

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2

งานวิจัยเรื่อง

“การวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรมและความสามารถในการกระตุ้น ระบบภูมิคุ้มกันของ โปรตีนทั้ง 12 ชนิดในกลุ่มโปรตีนบนผิวเมอโรโซइटโรซอยต์ชนิดที่ 3 ของพลาสโมเดียมไวแวกซ์จากผู้ติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย”

“Analysis of genetic diversity and immunogenicity in the 12 member multigene family of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 3 among clinical isolates in Thailand”

หน่วยงานวิจัย

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์

อ. นพ. ดร. ไพโรจน์ ธีรน้อยพงศ์

นางสาวอุรัสยา พัฒนวงศ์

นางสาวนภาพร กวมทรัพย์

นางสาวรัตน์ดิพร โกสุวิรินทร์

ผศ.ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง

อ.ดร. สุนีย์ สีธรรมใจ

นพ. พิสิษฐ์ เวชกามา

GRANT NO: GB-B_61_070_30_28

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ป่วยทุกท่านที่อุทิศเวลาและให้ความร่วมมืออย่างดียิ่ง ผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน เจ้าหน้าที่สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง โรงพยาบาลบุณชกริก โรงพยาบาลน้ำยืน โรงพยาบาลนาจะหวาย และโรงพยาบาลอุ้มผางที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ นายภัทกร บุบผัน นางสาวสุนิสา สงสัยเกตุ นายเสฏฐวุฒิ ชัยกิตโกสิยกุล และนายสุรศักดิ์ ยานมณี ในการช่วยงานการวิจัย และขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2559-2560

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2562

บทคัดย่อ

โปรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ชนิดที่ 3 ของเชื้อมาลาเรีย (MSP3) เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย MSP3 ของ *Plasmodium vivax* ถูกสร้างขึ้นจากกลุ่มของยีน 12 ชนิดที่มีชื่อเรียงตามตัวอักษรคือ *PvMSP-3A* ถึง *PvMSP-3I* โครงสร้างของ *PvMSP3* family ประกอบไปด้วยบริเวณที่มีความคล้ายกันในบริเวณ N- และ C-termini โดยส่วนกลางของโปรตีนบางชนิดประกอบด้วยบริเวณที่มีกรดอะมิโน alanine เป็นองค์ประกอบจำนวนมากในระยะห่างที่ชัดเจน ทำให้โปรตีนเหล่านี้มีโครงสร้างเป็นขดเกลียวหลายรอบ (coiled-coil motif) วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าเพื่อศึกษาความหลากหลายของกลุ่มยีน *PvMSP3* family ของตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่พบติดเชื้อตามธรรมชาติ และเพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG ต่อโปรตีนลูกผสมที่สร้างขึ้นจากโปรตีนในกลุ่มนี้ ผลการศึกษาค้นคว้าประกอบไปด้วย (i) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PvMSP3-D2* (n=120), *PvMSP3-E2* (n=120), *PvMSP3-F2* (n=120), *PvMSP3-G* (n=120) และ *PvMSP3-I* (n=120) ของตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่เก็บจากจังหวัดตาก จันทบุรี อุบลราชธานี และยะลา และ(ii) ระดับแอนติบอดีชนิด IgG ต่อโปรตีนลูกผสมในกลุ่มยีนนี้ของตัวอย่างซ้ำของผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* ในจังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 734 ตัวอย่าง ในบรรดา ยีนทั้ง 5 ชนิดที่รายงานการศึกษาค้นคว้าในครั้งนี้ พบว่า *PvMSP3-F2* เป็นยีนที่มีหลายรูปแบบมากที่สุดโดยมีค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.11251 ตามด้วย *PvMSP3-D1*, *PvMSP3-E2* ส่วนยีน *PvMSP3-G* และ *PvMSP3-I* มีความหลากหลายน้อยที่สุดในบรรดา ยีนในกลุ่มนี้คือมีค่า nucleotide diversity อยู่ในช่วง 0.01169 ถึง 0.01001 ส่วนค่า nucleotide diversity ของยีน *PvMSP3-D2*, *PvMSP3-E2*, *PvMSP3-F2*, *PvMSP3-G* and *PvMSP3-I* มีค่าเท่ากับ 0.09661, 0.07923, 0.11251, 0.01169 และ 0.01001 ตามลำดับ แม้ว่ายีน *PvMSP3-G* และ *PvMSP3-I* จะมีความหลากหลายต่ำแต่กลับพบรูปแบบของ haplotype ทั้งหมด 56 และ 46 haplotypes แสดงให้เห็นว่ายีนชนิดนี้มีความแตกต่างในระดับลำดับเบสแบบกระจาย กระจายของความหลากหลายของ haplotype สำหรับยีนในกลุ่มนี้ทั้ง 5 ชนิดมีค่าอยู่ในช่วง 0.943 ถึง 1.000 แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของ haplotype ของแต่ละยีนทั้ง 5 ชนิดทั่วไปในพื้นที่ที่มีการตรวจพบเชื้อมาลาเรียในการศึกษาค้นคว้านี้ สำหรับการศึกษากonstruktion โปรตีนลูกผสมที่มีขนาดความยาวครอบคลุมส่วนของบริเวณที่มีการแสดงออกของโปรตีนของ กลุ่มยีน *PvMSP3* โดยหลังจากการเตรียมโปรตีนเหล่านี้ให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการศึกษาการตอบสนองของ IgG แอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ผลการศึกษาปริมาณของ IgG ต่อ *PvMSP3-B*, *PvMSP3-D1*, *PvMSP3-F1*, *PvMSP3-F2* และ *PvMSP3-H* แอนติเจน จากตัวอย่างซ้ำของผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* จำนวน 734 ตัวอย่าง พบว่าอัตราการตรวจพบภูมิคุ้มกันที่มีต่อแอนติเจนเหล่านี้มีปริมาณร้อยละ 33.38, 46.45, 48.36, 38.42 และ 47.54 ตามลำดับ สิ่งที่สำคัญอีกประเด็นหนึ่งคือภูมิคุ้มกันทางธรรมชาติต่อแอนติเจนนี้ประกอบด้วยทั้งที่เป็นแบบเฉพาะต่อรูปแบบของอัลลีล และแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อทุกสายพันธุ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า บริเวณทั้งส่วนที่มีความหลากหลายต่ำและสูงของโปรตีนชนิดนี้ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นจากการศึกษานี้ จึงสรุปได้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีนทั้ง 5 ชนิดของกลุ่มยีน *PvMSP3* จากตัวอย่างในประเทศไทย ในขณะที่การศึกษากonstruktion ของระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติพบว่าการตรวจพบระดับของ IgG แอนติบอดี สูงขึ้นในช่วงที่มีการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* นอกจากนี้ความหลากหลายของลำดับเบสที่สามารถพบได้สูงใน ยีน *PvMSP3* บางชนิดนั้นสามารถใช้เป็นตัวติดตามระดับโมเลกุลเพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ เชื้อ *Plasmodium vivax* และการตรวจพบว่ามีแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสมของ *PvMSP3* ซึ่งสามารถทำ ปฏิกิริยากับเชื้อในทุกสายพันธุ์ได้นั้นก็เป็นส่วนสนับสนุนอย่างยิ่งต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ *Plasmodium vivax*

Abstract

The merozoite surface protein 3 of malaria parasites (MSP3) is a leading candidate for malaria vaccine development. In *Plasmodium vivax*, MSP3 is encoded by a multigene family consisting of 12 gene members, designated alphabetically as *PvMSP3-A* to *PvMSP3-I*. The general structure of *PvMSP3* contains N-terminal conserved region, the central alanine-rich region forming coiled-coil motifs and conserved C-terminal domain. The objectives of this study are to investigate the extent of sequence diversity of this gene family among natural *P. vivax* isolates and to determine the IgG antibody responses to the recombinant proteins derived from these genes. Here, we report on the outcomes of this study that include (i) sequence analysis of *PvMSP3-D2* (n=120), *PvMSP3-E2* (n=120), *PvMSP3-F2* (n=120), *PvMSP3-G* (n=120) and *PvMSP3-I* (n=120) among *P. vivax* isolates collected from Tak, Chantaburi, Ubon Ratchathani and Yala provinces, and (ii) IgG antibody responses to the recombinant proteins corresponding to these gene members among *P. vivax*-infected patients in Ubon Ratchathani provinces (n=734). Of 5 gene members analyzed, *PvMSP3-F2* was the most polymorphic locus in which nucleotide diversity was 0.11251, followed by *PvMSP3-D2*, *PvMSP3-E2*, while *PvMSP3-G* and *PvMSP3-I* were relatively more conserved than other gene members (nucleotide diversity ranged from 0.01169 to 0.01001). The nucleotide diversity of *PvMSP3-D2*, *PvMSP3-E2*, *PvMSP3-F2*, *PvMSP3-G* and *PvMSP3-I* was 0.09661, 0.07923, 0.11251, 0.01169 and 0.01001, respectively. Despite low level of sequence diversity, 56 and 46 haplotypes of *PvMSP3-G* and *PvMSP3-I* were observed among isolates, implying microheterogeneity of sequences in these gene members. The levels of haplotype diversity of these 5 gene members ranged from 0.943 to 1.000, suggesting rather even distribution of haplotypes for each of these gene members circulating in these endemic areas. The recombinant proteins spanning the near complete coding regions of these genes were produced. After purification, these proteins were used as antigens for determination of specific IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. Results from analysis of IgG antibodies to *PvMSP3-B*, *PvMSP3-D1*, *PvMSP3-F1*, *PvMSP3-F2* and *PvMSP3-H* antigens among 734 *P. vivax*-infected plasma samples has shown that the seropositive rates for these antigens were 33.38%, 46.45%, 48.36%, 38.42% and 47.54%, respectively. Importantly, naturally acquired against these antigens contained both allele-specific and strain-transcending antibodies, implying that both conserved and variable domains in these proteins were immunogenic. Therefore, differential genetic diversity was observed among 5 gene members in *PvMSP3* among Thai isolates while naturally acquired IgG antibodies were relatively prevalent during acute *P. vivax* infections. Extensive sequence diversity in some *PvMSP3* gene members could serve as molecular markers for differentiation of *P. vivax* strain while the presence of strain-transcending antibodies against *PvMSP3* recombinant proteins has encouraged vaccine development against *P. vivax* infections.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7-9
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	10
บทนำ	11-18
วัตถุประสงค์การวิจัย	18
วิธีดำเนินการวิจัย	18-25
ผลการวิจัย	25-50
วิจารณ์ผลการวิจัย	51-53
สรุปผลการวิจัย	53
รายงานผลในภาพรวมทั้งหมด	53-60
สรุปรายงานผลในภาพรวมทั้งหมด	61-62
บรรณานุกรม	63-67
ประวัตินักวิจัยและคณะ	68-87

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	PCR primers for PvMSP3	23
ตารางที่ 2	Sequence primers for PvMSP3 (1) - (3)	24
ตารางที่ 3	Species-specific PCR diagnosis of malaria parasites	26
ตารางที่ 4	Distributions of <i>PvMsp-1</i> haplotypes based on blocks 6a/6b among 203 clinical isolates.	27
ตารางที่ 5	Distribution of PvMSP3 haplotypes of among <i>Plasmodium vivax</i> isolates from diverse endemic areas of Thailand	40
ตารางที่ 6	List of primer for protein expression of PvMSP3 family.	41

สารบัญภาพ

	หน้า	
รูปที่ 1	แสดงโครงสร้างของยีน PvMsp-1 ของเชื้อ <i>Plasmodium vivax</i> (a) แสดงบริเวณ conserved block แทนด้วย block สีขาว ส่วน variable region แทนด้วย block สีดำ (b) แสดงตำแหน่งและชื่อ primer (B5aF, T5aF, B6aF, S6aF, B6bR, S6bR, B8R and T8R) ที่ใช้ในการทำ haplotyping ของ block 5 6a 6b และ 8	21
รูปที่ 2	แสดงโครงสร้าง และตำแหน่งของ PCR primer ของยีน PvCSP ของเชื้อ <i>Plasmodium vivax</i> conserved block แทนด้วย block สีขาว ส่วน central repeat region แทนด้วย block สีเทา	22
รูปที่ 3	Representative PCR products of the PvMSP3D2 gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. M is a DNA lambda/HindIII marker in lane 15, N is a negative control in lane 1, Sample are in lanes 2-14.	27
รูปที่ 4	Representative PCR products of the PvMSP3E2 gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Sample are in lanes 1-13, M is a DNA lambda/HindIII marker in lane 14.	28
รูปที่ 5	Representative PCR products of the PvMSP3F2 gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Samples are in lanes 1-3, 5-13 M is a DNA lambda/HindIII marker in lane 4.	28
รูปที่ 6	Representative PCR products of the PvMSP3G gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Samples are in lanes 2-17, M is a DNA lambda/HindIII marker in lane 1.	29
รูปที่ 7	Representative PCR products of the PvMSP3I gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. M is a DNA lambda/HindIII marker in lane 1, N is a negative control in lane 17, Sample are in lanes 2-16.	30
รูปที่ 8	Representative structure of PvMSP3D2 gene.	30
รูปที่ 9	Amino acid sequences of the repeat regions among 33 haplotypes of PvMSP3D2 from Tak, Ubon-Ratchathani, Chanthaburi, Narathiwat and Yala provinces.	31
รูปที่ 10	Phylogenetic tree of PvMSP3D2 sequences from 33 haplotypes.	32
รูปที่ 11	Representative structure of PvMSP3E2 gene.	33
รูปที่ 12	Amino acid sequences of the repeat regions among 38 haplotypes of PvMSP3E2 from Tak, Ubon-Ratchathani, Chanthaburi, Narathiwat and Yala provinces.	33
รูปที่ 13	Phylogenetic tree of PvMSP3E2 sequences from 38 haplotypes.	34
รูปที่ 14	Representative structure of PvMSP3F2 gene.	34
รูปที่ 15	Amino acid sequences of the repeat regions among 41 haplotypes of PvMSP3F2 from Tak, Ubon-Ratchathani, Chanthaburi, Narathiwat and Yala provinces.	35
รูปที่ 16	Phylogenetic tree of PvMSP3F2 sequences from 41 haplotypes.	36
รูปที่ 17	Representative structure of PvMSP3G gene.	36

	หน้า
รูปที่ 18	Amino acid sequences of the repeat regions among 56 haplotypes of PvMSP3G gene from Tak, Ubon-Ratchathani, Chanthaburi, Narathiwat and Yala provinces. 37
รูปที่ 19	Phylogenetic tree of PvMSP3G sequences from 56 haplotypes. 38
รูปที่ 20	Representative structure of PvMSP3I gene. 39
รูปที่ 21	Amino acid sequences of the repeat regions among 46 haplotypes of PvMSP3I gene from Tak, Ubon-Ratchathani, Chanthaburi, Narathiwat and Yala provinces. 39
รูปที่ 22	Phylogenetic tree of PvMSP3I sequences from 46 haplotypes. 40
รูปที่ 23	Representative 1% agarose gel electrophoresis showing specific amplifications from PvMSP3F2 PCR. Lane M, 1 kb DNA ladder Marker; Lanes 1-3, CT1691. Molecular size in base pairs is show on the right of the gel. 42
รูปที่ 24	Structure of Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-3F2 (PvMSP3.9) 42
รูปที่ 25	Amino acids sequence of PvMSP3F2 from CT1691 isolate. 43
รูปที่ 26	SDS-PAGE analysis of PvMSP3F2-CT1691 (123.78 kDa) full fragment purified protein. Staining with coomassie brillian blue R-250. M; <i>Dual</i> color protein standard marker. 43
รูปที่ 27	SDS-PAGE analysis of PvMSP3B-CT1230 full fragment purified protein. Lane 1; Cell lysate before pass column, Lane 2; Cell lysate after pass column, Lane 3; Cell lysate, Lane 4; First wash, M; <i>Dual</i> color protein standard marker. Lane 6; Eluate (100 mM imidazole), Lane 7; Eluate (150 mM imidazole), Lane 8; Eluate (200 mM imidazole), Lane 9; Eluate (250-1 mM imidazole), Lane 10; Eluate (250-2 mM imidazole), Lane 11; Eluate (250-3 mM imidazole), Lane 12; Eluate (250-4 mM imidazole). 45
รูปที่ 28	SDS-PAGE analysis of His-tag-recombinant CT1230-Full-PvMSP3B (95.30 kDa) purified protein. Western blot used 6X-His tag antibody (primary antibody) and His-tag Rabbit antibody (secondary antibody) 46
รูปที่ 29	SDS-PAGE analysis of PvMSP3D1-YL558 full fragment purified protein. Lane 1; Cell lysate before pass column, Lane 2; Cell lysate after pass column, Lane 3; Cell lysate, Lane 4; First wash, Lane 5; Eluate (100 mM imidazole), Lane 6; Eluate (150 mM imidazole), Lane 7; Eluate (200 mM imidazole), Lane 8; Eluate (250-1 mM imidazole), Lane 9; Eluate (250-2 mM imidazole), Lane 10; Eluate (250-3 mM imidazole), Lane 11; Eluate (250-4 mM imidazole), M; <i>Dual</i> color protein standard marker. 47
รูปที่ 30	SDS-PAGE analysis of PvMSP3F1-CTRC25 full fragment purified protein (147.63 kDa) Staining with coomassie brillian blue R-250. Lane 1; Cell lysate, Lane 2; First wash, Lane 3; Eluate (100 mM imidazole), Lane 4; Eluate (150 mM imidazole), Lane 5; Eluate (200 mM imidazole), Lane 6; Eluate (250 mM imidazole), Lane 7; Eluate (250-1 mM imidazole), Lane 8; Eluate (250-2 mM imidazole), Lane 9; Eluate (250-3 mM imidazole), M; <i>Dual</i> color protein standard marker. 48

รูปที่ 31	SDS-PAGE analysis of PvMSP3H-CTRC25 (91.80 kDa) full fragment purified protein. Lane 1; Supernatant of Cell lysate, Lane 2; Pellet of Cell lysate, Lane 3; Cell lysate, Lane 4; Binding buffer, Lane 5; Wash I, Lane 6; Wash II, Lane 8; Eluate-I, Lane 9; Eluate-II, Lane 10; Eluate-III, Lane 11; Eluate-IV, Lane 12; Eluate-V, M; Dual color protein standard marker.	50
รูปที่ 32	Maximum likelihood tree depicting evolutionary relation among gene members in the <i>PvMSP3</i> family. Bootstrap values from 500 pseudoreplicates are indicated along the branches. Shape and size of triangles represent the extent of diversity in each locus.	55
รูปที่ 33	Maximum likelihood tree inferred from <i>PvMSP3E1</i> (filled squares)/ <i>PvMSP3E2</i> (open squares), <i>PvMSP3D1</i> (filled circles)/ <i>PvMSP3D2</i> (open circles) and <i>PvMSP3F1</i> (filled diamonds)/ <i>PvMSP3F2</i> (open diamond) derived from the same isolates in comparison with sequences of all members in the <i>PvMSP3</i> gene family of the Salvador I strain.	56
รูปที่ 34	Amino acid alignment of <i>PvMSP3E1</i> of isolates with premature stop codon (*).	57
รูปที่ 35	Maximum likelihood tree of <i>PvMSP3A</i> with inserts (unlabelled) and without inserts (circles) in comparison with <i>PcyMSP3A</i> (squares). Bootstrap values along the branches from 500 pseudoreplicates.	59
รูปที่ 36	Maximum likelihood tree of <i>PvMSP3C</i> with long inserts, medium-sized inserts, short or no inserts in comparison with <i>PcyMSP3C</i> (square).	60

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

PCR	=	polymerase chain reaction
DNA	=	deoxyribonucleic acid
A	=	adenine
T	=	thymine
G	=	guanine
C	=	cytosine
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	=	deoxyadeninosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
ddH ₂ O	=	double distilled water
bp	=	base pair
cm	=	centimetre
kb	=	kilobases
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
UV	=	ultraviolet
°C	=	degree celsius
λ	=	lambda
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetate
PBS	=	phospate buffer saline
MSP3	=	Merozoite surface protein-3
msp-1	=	Merozoite surface protein-1
CSP	=	Circumsporozoite protein
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
dS	=	rate of synonymous nucleotide subsitutions per synonymous site
dN	=	rate of nonsynonymous nucleotide subsitutions per nonsynonymous site
π	=	nucleotide diversity
<i>h</i>	=	haplotype diversity

1. บทนำ

ระบาดวิทยาของมาลาเรียในภาพรวม

องค์การอนามัยโลกรายงานผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกในปี ค.ศ. 2013 มีจำนวน 128 ล้านคน และในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิตประมาณ 528,000 คน ซึ่ง *P. falciparum* เป็นสาเหตุการเสียชีวิตร้อยละ 91 โดยส่วนใหญ่เป็นเด็กที่อาศัยในทวีปแอฟริกา สำหรับในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบผู้ป่วยราว 1.7 ล้านคน โดยส่วนใหญ่มีสาเหตุจาก *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยพบ *P. falciparum* มากกว่า *P. vivax* ในบังคลาเทศ เมียนมาร์ ติมอร์เรสต์ และอินโดนีเซีย ส่วนประเทศที่พบ *P. falciparum* และ *P. vivax* ใกล้เคียงกัน ได้แก่ ภูฏาน และอินเดีย ในขณะที่ประเทศไทยพบ *P. vivax* มากกว่า *P. falciparum* เช่นเดียวกับ เนปาล ศรีลังกาและเกาหลีใต้ (WHO 2014) สำหรับอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทยพบว่าลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 4 ทศวรรษที่ผ่านมา โดย *P. falciparum* มีอัตราการลดลงมากกว่า *P. vivax* ทำให้อุบัติการณ์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดในปัจจุบันมีอุบัติการณ์ต่างไปจากเดิมและมักพบว่า *P. vivax* มีสัดส่วนที่สูงกว่า *P. falciparum* ในจังหวัดชายแดนไทย มาเลเซีย และ ไทย กัมพูชา ในประเทศไทยมีแพร่กระจายของโรคมาลาเรียตลอดทั้งปี แต่จะพบผู้ติดเชื้อจำนวนมากในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึง กรกฎาคม และช่วงเดือน ตุลาคม ถึง พฤศจิกายน (Zhou et al 2005) อัตราการติดเชื้อมากกว่า 1 species พบได้มากตามชายแดนไทยและพม่าซึ่งในบางพื้นที่อาจพบได้มากถึงร้อยละ 24 (Putaporntip et al 2009; Jongwutiwes et al 2011)

โดยทั่วไป *P. vivax* มีขอบเขตการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางกว่า *P. falciparum* โดยพบได้ทั้งในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน และเขตอบอุ่น อย่างไรก็ตามในแอฟริกาตะวันตกซึ่งพบอุบัติการณ์ของ Duffy negative blood group สูงจึงแทบไม่พบการติดเชื้อชนิดนี้เนื่องจากกลไกการลุกลามของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงต้องอาศัย Duffy blood group ดังกล่าว แม้ว่าอาจพบผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* ที่มี Duffy negative blood group ในบางพื้นที่ทางแอฟริกาตะวันออกแต่ภาวะดังกล่าวไม่ได้พบโดยทั่วไป (Ménard et al 2010) การที่ *P. vivax* มีระยะ hypnozoite ในเซลล์ hepatocyte ทำให้การรักษาผู้ป่วยให้หายขาดนอกจากต้องใช้ chloroquine แล้วยังต้องให้ยา primaquine เพื่อการทำลายระยะ hypnozoite อันเป็นการป้องกันการเกิดซ้ำกลับแบบ relapse (Mendis et al 2001) ทั้งนี้ *P. vivax* สายพันธุ์ต่างกันจะมีการเจริญของระยะที่อยู่ในตับต่างกัน เช่น เชื้อมาลาเรียในภูมิภาคเขตร้อนจะมีการเจริญเร็วกว่าตลอดจนการเกิด relapse มักปรากฏในช่วงเวลาห่างจากอาการแสดงของโรคมาลาเรียครั้งแรกไม่นาน ทั้งนี้ในประเทศไทยมักพบในผู้ที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยหรือรักษาที่ไม่ถูกต้องซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นภายใน 3 เดือนและเกิดขึ้นได้หลายครั้ง ในขณะที่สายพันธุ์ Nicolaev จากรัสเซียมีระยะเวลาการเจริญในเซลล์ hepatocyte ที่ยาวมากทำให้ระยะพักตัวของโรคใช้เวลานานถึง 8 หรือ 9 เดือนและ relapse เกิดขึ้นหลังจากนั้นเพียงไม่กี่เดือน เรียกสายพันธุ์ดังกล่าวว่า *P. vivax hibernans* สำหรับสายพันธุ์จากเกาหลีเหนืออาจมีการพบเชื้อในครั้งแรกในกระแสโลหิตหลังจากได้รับ sporozoite เข้าไปในระยะเวลาไม่นานกว่าปกติแต่ถ้าได้รับ sporozoite ในปริมาณน้อยจะพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมีระยะพักตัวนานกว่า 300 วันคล้ายกับสายพันธุ์ *P. vivax multinucleatum* จากประเทศจีน อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่ทราบปัจจัยที่ชัดเจนที่กระตุ้นให้ระยะ hypnozoite มีการเจริญใหม่ภายหลังการหยุดพักในระยะเวลาต่างๆ กัน (Shute et al 1977; Jiang et al 1982)

วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจำเป็นต้องพิจารณาถึงเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดนอกจากจะมีพื้นฐานและคุณลักษณะทางชีววิทยาที่ต่างกันแล้วยังมีองค์ประกอบของแอนติเจนที่ต่างกัน ในขณะที่เชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันประกอบด้วยระยะต่าง ๆ ในวงจรชีวิตหลายระยะ ดังนั้นแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละระยะของการเจริญจึงมีความแตกต่างกันด้วย ในขณะที่แอนติเจนหนึ่ง ๆ ของเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์

(clone หรือ strain) ยังอาจมีความผันแปรในองค์ประกอบของกรดอะมิโนได้ ดังนั้นภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ มาลาเรียจึงมีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อ (species-specific) ต่อระยะของเชื้อ (stage-specific) และต่อสายพันธุ์ของเชื้อ (strain-specific) เนื่องจากการติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียในภายหลังได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นแม้ว่าเป้าหมายของวัคซีนในอนาคตคือการสร้างภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์หรือ sterile immunity แต่ในทางปฏิบัติผลสัมฤทธิ์ของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียยังไม่สามารถบรรลุเป้าหมายดังกล่าวในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนนอกจากจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและปราศจากผลข้างเคียงแล้ว ระดับผลสัมฤทธิ์ของวัคซีนอาจทำให้ระยะฟักตัวของโรคนานขึ้น ระดับเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดไม่สูง อาการของโรคที่ไม่รุนแรง หรือการลดความเสี่ยงของการติดเชื้อลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน เป็นต้น สำหรับโปรตีนที่เป็นเป้าหมายในการพัฒนาวัคซีนที่สำคัญสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ดังนี้ (Crompton et al 2010)

1. วัคซีนป้องกันระยะก่อนที่เชื้อจะเข้าเม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccines)

