



รายงานการวิจัย

แผนงานวิจัยเรื่อง

“ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย”

“Integrative Research in Malaria Epidemiology”

หน่วยงานวิจัยหลัก

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์

รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

อ.ดร. สุนีย์ สีสรรมาใจ

มีนาคม 2553

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้วิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ปีงบประมาณ 2551

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ป่วยทุกท่านที่อุทิศเวลาและให้ความร่วมมืออย่างดียิ่ง ผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน เจ้าหน้าที่ สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง และหน่วยงานทุกแห่ง ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบัติ ชัยเพชร ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์ นายแพทย์พินันท์ แดงหาญ และรองศาสตราจารย์ นายแพทย์อุดมศักดิ์ ศิลารัจญ์ ที่ให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอย่างมีคุณค่า และขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนแผนงานวิจัยประเภททุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจ และสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ 2551

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2553

บทคัดย่อโครงการวิจัยที่ 1

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของการติดเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในผู้ป่วยทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย

(ภาษาอังกฤษ) **Molecular epidemiology of human and primate malaria in patients detected in western and southern Thailand**

ชื่อผู้วิจัย

1. ศ.นพ.ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ (Somchai Jongwutiwes M.D., Ph.D.)

สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944

2. รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ (Chaturong Putaporntip Ph.D.)

สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944

3. อ. ดร. สุนีย์ สีธรรมใจ (Sune Seethamchai Ph.D.)

สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก

โทรศัพท์ 055-961-000 ต่อ 3302 โทรสาร 055-961-000 ต่อ 3301

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ประจำปีงบประมาณ 2551

จำนวนเงิน 3,315,274 บาท (สามล้านสามแสนหนึ่งหมื่นห้าพันสองร้อยเจ็ดสิบสี่บาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2552

โครงการวิจัยที่ 1

(ภาษาไทย) ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของการติดเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในผู้ป่วยทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย

(ภาษาอังกฤษ) **Molecular epidemiology of human and primate malaria in patients detected in western and southern Thailand**

บทคัดย่อ

แม้ว่ามาตรการควบคุมโรคมาลาเรียแบบผสมผสานระดับประเทศ ทำให้จำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยลดลงอย่างชัดเจนในช่วง 3 ทศวรรษที่ผ่านมา แต่มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขตามแนวชายแดนของประเทศ ทั้งนี้อุปสรรคในการควบคุมโรคมาลาเรียมีปัจจัยหลักจากการที่ยุงก้นปล่องพาหะคือต่อยาคู่แม่และเชื้อมาลาเรียเกิดการดื้อยาต้านมาลาเรีย ปัญหาการอพยพข้ามพรมแดนของผู้ที่มีเชื้อในร่างกาย รวมทั้งการค้นพบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* ซึ่งพบในลิงนั้นสามารถก่อโรคในคน ปัจจัยเหล่านี้ย่อมอาจเป็นอุปสรรคต่อความก้าวหน้าของการควบคุมโรค ดังนั้นเพื่อเป็นการทราบสถานะของการติดเชื้อมาลาเรียในเขตปრაกฏโรคหลักของประเทศ คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจชนิดของเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก จันทบุรี นราธิวาสและยะลาโดยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดที่ข้อมลิมข่าและเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อเพิ่มปริมาณในส่วน of ยีน small subunit ribosomal RNA ของมาลาเรียที่พบในคน รวมทั้ง *Plasmodium knowlesi* จากจำนวนตัวอย่างเลือดทั้งหมด 4,134 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในจังหวัดตากจำนวน 1,630 ราย จังหวัดจันทบุรี 316 ราย จังหวัดนราธิวาส 546 ราย และจังหวัดยะลา จำนวน 1,642 ราย ซึ่งทำการเก็บรวบรวมในระหว่างเดือนกันยายน 2551 ถึง ตุลาคม 2552 ผลการตรวจพบได้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมาลาเรีย 3,603 ตัวอย่างประกอบด้วย *Plasmodium falciparum* ร้อยละ 48.49 *Plasmodium vivax* ร้อยละ 51.15 การติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium vivax* ร้อยละ 0.33 และผู้ป่วย 1 รายติดเชื้อ *Plasmodium malariae* ในขณะที่ผลการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส สามารถตรวจพบมาลาเรียที่ไม่พบจากการตรวจพบได้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 147 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.9 ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด นอกจากนี้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสยังตรวจพบเชื้อมาลาเรียหลายชนิดมากขึ้น และยังคงตรวจพบการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันมากกว่าการตรวจพบได้กล้องจุลทรรศน์ถึง 35 เท่า สำหรับการกระจายของเชื้อมาลาเรียในแต่ละจังหวัดพบว่ามีผลแตกต่างกัน และที่สำคัญคือได้มีการค้นพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* 15 ราย จากทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ โดยผู้ป่วย 9 ราย พบว่ามีการติดเชื้อร่วมกับ *Plasmodium falciparum* และ/หรือ *Plasmodium vivax* การติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ส่วนใหญ่พบในเพศชายโดยมีอายุเฉลี่ย 34.5 ปี ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าการกระจายของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามภูมิภาคและเวลา เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ และการติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* พบได้ทั่วไปในคนแม้ว่าจะมีอุบัติการณ์ที่ต่ำ

โครงการวิจัยที่ 1

(ภาษาไทย) ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของการติดเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในผู้ป่วยทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย

(ภาษาอังกฤษ) **Molecular epidemiology of human and primate malaria in patients detected in western and southern Thailand**

Abstract

Despite a striking reduction in the reported number of human malaria cases in Thailand over the past 3 decades due to nation-wide integrated malaria control strategies, the disease remains a significant health problem along border areas of the country. Besides insecticide-resistant mosquito vectors and drug-resistant malarial parasites, cross-border migration of infected individuals and more recently the occurrence of *Plasmodium knowlesi*, a nonhuman primate malaria, causing human infections could potentially hamper further success of malaria control program. To gain insights into the status of malaria circulating among people living in main endemic areas of Thailand, we have conducted a comprehensive survey to elucidate the malaria species distribution in Tak, Chantaburi, Narathiwat and Yala Provinces by examination of Giemsa stained blood films collected from febrile patients attending malaria clinics and compared with results obtained from polymerase chain reaction (PCR) method targeting the small subunit ribosomal RNA gene of human malaria and *Plasmodium knowlesi*. In total, 4134 blood samples were obtained from individuals in Tak (n=1630), Chantaburi (n=316), Narathiwat (n=546) and Yala (n=1642) during September 2008-October 2009. Of these, microscopy detected malaria in 3603 patients, consisting of *Plasmodium falciparum* (48.49%), *Plasmodium vivax* (51.15%), co-infection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* (0.33%) and one patient infected with *Plasmodium malariae*. Meanwhile, the PCR method has detected submicroscopic parasitemia in 147 cases, accounting for 3.9% of all PCR-positive samples. Furthermore, PCR could detect more malaria species and mixed species infections were found 35 times more often than those by microscopy. There was a difference in malaria species distribution in these 4 provinces examined. Importantly, *Plasmodium knowlesi* was diagnosed by PCR in 15 patients distributed in all provinces under this survey, nine of these were co-infected with either *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax*. The majority of knowlesi malaria occurred in male with an average age of 34.5 years. Comparing with our previous surveys, the species distribution of malaria in Thailand seems to exhibit spatial and temporal variation whereas *Plasmodium knowlesi* infecting humans seems to be widely distributed, *albeit* at a low prevalence.

บทคัดย่อโครงการวิจัยที่ 2

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การตรวจหาและวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในประชากรลิงป่าและ
ลิงบ้านในเขตจังหวัดนราธิวาส

(ภาษาอังกฤษ) Detection and genetic characterization of malaria in wild and domesticated nonhuman
primate populations in Narathiwat Province

ชื่อผู้วิจัย

1. รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์ (Chaturong Putaporn tip Ph.D.)
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
2. ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ (Somchai Jongwutiwes M.D., Ph.D.)
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
3. นางสาวศิริพร ทองอารีย์ (Siriporn Thongaree M.Sc.) นักวิทยาศาสตร์ 8ว
สังกัดสถานีวิจัยสัตว์ป่าป่ารู - ป่าฮาลาบาลา กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า
กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช นราธิวาส กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
โทรศัพท์ 073-586040
4. อ. ดร. สุนีย์ สีธรรมใจ (Sune Seethamchai Ph.D.)
สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก
โทรศัพท์ 055-961-000 ต่อ 3302 โทรสาร 055-961-000 ต่อ 3301

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ประจำปีงบประมาณ 2551

จำนวนเงิน 3,316,676 บาท (สามล้านสามแสนหนึ่งหมื่นหกพันหกร้อยเจ็ดสิบหกบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2552

โครงการวิจัยที่ 2

(ภาษาไทย) การตรวจหาและวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในประชากรลิงป่าและ
ลิงบ้านในเขตจังหวัดนราธิวาส

(ภาษาอังกฤษ) Detection and genetic characterization of malaria in wild and domesticated onhuman
primate populations in Narathiwat Province

