

พันธุศาสตร์ประชากรเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี : กรณีศึกษาเปรียบเทียบระหว่างปี พ.ศ. 2553 และ พ.ศ. 2556-2557

คณิงนิจ คงพวง^{1*}, รตวรรณ อุบาลี², เอกชัย คำฝัน¹

¹สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ

²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ฝ่ายสหรัฐอเมริกา กรุงเทพฯ

Population Genetics of *Plasmodium vivax* in Saiyok District, Kanchanaburi Province : A Comparative Study Case between the Years 2010 and 2013-2014

Kanungrit Congpuong^{1*}, Ratawan Ubalee², Ekkachai Khamfan¹

¹Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok

²United States Army Medical Component, Armed Force Research Institute of Medical Sciences, Bangkok

หลักการและวัตถุประสงค์ : ปัจจุบันสถานการณ์ของชนิดเชื้อมาลาเรียเปลี่ยนแปลงไป ที่จังหวัดกาญจนบุรีมีผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* มากกว่าชนิด *P. falciparum* วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบลักษณะพันธุกรรมของประชากร *P. vivax* ในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีโรคมาลาเรียชุกชุม ในสองช่วงเวลาคือปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557

วิธีการศึกษา : เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 และ PV3.502 ของ *P. vivax* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแต่ละตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วน

ผลการศึกษา : ประชากรเชื้อมาลาเรียของสองช่วงเวลามีความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ตรวจสูงมาก และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยประชากรปี พ.ศ. 2556-2557 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าประชากรปี พ.ศ. 2553 ค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตีของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง PV3.27 ของประชากรปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 เท่ากับ 0.898 และ 0.927 และค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตีของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง PV3.502 ของประชากรปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557

Background and Objective: In Kanchanaburi province, malaria caused by *Plasmodium (P) vivax* has increased in higher proportion compared to *P. falciparum* but little is known about genetic structure of *P. vivax* in this area. This study aimed to compare genetic characteristics of *P. vivax* isolates collected from malaria patients in Saiyok district of Kanchanaburi province in year 2010 and years 2013-2014.

Material and Methods: Two microsatellite markers, i.e. PV3.27 and PV3.502 were amplified by nested polymerase chain reaction, followed by fragment analysis of PCR products.

Result: *P. vivax* population of years 2013-2014 had statistical significance higher in genetic diversity than population of year 2010. Expected heterozygosity values of microsatellite marker, PV3.27 of year 2010 and 2013-2014 were 0.898 and 0.927; those values of PV3.502 were 0.873 and 0.912, respectively. Polyclonal infection of *P. vivax* population in Saiyok district, Kanchanaburi province was high. The average polyclonal infections were 52.1%; 54.8% in 2010 and 48.4% in 2013-2014. Mean multiplicity of infection was 2.35, 2.38,

*Corresponding author: คณิงนิจ คงพวง สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ซอยอิสรภาพ 15 แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600 E-mail : k.congpuong@gmail.com Tel. 084-3767400

เท่ากับ 0.873 และ 0.912 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยการติดเชื้อพร้อมกันหลายโคลนของประชากร *P. vivax* ที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรีมีอัตราสูงถึงร้อยละ 52.1 โดยปี พ.ศ. 2553 พบร้อยละ 54.8 และปี พ.ศ. 2556-2557 พบร้อยละ 48.4 ค่าเฉลี่ยจำนวนโคลนที่ติดเชื้อในกลุ่มที่มีการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งโคลนเท่ากับ 2.35, 2.38 และ 2.45 สำหรับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27, PV3.502 และรวมทั้งสองเครื่องหมาย ตามลำดับ

สรุป : ประชากรเชื้อ *P. vivax* ที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรีในปี พ.ศ. 2556-2557 มีความหลากหลายเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2553 แสดงถึงยังคงมีการแพร่เชื้อในพื้นที่สูงและมีวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้

คำสำคัญ : *P. vivax*, เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, PV3.27, PV3.502

and 2.45 for microsatellite markers, PV3.27, PV3.502, and the combination, respectively.

Conclusion: *P. vivax* population in Saiyok district, Kanchanaburi province had increase in genetic diversity when compared between isolates collected in year 2010 and year 2013-2014. This suggests that there is still high malaria transmission and parasite evolution in this area.

Key words: *P. vivax*, microsatellite marker, PV3.27, PV3.502

ศรีนครินทร์เวชสาร 2558; 30 (5): 439-446. ♦ Srinagarind Med J 2015; 30 (5): 439-446.