เป้าหมายหลักของวัคซีนกลุ่มนี้คือการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของระยะ sporozoite รวมทั้งระยะที่เชื้อเจริญในตับจึงเป็นการป้องกันการติดเชื้อที่จะเกิดขึ้นตามมา ซึ่งบนผิวของระยะ sporozoite ประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับเซลล์ตับรวมทั้งการเคลื่อนที่และลูกกลมเข้าสู่เซลล์ที่สำคัญและได้รับการศึกษาและพัฒนามากที่สุดจนถึงขั้นสามารถทดสอบในภาคสนาม ได้แก่ circumsporozoite protein (CSP) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของวัคซีนยังไม่สมบูรณ์ ซึ่งการค้นพบ CSP เริ่มจากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยระยะ sporozoite ของเชื้อมาลาเรียที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) หรือผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ (X-irradiated sporozoite) สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ โดยพบว่าแอนติบอดีที่สามารถป้องกันการติดเชื้อทำให้โปรตีนบนผิวของระยะ sporozoite เกิดการเกาะกลุ่ม (precipitation) จึงเรียกโปรตีนดังกล่าวว่า circumsporozoite protein (Nussenzweig and Nussenzweig 1989) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดบนผิวของระยะนี้ มีโครงสร้างโดยทั่วไปคล้ายกัน กล่าวคือด้าน N-terminus และ C-terminus ของโปรตีนประกอบด้วยบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันระหว่าง CSP ของเชื้อมาลาเรียต่าง species กันเรียกว่า region I และ region II ตามลำดับ (McCutchan et al 1996) ซึ่งบริเวณส่วนกลางใน CSP ประกอบด้วย repeats ซึ่งมี B cell epitope โดยแอนติบอดีต่อบริเวณดังกล่าวสามารถยับยั้งการลูกกลมของ sporozoite เข้าสู่เซลล์ตับและยับยั้งความสามารถในการติดต่อของ sporozoite (Hollingdale et al 1984) แอนติบอดีดังกล่าวอาจทำหน้าที่ปิดกั้นตัวจับ (ligand) และตัวรับ (receptor) ระหว่าง sporozoite กับเซลล์ตับหรือยับยั้งการเคลื่อนที่ของ sporozoite (Nussenzweig and Nussenzweig 1989) บริเวณ C-terminus ใน CSP ของ *P.falciparum* ประกอบด้วย T helper epitope ซึ่ง T cell epitope เหล่านี้มีความหลากหลายในลำดับเบสสูง แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนี้ ทำให้การตอบสนองของ T cell ต่อ epitope ดังกล่าวลดลงหรือไม่ตอบสนองเลย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถอธิบายการหลบหลีกของเชื้อมาลาเรียต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ด้วยกระบวนการต่างๆ แอนติบอดีต่อ repeats ใน CSP มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียจากการทดลองในอาสาสมัครแม้จะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ แต่ในธรรมชาติกลับพบว่าผู้ที่อยู่ในเขตปรากฏโรคมาลาเรียส่วนใหญ่มีแอนติบอดีต่อ repeats และยังคงติดเชื้อมาลาเรียได้เช่นเดียวกับผู้ที่ไม่มีแอนติบอดี แสดงว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้ออาจมีปริมาณและคุณภาพไม่เพียงพอต่อการป้องกันโรคมาลาเรียได้ในธรรมชาติ (Hoffman et al 1987) อย่างไรก็ตาม CSP ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในการเพิ่มประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในรูปของวัคซีน RTS,S โดยผลิตโปรตีนลูกผสมที่มีองค์ประกอบของ tetrapeptide repeats (NANP) ของโปรตีน CSP ซ้ำกัน 16 ชุด และโปรตีน HBsAg โดยมี T cell epitopes ของโปรตีน CSP เป็นองค์ประกอบที่เชื่อมกับ HBsAg หรือ S protein และยังมี S protein ที่ไม่ได้เชื่อมกับโปรตีน CS ดังกล่าวเป็นองค์ประกอบร่วมในวัคซีน (Cohen et al 2010) ในระยะต่อมาได้มีการพัฒนา

adjuvant ใหม่อีกหลายขนาน จึงมีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนจากการเปลี่ยน adjuvant ชนิดต่างๆ จากการเฝ้าติดตามประสิทธิภาพของวัคซีนต่อเนื่อง พบว่าร้อยละ 34 ของผู้ที่ได้รับวัคซีนมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ มาลาเรีย และหลังจากนั้นประสิทธิภาพของวัคซีนจะลดลง ในการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน RTS,S/AS02_A ที่ให้ผลค่อนข้างดีในผู้ใหญ่จึงได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในเด็กโดยใช้ขนาดของวัคซีนลดลงครึ่งหนึ่ง เรียกว่า RTS,S/AS0_D ในการทดสอบในเด็กอายุ 1 ถึง 4 ปี ในประเทศโมแซมบิก ซึ่งจากการติดตามเป็นเวลา 6 เดือน ภายหลังจากวัคซีนครั้งสุดท้ายพบว่าเด็กที่ได้รับวัคซีนมีจำนวนครั้งของอาการของโรคมาลาเรียลดลงร้อยละ 29 และอุบัติการณ์ของภาวะมาลาเรียที่รุนแรงลดลงร้อยละ 58 และเมื่อติดตามต่อไปเป็นเวลา 18 เดือนพบว่าอุบัติการณ์ดังกล่าวลดลงเหลือร้อยละ 35 และ 49 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อติดตามต่อไปเป็นเวลา 45 เดือน พบว่าอุบัติการณ์เหล่านี้ยังคงลดลงเหลือร้อยละ 26 และ 38 ตามลำดับ รวมทั้งพบว่าอุบัติการณ์การพบเชื้อในกระแสเลือดของผู้ที่ได้รับวัคซีนมีค่าต่ำกว่าผู้ที่ไม่ได้รับวัคซีนร้อยละ 34 ในการผนวกวัคซีน RTS,S/AS0_D กับโปรแกรมการฉีดวัคซีนป้องกันโรคสำหรับเด็ก โดยฉีดร่วมกับวัคซีนป้องกันโรคคอตีบ ไอกรน บาดทะยัก และ *Haemophilus influenzae* type b ในเด็กโมแซมบิกอายุ 8, 12 และ 16 สัปดาห์ พบว่าวัคซีนดังกล่าวมีความปลอดภัย ไม่มีผลกระทบต่ออาการตอบสนองของวัคซีนอื่นๆ เมื่อให้ร่วมกันและยังคงประสิทธิภาพในการป้องกันโรคมาลาเรียได้ถึงร้อยละ 66 เมื่อติดตามเป็นเวลา 3 เดือนหลังได้รับวัคซีนเข็มสุดท้าย ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในลักษณะเดียวกันในเด็กประเทศแทนซาเนีย (Cohen et al 2010) อย่างไรก็ตามพบว่าวัคซีน RTS,S/AS01_B ให้ผลการป้องกันโรคได้สูงถึงร้อยละ 50 ในขณะที่วัคซีน RTS,S/AS02_A ให้ผลเพียงร้อยละ 32 ผลเปรียบเทียบกับดังกล่าวยังมีความสอดคล้องกับการศึกษาในภาคสนามในผู้ใหญ่ในประเทศเคนยา และผลของวัคซีนในเด็กอายุ 18 เดือนถึง 4 ปี ในประเทศกาบอง ซึ่งวัคซีนในเด็กที่ใช้คือ RTS,S/AS01_E ที่มีขนาดลดลงครึ่งหนึ่งจากวัคซีนที่ใช้ในผู้ใหญ่ ข้อมูลเหล่านี้ล้วนให้ผลสนับสนุนถึงประสิทธิภาพที่ดีกว่าของ RTS,S/AS01 สำหรับการศึกษาวัดวัคซีน RTS,S/AS01_E ในเด็กเล็กอายุ 5 ถึง 17 เดือนในประเทศเคนยาและแทนซาเนีย โดยให้วัคซีน 3 ครั้ง คือ เดือนที่ 0, 1 และ 2 พบว่าจากการติดตามเป็นเวลา 8 เดือน หลังได้รับวัคซีนเข็มสุดท้ายพบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ร้อยละ 53 และเมื่อติดตามเด็กที่ได้รับวัคซีนเป็นเวลา 12 และ 15 เดือนหลังได้รับวัคซีนพบว่ามีความปลอดภัยร้อยละ 39.2 และ 45.8 ตามลำดับ (The RTS,S Clinical Trials Partnership 2012)

ในการพัฒนาวัคซีนต่อระยะ pre-erythrocytic stages นั้นยังมีโปรตีนอื่น ๆ ที่พบในระยะดังกล่าว และน่าจะมีส่วนในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีน เช่น thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), sporozoite threonine-asparagine-rich protein (STARP), sporozoite and liver stage antigen (SALSA), liver-stage-specific antigens 1, 2 และ 3 (LSA-1, 2, 3) เป็นต้น (Crompton et al 2010)

2. วัคซีนป้องกันระยะที่เชื้อเจริญโดยไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง (asexual erythrocytic stage vaccines)

เป้าหมายของวัคซีนในกลุ่มนี้เพื่อทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการเจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง ทำให้ผู้ได้รับวัคซีนแม้จะติดเชื้อมาลาเรียในระยะที่เชื้อเจริญในตับได้แต่ภายหลังที่เชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดงจะถูกทำลายหรือมีกระบวนการยับยั้งการเจริญต่อไปทำให้ไม่มีอาการของโรคหรือมีอาการที่ไม่รุนแรง โปรตีนที่มีศักยภาพสำหรับวัคซีนระยะนี้มีหลายชนิด ที่สำคัญมีดังนี้ merozoite surface protein 1 (MSP1), merozoite surface protein 3 (MSP3), merozoite surface protein 4 (MSP4), merozoite surface protein 5 (MSP5), apical membrane antigen 1 (AMA1) และ glutamate-rich protein (GLURP) นอกจากนี้เอนติเจนที่กล่าวมาแล้วนี้ยังมีโปรตีนอื่น ๆ ของเชื้อมาลาเรียที่อาจมีส่วนในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนอีกหลายชนิด เช่น erythrocyte-binding protein (EBA-175), serine repeat antigen (SERA) และ rhoptry protein complex เป็นต้น (Good et al 1998)

3. วัคซีนยับยั้งระยะที่เชื้อสปีพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage vaccines)

วัคซีนในกลุ่มนี้ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในผู้ที่ได้รับวัคซีน แต่แอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียสู่ผู้อื่นในชุมชนในรัศมีที่ยุงกินปล่องสามารถบินได้ เป้าหมายของวัคซีนในกลุ่มนี้แบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่ (1) การทำลายระยะสืบพันธุ์ก่อนที่จะมีการปฏิสนธิ (pre-fertilization) ประกอบด้วย gametocyte และ gamete รวมทั้งกระบวนการเกิด exflagellation ของ gametocyte เพศผู้ แอนติเจนที่สำคัญคือ Pfs230 และ Pfs48/45 ที่พบใน *P.falciparum* (2) การทำลายระยะ zygote และ ookinete หรือเป็นช่วงที่เกิดขึ้นหลังจากการปฏิสนธิ (post-fertilization) เช่น Pfs25 และ Pfs28 ของ *P.falciparum* เป็นต้น และ (3) การทำลาย late-midgut-stage เป็นช่วงที่มีการสร้างเอนไซม์ chitinase ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับ ookinete ที่จะไชผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงพาหะ (Kaslow 1990)

Merozoite surface protein 3 (MSP3)

โปรตีน MSP3 ของ *P. falciparum* (PfMSP3) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย repeats ที่มีกรดอะมิโน 7 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุดทำให้โปรตีนมีโครงสร้างเป็นขดในลักษณะของ coiled-coil alpha-helices โดยแอนติบอดีต่อ PfMSP3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้โดยกระบวนการ antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) กล่าวคือแอนติบอดีไม่ได้ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียโดยตรงแต่แอนติบอดีที่เกิดขึ้นเป็นแอนติบอดีจำพวก cytophilic เช่น IgG1 และ IgG3 ทำหน้าที่จับกับ monocyte และ MSP3 โดยอาศัยส่วนของ Fc receptor เพื่อกระตุ้นการสร้าง cytokines ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียต่อไป (Good et al 1998) นอกจากนี้การทดสอบวัคซีนจากโปรตีนชนิดนี้ในเบื้องต้นพบว่าสามารถลดอุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรียอย่างมีนัยสำคัญ (Sirima et al 2011)

สำหรับ MSP3 ของ *P. vivax* (PvMSP3) นั้นในระยะแรกก่อนการทราบข้อมูล genome ของเชื้อชนิดนี้พบว่า PvMSP3 ประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกัน 3 ชนิด เรียกว่า PvMSP3H, PvMSP3C และ PvMSPA โดยมีน้ำหนักโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันขนาดประมาณ 75 ถึง 105 กิโลดาลตัน มีโครงสร้างเป็นเกลียวขดหรือ coiled-coil structure เช่นกัน และมีกรดอะมิโน alanine เป็นองค์ประกอบจำนวนมากในส่วนกลางของ domain ทั้งนี้ผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* มักตรวจพบว่ามีแอนติบอดีต่อ PvMSP3 และมีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรีย โดยเชื่อว่า PvMSP3 มีความสำคัญในการลุกลามของระยะเมอโรโซइट การเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (Stanisic et al 2013) ในขณะเดียวกันหลังจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3H และ PvMSP3C จากตัวอย่างจำนวนมากที่ได้จากผู้ติดเชื้อ *P. vivax* พบว่าบริเวณ 5' และ 3' ของยีนมีความคงที่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนกลางของยีนที่มีลักษณะของการเรียงตัวซ้ำกันเป็นชุดของ codon ที่มีความหลากหลายในองค์ประกอบของ codon และยังมีมีความผันแปรในจำนวน repeat units รวมทั้งการพบการแทรกของลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้น (insertion) หรือการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ (deletion) กระจุกกระจายในส่วนกลางของยีน ดังนั้นจึงพบว่ายีนเหล่านี้มีความหลากหลายสูงระหว่างเชื้อต่างสายพันธุ์ (clone) และสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบติดตามประชากรของ *P. vivax* ได้ (Putapornpit et al 2014; Yang et al 2006)

อย่างไรก็ตามภายหลังจากการทราบข้อมูล genome ของ *P. vivax* แล้วพบว่า PvMSP3H, PvMSP3C และ PvMSP3A ปรากฏอยู่บนโครโมโซมแห่งที่ 10 ของเชื้อชนิดนี้ และพบว่ามียีนอื่น ๆ ที่มีลักษณะคล้ายกับยีนเหล่านี้อีก 9 ยีน โดยพบการเรียงตัวของยีนต่อเนื่องกันในทิศทางเดียวกันเป็นกลุ่มครอบคลุมบริเวณประมาณ 60 kilobases ยีนเหล่านี้มีลักษณะร่วมกันคือ (1) มีกรดอะมิโน alanine เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก (2) บริเวณส่วนกลางของโปรตีนมีโครงสร้างเป็นขดเกลียว และ (3) บริเวณด้าน N-terminus ที่เป็น signal peptide มีลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อโปรตีนกลุ่มนี้ (Galinski et al 2001; Jiang et al 2013) ดังนั้นโปรตีน

เหล่านี้จึงจัดเป็น PvMSP3 family โดยใน *P. vivax* สายพันธุ์ Salvador I กลุ่มยีนเหล่านี้ประกอบด้วย 12 loci และชื่อยีนที่เสนอโดย Rice และคณะ (Rice et al 2014) ตามลำดับการเรียงตัวและจำนวนกรดอะมิโนที่คาดว่าจะมี ได้แก่ (i) PVX_097670 (PvMSP3-A หรือ PvMSP3-gamma) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 845 ตัว, (ii) PVX_097675 (PvMSP3-B) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 902 ตัว, (iii) PVX_097680 (PvMSP3-C หรือ PvMSP3-beta) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1016 ตัว, (iv) PVX_097685 (PvMSP3-D1) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1111 ตัว, (v) PVX_097690 (PvMSP3-D2) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1125 ตัว, (vi) PVX_097995 (PvMSP3-E1) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 899 ตัว, (vii) PVX_097700 (PvMSP3-F1) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1140 ตัว, (viii) PVX_097705 (PvMSP3-E2) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 907 ตัว, (ix) PVX_097710 (PvMSP3-F2) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1243 ตัว, (x) PVX_097715 (PvMSP3-G) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 450 ตัว, (xi) PVX_097720 (PvMSP3-H หรือ PvMSP3-alpha) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 852 ตัว และ (xii) PVX_097725 (PvMSP3-I) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 382 ตัว ซึ่งยีนเหล่านี้น่าจะเกิดจากการเพิ่มจำนวนยีน (gene duplication) ในระหว่างวิวัฒนาการ เป็นที่น่าสังเกตว่าแม้ยีนเหล่านี้จะเป็นยีนที่คล้ายกัน (paralogous gene) แต่พบว่า PvMSP3-C และ PvMSP3-D1 มีส่วนของ Duffy-binding-like motif ในส่วนกลาง ในขณะที่ PvMSP3 อื่นๆ มีบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน proline จำนวนมากรวมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า PvMSP3-G และ PvMSP3-I ไม่มีบริเวณที่มีกรดอะมิโน alanine จำนวนมากจึงไม่มีโครงสร้างที่ขดเป็นเกลียว ดังนั้นยีนทั้ง 2 ชนิดนี้จึงมีความสัมพันธ์กับยีนอื่นๆ ในกลุ่มค่อนข้างน้อย (Rice et al 2014)

ในการศึกษา ยีน PvMSP3 family ของ Jiang และคณะซึ่งครอบคลุมยีน 11 ชนิดยกเว้นยีน PvMSP3-G พบว่าสามารถตรวจพบโปรตีนในกลุ่ม PvMSP3 family ได้ทั้งหมด 10 ชนิด โดยทุกชนิดพบบนผิวของระยะเมอริโรซอยต์ ยกเว้น PvMSP3-F1 พบที่ apical area ของเซลล์และไม่พบโปรตีนที่สร้างจากยีน PvMSP3-I แม้จะตรวจพบ mRNA transcript ของยีนนี้ (Jiang et al 2013) ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ PvMSP3 family มีจำกัดเฉพาะ PvMSP3H และ PvMSP3C และมีการใช้ยีนเหล่านี้ในการตรวจจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *P. vivax* จากตัวอย่างเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยในหลายภูมิภาค แต่การวิเคราะห์ถึงการใช้อยีนในกลุ่ม PvMSP3 family เพื่อการตรวจสอบอัตลักษณ์ของเชื้อยังไม่มีการศึกษาชัดเจน แม้ว่าจะมีผู้เสนอให้ใช้ genetic markers ต่างๆ เช่น microsallite loci แต่ความสามารถในการจำแนกหรือการตรวจสอบประชากร *P. vivax* สายพันธุ์ที่มีการปะปนในตัวอย่างเดียวกันในปริมาณต่ำยังมีข้อจำกัด (de Souza et al 2015) ซึ่งการตรวจหาจำนวน clone ทั้งหมดในแต่ละตัวอย่างที่ไม่ครอบคลุมจะมีผลต่อการวิเคราะห์และประเมินพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียเกิดความคลาดเคลื่อน

เนื่องจากโปรตีนในกลุ่ม PvMSP3 เป็นโปรตีนบนผิวเมอริโรซอยต์ที่ไม่มีส่วนที่แทรกระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane domain) และไม่มีส่วนเกาะยึดกับเซลล์เมมเบรนโดย glycosylphosphatidyl inositol (GPI) anchor (Galinski et al 1999; Galinski et al 2001; Jiang et al 2013) ดังนั้นโปรตีนเหล่านี้จึงน่าจะหลุดออกจากผิวเมอริโรซอยต์ได้ภายหลังการลูกกลมเข้าสู่เม็ดเลือดแดง ดังนั้นกลุ่มของโปรตีน PvMSP3 จึงน่าจะตรวจพบได้ในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อ *P. vivax* และอาจจะมียาต้านในการช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ ซึ่งชุดทดสอบสำหรับระบุในปัจจุบันที่ตรวจหา lactate dehydrogenase ของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ยังมีข้อจำกัดในด้านความไวและความจำเพาะอย่างชัดเจน ดังนั้นผลสัมฤทธิ์จากโครงการวิจัยนี้จึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีน การติดตามประชากรมาลาเรียและศักยภาพในการพัฒนาการวินิจฉัย *P. vivax* ในอนาคต

ความสำคัญของการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

การเข้าใจพันธุกรรมประชากร (population genetics) และวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (molecular evolution) ของเชื้อมาลาเรียมีประโยชน์พื้นฐานในการวางมาตรการสำหรับการควบคุมโรค เช่น การทราบขอบเขตและเข้าใจกลไกทางพันธุกรรมที่กำหนดความหลากหลายของโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมมาลาเรียรวมทั้งการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียและการแพร่กระจายของเชื้อที่ดื้อยาไปตามภูมิภาคต่างๆ การทราบอัตราการผ่าเหล่าหรืออัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งเบสต่อปี อาจช่วยพยากรณ์แนวโน้มที่เชื้อมาลาเรียจะมีคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างไปจากเดิมภายใต้สภาวะที่ถูกกดดันจากปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการควบคุมโรค ดังนั้นการควบคุมปัจจัยที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเหล่านี้ย่อมช่วยชะลอหรือควบคุมเชื้อมาลาเรียที่จะก่อปัญหาอย่างมากในอนาคตลงได้ ร่วมกับการใช้มาตรการอื่นๆ ควบคู่กันไป เป็นต้น (Arnott et al 2012)

พันธุกรรมประชากรเป็นการประยุกต์กฎของเมนเดล (Mendel) รวมทั้งหลักการทางพันธุกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในการศึกษากลุ่มประชากรเป้าหมายทั้งหมด การศึกษาดังกล่าวนับเป็นพื้นฐานเพื่อการเข้าใจวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากวิวัฒนาการมีรากฐานมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่มีการสะสมขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปในกลุ่มประชากร ในการศึกษาพันธุกรรมประชากรนั้นเพื่อทำนายหรือคาดการณ์เกี่ยวกับกลไกทางพันธุกรรมต่างๆ เช่น การแยกหน่วยพันธุกรรม (segregation) การแลกเปลี่ยนระหว่างหน่วยพันธุกรรม (recombination) การโยกย้ายหน่วยพันธุกรรม (transposition) และการผ่าเหล่า (mutation) กับผลกระทบที่เกิดขึ้นกับกลุ่มประชากรเป้าหมาย ในขณะที่เดียวกันการศึกษาพันธุกรรมประชากรได้มีการคำนึงถึงปัจจัยทางระบบนิเวศวิทยาและกระบวนการทางวิวัฒนาการ เช่น ขนาดของประชากร (population size) รูปแบบการสืบพันธุ์ (pattern of mating) การกระจายทางภูมิศาสตร์ (geographic distribution) การอพยพย้ายถิ่น (migration) และกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ร่วมด้วย ทั้งนี้ปัจจัยทางพันธุกรรม ปัจจัยทางนิเวศวิทยา และปัจจัยทางวิวัฒนาการ ล้วนมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันทั้งสิ้น ดังนั้นการศึกษาพันธุกรรมประชากรจึงมีความเชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดกับการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุล หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลเป็นการประยุกต์ทฤษฎีของดาร์วิน (Darwin) เพื่ออธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในระดับนิวคลีโอไทด์ของหน่วยพันธุกรรมที่ต้องการศึกษา โดยวิวัฒนาการเป็นการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมในประชากรหรือ gene pool ตามช่วงเวลาที่ผ่านมา (Futuyma 1998)

โดยทั่วไปการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นอย่างไม่จำเพาะและอยู่ภายใต้สภาวะที่ถ่วงดุลย์กันระหว่างการเกิด mutation และการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนแบบ random genetic drift หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคืออัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งชนิดที่ทำและไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้แนวคิดหรือทฤษฎีดังกล่าวเรียกว่า neutral theory of molecular evolution (Kimura 1968) ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากสามารถใช้เป็น null hypothesis สำหรับการประยุกต์ในการทดสอบทางวิวัฒนาการ เช่น การคัดเลือกตามธรรมชาติที่มีผลต่อลักษณะการเปลี่ยนแปลงของยีน เป็นต้น ข้อมูลเกี่ยวกับพันธุกรรมนั้นยังสามารถใช้สร้างความเชื่อมโยงทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยแสดงในเชิงเส้นที่มีลักษณะคล้ายการแตกแขนงของกิ่งก้านสาขาของต้นไม้ ซึ่งอาศัยพื้นฐานจากการเปรียบเทียบลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโน วิธีวิเคราะห์และข้อตกลงพื้นฐานเบื้องต้นของการวิเคราะห์แต่ละวิธีสามารถหารายละเอียดได้จากหนังสือเกี่ยวกับวิวัฒนาการระดับโมเลกุลในเรื่องการสร้าง phylogenetic tree

แม้ว่าวงชีวิตของเชื้อมาลาเรียต้องมีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแต่การแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมในขั้นตอนดังกล่าวไม่จำเป็นต้องเกิดขึ้น ในบริเวณที่มีประชากรเชื้อมาลาเรียจำนวนน้อยเมื่อยุงดูดเลือดคนมักได้รับเฉพาะ gametocyte ที่มีพันธุกรรมแบบเดียว ดังนั้นการปฏิสนธิที่เกิดขึ้นมักเป็นการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อมาลาเรียที่มีพันธุกรรมที่เหมือนกันหรือเป็น self-fertilization ซึ่งสามารถตรวจสอบภาวะที่ขาดเซลล์สืบพันธุ์ที่มีพันธุกรรม

ต่างกัน (heterozygote) (Tibayrenc et al 2002) เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่มีการจับคู่ของเซลล์สืบพันธุ์ในรูปแบบที่ไม่จำเพาะด้วยการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของการผสมพันธุ์กันเอง (inbreeding coefficient) หรือ Fis ซึ่งแสดงถึงโอกาสที่ zygote จะมีรูปแบบของยีนที่เหมือนกันจากบรรพบุรุษเดียวกัน เช่น การศึกษา genotype จากรยะ oocyst ของ *P. falciparum* ในยูงพาหะในประเทศแทนซาเนีย พบว่า Fis มีค่า 0.33 แสดงว่าราว 2 ใน 3 ของระยะ zygote มีรูปแบบของยีนที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม (recombinant genotype) (Babiker et al 1994) ทั้งนี้ค่า Fis เป็นการวัดการขาดหายไปของ heterozygote ภายในประชากรกลุ่มย่อย ในขณะที่ค่า Fst หรือ fixation index เป็นการวัดการขาดหายไปของ heterozygote อันเป็นผลจากข้อจำกัดของการเคลื่อนย้ายประชากรจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์ เช่น ในอเมริกาใต้ซึ่งมีการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียค่อนข้างต่ำ พบการติดเชื้อ *P. falciparum* ที่มีการปะปนของเชื้อที่มีพันธุกรรมต่างกันน้อยกว่าร้อยละ 20 และค่า Fis ภายในกลุ่มประชากรมาลาเรียมีค่าสูงรวมทั้งค่า Fst มีนัยสำคัญแสดงว่าประชากรเชื้อมาลาเรียดังกล่าวมีการผสมพันธุ์เฉพาะในกลุ่มประชากรหรือ self-fertilization มากและมีข้อจำกัดของการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างกลุ่มประชากร (Anderson et al 2000) ในขณะที่ประชากร *P. falciparum* ในตอนกลางของทวีปแอฟริกามีการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียในอัตราที่สูงและพบการติดเชื้อ *P. falciparum* ที่มีการปะปนของเชื้อที่มีพันธุกรรมต่างกันมากกว่าร้อยละ 45 พบว่าค่า Fis และ Fst มีค่าต่ำโดย Fst มีค่าที่ไม่มีความสำคัญแสดงว่าเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่มีการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างเชื้อที่มีพันธุกรรมต่างกันและเกิดขึ้นได้ระหว่างกลุ่มประชากรโดยไม่มีข้อจำกัดทางภูมิศาสตร์ ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในประชากรและระหว่างกลุ่มประชากรจึงมีมาก (Anderson et al 2000)

การเข้าใจโครงสร้างประชากรและวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียมียุทธศาสตร์ต่อการวางแผนการควบคุมโรค การใช้ยารักษาอย่างมีเหตุผลเพื่อให้เชื้อมาลาเรียดื้อยาได้ยากขึ้น ตลอดจนการออกแบบวัคซีนป้องกันโรคมลาเรีย อย่างไรก็ตามโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียมักมีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคโดยอาจเป็น panmixia หรือ clonal population ซึ่งจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเชื้อในแต่ละท้องถิ่นต่อไป (Hartl et al 2002)

การวิเคราะห์กลไกทางวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย

การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจำเป็นต้องเลือกใช้ molecular marker ที่มีความหลากหลายมากพอที่สามารถบ่งชี้เอกลักษณ์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์โดยใช้หลักการของ Wright's statistics ส่วนการทดสอบเพื่อหาร่องรอยของกระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติในระดับยีนหรือระดับนิวคลีโอไทด์มีหลายวิธี ขึ้นกับลักษณะของข้อมูลที่ต้องการศึกษา ถ้าผลที่ได้มีค่าเบี่ยงเบนไปจากวิวัฒนาการที่เป็นกลาง (neutral evolution) แสดงว่ามีกระบวนการคัดเลือก (selection) เกิดขึ้น เช่น การทดสอบโดยวิธีของ McDonald-Kreitman โดยการคำนวณความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ใน codon ที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (synonymous polymorphism) และใน codon ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิด (nonsynonymous polymorphism) ภายใน species ที่ต้องการศึกษาเปรียบเทียบกับความหลากหลายระหว่าง species ที่ศึกษา กับ species ที่มีความใกล้ชิดทางสายใยวิวัฒนาการ สัดส่วนดังกล่าวเรียกว่า neutrality index ซึ่งถ้ามีค่าที่มีนัยสำคัญแสดงว่ากระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติทำให้เกิดความหลากหลายดังกล่าว (McDonald and Kreitman 1991) การคำนวณอีกวิธีหนึ่งโดยการเปรียบเทียบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน codon ชนิดที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงต่อตำแหน่งการแทนที่แบบเดียวกัน (synonymous substitution per synonymous site หรือ dS) และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงต่อตำแหน่งการแทนที่แบบเดียวกัน (nonsynonymous substitution per nonsynonymous site หรือ dN) รวมทั้งมีการคำนวณโดยอาศัยวิธีอื่น ๆ

เช่น การวิเคราะห์โดยวิธี Fu and Li's statistics ตลอดจนการวิเคราะห์โดยวิธี Tajima เป็นต้น (Nei and Gojobori 1986; Fu and Li 1989; Tajima 1989)

ในการวิเคราะห์แบบแผนของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน codon ของยีนในกลุ่ม housekeeping genes กับยีนที่สร้างโปรตีนในบางระยะของเชื้อมาลาเรีย โดยการคำนวณอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จากค่า dS เปรียบเทียบกับค่า dN พบว่าการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่ม housekeeping genes มีค่า dS มากกว่าค่า dN ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สร้างจากยีนเหล่านี้แม้เพียงเล็กน้อยอาจทำให้หน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนไปในระดับที่เซลล์ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ ดังนั้นจึงพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มักเป็นชนิดที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนชนิดไป ซึ่งในกรณีนี้ค่า dS มากกว่าค่า dN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่ามีการคัดเลือกในเชิงลบหรือเรียกว่า negative selection หรือ purifying selection ในทางตรงข้าม การเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างโปรตีนในบางระยะของเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่สร้างโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนบนผิวเซลล์ มักมีค่า dN มากกว่าค่า dS ซึ่งในกรณีที่มีค่าต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่ามีการคัดเลือกในเชิงบวกหรือเรียกว่า positive selection หรือ natural selection อย่างไรก็ตามยังมียีนหลายชนิดและอาจเป็นส่วนใหญ่ในทั้ง 2 กลุ่มที่ค่า dS และ dN ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ลักษณะดังกล่าวเกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์อย่างไม่เบี่ยงเบนจากความเป็นกลางหรือเรียกว่า selective neutrality (Hughes and Friedman 2005)

