



แบบสรุปผู้บริหาร
(Executive Summary)

แผนงานวิจัยเรื่อง
“ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย”
“Integrative Research in Malaria Epidemiology”

หน่วยงานวิจัยหลัก
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย
ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์
รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์
อ.ดร. สุนีย์ สีธรรมใจ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
มีนาคม 2553

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) “ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย”

(ภาษาอังกฤษ) “Integrative Research in Malaria Epidemiology”

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

หัวหน้าแผนงานวิจัย

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

สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธรทิพย์ (Chaturong Putaporntip Ph.D.)

สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

2. อ. ดร. สุณีย์ สีธรรมใจ (Sunee Seethamchai Ph.D.)

สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก

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

3. นางสาวศิริพร ทองอารีย์ (Siriporn Thongaree M.Sc.) นักวิทยาศาสตร์ 8ว

สังกัดสถานีวิจัยสัตว์ป่าปาพรุ - ป่าฮาลาบาลา กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า

กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช นครราชสีมา กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและ

สิ่งแวดล้อม โทรศัพท์ 073-586040

4. รศ.ณัฐรุต จันทชุม (Nutaros Chantachum M.Sc.)

สังกัดภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

5. นพ.จิรพัฒน์ สิริชัยสินธพ (Jeeraphat Sirichaisinthop M.D.)

ศูนย์อบรมโรคติดต่อมาโดยแมลง (สังกัดสำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง)

6 ถ.พหลโยธิน ต.ธารเกษม อ.พระพุทธบาท จ.สระบุรี 18120

โทรศัพท์ 036-266142 โทรสาร 036-267586

1.3 งบประมาณและระยะทำการวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2551

จำนวนเงิน 13,000,000 บาท (สิบสามล้านบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2552

2. สรุปแผนงานวิจัย

แม้ว่าโรคมาลาเรียสามารถป้องกันและรักษาได้แต่จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกพบว่าประชากรโลกราว 3.2 พันล้านคนอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย โดยในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 300-500 ล้านคนและเป็นสาเหตุของการตายของประชากรทั่วโลกราว 1-2 ล้านคน สำหรับในประเทศไทยโรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรที่อาศัยอยู่ตามชายแดนของประเทศ ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อทั้งชาวไทยและชาวต่างชาติที่ข้ามพรมแดนของประเทศในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนที่ทราบกันในอดีตมี 4 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* โดย *Plasmodium falciparum* สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพและอาการที่รุนแรงจนอาจเสียชีวิตได้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* จากลิงและพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งเชื้อมาลาเรียเหล่านี้มีศูนย์กลางปล่องเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียมาสู่คน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อให้ทราบระบาดวิทยาของโรคมาลาเรียในประเทศไทยอย่างครอบคลุมทั้งผู้ป่วยลิงและยุงก้นปล่อง เพื่อประโยชน์ในการวางแผนมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียในระดับชาติ รวมทั้งการศึกษา apicoplast genome เพื่อเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญต่อการออกแบบยาในอนาคต

วิธีการวิจัยดำเนินการ โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยครอบคลุมพื้นที่จังหวัดตาก ยะลา นราธิวาส และ จันทบุรี จำนวนทั้งสิ้น 4,134 ตัวอย่าง รวมทั้งประชากรลิงป่าและลิงบ้านในเขตจังหวัดนราธิวาส และใกล้เคียง โดยสามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดได้จำนวน 655 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเลือดมาตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ในตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียจะทำการหาลำดับเบสและวิเคราะห์ทางพันธุกรรมประชากร และสายใยทางวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย สำหรับการศึกษาศักยภาพการเป็นพาหะนำโรคของยุงก้นปล่องต่อเชื้อมาลาเรียในคนและลิงทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย ได้ทำการเก็บตัวอย่างยุงในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และระนอง รวมทั้งสิ้น 28,011 ตัวอย่าง ทำการเตรียม DNA จากยุงพาหะหลักชนิด *Anopheles minimus* เพื่อวิเคราะห์ชนิดของมาลาเรียจำนวน 397 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดที่พบในคนและเชื้อมาลาเรียที่มาจากลิง นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์พันธุกรรมของยุงกลุ่มสายพันธุ์ซับซ้อนชนิด *Anopheles minimus* จำนวน 150 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับตัวอย่างยุงชนิดดังกล่าวที่เก็บรวบรวมไว้ในปี พ.ศ. 2549 และ 2550 สำหรับการวิเคราะห์ apicoplast genome ของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนและที่พบในลิง ใช้ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium inui* และ *Plasmodium cynomolgi* ทำการเตรียมดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และหาลำดับเบสของทั้ง genome ความยาวทั้งหมดประมาณ 35,000 เบส นำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของ apicoplast genome ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด

ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากตัวอย่างเลือดทั้งหมด 4,134 ตัวอย่าง พบจำนวนชนิดของการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และยังตรวจพบการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันมากกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถึง 35 เท่า และพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Plasmodium*

knowlesi จำนวน 15 ราย จากทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ ส่วนผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจากลึงภายในคัสลิ่ง จุลทรรศน์พบเชื้อมาลาเรียและ *Hepatozoon* 164 ตัวอย่าง จากจำนวนลึงทั้งหมด 655 ตัว ในขณะที่ผลการตรวจ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสให้ผลบวก 190 ตัวอย่าง และยังพบการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันมากถึงร้อยละ 36.3 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก ทั้งนี้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในการศึกษานี้ได้อย่างชัดเจน 7 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium inui*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium fieldi* และ *Plasmodium simiovale* รวมทั้ง *Hepatozoon* การตรวจพบ *Plasmodium knowlesi* ในประชากรลิงในภาคใต้ของประเทศไทย บ่งบอกถึงการเป็นรังโรคของลิงเหล่านี้ สำหรับผลการศึกษา apicoplast genome พบว่าเชื้อมาลาเรียทั้ง 6 ชนิด มีโครงสร้างคล้ายกับที่พบในเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่เป็น inverted repeats ที่มียีน small subunit ribosomal RNA และยีน large subunit ribosomal RNA ยีนสำหรับ transfer RNA ชนิดต่าง ๆ ยีนสำหรับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซม ยีนสำหรับเอนไซม์ RNA polymerase และยีนที่สร้างโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน เป็นที่น่าสนใจว่า องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์นั้นมี adenine และ thymine รวมกันสูงถึงร้อยละ 86.2 - 86.8 และการใช้โคดอนสำหรับกรดอะมิโนหนึ่ง ๆ มีค่าเบี่ยงเบนจากปกติอย่างเห็นได้ชัด การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีนภายใน apicoplast มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามพบว่าสายใยพันธุกรรมของยีนสำหรับ transfer RNA ไม่สอดคล้องกับการแยก species ของเชื้อมาลาเรีย ในทางตรงกันข้ามความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ยีนที่มีการสร้างโปรตีนนั้นมีความสอดคล้องกับการแยกสายวิวัฒนาการต่อชนิดของมาลาเรีย แสดงว่าวิวัฒนาการของจีโนมใน apicoplast นั้นเกิดขึ้นพร้อมกับการแยก species ของเชื้อมาลาเรีย ส่วนของจีโนมหลายบริเวณที่มีความคงที่ระหว่าง species สูงจึงอาจเป็นไปได้ที่การรบกวนการทำหน้าที่ของ apicoplast อาจมีผลต่อเชื้อมาลาเรียหลาย species สำหรับผลการศึกษาชนิดของยุงที่นำโรคมาลาเรียนั้นพบว่าในจำนวนยุงก้นปล่องทั้งหมดที่จับได้จำนวน 28,011 ตัว พบยุงก้นปล่องพาหะหลัก 3,826 ตัว เป็นชนิด *Anopheles minimus* มากที่สุด ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างในการกระจายและความชุกของชนิดของยุงพาหะหลักในฤดูแล้งและฤดูฝนในทุกพื้นที่ที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าคนและสัตว์เป็นเหยื่อล่อที่ดีที่ติดเทียมกันสำหรับยุงก้นปล่องพาหะหลัก สำหรับการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรมของยุง *Anopheles minimus* จำนวน 150 ตัว ทั้งหมดสามารถจัดอยู่ในสายพันธุ์ซับซ้อนชนิด A และในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุง *Anopheles minimus* จำนวน 397 ตัว โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสพบว่ายุงทั้งหมด 15 ตัวหรือร้อยละ 3.8 ตรวจพบเชื้อมาลาเรีย และคณะผู้วิจัยยังตรวจพบเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium knowlesi* และ *Plasmodium inui* จากยุง *Anopheles dirus* complex ที่จับได้จากป่าในเขตจังหวัดนครราชสีมาจากการใช้คนและลิงเป็นเหยื่อล่อ

