและภาคใต้ พบ allele variation No. 25 มากที่สุด

ตารางที่ 3.7 แสดงผลของ Allele variation No.ของ *P. falciparum* โดยวิธี Nested PCR-HMA

Allele variation No.	MI range (%)	จำนวนที่ตรวจพบ (N)					จำนวนที่ตรวจพบรวม (%)
		North	West	South			
		แม่ฮ่องสอน	กาญจนบุรี	สุราษฎร์ธานี	ยะลา	รวม	
1	3.00-3.80	0	0	0	0	0	0 , (0.00)
2	3.81-4.60	0	3	0	0	0	3 , (2.78)
3	4.61-5.40	0	1	1	0	1	2 , (1.85)
4	5.41-6.20	1	2	3	0	3	6 , (5.56)
5	6.21-7.00	1	3	0	0	0	4 , (3.70)
6	7.01-7.80	2	7	1	0	1	10 , (9.26)
7	7.81-8.60	0	7	0	0	0	7 , (6.48)
8	8.61-9.40	1	7	0	0	0	8 , (7.40)
9	9.41-10.20	0	2	0	0	0	2 , (1.85)
10	10.21-11.00	5	4	0	0	0	9 , (8.33)
11	11.01-11.80	0	6	0	0	0	6 , (5.56)
12	11.81-12.60	0	0	1	0	1	1 , (0.93)
13	12.61-13.40	0	2	0	0	0	2 , (1.85)
14	13.41-14.20	0	2	0	0	0	2 , (1.85)
15	14.21-15.00	1	5	1	0	1	8 , (7.40)
16	15.01-15.80	1	2	0	0	0	3 , (2.78)
17	15.81-16.60	1	3	0	0	0	4 , (3.70)
18	16.61-17.40	1	0	0	0	0	1 , (0.93)
19	17.41-18.20	0	1	0	0	0	1 , (0.93)
20	18.21-19.00	0	0	0	0	0	0 , (0.00)
21	19.01-19.80	2	0	0	0	0	2 , (1.85)
22	19.81-20.60	0	2	0	0	0	2 , (1.85)
23	20.61-21.40	0	0	0	0	0	0 , (0.00)
24	21.41-22.20	0	1	0	0	0	1 , (1.85)
25	0 with same homoduplex migration	0	12	2	8	10	22 , (20.36)
26	0 with homoduplex shift	1	1	0	1	1	3,(2.78)
Total		17,(15.74)	73,(67.59)	9,(8.33)	9,(8.33)	18(16.67)	108,(100.00)
variants		11	20	6	2	7	23

ตารางที่ 3.8 จำนวน allele variation ของ *P. falciparum* ในการศึกษาโดยวิธี Nested PCR-HMA

ภูมิภาคที่สำรวจ	จำนวน Alleles variation	Allelic variation No.
North (N=11)	11	4,5,6,8,10,15,16,17,18,21,26
West (N=51)	20	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,16,17,19,22,24,25,26
South (N=17)	7	3,4,6,12,15,25,26

3.2 Multiplicity of infection (MOI)

จากการนับจำนวน heteroduplex band ที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างตรวจ พบว่ามี band มากที่สุด 3 bands ซึ่งพบเพียง 1 ตัวอย่าง และจากผลของการทดสอบ HMA ได้จัดกลุ่มของผู้ติดเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม ดังแสดงตารางที่ 3.9 คือ กลุ่มที่ติดเชื้ออย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ซึ่งหมายถึงพวกที่พบ heteroduplex 1 bands และพวกที่ไม่พบ band (ซึ่งหมายถึงติดเชื้ออย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ที่เป็น homoduplex) ทั้งนี้การทดสอบนี้ไม่อาจสรุปได้ว่าการพบ heteroduplex 1 band หมายความว่ามีความเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น เพราะอาจมีการติดเชื้อที่เหมือนกับ Reference DNA จึงมีเฉพาะ band ซ้อนตำแหน่งเดียวกับ homoduplex อีกหนึ่งสายพันธุ์ก็ได้ อีกกลุ่มหนึ่งคือพวกที่ติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ (อย่างน้อย 2 สายพันธุ์หรืออาจมากกว่า 2 สายพันธุ์) ซึ่งหมายถึงพวกที่พบ heteroduplex 2 bands หรือ 3 bands

จากผลสำรวจ Multiplicity of infection (MOI) ของการติดเชื้อ *P. falciparum* ในการตรวจครั้งนี้ ตัวอย่างทั้งหมดในทุกภูมิภาคที่มีการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ (2 สายพันธุ์หรืออาจมากกว่า 2 สายพันธุ์) เท่ากับ 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 35.44% ดังแสดงตารางที่ 3.9 และพบว่า ผู้ติดเชื้อในภาคเหนือ พบการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ มากกว่าการติดเชื้อ 1 สายพันธุ์ (54.55% vs 45.45%) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ภาคตะวันตกพบการติดเชื้อ 1 สายพันธุ์ มากกว่าการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ (56.86% vs 41.18%) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และภาคใต้พบว่ามีผู้ติดเชื้อเกือบทั้งหมด (94.11%) พบการติดเชื้อ 1 สายพันธุ์ มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อทดสอบสถิติหาความสัมพันธ์ของจำนวนสายพันธุ์ของการติดเชื้อ เปรียบเทียบระหว่างผู้ติดเชื้อในภาคเหนือกับภาคตะวันตกพบว่า จำนวนสายพันธุ์ของการติดเชื้อไม่แตกต่างกันใน 2 ภูมิภาคข้างต้น ($P>0.05$) แต่พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ติดเชื้อในภาคเหนือกับภาคใต้ และภาคตะวันตกกับภาคใต้ พบว่าจำนวนสายพันธุ์ของการติดเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การคำนวณค่าเฉลี่ย MOI เพื่อแสดงจำนวนของสายพันธุ์ของเชื้อที่พบในการติดเชื้อในผู้ป่วย 1 คน คำนวณโดย จำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อแต่ละแบบคือ 1, 2, 3 สายพันธุ์ คูณกับจำนวนสายพันธุ์ที่ตรวจพบ (1,2,3) แล้วหารด้วยผู้ป่วยทั้งหมด ซึ่งการสำรวจครั้งนี้พบว่า ภาคเหนือมีค่า MOI

เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 1.55 รองมาคือภาคตะวันตก MOI เฉลี่ยเท่ากับ 1.41 และภาคใต้พบว่ามีค่า MOI เฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 1.06 และพบว่าผู้ป่วยทั้งหมด 79 ราย มีค่า MOI เฉลี่ยเท่ากับ 1.35 แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยในประเทศไทย 1 รายมีอัตราการติดเชื้อ *P. falciparum* มากกว่า 1 สายพันธุ์

ตารางที่ 3.9 ผลการสำรวจ Multiplicity of *P. falciparum* infection โดยวิธี Nested PCR-HMA

ภูมิภาคที่สำรวจ N, (%)	MOI เฉลี่ย	จำนวนเชื้อ(สายพันธุ์) ในแต่ละตัวอย่างตรวจ			P-value ทดสอบ ระหว่างภูมิภาค
		1	>1	P-value	
North, แม่ฮ่องสอน(N=11)	1.55	5,(45.45)	6,(54.55)	0.139	North vs West =0.315
West, กาญจนบุรี(N=51)	1.41	30,(58.83)	21,(41.18)	0.116	
South, สุราษฎร์ธานี(N=8)	1.12	7,(87.50)	1,(12.50)	NC	North vs South =0.007*
South, ชะลา(N=9)	1.00	9,(100.00)	0,(0.00)	NC	
South,รวม (N=17)	1.06	16,(94.11)	1,(5.88)	0.003*	South vs West =0.005*
รวม ,(N=79)	1.35	51,(64.56)	28,(35.44)	-	

*Significant value, $p < 0.05$ (Fisher's exact test)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวน parasitemia กับจำนวนสายพันธุ์ของการติดเชื้อ (MOI) พบว่าจำนวนตัวอย่างตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่าง พบว่าผู้ที่ติดเชื้อ 1 สายพันธุ์ มีค่าเฉลี่ยของ parasitemia สูงกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ เล็กน้อย (25.00 vs. 21.88 parasite/ $\mu\text{l} \times 10^3$) แสดงในตารางที่ 3.10 แต่จากการทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Mann Whitney U test)

ตารางที่ 3.10 แสดงจำนวน parasitemia ของ *P. falciparum* (parasite/ μl) กับจำนวนของสายพันธุ์ของเชื้อ จากการศึกษาระดับโมเลกุลโดยวิธี Nested PCR-HMA

จำนวนเชื้อในแต่ละ ตัวอย่างตรวจ (สายพันธุ์)	Parasitemia (Parasite/ $\mu\text{l} \times 10^3$)				P-value
	Median	Max	Min	SD	
1	25.00	797.50	5.00	122.05	0.670
มากกว่า 1	21.88	403.75	2.50	95.05	
รวม	23.75	797.50	5.00	112.64	

3.3 Allele variation และ ปัจจัยต่างๆ

การศึกษาความหลากหลายของ *Pfmsp1* gene โดยวิธี Nested PCR- HMA กับความเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ทำโดยการจัดกลุ่มของ allele variation เป็นกลุ่มใหญ่ๆ โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มตามการเคลื่อนที่ของ heteroduplex ซึ่งสอดคล้องกับการมีลำดับเบสเหมือนหรือแตกต่างจาก reference DNA มากน้อยเพียงใด คือ กลุ่ม I (mostly different) เป็นพวกที่แตกต่างจาก reference DNA มากที่สุด, กลุ่ม II (highly different) เป็นพวกที่แตกต่างจาก reference DNA มาก, กลุ่ม III (moderate different) เป็นพวกที่แตกต่างจาก reference DNA ปานกลาง, กลุ่ม IV (highly related) เป็นพวกที่คล้ายกับ reference DNA และกลุ่ม V (mostly similar) เป็นพวกที่เหมือนกับ reference DNA มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3.11 และตารางที่ 3.12