ปัจจุบัน molecular marker สำหรับการศึกษา *P. vivax* ยังมีจำกัดดังนั้น PvMSP3 family นอกจากจะมีบทบาทเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของการพัฒนาวัคซีนแล้ว ความหลากหลายในลำดับเบสของยีนดังกล่าวที่ปรากฏในเชื้อต่างสายพันธุ์ยังมีประโยชน์สำหรับการประเมินผลของวัคซีนในอนาคตเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของประชากรของเชื้อ *P. vivax* (population dynamics) การตรวจสอบอุบัติการณ์ของการที่เชื้อมาลาเรียต่างสายพันธุ์ปะปนในผู้ป่วยรายเดียวกัน รวมทั้งการศึกษาและติดตามผลของวัคซีนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะประชากรของเชื้อมาลาเรียในเชิงวิวัฒนาการเกี่ยวกับการคัดเลือกตามธรรมชาติ (Jongwutiwes et al 2010) นอกเหนือไปจากการศึกษาภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย การศึกษานี้จึงสร้างองค์ความรู้ใหม่อันสำคัญต่อการควบคุมโรคมาลาเรียต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 วิเคราะห์ความหลากหลายของยีนแต่ละชนิดรวม 12 ยีนซึ่งอยู่ในกลุ่ม PvMSP3 family ของ *P. vivax* จากผู้ติดเชื้อในเขตจังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรีและยะลา

2.2 ศึกษาอุบัติการณ์ของการตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG ต่อโปรตีน 8 ชนิดในกลุ่ม PvMSP3 family ในผู้ติดเชื้อ *P. vivax* และความสัมพันธ์กับระดับ hematocrit และปริมาณเชื้อในกระแสเลือด

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้วหรือหลอดเลือดดำของผู้ป่วยที่มารับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่หน่วยควบคุมโรคติดต่อโดยแมลงหรือโรงพยาบาลในท้องที่ที่มีเชื้อมาลาเรียระบาดและตรวจพบเชื้อ *P. vivax* ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ จากจังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา จำนวนไม่น้อยกว่า 50 ตัวอย่างในแต่ละท้องที่ (รวม 200 ตัวอย่าง) นำตัวอย่างเลือดดังกล่าวเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก ได้แก่ เพศ อายุ เชื้อชาติ ภูมิลำเนา อุณหภูมิร่างกาย และอาการของผู้ป่วยแต่ละรายที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรีย รวมทั้งผล complete blood count สำหรับผู้ป่วยมาลาเรียในจังหวัดอุบลราชธานีหรือจังหวัดอื่นๆ ที่พบเชื้อมาลาเรียที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเช่นเดียวกัน จะคัดแยก serum จากผู้ติดเชื้อ *P.*

vivax และผู้ที่ติดเชื้อ *P. falciparum* อย่างละ 100 ราย (รวม 200 ตัวอย่าง) เพื่อใช้ในขั้นตอนการศึกษา แอนติบอดี

3.2 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทำแผ่นฟิล์มโลหิตบาง (thin blood film)

- ปิเปตเลือดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาด จำนวน 3 μ l บริเวณปลายด้านที่ติดกับส่วนที่เป็นกระจกฝ้าของกระจกสไลด์
- ใช้ขอบกระจกสไลด์ปลายเรียบสม่ำเสมออีกแผ่นหนึ่งแตะหยดเลือดทำมุมประมาณ 45 องศา ไกลขอบกระจกสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางปลายโดยเร็วและสม่ำเสมอ เลือดจะแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางบนแผ่นกระจก ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท
- นำไปจุ่มใน absolute methanol ครึ่งนาที แล้วผึ่งไว้ให้แห้งสนิท
- นำมาย้อมด้วยสีโดยผสมสี Giemsa เข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 ml กับสารละลาย PBS ที่มีค่า pH 7.4 ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วหยดสีลงบนแผ่นฟิล์มโลหิตบนกระจกสไลด์จนท่วมบริเวณที่จะย้อม ทิ้งไว้ 20 นาที
- ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปตรวจหาเชื้อมาลาเรียต่อไป

การทำแผ่นฟิล์มโลหิตหนา (thick blood film)

- ปิเปตเลือดลงบนตรงกลางแผ่นกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาด จำนวน 5 μ l
- ใช้มุมของกระจกสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะหยดเลือด แล้ววนให้เลือดเป็นแผ่นกระจายออกเป็นวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 cm ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท
- นำมาย้อมด้วยสีโดยผสมสียิมซาเข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 ml กับสารละลาย PBS ที่มีค่า pH 7.4 ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้วหยดสีลงบนแผ่นฟิล์มโลหิตบนกระจกสไลด์จนท่วมบริเวณที่จะย้อม ทิ้งไว้ 20 นาที
- ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วเก็บไว้ตรวจหาเชื้อต่อไป

หลังจากทำการเตรียมฟิล์มเลือดทั้งชนิดบางและชนิดหนาจากตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว และย้อมสี Giemsa จากนั้นทำการตรวจหาเชื้อมาลาเรียจาก 200 วงกล้องภายใต้ objective lens กำลังขยาย 100 เท่า สำหรับการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดชนิดบางอาศัยหลักการสังเกตระยะและลักษณะของเชื้อมาลาเรีย การเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน รวมทั้งลักษณะของ hemozoin ส่วนการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมาลาเรียจากฟิล์มเลือดชนิดหนา อาศัยลักษณะของเชื้อมาลาเรียเป็นหลักโดยเทียบเคียงกับเม็ดเลือดขาว ซึ่งมักมีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียมากกว่าฟิล์มโลหิตชนิดบางแต่มีความไวมากกว่าและใช้สำหรับประเมิน parasite density โดยนับจำนวนเชื้อเปรียบเทียบกับจำนวนเม็ดเลือดขาว

3.3 การเตรียม DNA จากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เก็บรวบรวมได้มาทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป ภายหลังจากการเติมสารละลาย TE บัฟเฟอร์ จะทำการเก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิ -40°C จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งดำเนินการที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยอนุชีววิทยาของมาลาเรียและปรสิตวิทยาโอกาส คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งขั้นตอนการการสกัด DNA มีดังนี้

- (1) ปิเปต proteinase K 20 μ l ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- (2) ปิเปตตัวอย่างเลือด น้ำลายหรือปัสสาวะปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down

- (3) เติมนัฟเฟอร์ AL ลงไป 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที นำไป spin down
- (4) นำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดไป incubate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างถูกย่อยอย่างสมบูรณ์
- (5) หลังจากนั้นนำไป spin down แล้วเติม ethanol 200 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไป spin down
- (6) ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp spin column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- (7) นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
- (8) เติมนัฟเฟอร์ AW1 500 μ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- (9) นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
- (10) เติมนัฟเฟอร์ AW2 500 μ l แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- (11) นำ QIAamp spin column ไปใส่ใน collection tube ใหม่ที่สะอาด
- (12) นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ส่วนที่เหลือออกให้หมด
- (13) นำ QIAamp spin column ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ที่สะอาด
- (14) เติมนัฟเฟอร์ AE ลงไป 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
- (15) นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- (16) ดูดเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR ต่อไป

3.4 การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR

การตรวจสอบชนิดของเชื้อมาลาเรียจากตัวอย่าง DNA ของทุกตัวอย่างที่รวบรวมได้โดยวิธี PCR ใช้ primers ที่มีลำดับเบสจากส่วนของ mitochondrial cytochrome b ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi* โดยการทำ nested PCR ซึ่งลำดับเบสของ primer แต่ละชนิด ตลอดจนขั้นตอนการเตรียม PCR mixture รวมทั้ง PCR thermal cycler profile ทำเช่นเดียวกับที่คณะผู้วิจัยรายงานมาก่อนแล้ว (Putaporntip et al 2009; Jongwutiwes et al 2011) สำหรับองค์ประกอบของสารต่าง ๆ และสถานะของ PCR โดยสังเขปมีดังนี้ ในปริมาณสุทธิของสารละลาย PCR 10 μ l ประกอบด้วย DNA ที่เจือจางในสารละลาย TE buffer 2 μ l ส่วน forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.2 μ M, nucleotide substrate (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) อย่างละ 2.5 mM, 10xPCR reaction buffer 1 μ l, น้ำกลั่น 6.02 μ l และมี Taq polymerase 0.25 unit เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่อง PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่ทำให้ DNA แยกสายก่อนปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 96°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วยขั้น DNA แยกสายที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ primer จับกับ DNA template ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ DNA ยืดสายที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 35 รอบ และขั้นการสร้างสาย DNA ที่สมบูรณ์ ใช้อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที การตรวจสอบแถบ DNA โดย agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยใช้ agarose 2 g ละลายใน TBE buffer 100 ml

3.5 การจำแนก monoclonal ของ *Plasmodium vivax*

เนื่องจากปัจจุบันยังมีข้อจำกัดในการใช้ genetic markers เพื่อจำแนก clone ของ *Plasmodium vivax* ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกใช้ PvMSP1 และ PvCSP ในการตรวจสอบเบื้องต้น โดย PvMSP1 จะให้ primers เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนใน block 6 ส่วน PvCSP ใช้ primers ที่ครอบคลุมส่วนกลางของยีนที่มี repeats โดยสามารถแยกขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต่างกันได้ในระดับหนึ่ง (Putaporntip et al unpublished) โดยมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

นำ DNA ที่ให้ผลตรวจว่าเป็นเชื้อ *Plasmodium vivax* มาเป็น DNA ต้นแบบ (DNA template) องค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดในปริมาตรสุทธิ 20 μ l ประกอบด้วย

DNA template	3.0	μ l
forward primer	0.2	μ M
reverse primer	0.2	μ M
10X <i>ExTaq</i> Buffer	2.0	μ l
dNTP mixture อย่างละ	2.5	mM
sterile distilled water	13.4	μ l
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	0.25	unit/ μ l

นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR thermal cycler) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

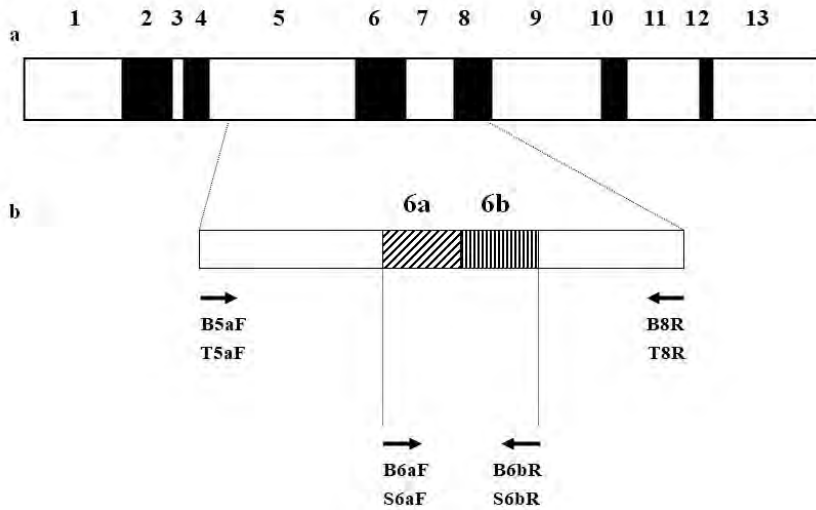
ในขั้นตอนแรกต้องทำการแยกสาย DNA (DNA denaturation) ก่อนที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย

1. การแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที
2. ขั้นตอนที่ primer จับกับ template DNA (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิปรับตามค่า T_m ของ primers ที่ใช้เป็นเวลา 30 วินาที

3. การสร้างสาย DNA จาก DNA ต้นแบบ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที สำหรับ PCR ที่ต้องการ product น้อยกว่า 1 kb และ 2-3 นาทีสำหรับ product ยาวมากกว่า 1 kb

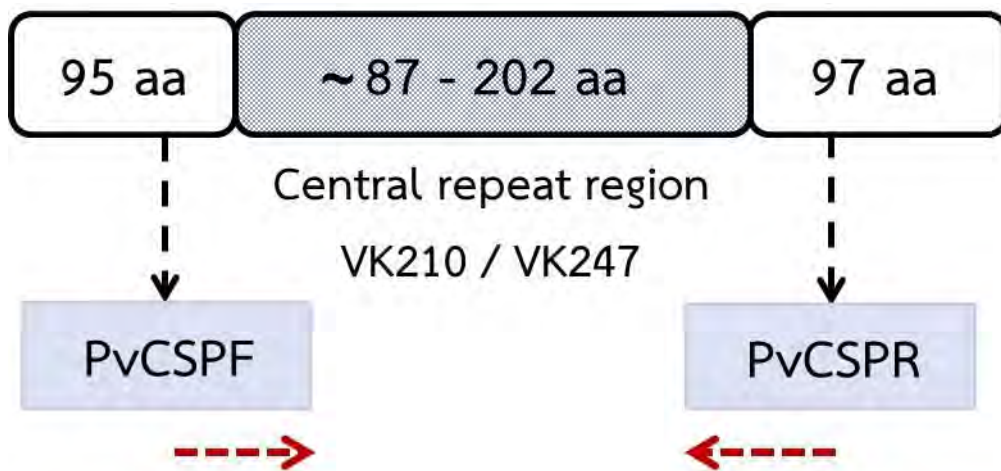
โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 35 รอบ และขั้นตอนการสร้างสาย DNA สมบูรณ์หลังรอบสุดท้ายใช้ อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

ชื่อและตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการทำ haplotyping เพื่อแยก monoclonal ของ *P. vivax* แสดงไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของยีน Pvmsp-1 ของเชื้อ *Plasmodium vivax* (a) แสดงบริเวณ conserved block แทนด้วย block สีขาว ส่วน variable region แทนด้วย block สีดำ (b) แสดงตำแหน่งและชื่อ primer (B5aF, T5aF, B6aF, S6aF, B6bR, S6bR, B8R and T8R) ที่ใช้ในการทำ haplotyping ของ block 5 6a 6b และ 8

สำหรับการทำ haplotyping ของยีน PvCSP นั้นใช้ PCR primer เพียง 1 คู่ ที่อยู่ในส่วนของ conserved block ด้านปลาย 5' และ 3' ส่วน central region มีลักษณะของลำดับเบสที่เรียงซ้ำกันเป็นชุดทำให้มีความสั้นยาวไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่างเชื้อ ดังนั้นจึงใช้คุณลักษณะนี้มาใช้แยก monoclonal ของเชื้อ ตามขนาดความสั้นยาวของผลผลิต PCR ได้ในแต่ละตัวอย่าง โครงสร้างของยีน PvCSP และตำแหน่ง primer แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง และตำแหน่งของ PCR primer ของยีน PvCSP ของเชื้อ *Plasmodium vivax* conserved block แทนด้วย block สีขาว ส่วน central repeat region แทนด้วย block สีเทา

3.6 การเพิ่มปริมาณของยีน PvMSP3 family ทั้ง 12 ยีน

จำนวนตัวอย่าง *P. vivax* ใช้ 30 ตัวอย่างที่เป็นการติดเชื้อสายพันธุ์เดียวจากแต่ละจังหวัด รวมทั้งสิ้นใช้ 120 ตัวอย่าง (ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนอย่างน้อย 30 ตัวอย่างสำหรับแต่ละกลุ่มประชากร ณ ขณะใดขณะหนึ่ง เป็นจำนวนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ molecular evolution และ population genetics ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ครอบคลุมยีน PvMSP3 family ทั้ง 12 ยีนได้แก่ PVX_097670 (PvMSP3-A หรือ PvMSP3-

gamma) ครอบคลุมประมาณ 2500 bp ตัว, (ii) PVX_097675 (PvMSP3-B) ครอบคลุมประมาณ 2700 bp, (iii) PVX_097680 (PvMSP3-C หรือ PvMSP3-beta) ครอบคลุมประมาณ 3000 bp, (iv) PVX_097685 (PvMSP3-D1) ครอบคลุมประมาณ 3300 bp, (v) PVX_097690 (PvMSP3-D2) ครอบคลุมประมาณ 3300 bp, (vi) PVX_097995 (PvMSP3-E1) ครอบคลุมประมาณ 2700 bp, (vii) PVX_097700 (PvMSP3-F1) ครอบคลุมประมาณ 3400 bp, (viii) PVX_097705 (PvMSP3-E2) ครอบคลุมประมาณ 2700 bp, (ix) PVX_097710 (PvMSP3-F2) ครอบคลุมประมาณ 3700 bp, (x) PVX_097715 (PvMSP3-G) ครอบคลุมประมาณ 1500 bp, (xi) PVX_097720 (PvMSP3-H หรือ PvMSP3-alpha) ครอบคลุมประมาณ 2500 bp และ (xii) PVX_097725 (PvMSP3-I) ครอบคลุมประมาณ 1200 bp โดยปฏิกิริยาถูกใช้โพริเมอร์เรสโดยใช้ forward primer ซึ่งได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 25-30 ตัวแรกก่อน start codon ของยีนโดยอ้างอิงจาก genome sequence ในฐานข้อมูล GenBank database ส่วน reverse primer ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ complementary strand ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 25-30 ตัวหลังจาก stop codon สำหรับขั้นตอนการทำ PCR ในปริมาณสุทธิ 30 μ l ประกอบด้วย DNA ของเชื้อมาลาเรียที่จะศึกษา primers อย่างละ 0.2 μ M nucleotide substrate (dATP, dCTP, dGTP) อย่างละ 2.5 mM MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 mM 10x PCR reaction buffer 3 μ l น้ำกลั่น 17.4 μ l และมี Taq DNA polymerase 0.6 units เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นำ PCR reaction mixture เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ (PCR thermal cycler) ซึ่งประกอบด้วยขั้นทำให้ DNA แยกสาย (DNA denaturation) ขั้นตอนทำให้ primer จับกับ DNA template (primer-template annealing) และขั้นตอนที่ DNA ยืดสาย (primer extension) โดยปฏิกิริยาทั้งหมดทำซ้ำกันจนครบ 35 รอบ หลังจากนั้นทำการตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis สำหรับ PCR primer ที่ออกแบบเพื่อการเพิ่มผลผลิต PCR ของ PvMSP3 family ทั้ง 12 ยีนนั้นแสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งในรายงานครั้งนี้ทำเฉพาะ 7 ยีนก่อนได้แก่ 3A, 3B, 3C, 3D1, 3E1, 3F1 และ 3H

ตารางที่ 1 PCR primers for PvMSP3

Gene	Primers	Sequence (5' -> 3')	Nucleotides (bp)
3D2	PvMSP3.5_F0	ATGTACACGGCCACTGCACG	20
	PvMSP3D2-R0	GTATGTATAAACATACGCATGTGCG	25
3E2	PvMSP3.8_F0	ATTGCCATACCGGACAATTCGCA	23
	PvMSP3.8-R0	CTTAGAAGGTCCTTCCTGGGC	21
3F2	PvMSP3.9_F0.1	CGCTAACTGAAAGGTAGTGTATATC	25
	PvMSP3.9-R0.2	CCACAAACGGGAAACATC	18
3G	PvMSP3GT_F0	GTGTTTTACCCACATCAAATAGG	24
	PvMSP3GT-R0	CTCATTTCTTCATTTTGGAGGAC	23
3I	PvMSP3.11_F0	TAACTCAAAGAATGGCTTTCC	22
	PvMSP3.11-R0	GTATAGTGGCACACGAATTG	21

3.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3 family ทั้ง 12 ยีน

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PCR purification kit จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated DNA sequencer) ในกรณีที่พบรูปแบบของ allele ใหม่ หรือพบการแทนที่ของเบสในตำแหน่งที่ไม่เคยพบมาก่อนจะทำการเพิ่มปริมาณยีนอีกครั้งโดยเริ่มต้นจาก genomic DNA จากตัวอย่างเดิมและทำการหาลำดับเบสซ้ำอีกครั้ง เพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้อง

รายชื่อ primer และลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการอ่านลำดับเบสของยีน PvMSP3 family เฉพาะในรายงานครั้งนี้ 5 ยีน แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Sequence primers for PvMSP3

Gene	Primers	Sequence (5'→ 3')	Nucleotides (bp)
3D2	PvMSP3.5-F1.3	CTCCGCACTCTTTTTAGCATACG	23
	PvMSP3D2-F2	GAACAAAAAAGCAGAATGGGCAGC	26
	PvMSP3D2-F3	GCAGCCGAAGTAGTAAAAGCGG	22
	PvMSP3D2-F4	CACTAAACGTTGTAAAAGCAG	21
	PvMSP3.4.5-F2	AGCAAAGGGAAATGCACAACTGC	24
	PvMSP3D2-R1	TACCACATAGGCTGCTATCTGGGC	24
	PvMSP3D2-R2	CGCTTCTTTTGCTGCAGTTTC	21
3E2	PvMSP3E2-R1	TGCTGATTTTGAAGTTTTGCTGCA	25
	PvMSP3E2-F1	AAAGAAGAAGCAAAAAAGCAGT	23
	PvMSP3E2-F2	GCTAAGGCTATAGCAGCTAAAG	22
3F2	PvMSP3F2_R1	TGCTTCTTCTGCTCGCTTACTTGCTAA	27
	PvMSP3F2_F1	GGAACAAACAAAAGCAGAAGT	21
	PvMSP3F2_F2	TAATAGAAGCAGAAGTAGCAAAGGCAG	27
	PvMSP3F2_F3	GCAGAATCAGCGGAGGAAGACGCGGA	26
3G	PvMSP3GT-F0	GTGTTTTACCCACATCAAAATAGG	24
	PvMSP3GT-F1	GCAGTAAGAGCAAGCGAAGATG	22
	PvMSP3GT-R0	CTCATTTCTTCATTTTGGAGGAC	23
3I	PvMSP3.11_R1	CACCCCTGGACTCCAAGACCT	21
	PvMSP3.11_F1.1	GGCCAACACAGTGATGAAG	19

3.8 การเตรียม expression plasmid construct

ทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสที่เหมาะสมในการปรับเปลี่ยนเพื่อให้เป็นตำแหน่งตัดจำเพาะของ restriction enzyme ที่เหมาะสมเพื่อให้ง่ายในขั้นตอนการโคลนเข้าสู่ plasmid vector หลังจากที่ยื่นส่วน DNA ถูกตัดด้วย restriction enzyme ที่เหมาะสมแล้วจะถูกเชื่อมเข้าสู่ expression vector เช่น plasmid pET28a แล้วโคลนเข้าสู่ *E. coli* JM109 โดยเทคนิค electroporation แล้วเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ส่วนหนึ่งมาทำการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน ความเข้มข้น 50 µg/ml ผสมอยู่ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นโคโลนีที่ได้จะถูกนำมาคัดเลือกหา transformant ที่มี recombinant DNA ด้วยการตรวจสอบโดยวิธี PCR และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อตรวจสอบความถูกต้องแล้ว นำ expression plasmid construct ที่ได้ มา transform เข้าสู่ *E. coli* BL21 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตโปรตีนได้

3.9 การกระตุ้นการสร้างโปรตีน recombinant PvMSP3 family

นำ *E. coli* BL21 ที่มี expression plasmid construct ที่เตรียมไว้แล้ว มากระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนโดยการเติม Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เพื่อเป็นการเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตโปรตีนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นดังกล่าวมาทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) แล้ว นำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column

3.10 การวิเคราะห์โปรตีน recombinant PvMSP3 family และ Western blot analysis

ทำการหาปริมาณของโปรตีนที่ได้โดยวิธี Bradford Protein Assay และแยกโปรตีนโดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โปรตีนที่แยกออกจากกันได้จะถูกนำมาย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue solution และถูกย้ายไปยัง PVDF membrane ด้วยวิธี semi-dry transfer และทำ western blot analysis โดยใช้ pooled serum ของผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* เป็น positive control และ pooled serum จากผู้ที่ไม่ได้มีประวัติได้รับเชื้อมาลาเรียมาก่อนและอาศัยนอกเขตปรากฏโรคมมาลาเรียเป็น negative control ส่วน pooled serum จากผู้ที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ใช้เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของแอนติบอดี

3.11 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ recombinant PvMSP3 family ต่อการทำปฏิกิริยากับ pooled serum จากผู้ที่ติดเชื้อ *P. vivax* และตรวจสอบความเข้มข้น (titer) ที่เหมาะสมของ pooled serum ดังกล่าวต่อการทำปฏิกิริยากับ recombinant PvMSP3 family ที่เลือกใช้ทดสอบ เมื่อได้สภาวะการทดสอบ ELISA ที่เหมาะสมแล้วจึงทำการตรวจสอบหาแอนติบอดีต่อ PvMSP3 family จากตัวอย่างซีรัมที่ต้องการศึกษา ทั้งนี้การทดสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้เพื่อหาแอนติบอดีต่อ PvMSP3 family ชนิด IgG เป็นหลัก

4. ผลการวิจัย

4.1 ประชากรตัวอย่าง

คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียจากหน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงและมาลาเรียคลินิกที่มีการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ *Plasmodium vivax* โดยการตรวจแผ่นฟิล์มเลือดที่ผ่านการย้อมสี Giemsa ในพื้นที่จังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา ในปี ค.ศ. 2006 ถึง ค.ศ. 2018 ได้ตัวอย่างจำนวน 362 ตัวอย่าง รวมทั้งตัวอย่างซีรัมในปี ค.ศ. 1998-2016 ในจังหวัดตาก อุบลราชธานี กรุงเทพมหานคร และยะลา จำนวน 734 ตัวอย่าง

4.2 ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีกล้องจุลทรรศน์

ผลการตรวจตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบเชื้อ *Plasmodium vivax* จากหน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงและมาลาเรียคลินิก จากฟิล์มโลหิตชนิดบางโดยพบลักษณะของเชื้อระยะที่เจริญตั้งแต่ระยะ growing trophozoite เป็นต้นไปจนถึง mature schizont หรือ gametocyte และ เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเหล่านี้จะมีขนาดโตขึ้นชัดเจนและพบ Schuffner's dots อัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงมักไม่เกินร้อยละ 2 นอกจากนี้อาจพบระยะวงแหวนได้เช่นกันแต่ไม่บ่อยเท่าเชื้อ *Plasmodium falciparum* ดังนั้นจึงมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยภาวะของการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium falciparum* ยกเว้นในกรณีที่พบระยะวงแหวนจำนวนมากและมีอัตราการติดเชื้อของเม็ดเลือดแดงสูงร่วมกับการพบลักษณะของเชื้อ *Plasmodium vivax* ชัดเจน ส่วนลักษณะเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่พบได้ในฟิล์มโลหิตชนิดหนา มักมีรูปร่างไม่แน่นอน เนื่องจาก

กระบวนการย้อมสี โดยจากตัวอย่างทั้งหมดสามารถตรวจพบเชื้อสอดคล้องกับผลการตรวจของหน่วยควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลง และมาลาเรียคลินิก ทั้ง 362 ตัวอย่าง

4.3 ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี PCR

เมื่อนำตัวอย่างเลือดที่ได้มาสกัด DNA และนำมาทำ PCR เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรียโดยใช้ primer ของ mitochondrial cytochrome *b* gene ที่จำเพาะกับ *Plasmodium* แต่ละชนิด โดยทำการทดสอบเพื่อหาเชื้อมาลาเรียชนิดที่พบในคน 5 ชนิด *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* และ *Plasmodium knowlesi* ซึ่งสามารถติดต่อสู่คนได้ในประเทศไทย จากผลการตรวจโดยวิธี PCR พบว่าผลการตรวจโดยวิธี PCR มีความสอดคล้องกับผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังตรวจพบการติดเชื้อผสมใน 62 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นการติดเชื้อร่วมกันกับ *Plasmodium falciparum* ในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 3 Species-specific PCR diagnosis of malaria parasites

Province/ Malaria	Tak	Ubon- Ratchathani	Chantaburi	Yala and Narathiwat	Total
<i>P.f</i>	3	0	1	5	9
<i>P.v</i>	71	75	64	81	291
<i>P.v + Pf</i>	15	26	10	11	62
<i>P.m</i>	0	0	0	0	0
<i>P.o</i>	0	0	0	0	0
<i>P.k</i>	0	0	0	0	0
Total	89	101	75	97	362

หมายเหตุ *Pf* = *Plasmodium falciparum*; *Pv* = *Plasmodium vivax*; *Pm* = *Plasmodium malariae*, *Po* = *Plasmodium ovale* และ *Pk* = *Plasmodium knowlesi*

4.4 การจำแนก monoclonal ของ *Plasmodium vivax*

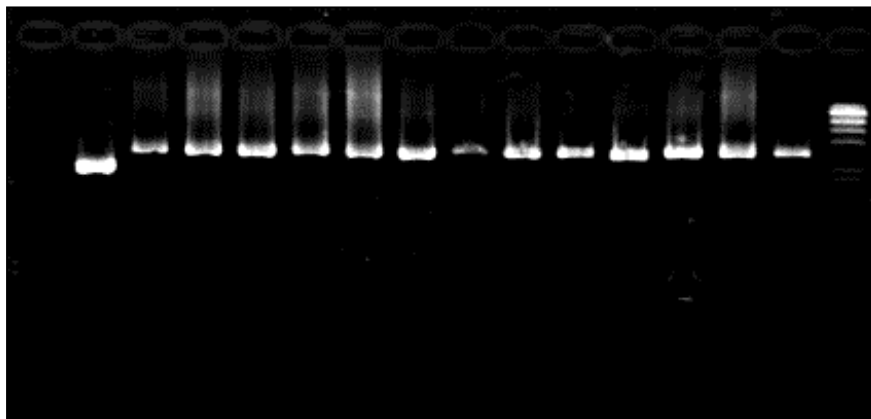
ผลการจำแนก monoclonal ของตัวอย่างเชื้อ *Plasmodium vivax* ทั้ง 291 ตัวอย่างโดยการทำ genotyping ของยีน merozoite surface protein 1 ในส่วนของ variable block 6 ซึ่ง variable block 6 มีรูปแบบของอัลลีล 4 รูปแบบ ส่วนรูปแบบที่ 5 แบบ Belem-Sal1 นั้นยังไม่มีมีการตรวจพบในธรรมชาติ จะเห็นได้ว่าจากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดสามารถตรวจพบรูปแบบของอัลลีลแบบ Sal1-Sal1 ได้มากที่สุด รองลงมาคือ Sal1-Belem b Belem-Belem และ Sal1-Belem a ตามลำดับ และพบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 363 อัลลีลดังแสดงในตารางที่ 4 ในจำนวนนี้พบตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่มีการปะปนกันของอัลลีลต่างชนิดกัน 72 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทำ haplotyping ของยีน PvCSP โดยพบรูปแบบของ central repeat region เป็นแบบ VK210 มากกว่า VK247 ร้อยละ 72 และ 28 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 Distributions of *PvMsp-1* haplotypes based on blocks 6a/6b among 291 clinical isolates.