จากผลการศึกษาที่ได้สามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรีย เนื่องจากการวินิจฉัยโรคมาลาเรียโดยวิธี PCR ให้ผลการตรวจที่แม่นยำและมีความไวสูงกว่าวิธีอื่น ๆ ดังนั้นผลการศึกษาในประชากรจำนวนมากตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยนับเป็นข้อมูลและดัชนีที่สำคัญในการวางแผนนโยบาย การควบคุมโรคมาลาเรียในระดับชาติ การทราบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งมักจะวินิจฉัยไม่ได้หรือวินิจฉัยได้ยากจากฟิล์มโลหิตแต่สามารถตรวจได้จากวิธี PCR ข้อมูลนี้มีความสำคัญต่อ

การวางแผนนโยบายการรักษาและควบคุมโรค เพื่อลดภาวะการเกิดไข้กลับจากเชื้อมาลาเรียต่างชนิดที่มีปริมาณเชื้อจำนวนน้อย การศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรีย และชนิดของเชื้อมาลาเรียในลิงแต่ละชนิดที่พบในเขตจังหวัดนราธิวาสเป็นข้อมูลที่สำคัญในการช่วยป้องกันหรือเฝ้าระวังการติดต่อของโรคระหว่างมนุษย์กับลิง การทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงเป็นข้อมูลสำคัญในการเปรียบเทียบสายวิวัฒนาการและการทราบสถานะของการเป็นรังโรคของลิง เมื่อนำข้อมูลที่ได้นี้มาเปรียบเทียบกับมาลาเรียชนิดที่พบในคนจึงเป็นประโยชน์ในการวางแผนป้องกันโรคมาลาเรียอย่างครอบคลุม ส่วนผลการศึกษาชนิดของยุงก้นปล่องพาหะหลักในประเทศไทยเป็นชนิด *Anopheles minimus* สายพันธุ์ซับซ้อน A และการตรวจพบว่ายุง *Anopheles dirus* complex ที่จับได้จากป่าในเขตจังหวัดนราธิวาสจากการใช้คนและลิงเป็นเหยื่อล่อ พบเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium knowlesi* และ *Plasmodium inui* ยุงชนิดนี้จึงมีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียดังกล่าว ข้อมูลเกี่ยวกับสถานะการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียของยุงก้นปล่องชนิดต่างๆ นับเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นพื้นฐานเพื่อการวางแผนนโยบายควบคุมพาหะของโรคมาลาเรีย ส่วนข้อมูล apicoplast genome ของเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิดที่เป็นมาลาเรียที่สำคัญของคนในเชิงเปรียบเทียบจะเป็นประโยชน์ในการออกแบบยาต้านมาลาเรียในอนาคต รวมทั้งความเข้าใจในผลของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่ยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการทำหน้าที่ของการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อมาลาเรีย การสร้างข้อมูลเกี่ยวกับ apicoplast genome ของเชื้อมาลาเรียชนิดต่าง ๆ สำหรับฐานข้อมูลนานาชาติ ทำให้นักวิจัยจากทั่วโลกสามารถนำข้อมูลหรือองค์ความรู้ที่ได้เพื่อต่อยอดงานวิจัยเกี่ยวกับการแสวงหายาต้านมาลาเรียชนิดใหม่

กลุ่มเป้าหมายที่สามารถนำผลงานจากการศึกษานี้ไปใช้ประโยชน์ประกอบด้วย (1) เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในมาลาเรียคลินิก หน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง สถานพยาบาลต่างๆ (2) หน่วยงานวิจัย กระทรวงสาธารณสุข และหน่วยงานวิชาการต่าง ๆ (3) บุคลากรประชาคมวิจัยทั้งในและต่างประเทศ นักวิชาการทั่วไป และประชาชนทั่วไป

เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียจาก *Plasmodium knowlesi* ในประเทศไทยค่อนข้างต่ำและการติดเชื้อดังกล่าวมักพบร่วมกับการติดเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ดังนั้นการตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรีนี้นี้โดยวิธี PCR เพื่อวินิจฉัยจึงมีความจำเป็น และควรมีการนำวิธี PCR ไปใช้เพื่อการตรวจและประเมินสถานการณ์ของโรคในบางท้องที่โดยการสุ่มตัวอย่างจากพื้นที่ที่มีปัญหาการควบคุมโรคในแหล่งที่มีการแพร่กระจายของลิงที่มีเชื้อมาลาเรียควรมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อมาลาเรียของลิงในคนต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อ และบริเวณที่มีลิงที่มีศักยภาพในการเป็นรังโรค เนื่องจากในการศึกษานี้มีการค้นพบยุงที่มีเชื้อมาลาเรียลิง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในจังหวัดนราธิวาสหรือใกล้เคียงเพื่อทราบถึงการแพร่กระจายของยุงพาหะนำโรคมาลาเรียอย่างครอบคลุมเท่าที่สถานการณ์อำนวย และในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในยุงนั้นนอกจากใช้วิธี PCR ที่ดำเนินการอยู่แล้วควรมีการตรวจด้วยวิธี reverse transcription-PCR เพื่อตรวจยืนยันสถานะการเป็นยุงพาหะนำโรคมาลาเรีย ในหัวข้องานวิจัยเกี่ยวกับ apicoplast genome นั้นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเพิ่มปริมาณของ apicoplast เพื่อหาผลกระทบของยาหรือสารเคมีที่อาจมีผลต่อกระบวนการดังกล่าว และควรมีการศึกษาลักษณะและหน้าที่ของยีนจาก apicoplast genome ที่ถูกขนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสของเชื้อมาลาเรียรวมทั้งการทำ gene knockout เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนดังกล่าว

3. บทคัดย่อ

โครงการวิจัยที่ 1

(ภาษาไทย) ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของการติดเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์และเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในผู้ป่วยทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย

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

บทคัดย่อภาษาไทย

แม้ว่ามาตรการควบคุมโรคมาลาเรียแบบผสมผสานระดับประเทศ ทำให้จำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยลดลงอย่างชัดเจนในช่วง 3 ทศวรรษที่ผ่านมา แต่มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขตามแนวชายแดนของประเทศ ทั้งนี้อุปสรรคในการควบคุมโรคมาลาเรียมีปัจจัยหลักจากการที่ยุงก้นปล่องพาหะคือต่อยามีแมลงและเชื้อมาลาเรียเกิดการติดต่อยาด้านมาลาเรีย ปัญหาการอพยพข้ามพรมแดนของผู้ที่มีเชื้อในร่างกาย รวมทั้งการค้นพบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium knowlesi* ซึ่งพบในลิงนั้น สามารถก่อโรคในคน ปัจจัยเหล่านี้ย่อมอาจเป็นอุปสรรคต่อความก้าวหน้าของการควบคุมโรค ดังนั้นเพื่อเป็นการทราบสถานะของการติดเชื้อมาลาเรียในเขตปรากฏโรคหลักของประเทศ คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจชนิดของเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก จันทบุรี นราธิวาสและยะลาโดยการตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดที่ย้อมสียิมซ่าและเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อเพิ่มปริมาณในส่วนที่ยีน small subunit ribosomal RNA ของมาลาเรียที่พบในคน รวมทั้ง *Plasmodium knowlesi* จากจำนวนตัวอย่างเลือดทั้งหมด 4,134 ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในจังหวัดตากจำนวน 1,630 ราย จังหวัดจันทบุรี 316 ราย จังหวัดนราธิวาส 546 ราย และจังหวัดยะลาจำนวน 1,642 ราย ซึ่งทำการเก็บรวบรวมในระหว่างเดือนกันยายน 2551 ถึง ตุลาคม 2552 ผลการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมาลาเรีย 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 สามารถตรวจพบมาลาเรียที่ไม่พบจากการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 147 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.9 ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด นอกจากนี้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสยังตรวจพบเชื้อมาลาเรียหลายชนิดมากขึ้น และยังตรวจพบการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันมากกว่าการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถึง 35 เท่า สำหรับการกระจายของเชื้อมาลาเรียในแต่ละจังหวัดพบว่ามีความแตกต่างกัน 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

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.