จากการแบ่งกลุ่มดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบ genetic variation ของ *Pfmsp1* gene จากจำนวนที่ตรวจพบทั้งหมด 108 isolates (ตารางที่ 3.11) ส่วนใหญ่เชื่อจัดอยู่ในกลุ่ม II จำนวน 41 isolates รองลงมาคือกลุ่ม III จำนวน 31 isolates และพบน้อยที่สุดคือกลุ่ม I พบเพียง 3 isolates (2.80%) โดยพบว่าภาคเหนือพบเชื่อที่จัดอยู่ในกลุ่ม III มากที่สุดจำนวน 7 isolates (41.20%) รองลงมาคือกลุ่ม II จำนวน 5 isolates (29.40%) และไม่พบเชื่อในกลุ่ม V ส่วนภาคตะวันตกพบเชื่อที่จัดอยู่ในกลุ่ม II มากที่สุดจำนวน 31 isolates (42.50%) รองลงมาคือกลุ่ม III จำนวน 22 isolates (30.10%) และภาคใต้พบเชื่อที่จัดอยู่ในกลุ่ม V มากที่สุด จำนวน 10 isolates (55.50%) รองลงมาคือกลุ่ม II จำนวน 5 isolates (27.80%) แต่ไม่พบเชื่อในกลุ่ม IV

ตารางที่ 3.11 จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับ I-V แยกตามภูมิภาค

Group	MI range (%)	Mean MI	จำนวนที่พบรวม N, (%)			รวม
			North	West	South	
I (Mostly different)	0 (with homoduplex shift)	0.00	1, (5.90)	1, (1.40)	1, (5.60)	3, (2.80)
II (Highly different)	3.00-9.40	6.20	5, (29.40)	31, (42.50)	5, (27.80)	41, (38.00)
III (Moderate different)	9.41-15.80	12.61	7, (41.20)	22, (30.10)	2, (11.10)	31, (28.70)
IV (Highly related)	15.81-22.20	19.01	4, (23.50)	7, (9.60)	0, (0.00)	11, (10.20)
V (Mostly similar)	0 (with homoduplex same migration)	0.00	0, (0.00)	12, (16.40)	10, (55.50)	22, (20.30)
รวม			17,(100.00)	73,(100.00)	18,(100.00)	108,(100.00)

เมื่อเปรียบเทียบ genetic variation โดยจัดกลุ่ม I-V กับสัญชาติของผู้ติดเชื้อ พบว่าผู้ติดเชื้อที่มีสัญชาติไทยตรวจพบ 81 isolates ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่ม II จำนวน 31 isolates (38.30%) และ รองลงมาอยู่ในกลุ่ม III จำนวน 20 isolates (24.70%) สัญชาติกระเหรี่ยงติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม II และกลุ่ม III เท่ากัน จำนวนกลุ่มละ 6 isolates (40.00%) สัญชาติพม่าพบเชื้อ 8 isolate โดยติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม II มากที่สุด จำนวน 4 isolates (50.00%) รองลงมาคือกลุ่ม III (25.00%) สัญชาติมอญ และสัญชาติลาวติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม III และ กลุ่ม V จำนวน 3 และ 1 isolate ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.12

จากตาราง 3.13 จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับ I-V เทียบกับปริมาณ parasitemia (median) พบว่าในกลุ่ม III มีค่า parasitemia เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 30.00×10^3 parasite/ μ l รองลงมาคือ กลุ่ม II มีค่า parasitemia เฉลี่ยเท่ากับ 25.00×10^3 parasite/ μ l ส่วนกลุ่มที่มีค่า parasitemia เฉลี่ยต่ำสุดคือ กลุ่ม V มีค่า parasitemia เท่ากับ 16.88×10^3 parasite/ μ l

ตารางที่ 3.12 จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับ I-V แยกตามสัญชาติ

Group of genetic diversity	MI range (%)	Mean MI (%)	แยกตามสัญชาติ N, (%)					รวม
			ไทย	กระเหรี่ยง	พม่า	ลาว	มอญ	
I (Mostly different)	0 (with homoduplex shift)	0.00	3 (3.70)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (2.80)
II (Highly different)	3.00-9.40	6.20	31 (38.30)	6 (40.00)	4 (50.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	41 (38.00)
III (Moderate different)	9.41-15.80	12.61	20 (24.70)	6 (40.00)	2 (25.00)	0 (0.00)	3 (100.00)	31 (28.60)
IV (Highly related)	15.81-22.20	19.01	8 (9.80)	2 (13.30)	1 (12.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	11 (10.20)
V (Mostly similar)	0 (with homoduplex same migration)	0.00	19 (23.50)	1 (6.70)	1 (12.50)	1 (100.00)	0 (0.00)	22 (20.40)
รวม			81 (100.00)	15 (100.00)	8 (100.00)	1 (100.00)	3 (100.00)	108 (100.00)

ตารางที่ 3.13 จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับ I-V เทียบกับปริมาณ Parasitemia

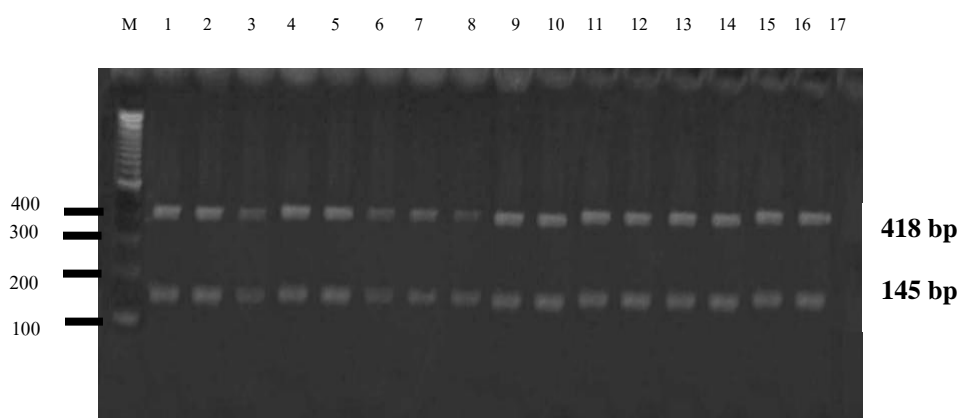
Group of genetic diversity	MI range (%)	Mean MI (%)	Median (parasite/ μ l $\times 10^3$)	Max	Min	SD
I (N= 3) (Mostly different)	0 (with homoduplex shift)	0.00	17.50	13.13	1.75	65.67
II (N= 41) (Highly different)	3.00-9.40	6.20	25.00	79.75	0.63	137.66
III (N= 31) (Moderate different)	9.41-15.80	12.61	30.00	40.38	0.25	80.73
IV (N= 11) (Highly related)	15.81-22.20	19.01	20.61	40.38	0.63	136.09
V (N= 22) (Mostly similar)	0 (with homoduplex same migration)	0.00	16.88	13.00	0.75	27.27

4. วิธี Multiplex nested PCR-RFLP สำหรับศึกษายีนดื้อยา *Pfmdr1* 86 และ *Pfprt* 76

4.1 ผลการศึกษายีนดื้อยา *Pfmdr1* ที่ตำแหน่ง codon 86 และ *Pfprt* ที่ตำแหน่ง codon 76

การศึกษากการเกิด mutation ของ *Pfmdr1* gene ที่ตำแหน่ง codon 86 และ *Pfprt* gene ที่ตำแหน่ง codon 76 ของเชื้อ *P. falciparum* โดยทำการสุ่มตัวอย่างจาก 2 จังหวัด คือ จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 43 ตัวอย่าง และทำการสกัด DNA จาก Whatman filter paper โดยใช้วิธี Chelex จากนั้นนำ DNA ที่ได้มาทำ Multiplex nested PCR และติดตามผลผลิต PCR product โดยทำ gel electroporesis ผลการทำ Multiplex nested PCR ของ *Pfmdr1* gene ได้ขนาดเท่ากับ 418 bp และ *pfprt* gene ขนาดเท่ากับ 145 bp ดังแสดงในรูปที่ 3.5

จากการสุ่มตัวอย่างมา 43 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดสุราษฎร์ธานี ผลการทำ Multiplex nested PCR พบว่าสามารถ amplify *Pfmdr1* gene และ *Pfprt* gene สำเร็จจำนวน 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 58.14 % ทั้งนี้ได้ตัดตัวอย่างที่ amplify *Pfmdr1* gene หรือ *Pfprt* gene ไม่ได้ ออกจากการวิเคราะห์ข้อมูลในตอนต่อไป



รูปที่ 3.5 แสดงผล PCR product ของ *Pfmdr1* gene และ *Pfprt* gene

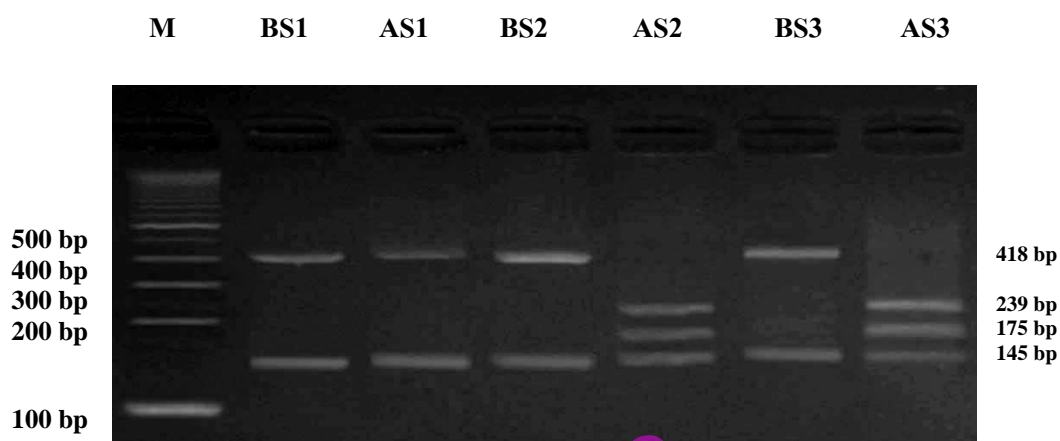
M คือ DNA marker (100 bp)