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในคนไทยทำให้ตระหนักถึงความสำคัญของลิงมาแกลในการเป็น
รังโรคซึ่งมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาอุบัติการณ์และการกระจายของเชื้อมาลาเรียในลิงมาแกลจึงมีความสำคัญซึ่งอาจเป็นตัวสะท้อนให้เห็นถึงแนวโน้มของโรคในคน คณะผู้วิจัยได้ทำ
การตรวจหาเชื้อมาลาเรียในประชากรลิงในเขตจังหวัดนราธิวาสและบริเวณใกล้เคียงในปี ค.ศ. 2009 ในการ
สำรวจนี้ได้ทำการจับลิง 665 ตัว ประกอบด้วยลิงกัง 455 ตัว ลิงแสม 187 ตัว ลิงวอกภูเขา 4 ตัว ค่างแว่นถิ่นใต้
จำนวน 7 ตัว และลิงลูกผสม 2 ตัว ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมาลาเรียและ
Hepatocystis 164 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยใช้ยีน small subunit
ribosomal RNA (SSU rRNA) เป็นเป้าหมายให้ผลบวก 190 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28.6) ทั้งนี้การตรวจด้วยกล้อง
จุลทรรศน์พบ *Plasmodium inui* 69 ตัวอย่าง *Plasmodium cynomolgi* 2 ตัวอย่าง *Plasmodium knowlesi* 2
ตัวอย่าง และ *Hepatocystis* จำนวน 67 ตัวอย่าง ในทางตรงข้ามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU
rRNA และ mitochondrial cytochrome b (*Mtcb*) พบการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดรวมกันมากถึงร้อยละ 36.3
ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก ทั้งนี้ *Plasmodium inui* มีอุบัติการณ์สูงสุดโดยพบร้อยละ 36.3 ในลิง
กังและร้อยละ 38.9 ในลิงแสม สำหรับ *Plasmodium knowlesi* พบจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยพบในลิงกัง 9
ตัวอย่าง ลิงแสม 2 ตัวอย่าง และค่างแว่นถิ่นใต้ 1 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้เป็นการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง
Plasmodium knowlesi กับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น 10 ตัวอย่าง แม้ว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถจำแนกชนิด
ของเชื้อมาลาเรียที่พบในการศึกษานี้ได้อย่างชัดเจน 7 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium inui*, *Plasmodium knowlesi*,
Plasmodium cynomolgi, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium fieldi* และ *Plasmodium simiovale* รวมทั้ง
Hepatocystis แต่จากการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรมพบลำดับเบสของยีน *Mtcb* 47 แบบ ที่ไม่สามารถจัดเข้า
กับเชื้อมาลาเรียชนิดใด โดยแยกเป็น 2 แขนงใหม่ที่มีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ค่อนข้างสูง แสดงว่าเชื้อมาลาเรีย
ดังกล่าวเป็นชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามการตรวจพบ *Plasmodium knowlesi* ในประชากรลิงในภาคใต้ของ
ประเทศไทย บ่งบอกถึงการเป็นรังโรคของลิงเหล่านี้ ในขณะที่การพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรียชนิด
ดังกล่าวในลิงและในคนที่ต่ำอาจเนื่องจากคนได้รับเชื้อส่วนใหญ่จากลิงที่เป็นรังโรคโดยผ่านยุงก้นปล่องพาหะ
ที่เหมาะสม

โครงการวิจัยที่ 2

(ภาษาไทย) การตรวจหาและวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในประชากรลิงป่าและ
ลิงบ้านในเขตจังหวัดนราธิวาส

(ภาษาอังกฤษ) **Detection and genetic characterization of malaria in wild and domesticated nonhuman
primate populations in Narathiwat Province**

Abstract

The presence of human infections caused by *Plasmodium knowlesi* in Thailand has highlighted the importance of macaque monkeys as reservoir hosts that are highly populated in southern Thailand. To address the prevalence and distribution of malaria in nonhuman primates that may reflect the status of disease trend in humans, a survey of malaria in monkey populations in Narathiwat Province and nearby areas have been conducted in 2009. In total, 665 monkeys were captured that included *Macaca nemestrina* (n=455), *Macaca fascicularis* (n=187), *Macaca arctoides* (n=4), *Semnopithecus obscurus* (n=7) and hybrid macaques (n=2). Of these, microscopy detected malaria and *Hepatocystis* in 164 samples while nested PCR targeting the small subunit ribosomal RNA gene (*SSU rRNA*) yielded positive results in 190 isolates (28.6%). Microscopy could presumptively diagnose parasite species in 139 isolates comprising *Plasmodium inui* (n=69), *Plasmodium cynomolgi* (n=2), *Plasmodium knowlesi* (n=1) and *Hepatocystis* (67). On the other hand,, analysis of the *SSU rRNA* and mitochondrial cytochrome b sequences has revealed that mixed infections of different malaria species were found in 36.3% of all PCR positive isolates. Meanwhile, *Plasmodium inui* was the most prevalent species identified accounting for 36.3% and 38.9% of malaria infected *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*, respectively. Importantly, *Plasmodium knowlesi* was detected in 12 isolates (9 *Macaca nemestrina*, 2 *Macaca fascicularis* and 1 *Semnopithecus obscurus*) and 10 of these were co-infections with other malaria species and *Hepatocystis*. Although sequence analysis has unambiguously identified 7 *Plasmodium* species in this survey (*Plasmodium inui*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium fieldi* and *Plasmodium simiovale*) and *Hepatocystis*, phylogenetic inference has placed 47 malarial mitochondrial sequences into 2 distinct clades with high bootstrap supports, suggesting that they belonged to novel *Plasmodium* species. The presence of *Plasmodium knowlesi* in southern Thailand macaque population could reflect that these monkeys could serve as reservoir hosts for human infections while the low prevalence of this malaria in macaques and humans could suggest that humans mainly acquired infections from infected reservoirs through appropriate mosquito vectors.

บทคัดย่อโครงการวิจัยที่ 3

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การวิเคราะห์อะพิคพลาสต์จีโนมของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนและที่พบในลิง

(ภาษาอังกฤษ) **Analysis of the apicoplast genomes of human and nonhuman primate malaria**

ชื่อผู้วิจัย

1. อ. ดร. สุนีย์ สีธรรมใจ (Sune Seethamchai Ph.D.)

สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก

โทรศัพท์ 055-961-000 ต่อ 3302 โทรสาร 055-961-000 ต่อ 3301

2. ศ.นพ.ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ (Somchai Jongwutiwes M.D., Ph.D.)

สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944

3. รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพิทย (Chaturong Putaporntip Ph.D.)

สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ประจำปีงบประมาณ 2551

จำนวนเงิน 2,716,758 บาท (สองล้านเจ็ดแสนหนึ่งหมื่นหกพันเจ็ดร้อยห้าสิบบแปดบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2552

โครงการวิจัยที่ 3

(ภาษาไทย) การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนและที่พบในลิง

(ภาษาอังกฤษ) Analysis of the apicoplast genomes of human and nonhuman primate malaria

บทคัดย่อ

เชื้อมาลาเรียมีจีโนมที่อยู่นอกโครโมโซมขนาด 35 กิโลเบส อยู่ใกล้กับไมโทคอนเดรีย หรือเรียกว่า apicoplast ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ ที่สำคัญต่อการดำรงชีพของเชื้อมาลาเรีย apicoplast มีจีโนมที่เป็นวงกลมและมีวิวัฒนาการมาจากระบวนการเกิด endosymbiosis 2 ครั้ง ร่วมกับการขาดหายไปของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง เมื่อไม่นานมานี้มีการพบว่า apicoplast เป็นเป้าหมายของยาปฏิชีวนะหลายชนิด ที่มีผลในการทำลายเชื้อมาลาเรีย เช่น tetracyclines, clindamycines และ macrolides โดยมีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโปรตีนใน apicoplast ส่งผลให้เชื้อมาลาเรียตายในภายหลัง นอกจากนี้ apicoplast ยังทำหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมันที่มีฤทธิ์เป็น antioxidant ซึ่งเชื้อมาลาเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการยับยั้งการทำหน้าที่ดังกล่าวของ apicoplast จะส่งผลให้เชื้อมาลาเรียอยู่ภายใต้แรงกดดันของ oxidative stress ในปัจจุบันมีข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ ของ apicoplast ทั้งจีโนมของ *Plasmodium falciparum* เพียงชนิดเดียว ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ apicoplast ทั้งจีโนมของเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคน 3 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovalae* รวมทั้งเชื้อมาลาเรียที่พบในลิง 3 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* และ *Plasmodium inui* โดยพบว่า apicoplast จีโนมของเชื้อมาลาเรียทั้ง 6 ชนิดดังกล่าว มีโครงสร้างคล้ายกับที่พบในเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่เป็น inverted repeats ที่มียีน small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA), large subunit ribosomal RNA (LSU rRNA) ยีนสำหรับ transfer RNA ชนิดต่าง ๆ ยีนสำหรับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซม ยีนสำหรับเอนไซม์ RNA polymerase และยีนที่สร้างโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน เป็นที่น่าสังเกตว่า องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์นั้นมี adenine และ thymine รวมกันสูงถึงร้อยละ 86.2 - 86.8 และการใช้โคดอนสำหรับกรดอะมิโนหนึ่ง ๆ มีค่าเบี่ยงเบนจากปกติอย่างเห็นได้ชัด การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีนภายใน apicoplast มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละ species อย่างไรก็ตามพบว่าสายใยพันธุกรรมของยีนสำหรับ transfer RNA ไม่สอดคล้องกับการแยก species ของเชื้อมาลาเรียบนพื้นฐานของยีน SSU rRNA และ LSU rRNA ในทางตรงกันข้ามพบว่า ความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ยีนที่มีการสร้างโปรตีนนั้นมีความสอดคล้องกัน แสดงว่าวิวัฒนาการของจีโนมใน apicoplast นั้นเกิดขึ้นพร้อมกับการแยก species ของเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตามพบว่า ส่วนของจีโนมหลายบริเวณที่มีความคงที่ระหว่าง species สูงจึงอาจเป็นไปได้ที่การรบกวนการทำหน้าที่ของ apicoplast อาจมีผลต่อเชื้อมาลาเรียหลาย species ดังนั้น apicoplast จึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจสำหรับการออกฤทธิ์ของยา หรือมาตรการอื่น ๆ ซึ่งอาจมีผลต่อเชื้อมาลาเรียโดยไม่จำกัดอยู่เพียงเชื้อมาลาเรียชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