โครงการวิจัยที่ 2

(ภาษาไทย) การตรวจหาและวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในประชากรลิงป่าและ
ลิงบ้านในเขตจังหวัดนราธิวาส

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

บทคัดย่อภาษาไทย

การติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในคนไทยทำให้ตระหนักถึงความสำคัญของลิงมาแควในการเป็นรังโรคซึ่งมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาอุบัติการณ์และการกระจายของเชื้อมาลาเรียในลิงมาแควจึงมีความสำคัญซึ่งอาจเป็นตัวสะท้อนให้เห็นถึงแนวโน้มของโรคในคน คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในประชากรลิงในเขตจังหวัดนราธิวาสและบริเวณใกล้เคียงในปี ค.ศ. 2009 ในการสำรวจนี้ได้ทำการจับลิง 665 ตัว ประกอบด้วยลิงกัง 455 ตัว ลิงแสม 187 ตัว ลิงวอกภูเขา 4 ตัว ค่างแว่นถิ่นใต้ 7 ตัว และลิงลูกผสม 2 ตัว ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมาลาเรียและ *Hepatozoon* 164 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยใช้นิวคลีโอไทด์ small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) เป็นเป้าหมายให้ผลบวก 190 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28.6) ทั้งนี้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบ *Plasmodium inui* 69 ตัวอย่าง *Plasmodium cynomolgi* 2 ตัวอย่าง *Plasmodium knowlesi* 2 ตัวอย่าง และ *Hepatozoon* จำนวน 67 ตัวอย่าง ในทางตรงข้ามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU rRNA และ mitochondrial cytochrome b (*Mtcb*) พบการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันมากถึงร้อยละ 36.3 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก ทั้งนี้ *Plasmodium inui* มีอุบัติการณ์สูงสุดโดยพบร้อยละ 36.3 ในลิงกังและร้อยละ 38.9 ในลิงแสม สำหรับ *Plasmodium knowlesi* พบจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยพบในลิงกัง 9 ตัวอย่าง ลิงแสม 2 ตัวอย่าง และค่างแว่นถิ่นใต้ 1 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้เป็นการศึกษาเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium knowlesi* กับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น 10 ตัวอย่าง แม้ว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในการศึกษานี้ได้อย่างชัดเจน 7 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium inui*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium fieldi* และ *Plasmodium simiovale* รวมทั้ง *Hepatozoon* แต่จากการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรมพบลำดับเบสของยีน *Mtcb* 47 แบบ ที่ไม่สามารถจัดเข้ากับเชื้อมาลาเรียชนิดใด โดยแยกเป็น 2 แขนงใหม่ที่มีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ค่อนข้างสูง แสดงว่าเชื้อมาลาเรียดังกล่าวเป็นชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามการตรวจพบ *Plasmodium knowlesi* ในประชากรลิงในภาคใต้ของประเทศไทย บ่งบอกถึงการเป็นรังโรคของลิงเหล่านี้ ในขณะที่การพบอุบัติการณ์ต่ำของการติดเชื้อมาลาเรียชนิดดังกล่าวในลิงและในคนอาจเนื่องจากคนได้รับเชื้อส่วนใหญ่จากลิงที่เป็นรังโรคโดยผ่านยุงก้นปล่องพาหะที่เหมาะสม

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 *Hepaticystis* 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 *Hepaticystis* (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 *Hepaticystis*. 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 *Hepaticystis*, 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.

โครงการวิจัยที่ 3

(ภาษาไทย) การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อมาลาเรียที่พบในคนและที่พบในลิง

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

บทคัดย่อภาษาไทย

เชื้อมาลาเรียมีจีโนมที่อยู่นอกโครโมโซมขนาด 35 กิโลเบส อยู่ใกล้กับไมโทคอนเดรีย หรือเรียกว่า apicoplast ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญต่อการดำรงชีพของเชื้อมาลาเรีย apicoplast มีจีโนมที่เป็นวงกลมและมีวิวัฒนาการมาจากกระบวนการเกิด 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 และการใช้ โคดอนสำหรับกรดอะมิโนหนึ่ง ๆ มีค่าเบี่ยงเบนจากปกติอย่างเห็นได้ชัด การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีนภายใน apicoplast มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละ species อย่างไรก็ตามพบว่าสายใยพันธุกรรมของยีนสำหรับ transfer RNA ไม่สอดคล้องกับการแยก species ของเชื้อมาลาเรียบนพื้นฐานของยีน SSU rRNA และ LSU rRNA ในทางตรงกันข้ามพบว่า ความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ยีนที่มีการสร้างโปรตีนนั้นมีความสอดคล้องกัน แสดงว่าวิวัฒนาการของจีโนมใน apicoplast นั้นเกิดขึ้นพร้อมกับการแยก species ของเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนของจีโนมหลายบริเวณที่มีความคงที่ระหว่าง species สูงจึงอาจเป็นไปได้ว่าการรบกวนการทำหน้าที่ของ apicoplast อาจมีผลต่อเชื้อมาลาเรียหลาย species ดังนั้น apicoplast จึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจสำหรับการออกฤทธิ์ของยา หรือมาตรการอื่น ๆ ซึ่งอาจมีผลต่อเชื้อมาลาเรียโดยไม่จำกัดอยู่เพียงเชื้อมาลาเรียชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

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.