Lane ที่ 1-15 คือ ตัวอย่างตรวจที่พบ *Pfmdr1* gene และ *Pfprt* gene

Lane ที่ 16 คือ Positive control (*P. falciparum* สายพันธุ์ K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา Chloroquine)

Lane ที่ 17 คือ Negative control (Human blood DNA)

จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 25 ตัวอย่าง เมื่อทำ multiplex nested PCR จะได้ DNA ที่มีขนาดของ *Pfmdr1* gene 418 bp และ *Pfprt* gene ขนาด 145 bp และนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ApoI หรือการทำ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ซึ่ง PCR product ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หากเป็น wild type ของ *Pfmdr1* gene ที่ตำแหน่ง codon 86 (N86) จะถูกตัดให้มีขนาด 239 bp และ 179 bp หากเป็น mutant จะมีขนาด DNA 418 bp (รูปที่ 3.6) ส่วน *Pfprt* gene ที่ตำแหน่ง codon 76 (76T) หากเป็น wild type จะถูกตัดให้มีขนาด 98 bp และ 47 bp ถ้าหากเป็น mutant จะมีขนาด DNA 145 bp โดยผลการตรวจสามารถอ่านผลได้ชัดเจนทั้ง 25 ตัวอย่าง



รูปที่ 3.6 แสดงผล PCR product ของ Multiplex nested PCR-RFLP ของ *Pfmdr1* gene ที่ตำแหน่ง codon 86 และ *Pfprt* gene ที่ตำแหน่ง codon 76 (แสดงผลการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบางส่วน)

M คือ DNA marker (100 bp)

BS1 คือ ตัวอย่างที่ 1 ก่อนตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

AS1 คือ ตัวอย่างที่ 1 หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ มี genotype เป็น *pfmdr1*(86Y)/ *Pfprt* (76T), (M/M)

BS2 คือ ตัวอย่างที่ 2 ก่อนตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

AS2 คือ ตัวอย่างที่ 2 หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ มี genotype เป็น *Pfmdr1* (N86)/ *Pfprt* (76T), (W/M)

BS3 คือ ตัวอย่างที่ 3 ก่อนตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

AS3 คือ ตัวอย่างที่ 3 หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ มี genotype เป็น *Pfmdr1* (N86)/ *Pfprt* (76T), (W/M)

หมายเหตุ W = Wild type M = Mutant

4.2 การเปรียบเทียบ *Pfmdr1* 86 และ *Pfprt* 76 drug resistant marker กับ genetic variation ของ *Pfmsp1* gene

จากตารางที่ 3.14 แสดงการศึกษา genotype ของยีนดื้อยาที่สุ่มเลือกมาจาก 2 จังหวัด คือ จังหวัดกาญจนบุรีและสุราษฎร์ธานี จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ตรวจสอบว่ามีสายพันธุ์ที่เป็นชนิด mutant ของ *Pfmdr1* 86 gene จำนวนทั้งหมด 10 ตัวอย่าง (40%) โดยพบในจังหวัดกาญจนบุรี 5 ตัวอย่าง (20%) และจังหวัดสุราษฎร์ธานี 5 ตัวอย่าง (20%) ส่วนสายพันธุ์ที่เป็นชนิด wilde type จำนวนทั้งหมด 15 ตัวอย่าง (60%) และพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่เป็นชนิด mutant ของ *Pfprt* 76 gene ทุกตัวอย่าง (100%)

เมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อสายพันธุ์ที่เป็น *Pfmdr1* 86 mutation กับการติดเชื้อ มากกว่า 1 สายพันธุ์ พบว่าผู้ที่ติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *Pfmdr1* 86 ชนิด Wilde type มากกว่า mutant แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 3.15)

ตารางที่ 3.14 แสดงผลการศึกษา Genotype ของ *Pfmdr1* gene ที่ตำแหน่ง codon 86 และ *Pfprt* gene ที่ตำแหน่ง codon 76 ใน *P. falciparum* ที่แยกได้ในจังหวัดกาญจนบุรีและสุราษฎร์ธานี โดยวิธี Multiplex nested PCR-RFLP

จังหวัด	Genotyping of <i>Pfmdr1</i> codon 86 / <i>Pfprt</i> codon 76 N, (%)			
	<i>Pfmdr1</i> codon 86		<i>Pfprt</i> codon 76	
	W (Wilde type)	M (Mutant)	W (Wilde type)	M (Mutant)
กาญจนบุรี (N=17)	12 , (48.00)	5 , (20.00)	0 , (0.00)	17 , (68.00)
สุราษฎร์ธานี (N=8)	3 , (12.00)	5 , (20.00)	0 , (0.00)	8 , (32.00)
รวม (N=25)	15 , (60.00)	10 , (40.00)	0 , (0.00)	25 , (100.00)

ตารางที่ 3.15 แสดงผลการศึกษา Genotype ของ *Pfmdr1* 86 ใน *P. falciparum* และ Multiplicity

การติดเชื้อ	<i>Pfmdr1</i> 86 mutant	<i>Pfmdr1</i> 86 wilde type	P-value
1 สายพันธุ์	7	7	0.231
>1 สายพันธุ์	3	8	
รวม	10	15	

ตารางที่ 3.16 จัดกลุ่มของ Genetic diversity ตามค่า MI เป็นระดับสัมพันธ์กับการเกิด mutant *Pfmdr1* 86 gene และ *Pfcr1* 76 gene

Group of genetic diversity	MI range	Mean MI	<i>Pfmdr1</i> gene		<i>Pfcr1</i> gene Mutant	Co mutation of <i>Pfmdr1/Pfcr1</i>
			Mutant	Wild type		
I (N= 3) (Mostly different)	0 (with homoduplex shift)	0.00	0, (0.00)	0, (00.00)	0, (0.00)	0, (0.00)
II (N= 41) (Highly different)	3.00-9.40	6.20	4, (30.76)	14, (60.86)	18, (50.00)	4, (30.76)
III (N= 31) (Moderate different)	9.41-15.80	12.61	2, (15.39)	3, (13.04)	5, (13.89)	2, (15.38)
IV (N= 11) (Highly related)	15.81-22.20	19.01	2, (15.39)	4, (17.39)	6, (16.67)	2, (15.38)
V (N= 22) (Mostly similar)	0 (with homoduplex same migration)	0.00	5, (38.46)	2, (8.69)	7, (19.44)	5, (38.76)
รวม			13 (100.00)	23 (100.00)	36 (100.00)	13 (100.00)

จากตารางที่ 3.16 เปรียบเทียบ *Pfmdr1* 86 และ *Pfcr1* 76 drug resistant marker กับ genetic variation โดยการจัดกลุ่ม จากตัวอย่างตรวจ 25 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อด้วย PCR-HMA ทั้งหมด 36 isolates ไม่พบสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม I และเป็นเชื้อที่มี *Pfmdr1* 86 mutation 13 isolates wild type 23 isolates การเกิด co-mutation ระหว่าง *Pfmdr1* 86 และ *Pfcr1* 76 พบ 13 isolates ในจำนวน 13 isolates ที่ *Pfmdr1* 86 เกิด mutation เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม V จำนวน 5 isolates (38.46%) รองลงมาคือ กลุ่ม II จำนวน 4 isolates (30.76%)

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาคความหลากหลายของพันธุกรรม (genetic diversity) ของเชื้อ *P. falciparum* สามารถศึกษาจาก ความหลากหลายของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนในบางระยะของเชื้อ หรือโปรตีนที่ผิวของเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น antigen เช่น โปรตีนบนผิวเมอโรโซยต์ (merozoite surface protein) ซึ่งปัจจุบันพบว่า *Pfmsp1* gene ในตำแหน่ง block 2 เป็นยีนที่มีลำดับเบสที่มีความผันแปรสูง ซึ่งใช้เป็น genetic marker ในการแยกความหลากหลายของสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี (Snounou & Snounou, et al., 1993; Beck, 1998; Ngeringarlert, et al., 2005) ในการศึกษาความผันแปรของ *Pfmsp1* gene ในงานวิจัยต่างๆ ได้ใช้วิธี Nested PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการแยกสายพันธุ์ (Snounou, et al., 1999; Ghanchi, et al., 2010; Kang, et al., 2010) ซึ่งวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ เช่น ถ้าขนาดของ DNA ที่มีจำนวนเบสต่างกันเล็กน้อยจะแยกความต่างของ band ไม่ได้ หรือหากมีลำดับเบสที่ต่างกันแต่จำนวนเบสเท่ากันก็ไม่สามารถแยกความต่างได้เช่นกัน หรือในขั้นตอนการ amplify *Pfmsp1* gene จะต้องแยก specific primer เป็น 3 หลอดในการทำ PCR รอบที่ 2 ซึ่งจะต้องใช้หลอดจำนวนมากในการทำแต่ละครั้ง ทำให้สิ้นเปลืองเวลา และค่าใช้จ่าย วิธี Heteroduplex Mobility Assay (HMA) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและราคาถูก จึงถูกนำมาศึกษาคความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ได้เป็นอย่างดี (Zou, et al., 1998; Wang, & Hiruki, 2001; Kuroiwa, et al., 2004; Soares, et al., 2004) และมีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่สามารถตรวจพบความแตกต่างของ DNA ทั้งจำนวนเบส แม้เพียง 1 เบส การเกิดเบสเพิ่มขึ้น (insertion) หรือลดลง (deletion) หรือแม้แต่การเปลี่ยนไปของเบสในตำแหน่งต่างๆ ได้ (Zou, et al., 1998)

ในการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี Nested PCR-Heteroduplex Mobility Assay (Nested PCR-HMA) เพื่อศึกษา genetic variation ของ *P. falciparum* ในประเทศไทย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* เมื่อทำ Nested PCR จะได้ PCR product ที่มี *Pfmsp1* gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 300-400 bp ครบทั้ง 79 ตัวอย่าง ซึ่งประสบความสำเร็จในการ amplify *Pfmsp1* gene คิดเป็น 100% แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูง (100%) ในการ amplify gene เป้าหมาย *Pfmsp1*

ส่วนในการศึกษาคความหลากหลายของ *Pfmsp1* gene โดยพัฒนาการตรวจหาความหลากหลายด้วยวิธี HMA ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาใน *P. falciparum* มาก่อน ผู้วิจัยได้ทดสอบสถานะอันเหมาะสมโดยใช้ DNA ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ MAD20 มาเป็น reference DNA ทำ

ปฏิกิริยากับ DNA ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ K1 ที่ได้จากการ culture และตรวจสอบ band ของ heteroduplex พบว่าการใช้ PCR product อย่างละ 5 μ l denature ที่ 98 °C 3 นาที reannealing อย่างน้อย 15 นาที run ใน polyacrylamide gel 12% และใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 10 mA ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที สามารถแยกความต่างของ homoduplex และ heteroduplex ที่เกิดได้ชัดเจน จะเห็นว่าสามารถใช้การแยกสายพันธุ์หรือความหลากหลายของเชื้อ *P. falciparum* ได้สะดวกรวดเร็ว เหมาะกับการตรวจตัวอย่างตรวจจำนวนมากพร้อมๆ กัน

เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ใช้เวลานานกว่า เช่น Kuroiwa และคณะใน ปี 2004 (Kuroiwa, et al., 2004) ที่สามารถแยกสายพันธุ์ของ Respiratory Syncytial Virus group A strain ซึ่งแยกได้ 31 pattern โดยใช้ 5% polyacrylamide gel ความต่างศักย์ 150 V เวลา 3 ชั่วโมง และจากงานวิจัยของ Wang และ Hiruki (Wang & Hiruki, 2001) ได้ใช้วิธี HMA สำหรับใช้แยก และหาความแตกต่างของ phytoplasmas ใน Aster Yellows Group และ Clover Proliferation ซึ่งใช้วิธี HMA โดยใช้ 5% polyacrylamide gel ใช้ความต่างศักย์ 200 ถึง 250 V ใช้เวลา 3 ถึง 4 ชั่วโมง แต่ก็มีงานที่ใช้เวลาน้อยกว่าการศึกษาครั้งนี้ เช่น งานวิจัยของ Soares และคณะใน ปี 2004 (Soares, et al., 2004) ศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ Enteric Adenoviruses โดยวิธี HMA พบว่าตรวจพบ 22 isolate ใช้ 6% polyacrylamide gel ความต่างศักย์ 110 V เวลารวดเร็วเพียง 75 นาที

ซึ่งความแตกต่างของการใช้ % gel และเวลาในการ run gel อาจขึ้นอยู่กับขนาดของ PCR product ที่นำมาทดสอบ HMA กระแสไฟฟ้าที่ใช้ และขนาดของแผ่น gel อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ gel 12% ในขนาด gel 0.75 mm 10×10 cm. และใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง 30 นาที ก็สามารถแยกความหลากหลายของ *Pfmsp1* gene ได้ จึงจัดว่าเป็นการทดสอบที่สะดวกรวดเร็ว และราคาประหยัด

การตรวจสอบคุณภาพของการทดสอบด้วย HMA ที่พัฒนาขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3.4-3.5 พบว่า การทดสอบมีความแม่นยำสูง แสดงจากการตรวจวัดค่า MI สำหรับ heteroduplex band ซึ่งให้ค่าความแปรปรวนหรือ CV เท่ากับ 5.59% และในการตรวจวัดค่า MI สำหรับ single stranded DNA band ให้ค่า CV เท่ากับ 8.26% จัดว่ามีความคลาดเคลื่อนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (<10%) นอกจากนี้การทดสอบซ้ำ ยังแสดงให้เห็นว่าผลการตรวจซ้ำ 3 ครั้ง ในตัวอย่างตรวจเดียวกันจำนวน 10 ตัวอย่าง ให้ผลของ MI ที่จัดเป็น allelic variation No. เหมือนเดิม รวมทั้งการตรวจสอบ heteroduplex band ที่เกิดขึ้นได้จำนวน band เท่าเดิมทุกตัวอย่างตรวจ แสดงให้เห็นว่าการทดสอบ HMA ที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้องแม่นยำเชื่อถือได้

จากการทดสอบ HMA ที่พัฒนาขึ้น ระหว่าง reference DNA สายพันธุ์ MAD20 กับสายพันธุ์ K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวที่เพาะเลี้ยงไว้ พบว่าเกิด heteroduplex 1 band จะสามารถบ่งชี้ว่ามีเชื้อ 1 สายพันธุ์ในตัวอย่างตรวจ นอกจากนี้การทดสอบแสดงให้เห็นว่า

หากทดสอบสายพันธุ์เดียวกันเช่น reference MAD20 กับ reference MAD20 หรือ K1 กับ K1 จะไม่เกิด heteroduplex band ขึ้น แต่จะพบเพียง homoduplex band อย่างเดียว แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องของวิธี HMA ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ (accuracy 100%) และพบว่าจากการทำ nucleotide sequencing สายพันธุ์ K1 มีลำดับเบสแตกต่างจาก reference DNA ทั้งนี้เมื่อเทียบลำดับเบสของ *Pfmsp1* reference DNA กับ K1 culture พบว่ามีขนาดต่างกัน 82 bp และมีความเหมือนกัน (similarity) เพียง 77 % (โดย BLAST Assembled RefSeq Genomes) ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มของ K1 ตามค่า MI ที่มีค่าในกลุ่ม II (highly different)

จากการทดสอบความถูกต้องแม่นยำทั้งหมดดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการทดสอบ HMA ที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้องแม่นยำเชื่อถือได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่ได้ทำ nucleotide sequencing ของเชื้อที่แยกได้ เพื่อเป็นการยืนยันผล จึงควรศึกษาด้วยลำดับเบสของสายพันธุ์ของเชื้อต่อไป

การนำ Nested PCR-HMA ที่พัฒนาขึ้นนี้ ทดสอบกับตัวอย่างตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่าง พบว่า โดยวิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 108 isolate และจัด allelic variation No. ต่างๆ ตามค่า MI พบว่าการศึกษาจากการพัฒนาวิธี HMA และใช้ MAD20 เป็น reference DNA สามารถตรวจพบ allele variation ได้ทั้งสิ้น 23 variants แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาความหลากหลายของ *P. falciparum* ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่อยู่ใน family MAD20 และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง จึงตรวจพบความหลากหลายของเชื้อจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ความถี่ของ family MAD20 จะพบมากในประเทศไทย พบที่ อิหร่าน ปากีสถาน และ โคลอมเบีย (Snounou, et al., 1999; Gomez, et al., 2002; Kang et al., 2010) ในขณะที่ประเทศฝรั่งเศส กัวน่า และเปรู จะพบความถี่ของ family K1 มากกว่า (Ariey, et al., 1999; Takala, et al., 2002) อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่าหากพัฒนาวิธี HMA โดยเพิ่ม reference DNA ทั้ง 3 family อาจช่วยแยกสายพันธุ์ได้ละเอียดมากยิ่งขึ้น และอาจพัฒนาให้สามารถระบุ family และ subfamily ได้ด้วย

ผลการศึกษาโดยเทคนิค Nested PCR-HMA ในครั้งนี้ พบความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *P. falciparum* มากกว่าที่เคยศึกษาในประเทศไทย เช่น การศึกษา genetic variation ของ *Pfmsp1* gene ด้วยวิธีอื่นๆ พบว่า จากงานวิจัย ของ Snounou และคณะ ในปี 1999 (Snounou, et al., 1999) ศึกษาความแตกต่างของยีน *Pfmsp1* ในประชากรไทย วิเคราะห์ด้วยวิธี Nested PCR โดยศึกษาทั้ง 3 family คือ family allele K1, MAD20 และ RO33 พบว่ามี alleles variation 10 variants อย่างไรก็ตามอาจแตกต่างในช่วงเวลาในการศึกษา สถานที่ศึกษา และจำนวนตัวอย่างตรวจ ดังนั้นควรทำการศึกษาทั้งสองวิธีในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของทั้งสองวิธีในการแยกความหลากหลายของสายพันธุ์ที่แท้จริงต่อไป

อย่างไรก็ตามการพบ allele variation จำนวนมากในครั้งนี้ อาจเป็นไปได้เช่นกันว่า เชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยมีความหลากหลายของสายพันธุ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา (Zwetyenga, et al., 1998; Farnert, et al., 1999; Hoffmann, et al., 2001; Aubouy, et al., 2003; Aliehsan, et al., 2007;) รายงานว่า ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์มาก อาจหมายถึงมีการแพร่กระจายการติดเชื้อมาก ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับเชื้อดื้อยา และการเคลื่อนย้ายของผู้คนจากแหล่งระบาด ซึ่งสอดคล้องกับสถานะของประเทศไทยที่พบเชื้อที่ดื้อต่อยามากขึ้น และมีการเคลื่อนย้ายแรงงานต่างด้าวเข้าสู่ประเทศไทยมากขึ้น (กรมการจัดหางาน สำนักบริหารแรงงานต่างด้าว, 2552) จึงสมควรศึกษาเพิ่มเติมและเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อต่อไป