Haplotypes	Allelic types		Number of haplotype
	Block 6a	Block 6b	
1	Belem	Belem	68
2	Belem	Sal1	0
3	Sal1	Sal1	186
4	Sal1	Belem a	37
5	Sal1	Belem b	72

4.5 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3D2

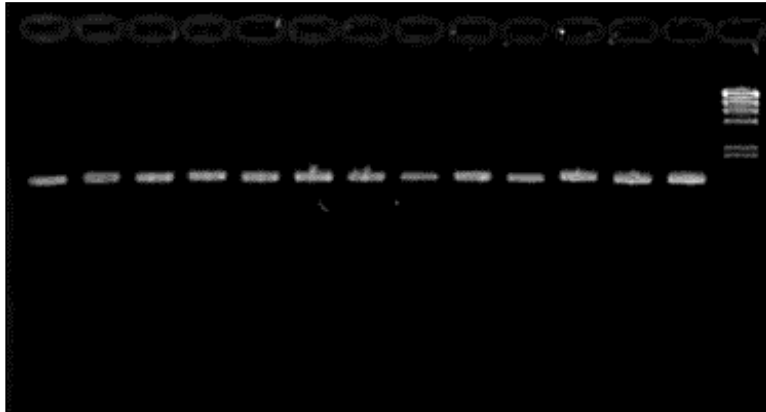
นำตัวอย่าง DNA ที่ตรวจพบเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่มีรูปแบบอัลลีลของ *PvMsp1* block 6 และ *PvCSP* เพียงรูปแบบเดียวจำนวน 219 ตัวอย่าง จากจังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา มาใช้เป็น DNA ต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR ในส่วนของยีน *PvMSP3D2* และนำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน และสุ่มเลือกตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR เหมาะสมต่อการหาลำดับเบสทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ตามแผนที่วางไว้คือจากจังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR บวกมีความยาว 3.3-3.4 กิโลเบส ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของยีน *PvMSP3D2* (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 Representative PCR products of the *PvMSP3D2* gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. M is a DNA lambda/*Hind*III marker in lane 15, N is a negative control in lane 1, *PvMSP3D2* positive sample are in lane 2-14.

4.6 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3E2

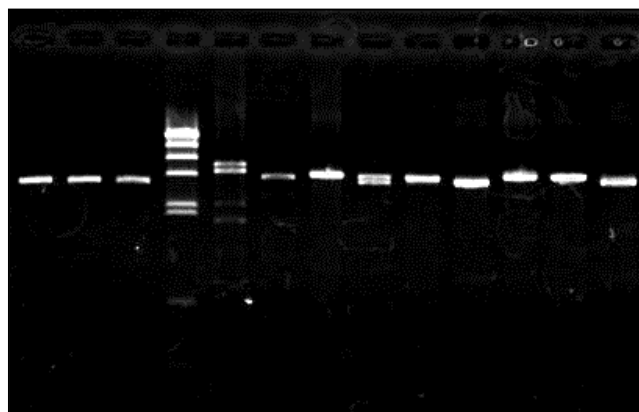
การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR ในส่วนของยีน PvMSP3E2 จากตัวอย่างเชื้อที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เพียงแบบเดียวมาเพิ่มผลผลิต PCR แล้วตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน พบว่าตัวอย่าง DNA ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มปริมาณยีน PvMSP3E2 มีจำนวน 120 ตัวอย่าง คือ จังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR บวกมีความยาว 2.6-2.7 กิโลเบส ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของยีน PvMSP3E2 (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 Representative PCR products of the PvMSP3E2 gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. PvMSP3E2 positive sample are in lane 1-13, M is a DNA lambda/*Hind*III marker in lane 14.

4.7 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3F2

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR ในส่วนของยีน PvMSP3F2 และนำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน พบว่าตัวอย่าง DNA ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มปริมาณยีน PvMSP3F2 มีจำนวน 120 ตัวอย่าง คือ จังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR บวกมีความยาว 3.3-4.1 กิโลเบส ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของยีน PvMSP3F2 (รูปที่ 5)

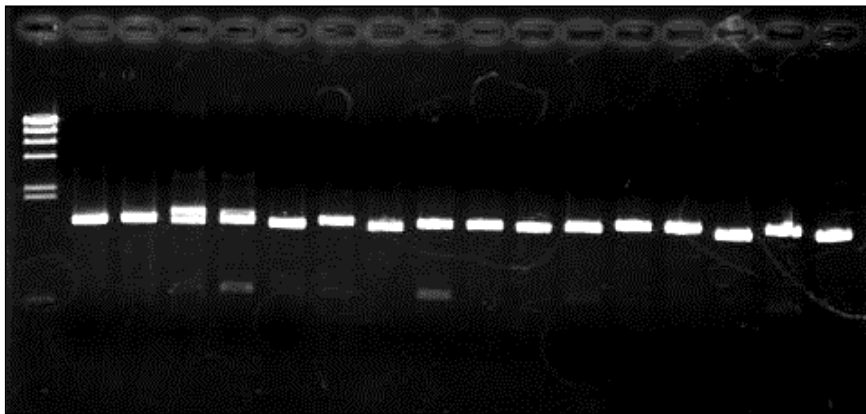


รูปที่ 5 Representative PCR products of the PvMSP3F2 gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. PvMSP3F2 positive samples are in lane 1-3 and 5-13. M is a DNA lambda/*Hind*III marker.

อย่างไรก็ตามพบว่า มี 2 ตัวอย่างที่มีการปะปนกันของอัลลีล PvMSP3F2 ต่างชนิดกันจึงไม่นำมาใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้ ลักษณะตัวอย่างที่มีอัลลีล PvMSP3F2 ต่างชนิดกันปะปนกันจะเห็นได้จากการเกิดผลผลิต PCR สองขนาดในตัวอย่างเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 5 แถวที่ 5

4.8 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3G

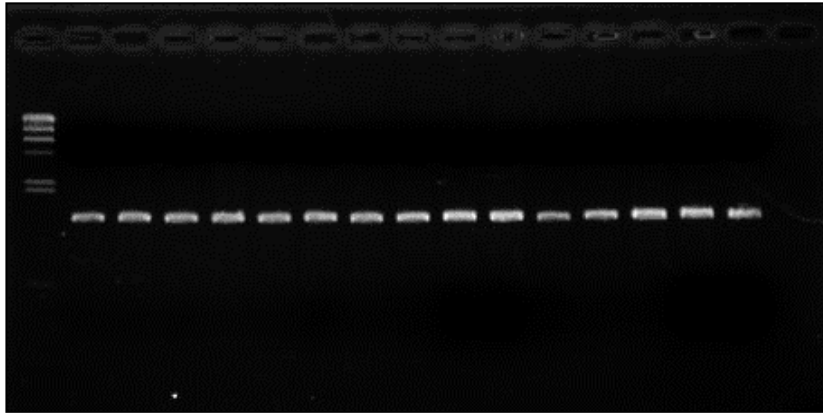
นำผลผลิต PCR ของยีน PvMSP3G มาตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน พบว่าตัวอย่าง DNA ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มปริมาณยีน PvMSP3G มีจำนวน 120 ตัวอย่าง คือ จังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR บวกมีความยาว 1.2-1.4 กิโลเบส ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของยีน PvMSP3G (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 Representative PCR products of the PvMSP3G gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. PvMSP3G positive samples are in lane 2-17, M is a DNA lambda/*Hind*III marker.

4.9 การเพิ่มปริมาณและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3I

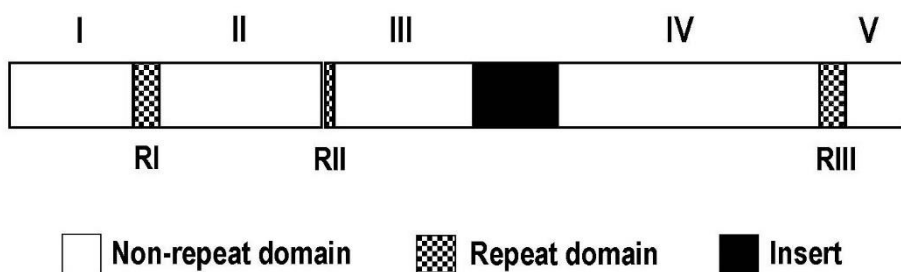
นำตัวอย่าง DNA ที่ตรวจพบเชื้อ *Plasmodium vivax* ที่มีรูปแบบอัลลีลรูปแบบเดียวมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR ในส่วนของยีน PvMSP3I นำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับ DNA มาตรฐาน พบว่าตัวอย่าง DNA ที่ให้ผลบวกในการเพิ่มปริมาณยีน PvMSP3I มีจำนวน 120 ตัวอย่าง คือ จังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และยะลา จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลผลิต PCR บวกมีความยาว 1.1 กิโลเบส ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของยีน PvMSP3I (รูปที่ 7)



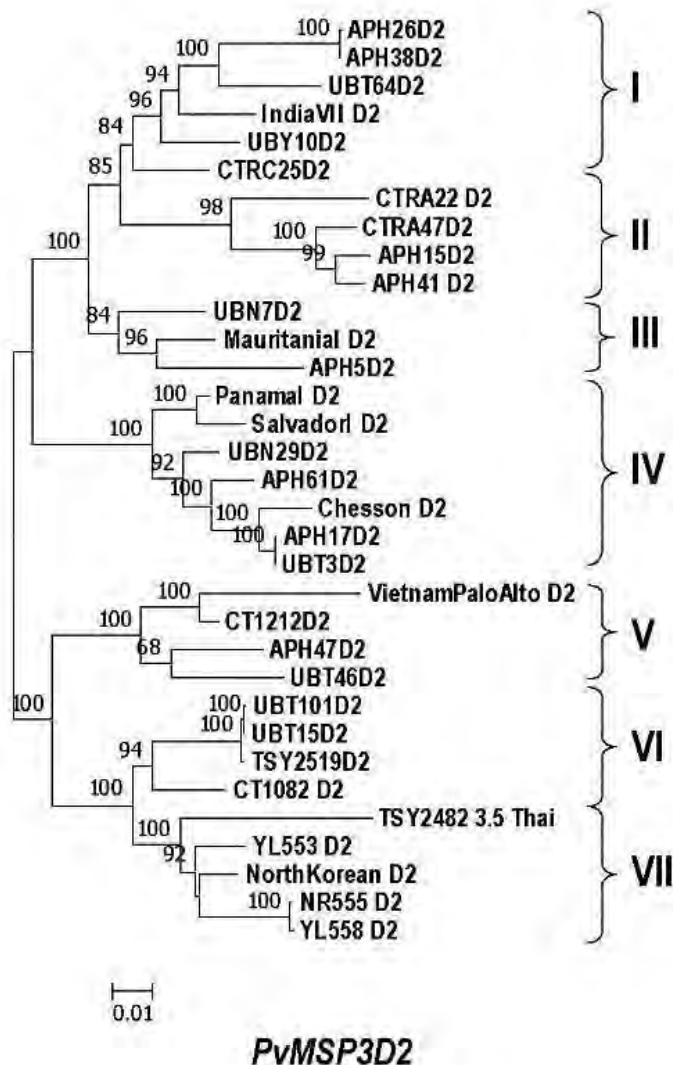
รูปที่ 7 Representative PCR products of the PvMSP3I gene analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. M is a DNA lambda/*Hind*III marker in lane 1, N is a negative control in lane 17 and PvMSP3I positive sample are in lane 2-16.

4.12 โครงสร้างของยีน PvMSP3D2 และความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3D2 (PvMSP3.5) จากตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่างนั้น พบว่าผลการวิเคราะห์ข้อมูลในส่วนโครงสร้างของยีน PvMSP3D2 จากจังหวัดตากจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 1,120-1,150 ตัว พบ new alleles จำนวน 10 haplotypes จังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 1,120-1,159 ตัว พบ new alleles จำนวน 8 haplotypes จังหวัดจันทบุรีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 1,128-1,134 ตัว พบ new alleles จำนวน 5 haplotypes จากยะลา 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโน 1,114 ตัว พบ new alleles จำนวน 3 haplotypes และสามารถแบ่งโครงสร้างภายในยีน PvMSP3D2 เป็น 3 ส่วน คือ 1. Non-repeats , repeat and insert domains (รูปที่ 8 และ 9)



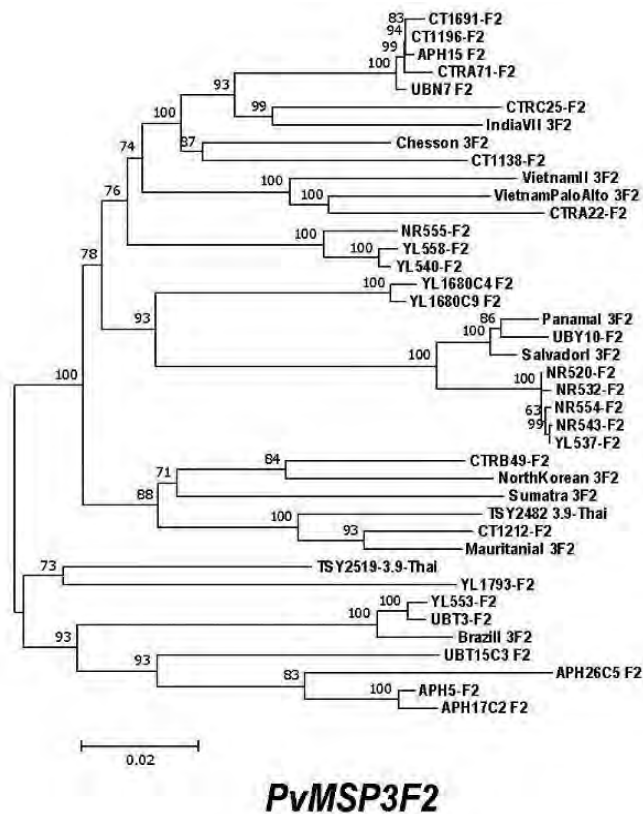
รูปที่ 8 Representative structure of *PvMSP3D2* gene.



รูปที่ 10 Phylogenetic tree of PvMSP3D2 sequences from 33 haplotypes.

4.14 โครงสร้างของยีน PvMSP3E2 และความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3E2 จากตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากจังหวัดตากจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 2,571-2,706 เบส จังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,812-2,718 เบส จังหวัดจันทบุรีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 2,565-2,706 เบส จังหวัดยะลา 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 2,637-2,667 เบส ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมในส่วนของ structure ของยีน PvMSP3E2 ในจังหวัดตากจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 857-902 ตัว พบ new alleles จำนวน 10 haplotypes จังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 604-906 ตัว พบ new alleles จำนวน 7 haplotypes จังหวัดจันทบุรีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 862-902 ตัว พบ new alleles จำนวน 6 haplotypes จากยะลา 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 879-889 ตัว พบ new alleles จำนวน 9 haplotypes และสามารถแบ่งโครงสร้างภายในยีน PvMSP3E2 เป็น 3 ส่วน คือ 1. Non-repeat domain I อยู่ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1-150 เบส 2. Repeat domain with complex inserts อยู่ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 151-1,440 เบส พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดจากการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (substitutions) เกิดการ



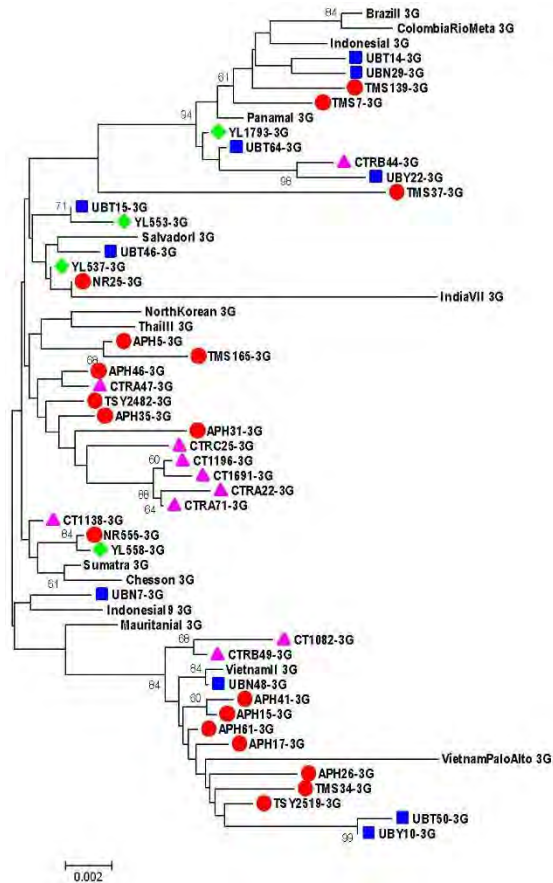
รูปที่ 16 Phylogenetic tree of PvMSP3F2 sequences from 41 haplotypes.

4.18 โครงสร้างของยีน PvMSP3G และความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์รูปแบบ allele ในระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3G จากตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากจังหวัดตากจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,254-1,365 เบส จังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,254-1,425 เบส จังหวัดจันทบุรีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,266-1,389 เบส จังหวัดยะลา 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,254-1,305 เบส ส่วนขนาดของกรดอะมิโนของตัวอย่างจากจังหวัดตากพบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 418-455 aa พบ new alleles จำนวน 16 haplotypes จังหวัดอุบลราชธานีพบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 418-475 aa พบ new alleles จำนวน 11 haplotypes จังหวัดจันทบุรีพบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 422-463 aa พบ new alleles จำนวน 10 haplotypes ยะลาพบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 418-435 aa พบ new alleles จำนวน 5 haplotypes และสามารถแบ่งโครงสร้างภายในยีน



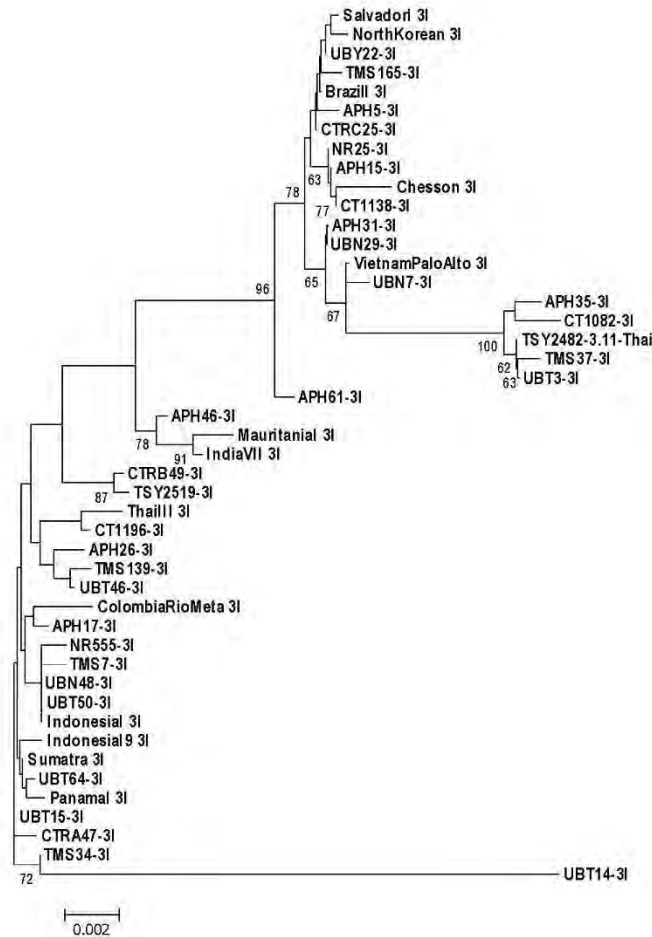
รูปที่ 17 Representative structure of PvMSP3G gene.



รูปที่ 19 Phylogenetic tree of PvMSP3G sequences from 56 haplotypes.

4.20 โครงสร้างของยีน PvMSP3I และความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *P. vivax* ในเขตจังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี และ ยะลา เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์รูปแบบ allele ในระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PvMSP3I ซึ่งใช้ตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ในจังหวัดตากจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,125-1,158 เบส จังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,116-1,149 เบส จังหวัดจันทบุรีจำนวน 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,107-1,149 เบส จังหวัดยะลา 30 ตัวอย่าง พบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,134-1,149 เบส ส่วนขนาดของลำดับกรดอะมิโนจากตัวอย่างของจังหวัดตากอยู่ในช่วง 375-386 ตัว พบ new alleles จำนวน 16 haplotypes จังหวัดอุบลราชธานีพบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 372-383 ตัว พบ new alleles จำนวน 11 haplotypes จังหวัดจันทบุรีพบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 369-383 ตัว พบ new alleles จำนวน 10 haplotypes ยะลาพบขนาดของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 378-383 ตัว พบ new alleles จำนวน 8 haplotypes และสามารถแบ่งโครงสร้างภายในยีน PvMSP3I เป็น 3 ส่วน



รูปที่ 22 Phylogenetic tree of PvMSP3I sequences from 46 haplotypes.

4.26 การวิเคราะห์ค่า haplotype diversity ของกลุ่มยีน PvMSP3

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นถึงค่า haplotype diversity ของยีน PvMSP3-D2, PvMSP3-E2, PvMSP3-F2, PvMSP3-G และ PvMSP3-I ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีค่ามากกว่า 0.87 ในทุกยีนแสดงให้เห็นว่ายีนเหล่านี้มีความหลากหลายสูงมาก

ตารางที่ 5 Distribution of PvMSP3 haplotypes of among *Plasmodium vivax* isolates from diverse endemic areas of Thailand

Gene	Number of Haplotype	Haplotype diversity (Hd)	Nucleotide diversity (Pi)
3D2	33	1.000 ± 0.011	0.09661 ± 0.00365
3E2	38	0.986 ± 0.014	0.07923 ± 0.00334
3F2	41	0.990 ± 0.011	0.11251 ± 0.00455
3G	56	0.986 ± 0.011	0.01169 ± 0.00098
3I	46	0.943 ± 0.021	0.01001 ± 0.00094

ในจำนวน haplotype ของ PvMSP3D2 ที่พบทั้งหมด 33 แบบ เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMSP3D2 พบความหลากหลายของยีนสูงและสามารถวิเคราะห์ค่า haplotype diversity คือ 1.000 ในจำนวน

haplotype ของ PvMSP3E2 ที่พบทั้งหมด 38 แบบ เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMSP3E2 พบความหลากหลายของยีนและสามารถวิเคราะห์ค่า haplotype diversity คือ 0.986 ในจำนวน haplotype ของ PvMSP3F2 ที่พบทั้งหมด 41 แบบ เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMSP3F2 พบความหลากหลายของยีนและสามารถวิเคราะห์ค่า haplotype diversity คือ 0.990 ในจำนวน haplotype ของ PvMSP3G ที่พบทั้งหมด 56 แบบ เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMSP3G พบความหลากหลายของยีนและสามารถวิเคราะห์ค่า haplotype diversity คือ 0.986 ในจำนวน haplotype ของ PvMSP3I ที่พบทั้งหมด 46 แบบ เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน PvMSP3I พบความหลากหลายของยีนและสามารถวิเคราะห์ค่า haplotype diversity คือ 0.943 พบว่าทั้งยีน PvMSP3D2 และ PvMSP3F2 มีค่า haplotype diversity สูงเมื่อเปรียบเทียบกับยีนอื่นๆ ของ PvMSP3 ส่วนความหลากหลายของยีน PvMSP3E2, PvMSP3G และ PvMSP3I มีค่า haplotype diversity ที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นถึงชนิดและความถี่ของ haplotype ที่พบในแต่ละกลุ่มยีน PvMSP3 ดังเช่นในยีน PvMSP3G พบ haplotype ที่ 56 มากที่สุดร้อยละ 12.77

4.27 การทดสอบความเบี่ยงเบนจากความเป็นกลางทางวิวัฒนาการ (Tests for departure from neutral evolution)

จากตารางที่ 5 การวิเคราะห์อัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในลำดับเบสของยีน *PvMSP3-D2*, *PvMSP3-E2*, *PvMSP3-F2*, *PvMSP3-G* และ *PvMSP3-I* จากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามีค่า synonymous nucleotide substitutions per synonymous site (d_s) สูงกว่าค่า nonsynonymous nucleotide substitutions per nonsynonymous site (d_n) อย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มยีนที่ศึกษา ($p < 0.05$) ยกเว้นตัวอย่างเชื้อของยีน PvMSP3-H แสดงให้เห็นว่าในบริเวณ N-terminal และ C-terminal ของกลุ่มยีน PvMSP3 family มีอิทธิพลของ purifying selection หรือ negative selection เนื่องจากบริเวณเหล่านี้มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมาลาเรียเนื่องจากมี functional constraint ดังนั้นการแทนที่ของ nucleotide ที่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่จะมีผลต่อหน้าที่ของโปรตีนนี้จึงถูกยับยั้งเพื่อการอยู่รอดของเชื้อมาลาเรีย

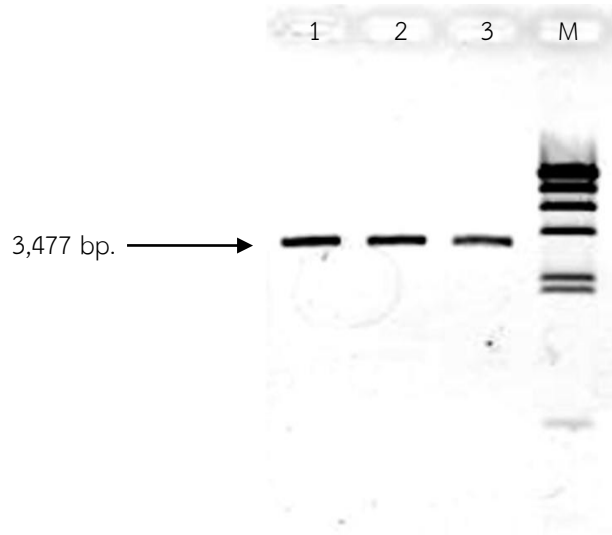
4.28 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3F2 จากตัวอย่าง CT1691 โดยวิธี PCR

ทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสที่เหมาะสมในการปรับเปลี่ยนเพื่อให้เป็นตำแหน่งตัดจำเพาะของ restriction enzyme ที่เหมาะสมเพื่อให้ง่ายในขั้นตอนการโคลนเข้าสู่ plasmid vector (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 List of primer for protein expression of PvMSP3 family.

No	Gene	fragment	Primers	Sequence (5'→ 3')
1	3F2	CT1691-full	PvMSP3F2-F0P	CCCCCATATGATGAAGTCCAATTTGAAAAGTACCCTTTAC
			PvMSP3F2-F0P	CCCCTCGAGTTAACATGCTAAAAATGAACTGATTCAGGT

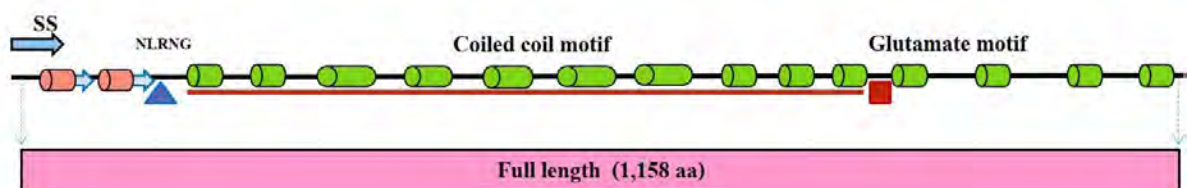
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3F2 จากตัวอย่าง CT1691 โดยวิธี PCR จากการใช้ expression primers (ตารางที่ 6) จากการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ Agarose gel 1% และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาด พบว่าผลผลิตของตัวอย่าง CT1691 มีขนาดประมาณ 3,477 bp ซึ่งเป็นขนาดที่อยู่ในช่วงต้องการศึกษา (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 Representative 1% agarose gel electrophoresis showing specific amplifications from PvMSP3F2 PCR. Lane M, 1 kb DNA ladder Marker; Lanes 1-3, CT1691. Molecular size in base pairs is show on the right of the gel.