โครงการวิจัยที่ 3

(ภาษาไทย) การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนและที่พบในลิง

(ภาษาอังกฤษ) **Analysis of the apicoplast genomes of human and nonhuman primate malaria**

Abstract

Malarial parasites possess a 35 kb extrachromosomal genome located in close proximity to mitochondria, designated apicoplast, that is a vital organelle for their survival. The apicoplast has evolved through a secondary endosymbiosis along with the loss of photosynthetic genes in its circular genome. Recently, it has been shown that apicoplast is a target for multiple antimalarial antibiotics such as tetracyclines, clindamycines and macrolides which exert interference effects on the translation process, resulting in delayed death of malarial parasites. Furthermore, apicoplast appears to synthesize the potent antioxidant lipoic acid that could be deployed by *Plasmodium* as an antioxidant; thereby inhibition of apicoplast may lead to susceptibility to oxidative stress. To date, the complete genome sequence of malarial apicoplast has been fully determined from *Plasmodium falciparum* but not other related species. Therefore, we determined the complete genome sequences of apicoplast from 3 other human malaria (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*) and 3 primate malaria (*Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium inui*). Sequence analysis has revealed that apicoplast genomes of all 6 *Plasmodium* species shared structural organization akin to that of *P. falciparum*, consisting of inverted repeats encoding small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) and large subunit ribosomal RNA (LSU rRNA), various transfer RNA, a series of ribosomal proteins, RNA polymerase and open reading frames of unassigned proteins. The nucleotide composition is extremely rich in A+T residues (~86.2-86.8%) and the codon usage notably biased. Nucleotide substitutions in each locus within the apicoplast genomes of *Plasmodium* species are species specific. However, phylogenetic relationship inferred from individual tRNA genes did not give concordant results with species trees inferred from SSU rRNA or LSU rRNA. On the other hand, tree topologies inferred from all other protein-coding loci displayed similar results with those based on sequences of the rRNA loci, suggesting that evolution of apicoplast genomes have been ongoing along with speciation of malaria. Nevertheless, several portions of the apicoplast genomes are well-conserved between species, implying that inference of apicoplast may affect a broad range of *Plasmodium* species. Therefore, apicoplast genome is an attractive target for drugs or other control intervention that may circumvent species-specific restriction.

บทคัดย่อโครงการวิจัยที่ 4

ชื่อโครงการวิจัย

- (ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพในการเป็นพาหะนำโรคของยุงก้นปล่องต่อเชื้อมาลาเรียในคน และลิงทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย
- (ภาษาอังกฤษ) **A study of anopheline potential vectors of human and primate malaria in western and southern Thailand**

ชื่อผู้วิจัย

1. รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์ (Chaturong Putaporntip Ph.D.)
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
2. รศ. ณัฐรุต จันทชุม (Nutaros Chantachum M.Sc.)
สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3685 โทรสาร 02-252-5944
3. นพ. จีรพัฒน์ ศิริชัยสินธพ (Jeeraphat Sirichaisinthop M.D.)
ศูนย์อบรมโรคติดต่อฯ โดยแมลง (สังกัดสำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง)
6 ถ.พหลโยธิน ต.ธารเกษม อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี 18120
โทรศัพท์ 036-266142 โทรสาร 036-267586

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ประจำปีงบประมาณ 2551

จำนวนเงิน 3,651,292 บาท (สามล้านหกแสนห้าหมื่นหนึ่งพันสองร้อยเก้าสิบสองบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2552

โครงการวิจัยที่ 4

(ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพในการเป็นพาหะนำโรคของยุงก้นปล่องต่อเชื้อมาลาเรียในคน และลิง
ทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย

(ภาษาอังกฤษ) A study of anopheline potential vectors to human and primate malaria in western
and southern Thailand

บทคัดย่อ

การแพร่กระจายของมาลาเรียทั้งชนิดที่ก่อโรคในคนและที่พบในลิงต้องอาศัยยุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาสถานะของระบบนิเวศ ตลอดจนแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงพาหะในประเทศไทยได้มีการเปลี่ยนแปลงจากอดีต ซึ่งส่วนหนึ่งเนื่องมาจากการถางป่ารวมทั้งการขยายตัวของชุมชนเมือง ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจการแพร่กระจายและความชุกของยุงก้นปล่องพาหะหลักและพาหะรองในแถบตะวันตกและทางตอนใต้ของประเทศไทย ซึ่งยังเป็นเขตปรากฏโรคมาลาเรีย โดยทำการสำรวจในช่วงฤดูแล้ง (ตุลาคมและธันวาคม พ.ศ. 2551) และฤดูฝน (พฤษภาคม-สิงหาคม พ.ศ. 2552) ในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์และระนอง โดยใช้คนและสัตว์เป็นเหยื่อล่อ ผลการสำรวจพบว่าในจำนวนยุงก้นปล่องทั้งหมดที่จับได้จำนวน 28,011 ตัว จัดเป็นยุงก้นปล่องพาหะหลัก 3,826 ตัว ซึ่ง *Anopheles minimus* มีจำนวนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 73.5 รองลงมาได้แก่ *Anopheles maculatus* พบร้อยละ 25.9 และ *Anopheles dirus* พบร้อยละ 0.6 สำหรับยุงพาหะรองพบ *Anopheles sundaicus* เฉพาะบริเวณชายฝั่งของจังหวัดระนอง และ *Anopheles aconitus* พบทั่วไปตามหมู่บ้านในทุกจังหวัดที่ศึกษา ในขณะที่ยุง *Anopheles barbirostris* ยังคงเป็นยุงพาหะสงสัยที่พบมากที่สุดในทุกจังหวัดที่สำรวจ ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างในการกระจายและความชุกของชนิดของยุงพาหะหลักในฤดูแล้งและฤดูฝนในทุกพื้นที่ที่ศึกษา เป็นที่น่าสังเกตว่าคนและสัตว์เป็นเหยื่อล่อที่ดีทดเทียมกันสำหรับยุงก้นปล่องพาหะหลัก ในขณะที่ยุงก้นปล่องพาหะรองและพาหะสงสัยชอบกัดสัตว์มากกว่าคน สำหรับการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรมจากการใช้ลำดับเบสของ internal transcribed spacer II (ITS-2) และ cytochrome oxidase II พบว่ายุง *Anopheles minimus* จำนวน 150 ตัว ทั้งหมดสามารถจัดอยู่ในสายพันธุ์ซับซ้อนชนิด A โดยมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์เล็กน้อยระหว่างแต่ละตัวอย่าง นอกจากนี้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุง *Anopheles minimus* จำนวน 397 ตัว โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อตรวจสอบยีน SSU rRNA ของเชื้อมาลาเรียพบว่า ยุงทั้งหมด 15 ตัวหรือร้อยละ 3.8 ให้ผลบวกต่อการตรวจโดยพบ *Plasmodium falciparum* จำนวน 3 ตัวอย่าง *Plasmodium vivax* จำนวน 11 ตัวอย่าง และเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิด 1 ตัวอย่าง ซึ่งผลที่ได้สนับสนุนถึงความสำคัญของยุงชนิดนี้ในการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญของประเทศไทย ในทำนองเดียวกันคณะผู้วิจัยได้ตรวจพบว่ายุง *Anopheles dirus* complex ที่จับได้จากป่าในเขตจังหวัดนราธิวาสจากการใช้คนและลิงเป็นเหยื่อล่อ พบเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium knowlesi* และ *Plasmodium inui* ซึ่งยุงชนิดนี้อาจมีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียดังกล่าว ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับสถานะการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียของยุงก้นปล่องชนิดต่างๆ นับเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นพื้นฐานเพื่อการวางแผนนโยบายควบคุมโรคมาลาเรียระดับประเทศต่อไป

โครงการวิจัยที่ 4

(ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพในการเป็นพาหะนำโรคของยุงก้นปล่องต่อเชื้อมาลาเรียในคน และลิง
ทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย

(ภาษาอังกฤษ) **A study of anopheline potential vectors to human and primate malaria in western
and southern Thailand**