จากงานวิจัยในต่างประเทศที่ศึกษาความหลากหลายของ *Pfmsp1* gene ด้วยวิธี Nested PCR ต่อการตรวจหา allele variation ทั้ง 3 family ของ *P. falciparum* พบความหลากหลายของสายพันธุ์แตกต่างกันในแต่ละประเทศ เช่น งานวิจัยของ Aubouy และคณะ (Aubouy, et al., 2003) ในปี ค.ศ 2003 ได้ศึกษา polymorphism ใน *Pfmsp1* ในประเทศอาร์เจนติน่า ด้วยวิธี Nested PCR พบว่า allele variation ทั้งหมด 25 variants จากการศึกษารายงานของ Aliehsan และคณะ (Aliehsan, et al., 2007) โดยได้ศึกษาจาก polymorphism ของยีน *Pfmsp1* ที่แยกได้จากประเทศอิหร่าน ในปี ค.ศ 2007 ด้วยวิธี Nested PCR พบ allele variation ทั้งหมด 9 variants จากการศึกษายีน *Pfmsp1* ของ *P. falciparum* ในประเทศปากีสถาน โดย Ghanchi และคณะ (Ghanchi, et al., 2010) ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษาดังแต่ปี ค.ศ. 2005-2007 พบแบบแผนของ allele variation ของ *Pfmsp1* ทั้งหมด 25 variants และจากรายงานการวิจัยของ Kang และคณะ (Kang, et al., 2010) ในปี ค.ศ. 2010 ทำการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Pfmsp1* ในประเทศพม่า โดยวิธี Nested PCR พบ allele variation ทั้งหมด 15 variants

เมื่อแยก allele variation ของ *P. falciparum* ที่พบในแต่ละภูมิภาค พบว่าภาคตะวันตกพบ allele variation มากที่สุดจำนวน 20 variants รองมาคือ ภาคเหนือ พบจำนวน 11 variants และภาคใต้พบน้อยที่สุดจำนวน 7 variants ในภาคตะวันตกพบ genetic diversity มากกว่าภาคอื่นๆ อาจสอดคล้องกับการอยู่อาศัย การเคลื่อนย้ายเดินทางระหว่างชายแดนไทยที่ติดต่อกับเพื่อนบ้าน โดยทางภาคตะวันตกเป็นเขตติดต่อกับประเทศพม่า ซึ่งจะมีการเคลื่อนย้ายเข้ามาอาศัยทำงาน หรือเดินทางไปมาระหว่างทั้งสองประเทศ (กรมการจัดหางาน สำนักบริหารแรงงานต่างด้าว, 2552) ซึ่งเขตพื้นที่ดังกล่าวจัดเป็นพื้นที่ระบาดของมาลาเรีย และพบเชื้อดื้อยาเป็นจำนวนมาก (Mutsuo, et al., 2003) อาจเป็นปัจจัยการแพร่ระบาดของเชื้อต่างสายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าวได้ง่ายขึ้น

จากการสำรวจการติดเชื้อ *P. falciparum* มากกว่า 1 สายพันธุ์ หรือ multiplicity of infection (MOI) พบว่าภาคเหนือมีค่า MOI เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 1.55 รองมาคือภาคตะวันตก MOI เฉลี่ยเท่ากับ 1.41 และภาคใต้พบว่ามีค่า MOI เฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 1.06 โดยมีค่า MOI เฉลี่ยเท่ากับ 1.35

ซึ่งแสดงว่ามีอัตราการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ในผู้ติดเชื้อ 1 คน ทั้งนี้ใกล้เคียงกับงานวิจัยต่างๆ เช่น เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Snounou และคณะ ในปี 1999 (Snounou, et al., 1999) การติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ ในประเทศไทยซึ่งทำการสำรวจ 4 ครั้ง พบว่า ค่า MOI เท่ากับ 1.87, 1.55, 1.83 และ 1.59 ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Ghanchi และคณะ (Ghanchi, et al., 2010) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ใน 3 พื้นที่ของประเทศปากีสถาน พบว่ามีค่า MOI เฉลี่ย 1.26, 1.23 และ 1.11 ตามลำดับ การวิจัยของ Kang และคณะ (Kang, et al., 2010) ในปี ค.ศ. 2010 ทำการศึกษาในประเทศพม่าพบว่า ค่า MOI เท่ากับ 2.03 แต่แตกต่างกับวิจัยที่ของ Baruah และคณะในปี 2009 (Baruah, et al., 2009) ในประเทศอินเดีย พบว่ามีอัตราการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ ที่สูงกว่างานวิจัยครั้งนี้ โดยมีค่า MOI เฉลี่ยเท่ากับ 3.31, 3.52 และ 4.12 ตามลำดับ

จากตารางที่ 3.9 พบว่าผู้ติดเชื้อในภาคเหนือมีแนวโน้มพบการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ มากกว่าภาคอื่นๆ และภาคใต้พบว่าผู้ติดเชื้อเกือบทั้งหมด (94.11%) พบการติดเชื้อ 1 สายพันธุ์ และจากผลการวิจัยรายงานว่าการติดเชื้อผสมมากกว่า 1 สายพันธุ์เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ (Raj, et al., 2004; Heidari, et al., 2007) ผู้ติดเชื้อในภาคเหนือมีแนวโน้มพบการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ อาจสอดคล้องกับรายงานการรักษาผู้ติดเชื้อในภาคเหนือ ซึ่งมีอัตราการรักษาหายต่ำกว่าภาคอื่นๆ โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับภาคใต้ซึ่งมีอัตราการรักษาหายสูงที่สุด (Chaijaroenkul, et al., 2005)

ทั้งนี้จากการตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ดังกล่าว อาจมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ตัวเชื้อเองซึ่งมีกลไกการสร้างความหลากหลายของพันธุกรรม ทำให้เชื้อหลบหนีจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อเอง และเชื้อมีการดื้อต่อยาต้านมาลาเรียมากขึ้น รวมทั้งการอพยพเคลื่อนย้าย การเดินทางระหว่างประเทศจากแหล่งระบาดเพิ่มมากขึ้น (Ntoumi, et al., 1995; Bendixen, et al., 2001; Hoffman, et al., 2001; Aubouy, et al., 2003) หรืออาจเกิดจากการ cross fertilization meiotic recombination ระหว่างมีการเจริญในยุง (Snounou, et al., 1999; Raj et al., 2004)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวน parasitemia กับจำนวนการติดเชื้อ (MOI) พบว่าจำนวนตัวอย่างตรวจทั้งหมด 79 ตัวอย่าง พบว่าผู้ที่ติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ มีค่าเฉลี่ยของ parasitemia ต่ำกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อ 1 สายพันธุ์ เล็กน้อย (21.88 vs. 25.00 Parasite/ $\mu\text{l} \times 10^3$) แสดงในตารางที่ 3.10 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แสดงให้เห็นว่าจำนวนของสายพันธุ์ของการติดเชื้ออาจไม่เกี่ยวข้องกับจำนวน parasitemia ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Aubouy และคณะในปี 2003 (Aubouy et al., 2003) แต่ต่างจากงานวิจัยของ Mutsuo และคณะในปี 2003 (Mutsuo, et al. 2003)

ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ของเชื้อ พบว่าจากการแบ่งกลุ่มดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบ genetic variation ของ *Pfmsp1* gene ในแต่ละภูมิภาค พบว่าภาคเหนือจัดอยู่ในกลุ่ม III (Moderate different) มากที่สุดจำนวน 7 isolates (41.20%) ภาคตะวันตก

จัดอยู่ในกลุ่ม II (Highly different) มากที่สุดจำนวน 30 isolates (41.50%) และภาคใต้จัดอยู่ในกลุ่ม V (Mostly similar) มากที่สุด จำนวน 10 isolates (55.50%) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ของเชื้อมีการแพร่ระบาดในบริเวณที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามควรศึกษาตัวอย่างในแต่ละภูมิภาคให้มากขึ้นเพื่อวิเคราะห์หัยสำคัญทางสถิติ

ในด้านสัญชาติพบว่าผู้ติดเชื้อที่มีสัญชาติไทย และสัญชาติพม่าติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม II มากที่สุด จำนวน 31 isolates, 4 isolates (38.27% vs 50.00%) ตามลำดับ สัญชาติกระเหรี่ยง ติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม III มากที่สุด ผู้ติดเชื้อที่มีเชื้อชาติมอญและสัญชาติลาว ติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม III และกลุ่ม V ตามลำดับ โดยการติดเชื้อในสัญชาติไทย กระเหรี่ยง และพม่าส่วนใหญ่จัดอยู่กลุ่มเดียวกัน (II,III) อาจแสดงว่าเชื้อในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุในการติดต่อระหว่างประเทศดังกล่าว ซึ่งจากรายงานสถานการณ์ของผู้ติดเชื้อพบว่า ผู้ป่วยไทยติดเชื้อจำนวน 4,715 ราย และผู้ป่วยต่างชาติติดเชื้อจำนวน 4,747 ราย (สำนักงานโรคติดต่อเฝ้าระวัง, 2553) โดยอัตราการติดเชื้อที่เพิ่มมากขึ้นอาจมีสาเหตุจากในปัจจุบันมีการติดต่อและอพยพของแรงงานต่างชาติเข้ามาในประเทศไทยมากขึ้น และจากรายงานสถานการณ์การเคลื่อนย้ายแรงงานต่างชาติเข้าสู่ประเทศไทยพบว่า ส่วนใหญ่แรงงานต่างด้าวที่เข้ามาจะเป็นกลุ่มคนจากประเทศพม่า (82%) ประเทศลาว (8%) และประเทศกัมพูชา (10%) (กรมการจัดหางาน สำนักบริหารแรงงานต่างด้าว, 2552) อย่างไรก็ตามควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างของคนต่างสัญชาติให้มากขึ้นเพื่อวิเคราะห์หัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ parasitemia พบว่าในกลุ่ม V มีค่า parasitemia เฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ 18.09×10^3 parasite/ μ l สอดคล้องกับการพบเชื้อกลุ่มนี้มากในภาคใต้ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการรักษาหายมากที่สุด จึงอาจเกี่ยวข้องกับทำให้พบความรุนแรงของเชื่อน้อย จึงมีจำนวน parasitemia ต่ำในผู้ที่ติดเชื้อกลุ่มนี้ และสอดคล้องกับรายงานการศึกษายีนดื้อยา ของจารูวรรณ กรานเกตุและคณะ, 2552 (Chaijaroenkul, et al., 2005, จารูวรรณ กรานเกตุและคณะ, 2552) พบว่ามี mutation ของ *Pfmdr1* น้อยที่สุดในภาคใต้