บทนำ

การแพร่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทยเป็นการแพร่เชื้อตามฤดูกาลและมีภาระโรคเป็นครั้งคราว อัตราการเกิดโรคมาลาเรียต่อประชากรพันคน (annual parasite incidence: API) เท่ากับ 0.37 ในปี พ.ศ. 2557 ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2543 ผู้ป่วยส่วนใหญ่ร้อยละ 46.71 ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในปี พ.ศ. 2557 จังหวัดกาญจนบุรีพบผู้ป่วยมากเป็นอันดับ 8 ของประเทศ พบผู้ป่วย 639 ราย ลดลงจากปี พ.ศ. 2556 ซึ่งพบผู้ป่วยจำนวน 1,245 ราย¹

จากการที่ปัจจุบันสถานการณ์ของชนิดเชื้อมาลาเรียเปลี่ยนแปลงไป โดยมีผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. vivax* เพิ่มขึ้นมาก ทำให้จำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อมาลาเรียชนิดนี้มากขึ้น เพราะที่ผ่านมาการศึกษาเน้นไปที่เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มากกว่าเนื่องจากเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงและมีอาการแทรกซ้อน ทำให้มีการศึกษากันมากทั้งเรื่องประสิทธิภาพของยาชนิดต่าง ๆ ที่ใช้รักษา เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา และความแตกต่างทางพันธุศาสตร์ประชากรของ *P. falciparum* ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ แต่การศึกษาเกี่ยวกับ *P. vivax* ยังมีน้อย โดยเฉพาะการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากร

ในช่วงระยะเวลา 2 ปีที่ผ่านมาสถานการณ์โรคมาลาเรียที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรีพบมีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* เพิ่มขึ้นมากกว่า *P. falciparum* ร้อยละของผู้ป่วย *P.*

vivax เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องคือ ร้อยละ 33.2, 38.3, 39.1 และ 52.9 ในปี พ.ศ. 2553-2556 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานการดื้อยาของ *P. vivax* ต่อยาคลอโรควินที่เกิดขึ้นที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี² ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของ *P. vivax* การศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรีเปรียบเทียบกับระหว่างปี พ.ศ. 2553 และ ปี พ.ศ. 2556-2557

วิธีการศึกษา

ประชากรศึกษาเป็นเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ได้จากผู้ป่วยมาลาเรียชนิดเฉียบพลันที่ไม่มีอาการแทรกซ้อน ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* เพียงชนิดเดียว เป็นผู้ป่วยที่มารับบริการตรวจรักษาโรคมาลาเรียที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4.1.4 ตำบลลุ่มสุม อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ตัวอย่างที่ได้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแรกเป็น *P. vivax* ที่ได้จากผู้ป่วยระหว่างปี พ.ศ. 2553 และกลุ่มที่สองได้จากผู้ป่วยระหว่างปี พ.ศ. 2556-2557

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดเก็บบนกระดาษกรอง การเก็บตัวอย่างทำโดยหยดเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* ลงบนกระดาษกรอง Whatman 3MM

ขนาดของหยดเลือดมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. รอยจีดเลือดแห้งสนิทเอง ห้ามใช้ความร้อนทำให้หยดเลือดแห้ง เก็บใส่ซองพลาสติกที่มีสารกันชื้น ปิดช่องให้สนิท เลือดบนกระดาษกรองนำมาสกัดดีเอ็นเอใช้ตรวจหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของ *P. vivax* ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยชีวโมเลกุล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตรวจหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ด้วยวิธี nested polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ และ สปีฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ติดฉลากไพรเมอร์ในการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 และ PV3.502 ใช้ไพรเมอร์ตามวิธีของ Imwong และคณะ³ แต่เปลี่ยนสปีฟลูออเรสเซนซ์เป็นสี PET แทน (ตารางที่ 1)

เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์แล้วนำไปวิเคราะห์ขนาดด้วยการทำแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส (capillary electrophoresis) วัดขนาดของชิ้นส่วนด้วยการเทียบกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานที่ติดฉลากสปีฟลูออเรสเซนซ์ ในการศึกษาการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใช้การตรวจด้วยเครื่อง Applied Biosystems Genetic Analyzer (ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA) อ่านผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GeneMapper[®] 4.0 analysis (Applied Biosystem, Foster city, California, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูลประกอบด้วยสองส่วนคือ 1) การวิเคราะห์ว่าประชากรเชื้อทั้งสองกลุ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกันหรือไม่ และ 2) การทดสอบว่าความแตกต่างที่พบมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ ในส่วนที่หนึ่งประกอบด้วย 1.1) การวิเคราะห์ความถี่อัลลีล (allele frequency) โดยความถี่ของอัลลีลแต่ละชนิดของแต่ละเครื่องหมายได้จากการนับจำนวนอัลลีลแต่ละชนิด สร้างกราฟแท่งแสดงการกระจายความถี่อัลลีลแต่ละชนิดของประชากรเชื้อ

ปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 การศึกษานี้ใช้เฉพาะอัลลีลหลักในการหาค่าความถี่อัลลีล 1.2) ค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (expected heterozygosity; H_E) ใช้บอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนระหว่างประชากร โดยจะบอกว่าโอกาสที่อัลลีลสองอัลลีลที่ได้จากตัวอย่างจากการสุ่มจากประชากรมีความแตกต่างกันหรือไม่ ค่า H_E อยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ค่าที่เข้าใกล้ 1 แสดงถึงมีความหลากหลายของประชากรกลุ่มนั้นมาก ค่า H_E ได้จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรม GenAlEx 6.5⁴ และ 1.3) ค่าเฉลี่ยจำนวนโคลนของการติดเชื้อพร้อมกันหลายโคลน (multiplicity of infection: mean MOI) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ศึกษาเป็นเครื่องหมายที่มีเพียงสำเนาเดียวและเชื่อมมาเรื่อยๆที่อยู่ใกระแสเลือดเป็นแฮพลอยด์ (haploid) ดังนั้นการพบอัลลีลมากกว่าหนึ่งอัลลีลในแต่ละเครื่องหมายจึงหมายถึงมีการติดเชื้อแบบผสมจีโนไทป์หรือแบบหลายโคลน (mixed-genotype หรือ mixed-clone infection) การติดเชื้อหลายโคลนพร้อมกันเป็นตัวชี้วัดระดับการแพร่เชื้อในประชากร ค่า MOI คือจำนวนอัลลีลที่มากที่สุดของเครื่องหมายที่พบจำนวนอัลลีลมากที่สุดหาค่า MOI ของประชากร *P. vivax* สองกลุ่มคือประชากรเชื้อในปี พ.ศ. 2553 และประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2556-2557 เปรียบเทียบค่า MOI ของประชากรเชื้อสองกลุ่มนี้โดยใช้ Mann-Whitney U test

2) การวัดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรสองกลุ่มใช้ Shannon Analysis โดยการหาค่า Shannon's mutual information index ($^sH_{UA}$) จากค่า $^sH_{UA}$ สามารถเปลี่ยนเป็น log-likelihood contingency test G statistic ซึ่งเป็นสถิติไคสแควร์ที่ใช้ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลของตัวอย่างจากแต่ละคู่ของกลุ่มประชากร กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 1 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่งบนโครโมโซม ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ และขนาดเบสของชิ้นส่วนปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์	ลำดับเบสซ้ำ	ไพรเมอร์ (5' ไป 3')	โครโมโซมที่	ขนาดเบส (ช่วง)
PV3.27	AAAC	F: AAGCTGCACTGAATTATGCT R: TTCCAAATGTATGTGCAGTC F:PET- AGCACAAGCATATGCAAAA	3	128 (85-240)
PV3.502	AACGGATG	F: CCATGGACAACGGGTTAG R: TCCTACTCAGGGGGAATACT F:PET- GTGGACCGATGGACCTAT	3	168 (128-265)

ผลการศึกษา

การวิเคราะห์ข้อมูลได้เลือกเฉพาะตัวอย่างที่สามารถตรวจพบไมโครแซทเทลไลท์ทั้งสองเครื่องหมายซึ่งมีจำนวนตัวอย่างรวม 73 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2553 จำนวน 42 ตัวอย่าง และเป็นตัวอย่างประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2556-2557 จำนวน 31 ตัวอย่าง การวิเคราะห์ข้อมูลจากอัลลีลหลัก (predominant allele) ส่วนจำนวนอัลลีลทั้งหมด คือ อัลลีลหลักและอัลลีลรองจะนำไปวิเคราะห์การติดเชื้อพร้อมกันหลายโคลน (multiplicity of infection)

ประชากรเชื้อในปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 มีความหลากหลายของอัลลีลสูง จำนวนอัลลีลที่แตกต่างกันของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 และ PV3.502 เท่ากับ 12 และ 14 สำหรับประชากรเชื้อในปี พ.ศ. 2553 และเท่ากับ 13 และ 12 สำหรับประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2556-2557 เมื่อคำนวณเป็นจำนวนอัลลีลต่อเครื่องหมาย (allele per locus หรือ allelic richness) เท่ากับ 13 และ 12.5 อัลลีลต่อเครื่องหมายตามลำดับ