โครงการวิจัยที่ 4

(ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพในการเป็นพาหะนำโรคของยุงก้นปล่องต่อเชื้อมาลาเรียในคน และลิงทางตะวันตกและทางใต้ของประเทศไทย

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

บทคัดย่อภาษาไทย

การแพร่กระจายของมาลาเรียทั้งชนิดที่ก่อโรคในคนและที่พบในลิงต้องอาศัยยุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาสถานะของระบบนิเวศ ตลอดจนแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงพาหะในประเทศไทย ได้มีการเปลี่ยนแปลงจากอดีต ซึ่งส่วนหนึ่งเนื่องมาจากการถางป่ารวมทั้งการขยายตัวของชุมชนเมือง ใน การศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจการแพร่กระจายและความชุกของยุงก้นปล่องพาหะหลักและพาหะรองใน แถบตะวันตกและทางตอนใต้ของประเทศไทย ซึ่งยังเป็นเขตปรากฏโรคมมาลาเรีย โดยทำการสำรวจในช่วงฤดูแล้ง (ตุลาคมและธันวาคม พ.ศ. 2551) และฤดูฝน (พฤษภาคม-สิงหาคม พ.ศ. 2552) ในพื้นที่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์และระนอง โดยใช้คนและสัตว์เป็นเหยื่อล่อ ผลการสำรวจพบว่าในจำนวนยุงก้นปล่องทั้งหมดที่ จับได้จำนวน 28,011 ตัว จัดเป็นยุงก้นปล่องพาหะหลัก 3,826 ตัว ซึ่ง *Anopheles minimus* มีจำนวนมากที่สุด คิด เป็นร้อยละ 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* ยังคงเป็นยุงพาหะสงสัยที่พบ มากที่สุดในทุกจังหวัดที่สำรวจ ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างในการกระจายและความชุกของชนิดของยุงพาหะหลัก ในฤดูแล้งและฤดูฝนในทุกพื้นที่ที่ศึกษา เป็นที่น่าสังเกตว่าคนและสัตว์เป็นเหยื่อล่อที่ดึงดูดติดเทียมกันสำหรับ ยุงก้นปล่องพาหะหลัก ในขณะที่ยุงก้นปล่องพาหะรองและพาหะสงสัยชอบกัดสัตว์มากกว่าคน สำหรับการ วิเคราะห์สายใยพันธุกรรมจากการใช้ลำดับเบสของ internal transcribed spacer II (ITS-2) และ cytochrome oxidase II พบว่ายุง *Anopheles minimus* จำนวน 150 ตัว ทั้งหมดสามารถจัดอยู่ในสายพันธุ์ซับซ้อนชนิด A โดย มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์เล็กน้อยระหว่างแต่ละตัวอย่าง นอกจากนี้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย ในยุง *Anopheles minimus* จำนวน 397 ตัว โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อตรวจสอบยีน SSU rRNA ของ เชื้อมาลาเรียพบว่า ยุงทั้งหมด 15 ตัวหรือร้อยละ 3.8 ให้ผลบวกต่อการตรวจโดยพบ *Plasmodium falciparum* จำนวน 3 ตัวอย่าง *Plasmodium vivax* จำนวน 11 ตัวอย่าง และเชื้อมาลาเรียทั้งสองชนิด 1 ตัวอย่าง ซึ่งผลที่ได้ สนับสนุนถึงความสำคัญของยุงชนิดนี้ในการเป็นพาหะนำโรคมมาลาเรียที่สำคัญของประเทศไทย ในทำนอง เดียวกันคณะผู้วิจัยได้ตรวจพบว่ายุง *Anopheles dirus* complex ที่จับได้จากป่าในเขตจังหวัดนราธิวาสจากการใช้ คนและลิงเป็นเหยื่อล่อ พบเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium knowlesi* และ *Plasmodium inui* ซึ่งยุงชนิดนี้อาจมีศักยภาพ ในการเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียดังกล่าว ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับสถานะการเป็นพาหะนำโรคมมาลาเรียของ ยุงก้นปล่องชนิดต่างๆ นับเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นพื้นฐานเพื่อการวางแผนนโยบายควบคุมโรคมมาลาเรีย ระดับประเทศต่อไป

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 sundaicus* 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.