จากการศึกษาปัจจัยด้านการดื้อยากับ genetic variation พบว่า *Pfmdr1* 86 ที่เป็น mutant พบในกลุ่ม V มากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่ม II และการเกิด co-mutation ระหว่าง *Pfmdr1*86 และ *Pfcr*76 พบในกลุ่ม V และกลุ่ม II มากที่สุดเช่นเดียวกัน ซึ่งข้อมูลยังไม่สามารถชี้ให้เห็นถึงความต่างได้ชัดเจน เนื่องจากตัวอย่างตรวจที่ใช้ในการศึกษาน้อยเพียง 25 ตัวอย่าง และในแต่ละกลุ่มมีตัวอย่างไม่เท่ากัน หรือบางกลุ่มไม่มีตัวอย่างตรวจ จึงควรเพิ่มตัวอย่างตรวจให้มากเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อกับอัตราการดื้อยาต่อไป

ส่วนการพบยีนดื้อยาของเชื้อ *P. falciparum* กับจำนวนสายพันธุ์ของการติดเชื้อพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ($P < 0.05$) อาจเป็นไปได้ว่า การติดเชื้อมากกว่า 1 มากกว่า 1 สายพันธุ์ ไม่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการดื้อยาของเชื้อ

ข้อจำกัดอีกอย่างของการศึกษาเรื่องปัจจัยการดื้อยาของเชื้อคือ วิธี Multiplex nested PCR-RFLP ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีปัญหาในการ amplify gene *Pfmdr1* และ *Pfcr1* ซึ่งการศึกษานี้พบว่าสามารถ amplify gene ได้สำเร็จเพียง 58.14% (25 ตัวอย่าง จาก 43 ตัวอย่าง) จึงทำให้จำนวนตัวอย่างเกี่ยวกับ mutation ของยีนดื้อยาไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ allele variation ซึ่งอาจปัญหาดังกล่าวเกิดได้หลายสาเหตุ ได้แก่ เกิดจากการที่ต้องใช้ primer ถึง 2 คู่ในรอบเดียวกัน อาจมีปัญหาหรือความสมมูลย์ของ template และ primer หรือ T_m ไม่พอเหมาะกัน หรืออาจมีสาเหตุจากการปนเปื้อนของ enzyme หรือมีสารรบกวนปฏิกิริยาของ PCR

สรุปว่าจากงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษา genetic diversity ของเชื้อ *P. falciparum* โดยการศึกษ *Pfmsp1* blok2 ด้วยวิธี Nested PCR-HMA ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งใช้ *P. falciparum* MAD20 เป็น reference DNA พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำสูง (CV= 5.59%), ความถูกต้องสูง (accuracy เท่ากับ 100%) จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถทำได้ง่าย ตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้ในเวลารวดเร็ว ราคาประหยัด เมื่อนำ Nested PCR-HMA ที่พัฒนาขึ้นไปตรวจในตัวอย่างเลือด 79 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 108 isolates สามารถจำแนก allele variation ได้หลากหลายถึง 23 variants และตรวจพบการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ คิดเป็น 35.44% โดยมีค่า MOI เฉลี่ย 1.35 และพบว่าผู้ติดเชื้อในภาคตะวันตกมี genetic diversity มากกว่าภาคอื่นๆ โดยปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องกับชนิดของสายพันธุ์ และความหลากหลายของสายพันธุ์ ได้แก่ ภูมิภาคหรือพื้นที่ที่อาศัย ลักษณะของผู้ติดเชื้อ การดื้อยา และ parasitemia ควรต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมให้มีจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเพิ่มมากขึ้น เพื่อการทดสอบทางสถิติที่ถูกต้องมากขึ้น

ดังนั้นการพัฒนา Nested PCR-HMA ขึ้นในครั้งนี้ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถนำไปตรวจกรองเพื่อศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของ *P. falciparum* *Pfmsp1* อันเป็นพื้นฐานสำคัญของระบาดวิทยาของเชื้อ และมีประโยชน์ในการออกแบบวัคซีนให้ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ รวมทั้งประโยชน์ในการวินิจฉัย และติดตามสายพันธุ์ที่มีการระบาดในแต่ละพื้นที่ อีกทั้งสามารถนำไปใช้ตรวจกรองเพื่อบ่งชี้ถึงการติดเชื้อซ้ำได้ (recrudescence) หรือการติดเชื้อใหม่ (new infection) หรือการติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ ได้อย่างรวดเร็ว เพื่อประโยชน์ในการศึกษาประสิทธิภาพของยาที่จะมีผลต่อการกำหนดแนวทางการรักษาต่อไป อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่สามารถทำ nucleotide sequencing ของเชื้อที่แยกได้เพื่อเป็นการยืนยันผล จึงควรศึกษาด้วยลำดับเบสของสายพันธุ์ต่อไป

บรรณานุกรม

- กรมการจัดหางาน สำนักบริหารแรงงานต่างด้าว. (2552), ค้นเมื่อ 26 มีนาคม 2553, <http://wp.doe.go.th/>
- จารุวรรณ กรานเกตุ, กุลพิมล นรเกียรติคุณ, พรทิพย์ รุ่งเรือง, ศิริรัตน์ สุทธิศิริ. (2552). การสำรวจความชุกของยีนดื้อยา (*mdr1*) และ (*crt*) ของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม ในประเทศไทย โดยวิธี *Multiplex Nested PCR-RFLP*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยรังสิต.
- จิรพัฒน์ สิริชัยธพ. (2549). *ระบาดวิทยาและความสำคัญของโรคมาลาเรีย*. กรุงเทพฯ: รวมทรรศน์ตระหนักจิต หาริมสูตร, ดนัย บุนนาค, แทน จงสุขชัยสิทธิ์, สดศรี ไทยทอง, ชันตรา เหล่าถาวร, และคนอื่นๆ. (2534). *การดื้อยาของมาลาเรีย*. กรุงเทพฯ: รวมทรรศน์.
- สมชาย จงวุฒิเวศย์ และ อุษา ทิษยากร (บก.). (2549). *มาลาเรีย*. กรุงเทพฯ: ชนาเพลส.
- สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค สถานการณ์โรคมาลาเรีย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.thaivbd.org/cms/index.php>. (วันที่ค้นข้อมูล: 25 เมษายน 2555).
- Abdoulaye, D., Pharm, D., Ogobara, K., Doumbo, J. F., & Cortese, B.S. (2001). A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 344.
- Ariey, F., Chalvet, W., Hommel, D., Peneau, C., Hulin, A., Mercereau-Puijalon O., et al. (1999). *Plasmodium falciparum* parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate. *Am J Trop Med Hyg*, 61, 978-985.
- Aubouy, A., Nabias, F.M., & Deloron, P. (2003). Polymorphism in two merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon. *Malar J*, 10, 1475-2875.
- Baruah, S., Lourembam, D.S., & Sawian E.C. (2009). Temporal and spatial variation in MSP1 clonal composition of *Plasmodium falciparum* in districts of Assam, Northeast India. *Infection*, 853-859.
- Beck, H.P., Felger, I., Huber, W., Steiger, S., Smith, T., Weiss, N., & Tanner, M. (1997). Analysis of multiple *plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the Phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J Infect Dis*, 175, 921-926.
- Bendixen, M., Msangeni, H.A., Pedersen, B.V., Shayo, D., & Bodker, R. (2001). Diversity of *Plasmodium falciparum* populations and complexity of infections in relation to

- transmission intensity and host age: a study from the Usambara Mountains, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95,143-8.
- Brockman, A., Paul, R.E., Anderson, T., Hackford, J., Phaiphun, I., Looareesuwan, S.L., et al. (1999). Application of genetic markers to the identification of recrudescing *Plasmodium falciparum* infections on the northwestern border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 60(1), 14-21.
- Chaijaroenkul, W., Na Bangchang, K., Mungthin, M., & Stephen A.W. (2005). *In vitro* antimalarial drug susceptibility in Thai border areas from 1998–2003. *Malar J*, 4, 37-42.
- Chaijaroenkul, W., Wisedpanichkij, R., Na –Bangchang, K. (2010). Monitoring of *in vitro* susceptibilities and molecular markers of resistance of *Plasmodium falciparum* isolates from Thai -Myanmar border to chloroquine, quinine, mefloquine and artesunate. *Acta Trop*, 113 (2): 190-4.
- Congpuong, K., Bangchang, N.K., Mungthin, M., Bualombai, P., & Wernsdorfer, H.W. (2005). Molecular epidemiology of drug resistant marker of *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol*, 10, 717-722.
- Cowman, A.F., Karcz, S., Galatis, D., & Culvenor, J.G. (1991). A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J cell Biol*, 113, 1033-1042.
- Dev, V., Hira, C.R., & Rajkhowa, M.K. (2001). Malaria attributable morbidity in Assam, north-eastern India. *Ann Trop Med Parasitol*, 95, 789-796..
- Ellis, J.S., & Zambon, M.C. (2001). Combined PCR- heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses for different animal species. *J Clin Microbiol*, 4097-4102
- Ghanchi, N.K., Mårtensson, A., Ursing, J., Jafri, S., Bereczky, S., & Hussain, R. (2010). Genetic diversity among *Plasmodium falciparum* field isolates in Pakistan measured with PCR genotyping of the merozoite surface protein 1 and 2. *Malar J*, 10, 1475-2875.
- Gomez, D., Chaparro, J., Rubiano, C., Rojas, M.O., & Wasserman, M. (2002). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* field samples from an isolated Colombian village. *Am J Trop Med Hyg*, 67, 611-616.
- Guerra, C.A., Snow, R.W., & Hay, S.I. (2006). Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends in Parasitol*, 22, 353-258.