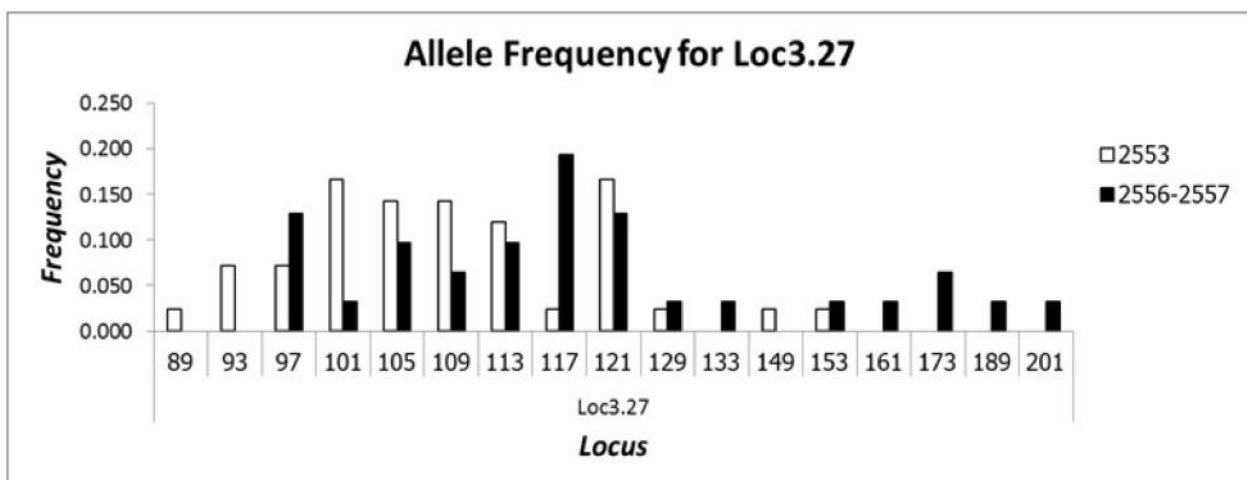
ที่เครื่องหมาย PV3.27 ของกลุ่มตัวอย่างปี พ.ศ. 2553 อัลลีลที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรกคือ อัลลีลที่มีขนาด 101, 121, 105, 109 และ 113 คู่เบส โดยพบร้อยละ 16.7, 16.7, 14.3, 14.3 และ 11.9 ตามลำดับ (รูปที่ 1) รวมเป็นร้อยละ 73.9 ของตัวอย่างทั้งหมด ส่วนตัวอย่างปี พ.ศ. 2556-2557 อัลลีลที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรกคืออัลลีลขนาด 117, 97, 121, 105 และ 113 คู่เบสโดยพบร้อยละ 19.4, 12.9, 12.9, 9.7 และ 9.7 ตามลำดับ รวมเป็นร้อยละ 64.6 ของตัวอย่างทั้งหมด ที่น่าสนใจคือที่ตำแหน่ง 101 พบเป็นของเชื้อปี พ.ศ. 2553 มากกว่าเชื้อปี พ.ศ. 2556-2557 มาก ในขณะที่ตำแหน่ง 117 กลับพบเป็นของเชื้อปี พ.ศ. 2556-2557 มากกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีล

โดยใช้สถิติ G test ไม่พบความแตกต่างของความถี่อัลลีลของประชากรเชื้อกลุ่มปี พ.ศ. 2553 และ กลุ่มปี พ.ศ. 2556-2557 โดยมีค่า G เท่ากับ 27.2 DF เท่ากับ 17 และ Chi square probability เท่ากับ 0.055

ความถี่อัลลีลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.502 (รูปที่ 2) ของกลุ่มตัวอย่างปี พ.ศ. 2553 อัลลีลที่พบมากที่สุด 4 อันดับแรกคือ อัลลีลขนาด 152, 192, 168 และ 144 คู่เบสโดยพบร้อยละ 26.2, 19, 14.3 และ 9.5 ตามลำดับ รวมเป็นร้อยละ 69 ของตัวอย่างทั้งหมด ส่วนกลุ่มตัวอย่างปี พ.ศ. 2556-2557 อัลลีลที่พบมากที่สุด 4 อันดับแรก คือ อัลลีลขนาด 160, 136, 208 และ 176 โดยพบร้อยละ 22.6, 12.9, 12.9 และ 9.7 ตามลำดับ รวมเป็นร้อยละ 58.1 ของตัวอย่างทั้งหมด ที่น่าสนใจคือที่ตำแหน่ง 152 และ 192 พบเป็นเชื้อของปี พ.ศ. 2553 มากกว่าเชื้อปี พ.ศ. 2556-2557 มาก ในทางตรงกันข้ามที่ตำแหน่ง 160 และ 208 กลับพบเป็นเชื้อปี พ.ศ. 2556-2557 มากกว่า เมื่อทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากรเชื้อในปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 โดยใช้สถิติ G test พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่า G เท่ากับ 48.607 DF เท่ากับ 16 และ Chi square probability <0.0001