4.35 ผลการผลิตโปรตีนจากบริเวณ Full fragment จากตัวอย่าง CT1691 ของยีน PvMSP3F2

ผลผลิต PCR จากบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3F2 (รูปที่ 23) สามารถเชื่อมเข้าสู่ pET19b vector ด้วยตำแหน่งตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xho*I จากนั้นทำการยืนยันความถูกต้องด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนตัวที่ 25-1,158 เมื่อแปลรหัส CT1691 เป็นโปรตีนจะได้กรดอะมิโนทั้งหมด 1,158 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 123.78 kDa (รูปที่ 24-25)



รูปที่ 24 Structure of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3F2 (PvMSP3.9)

>CT1691-3F2

MKSNLKSTLYIIIFLYWYVHIKDEQKWVTVNAETPNLRNGWSIKNDALHNGENNLNRKYADYLNDDTVEGNSKMDAIEEGLSGQS
EDAIIVKAQQEDGGVSAQQEFAADSQSEDEKKAAKAAEEAQEFKQAKAEARQAAQAAEDAEKAAKAAQAAQDTEKAAQAAQSA
QDAEKTAKEITENA EKINEAVKQATYAKEEAQKASDEAKTAKEKAAAATKAAEQAAAAAAAKTTEEAKTNKQQAAMEQKGLAEE
ALKRAKEAATNAQQAKENAEIALERTKAEVSKELAEKEVLAKEAQKEAEAAKNKAKAASDKVTSENEAVNKATLASKRADEA
LGRAQFYATIAEKAAGEAQKAETVQTAQVASKKAKDAETSANYERI IAE LAEVAKAEAEKNEAEKELKEANKADEEAKAVGA
AIGADKAKEKAKIEAEKAKKQLDEAKKLAKEVSSAEYNNVEEKSVSEAKKVEIQKAVTAAKTAKELAVKAAKAVATHILNAEK
AKTEAQQA KKDALKAKAEAEKYASDSKAEKAKEAATKAATAADTATDKATKAEKESADAVTEANVNPDEIPDKKEEVKKKATQ
AAAFSKEAVKAKNEALIEAEVAKAEAAKEEAKKAQIATDEAKAEAEKAAQTVQLSEVTEAKGKAENLAIQAKYADSAAQGA
EVNDSADRI RNEAKTEKTEETITKIEELKVKAEENASKAAKAAKVVQTEAE LAAAVAKAAVAKDEAKKAQDAADDAKKKADEAA
KPVESKAKGEAASAAAKAKENATAAASAA NEVLLKAKEAE EEVKNNWDKEEKEDITSKVNHVKGKTSQSIDAAEGAKRAKEV
AELALKVVS AEVENDKAKKAVTTAEAAKEEAKKAVQSAEKSKEAE SADEDADIKEEEEKVKNAQAEVAENANAAQALNIA
EEELKKAQEADNEEKLSAKTKALAAVEEAVKNGQAAEAAANVATDKAKKATQSAERAQKAAEESALKKKLKVLEIVKKYSKE
GYNTVDNEEHVLEVEEQASEDKEEGEEGEEAEDSASSDVEIDDDNEEEEEEEDEEETE TNKTEEDIANTEGKSGDNPPHS
DTAPQEQKQSVKPSQEQDKPLSDSNAQALLEENYKNVANFKKMADGLTKNIISTIDGNTDVLDTLKDFAEDLNQFIFSM

รูปที่ 25 Amino acids sequence of PvMSP3F2 from CT1691 isolate.

4.42 การตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ recombinant protein ในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย

จากนั้น 6X His-tag fusion protein จะถูกผลิตใน *E. coli* ในสายพันธุ์ BL21 โดยมี IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ซึ่งโปรตีนที่ได้จะมีขนาดดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 SDS-PAGE analysis of PvMSP3F2-CT1691 (123.78 kDa) full fragment purified protein. Staining with coomassie brilliant blue R-250. M; Dual color protein standard marker.

4.45 การตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ PvMSP3F2 Full fragment recombinant protein จาก CT1691 Isolates ในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ IgG ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* จากจังหวัดตาก จำนวน 143 ราย อุบลราชธานี จำนวน 132 ราย และยะลา จำนวน 8 ราย รวม 283 ราย กลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตาก จำนวน 133 ราย อุบลราชธานีจำนวน 77 ราย รวม 210 ราย นอกจากนี้ยังทำการศึกษากลุ่มคนปกติ ในกรุงเทพมหานคร จำนวน 61 ราย โดยวิธี ELISA จากผลการวิเคราะห์ที่พบ positive selection ในบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3F2 จึงเป็นไปได้ที่บริเวณดังกล่าวอาจมี immunodominant epitopes ดังนั้นจึงได้

ทำการผลิต recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CT1691 ซึ่งจากการวิเคราะห์ใน 10% SDS polyacrylamide electrophoresis พบว่า recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CT1691 มีขนาด 123.78 kDa

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมในเขตจังหวัดตาก อุบลราชธานี กรุงเทพมหานคร และยะลา เพื่อการวิเคราะห์การตอบสนองของแอนติบอดีในผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เมื่อนำ purified proteins เหล่านี้มาทดสอบกับซีรัมโดยวิธี ELISA พบว่าซีรัมในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* สามารถตรวจพบ IgG ต่อ CT full fragment ของโปรตีน PvMSP3F2 จากจังหวัดตาก จำนวน 143 รายให้ผลบวกต่อ CT full fragment จำนวน 61 รายหรือร้อยละ 42.6 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 23 ราย และตรวจพบซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตากจำนวน 133 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 37 รายหรือร้อยละ 27.8

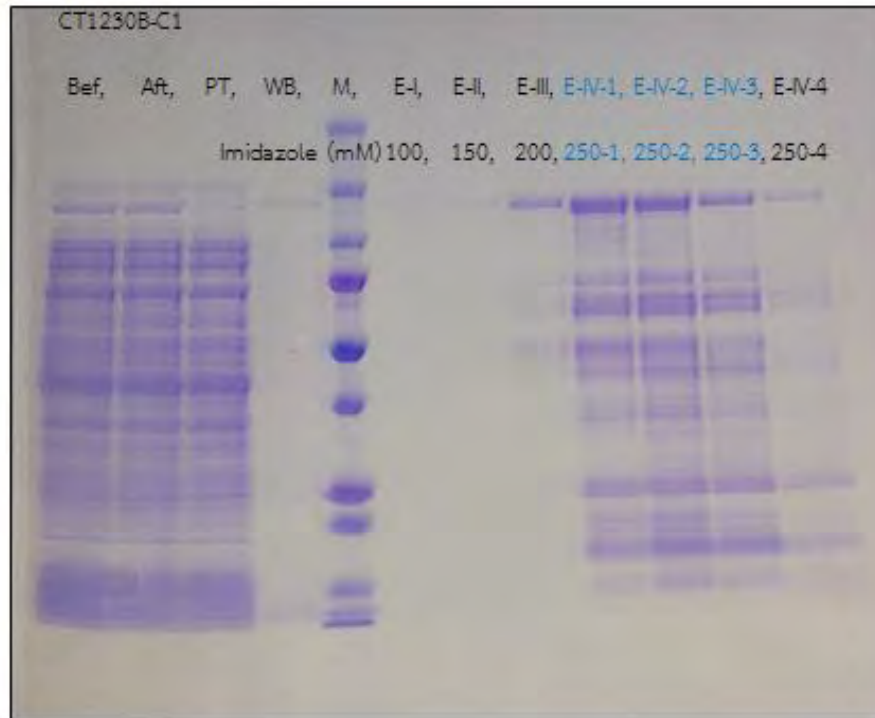
จากจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 312 รายให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 142 รายหรือร้อยละ 45.51 ทั้งนี้ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 39 ราย และเมื่อนำซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จำนวน 77 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีดังกล่าวในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 30 รายหรือร้อยละ 39

และทำการศึกษาในจังหวัดยะลา ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีจำนวน 8 รายที่ให้ผลบวกต่อ CT1691 full fragment จำนวน 5 รายหรือร้อยละ 62.5 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ CT1691 full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 2 รายหรือร้อยละ 25

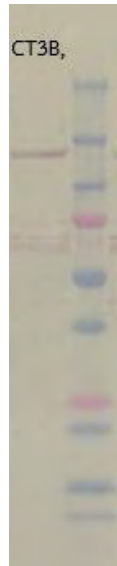
รวมทั้งซีรัมของกลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานครจำนวน 61 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 7 รายหรือร้อยละ 11.5

4.46 การตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ PvMSP3B recombinant protein จาก Full fragment CT1230 isolate ในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ IgG ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* จากจังหวัดตาก จำนวน 143 ราย อุบลราชธานี จำนวน 132 ราย และยะลา จำนวน 8 ราย รวม 283 ราย กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตาก จำนวน 133 ราย อุบลราชธานีจำนวน 77 ราย รวม 210 ราย นอกจากนี้ยังทำการศึกษากลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานคร จำนวน 61 ราย โดยวิธี ELISA จากผลการวิเคราะห์ที่พบ positive selection ในบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3B จึงเป็นไปได้ที่บริเวณดังกล่าวอาจมี immunodominant epitopes ดังนั้นจึงได้ทำการผลิต recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CT1230 Isolate ซึ่งพบมากที่สุด ซึ่งจากการวิเคราะห์ใน 10% SDS polyacrylamide electrophoresis และ Western blot พบว่า recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CT1230 มีขนาด 95.30 kDa (รูปที่ 27)



រូបទី 27 SDS-PAGE analysis of PvMSP3B-CT1230 full fragment purified protein. Lane 1; Cell lysate before pass column, Lane 2; Cell lysate after pass column, Lane 3; Cell lysate, Lane 4; First wash, M; *Dual* color protein standard marker. Lane 6; Eluate (100 mM imidazole), Lane 7; Eluate (150 mM imidazole), Lane 8; Eluate (200 mM imidazole), Lane 9; Eluate (250-1 mM imidazole), Lane 10; Eluate (250-2 mM imidazole), Lane 11; Eluate (250-3 mM imidazole), Lane 12; Eluate (250-4 mM imidazole).



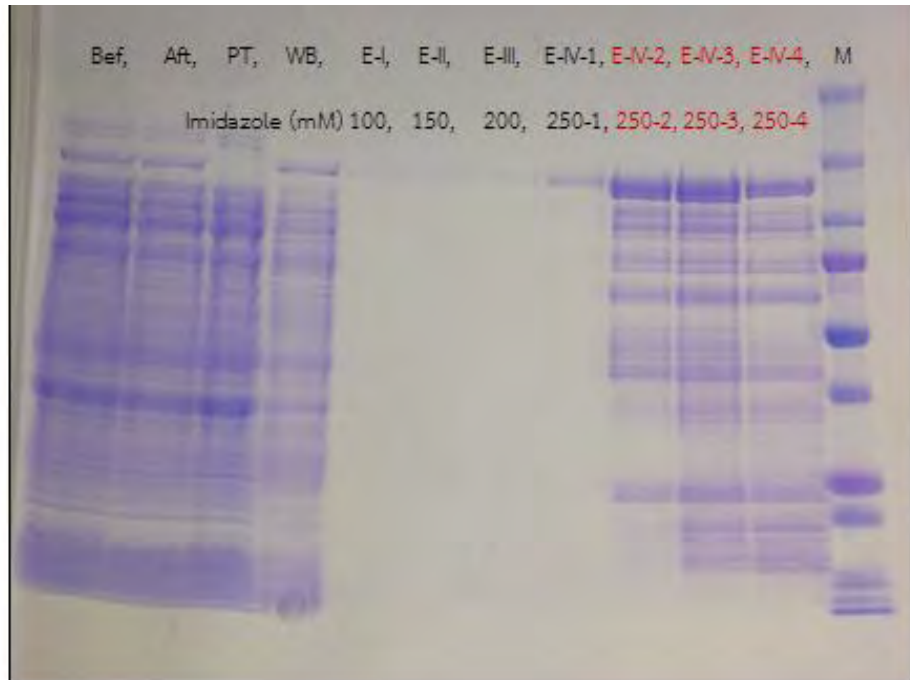
รูปที่ 28 SDS-PAGE analysis of His-tag-recombinant CT1230-Full-PvMSP3B (95.30 kDa) purified protein. Western blot used 6X-His tag antibody (primary antibody) and His-tag Rabbit antibody (secondary antibody)

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมในเขตจังหวัดตาก อุบลราชธานี กรุงเทพมหานคร และยะลา เพื่อการวิเคราะห์การตอบสนองของแอนติบอดีในผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เมื่อนำ purified proteins เหล่านี้มาทดสอบกับซีรัมโดยวิธี ELISA พบว่าซีรัมในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* สามารถตรวจพบ IgG ต่อ CT1230 full fragment ของโปรตีน PvMSP3B จากจังหวัดตาก จำนวน 143 รายให้ผลบวกต่อ CT full fragment จำนวน 52 รายหรือร้อยละ 36.36 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 33 ราย และตรวจพบซีรัมกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตากจำนวน 133 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 42 รายหรือร้อยละ 31.57 จากจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 312 รายให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 121 รายหรือร้อยละ 38.78 ทั้งนี้ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 57 ราย และเมื่อนำซีรัมกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จำนวน 77 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีดังกล่าวในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 24 รายหรือร้อยละ 31.16 และทำการศึกษาในจังหวัดยะลา ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีจำนวน 8 รายที่ให้ผลบวกต่อ CT1230 full fragment จำนวน 2 รายหรือร้อยละ 25 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ CT1230 full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 1 รายหรือร้อยละ 12.5 รวมทั้งซีรัมของกลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานคร จำนวน 61 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 4 รายหรือร้อยละ 6.55

4.47 การตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ PvMSP3D1 recombinant protein จาก Full fragment YL558 isolate ในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ IgG ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* จากจังหวัดตาก จำนวน 143 ราย อุบลราชธานี จำนวน 132 ราย และยะลา จำนวน 8 ราย รวม 283 ราย กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตาก จำนวน 133 ราย อุบลราชธานีจำนวน 77 ราย รวม 210 ราย นอกจากนี้ยังทำการศึกษากลุ่มคนปกติ

ในกรุงเทพมหานคร จำนวน 61 ราย โดยวิธี ELISA จากผลการวิเคราะห์ที่พบ positive selection ในบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3D1 จึงเป็นไปได้ที่บริเวณดังกล่าวอาจมี immunodominant epitopes ดังนั้นจึงได้ทำการผลิต recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก YL558 Isolate ซึ่งพบมากที่สุดรวมทั้งการผลิต recombinant protein จาก YL Isolate ในส่วนของ Full fragment ซึ่งจากการวิเคราะห์ใน 10% SDS polyacrylamide electrophoresis และ Western blot พบว่า recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก YL558 มีขนาด 118.42 kDa (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 SDS-PAGE analysis of PvMSP3D1-YL558 full fragment purified protein. Lane 1; Cell lysate before pass column, Lane 2; Cell lysate after pass column, Lane 3; Cell lysate, Lane 4; First wash, Lane 5; Eluate (100 mM imidazole), Lane 6; Eluate (150 mM imidazole), Lane 7; Eluate (200 mM imidazole), Lane 8; Eluate (250-1 mM imidazole), Lane 9; Eluate (250-2 mM imidazole), Lane 10; Eluate (250-3 mM imidazole), Lane 11; Eluate (250-4 mM imidazole), M; Dual color protein standard marker.

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมในเขตจังหวัดตาก อุบลราชธานี กรุงเทพมหานคร และยะลา เพื่อการวิเคราะห์การตอบสนองของแอนติบอดีในผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เมื่อนำ purified proteins เหล่านี้มาทดสอบกับซีรัมโดยวิธี ELISA พบว่าซีรัมในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* สามารถตรวจพบ IgG ต่อ YL558 full fragment ของโปรตีน PvMSP3D1 จากจังหวัดตาก จำนวน 143 รายให้ผลบวกต่อ YL full fragment จำนวน 60 รายหรือร้อยละ 41.95 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 27 ราย และตรวจพบซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตากจำนวน 133 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 69 รายหรือร้อยละ 51.87 จากจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 312 รายให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 165 รายหรือร้อยละ 52.88 ทั้งนี้ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 63 ราย และเมื่อนำซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จำนวน 77 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีดังกล่าวในผู้ที่

ให้ผลบวกจำนวน 40 รายหรือร้อยละ 51.94 และทำการศึกษาในจังหวัดยะลา ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีจำนวน 8 รายที่ให้ผลบวกต่อ YL full fragment จำนวน 3 รายหรือร้อยละ 37.5 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ YL558 full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 1 รายหรือร้อยละ 12.5 รวมทั้งซีรัมของกลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานครจำนวน 61 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 4 รายหรือร้อยละ 6.55

4.47 การตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ PvMSP3F1 recombinant protein จาก CTRC25 isolate Full fragment ในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ IgG ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* จากจังหวัดตาก จำนวน 143 ราย อุบลราชธานี จำนวน 132 ราย และยะลา จำนวน 8 ราย รวม 283 ราย กลุ่มผู้ที่ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตาก จำนวน 133 ราย อุบลราชธานีจำนวน 77 ราย รวม 210 ราย นอกจากนี้ยังทำการศึกษากลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานคร จำนวน 61 ราย โดยวิธี ELISA จากผลการวิเคราะห์ที่พบ positive selection ในบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3F1 จึงเป็นไปได้ที่บริเวณดังกล่าวอาจมี immunodominant epitopes ดังนั้นจึงได้ทำการผลิต recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CTRC25 Isolate ซึ่งพบมากที่สุดรวมทั้งการผลิต recombinant protein จาก CTRC25 Isolate ในส่วนของ Full fragment ซึ่งจากการวิเคราะห์ใน 10% SDS polyacrylamide electrophoresis และ Western blot พบว่า recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CTRC25 มีขนาด 147.63 kDa (รูปที่ 30)

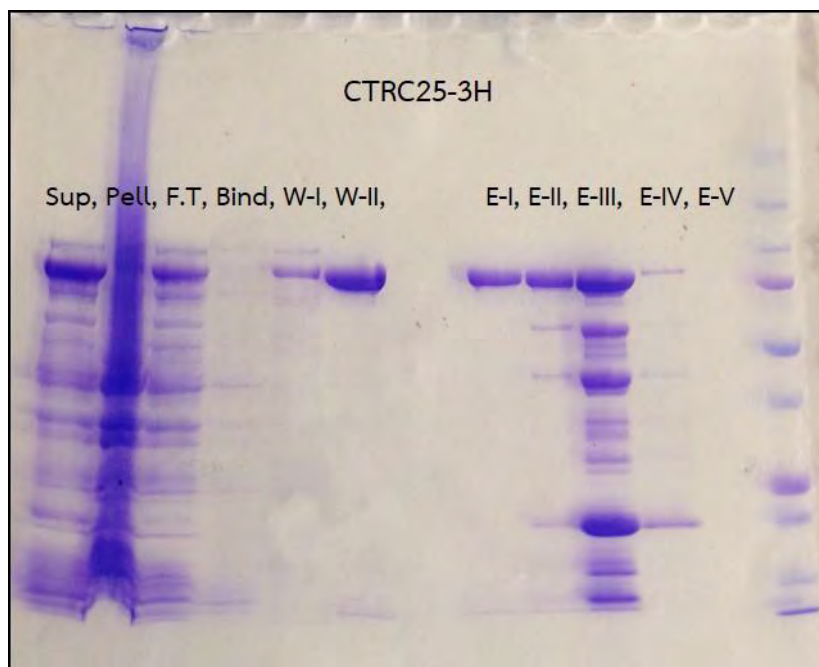


รูปที่ 30 SDS-PAGE analysis of PvMSP3F1-CTRC25 full fragment purified protein (147.63 kDa) Staining with coomassie brillian blue R-250. Lane 1; Cell lysate, Lane 2; First wash, Lane 3; Eluate (100 mM imidazole), Lane 4; Eluate (150 mM imidazole), Lane 5; Eluate (200 mM imidazole), Lane 6; Eluate (250 mM imidazole), Lane 7; Eluate (250-1 mM imidazole), Lane 8; Eluate (250-2 mM imidazole), Lane 9; Eluate (250-3 mM imidazole), M; *Dual* color protein standard marker.

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมในเขตจังหวัดตาก อุบลราชธานี กรุงเทพมหานคร และยะลา เพื่อการวิเคราะห์การตอบสนองของแอนติบอดีในผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เมื่อนำ purified proteins เหล่านี้มาทดสอบกับซีรัมโดยวิธี ELISA พบว่าซีรัมในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* สามารถตรวจพบ IgG ต่อ CTRC25 full fragment ของโปรตีน PvMSP3F1 จากจังหวัดตาก จำนวน 143 รายให้ผลบวกต่อ CTRC25 full fragment จำนวน 65 รายหรือร้อยละ 45.45 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 27 ราย และตรวจพบซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตากจำนวน 133 รายพบว่า ปริมาณแอนติบอดีในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 70 รายหรือร้อยละ 52.63 จากจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 312 รายให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 166 รายหรือร้อยละ 53.20 ทั้งนี้ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 64 ราย และเมื่อนำซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จำนวน 77 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีดังกล่าวในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 48 รายหรือร้อยละ 62.33 และทำการศึกษาในจังหวัดยะลา ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีจำนวน 8 รายที่ให้ผลบวกต่อ CTRC25 full fragment จำนวน 3 รายหรือร้อยละ 37.5 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ CTRC25 full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 2 รายหรือร้อยละ 25 รวมทั้งซีรัมของกลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานครจำนวน 61 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 3 รายหรือร้อยละ 4.92

4.47 การตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ PvMSP3H recombinant protein จาก CTRC25 isolate Full fragment ในผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อ IgG ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* จากจังหวัดตาก จำนวน 143 ราย อุบลราชธานี จำนวน 132 ราย และยะลา จำนวน 8 ราย รวม 283 ราย กลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตาก จำนวน 133 ราย อุบลราชธานีจำนวน 77 ราย รวม 210 ราย นอกจากนี้ยังทำการศึกษากลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานคร จำนวน 61 ราย โดยวิธี ELISA จากผลการวิเคราะห์ที่พบ positive selection ในบริเวณ Full fragment ของยีน PvMSP3H จึงเป็นไปได้ที่บริเวณดังกล่าวอาจมี immunodominant epitopes ดังนั้นจึงได้ทำการผลิต recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CTRC25 Isolate ซึ่งพบมากที่สุดรวมทั้งการผลิต recombinant protein จาก CTRC25 Isolate ในส่วนของ Full fragment ซึ่งจากการวิเคราะห์ใน 10% SDS polyacrylamide electrophoresis และ Western blot พบว่า recombinant protein ในส่วนของ Full fragment จาก CTRC25 ของยีน PvMSP3H มีขนาด 91.80 kDa (รูปที่ 31)



รูปที่ 31 SDS-PAGE analysis of PvMSP3H-CTRC25 (91.80 kDa) full fragment purified protein. Lane 1; Supernatant of Cell lysate, Lane 2; Pellet of Cell lysate, Lane 3; Cell lysate, Lane 4; Binding buffer, Lane 5; Wash I, Lane 6; Wash II, Lane 8; Eluate-I, Lane 9; Eluate-II, Lane 10; Eluate-III, Lane 11; Eluate-IV, Lane 12; Eluate-V, M; *Dual* color protein standard marker.

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ซีรัมในเขตจังหวัดตาก อุบลราชธานี กรุงเทพมหานคร และยะลา เพื่อการวิเคราะห์การตอบสนองของแอนติบอดีในผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* เมื่อนำ purified proteins เหล่านี้มาทดสอบกับซีรัมโดยวิธี ELISA พบว่าซีรัมในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* สามารถตรวจพบ IgG ต่อ CTRC25 full fragment ของโปรตีน PvMSP3H จากจังหวัดตาก จำนวน 143 รายให้ผลบวกต่อ CTRC25 full fragment จำนวน 55 รายหรือร้อยละ 38.46 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 21 ราย และตรวจพบซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จากจังหวัดตากจำนวน 133 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 68 รายหรือร้อยละ 51.12 จากจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 312 รายให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 174 รายหรือร้อยละ 55.76 ทั้งนี้ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 67 ราย และเมื่อนำซีรัมกลุ่มผู้ติดเชื้อและหายจากโรคแล้ว จำนวน 77 รายพบว่าปริมาณแอนติบอดีดังกล่าวในผู้ที่ให้ผลบวกจำนวน 43 รายหรือร้อยละ 55.84 และทำการศึกษาในจังหวัดยะลา ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ *P. vivax* ผู้ป่วยมีระดับแอนติบอดีจำนวน 8 รายที่ให้ผลบวกต่อ CTRC25 full fragment จำนวน 3 รายหรือร้อยละ 37.5 พบผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีต่อ CTRC25 full fragment เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 S.D. จำนวน 1 รายหรือร้อยละ 12.5 รวมทั้งซีรัมของกลุ่มคนปกติในกรุงเทพมหานครจำนวน 61 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อ full fragment จำนวน 6 รายหรือร้อยละ 9.83

5. วิจารณ์ผลการวิจัย

ประชากรของเชื้อมาลาเรียในปัจจุบันได้รับอิทธิพลของการคัดเลือกพันธุ์จากหลายปัจจัย โดยเฉพาะมาตรการต่างๆ ที่นำออกมาใช้เพื่อควบคุมและกำจัดโรคมาลาเรีย ทำให้หลายๆพื้นที่ในเขตลุ่มแม่น้ำโขง มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้มีผลต่อการจำกัดขนาดประชากรของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้ข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนที่มีศักยภาพในการใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *Plasmodium vivax* ยังมีอยู่อย่างจำกัด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในที่ควบคุมการสร้าง MSP3 ของ *P. vivax* พบว่าประกอบด้วยยีน 12 ชนิดเรียงตัวต่อเนื่องกันบนโครโมโซมแท่งที่ 10 ดังนั้น MSP3 ของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้จึงจัดเป็นกลุ่มโปรตีนชนิดที่ 3 บนผิวเมอร์โรซอइट (PvMSP3 family) ทั้งนี้มีโปรตีนเพียง 2 ชนิดในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษาถึงความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนจากตัวอย่างเชื้อในธรรมชาติ ได้แก่ PvMSP3H และ PvMSP3C ส่วน PvMSP3 อื่น ๆ ยังไม่มีการศึกษาในลักษณะเดียวกันอย่างชัดเจน ในขณะที่ข้อมูลเกี่ยวกับแอนติบอดีต่อกลุ่มโปรตีนชนิดนี้มีจำกัดเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับ PvMSP3H (Bitencourt et al 2013) ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายในยีนกลุ่มนี้รวมถึงการศึกษาแอนติบอดีต่อกลุ่มโปรตีนดังกล่าว ในรายงานครั้งนี้ได้แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PvMSP3-D2*, *PvMSP3-E2*, *PvMSP3-F2*, *PvMSP3-G* และ *PvMSP3-I* และผลการศึกษาอุบัติการณ์ของการตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgG ต่อโปรตีนทั้ง 5 ชนิด คือ 3B, 3D1, 3F1, 3F2 และ 3H จะเห็นได้ว่าผลการศึกษาทำให้สามารถขยายขอบเขตองค์ความรู้ที่จะใช้กลุ่มยีน PvMSP3 เป็นติดตามทางพันธุกรรมที่สำคัญสำหรับการศึกษาประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ในอดีตมีการใช้เทคนิค PCR-RFLP สำหรับยีน PvMSP3C เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรของเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ (Yang et al 2006) แต่ในการศึกษานี้ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีนกลุ่ม PvMSP3 จำนวน 5 ยีน ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการใช้เป็นตัวติดตามการศึกษา ลักษณะประชากรของเชื้อ *Plasmodium vivax* ให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการใช้วิธี PCR-RFLP จากข้อมูลของยีนเพียงชนิดเดียวนั้นมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมประชากร (Rice et al 2013) มาตรการในการควบคุมโรคมาลาเรียในบริเวณจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีอาณาเขตติดต่อกับประเทศเมียนมาร์นั้นมีผลสืบหน้าไปอย่างช้า ๆ อันเนื่องมาจากมีการเคลื่อนย้ายไปมาของประชากรตลอดเวลาโดยเฉพาะการเดินทางของแรงงานอพยพทำให้ยากต่อการควบคุมการส่งผ่านของเชื้อมาลาเรีย (Konchom et al 2003) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ในการศึกษานี้พบว่าในทุกพื้นที่ที่สำรวจมีความหลากหลายของประชากรค่อนข้างสูงยกเว้นประชากรเชื้อ *Plasmodium vivax* จากภาคใต้ของประเทศไทยที่มีความหลากหลายต่ำมีรูปแบบของอัลลีลเพียง 2 – 3 รูปแบบเท่านั้นจะเห็นได้จากค่า haplotype diversity นั้นมีค่ามากกว่า 0.9 ในทุกยีนที่ทำการศึกษา ซึ่งผลการศึกษาที่มีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์ยีน PvMSP3H จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Mascorro et al 2005 and Cui et al 2003) และการศึกษาในยีนชนิดอื่น ๆ เช่น PvMSP1 และ PvAMA1 (Jongwutives et al 2010)