- Haddad, D., Sunounou, G., Mattei, D., Enamorado, I.G., Figueroa, J., Stahl, S., et al. (1999). Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am J Trop Med Hyg*, 60, 30-34.
- Heidari, A., Keshavarz, H., Mohammad, R.B., & Jelinek, T. (2007). Genetic diversity in merozoite surface protein (MSP)-1 and MSP-2 genes of *Plasmodium falciparum* in a major endemic region of Iran. *Korean J Parasitol*, 45(1), 59–63.
- Hoffmann, E.H., Silveira, L.A., Tonhosolo, R., Pereira, F.J., Ribeiro W.L., Tonon A.P., et al. (2001). Geographical patterns of allelic diversity in the *Plasmodium falciparum* malaria-vaccine candidate, merozoite surface protein-2. *Am Trop Med Parasitol*, 95, 117-32.
- Joshi, H., Valecha, N., Verma, A., Kaul, A., Mallick, P.K., Shalini, S., et al. (2007). Genetic structure of *Plasmodium falciparum* field isolates in eastern and north-eastern India. *Malar J*, 10, 1475-2875.
- Kang, J., Moon, S.U., Kim, J.Y., Cho, S.H., Lin, K., Sohn W.M., et. al. (2010). Genetic polymorphism of merozoite surfaceprotein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* field isolates from Myanmar. *Malar J*, 9, 131.
- Kirsten, M., Inger, L., Hedvig, P., Artur, S., & Mats, W. (2008). Methods in Malaria Research. p199.
- Kuroiwa, Y., Nagai, K., Okita, L., & Tsutsumi, H. (2004). Genetic variability and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus subgroup a strains in Japan determined by heteroduplex mobility assay. *J Clin Microbiol*, 2048–2053.
- Matsuo, T., Shirakawa, T., Singhasivanon, P., Looareesuwan, S., & Kawabata, M. (2003). Effects of mefloquine usage on genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* in Thai-Myanmar border. *Kobe J Med Sci*, 49(5-6), 143-151.
- Maria, I.V., Pedro, E.F., Anders, B., & Jose, P.G. (2006). Multiplex-PCR RFLP methods for *pfprt*, *pfmdr1* and *pfdhfr* mutations in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular*, 20, 100-104.
- Montoya, L., Maestre, A., Carmona, J., Lopes, D., Rosario. V., & Blair, S. (2003). *Plasmodium falciparum*: diversity studies of isolates from two Colombian regions with different endemicity. *Exp Parasitol*, 104, 14-19.

- Ngrenngamlert, W., Kwiek, J.J., Kamwendo, D.D., Ritola, K., Swanstrom, R., Wongsrichanalai, C., et al. (2005). Measuring allelic heterogeneity in *Plasmodium falciparum* by a heteroduplex tracking assay. *Am J Trop Med Hyg*, 72(6), 694-701.
- Ntoumi, F., Contamin, H., Rogier, C., Bonnefoy, S., & Trape, J.F. (1995). Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg*, 52,81-8.
- Paul, R.E.L., Hackford, I., Brockman, A., Muller-Graf, C., Price, R., Luxemburger, C., et al. (1998). Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the Northwestern border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 58, 195-203.
- Paul, R.E.L., Packer, M.J., Walmsey, M., Lagoon, M., Ranford-Cartwright, L.C., Paru R, & Day, K.P. (1995). Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. *Science*, 269, 1709-1711.
- Raj, D.K., Das, B.R., Dash, A.P., & Supakar, P.C. (2004). Genetic diversity in the *msp1* gene of *Plasmodium falciparum* in different malaria endemic localities. *Am J Trop Med Hyg*, 71,285-289.
- Sharma, S.K., Tyagi, P.K., Padhan, K., Upadhyaya, A.K., Haque, M.A., Nanda, M., et al. (2006). Epidemiology of malaria in the forest and plain ecotypes of Sundergarh District, Orissa, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100, 917-925.
- Snounou, G., & Beck, H.P. (1998). The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol Today*, 14, 462-467.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jarra, W., Pinheiro, L., Thaithong, S., & Brown, K.N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 61, 315-320.
- Snounou, G., Zhu, X., Siripoon, N., Jarra, W., Thaithong, S., Brown, K.N., et al. (1999). Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93, 369-374.
- SNP genotyping. (ม.ป.ป.). ค้นเมื่อ 15 มีนาคม 2553, http://en.wikipedia.org/wiki/SNP_genotyping
- Soares, C.C., Volotao, E.M., Carolina, M., Nozawa, C.M., Linhares R.E.C., Volokhov, D., et al. (2004). Genotyping of enteric adenoviruses by using single-stranded conformation polymorphism analysis and heteroduplex mobility assay. *J Clin Microbiol*, 1723-1726.

- Wang, K., & Hiruki, C. (2001). Use of Heteroduplex mobility assay for identification and differentiation of phytoplasmas in the aster yellows group and the clover proliferation group. *Phytopathology*, 91(6), 546-552.
- Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., Rosario, V.E., Gwadz R.W., Walker, J.A., et al. (1990). Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, 345, 253-255.
- Zou, S., & Bridge, J. (1998). Identification of new influenza B Virus variants by multiplex reverse transcription-PCR and the heteroduplex mobility assay. *J Clin Microbio*, 1544–1548.

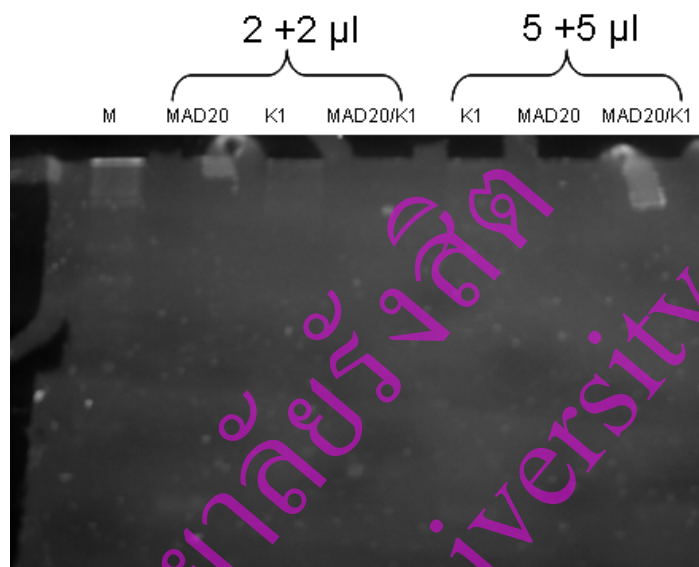
มหาวิทยาลัยรังสิต
Rungsit University

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rungsit University

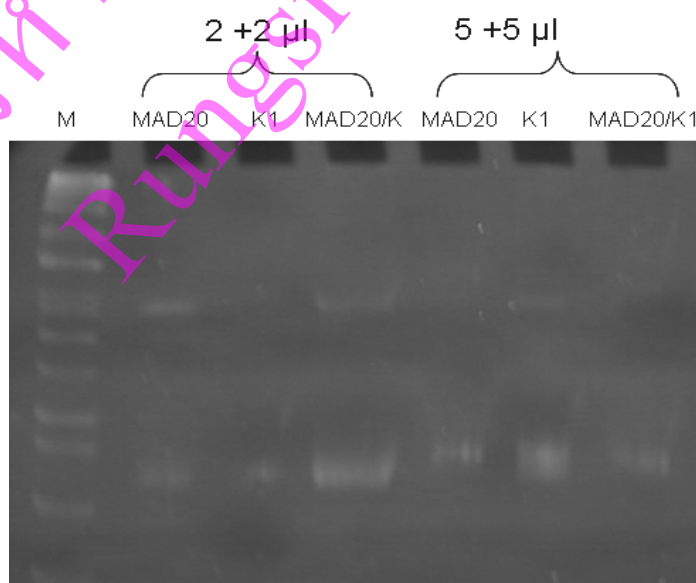
ภาคผนวก

1. การทดสอบความเหมาะสมของปริมาณ DNA และความเข้มข้นของ polyacrylamide gel

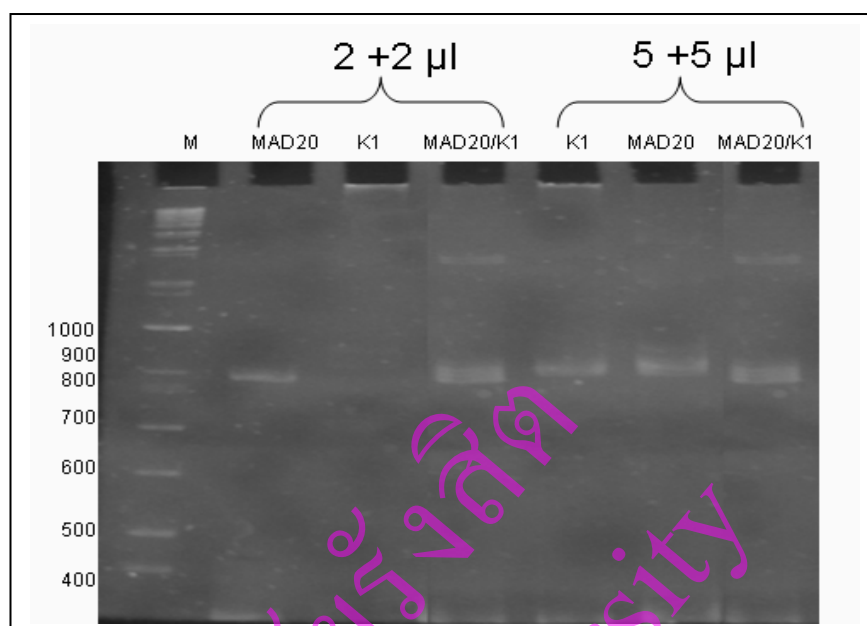
โดยใช้ปริมาณเท่ากัน 2 แบบคือ อย่างละ 2 μ l และ 5 μ l โดยให้เกิด denature ที่ 98° C 3 นาที และ 5 นาที ใช้สภาวะ reannealing ที่อุณหภูมิ 4 °C นานอย่างน้อย 15 นาที และนำไป run polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6%, 8% และ 12% โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 10 mA ดังรูป