การติดเชื้อมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์พร้อมกัน (multiplicity of infection)

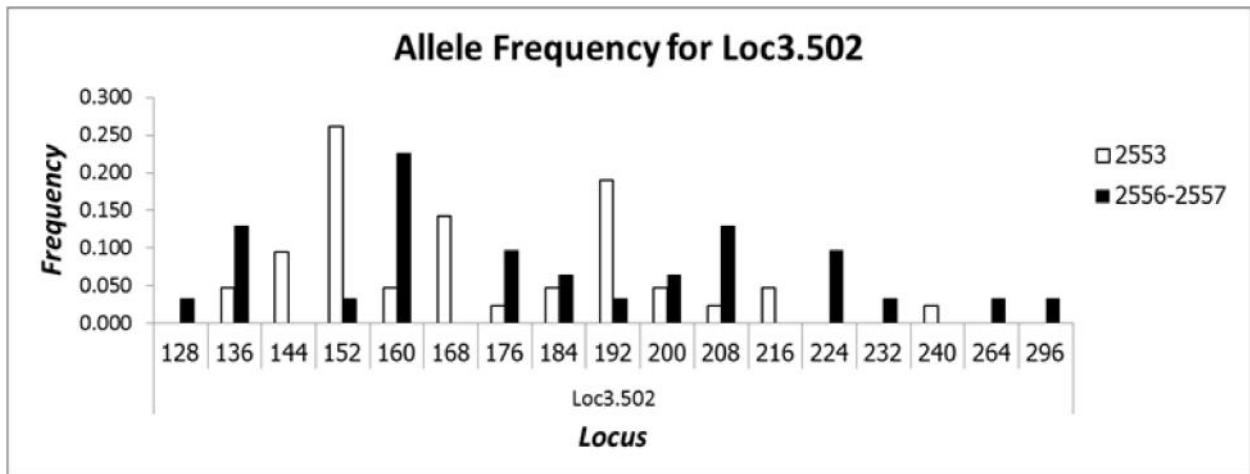
การติดเชื้อมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์พร้อมกัน (multiplicity of infection: MOI) คำนวณแยกแต่ละเครื่องหมายและรวมทั้งสองเครื่องหมายแสดงในตารางที่ 2 ค่า MOI ของเครื่องหมาย PV3.27 เท่ากับ 2.35 เครื่องหมาย PV3.502 เท่ากับ 2.38 เมื่อรวมทั้งสองเครื่องหมาย ค่า MOI เท่ากับ 2.45 (ตารางที่ 2)



รูปที่ 1 ความถี่อัลลีลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27

ตารางที่ 2 การติดเชื้อมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์พร้อมกันของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 และ PV3.502 ของประชากรเชื้อ *P. vivax* ที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

เครื่องหมาย	จำนวนตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ 1-6 ชนิดพร้อมกัน					MOI
	1	2	3	4	6	
PV3.27	56 (76.7)	12 (16.4)	4 (5.5)	1 (1.4)	0	2.35
PV3.502	39 (53.4)	26 (35.6)	5 (6.9)	2 (2.7)	1 (1.4)	2.38
รวม	35 (47.9)	27 (37.0)	7 (9.6)	3 (4.1)	1 (1.4)	2.45



รูปที่ 2 ความถี่อัลลีลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.502

พารามิเตอร์ที่แตกต่างกันระหว่างประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2553 และ ปี พ.ศ. 2556-2557 อีกพารามิเตอร์หนึ่ง คือ การติดเชื้อพร้อมกันมากกว่าหนึ่งโคลนในการติดเชื้อแต่ละครั้ง (multiplicity of infection: MOI) พบว่าประชากรปี พ.ศ. 2553 มีการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งโคลนมากกว่าประชากรปี พ.ศ. 2556-2557 เมื่อใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 โดยมีร้อยละของการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งโคลนในประชากรปี พ.ศ. 2553 และ ปี พ.ศ. 2556-2557 เท่ากับร้อยละ 38.1 และ 3.2 ตามลำดับ แต่เมื่อใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.502 พบร้อยละของการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งโคลนใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 42.9 และ 51.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) การติดเชื้อมากกว่าหนึ่งโคลนของประชากรปี พ.ศ. 2553 มากกว่าประชากรปี พ.ศ. 2556-2557 เล็กน้อย โดยมีร้อยละของการติดเชื้อมากกว่าหนึ่งโคลนเท่ากับร้อยละ 54.8 และ ร้อยละ 48.4 ตามลำดับ แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.174$)

ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีคาดหวัง (Expected heterozygosity; H_E) ของประชากรปี พ.ศ. 2553 ทั้งสองเครื่องหมาย มีค่าน้อยกว่าของประชากรปี พ.ศ. 2556-2557 โดยมีค่า H_E ของเครื่องหมาย PV3.27 และ PV3.502 ของประชากรปี พ.ศ.