Abstract

Natural transmission of both human and nonhuman primate malaria requires *Anopheles* vectors. During the past decades, ecological niche and breeding places of malaria vectors in Thailand have been altered, partly due to deforestation and expanded urbanization. To explore the distribution and abundance of both primary and secondary vectors in western and southern Thailand where malaria remain endemic, we performed a prospective survey during dry season (October and December 2008) and rainy season (May – August 2009) in Tak, Prachuab Khirikhan, Kanchanaburi and Ranong Provinces using both human and animal baits. Of 28,011 anopheline mosquitos caught, 3,826 mosquitos belonged to primary malaria vectors which included *Anopheles minimus*, the most prevalent species, accounting for 73.5%, followed by *Anopheles maculatus* (25.9%) and *Anopheles dirus* (0.6%), respectively. Secondary vectors identified in this survey were *Anopheles sudaicus* exclusively found in the coastal areas of Ranong Province and *Anopheles aconitus* widely distributed around rural villages. *Anopheles barbirostris* remains to be the most populated suspected vectors in all provinces. There was no significant difference in species distribution of the primary vectors in each endemic area during raining season and dry season. It is noteworthy that both human and animal baits attracted primary vectors almost equally well while secondary vectors, suspected vectors and other anopheline mosquitos preferred animal baits to human baits. Phylogenetic analysis inferred from internal transcribed spacer II (*ITS-2*) and cytochrome oxidase II sequence revealed that *Anopheles minimus* (n=150) exhibited microheterogeneity of sequences at both loci and all were clustered within complex A. Furthermore, searching for malarial DNA in 397 *Anopheles minimus* by polymerase chain reaction targeting *SSU rRNA* of malaria parasites showed that 15 mosquitos (3.8%) yielded positive tests for *Plasmodium falciparum* (n=3), *Plasmodium vivax* (n=11) and co-existence of both species (n=1), supporting an important role of this mosquito species as a malaria vector in Thailand. Likewise, *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium inui* were found in *Anopheles dirus* complex that were caught upon landing on human and monkey baits collected from a forest area in Narathiwat Province, suggesting that these primate malarias could be potentially transmitted by this anopheline mosquito. Information on the status of malaria vectors will form an essential basis for national malaria control policy.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	
โครงการวิจัยที่ 1	iii
โครงการวิจัยที่ 2	vi
โครงการวิจัยที่ 3	ix
โครงการวิจัยที่ 4	xii
สารบัญเรื่อง	xv
สารบัญตาราง	xvii
สารบัญรูป	xix
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xxv
บทนำรวม	xxvi
 โครงการวิจัยที่ 1	
- บทคัดย่อ	1
- บทนำ	3
- การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
- ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	7
- ผลการวิจัย	12
- อภิปรายและวิจารณ์ผล	24
- สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	28
- บรรณานุกรม	29
 โครงการวิจัยที่ 2	
- บทคัดย่อ	32
- บทนำ	34
- การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	36
- ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	38
- ผลการวิจัย	52
- อภิปรายและวิจารณ์ผล	78
- สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	84
- บรรณานุกรม	85

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
โครงการวิจัยที่ 3	
- บทคัดย่อ	89
- บทนำ	91
- การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	92
- ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	95
- ผลการวิจัย	102
- อภิปรายและวิจารณ์ผล	134
- สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	137
- บรรณานุกรม	138
โครงการวิจัยที่ 4	
- บทคัดย่อ	141
- บทนำ	143
- การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	144
- ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	146
- ผลการวิจัย	154
- อภิปรายและวิจารณ์ผล	173
- สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	178
- บรรณานุกรม	179
สรุปภาพรวมของแผนงาน	182
ประวัติและผลงานของคณະนักวิจัย	193

สารบัญตาราง

	หน้า
<u>โครงการวิจัยที่ 1</u>	
ตารางที่ 1.1 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการศึกษา	9
ตารางที่ 1.2 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มโลหิต	13
ตารางที่ 1.3 เปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวและหลายชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี PCR	16
ตารางที่ 1.4 แสดงผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR	18
ตารางที่ 1.5 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี PCR และจากแผ่นฟิล์มโลหิต	19
ตารางที่ 1.6 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจากแผ่นฟิล์มโลหิตและโดยวิธี PCR	20
ตารางที่ 1.7 เปรียบเทียบผลการตรวจภาวะของการติดเชื้อมาลาเรียตั้งแต่หรือมากกว่า 1 ชนิดโดยวิธีตรวจจากแผ่นฟิล์มโลหิตและโดยวิธี PCR	20
ตารางที่ 1.8 รายละเอียดผู้ป่วยที่ตรวจพบ <i>Plasmodium knowlesi</i>	23
<u>โครงการวิจัยที่ 2</u>	
ตารางที่ 2.1 แสดงพื้นที่ศึกษา ชนิดลิง และจำนวนลิงทั้งหมดจำแนกตามเพศ	56
ตารางที่ 2.2 อัตราการพบเชื้อมาลาเรียและ <i>Hepatozoon</i> ในลิงกัง (<i>Macaca nemestrina</i>) และลิงแสม (<i>Macaca fascicularis</i>).	76
ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (synonymous nucleotide diversity, π_s) และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (nonsynonymous nucleotide diversity, π_n) ในยีน mitochondrial cytochrome b ของเชื้อ <i>Plasmodium inui</i> และ <i>Hepatozoon</i> sp. จากลิงกังและลิงแสม	77
<u>โครงการวิจัยที่ 3</u>	
ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR primers และขนาดของ PCR products ที่ได้	97
ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sequencing primers สำหรับ apicoplast genome	99
<u>โครงการวิจัยที่ 4</u>	
ตารางที่ 4.1 แสดงพื้นที่ศึกษาในการเก็บตัวอย่าง และระยะเวลาการปฏิบัติงาน	147
ตารางที่ 4.2 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ตรวจหาเชื้อมาลาเรีย	148
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณยุงก้นปล่องที่จับได้จำแนกตามฤดูกาล และประเภทของการเป็นพาหะ	156
ตารางที่ 4.4 ผลการจับยุงในพื้นที่ศึกษาในช่วงฤดูแล้ง (ระหว่างเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม 2551)	158
ตารางที่ 4.5 ผลการจับยุงในพื้นที่ศึกษาในช่วงฤดูฝน (ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนสิงหาคม 2552)	159

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนยุงก้นปล่องที่จับได้ จำแนกตามประเภทของยุงพาหะ และวิธีการจับ	161
ตารางที่ 4.7 แสดงชนิดของยุงก้นปล่องที่พบทั้งหมดในพื้นที่ศึกษา	161
ตารางที่ 4.8 แสดงจำนวนยุงที่จับได้ในพื้นที่จังหวัดนราธิวาสจากการใช้คนและลิงเป็นเหยื่อล่อ	162
ตารางที่ 4.9 แสดงพื้นที่การศึกษา จำนวนและร้อยละของยุง <i>Anopheles minimus</i> ที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรีย จากตัวอย่างยุงที่ทดสอบในแต่ละพื้นที่ศึกษาโดยวิธี PCR	164
ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณยุงก้นปล่องที่จับได้ทั้งหมดที่ทำการศึกษาจำแนกประเภทของการเป็นพาหะ	174
ตารางที่ 4.11 จำนวนยุงก้นปล่องที่จับได้จำแนกตามประเภทของยุงพาหะและวิธีการจับ	176

สารบัญรูป

หน้า

โครงการวิจัยที่ 1

- รูปที่ 1.1 แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ให้ผลบวกกับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* โดย M=DNA Marker, แถวที่ 1 – 2 และ 4 – 9 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก แถวที่ 3 และ 10 คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ 14
- รูปที่ 1.2 แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ให้ผลบวกกับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* โดย M=DNA Marker, แถวที่ 3 – 4, 7 – 9 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก แถวที่ 1 – 2 และ 5 – 6 คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ 14
- รูปที่ 1.3 แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ให้ผลบวกกับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium malariae* โดย M=DNA Marker, แถวที่ 5 และ 8 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก แถวที่ 1 – 4, 6 – 7 และ 9 – 10 คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ 14
- รูปที่ 1.4 แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR จากผู้ป่วยในจังหวัดตากที่ให้ผลบวกกับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium ovale* โดย M=DNA Marker, แถวที่ 3 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก แถวที่ 1 – 2 และ 4 – 10 คือตัวอย่างที่ให้ผลลบ 15
- รูปที่ 1.5 แสดงตัวอย่างผลผลิต PCR จากผู้ป่วยในจังหวัดยะลาที่ให้ผลบวกกับเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* โดย M=DNA Marker, แถวที่ 3 และ 6 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก แถวที่ 1 – 2, 4 – 5 และ 7 – 10 ให้ผลลบ 15
- รูปที่ 1.6 เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* ระยะ ring with double chromatin (A, B) ระยะ trophozoite (band form) (C, D, E, F) ระยะ developing schizont (G, H, I, T, U) และระยะ gametocyte (V) 22

โครงการวิจัยที่ 2

- รูปที่ 2.1 แสดงการสร้างกรงจับลิงขนาด 0.5 x 1 x 0.7 เมตร 39
- รูปที่ 2.2 แสดงลิงกังป่าเพศผู้ที่จับได้จากป่าฮาลาบาลา 39
- รูปที่ 2.3 แสดงลิงกังเพศผู้ที่ชาวบ้านเลี้ยงไว้เก็บสละและมะพร้าวจากจังหวัดนราธิวาส 40
- รูปที่ 2.4 แสดงการเจาะเลือดลิงโดยใช้เข็มอินชูลินขนาด 1 มิลลิลิตร 40
- รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของ pGEM-T Easy plasmid vector (Promega, USA) 46
- รูปที่ 2.6 แสดงลำดับเบสบริเวณ cloning site ของ pGEM-T Easy plasmid vector (Promega, USA) 47
- รูปที่ 2.7 แสดงโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงินของ *Escherichia coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal 49
- รูปที่ 2.8 เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติชนิด ABI 3100 DNA Sequencer 51
- รูปที่ 2.9 แสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างเลือดลิงในจังหวัด พัทลุง ปัตตานี ยะลาและนราธิวาส 53