แสดงผล HMA โดยไม่พบ homoduplex และ heteroduplex ระหว่าง สายพันธุ์ MAD20 กับ สายพันธุ์ K1 ที่ได้จากการ culture โดยใช้ 6% polyacrylamide gel และใช้กระแสไฟฟ้า 10 mA



แสดงผล HMA โดยไม่พบ homoduplex และ heteroduplex ระหว่าง สายพันธุ์ MAD20 กับสายพันธุ์ K1 ที่ได้จากการ culture โดยใช้ 8% polyacrylamide gel และใช้กระแสไฟฟ้า 10 mA



แสดงผล HMA โดยไม่พบ homoduplex และ heteroduplex ระหว่าง สายพันธุ์ MAD20 กับสายพันธุ์ K1 ที่ได้จากการ culture โดยใช้ 8% polyacrymide gel และใช้กระแสไฟฟ้า 10 mA

2. แสดงข้อมูลจำนวน heteroduplex และค่า Mobility index (MI%) ทั้ง 3 ภูมิภาค จำนวน 79 ตัวอย่าง

Region	Sample No.	Numbers of Heteroduplexs	MI %			Pattern of Homoduplex	
			Band 1	Band 2	Band 3	Shift	No shift
North (N=11)	H9	1	10.45	-	-	-	-
	H13	2	10.45	19.40	-	-	-
	H14	2	16.52	17.39	-	-	-
	H18	2	8.70	10.43	-	-	-
	H19	2	10.45	19.40	-	-	-
	H21	1	14.29	-	-	-	-
	H22	0	-	-	-	1	-
	H24	1	7.69	-	-	-	-
	H25	2	7.69	15.38	-	-	-
	H27	2	6.54	10.28	-	-	-
	H28	1	5.48	-	-	-	-
South (N=17)	G1	1	5.48	-	-	-	-
	G2	1	5.48	-	-	-	-
	G3	1	5.48	-	-	-	-
	G6	0	-	-	-	-	1
	G7	0	-	-	-	-	1
	G8	1	11.94	-	-	-	-
	G10	2	7.46	14.93	-	-	-
	G11	1	5.32	-	-	-	-
	BT7	0	-	-	-	-	1
	BT10	0	-	-	-	-	1
	BT15	0	-	-	-	-	1
	BT16	0	-	-	-	1	-
	BT17	0	-	-	-	-	1
	BT18	0	-	-	-	-	1
	BT19	0	-	-	-	-	1

	BT21	0	-	-	-	-	1
	BT22	0	-	-	-	-	1
West (N=51)	P1	0	-	-	-	-	1
	P2	2	7.59	12.66	-	-	-
	P3	2	8.75	16.25	-	-	-
	P5	2	8.75	16.25	-	-	-
	P6	2	7.50	20.00	-	-	-
	P8	2	8.25	6.19	-	-	-
	P13	1	8.47	-	-	-	-
	P26	2	7.59	17.72	-	-	-
	P27	0	-	-	-	-	1
	P35	1	8.77	-	-	-	-
	P37	1	8.82	-	-	-	-
	P40	0	-	-	-	-	1
	P43	2	7.41	14.81	-	-	-
	P44	2	9.20	21.84	-	-	-
	P45	2	9.20	16.09	-	-	-
	P46	2	7.14	10.00	-	-	-
	P49	0	-	-	-	-	1
	P61	0	-	-	-	-	1
	P65	1	8.75	-	-	-	-
	P66	0	-	-	-	-	1
	P67	2	8.57	10.48	-	-	-
	P68	2	7.84	12.75	-	-	-
	P69	1	7.69	-	-	-	-
	P78	0	-	-	-	-	1
	P82	2	6.33	11.39	-	-	-
S22	1	6.33	-	-	-	-	
S23	1	11.00	-	-	-	-	
S24	0	-	-	-	-	1	
S25	0	-	-	-	-	1	

	S38	2	8.57	14.29	-	-	-
	S43	2	10.53	-	-	-	-
	S46	2	7.50	20.00	-	-	-
	S48	2	5.13	14.10	-	-	-
	S49	1	11.54	-	-	-	-
	S50	2	14.53	15.38	-	-	-
	S52	1	6.78	-	-	-	-
	S53	1	14.10	-	-	-	-
	S55	3	3.95	7.89	14.47	-	-
	S60	2	3.95	7.89	-	-	-
	S63	1	3.95	-	-	-	-
	S64	1	11.76	-	-	-	-
	S65	1	11.76	-	-	-	-
	S66	1	11.54	-	-	-	-
	S67	1	11.11	-	-	-	-
	S68	0	-	-	-	-	1
	S70	0	-	-	-	-	1
	S71	1	13.46	-	-	-	-
	S72	2	10.58	15.38	-	-	-
	S73	0	-	-	-	-	1
	S74	0	-	-	-	1	-
	S76	2	5.88	9.80	-	-	-

3. Restriction site ของ ApoI

ApoI restriction enzyme

Restriction Site Sequence After Cut:

```
...R AATTY...
...YTTAA R...
```

R = Purine (A/G)

Y = Pyrimidine (C/T)

```

M2Fw      : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----AGAG :
pfmdr1_3D7 : ATGGGTA AAGAGCAGAAAAGAGAAAAAGATGGTAA CCTCAGTATCAAAGAAGAGGTTGAAA AAGAGTTGAACAAAAGAG :
M2Rev'    : -----AGAG-----

M2Fw      : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160----- :
pfmdr1_3D7 : TACCGCTGAATTATTTAG-----TACCGCTGAATTATTTAGAAAAATAAAGAA TGAGAAAATATCATTTTTTTTACCCTTTAAATGTTACCTGCACAACATA :
M2Rev'    : -----AGAG-----

M2Fw      : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240----- :
pfmdr1_3D7 : GAAAATTATTA TTTATATCATTTGTATGTGCTGTATTTATCAGGAGGAACATTACCTTTTTTTATATCTGTGTTTGGTGTA :
M2Rev'    : -----AGAG-----

M2Fw      : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320----- :
pfmdr1_3D7 : ATATTAAAGAACATGAAATTAGGTTGATGATTTAA TCCTATAATATTATCA TTAGTATCTATAGGTTT AGTACAATTTAT :
M2Rev'    : -----AGAG-----

M2Fw      : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400----- :
pfmdr1_3D7 : ATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTACATCAA AATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAA :
M2Rev'    : -----AGAG-----

M2Fw      : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480----- :
pfmdr1_3D7 : GTGTTTTTATCAAGATGGACAA TTTCATGATAAATAATCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTTAGATTTTT ATTTAGAA :
M2Rev'    : -----AGAG-----

M2Fw      : -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560----- :
pfmdr1_3D7 : CAAGTGAGTTCAGGAAATTGTACGAAATTTATAACAA TTTTACATATGCCAGTTCCTTTTAGGTTTATATATTTGGTC :
M2Rev'    : -----AGAG-----

```

แสดงลำดับเบสของ *Pfmdr1* สายพันธุ์ 3D7 (wild type) (สีน้ำเงินคือตำแหน่งจับของ Nested PCR primer, สีแดงเป็นตำแหน่งของ ApoI restriction site)

```

          *      100      *      120      *      140      *      160
C2Fw      : -----TG TGCTCATGTCTTTAAACTT----- :
PFCRT_3D7C : ACAAGAAGGAAATGGCTCACGTTTAGGTGGAGGTTCTTGCTTTGGTAAATG TGCTCATGTGTTTAAACTTATTTTTAAAG :
C2Rev'    : ----- :

          *      180      *      200      *      220      *      240
C2Fw      : ----- :
PFCRT_3D7C : AGATTAAGGATAATATTTTTATTATATTTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGATGTGTAATGAATAAAATTTTGGCTAAA :
C2Rev'    : ----- :

          *      260      *      280      *      300      *      320
C2Fw      : ----- :
PFCRT_3D7C : AGAACTTTAAACAAAATTGGTAACTATAGTTTGTAAACATCCGAAACTCACAACTTTATTTGTATGATTATGTTCTTTAT :
C2Rev'    : -----CAA AATTGGTAACTATAGTTTGT----- :

```

แสดงลำดับเบสของ *Pfprt* สายพันธุ์ 3D7 (wild type) (สีน้ำเงินคือตำแหน่งจับของ Nested PCR primer, สีแดงเป็นตำแหน่งของ ApoI restriction site)

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rungsit University

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางกัญญนันท์ กฤษศิริวัฒนันท์
วัน เดือน ปีเกิด	7 พฤศจิกายน 2505
สถานที่เกิด	จังหวัดชัยภูมิ ประเทศไทย
ที่อยู่ปัจจุบัน	55/341 เมืองเอก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rungsit University