แม้ว่าการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียในภูมิภาคนี้รวมทั้งประเทศไทยจะมีอยู่อย่างจำกัด แต่การศึกษา genotyping จากการใช้ยีน PvMSP3C และ PvMSP3H เป็นตัวติดตามพบว่ามากกว่าร้อยละ 30 ของผู้ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* มีการติดเชื้อผสมของมาลาเรียต่างสายพันธุ์กัน (Cui et al 2003) ซึ่งลักษณะนี้ก็ตรวจพบในการศึกษานี้เช่นกัน การติดเชื้อมาลาเรียต่างสายพันธุ์กันอาจจะมีผลเนื่องมาจากเชื้อมาลาเรียชนิดนี้มีระยะ hypnozoite ที่แฝงตัวอยู่ในตับ และการติดเชื้อใหม่ทำให้ออกาสที่จะมีการผสมปนกันของมาลาเรียต่างสายพันธุ์กันได้สูง (Imwong et al 2007 and Chen et al 2007) หรืออาจเกิดจากถูกยุงที่มีเชื้อต่างสายพันธุ์กันกัดปล่อยเชื้อเข้าสู่ร่างกาย (Imwong et al 2011) หรือจากการถูกยุงที่มีเชื้อต่างสายพันธุ์และต่างตัวกันกัดซึ่งสาเหตุเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการเพิ่มการติดเชื้อผสมต่างสายพันธุ์กันให้มากยิ่งขึ้น ซึ่งการติดเชื้อผสมต่างสายพันธุ์กันนั้นยังเพิ่มโอกาสการแลกเปลี่ยนอัลลีลภายในยีนชนิดเดียวกันมากยิ่งขึ้นซึ่งมีผลต่อการเกิดอัลลีลรูปแบบใหม่ตามมามากขึ้น

เช่นกันทำให้มีการคงอยู่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างต่อเนื่องในกลุ่มยีน PvMSP3 ดังที่พบในการศึกษานี้ ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับพื้นที่การแพร่กระจายของเชื้อ (Cole-Tobian et al 2005 and Gray et al 2013) ภาวะความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่พบในกลุ่มยีน PvMSP3 จากการศึกษานี้อาจแสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อสูงในพื้นที่ที่สำรวจยกเว้นทางภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากในพื้นที่นี้มีมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียมาตั้งแต่ต้นปี 1990 ทำให้มีผลต่อการลดอัตราการป่วยด้วยโรคไข้มาลาเรียต่อประชากรพันคนอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีผลต่อการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม นอกจากนี้ การศึกษา genotyping โดยใช้ยีนเป้าหมายที่สร้างโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์หลายชนิดพบว่า haplotype diversity ของเชื้อมาลาเรียจากภาคใต้ของประเทศไทยมีอัตราการลดลงอย่างชัดเจน (Jongwutiwes et al 2010) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium falciparum* เช่นกันหลังจากที่ใช้ความพยายามควบคุมการแพร่กระจายของเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ (Anthony et al 2007, Griffing et al 2011 and Khaireh et al 2013) อย่างไรก็ตามการควบคุมประชากร *Plasmodium vivax* นั้นไม่ได้ง่าย เช่นที่หมู่เกาะโซโลมอนมีมาตรการควบคุมโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพจนมาลาเรียเกือบจะกำจัดหมดไปจากเกาะแห่งนี้ ซึ่งมีผลทำให้ความหลากหลายของประชากรเชื้อ *Plasmodium falciparum* ลดลงอย่างมาก ในขณะที่ประชากร *Plasmodium vivax* ยังคงความหลากหลายจากการศึกษาโดย microsatellite genotyping (Gray et al 2013) ผลการวิเคราะห์อัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในลำดับเบสของยีน PvMSP3-D2, PvMSP3-E2, PvMSP3-F2, PvMSP3-G และ PvMSP3-I จากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามีค่า synonymous nucleotide substitutions per synonymous site (d_s) สูงกว่าค่า nonsynonymous nucleotide substitutions per nonsynonymous site (d_n) อย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มยีนที่ศึกษา ($p < 0.05$) ยกเว้นตัวอย่างเชื้อของยีน PvMSP3-G และ PvMSP3I แสดงให้เห็นว่าในบริเวณ N-terminal และ C-terminal ของกลุ่มยีน PvMSP3 family มีอิทธิพลของ purifying selection หรือ negative selection เนื่องจากบริเวณเหล่านี้มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมาลาเรียเนื่องจากมี functional constraint ดังนั้นการแทนที่ของ nucleotide ที่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่จะมีผลต่อหน้าที่ของโปรตีนนี้จึงถูกยับยั้งเพื่อการอยู่รอดของเชื้อมาลาเรีย

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน PvMSP3 family เกี่ยวข้องกับทั้ง humoral และ cellular immunity กล่าวคือแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของระยะ merozoite รวมทั้งการเกาะติดระหว่างผิวของระยะดังกล่าวกับเซลล์ของโฮสต์ มีการศึกษาในเด็กอัฟริกาพบว่า PfMSP-3.1 สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ได้ (Sirima et al 2011) อย่างไรก็ตามเนื่องจากยีนในกลุ่ม PvMSP3 มีความหลากหลายสูง ดังนั้นถ้ามีการพัฒนาบริเวณดังกล่าวในการเป็นวัคซีนป้องกันมาลาเรียจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อไม่ให้เกิดปัญหาจาก antigenic polymorphism ที่มักพบในโปรตีนของเชื้อมาลาเรียหลายชนิดที่มีศักยภาพในการพัฒนาวัคซีน นอกจากนี้มีการศึกษาโดยใช้ PvMSP3 เป็นองค์ประกอบหนึ่งของวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ *Plasmodium vivax* โดยโปรตีนลูกผสมของ PvMSP3H และ PvMSP3C ของ *Plasmodium vivax* ได้มีการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในรูปของ soluble histidine-tagged bacterial fusions และมีการติดตามวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็น antigenicity ในการติดเชื้อในธรรมชาติด้วยการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนดังกล่าวโดยใช้ซีรัมของคนที่มีภูมิคุ้มกันต่อมาลาเรียในประเทศบราซิล และตรวจพบว่าซีรัมส่วนใหญ่ของคนติดเชื้อมาลาเรียมี IgG แอนติบอดีต่อ PvMSP3H (68.2%) และ PvMSP3C (79.1%) (Bitencourt et al 2013)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับการตอบสนองของแอนติบอดีต่อโปรตีนในกลุ่ม PvMSP3 โดยพบว่าผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium vivax* ส่วนใหญ่มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าว โดยพบอุบัติการณ์ของการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อโปรตีน PvMSP3 ในอัตราใกล้เคียงกันกับการศึกษาใน

ประเทศบราซิล โดยตัวอย่างซีรัมในการศึกษานี้ได้จากผู้ป่วยในขณะที่มีการติดเชื้อมาลาเรียในระยะเฉียบพลัน ดังนั้นการใช้โปรตีนในกลุ่ม PvMSP3 จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium vivax* ซึ่งในการศึกษาต่อไปควรมีการศึกษาถึงระดับการตรวจพบแอนติบอดีว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรภายหลังการติดเชื้อหรือในผู้ที่มีการติดเชื้อซ้ำกันหลายครั้ง และควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดและระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบ

6. สรุปผลการวิจัยจากผลงานในปีที่ 2

6.1 การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า *PvMSP3-F2* เป็นยีนที่มีหลายรูปแบบมากที่สุดโดยมีค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.11251 ตามด้วย *PvMSP3-D2* *PvMSP3-E2* ส่วนยีน *PvMSP3-G* และ *PvMSP3-I* มีความหลากหลายน้อยที่สุดในบรรดา ยีนในกลุ่มนี้คือมีค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.01169 และ 0.01001 ตามลำดับ ส่วนค่า nucleotide diversity ของยีน *PvMSP3-D2* และ *PvMSP3-E2* มีค่าเท่ากับ 0.09661 และ 0.07923 ตามลำดับ

6.2 *PvMSP3-G* และ *PvMSP3-I* จะมีความหลากหลายต่ำแต่กลับพบรูปแบบของ haplotype ทั้งหมด 56, 46 haplotypes ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีนชนิดนี้มีความแตกต่างในระดับลำดับเบสแบบ microheterogeneity

6.3 ระดับของความหลากหลายของ haplotype สำหรับยีนในกลุ่มนี้ทั้ง 5 ชนิดมีค่าอยู่ในช่วง 0.943 ถึง 1.000 แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของ haplotype ของแต่ละยีนทั้ง 5 ชนิดทั่วไปในพื้นที่ที่มีการตรวจพบเชื้อมาลาเรีย

6.4 ผลการศึกษาปริมาณของ IgG ต่อ *PvMSP3-B*, *PvMSP3-D1*, *PvMSP3-F1*, *PvMSP3-F2* และ *PvMSP3-H* แอนติเจน จากตัวอย่างซีรัมของผู้ที่ติดเชื้อ *Plasmodium vivax* จำนวน 734 ตัวอย่าง พบว่าอัตราการตรวจพบภูมิคุ้มกันที่มีต่อแอนติเจนเหล่านี้มีปริมาณร้อยละ 33.38, 46.45, 48.36, 38.42 และ 47.54 ตามลำดับ

7. รายงานผลในภาพรวมทั้งหมด

7.1 Evolution of the *PvMSP3* gene family

7.1.1 Divergent, concerted, or birth-and-death evolution

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของยีน *PvMSP3* ทั้ง 12 ยีน จาก 761 haplotypes โดยสามารถวิเคราะห์ยีน *PvMSP3-G* เป็นฐานของลำดับสายวิวัฒนาการของยีนแสดงให้เห็นว่ายีนชนิดนี้เกิด diverged เป็นลำดับแรกของสายวิวัฒนาการ (รูปที่ 32) นอกจากนี้ยังพบลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันของยีน *PvMSP3-F1* และ *PvMSP3-F2* โดยลำดับสายวิวัฒนาการไม่สามารถแยกกลุ่มกันได้ชัดเจน ยังพบว่ามียีนที่มีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันคือยีน *PvMSP3-D1* และ *PvMSP3-D2* รวมทั้งยีน *PvMSP3-E1* และ *PvMSP3-E2* ก็มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการแล้วพบว่ายีน *PvMSP3-F1/F2* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับยีน *PvMSP3-D1/D2* มากกว่ายีนในสมาชิกตัวอื่น ในขณะที่ยีน *PvMSP3-H*, *PvMSP3-I* และ *PvMSP3-E1/E2* มีความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า *PvMSP3-C* มีความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับยีน *PvMSP3-A* และ *PvMSP3-B* มากกว่ายีนตัวอื่นในสมาชิก

เดียวกัน จะเห็นได้ว่าสมาชิกทั้ง 6 ยีนได้แก่ PvMSP3-A, PvMSP3-B, PvMSP3-C, PvMSP3-G, PvMSP3-H และ PvMSP3-I มีการเปลี่ยนแปลงของสายใยวิวัฒนาการอย่างอิสระต่อกัน และรวมถึงการแยกสายใยวิวัฒนาการมาแล้วได้แก่ยีน PvMSP3-E1/E2, PvMSP3-D1/D2 และ PvMSP3-F1/F2 ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นยีนที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองซ้ำๆ ได้

ความใกล้ชิดกันของยีนที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองซ้ำๆ จากตัวอย่างสายพันธุ์ Salvador I แสดงให้เห็นว่าทั้งยีน PvMSP3-E1 แยกออกจากกลุ่ม PvMSP3-E2 อย่างชัดเจน แต่มีการกระจายของกลุ่มโครงสร้างภายในที่คล้ายคลึงกันบ้างในกลุ่มของยีน PvMSP3-F1 และ PvMSP3-F2 นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มที่ยีน PvMSP3-D1 และ PvMSP3-D2 มีความใกล้ชิดกันมากขึ้น อย่างไรก็ตามการกระจายบางรูปแบบของยีน PvMSP3-D1 และ PvMSP3-D2 ของการเกิด duplication (รูปที่ 33) ดังนั้นยีนที่มี duplication จึงไม่สนับสนุนสายวิวัฒนาการรูปแบบทฤษฎีของ divergent หรือ concerted แต่กลับสนับสนุนสายวิวัฒนาการรูปแบบทฤษฎีของ birth-and-death

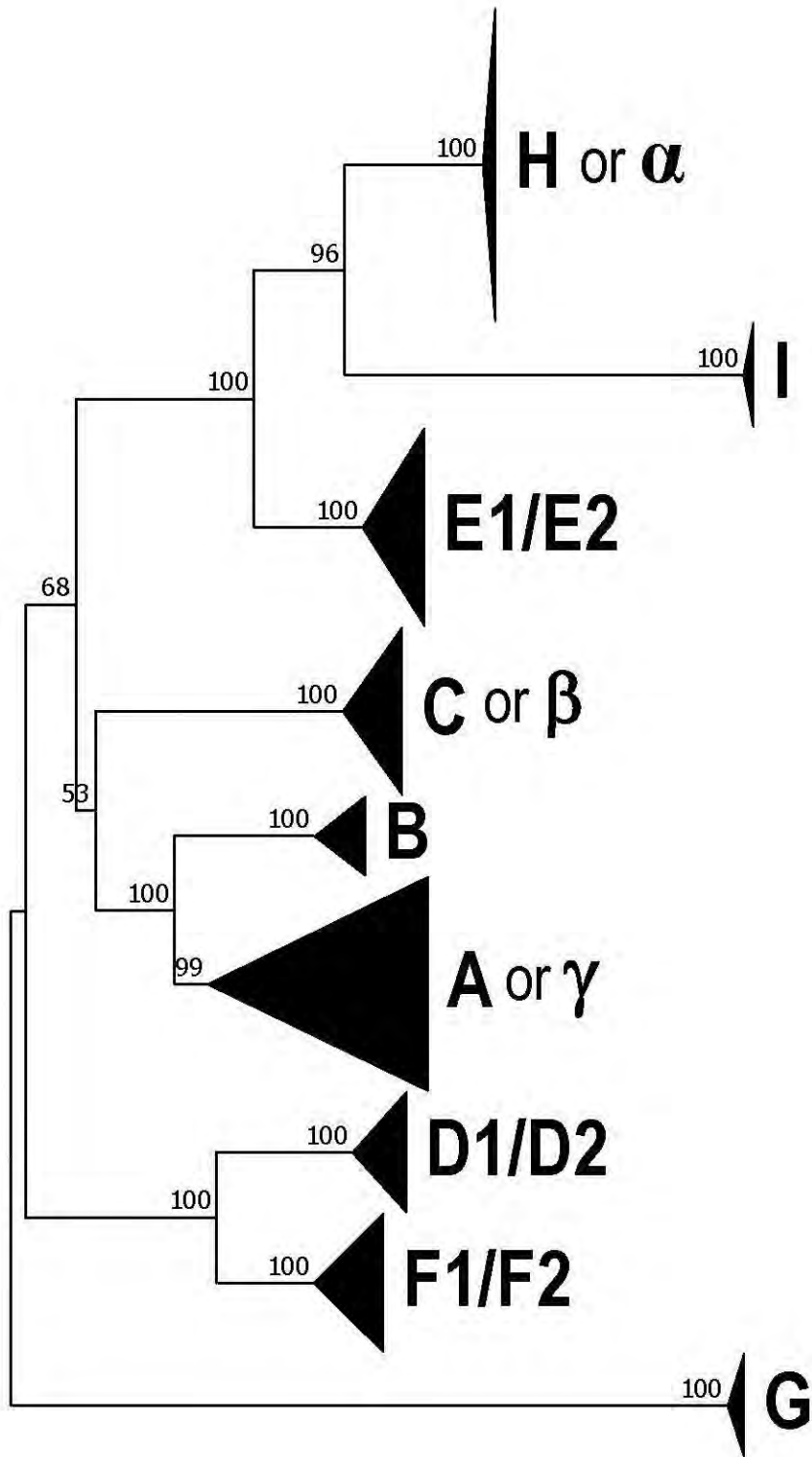


Figure 32 Maximum likelihood tree depicting evolutionary relation among gene members in the *PvMSP3* family. Bootstrap values from 500 pseudoreplicates are indicated along the branches. Shape and size of triangles represent the extent of diversity in each locus.

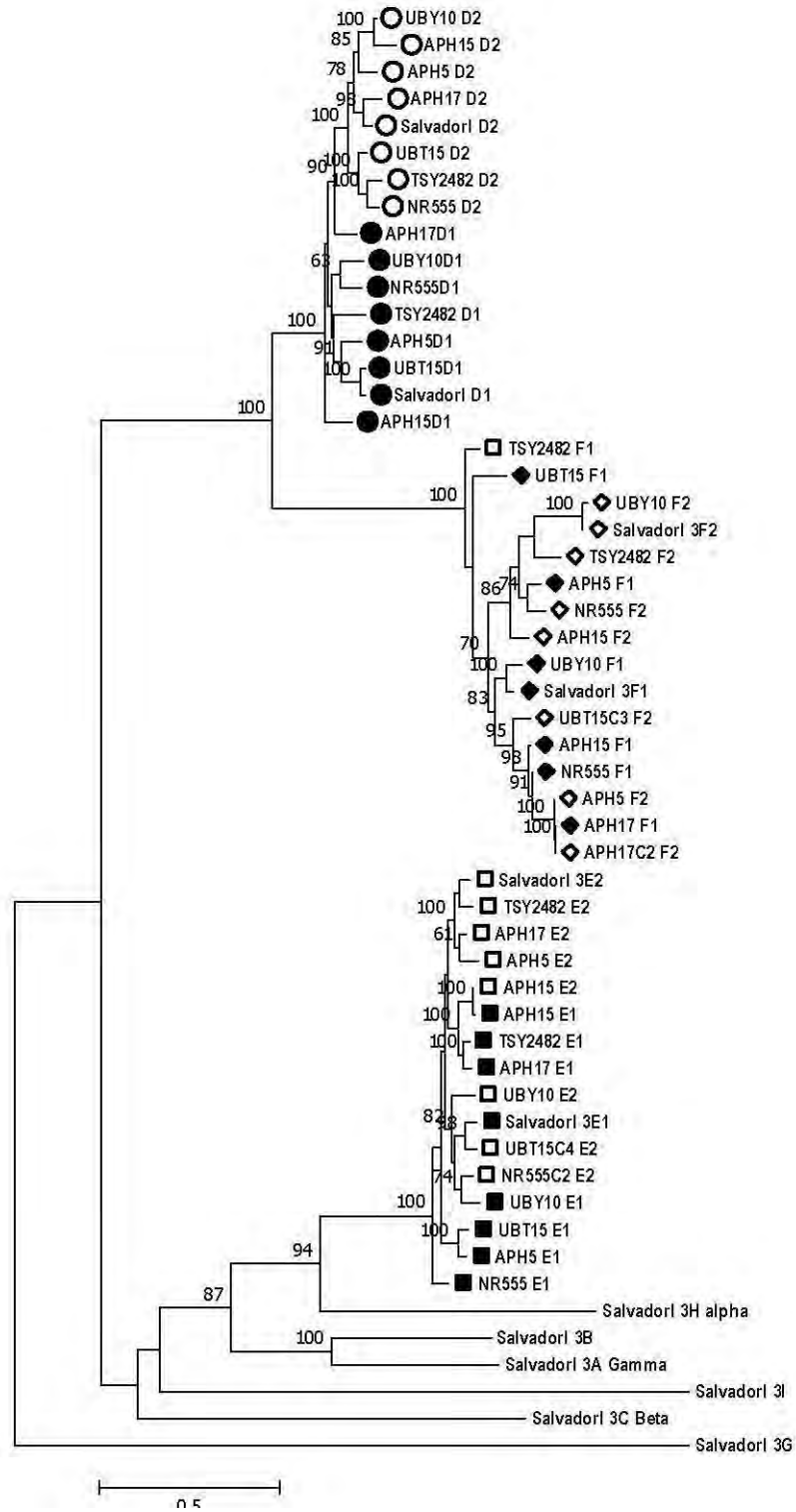


Figure 33 Maximum likelihood tree inferred from *PvMSP3E1* (filled squares)/*PvMSP3E2* (open squares), *PvMSP3D1* (filled circles)/*PvMSP3D2* (open circles) and *PvMSP3F1* (filled diamonds)/*PvMSP3F2* (open diamond) derived from the same isolates in comparison with sequences of all members in the *PvMSP3* gene family of the Salvador I strain.

7.1.2 Gene death versus pseudogene

จากการศึกษา ยีน PvMSP3-E1 พบว่ามี 3 สายพันธุ์จากจังหวัดจันทบุรีได้แก่ CTRA22, CTRA71 และ CT1230 ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนบริเวณตำแหน่งที่ 1408G>T และ 1409C>A หรือลำดับกรดอะมิโนตัวที่ 470 ของตำแหน่งยีน PvMSP3-E1 (รูปที่ 34) ลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงของยีน PvMSP3-E1 จากสายพันธุ์เหล่านี้มีความยาวนานน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวปกติ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการทำงานของโปรตีนไว้ได้ ยิ่งไปกว่านั้นรูปแบบ haplotypes ของสายพันธุ์ CTRA22, CTRA71 และ CT1230 มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์อื่นๆ ในสมาชิกของยีน PvMSP3-E1 ซึ่งแสดงว่ามีการกลายพันธุ์จำนวนมากใน haplotypes เหล่านี้ที่มี stop codon ก่อน ดังนั้น haplotypes เหล่านี้อาจเป็นตัวแทนของ pseudogene ของ PvMSP3-E1 ซึ่งสนับสนุนรูปแบบ birth-and-death ของวิวัฒนาการในยีน PvMSP3

Salvadori_E1	MRQFFGTII	VLFNLVYLQ	THVSNENVN	LKPNLRNGW	AGKDVTLQDE	QSGPNAEDGD	EVNTRQDQIK	LQQKSDETLL	80
CTRA22E1	MRQFCRIPFL	VLFVNLVYHQ	NHVSNIEIVN	LKPNLRNGW	AGKDVTLQDE	QSGLDARDGD	EVNTRKEYQNE	LLQKSEEAASL	80
CTRA472	MRQFFGTII	VLFVNLVYHQ	NHVSNIEIVN	LKPNLRNGW	AGKDVTLQDE	QSGLDARDGD	EVNTRKEYQNE	LLQKSEEAASL	80
CT1230E1	MRQFCRIPFL	VLFVNLVYHQ	NHVSNIEIVN	LKPNLRNGW	AGKDVTLQDE	QSGLDARDGD	EVNTRKEYQNE	LLQKSEEAASL	80
Salvadori_E1	QMGGQDKE	-----	-----	-----	-----	KVAESDDLKE	AKEARTKAEK	EEAEA----E	160
CTRA22E1	QVQAQNSDGD	EELKRRKIDEL	VNNAQVAHTE	AQNAVTKAE	SLRIATEAEK	QVDEGKETT	LKAKVVEAEK	AVAAAKIKKE	160
CTRA472	QVQAQNSDGD	EELKRRKIDEL	VNNAQVAHTE	AQNAVTKAE	SLRIATEAEK	QVDEGKETT	LKAKVVEAEK	AVAAAKIKKE	160
CT1230E1	QVQAQNSDGD	EELKRRKIDEL	VNNAQVAHTE	AQNAVTKAE	SLRIATEAEK	QVDEGKETT	LKAKVVEAEK	AVAAAKIKKE	160
Salvadori_E1	TVKQKILKAE	KETEKAQKI	R----DAINK	VKEYALQKES	EYKEQTKAAK	FAADEATA-E	NAKERKETAN	TALGEAQKAK	240
CTRA22E1	DAKKKADNAK	QSEKTEEQE	SKTKLETVKN	LSEEAQAAAR	DARNEQKKAE	WAKIAEELK	KAYEAKINAK	ESEGEAEMSK	240
CTRA472	DAKKKADNAK	QSEKTEEQE	SKTKLETVKN	LSEEAQAAAR	DARNEQKKAE	WAKIAEELK	KAYEAKINAK	ESEGEAEMSK	240
CT1230E1	DAKKKADNAK	QSEKTEEQE	SKTKLETVKN	LSEEAQAAAR	DARNEQKKAE	WAKIAEELK	KAYEAKINAK	ESEGEAEMSK	240
Salvadori_E1	KEME-----	-----TAAVI	VAE-----V	KAMEAEKES	QKAN-----	-----	-----EE	AQKANQAEAN	320
CTRA22E1	KEATSATSSS	TAEKVTAAIK	IAEDEMQIAV	KKASEAEAE	SKAEQAAIEA	INIIIEQNGEA	QSKVNVVQDE	ADKASKAAAA	320
CTRA472	KEATSATSSS	TAEKVTAAIK	IAEDEMQIAV	KKASEAEAE	SKAEQAAIEA	INIIIEQNGEA	QSKVNVVQDE	ADKASKAAAA	320
CT1230E1	KEATSATSSS	TAEKVTAAIK	IAEDEMQIAV	KKASEAEAE	SKAEQAAIEA	INIIIEQNGEA	QSKVNVVQDE	ADKASKAAAA	320
Salvadori_E1	AK-----	-----NIIINIE	KAGADNPNSK	AEQERTIVWE	KAK-----	-----GAIE	NAKQASTRAT	GAQKATGAA	400
CTRA22E1	AKKAQIKAQI	ADYVVKTEVS	KEKAVKSADA	ANEERTKAEA	VARKSEETIKI	TDVAKSGKVG	TARDEAGKQA	EAADKAKEAA	400
CTRA472	AKKAQIKAQI	ADYVVKTEVS	KEKAVKSADA	ANEERTKAEA	VARKSEETIKI	TDVAKSGKVG	TARDEAGKQA	EAADKAKEAA	400
CT1230E1	AKKAQIKAQI	ADYVVKTEVS	KEKAVKSADA	ANEERTKAEA	VARKSEETIKI	TDVAKSGKVG	TARDEAGKQA	EAADKAKEAA	400
Salvadori_E1	QKAABEAQKA	IAAITGNVKE	IPPANVE---	-----EIKKI	ASDAVKDARD	AKKAKGEAQI	NAEIVKLELA	KVEAKKVVAS	480
CTRA22E1	LTAARNADEA	QTSIKDKDDE	AELNEAKKKA	YEASIKAKQA	ETDALNALEK	AKTAQTETEI	AAEVVKAEN*	kakastteate	480
CTRA472	LTAARNADEA	QTSIKDKDDE	AELNEAKKKA	YEASIKAKQA	ETDALNALEK	AKTAQTETEI	AAEVVKAEN*	kakastteate	480
CT1230E1	LTAARNADEA	QTSIKDKDDE	AELNEAKKKA	YEASIKAKQA	ETDALNALEK	AKTAQTETEI	AAEVVKAEN*	kakastteate	480
Salvadori_E1	ANKAKKEAAA	AAKTSKS---	-----	-----AKL	TAGRAVKKAE	EA-----	-----	-----	560
ctra22e1	agkakekaqt	eadkakeknek	aqeaaakkaqk	qeeaaalkoke	kagtaakeae	taeedivseq	tlakvktrkaq	dasaanaak	560
ctra472	agkakekaqt	eadkakeknek	aqeaaakkaqk	qeeaaalkoke	kagtaakeae	taeedivseq	tlakvktrkaq	dasaanaak	560
ct1230e1	agkakekaqt	eadkakeknek	aqeaaakkaqk	qeeaaalkoke	kagtaakeae	taeedivseq	tlakvktrkaq	dasaanaak	560
Salvadori_E1	-----	-----EAKAKILEN	QNEQDAIS---	-----	-----SAETAA	TAAVAAVAIV	ATAEAAATAG	NEEERKKEAE	640
ctra22e1	tartkaeiaa	eeakaqaakt	eeaaakvaan	aakgeaqqva	neeksaaeqk	aaekaaeeat	tagekaasaa	tvadnapsvs	640
ctra472	tartkaeiaa	eeakaqaakt	eeaaakvaan	aakgeaqqva	neeksaaeqk	aaekaaeeat	tagekaasaa	tvadnapsvs	640
ct1230e1	tartkaeiaa	eeakaqaakt	eeaaakvaan	aakgeaqqva	neeksaaeqk	aaekaaeeat	tagekaasaa	tvadnapsvs	640
Salvadori_E1	AEGKIKTLIQ	KVAEAIKAA	QAQKAQIEAE	IAVEVAKIEE	HSEVAQKEVE	EAEKANAKAK	QAASEAQEAK	TQTEKAAKAA	720
ctra22e1	ntatlstmqe	kankavehak	eakkaqieae	iavevakiee	hsevaqkeve	eaekanakak	qaapeaqeak	tqtekaakaa	720
ctra472	ntatlstmqe	kankavehak	eakkaqieae	iavevakiee	hsevaqkeve	eaekanakak	qaapeaqeak	tqtekaakaa	720
ct1230e1	ntatlstmqe	kankavehak	eakkaqieae	iavevakiee	hsevaqkeve	eaekanakak	qaapeaqeak	tqtekaakaa	720
Salvadori_E1	EMVKAKDLAK	TEVEIATKAE	KEVADARMEA	DEESSEAVEK	AHAIKMQLV	AINAEKKAAK	EVDITKLEDA	KKEAQDATFN	800
ctra22e1	emvkakdlak	teveiatkae	kevadakmea	deesseavek	ahai kmqlv	ainae kkaak	evdi tkleda	kkeaqdaafn	800
ctra472	emvkakdlak	teveiatkae	kevadakmea	deesseavek	ahai kmqlv	ainae kkaak	evdi tkleda	kkeaqdaafn	800
ct1230e1	emvkakdlak	teveiatkae	kevadakmea	deesseavek	ahai kmqlv	ainae kkaak	evdi tkleda	kkeaqdaafn	800
Salvadori_E1	AKELLSIVQK	ASTLAIARSK	NAENSLKVK	KAAEVAKAKL	AKAEAKNQAE	EAKAIAAKAD	ELSKGTFAST	AEKTKAEAAA	880
ctra22e1	akelllvvqq	asllaiaksk	nalnslekvy	kaaevakakl	akaeknqad	akai aakad	elsgtkkast	ae ktkaeaaa	880
ctra472	akelllvvqq	asllaiaksk	nalnslekvy	kaaevakakl	akaeknqad	akai aakad	elsgtkkast	ae ktkaeaaa	880
ct1230e1	akelllvvqq	asllaiaksk	nalnslekvy	kaaevakakl	akaeknqad	akai aakad	elsgtkkast	ae ktkaeaaa	880
Salvadori_E1	KEAAQAATKA	ADEAGKAETA	ADVTKKAATS	AEAKVEANKA	VAAAKEAIIA	KIKAAHEFLK	TKNQDILEPV	EMFSGGTEWV	960
ctra22e1	keaaqatka	adeagkaeta	avtkekaats	aeakveanka	vaakeaaiia	ki kaahel lk	tknqdilepv	emfsggtewv	960
ctra472	keaaqatka	adeagkaeta	avtkekaats	aeakveanka	vaakeaaiia	ki kaahel lk	tknqdilepv	emfsggtewv	960
ct1230e1	keaaqatka	adeagkaeta	avtkekaats	aeakveanka	vaakeaaiia	ki kaahel lk	tknqdilepv	emfsggtewv	960
Salvadori_E1	TDREEQVKE	VEEQDGSNE	KAEEEE-ED	SESALPNGSD	GLEDVDFDV	DODVEEENV	ATNHQGGKY	EKGVTDVAVD	1040
ctra22e1	tdreeqvkee	veeqdgdgnee	qteaaeemee	sesalpngsd	gledvdfdv	ddgeeeenv	atnhqggky	ekgvtbdavd	1040
ctra472	tdreeqvkee	veeqdgdgnee	qteaaeemee	sesalpngsd	gledvdfdv	ddgeeeenv	atnhqggky	ekgvtbdavd	1040
ct1230e1	tdreeqvkee	veeqdgdgnee	qteaaeemee	sesalpngsd	gledvdfdv	ddgeeeenv	atnhqggky	ekgvtbdavd	1040
Salvadori_E1	DTNADKQFGD	EFDAYNDIKK	VTEALVKTMT	SLVSEDPVSG	DTINEFLSDM	NQLFLSW	1097		
ctra22e1	dtnadkqfgd	efdayndikk	vtealvktmt	slvse dpvsg	dtineflsdm	nqlflsw	1097		
ctra472	dtnadkqfgd	efdayndikk	vtealvktmt	slvse dpvsg	dtineflsdm	nqlflsw	1097		
ct1230e1	dtnadkqfgd	efdayndikk	vtealvktmt	slvse dpvsg	dtineflsdm	nqlflsw	1097		

Figure 34 Amino acid alignment of *PvMSP3E1* of isolates with premature stop codon (*).