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.10 แสดงรูปตัวอย่างลิงกังเพศผู้ (<i>Macaca nemestrina</i>) จากจังหวัดนครราชสีมา	54
รูปที่ 2.11 แสดงรูปตัวอย่างลิงแสมเพศผู้ (<i>Macaca fascicularis</i>) จากจังหวัดยะลา	54
รูปที่ 2.12 แสดงรูปตัวอย่างลิงเสนเพศผู้ (<i>Macaca arctoides</i>) จากจังหวัดพัทลุง	55
รูปที่ 2.13 แสดงรูปตัวอย่างค่างแว่นถิ่นใต้ (<i>Semnopithecus obscurus</i>) จากจังหวัดนครราชสีมา	55
รูปที่ 2.14 แสดงจำนวนแบ่งตามเพศของลิงแต่ละชนิดที่จับได้จากอำเภอต่าง ๆ ของจังหวัดนครราชสีมา	57
รูปที่ 2.15 แสดงชนิดของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ และจำนวน ที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์	58
รูปที่ 2.16 แสดงตัวอย่างเชื้อระยะ ring form (A), trophozoite (B), developing schizont (C), schizont (D) male gametocytes (E) และ female gametocytes (F) ของเชื้อ <i>Plasmodium inui</i> จากฟิล์มเลือดบาง	58
รูปที่ 2.17 แสดงตัวอย่างเชื้อ <i>Plasmodium cynomolgi</i> ระยะ growing trophozoites จากฟิล์มเลือดบาง (A – D)	59
รูปที่ 2.18 ร้อยละจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ (190 ตัวอย่าง) และตรวจไม่พบเชื้อมาลาเรีย (465ตัวอย่าง) จากการตรวจโดยวิธี PCR	60
รูปที่ 2.19 แสดงร้อยละการกระจายของจำนวนของลิงที่พบเชื้อมาลาเรียจำแนกตามวัย	60
รูปที่ 2.20 แสดงร้อยละการกระจายของการติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวและหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกันในประชากรลิงที่ศึกษา	61
รูปที่ 2.21 แสดงผลผลิต PCR ของ 18S rRNA gene ขนาดประมาณ 800-900 bp จาก primer M18SF0 และM18SR0 ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย (M = DNA marker, แถวที่1-16 = ผลบวก)	61
รูปที่ 2.22 ผลการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรม (phylogenetic analysis) วิธี neighbor-joining โดยอาศัยข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA ของ <i>Plasmodium sp.</i> และ <i>Hepatocystis spp</i> จากตัวอย่างที่ได้จากลิงในภาคใต้ประเทศไทย เปรียบเทียบข้อมูลที่มีใน Genbank Database เส้นกำกับขนาด ด้านล่างซ้ายมือคือระดับความแตกต่างที่ 0.02 ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์	64
รูปที่ 2.23 แสดงผลผลิต PCR ของ mitochondrial cytochrome <i>b</i> gene ขนาด 1,050 bp จากการใส่ primer MCytb-F0 และ MCytb-R0 ใน 1 % agarose gel (M = DNA marker, แถวที่1-15 = ผลบวกของยีน mitochondrial cytochrome <i>b</i>)	65
รูปที่ 2.24 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial cytochrome <i>b</i> gene จากเชื้อ มาลาเรียที่ได้จากตัวอย่างลิงเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีใน Genbank Database จุดหมายถึงกรด อะมิโนที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง	65

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 2.25 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mitochondrial cytochrome b จากเชื้อมาลาเรียที่ได้จากตัวอย่างลิง จดหมายถึงเบสที่เหมือนกันในแต่ละตำแหน่ง จดหมายถึงการขาดหายไปของเบส 67

รูปที่ 2.26 ผลการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรม (phylogenetic analysis) วิธี neighbor-joining โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mitochondrial cytochrome b gene ของ primate malaria จากตัวอย่างที่ได้จากลิงในจังหวัดนราธิวาสของประเทศไทย เส้นกำกับขนาดด้านล่างซ้ายมือคือระดับความแตกต่าง 0.02 นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง 75

โครงการวิจัยที่ 3

รูปที่ 3.1 โครงสร้าง Apicoplast Genome ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ขนาดประมาณ 35 กิโลเบส (Wilson et al 1996) แสดงตำแหน่งของยีนต่าง ๆ ได้แก่ large subunit ribosomal RNA (LSU rRNA), small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA), transfer RNA ซึ่งกำกับด้วย anticodon, ribosomal protein genes สำหรับ large subunit ribosome (rpl), ribosomal protein genes สำหรับ small subunit ribosome (rps), RNA polymerase (rpoB, rpoC1, rpoC2 หรือ rpoD), tufA gene, clpC gene, ORF470, ORF51, ORF78, ORF79, ORF91, ORF101, ORF105 และ ORF129 104

รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน tRNA สำหรับกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรียแต่ละ species จุดคือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน จดคือนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 106

รูปที่ 3.3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโนและความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน ribosomal proteins (rps2, rps7, rpl4 และ rpl23) ของเชื้อมาลาเรียแต่ละ species จุดคือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน จดคือนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 115

รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน rpoB ของเชื้อมาลาเรียแต่ละ species จุดคือกรดอะมิโนที่เหมือนกัน จดคือกรดอะมิโนที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 120

รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน rpoC ของเชื้อมาลาเรียแต่ละ species จุดคือกรดอะมิโนที่เหมือนกัน จดคือกรดอะมิโนที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 122

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

- รูปที่ 3.6** เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน rpoD ของเชื้อ
มาลาเรียแต่ละ species จุดคือกรดอะมิโนที่เหมือนกัน จี๊ดคือกรดอะมิโนที่ขาดหายไป scale
ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 123
- รูปที่ 3.7** เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน rpoD ของเชื้อมาลาเรีย
แต่ละ species จุดคือกรดอะมิโนที่เหมือนกัน จี๊ดคือกรดอะมิโนที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ
phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโนที่มีความคงที่
และทำหน้าที่จับกับ phosphoryl, Mg²⁺ และ GTP แสดงในกล่อง 124
- รูปที่ 3.8** เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน clpC ของเชื้อมาลาเรีย
แต่ละ species จุดคือกรดอะมิโนที่เหมือนกัน จี๊ดคือกรดอะมิโนที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ
phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 126
- รูปที่ 3.9** เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน ORF51, ORF78, ORF79, ORF91, ORF101,
ORF105, ORF 470 และ ORF129 ของเชื้อมาลาเรียแต่ละ species 127
- รูปที่ 3.10** เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน large subunit
ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียแต่ละ species จุดคือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน จี๊ดคือ
นิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่
ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 128
- รูปที่ 3.11** เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน large subunit
ribosomal RNA ของเชื้อมาลาเรียแต่ละ species จุดคือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน จี๊ดคือ
นิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป scale ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อ
ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 132
- รูปที่ 3.12** ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีนสำหรับ tRNA ต่าง ๆ จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์
ในแต่ละยีนมาต่อกัน scale ด้านล่างของ phylogenetic tree คือจำนวนการแทนที่ต่อตำแหน่ง
นิวคลีโอไทด์ตัวเลขกำกับการแยกสายแสดงร้อยละความเชื่อมั่นจากการประเมินโดยวิธี
bootstrap 1000 ครั้ง 136

โครงการวิจัยที่ 4

- รูปที่ 4.1** แสดงการเก็บตัวอย่างยุงโดยใช้คนเป็นเหยื่อล่อ 155
- รูปที่ 4.2** แสดงการจับยุงโดยใช้วุ้นเป็นเหยื่อล่อ 155
- รูปที่ 4.3** แสดงการจับยุงโดยใช้ลิงเป็นเหยื่อล่อ ในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา 156