2553 เท่ากับ 0.898 และ 0.873 ตามลำดับ และเท่ากับ 0.925 และ 0.912 ตามลำดับ สำหรับประชากรปี พ.ศ. 2556-2557 เมื่อคำนวณรวมทั้งสองเครื่องหมายก็ยังพบว่าประชากรเชื้อในปี พ.ศ. 2556-2557 มีความหลากหลายสูงกว่าประชากรเชื้อในปี พ.ศ. 2553 คือมีค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตีเท่ากับ 0.886 ($SE = 0.012$) และ 0.918 ($SE = 0.006$) ในปี พ.ศ. 2553 และ ปี พ.ศ. 2556-2557 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อรวมทั้งสองเครื่องหมายและรวมประชากรทั้งสองกลุ่มมีค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตีเท่ากับ 0.902 ($SE = 0.011$) (ตารางที่ 3)

การทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม

จากข้อมูลความถี่อัลลีล ค่า MOI และค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตีจะพบว่ามีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 การทดสอบทางสถิติเพื่อทดสอบว่าความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ เนื่องจากข้อมูลมาจากระยะที่อยู่ในกระแสน้ำเป็นเชื้อระยะแฮพลอยด์ ดังนั้นการทดสอบความแตกต่างจะใช้ Shannon Analysis^{5,6} โดยใช้ Shannon's mutual information index (${}^S H_{UA}$) ซึ่งเป็นวิธีการวัดความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร จาก ${}^S H_{UA}$ สามารถเปลี่ยนเป็น

ตารางที่ 3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 และ PV3.502

	ประชากรเชื้อ ปี พ.ศ. 2553			ประชากรเชื้อ ปี พ.ศ. 2556-2557			ประชากรเชื้อ ทั้งหมดและ รวมทั้งสอง เครื่องหมาย
	PV3.27	PV3.502	รวม	PV3.27	PV3.502	รวม	
จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์	42	42	42	31	31	31	73
จำนวนอัลลีลที่แตกต่างกัน	12	12	-	14	13	-	-
ตัวอย่างที่มีการติดเชื้อมากกว่า 1 โคลน (ร้อยละ)	38.1	42.9	54.8	3.2	51.6	48.4	52.1
ค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e)	0.898	0.873	0.886 (0.012)	0.925	0.912	0.918 (0.006)	0.902 (0.011)

ค่าตัวเลขในวงเล็บคือค่า standard error

log-likelihood contingency test G statistic ซึ่งเป็นสถิติไคสแควร์ที่ใช้ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลของแต่ละกลุ่มประชากร

เมื่อทดสอบด้วย Shannon Analysis พบว่าประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 มีการกระจายของอัลลีลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เครื่องหมาย PV3.27 มีค่า G เท่ากับ 27.2, DF = 16, p = 0.039 เช่นเดียวกับเครื่องหมาย PV3.502 มีค่า G = 48.607, DF = 16, p < 0.001 (ตารางที่ 4)

เมื่อศึกษาลักษณะของแฮปโลไทป์ (haplotype) โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง PV3.27 และ PV3.502 ของทั้งสองกลุ่มประชากร *P. vivax* ในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรีพบมีแฮปโลไทป์แตกต่างกัน 57 แฮปโลไทป์ มี 14 แฮปโลไทป์ที่พบมากกว่าหนึ่งครั้ง

วิจารณ์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรีเปรียบเทียบระหว่างปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 การที่ต้องรวมผู้ป่วยในปี พ.ศ. 2556 และ 2557 เข้าด้วยกันเนื่องจากปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยลดน้อยลง

มาก การเก็บจำนวนตัวอย่างให้ได้ครบตามที่ต้องการภายในปีเดียวไม่สามารถทำได้จึงจำเป็นต้องเพิ่มระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างไปถึงปี พ.ศ. 2557