7.1.3 Insertion first versus deletion first

สมาชิกหลายตัวในยีน PvMSP3 ที่ประกอบด้วย long insert ถึงแม้ว่า short insert อาจถูกสร้างขึ้นจากวิวัฒนาการของการวนซ้ำๆ ที่มีอยู่ในสมาชิกยีนทั้งหมด แต่ข้อจำกัดของ long insert จะมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ และการเปลี่ยนแปลงขนาดค่อนข้างน้อยตามที่อธิบายไว้ในยีน PvMSP3-A เพื่อตรวจสอบว่า haplotypes ของยีน PvMSP3-A ประกอบด้วย insert หรือไม่ เช่น Belem type และ Salvador I type มีวิวัฒนาการมาก่อนหรือหลัง haplotype ที่ไม่มี insert ทั้งหมด เช่น NR520 type อยู่นอกกลุ่มจาก *Plasmodium cynomolgi* (*PcyMSP3*) และ *Plasmodium inui* (*PiMSP3*) นำมาวิเคราะห์ร่วมด้วย โดยการใช้อำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนกลางที่มี insert A, B และ C ของ PvMSP3-A ซึ่งรวมอยู่ใน repeat ที่ไม่มี insert อยู่ด้วย ทำให้สายวิวัฒนาการมีความชัดเจนมากขึ้นใน NR520 type ที่เป็นสายพันธุ์ตัวแทนของยีน PvMSP3-A อย่างไรก็ตาม insert ทั้งหมดได้ถูกสร้างขึ้นเมื่อไม่นานมานี้และมีการกระจายความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่ารูปแบบ haplotypes ที่ไม่มี insert (รูปที่ 35)

สิ่งที่น่าสนใจคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Salvador I type เป็นพื้นฐานของ Belem type ซึ่งมี insert A และ C ก่อน insert B มีสองสายพันธุ์คือ TM37 และ CTRA71 เป็น NR520 type ซึ่งซ้อนกันภายใน Belem type สิ่งนี้อาจไม่ขัดแย้งกับข้อเสนอที่ว่า NR520 type มีสายใยวิวัฒนาการมาก่อน Belem และ Salvador I types เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีการทำซ้ำหลายครั้ง นำเสียดายที่ PvMSP3-A ไม่สามารถแยกออกจากการจัดเรียงลำดับสปีชีส์ได้ เนื่องจาก sites ที่ให้ข้อมูลนั้นไม่เพียงพอสำหรับการสร้างสายวิวัฒนาการที่เชื่อถือได้ อย่างไรก็ตามการรวมกันของ NR520 type ทั้งหมดใน phylogenetic ที่สร้างขึ้นโดยใช้ conserved sequences เท่านั้น ในขณะที่ทั้งสองสายพันธุ์ของ TM37 และ CTRA71 ทั้งสองซ้อนกันอยู่ภายใน Belem type ของสายวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นโดยการทำซ้ำ ในขณะเดียวกัน PvMSP3-C ประกอบด้วย 2 inserts ดังแสดงในส่วนก่อนหน้า ซึ่งแตกต่างจาก PvMSP3-A การเปลี่ยนแปลงขนาดที่หลากหลายเกิดขึ้นใน PvMSP3-C insert A โดเมนโดยสายพันธุ์ที่มี full length insert, intermediate length insert, short insert และไม่มี insert A. โดยใช้ *PcyMSP3C* เป็น outgroup ใน phylogenetic tree ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PvMSP3-C ประกอบด้วย full length insert A ที่อยู่ภายใน cluster เดียวกันหรือที่เกี่ยวข้องกับ *PcyMSP3C* รูปแบบ haplotypes อื่นๆ ของ PvMSP3C ที่ไม่มี insert A หรือที่มี intermediate length insert, short insert A ซึ่งอยู่ภายในที่เกี่ยวข้องกับ *PcyMSP3* (รูปที่ 36) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมี haplotypes ที่มี full length insert A เกิดขึ้นก่อนรูปแบบ haplotype อื่นๆ เมื่อนำ haplotypes มารวมกันในยีน PvMSP3 รูปแบบ haplotypes ที่มี inserts อาจเป็นบรรพบุรุษของ haplotypes ที่ไม่มี insert ดังแสดงในยีน PvMSP3A ในขณะที่ตรงกันข้ามกันสำหรับยีน PvMSP3-C

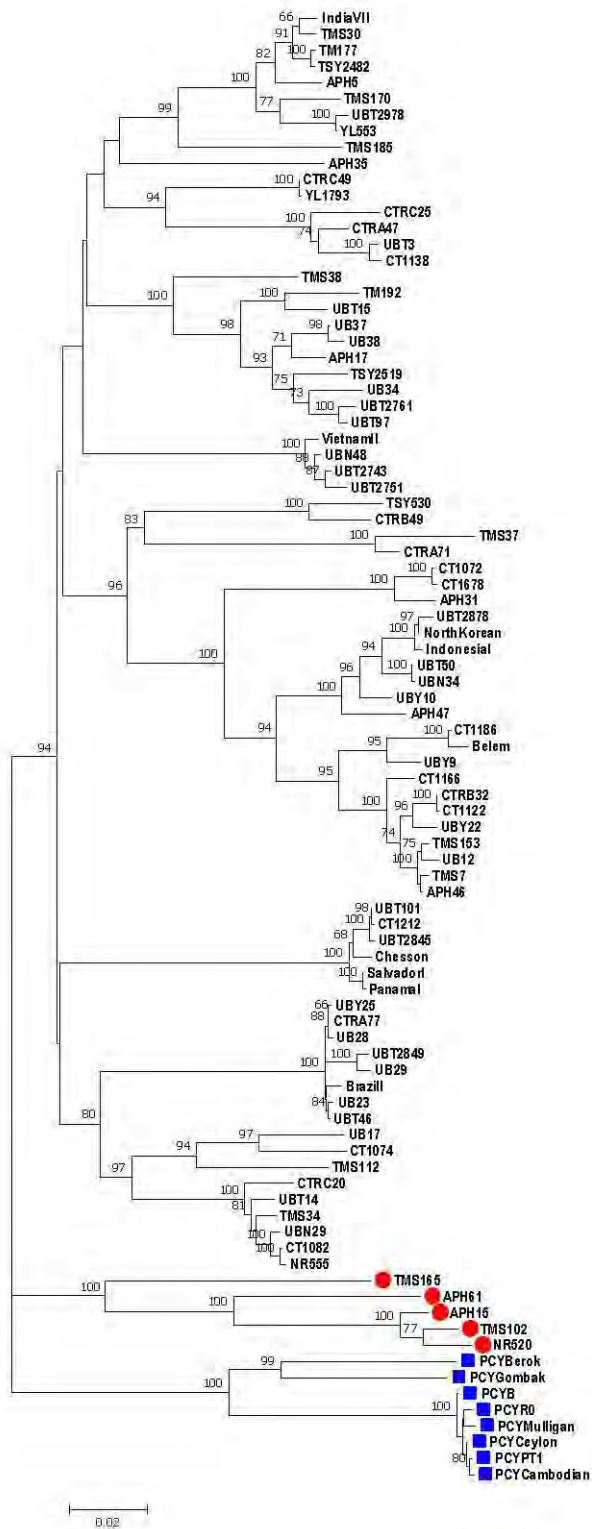


Figure 35 Maximum likelihood tree of *PvMSP3A* with inserts (unlabelled) and without inserts (circles) in comparison with *PcyMSP3A* (squares). Bootstrap values along the branches from 500 pseudoreplicates.

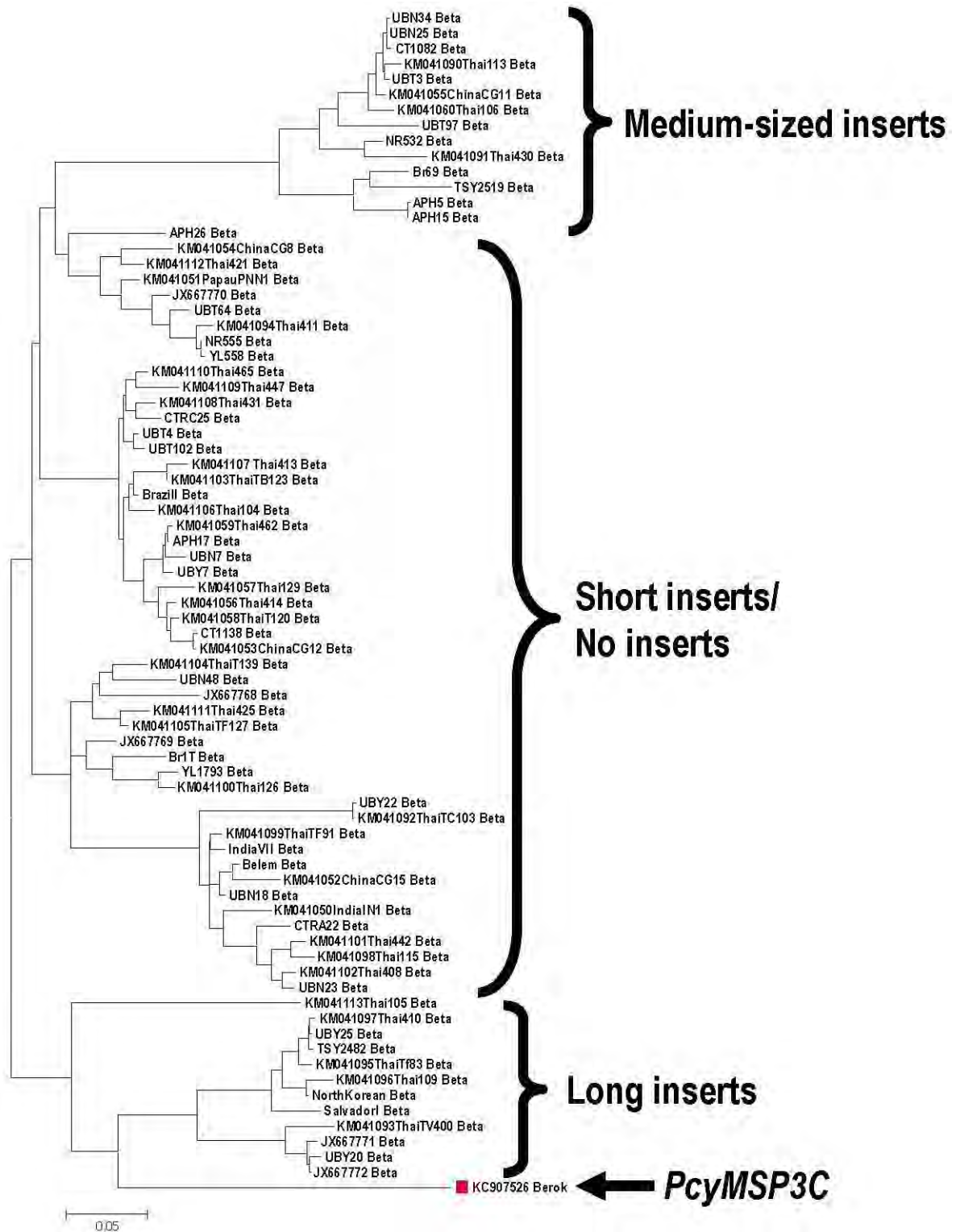


Figure 36 Maximum likelihood tree of *PvMSP3C* with long inserts, medium-sized inserts, short or no inserts in comparison with *PcyMSP3C* (square).

8. สรุปรายงานผลในภาพรวมทั้งหมด

บนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียถูกปกคลุมด้วยโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน ในบรรดาโปรตีนเหล่านี้มีบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการจดจำและการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง การรวบรวมการทำงานของโปรตีนเหล่านี้กับตัวตอบรับบนผิวเม็ดเลือดแดงสามารถยับยั้งการลุกลามของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โปรตีนเหล่านี้จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ในบรรดาโปรตีนในกลุ่มนี้โปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ชนิดที่ 3 หรือ MSP3 เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพเป็นองค์ประกอบของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย MSP3 ของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ (PvMSP3) สายพันธุ์ซาลวาดอร์ 1 จัดเป็นกลุ่มโปรตีนหรือโปรตีนแฟมิลีซึ่งสร้างจากกลุ่มยีนทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ PvMSP3A PvMSP3B PvMSP3C PvMSP3D1 PvMSP3D2 PvMSP3E1 PvMSP3F1 PvMSP3E2 PvMSP3F2 PvMSP3G PvMSP3H และ PvMSP3I ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 โดยยีน 2 ชนิดในกลุ่มนี้ได้แก่ PvMSP3 α หรือ PvMSP3H และ PvMSP3 β หรือ PvMSP3C ได้รับการศึกษาวิเคราะห์ในตัวอย่างเชื้อจำนวนมากจากผู้ป่วย ส่วนยีนที่เหลือได้รับการศึกษาอย่างจำกัด ดังนั้นเพื่อเป็นการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับเบสและวิวัฒนาการของยีนทั้ง 12 ชนิดนี้ จึงได้ทำการศึกษาในตัวอย่างเชื้อจำนวน 203 ถึง 291 ตัวอย่างจากผู้ป่วยในจังหวัดตาก อุบลราชธานี จันทบุรี ยะลาและนราธิวาส โดยทำการหาลำดับเบสและวิเคราะห์พันธุกรรมของประชากรและวิวัฒนาการของยีนเหล่านี้ ในเบื้องต้นได้วิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนแต่ละชนิดด้วยวิธีปฏิบัติการลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายยาว โดยใช้ไพรเมอร์จากยีนแต่ละชนิดในตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมด 120 ตัวอย่าง พบว่าการจัดเรียงตัวของยีนมีความสอดคล้องกับข้อมูลลำดับเบสของจีโนมที่มีการศึกษาในบางตัวอย่างก่อนหน้านี้ ในบรรดา ยีนเหล่านี้มียีนที่มีลำดับติดต่อกันที่ด้านปลาย telomere ได้แก่ PvMSP3A และ PvMSP3B PvMSP3E1 ที่อยู่ในส่วนกลางของจีโนม และยีนอีก 4 ชนิดที่เรียงลำดับติดต่อกันในส่วน centromere ซึ่งได้แก่ PvMSP3F2 PvMSP3G PvMSP3H และ PvMSP3I นั้นสามารถตรวจพบได้ในทุกตัวอย่างที่ศึกษา แต่ยีน PvMSP3C PvMSP3D1 PvMSP3D2 PvMSP3F1 และ PvMSP3E2 นั้นมีการขาดหายไปในบางตัวอย่างที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่ายีนในกลุ่มหลังนี้ไม่มีความสำคัญหรือไม่มีหน้าที่สำคัญ นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มยีน PvMSP3 ได้เป็น 3 กลุ่มตามพื้นฐานความหลากหลายของลำดับเบสคือ (1) กลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูงได้แก่ยีน PvMSP3G PvMSP3H และ PvMSP3I (2) กลุ่มยีนที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสปานกลางได้แก่ยีน PvMSP3E1 และ PvMSP3E2 และ (3) กลุ่มยีนที่มีความหลากหลายสูงได้แก่ยีนที่เหลือทั้งหมด ส่วนใหญ่ยีนในกลุ่ม PvMSP3 มีโครงสร้างของยีนคล้ายกันโดยส่วนที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูงและเป็นบริเวณที่ไม่มีลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุดอยู่ด้านปลาย 5' และ 3' และบริเวณส่วนกลางของยีนที่มีความซับซ้อนและมีการขาดหายไปหรือแทนที่ของลำดับเบสที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด ทั้งนี้ส่วนใหญ่ไม่พบลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกันเป็นชุดอย่างชัดเจน ยกเว้นลำดับกรดอะมิโนที่เรียงซ้ำกันในช่วงสั้น ๆ ของโปรตีน PvMSP3G ซึ่งสร้างจากยีนที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสค่อนข้างสูง แม้ว่าการผ่าเหล่า การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมภายในยีน และขบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติได้ส่งผลต่อการเกิดความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มยีนนี้มีความคล้ายคลึงกับยีนอื่น ๆ ของเชื้อมาลาเรียที่สร้างโปรตีนที่เป็นแอนติเจน กลไกดังกล่าวมีความแตกต่างกันในการส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละยีนในกลุ่มนี้ แสดงถึงความเป็นอิสระใน

วิวัฒนาการของแต่ละยีน และอาจเนื่องจากหน้าที่ของยีนเหล่านี้มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามโครงสร้างทางประชากรของเชื้อพลาสมิเดียมไวกแวกซ์ของประเทศไทย สามารถตรวจสอบได้จากยีนต่าง ๆ ในกลุ่มของยีน *PvMSP3* แสดงว่าความแตกต่างทางภูมิศาสตร์สามารถส่งผลต่อวิวัฒนาการของแต่ละยีน การวิเคราะห์สายใยวิวัฒนาการของยีนในกลุ่มที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีนได้แก่ยีน *PvMSP3D1/PvMSP3D2* *PvMSP3E1/PvMSP3E2* และ *PvMSP3F1/PvMSP3F2* นั้นพบว่าวิวัฒนาการของยีนในกลุ่ม *PvMSP3* สอดคล้องกับแบบจำลองการเกิดและดับ (birth-and-death model) ดังแสดงได้จากสายวิวัฒนาการที่ปะปนกันภายในกลุ่มยีนที่มีการเพิ่มจำนวนชุด นอกจากนี้การพบตำแหน่ง premature termination codon ในยีน *PvMSP3E1* ในตำแหน่งเดียวกันใน 3 ตัวอย่างซึ่งมีลำดับเบสที่ต่างจากยีนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเป็นลักษณะของยีนเทียม ยีนในกลุ่ม *PvMSP3* มีขนาดที่แตกต่างกันมากสามารถเกิดจากการได้รับ หรือขาดหายไปส่วนของยีนในภายหลังดังตัวอย่างจากการวิเคราะห์ยีน *PvMSP3A* และ *PvMSP3C* ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ทำให้เกิดความเข้าใจวิวัฒนาการของกลุ่มยีนแฟมิลีของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้การทราบขอบเขตความหลากหลายของยีนในกลุ่มนี้สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ในการวิเคราะห์ระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของประชากรเชื้อพลาสมิเดียมไวกแวกซ์ และการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อดังกล่าวได้

บรรณานุกรม

1. Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014;14:982-91.
2. Baird JK. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:36-57.
3. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The march toward malaria vaccines. *Vaccine* 2015 (in press).
4. Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2010;7:e1000218.
5. Bitencourt AR, Vicentin EC, Jimenez MC, Ricci R, Leite JA, Costa FT, Ferreira LC, Russell B, Nosten F, Rénia L, Galinski MR, Barnwell JW, Rodrigues MM, Soares IS. Antigenicity and immunogenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3. *PLoS One* 2013;8:e56061.
6. Lupas A. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* 1996;21:375-82.
7. Putaporntip C, Miao J, Kuamsab N, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Jongwutiwes S, Cui L. The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 3 β sequence reveals contrasting parasite populations in southern and northwestern Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e3336.
8. Yang Z, Miao J, Huang Y, Li X, Putaporntip C, Jongwutiwes S, Gao Q, Udomsangpetch R, Sattabongkot J, Cui L. Genetic structures of geographically distinct *Plasmodium vivax* populations assessed by PCR/RFLP analysis of the merozoite surface protein 3beta gene. *Acta Trop* 2006;100:205-12.
9. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:49-56.
10. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* 2000;109:111-9.
11. Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:67-73.
12. Thimasarn K, Jatapadma S, Vijaykadga S, Sirichaisinthop J, Wongsrichanalai C. Epidemiology of Malaria in Thailand. *J Travel Med* 1995;2:59-65.
13. Galinski MR, Corredor-Medina C, Pova M, Crosby J, Ingravallo P, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. *Mol Biochem Parasitol* 1999;101:131-47.
14. Galinski MR, Ingravallo P, Corredor-Medina C, Al-Khedery B, Pova M, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3beta and-3gamma share structural

- similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3 α and define a new gene family. *Mol Biochem Parasitol* 2001;115:41-53.
15. Jiang J, Barnwell JW, Meyer EV, Galinski MR. Plasmodium vivax merozoite surface protein-3 (PvMSP3): expression of an 11 member multigene family in blood-stage parasites. *PLoS One* 2013;8:e63888.
 16. Maltha J, Gillet P, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:399-407.
 17. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16348-53.
 18. World Health Organization. Global malaria report 2014.
 19. Zhou G, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Jones J, Bjrnstad ON, Yan G, Cui L. Spatio-temporal distribution of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:256-62.
 20. Putaporntip C, Hongsrimuang T, Seethamchai S, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongwutiwes S. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *J Infect Dis* 2009;199:1143-50.
 21. Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, Putaporntip C. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1799-806.
 22. Ménard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbaoa A, Thonier V, Carod JF, Domarle O, Colin Y, Bertrand O, Picot J, King CL, Grimberg BT, Mercereau-Puijalon O, Zimmerman PA. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:5967–71.
 23. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64:97-106.
 24. Shute PG, Lupascu G, Branzei P, Maryon M, Constantinescu P, Bruce-Chwatt LJ, Draper CC, Killick-Kendrick R, Garnham PC. A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: the effect of numbers of sporozoites on the length of the prepatent period. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977;70:474-81.
 25. Jiang JB, Huang JC, Liang DS, Liu JX, Zhang SW, Cheng FC. Long incubation of *Plasmodium vivax* multinucleatum as demonstrated in three experimental human cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982;76:845-7.
 26. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest* 2010;120:4168-78.
 27. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv Immunol* 1989;45:283-334.

28. McCutchan TF, Kissinger JC, Touray MG, Rogers MJ, Li J, Sullivan M, Braga EM, Krettli AU, Miller LH. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarial parasites: biological and phylogenetic implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11889-94.
29. Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz AL, Nussenzweig RS. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J Immunol* 1984;132:909-13.
30. Hoffman SL, Oster CN, Plowe CV, Woollett GR, Beier JC, Chulay JD, Wirtz RA, Hollingdale MR, Mugambi M. Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science* 1987;237:639-42.
31. Cohen J, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Vekemans J, Leach A. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. *Hum Vaccines* 2010;6:90-6.
32. The RTS,S Clinical Trials Partnership. A phase 3 Trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 2012;367:2284-95.
33. Good MF, Kaslow DC, Miller LH. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 1998;16:57-87.
34. Kaslow DC. Immunogenicity of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens: implications for the design of a transmission blocking vaccine. *Immunol Lett* 1990;25:83-6.
35. Sirima SB, Cousens S, Druilhe P. Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. *N Engl J Med* 2011;365:1062-4.
36. Stanisic DI, Javati S, Kiniboro B, Lin E, Jiang J, Singh B, Meyer EV, Siba P, Koepfli C, Felger I, Galinski MR, Mueller I. Naturally acquired immune responses to *P. vivax* merozoite surface protein 3 α and merozoite surface protein 9 are associated with reduced risk of *P. vivax* malaria in young Papua New Guinean children. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2498.
37. Rice BL, Acosta MM, Pacheco MA, Carlton JM, Barnwell JW, Escalante AA. The origin and diversification of the merozoite surface protein 3 (msp3) multi-gene family in *Plasmodium vivax* and related parasites. *Mol Phylogenet Evol* 2014;78:172-84.
38. de Souza AM, de Araújo FC, Fontes CJ, Carvalho LH, de Brito CF, de Sousa TN. Multiple-clone infections of *Plasmodium vivax*: definition of a panel of markers for molecular epidemiology. *Malar J* 2015;14:e330.
39. Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malaria J* 2012;11:e14.
40. Futuyma DJ. *Evolutionary biology*, 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.
41. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 1968;217:624-6.
42. Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol* 2002;18:405-10.
43. Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Currie D, Charlwood JD, Billingsley P, Teuscher T, Walliker D. Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 1994;109:413-21.

44. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 2000;17:1467-82.
45. Hartl DL, Volkman SK, Nielsen KM, Barry AE, Day KP, Wirth DF, Winzeler EA. The paradoxical population genetics of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 2002;18:266-72.
46. McDonald JH, Kreitman M. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* 1991;351:652-4.
47. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 1986;3:418-26.
48. Fu YX, Li W-H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 1993;133:693-709.
49. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989;123:585-95.
50. Hughes AL, Friedman R. Amino acid sequence constraint and gene expression pattern across the life history in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;142:170-6.
51. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Hughes AL. Bottleneck effects on vaccine-candidate antigen diversity of malaria parasites in Thailand. *Vaccine* 2010;28:3112-7.
52. Rice BL, Acosta MM, Pacheco MA, Escalante AA. Merozoite surface protein-3 alpha as a genetic marker for epidemiologic studies in *Plasmodium vivax*: a cautionary note. *Malar J*. 2013;12:288.
53. Konchom S, Singhasivanon P, Kaewkungwal J, Chupraphawan S, Thimasarn K, Kidson C, Rojanawatsirivet C, Yimsamran S, Looareesuwan S. Trend of malaria incidence in highly endemic provinces along the Thai borders, 1991-2001. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34:486-94.
54. Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol*. 2003;19:220-6.
55. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, Guthmann JP, Nosten F, Carlton J, Looareesuwan S, Nair S, Sudimack D, Day NP, Anderson TJ, White NJ. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007;195:927-33.
56. Imwong M1, Nakeesathit S, Day NP, White NJ. A review of mixed malaria species infections in anopheline mosquitoes. *Malar J*. 2011;10:253.
57. Mascorro CN1, Zhao K, Khuntirat B, Sattabongkot J, Yan G, Escalante AA, Cui L. Molecular evolution and intragenic recombination of the merozoite surface protein MSP-3alpha from the malaria parasite *Plasmodium vivax* in Thailand. *Parasitology*. 2005;131:25-35.
58. Chen N1, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis*. 2007;195:934-41.

59. Cole-Tobian JL1, Biasor M, King CL. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:626-33.
60. Gray KA, Dowd S, Bain L, Bobogare A, Wini L, Shanks GD, Cheng Q. Population genetics of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and asymptomatic malaria in Temotu Province, Solomon Islands. *Malar J.* 2013;12:429.
61. Anthony TG, Conway DJ, Cox-Singh J, Matusop A, Ratnam S, Shamsul S, Singh B. Fragmented population structure of *Plasmodium falciparum* in a region of declining endemicity. *J Infect Dis.* 2005;191:1558-64.
62. Griffing SM1, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, Marquiño Quezada W, Barnwell JW, De Oliveira AM, Lucas C, Arrospide N, Escalante AA, Bacon DJ, Udhayakumar V. South American *Plasmodium falciparum* after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PLoS One.* 2011;;e23486.
63. Khaireh BA1, Assefa A, Guessod HH, Basco LK, Khaireh MA, Pascual A, Briolant S, Bouh SM, Farah IH, Ali HM, Abdi AI, Aden MO, Abdillahi Z, Ayeh SN, Darar HY, Koeck JL, Rogier C, Pradines B, Bogueau H. Population genetics analysis during the elimination process of *Plasmodium falciparum* in Djibouti. *Malar J.* 2013;12:201.