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบร้อยละของจำนวนยุงพาหะหลักที่จับได้ทั้งหมดในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝนในปีที่ 1 (2548-2549), ปีที่ 2 (2549-2550) และปีที่ 3 (2551-2552)	160
รูปที่ 4.5 แสดงผลผลิต PCR ของ DNA ตัวอย่างยุง <i>Anopheles minimus</i> ที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium falciparum</i> lane 6 ให้ผลบวก lane 1 = positive control, lane M = DNA marker 100 bp Ladder (ขนาด 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp)	163
รูปที่ 4.6 แสดงผลผลิต PCR ของ DNA ตัวอย่างยุง <i>Anopheles minimus</i> ที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium vivax</i> lane 4 ให้ผลบวก lane 9 = positive control, lane M = DNA marker 50 bp DNA Ladder (ขนาด 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 และ 50)	163
รูปที่ 4.7 แสดงผลผลิต PCR ของ DNA ตัวอย่างยุงก้นปล่องจากจังหวัดนราธิวาสที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium inui</i> lane 9 ให้ผลบวก lane 10 = positive control, lane M = DNA marker 100 bp Ladder (ขนาด 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp)	165
รูปที่ 4.8 แสดงผลผลิต PCR ของ DNA ตัวอย่างยุงก้นปล่องจากจังหวัดนราธิวาสที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียชนิด <i>Plasmodium knowlesi</i> lane 2 ให้ผลบวก lane 9 = positive control, lane M = DNA marker 100 bp Ladder (ขนาด 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp)	165
รูปที่ 4.9 แสดงผลผลิต PCR ของยีน ITS-2 ของยุง <i>Anopheles minimus</i> มีขนาดความยาวประมาณ 600 bp จากการตรวจสอบโดยใช้ 2 % agarose gel lane 1-5 ให้ผลบวก lane 7 = positive control, lane M = DNA marker 50 bp DNA Ladder (ขนาด 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 และ 50)	166
รูปที่ 4.10 แสดงผลผลิต PCR ของ mitochondrial DNA ของยุง <i>Anopheles minimus</i> พาหะหลักสำหรับเชื้อมาลาเรียมีขนาดความยาวประมาณ 2.0 kb จากการตรวจสอบโดยใช้ 1 % agarose gel lane 1-3, 5-7 ให้ผลบวก lane 8 = positive control, lane M = DNA marker lamda/ <i>Hind</i> III (ขนาด 23130, 9416, 6557, 4361, 2332, 2027, 564 และ 125)	166
รูปที่ 4.11 Internal transcribed spacer II ของยุง <i>Anopheles minimus</i> เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีใน GenBank Database จดหมายถึงนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน จดหมายถึงนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป อักษร ‘RT’ หมายถึงชื่อของตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ส่วน อักษร ‘AMT’ เป็นตัวอย่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้	167

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

- รูปที่ 4.12 Neighbor-joining tree จากการเปรียบเทียบส่วน internal transcribed spacer II ของยุง *Anopheles minimus* โดยแสดงเฉพาะตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ตัวเลขกำกับการวิเคราะห์บนพื้นฐานของ Kimura 2-parameter มาตรฐานล่างแสดงหน่วยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ ตัวเลขกำกับแขนงแสดงร้อยละความเชื่อมั่น โดยวิธี bootstrap จำลอง 1,000 ครั้ง 169
- รูปที่ 4.13 Neighbor-joining tree โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome oxidase subunit II ของ mitochondria จากยุง *Anopheles minimus* การวิเคราะห์บนพื้นฐานของ Kimura 2-parameter มาตรฐานล่างแสดงหน่วยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ ตัวเลขกำกับแขนงแสดงร้อยละความเชื่อมั่น โดยวิธี bootstrap จำลอง 1,000 ครั้ง 171
- รูปที่ 4.14 Neighbor-joining tree โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน cytochrome oxidase subunit II ของ mitochondria จากยุง *Anopheles sp.* จากจังหวัดนราธิวาสเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Genbank database การวิเคราะห์บนพื้นฐานของ Kimura 2-parameter มาตรฐานล่างแสดงหน่วยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ ตัวเลขกำกับแขนงแสดงร้อยละความเชื่อมั่น โดยวิธี bootstrap จำลอง 1,000 ครั้ง 172

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

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

บทนำรวม

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

แม้ว่าโรคมาลาเรียสามารถป้องกันและรักษาได้ แต่จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกพบว่าประชากรโลกราว 3.2 พันล้านคน อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย โดยในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 300-500 ล้านคน ทั้งนี้โรคมาลาเรียเป็นสาเหตุของการตายของประชากรทั่วโลกกว่า 1-2 ล้านคน โดยส่วนใหญ่เป็นเด็กในทวีปแอฟริกา สำหรับในประเทศไทยโรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรที่อาศัยอยู่ตามชายแดนของประเทศ โดยในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อทั้งชาวไทยและชาวต่างชาติที่ข้ามพรมแดนของประเทศในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน สำหรับการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียในธรรมชาติ เกิดจากการที่ยุงก้นปล่องปล่อยเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite ในต่อมน้ำลายเข้าสู่กระแสเลือดในขณะกัดคน หลังจากนั้นระยะดังกล่าวจะลูกกลมเข้าสู่เซลล์ตับพร้อมกับกระบวนการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ เมื่อมีการพัฒนาเป็นระยะ merozoite ซึ่งเจริญเต็มที่แล้วจะออกจากเซลล์ตับเข้าสู่ระบบไหลเวียน พร้อมทั้งจะลูกกลมและเจริญในเม็ดเลือดแดงต่อไป การเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงแบบไม่อาศัยเพศ พร้อมกับการแตกของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียเจริญอยู่ภายใน จะทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการของโรคตามมา ในลักษณะของไข้หนาวสั่น ทั้งนี้เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนที่ทราบกันเป็นอย่างดีในอดีตรวม 4 ชนิดได้แก่

Plasmodium falciparum, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* โดย

Plasmodium falciparum สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพและอาการที่รุนแรงจนอาจเสียชีวิตได้ ในขณะที่

Plasmodium vivax และ *Plasmodium ovale* มีระยะที่มีการหยุดพักการเจริญในเซลล์ตับเรียกว่าระยะ

hypnozoite ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดไข้กลับ (relapse) ทำให้ผู้ได้รับเชื้อเพียงครั้งเดียวสามารถเกิดอาการของ

โรคมาลาเรียได้หลายครั้งในภายหลัง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* ซึ่ง

โดยทั่วไปพบการติดเชื้อในกลุ่มลิงกังและลิงแสม แต่เชื่อกันว่าสามารถติดต่อสู่คนจากการติดเชื้อตาม

ธรรมชาติ โดยอาศัยยุงก้นปล่องเป็นพาหะได้ แม้ว่าพยาธิสภาพและอาการของโรคมาลาเรียที่เกิดจาก

Plasmodium knowlesi มักไม่แตกต่างจากการติดเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ แต่จากการศึกษาในภายหลังใน

ประเทศมาเลเซียพบว่า เชื้อมาลาเรียดังกล่าวสามารถก่อพยาธิสภาพที่รุนแรงและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้

สำหรับอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในภูมิภาคต่างๆ ของโลกมีความแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยที่มีผลกระทบ ความเชื่อมโยง และปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน โดยเกี่ยวข้องกับ (1) ประชากรที่มีเชื้อมาลาเรียในร่างกายและประชากรในชุมชนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ (2) เชื้อมาลาเรียชนิดต่างๆ รวมทั้งพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยาด้านมาลาเรีย (3) ยุงพาหะนำโรค ชีวนิเวศ แหล่งเพาะพันธุ์และการตอบสนองต่อยาฆ่าแมลง และ (4) ในกรณีของเชื้อมาลาเรียที่มีลิงเป็นรังโรค การกระจายทางภูมิศาสตร์ของลิงแต่ละชนิดรวมทั้งโอกาสเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อผ่านยุงก้นปล่องพาหะมาสู่คน ดังนั้นผลสำเร็จของการควบคุมโรคมาลาเรียจะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยการวางมาตรการต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อ

ปัจจัยเหล่านี้โดยองค์รวม อย่างไรก็ตามด้วยข้อจำกัดจากวิธีวินิจฉัยโรคมาลาเรียในปัจจุบัน ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการประเมินสถานการณ์ของโรคที่เกิดขึ้นจริง เนื่องจากผู้ป่วยส่วนหนึ่งมีเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตต่ำกว่าที่สามารถตรวจพบได้จากการตรวจฟิล์มโลหิต ตลอดจนอาจมีการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดในผู้ป่วยคนเดียวกันซึ่งมักไม่ได้รับการวินิจฉัย ดังนั้นผู้ติดเชื้อเหล่านี้จึงสามารถแพร่เชื้อต่อไปได้และเชื้อมาลาเรียในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าวอาจได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์ในด้านการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียโดยไม่จำเป็นจึงก่อให้เกิดสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยามากขึ้นในอนาคตซึ่งต้องอาศัยนวัตกรรมการตรวจชนิดใหม่หรือปรับปรุงวิธีการทางอนุชีววิทยาที่มีความไวและจำเพาะสูงให้สามารถประยุกต์กับตัวอย่างจำนวนมากในภาคสนามได้ นอกจากนี้ชาวต่างชาติจากประเทศที่มีพรมแดนติดกับประเทศไทยมีการเดินทางระหว่างพรมแดนหรือการอพยพของแรงงานต่างชาติเข้ามาในประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งชาวต่างชาติส่วนหนึ่งมีการติดเชื้อมาลาเรียจึงเป็นการเพิ่มอัตราการพบผู้ป่วยโรคมาลาเรีย และอาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อในประเทศไทย ดังนั้นมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียจึงต้องคำนึงถึงปัญหาการนำเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ประเทศจากกลุ่มคนดังกล่าวซึ่งเชื้อมาลาเรียเหล่านี้อาจเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียแตกต่างไปจากเดิม และอาจก่อปัญหาในด้านการรักษาโรคในระยะยาวต่อไป การทราบข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งหน่วยพันธุกรรมที่อยู่นอกนิวเคลียสของเชื้อมาลาเรียที่เป็นเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียหลายขนานที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันย่อมเป็นแนวทางในการหามาตรการใหม่ ๆ เพื่อควบคุมเชื้อมาลาเรียในอนาคต อนึ่งข้อมูลในเชิงระบาดวิทยาและชีวนิสัชของยุงพาหะนำโรคมาลาเรียในระดับประเทศยังขาดการศึกษาอย่างครอบคลุม ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการวางมาตรการควบคุมโรค รวมทั้งปัญหาการอุบัติใหม่ของโรคมาลาเรีย (emerging diseases) ที่มีถึงเป็นรังโรคยังไม่ได้รับการประเมินอย่างต่อเนื่อง จากรายงานการพบอัตราการติดเชื้อมาลาเรียชนิดที่มีถึงเป็นรังโรคในประชากรจำนวนมากที่อาศัยในหมู่เกาะบอร์เนียวตอนเหนือและการตรวจพบผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับเชื้อชนิดเดียวกันทางภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งมีประชากรลิงชนิดเดียวกันอาศัยอยู่เป็นจำนวนมากในธรรมชาติและตามแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญบางแห่ง ย่อมมีโอกาสที่เชื้อมาลาเรียจากลิงอาจเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของประเทศต่อไป การดำเนินมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียตามสถานะที่มีความผันผวนจากปัจจัยหลายด้านซึ่งมีความซับซ้อนมากขึ้นในปัจจุบันและที่จะเกิดขึ้นในอนาคตย่อมต้องอาศัยการวางแผนยุทธศาสตร์เพื่อให้เกิดความยั่งยืนพร้อมทั้งบรรลุประสิทธิภาพอย่างเต็มที่ ดังนั้นพื้นฐานจากงานวิจัยที่สอดคล้องกันและสามารถนำไปประยุกต์ ขยายผลได้ในเชิงปฏิบัติและนวัตกรรมการเกิดจากการวิจัยจะเป็นพื้นฐานสำคัญในการวางมาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียในระดับชาติให้เกิดผลอย่างรวดเร็วควบคู่กับกระบวนการพัฒนาทรัพยากรบุคคลของชาติ ทั้งนี้ประเด็นปัญหาเกี่ยวกับการควบคุมโรคมาลาเรียที่ยังขาดความชัดเจนหรือจำเป็นต้องได้รับการศึกษาอย่างเร่งด่วนในปัจจุบัน ตลอดจนการเตรียมความพร้อมสำหรับอนาคตในระยะยาว