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างหนึ่งในการศึกษาความหลากหลายของประชากรเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* สามารถใช้ศึกษาวิวัฒนาการของการเคลื่อนย้ายประชากรเชื้อ และการติดเชื้อมาหลายสายพันธุ์พร้อม ๆ กัน การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สองเครื่องหมายคือ PV3.27 และ PV3.502 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 3 ของ *P. vivax* เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีการศึกษากันมาก มีผลการศึกษายืนยันว่า PV3.502 เหมาะกับการศึกษาความหลากหลายของประชากร และ PV3.27 เหมาะกับการศึกษาการติดเชื้อมาร่วมกันหลายโคลน⁷ การใช้เครื่องหมายที่มีผู้วิจัยอื่น ๆ ศึกษามาแล้วโดยใช้เชื้อมาลาเรียจากพื้นที่ต่าง ๆ กัน มีข้อดีคือสามารถเปรียบเทียบผลการศึกษาความหลากหลายและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ต่าง ๆ ที่มีมาลาเรียชุกชุม

ลักษณะและความยาวของจำนวนซ้ำ (motif and repeat length) มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์⁷ motif ที่มีความยาวมากกว่าจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า และจำนวนเบสซ้ำที่มากกว่าก็จะมี ความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ Shannon Analysis ของเครื่องหมาย PV3.27 และ PV3.502 สำหรับการเปรียบเทียบ ประชากร *P. vivax* ของปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 เปรียบเทียบทีละคู่

เครื่องหมาย	ประชากรเชื้อในปี พ.ศ.		^a H _a	G	DF	p-value
	2553	2556-7				
PV3.27	42	31	0.186	27.200	16	0.039
PV3.502	42	31	0.333	48.607	16	<0.001
รวม	42	31	0.260			

เช่นเดียวกัน ลักษณะการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย PV3.502 คือ AACGGATG ซึ่งยาวกว่าการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย PV3.27 คือ AAAC จากการศึกษาพบว่าความหลากหลายของประชากรเมื่อใช้เครื่องหมาย PV3.27 และ PV3.502 ให้ผลความหลากหลายใกล้เคียงกัน โดยพบว่าจำนวนอัลลีลต่อเครื่องหมาย PV3.27 มีจำนวนมากกว่าตำแหน่ง PV3.502 เล็กน้อยคือเท่ากับ 14 และ 13 ตามลำดับ ค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตีที่ตำแหน่ง PV3.27 มากกว่าตำแหน่ง PV3.502 เล็กน้อยคือเท่ากับ 0.925 และ 0.912 ตามลำดับ แต่ตัวอย่างที่มีการติดเชื่อมากกว่าหนึ่งโคลนเมื่อคำนวณจากตำแหน่ง PV3.502 มีค่ามากกว่าตำแหน่ง PV3.27 คือพบร้อยละ 51.6 และ 38.1 ตามลำดับ

พื้นที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี จัดเป็นพื้นที่ที่มีมาลาเรียเป็นโรคประจำถิ่น การพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร *P. vivax* สูงทั้งประชากรเชื้อปี พ.ศ. 2553 และ ปี พ.ศ. 2556-2557 จึงสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าความชุกชุมของการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่สอดคล้องกับการมีความหลากหลายของประชากรเชื้อมาลาเรีย⁷

ประชากร *P. vivax* เมื่อศึกษาด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 และ PV3.502 มีความหลากหลายสูงเมื่อใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 หรือ PV3.502 อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.502 ทำให้ตรวจพบความหลากหลายได้มากกว่าและทำให้เห็นความแตกต่างของประชากร *P. vivax* ในปี พ.ศ. 2553 และ ปี พ.ศ. 2556-2557 ได้มากกว่าการศึกษานี้พบว่าอัตราการติดเชื่อแบบหลายโคลนเท่ากับร้อยละ 52.1 ซึ่งต่ำกว่าการศึกษาของ Imwong และคณะในปี ค.ศ. 2007³ ซึ่งเท่ากับร้อยละ 66 เล็กน้อย การที่มีอัตราการพบเชื้อซ้ำพร้อมกันหลายโคลนน้อยกว่าอาจเกิดจากการที่ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพียงสองตำแหน่ง ในขณะที่ของ Imwong และคณะ ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ถึง 9 ตำแหน่ง นอกจากนั้นการศึกษาของ Imwong และคณะไม่ได้กล่าวถึงว่าตัวอย่างเป็น *P. vivax* จากจังหวัดใดของประเทศไทย³

การค้นพบที่สำคัญที่สุดในการศึกษานี้คือการพบประชากร *P. vivax* ที่พบในปี พ.ศ. 2553 และปี พ.ศ. 2556-2557 ที่อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมเมื่อศึกษาด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ PV3.27 และ PV3.502 ความแตกต่างนี้อาจอธิบายการที่พบ *P. vivax* ในพื้นที่นี้เพิ่มมากขึ้น จนมีสัดส่วนชนิดเชื้อสูงกว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* อย่างไรก็ตาม นอกจากปัจจัย