ประวัติคณะผู้วิจัย

ผู้วิจัยหลัก

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Chaturong Putaporntip
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3240100025105
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944
e-mail: p.chaturong@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาศาสตร์	2534
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สัตววิทยา	2538
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Parasitology	2546

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

Medical Parasitology, Molecular Biology, Population Genetics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

- Detection and genetic characterization of malaria in wild and domesticated nonhuman primate populations in Narathivas Province
- A study of anopheline potential vectors to human and primate malaria in western and southern Thailand
- Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax*: analysis of the genes encoding merozoite surface proteins 4 and 5 (PvMsp-4/5)
- Development of highly sensitive and specific diagnostic methods for human and primate malaria from blood samples stored in various conditions
- Population structure of *Plasmodium vivax* in Thailand based on the merozoite surface protein 1 gene
- Population genetics of anopheline primary vectors of human malaria in Thailand
- Detection of malaria among primate populations in natural habitats and some tourist attraction sites in Thailand

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ แหล่งทุน

ผลงานตีพิมพ์ (ผลงาน 5 ปีย้อนหลัง)

1. Cheng CW, Jongwutiwes S, **Putaporntip C**, Jackson AP. Clinical expression and antigenic profiles of a *Plasmodium vivax* vaccine candidate: merozoite surface protein 7 (PvMSP-7). *Malar J.* 2019;18:197.
2. Feng M, Yanagi T, **Putaporntip C**, Pattanawong U, Cheng X, Jongwutiwes S, Tachibana H. Correlation between genotypes and geographic distribution of *Entamoeba nuttalli* isolates from wild long-tailed macaques in Central Thailand. *Infect Genet Evol.* 2019;70:114-122.
3. Buppan P, Seethamchai S, Kuamsab N, Harnyuttanakorn P, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Multiple Novel Mutations in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Gene during Implementation of Artemisinin Combination Therapy in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:987-994.
4. Seethamchai S, Buppan P, Kuamsab N, Teeranaipong P, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2018;65:35-42.
5. Kosuwin R, Feng M, Makiuchi T, **Putaporntip C**, Tachibana H, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. *Trop Med Int Health.* 2018;23:923-933.
6. Feng M, Pandey K, Yanagi T, Wang T, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Cheng X, Sherchand JB, Pandey BD, Tachibana H. Prevalence and genotypic diversity of *Entamoeba* species in inhabitants in Kathmandu, Nepal. *Parasitol Res.* 2018;117:2467-2472.
7. Cheng CW, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Polymorphism in merozoite surface protein-7E of *Plasmodium vivax* in Thailand: Natural selection related to protein secondary structure. *PLoS One.* 2018;13:e0196765.
8. Pariyakanok L, Satitpitakul V, Laksanaphuk P, Ratanawongphaibul K, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Stromal Keratitis with Endophthalmitis Caused by *Vittaforma corneae* in an Immunocompetent Patient: A Case Report. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018:1-3.
9. Tangchaikereee T, Sawaisorn P, Somsri S, Polpanich D, **Putaporntip C**, Tangboriboonrat P, Udomsangpetch R, Jangpatarapongsa K. Enhanced Sensitivity for Detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by magnetic nanoparticles combined with enzyme substrate system. *Talanta.* 2017;164:645-650.
10. Shearer FM, Huang Z, Weiss DJ, Wiebe A, Gibson HS, Battle KE, Pigott DM, Brady OJ, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S, Lau YL, Manske M, Amato R, Elyazar IR, Vythilingam I, Bhatt S,

Gething PW, Singh B, Golding N, Hay SI, Moyes CL. Estimating Geographical Variation in the Risk of Zoonotic *Plasmodium knowlesi* Infection in Countries Eliminating Malaria. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004915.

11. **Putaporntip C**, Kuamsab N, Jongwutiwes S. Sequence diversity and positive selection at the Duffy-binding protein genes of *Plasmodium knowlesi* and *P. cynomolgi*: Analysis of the complete coding sequences of Thai isolates. Infect Genet Evol. 2016;44:367-375.

12. Al-Qahtani AA, Abdel-Muhsin AA, Dajem SMB, ALSheikh AAH, Bohol MFF, Al-Ahdal MN, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Comparative sequence analysis of domain I of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 from Saudi Arabia and worldwide isolates. Infect Genet Evol. 2016;39:381-388.

13. **Putaporntip C**, Kuamsab N, Kosuwin R, Tantiwattanasub W, Vejakama P, Sueblinvong T, Seethamchai S, Jongwutiwes S, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. Clin Microbiol Infect. 2016;22:285.e1-8.

14. Pariyakanok L, Satitpitakul V, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. Femtosecond laser-assisted anterior lamellar keratoplasty in stromal keratitis caused by an Endoreticulatus-like microsporidia. Cornea. 2015;34:588-91.

15. Nakaviroj S, Kobasa T, Teeranaipong P, **Putaporntip C**, Jongwutiwes S. An autochthonous case of severe *Plasmodium knowlesi* malaria in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:569-72.

16. **Putaporntip C**, Miao J, Kuamsab N, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Jongwutiwes S, Cui L. The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 3 β sequence reveals contrasting parasite populations in southern and northwestern Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e3336..

17. Kosuwin R, **Putaporntip C**, Tachibana H, Jongwutiwes S. Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). PLoS One. 2014;9:e110463.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แห่่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย

- โครงการวิจัยเรื่อง “Nonhuman primate malarias in pig-tailed and long-tailed macaques and their transmission to humans in Thailand” ระยะเวลา 3 ปี

ทุนสนับสนุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สถานภาพในการทำวิจัย: ได้ทำการวิจัยลู่่วงแล้วประมาณร้อยละ 90

ผู้วิจัยร่วม 1

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Somchai Jongwutiwes
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3100503095200
- ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์ ระดับ 11
- หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944
e-mail: jongwutiwes@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ. ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม)	วิทยาศาสตร์การแพทย์	2525
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2527
Nagasaki University	Doctor of Philosophy	Molecular Protozoology	2536

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Medical Parasitology, Molecular Parasitology, Molecular Population Genetics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (5 ปีย้อนหลัง)

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย “ระบาดวิทยาเชิงบูรณาการเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคมาลาเรียในประเทศไทย”

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย “ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของปอดอักเสบจากเชื้อนิวโมซิสติส จิโรเว็คซี ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสฮิวมนิกัมกับบภพร่องในประเทศไทย”

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

ผลงานตีพิมพ์ (ผลงาน 5 ปีย้อนหลัง)

- Cheng CW, **Jongwutiwes S**, Putaporntip C, Jackson AP. Clinical expression and antigenic profiles of a *Plasmodium vivax* vaccine candidate: merozoite surface protein 7 (PvMSP-7). *Malar J.* 2019;18:197.
- Feng M, Yanagi T, Putaporntip C, Pattanawong U, Cheng X, **Jongwutiwes S**, Tachibana H. Correlation between genotypes and geographic distribution of *Entamoeba nuttalli* isolates from wild long-tailed macaques in Central Thailand. *Infect Genet Evol.* 2019;70:114-122.
- Buppan P, Seethamchai S, Kuamsab N, Harnyuttanakorn P, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Multiple Novel Mutations in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Gene during Implementation of Artemisinin Combination Therapy in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:987-994.
- Seethamchai S, Buppan P, Kuamsab N, Teeranaipong P, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**.

- Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2018;65:35-42.
5. Kosuwin R, Feng M, Makiuchi T, Putaporntip C, Tachibana H, **Jongwutiwes S**. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. *Trop Med Int Health.* 2018;23:923-933.
 6. Feng M, Pandey K, Yanagi T, Wang T, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Cheng X, Sherchand JB, Pandey BD, Tachibana H. Prevalence and genotypic diversity of *Entamoeba* species in inhabitants in Kathmandu, Nepal. *Parasitol Res.* 2018;117:2467-2472.
 7. Cheng CW, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Polymorphism in merozoite surface protein-7E of *Plasmodium vivax* in Thailand: Natural selection related to protein secondary structure. *PLoS One.* 2018;13:e0196765.
 8. Pariyakanok L, Satitpitakul V, Laksanaphuk P, Ratanawongphaibul K, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Stromal Keratitis with Endophthalmitis Caused by *Vittaforma corneae* in an Immunocompetent Patient: A Case Report. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018:1-3.
 9. Chitsanoor S, Somsri S, Panburana P, Mungthin M, Ubalee R, Emyeam M, **Jongwutiwes S**, Sattabongkot J, Udomsangpetch R. A novel in vitro model reveals distinctive modulatory roles of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* on naïve cell-mediated immunity. *Malar J.* 2017;16:131.
 10. Shearer FM, Huang Z, Weiss DJ, Wiebe A, Gibson HS, Battle KE, Pigott DM, Brady OJ, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**, Lau YL, Manske M, Amato R, Elyazar IR, Vythilingam I, Bhatt S, Gething PW, Singh B, Golding N, Hay SI, Moyes CL. Estimating Geographical Variation in the Risk of Zoonotic *Plasmodium knowlesi* Infection in Countries Eliminating Malaria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004915.
 11. Putaporntip C, Kuamsab N, **Jongwutiwes S**. Sequence diversity and positive selection at the Duffy-binding protein genes of *Plasmodium knowlesi* and *P. cynomolgi*: Analysis of the complete coding sequences of Thai isolates. *Infect Genet Evol.* 2016;44:367-375.
 12. Al-Qahtani AA, Abdel-Muhsin AA, Dajem SMB, AlSheikh AAH, Bohol MFF, Al-Ahdal MN, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Comparative sequence analysis of domain I of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 from Saudi Arabia and worldwide isolates. *Infect Genet Evol.* 2016;39:381-388.
 13. Putaporntip C, Kuamsab N, Kosuwin R, Tantiwattanasub W, Vejakama P, Sueblinvong T, Seethamchai S, **Jongwutiwes S**, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium*

falciparum in response to artemisinin combination therapies in Thailand. Clin Microbiol Infect. 2016;22:285.e1-8.

14. Pariyakanok L, Satitpitakul V, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. Femtosecond laser-assisted anterior lamellar keratoplasty in stromal keratitis caused by an Endoreticulatus-like microsporidia. Cornea. 2015;34:588-91.

15. Nakaviroj S, Kobasa T, Teeranaipong P, Putaporntip C, **Jongwutiwes S**. An autochthonous case of severe Plasmodium knowlesi malaria in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2015;92:569-72.

16. Putaporntip C, Miao J, Kuamsab N, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, **Jongwutiwes S**, Cui L. The Plasmodium vivax merozoite surface protein 3 β sequence reveals contrasting parasite populations in southern and northwestern Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e3336..

17. Kosuwin R, Putaporntip C, Tachibana H, **Jongwutiwes S**. Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of Plasmodium vivax (PvTRAP). PLoS One. 2014;9:e110463.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย

- โครงการวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์จีโนมในไมโทคอนเดรียของอะแคนธามีบาเพื่อการจำแนกจีโนไทป์ โดยวิธีใหม่ การศึกษาสายวิวัฒนาการและการวินิจฉัย”

ระยะเวลา 2 ปี

ทุนสนับสนุน: งบประมาณแผ่นดิน

สถานภาพในการทำวิจัย: อยู่ในระหว่างดำเนินการวิจัยและคล่องแล้วประมาณร้อยละ 80

ผู้วิจัยร่วม 2

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ ดร. ไพโรจน์ ธีรนัยพงศ์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Phairote Teeranaipong
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3189900151716
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ A5
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944
e-mail: phairote1@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง)	แพทยศาสตร์	2546
University of Tokyo	Master of Science	Human Genetics	2551
University of Tokyo	Doctor of Philosophy	Infectious Diseases	2554
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	Thai Board of Internal Medicine	อายุรศาสตร์	2557

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

Molecular Biology, Population Genetics, Internal Medicine

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

- Seethamchai S, Buppan P, Kuamsab N, **Teeranaipong P**, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2018;65:35-42.
- Teeranaipong P**, Sirivichayakul S, Mekprasan S, Ohata PJ, Avihingsanon A, Ruxrungtham K, Putharoen O. Role of Rilpivirine and Etravirine in Efavirenz and Nevirapine-Based Regimens Failure in a Resource-Limited Country: A Cross- Sectional Study. *PLoS One.* 2016;11:e0154221.
- Nakaviroj S, Kobasa T, **Teeranaipong P**, Putaporntip C, Jongwutiwes S. An autochthonous case of severe *Plasmodium knowlesi* malaria in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 2015;92:569-72.
- Teeranaipong P**, Sirivichayakul S, Mekprasan S, Ruxrungtham K, Putharoen O. Rilpivirine versus etravirine validity in NNRTI-based treatment failure in Thailand. *J Int AIDS Soc.* 2014;17:19740.

5. **Teeranaipong P**, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. Journal of the International AIDS Society 2013;16:18723.
6. **Teeranaipong P**, Ohashi J, Patarapotikul J, Kimura R, Nuchnoi P, Hananantachai H, Naka I, Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tokunaga K. A functional single-nucleotide polymorphism in the CR1 promoter region contributes to protection against cerebral malaria. Journal of Infectious Diseases 2008;198:1880-1891.

ผู้วิจัยร่วม 3

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว อุรัศยา พัฒนวงศ์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Urassaya Pattanawong
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3709900367624
- ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ (ชำนาญการ)
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944
e-mail: p.urassaya@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต	วิทยาศาสตรบัณฑิต	คอมพิวเตอร์	2539
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ปรสิตวิทยาทางการแพทย์	2545

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Diagnostic Parasitology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผลงานตีพิมพ์

- Feng M, Yanagi T, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Cheng X, Jongwutiwes S, Tachibana H. Correlation between genotypes and geographic distribution of *Entamoeba nuttalli* isolates from wild long-tailed macaques in Central Thailand. *Infect Genet Evol.* 2019;70:114-122.
- Kuamsab N, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Seethamchai S, Jongwutiwes S. A novel reverse transcription polymerase chain reaction reveals a high prevalence of *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in an endemic area of Thailand. *Asian Biomedicine* 2013;7:219-226
- Ungcharoensuk C, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Jongwutiwes S. Sequence conservation in the Ancylostoma secreted protein-2 of *Necator americanus* (Na-ASP-2) from hookworm infected individuals in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* 2012;12:1926-323.
- Kuamsab N, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Jongwutiwes S. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. *Malaria Journal* 2012;11:190.
- Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, Seethamchai S, **Pattanawong U**, Sirichaisinthop J, Putaporntip C. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques, Thailand. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17:1799-806.
- Buppan P, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Seethamchai S, Jongwutiwes S. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Malaria Journal* 2010;9:72.

7. Putaporntip C, Udomsangpetch R, **Pattanawong U**, Cui L, Jongwutiwes S. Genetic diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-5 locus from diverse geographic origins. *Gene* 2010;456:24-35.
8. Kosuwin R, Putaporntip C, **Pattanawong U**, Jongwutiwes S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene* 2010;449:1-8.
9. Intrarapuk A, Awakairt S, Thammapalerd N, Mahannop P, **Pattanawong U**, Suppasiri T. Comparison between R-phycoerythrin-labeled and R-phycoerythrin-labeled monoclonal antibody (Mab) probes for the detection of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2001;32 Suppl 2:165-71.

ผู้วิจัยร่วม 4

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว นภาพร กวมทรัพย์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Napaporn Kuamsab
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 1800100093150
- ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2564761 โทรสาร 02-2525944
e-mail: kuamsab@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
มหาวิทยาลัยทักษิณ	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2552
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ปรสิตวิทยาทางการแพทย์	2555
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	ชีวเวชศาสตร์	กำลังศึกษา

- สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Molecular Parasitology
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผลงานตีพิมพ์

- Buppan P, Seethamchai S, **Kuamsab N**, Hanyuttanakorn P, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Multiple Novel Mutations in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Gene during Implementation of Artemisinin Combination Therapy in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:987-994.
- Seethamchai S, Buppan P, **Kuamsab N**, Teeranaipong P, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2018;65:35-42.
- Putaporntip C, **Kuamsab N**, Jongwutiwes S. Sequence diversity and positive selection at the Duffy-binding protein genes of *Plasmodium knowlesi* and *P. cynomolgi*: Analysis of the complete coding sequences of Thai isolates. *Infect Genet Evol.* 2016;44:367-375.
- Putaporntip C, **Kuamsab N**, Kosuwin R, Tantiwattanasub W, Vejakama P, Sueblinvong T, Seethamchai S, Jongwutiwes S, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:285.e1-8.
- Putaporntip C, Miao J, **Kuamsab N**, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Jongwutiwes S, Cui L.

The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 3 β sequence reveals contrasting parasite populations in southern and northwestern Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014;8:e3336.

6. **Kuamsab N**, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. *Malaria Journal* 2012;11:190.

7. **Kuamsab N**, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. A novel reverse transcription polymerase chain reaction reveals a high prevalence of *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in an endemic area of Thailand. *Asian Biomedicine* 2013;7:219-226.

ผู้วิจัยร่วม 5

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว รัตน์ดีพร โกสุวินทร์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Rattiporn Kosuwin
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3630300140192
3. ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานวิชาการฝ่ายศึกษา
4. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชาการส่งเสริมสุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
63 หมู่7 ถนนรังสิต-นครนายก ตำบลองครักษ์ อำเภอองครักษ์
จังหวัดนครนายก 26120
โทร: 098-5855614, 02 649-5000 (ext 2253-4)
โทรสาร: 02 649-5450
e-mail: rattiporn_k@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
มหาวิทยาลัยนเรศวร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	ชีววิทยา	2549
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ปรสตีวิทยาทางการแพทย์	2552
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	ชีวเวชศาสตร์	เตรียมสอบ ป้องกัน วิทยานิพนธ์

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Parasite Immunology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผลงานตีพิมพ์

1. **Kosuwin R**, Feng M, Makiuchi T, Putaporntip C, Tachibana H, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. Trop Med Int Health. 2018;23:923-933.
2. Putaporntip C, Kuamsab N, **Kosuwin R**, Tantiwattanasub W, Vejakama P, Sueblinvong T, Seethamchai S, Jongwutiwes S, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. Clin Microbiol Infect. 2016;22:285.e1-8.
3. **Kosuwin R**, Putaporntip C, Tachibana H, Jongwutiwes S. Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). PLoS One 2014;9:e110463.
4. Tia T, Putaporntip C, **Kosuwin R**, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage

specimens from immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18:598-603.

5. Jongwutiwes S, Buppan P, **Kosuwin R**, Seethamchai S, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, Putaporntip C. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques, Thailand. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17:1799-806.

6. **Kosuwin R**, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene* 2010;449:1-8.

ผู้วิจัยร่วม 6

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Thanaporn Rungruang
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3101100431971
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล ตึกศรีสุรินทรา กายวิภาคศาสตร์ ชั้น 7
เลขที่ 2 ถนนวิ้งหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทร: 0-24197035
โทรสาร: 0-24198523
e-mail: sitrr@mahidol.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	ชีววิทยา	2538
มหาวิทยาลัยมหิดล	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	กายวิภาคศาสตร์	2541
Ehime University, Japan	Doctor of Philosophy	Medical Science	2547

- สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Immunology; Laboratory uses of animals for pathological, vaccine and therapeutic studies

- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผลงานตีพิมพ์

- Chuncharunee A, Waikakul S, Wongkajornsilp A, Chongkolwatana V, Chuncharunee L, Sirimontaporn A, **Rungruang T**, Sreekanth GP. Invalid freeze-dried platelet gel promotes wound healing. Saudi Pharm J. 2019;27:33-40.
- Chompoonong S, Jarungjitaree S, Punbanlaem T, **Rungruang T**, Chongthammakun S, Kettawan A, Taechowisan T. Neuroprotective Effects of Germinated Brown Rice in Rotenone-Induced Parkinson's-Like Disease Rats. Neuromolecular Med. 2016;18:334-46.
- Wunjuntuk K, Kettawan A, Charoenkiatkul S, **Rungruang T**. Parboiled germinated brown rice protects against ccl4-induced oxidative stress and liver injury in rats. J Med Food. 2016;19:15-235
- Chaisuksunt V, Kwathai L, Namonta K, **Rungruang T**, Apinhasmit W, Chompoonong S. Occurrence of the foramen of Vesalius and its morphometry relevant to clinical consideration. Scientific World Journal 2012;2012:817454.
- Rungruang T**, Chaweeborisuit P, Klosek SK. Effect of malaria infection and dexamethasone on spleen morphology and histology. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 2010;41:1290-6.

6. Suwancharoen C, Putaporntip C, **Rungruang T**, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies against the C-terminal part of *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein in a low endemic area. *Parasitology Research* 2011;109:315-20
7. **Rungruang T**, Boonmars T. In vivo antiparasitic activity of the Thai traditional medicine plant--*Tinospora crispera*--against *Plasmodium yoelii*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2009;40:898-900.
8. Klosek SK, **Rungruang T**. Anatomical study of the greater palatine artery and related structures of the palatal vault: considerations for palate as the subepithelial connective tissue graft donor site. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2009;31:245-50.
9. Klosek SK, **Rungruang T**. Topography of carotid bifurcation: considerations for neck examination. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2008;30:383-7.
10. **Rungruang T**, Klosek SK. Chronic steroid administration does not suppress Plasmodium development and maturation. *Parasitology Research* 2007;101:1091-5. **(Impact Factor = 2.098)**
11. Bhakdi SC, Sratongno P, Chamma P, **Rungruang T**, Chuncharunee A, Neumann HP, Malasit P, Pattanapanyasat K. Re-evaluating acridine orange for rapid flow cytometric enumeration of parasitemia in malaria-infected rodents. *Cytometry A* 2007;71:662-7.
12. **Rungruang T**, Kaneko O, Murakami Y, Tsuboi T, Hamamoto H, Akimitsu N, Sekimizu K, Kinoshita T, Torii M. Erythrocyte surface glycosylphosphatidyl inositol anchored receptor for the malaria parasite. *Molecular Biochemical Parasitology* 2005;140:13-21.
13. Sattabongkot J, Tsuboi T, Hisaeda H, Tachibana M, Suwanabun N, **Rungruang T**, Cao YM, Stowers AW, Sirichaisinthop J, Coleman RE, Torii M. Blocking of transmission to mosquitoes by antibody to *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 despite antigenic polymorphism in field isolates. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 2003;69:536-41.
14. Arakawa T, Tsuboi T, Kishimoto A, Sattabongkot J, Suwanabun N, **Rungruang T**, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Shimabukuro I, Sato Y, Torii M. Serum antibodies induced by intranasal immunization of mice with *Plasmodium vivax* Pvs25 co-administered with cholera toxin completely block parasite transmission to mosquitoes. *Vaccine* 2003;21:3143-8.

ผู้วิจัยร่วม 7

- ชื่อ – สกุล (ภาษาไทย) นางสาวสุนีย์ สีธรรมใจ
ชื่อ – สกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Sunee Seethamchai
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3529900070496
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
99 หมู่ 9 ต.ท่าโพธิ์ ถ.พิษณุโลก-นครสวรรค์ อ.เมือง
จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-261024 โทรสาร 055-261025
E-mail: avenaa@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
มหาวิทยาลัยนเรศวร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	ชีววิทยา	2534
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สัตววิทยา	2538
มหาวิทยาลัยนเรศวร	Doctor of Philosophy	Biological Sciences	2552

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ Medical Parasitology, Molecular Parasitology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
ผลงานตีพิมพ์

- Buppan P, **Seethamchai S**, Kuamsab N, Harnyuttanakorn P, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Multiple Novel Mutations in *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter Gene during Implementation of Artemisinin Combination Therapy in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2018;99:987-994.
- Seethamchai S**, Buppan P, Kuamsab N, Teeranaipong P, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Variation in intronic microsatellites and exon 2 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene during modification of artemisinin combination therapy in Thailand. Infect Genet Evol. 2018;65:35-42.
- Putaporntip C, Kuamsab N, Kosuwin R, Tantiwattanasub W, Vejakama P, Sueblinvong T, **Seethamchai S**, Jongwutiwes S, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. Clin Microbiol Infect. 2016;22:285.e1-8.
- Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuwin R, **Seethamchai S**, Pattanawong U, Sirichaisinthop J, Putaporntip C. *Plasmodium knowlesi* Malaria in humans and macaques, Thailand. Emerging Infectious Diseases 2011;17:1799-806.

5. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Thongaree S, **Seethamchai S**, Grynberg P, Hughes AL. Ecology of malaria parasites infecting Southeast Asian macaques: evidence from cytochrome b sequences. *Molecular Ecology* 2010;19:3466-3476.
6. Buppan P, Putaporntip C, Pattanawong U, **Seethamchai S**, Jongwutiwes S. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Malaria Journal* 2010;9:72.
7. Putaporntip C, Hongsrimumang T, **Seethamchai S**, Kobasa T, Limkittikul K, Cui L, Jongwutiwes S. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 2009;199:1143-1150.
8. **Seethamchai S**, Putaporntip C, Malaivijitnond S, Cui L, Jongwutiwes S. Malaria and *Hepatozoon* species in wild macaques, southern Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2008;78:646-653.
9. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Karnchaisri K, **Seethamchai S**, Hongsrimumang T, Kanbara H. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein: analysis of isolates mainly from low endemic areas. *Gene* 2008;410:139-146.

ผู้วิจัยร่วม 8

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ พิสิษฐ์ เวชกามา
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Phisitt Vejakama
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3330401097775
- ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้อำนวยการโรงพยาบาลบุณฑริก อ.บุณฑริก จ.อุบลราชธานี
- หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้โรงพยาบาลบุณฑริก อ.บุณฑริก จ.อุบลราชธานี
เบอร์โทรศัพท์ 045-201-297
เบอร์โทรศัพท์มือถือ 084-9562882, 086-4658678
E-mail: toughcountrydoc@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปี พ.ศ.ที่จบ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2537
มหาวิทยาลัยขอนแก่น	Thai Board of Internal Medicine	อายุรศาสตร์ทั่วไป	2544
มหาวิทยาลัยขอนแก่น	Thai Sub-Board of Nephrology	อายุรศาสตร์โรคไต	2550

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

kidney disease

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ แหล่งทุน

- Vejakama P**, Ingsathit A, McKay GJ, Maxwell AP, McEvoy M, Attia J, Thakkinstian A. Treatment effects of renin-angiotensin aldosterone system blockade on kidney failure and mortality in chronic kidney disease patients. BMC Nephrol. 2017;18:342.
- Vejakama P**, Ingsathit A, McEvoy M, Attia J, Thakkinstian A. Progression of chronic kidney disease: an illness-death model approach. BMC Nephrol. 2017;18:205.
- Imwong M, Jindakhad T, Kunasol C, Sutawong K, **Vejakama P**, Dondorp AM. An outbreak of artemisinin resistant falciparum malaria in Eastern Thailand. Sci Rep. 2015;5:17412.
- Putaporntip C, Kuamsab N, Kosuwin R, Tantiwattanasub W, **Vejakama P**, Sueblinvong T, Seethamchai S, Jongwutiwes S, Hughes AL. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. Clin Microbiol Infect. 2016;22:285.e1-8.
- Vejakama P**, Ingsathit A, Attia J, Thakkinstian A. Epidemiological study of chronic kidney disease progression: a large-scale population-based cohort study. Medicine (Baltimore) 2015;94:e475.

6. **Vejakama P**, Thakkinstian A, Lertrattananon D, Ingsathit A, Ngarmukos C, Attia J. Prognostic factors of all-cause mortalities in continuous ambulatory peritoneal dialysis: a cohort study. *BMC Nephrology* 2013;14:28.
7. **Vejakama P**, Thakkinstian A, Lertrattananon D, Ingsathit A, Ngarmukos C, Attia J. Renoprotective effects of renin-angiotensin system blockade in type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis. *Diabetologia* 2012;55:566-78.
8. **Vejakama P**, Thakkinstian A, Attia J. Renoprotective effects of renin-angiotensin aldosterone system blockers in type 2 diabetes: demystifying multiple treatment comparisons in a network meta-analysis. Reply to Catala-Lopez F (letter). *Diabetologia*. 2012 Jun 30.
9. **Vejakama P**, Thongrong P, Larvongkerd C, Juntharaj T, Muanchart S, Singkum N, Boonsong A. Combination of Curcuma Longa and omeprazole in the treatment of peptic-ulcer disease and *H. pylori* eradication in comparison to the triple therapy: A controlled clinical trial. *Srinagarind Medical Journal* 2008; 23:100-106
10. Kerdchantuk C, Chaiyakum A, Kessomboon N, Kanpittaya J, **Vejakama P**, Sirivongs D: Self-Assessment symptoms and risk factors for chronic kidney disease screening in primary care. *Chiang Mai University Journal of Natural Science* 2010; 9:39-47
11. Rattanachotphanit T, Waleekhachonlort O, Migta P, Migta U, Chaewchanwattana A, **Vejakama P**, Limwattananon S, Limwattananon C. Quality of diabetic care in district hospitals: A case study from Thailand. *Pharma Indochina VI "the Development of Indochina Pharmacy in the Context of Global Economic Recession"*, pp.550-554. Hue College of Medicine and Pharmacy : Dec 15-18, 2009

Invited speaker

1. The academic meeting in KhonKaen to celebrate the 30th anniversary of kidney services in the northeast of Thailand 3-4 July, 2014
2. Renoprotective effects of renin-angiotensin system blockade in type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis. BIT's first annual world congress of diabetes, Beijing: June, 2012
3. Practical point of CKD clinic "Referring and monitoring system". The nephrology society of Thailand: Mar, 2012
4. Multi-disciplinary approach to delay kidney progression in type 2 diabetic patients. 15th Congress of Asean federation of endocrine societies: Nov 28- 1, 2009