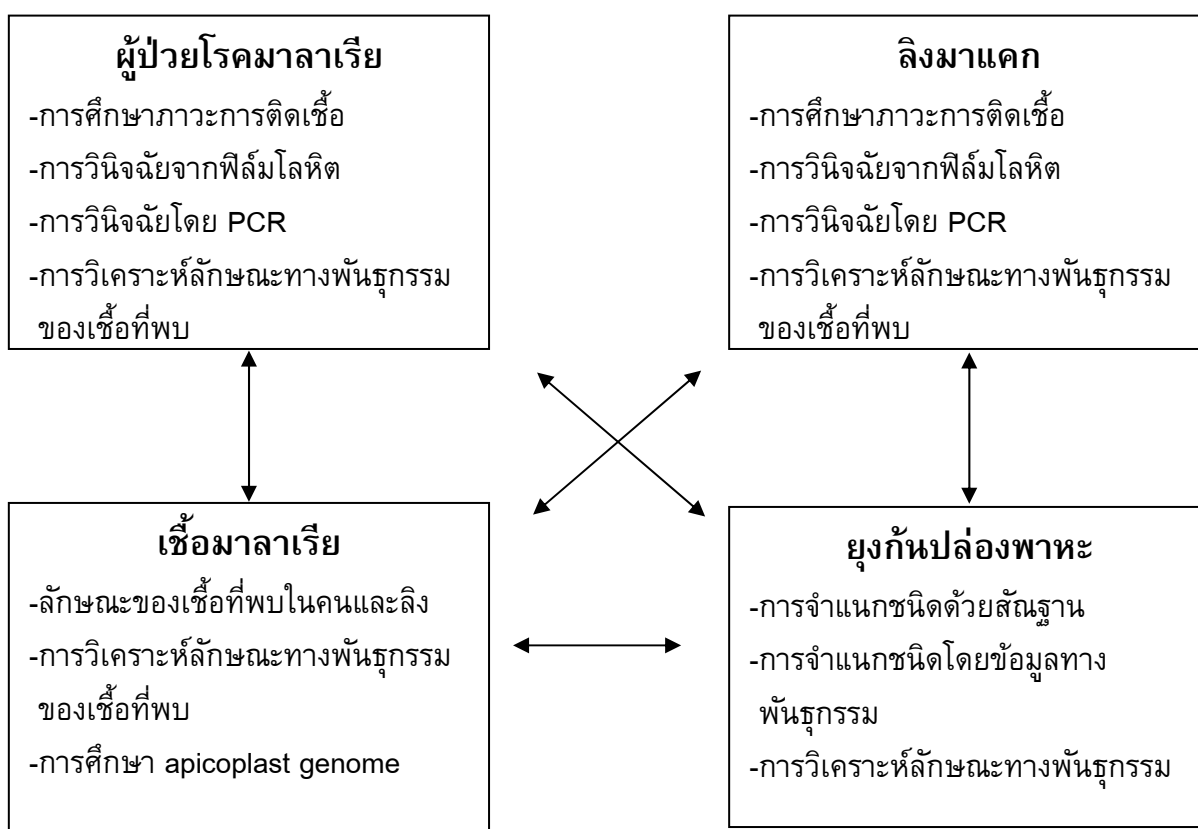
วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

การวิจัยเพื่อให้เกิดประโยชน์ในเชิงรูปธรรมในมิติต่างๆ โดยมีเป้าหมายหลักในการควบคุมโรคมาลาเรียอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน อันประกอบด้วย

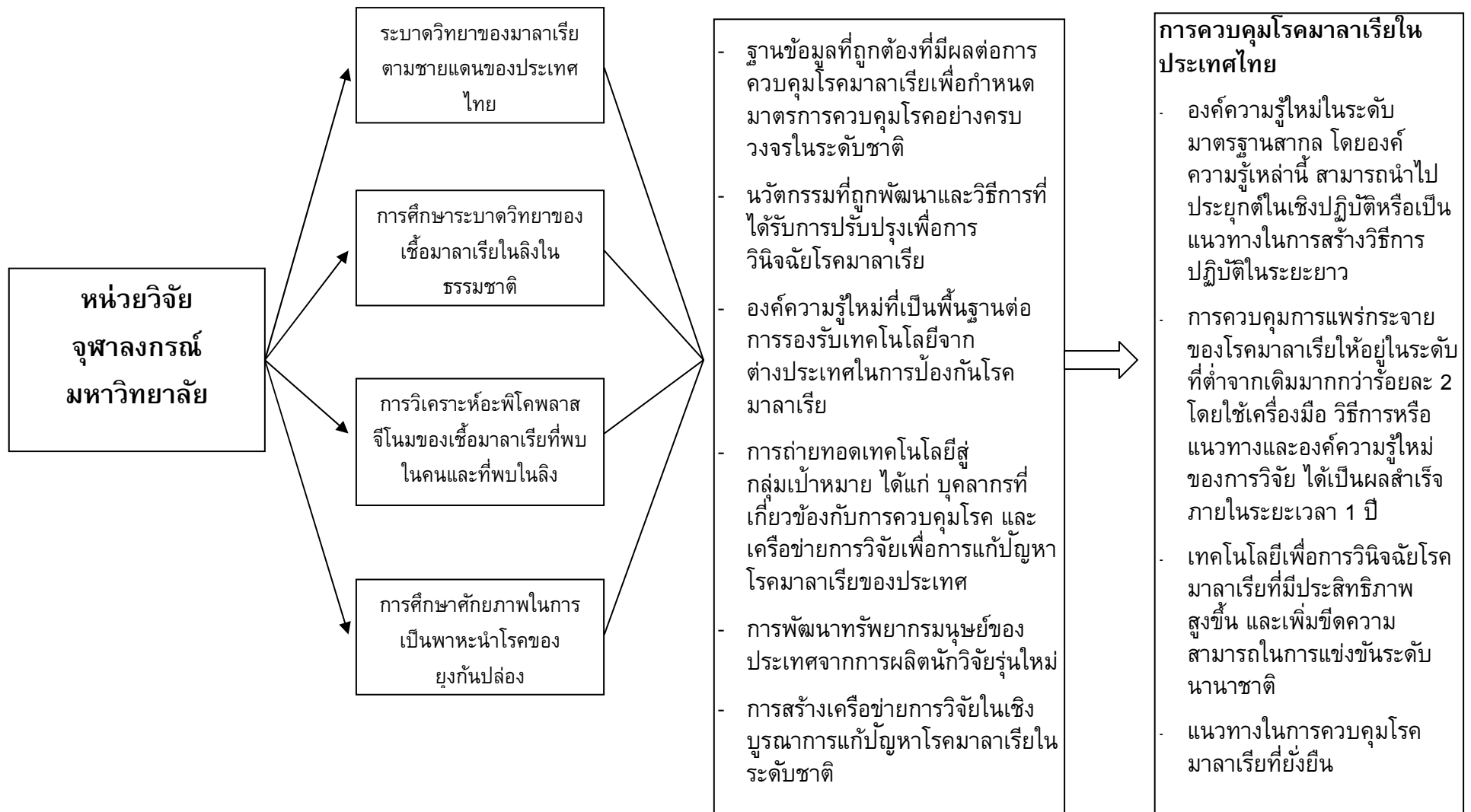
1. สร้างนวัตกรรมการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยวิธีที่มีความไวและถูกต้องสูง
2. สร้างองค์ความรู้และฐานข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ทันสมัยมีความถูกต้องเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการวางแผนมาตรการควบคุมโรคมาลาเรีย โดยเชื่อมโยงเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ที่ครอบคลุม (1) ประชากรที่มีเชื้อมาลาเรียในร่างกาย (2) เชื้อมาลาเรีย (3) ยุงพาหะนำโรค (4) สภาพของรังโรคในธรรมชาติ
3. การสร้างเครือข่ายการวิจัยและผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่เพื่อการแก้ปัญหาโรคมาลาเรียของประเทศและสามารถประยุกต์กับการแก้ปัญหาโรคติดเชื้ออื่นๆ ในอนาคตและตอบสนองต่อการพัฒนาทรัพยากรมนุษย์ของประเทศ
4. การเป็นแหล่งอ้างอิงทางวิชาการและการบริการต่อประชาคมวิจัย ตลอดจนหน่วยงานที่พึงจะนำผลการวิจัยไปใช้
5. การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่กลุ่มเป้าหมาย

รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย อาจมีแผนภูมิประกอบ

กรอบแนวคิดของแผนงานวิจัย



แผนภูมิโครงการวิจัย: ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย



ประโยชน์ที่ได้รับ

1. เนื่องจากการวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยวิธี PCR ให้ผลการตรวจที่แม่นยำและมีความไวสูงกว่าวิธีอื่น ๆ ดังนั้นผลการศึกษาในประชากรจำนวนมากตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยจะเป็นข้อมูลและดัชนีที่สำคัญในการวางแผนนโยบาย การควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย บนพื้นฐานข้อมูลที่จะเฝ้าระวังและชัดเจน การควบคุมโรคบนพื้นฐานของข้อมูลที่ดีย่อมสามารถลดจำนวนผู้ป่วยได้ในระยะยาวและเป็นการลดการสูญเสียแรงงานจากการเจ็บป่วยด้วยโรคมาลาเรียอันจะส่งผลต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ

2. การทราบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งมักจะวินิจฉัยไม่ได้หรือวินิจฉัยได้ยากจากฟิล์มโลหิตแต่สามารถตรวจได้จากวิธี PCR ข้อมูลจากการศึกษานี้มีความสำคัญต่อการวางแผนนโยบายการรักษาและควบคุมโรค เพื่อลดภาวะการเกิดไข้กลับจากเชื้อมาลาเรียต่างชนิดที่มีปริมาณเชื้อจำนวนน้อย และไม่ได้รับการวินิจฉัยในระยะแรก ๆ ผู้ติดเชื้อเหล่านี้ย่อมเป็นแหล่งแพร่เชื้อมาลาเรีย และเป็นอุปสรรคในการควบคุมโรคได้ต่อไป

3. การตรวจพบเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ที่มีต้นกำเนิดจากลิงนั้น ถ้ามีอุบัติการณ์สูงย่อมส่งผลกระทบต่อ การควบคุมโรคโดยรวมตลอดจนการท่องเที่ยวในเชิงอนุรักษ์ของประเทศ เชื้อมาลาเรียเหล่านี้มักไม่ได้รับการวินิจฉัยแยกจากเชื้อมาลาเรียที่พบโดยทั่วไปในมนุษย์ทั้ง 4 ชนิด (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale*) การศึกษานี้จะเป็นการไขปริศนาของปัญหาดังกล่าว ซึ่งการควบคุมโรคมาลาเรียที่มีต้นกำเนิดจากลิงย่อมมีความแตกต่างจากการควบคุมโรคที่ใช้ดำเนินการในปัจจุบัน รวมทั้งจะเป็นข้อมูลที่มีคุณค่าต่อเศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องกับการท่องเที่ยวของประเทศ

4. การศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรีย และชนิดของเชื้อมาลาเรียในลิงแต่ละชนิดที่พบในเขต จังหวัดนราธิวาสจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการช่วยป้องกันหรือเฝ้าระวังการติดต่อของโรคระหว่างมนุษย์กับลิง

5. การทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับเบสของ SSU rRNA gene และ mitochondrial cytochrome b ของเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงจะเป็นข้อมูลสำคัญในการเปรียบเทียบสายวิวัฒนาการ และการทราบสถานะของการเป็นรังโรคของลิง เมื่อพบเชื้อมาลาเรียดังกล่าวในมนุษย์ อันจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมรังโรคและแนวโน้มในการก่อโรคในมนุษย์ต่อไป

6. เนื่องจากประชากรลิงมีถิ่นอาศัยในป่าและบริเวณใกล้เขตชุมชนรวมทั้งแหล่งท่องเที่ยวหลายแห่งของ ประเทศ การควบคุมเชื้อมาลาเรียในลิงนอกจากจะเป็นการลดโอกาสที่เชื้อมาลาเรียจะแพร่กระจายสู่มนุษย์แล้ว ยังเป็นการสร้างความมั่นใจแก่นักท่องเที่ยวและส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศโดยอ้อม

7. เมื่อสิ้นสุดการวิจัยนี้จะทำให้ทราบว่าบริเวณชายแดนด้านตะวันตกของประเทศไทย บริเวณป่าเขา และแหล่งท่องเที่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตพื้นที่จังหวัดที่ศึกษารวมทั้งจังหวัดที่เคยมีการตรวจ พบมาลาเรียของลิง ในคน มียุงก้นปล่องชนิดใดบ้างที่เป็นยุงพาหะมาลาเรียของลิง รวมทั้งยังทราบ ความสามารถของยุงในบริเวณดังกล่าวในการเป็นพาหะเชื้อมาลาเรียของคนได้ ความรู้ดังกล่าวจะเป็นประโยชน์เพื่อการควบคุมยุงพาหะได้ถูกจุดและมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เนื่องจากยุงก้นปล่องแต่ละ ชนิดมักมีชีวนิสัยแตกต่างกัน

8. การสังเกตพฤติกรรมในการเลือกคู่เลือดเหยื่อจากจำนวนตัวอย่างและชนิดของยุงที่จับได้จากการใช้เหยื่อล่อที่แตกต่างกัน รวมทั้งการวิเคราะห์อัตราการพบเชื้อมาลาเรียของลิงและคนในยุงเหล่านี้ สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงโอกาสที่เชื้อมาลาเรียที่มีต้นกำเนิดจากคนและลิงจะเกิดการแพร่กระจายไปมาระหว่างกันได้ รวมทั้งจะช่วยพยากรณ์ความเสี่ยงของการได้รับเชื้อมาลาเรียของประชาชนในเขตพื้นที่ปรากฏโรคและในกลุ่มนักท่องเที่ยวที่เดินทางมาในบริเวณดังกล่าว และความเสี่ยงตามช่วงเวลาในรอบปีในกรณีที่มีการตรวจพบเชื้อมาลาเรียของลิงในยุง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณที่มีกลุ่มลิงใกล้บ้านเรือนประชาชนนั้นการบำบัดมาลาเรียในลิงจะเป็นการตัดวงจรการติดต่อของเชื้อมาลาเรียได้ และเป็นการสร้างความมั่นใจต่อระบบการท่องเที่ยวของประเทศ

9. ข้อมูล apicoplast genome ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดที่เป็นมาลาเรียที่สำคัญของคนได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* ในเชิงเปรียบเทียบจะเป็นประโยชน์ในการออกแบบยาต้านมาลาเรียในอนาคต รวมทั้งความเข้าใจในผลของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่ยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการทำหน้าที่ของ 70S ribosomes ในการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อมาลาเรีย

10. การสร้างข้อมูลเกี่ยวกับ apicoplast genome ของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ สำหรับฐานข้อมูลนานาชาติ ทำให้นักวิจัยจากทั่วโลกสามารถนำข้อมูลหรือองค์ความรู้ที่ได้เพื่อต่อยอดงานวิจัยเกี่ยวกับการแสวงหายาต้านมาลาเรียชนิดใหม่

11. การเปรียบเทียบ apicoplast genome ของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาเกี่ยวกับโปรโตซัวในกลุ่ม coccidian อื่น ๆ จะทำให้เข้าใจกระบวนการวิวัฒนาการของจุลชีพในกลุ่มนี้ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการคาดคะเนอัตราการผ่าเหล่าใน apicoplast genome ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการผ่าเหล่าของ nuclear genome จะช่วยพยากรณ์ความยั่งยืนในประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรียที่มีผลต่อเป้าหมายที่ต่างกัน

12. ข้อมูลความหลากหลายในบางส่วนของ apicoplast genome ที่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะเป็นเป้าหมายที่ดีอีกส่วนหนึ่งในการใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อและชนิดของเชื้อมาลาเรียโดยวิธีทางอนุชีววิทยา

หน่วยงานที่น่าผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในมาลาเรียคลินิก หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง สถานพยาบาล ต่างๆ
2. หน่วยงานวิจัย กระทรวงสาธารณสุข และหน่วยงานวิชาการต่าง ๆ
3. บุคลากรประชาคมวิจัยทั้งในและต่างประเทศ นักวิชาการทั่วไป และประชาชนทั่วไป