ทางด้านพันธุกรรมของเชื้อ *P. vivax* แล้ว ก็ยังไม่สามารถตัดประเด็นเรื่องความสำเร็จของการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ได้ด้วยยาที่มีประสิทธิภาพสูงกลุ่มอนุพันธ์ อาร์ติมิซินิน ซึ่งทำให้สัดส่วนของผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ลดน้อยลง

การที่มีการแพร่เชื้อสูง การมีเชื้อที่ซ่อนอยู่ในตับที่ทำให้เชื้อกลับซ้ำชนิดรีแลปส์ และการมีภูมิคุ้มกันเป็นสาเหตุทำให้ผู้ติดเชื่อมีการติดเชื่อแบบหลายโคลน⁸ การเกิด sexual recombination จะเกิดได้ในยุงที่ได้เชื้อระยะแกมมาโตไซต์ (gametocyte) ของเชื้อต่างโคลนกัน ซึ่งมีโอกาสเกิดได้มากถ้ายุงกินเลือดจากผู้ติดเชื่อหลายโคลน ยุงพาหะมาลาเรียอาจมีเชื้อมาลาเรียหลายโคลนในตัวเดียวกันซึ่งสามารถแพร่เชื้อมาลาเรียหลายโคลนนี้พร้อมกันเมื่อกัดคนแม้เพียงครั้งเดียว⁹

เป็นที่ทราบกันดีว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องมือที่ดีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพราะมีความผันแปรสูง มีความจำเพาะต่อตำแหน่งและไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของโฮสต์¹⁰ ผลการศึกษานี้พบว่าแม้จะใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพียงสองตำแหน่งคือ PV3.27 และ PV3.502 ก็สามารถบอกความแตกต่างของเชื้อมาลาเรียที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างกันได้ ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ทำแผนที่แสดงระบาดวิทยาของ *P. vivax* ในจังหวัดกาญจนบุรี และสามารถใช้สร้างโมเดลเพื่อทำนายแหล่งกำเนิดของ *P. vivax* ได้เมื่อมีการศึกษาต่อเนื่องต่อไป ข้อมูลโครงสร้างพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียนี้จะมีประโยชน์เมื่อมีการระบาดของโรคมาลาเรีย และต้องการหาแหล่งกำเนิดของเชื้อมาลาเรียที่กลับมาใหม่ในพื้นที่ วิธีนี้สามารถใช้เพื่อสนับสนุนวิธีการทางระบาดวิทยาเพื่อการป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรีย

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้จะประสบความสำเร็จไม่ได้เลยหากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณวิทยา สายพรมสุด หัวหน้าหน่วยควบคุมโรคติดต่ออำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี และเจ้าหน้าที่มาลาเรียคลินิกที่ช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียที่ใช้ในการศึกษานี้

ขอขอบคุณ นางสาววิรัชดา ศิริรัตน์ นิสิตสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ช่วยงานห้องปฏิบัติการโมเลกุล สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐ (AFRIMS) ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

โมเลกุลและมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนสำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักโรคติดต่อภายในโดยแมลง. สถานการณ์โรคมาลาเรีย. ใน: นิพนธ์ ชินานนท์เวช, บรรณาธิการ. รายงานประจำปี 2557. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนดี้ไซน์, 2557: 15-19.
2. Congpuong K, Satimai W, Sujariyakul A, Intanakom S, Harnpitakpong W, Pranuth Y, et al. *In vivo* sensitivity monitoring of chloroquine for the treatment of uncomplicated vivax malaria in four bordered provinces of Thailand during 2009-2010. *J Vector Borne Dis* 2011; 48: 190-6.
3. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Maysay M, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol* 2007; 37: 1013-22.
4. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 2012; 28: 2537-9.
5. Sherwin WB, Jabot F, Rush R, Rossetto M. Measurement of biological information with applications from genes to landscapes. *Mol Ecol* 2006; 15: 2857-69.
6. Rossetto M, Kooyman R, Sherwin WB, Jones R. Dispersal limitations, rather than bottlenecks or habitat specificity; can restrict the distribution of rare and endemic rainforest trees. *Amer J Bot* 2008; 95: 321-9.
7. Sutton PL. A call to arms: on refining *Plasmodium vivax* microsatellite marker panels for comparing global diversity. *Malar J* 2013; 12: 447.
8. Koepfli C, Ross A, Kiniboro B, Smith TA, Zimmerman PA, Siba P, et al. Multiplicity and diversity of *Plasmodium vivax* infections in a highly endemic region in Papua New Guinea. *PLOS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1424.
9. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Currie D, Charlwood J., Billingsley P, Teuscher T, et al. Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 1994; 109: 413-21.
10. Gunawardena S, Kauraweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack RJ, Alifrangis M, et al. Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 235-42.

