

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน RhopH-1 จากเชื้อ *Plasmodium vivax*
บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

Genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* RhopH-1 isolated
in South of Thailand

คณะนักวิจัย

ดร. สุกัญญา ธนาพงษ์ภักชาติ
รศ.ดร. นงเยาว์ สว่างเจริญ

หัวหน้าโครงการ
ที่ปรึกษาโครงการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ MET570512S

1. ชื่อโครงการวิจัย

ภาษาไทย: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน RhopH-1 จากเชื้อ *Plasmodium vivax* บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

ภาษาอังกฤษ: Genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* RhopH-1 isolated in South of Thailand

2. คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าโครงการวิจัย: ดร. สุภิญญา ธนาพงษ์ภักชาติ
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย: รศ.ดร. นงเยาว์ สว่างเจริญ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	5
บทนำ	
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	7
2. วัตถุประสงค์	8
3. การตรวจเอกสาร	8
วิธีการทดลอง	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	18
สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	30
ผลงานที่ได้รับในช่วงรายงานการวิจัย	
การเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับประเทศและระดับนานาชาติ	35
ภาคผนวก	36

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน RhopH-1 จากเชื้อ *Plasmodium vivax* บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย (Genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* RhopH-1 isolated in South of Thailand) ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป งบประมาณรายได้ ในปีงบประมาณ 2557 (MET570512S)

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูง ในการให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบพระคุณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้เอื้ออำนวยความสะดวกและความสะดวกในการปฏิบัติการวิจัยจนตลอดโครงการ ขอขอบคุณจินตนา ประดุกกาญจนา ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลองจากเครื่อง ABI 3100 Genetic Analyzer

สุดท้ายคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นงเยาว์ สว่างเจริญ และนักวิจัยทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะตลอดการดำเนินงานวิจัย

บทคัดย่อ

Plasmodium vivax เป็นเชื้อก่อโรคมาลาเรียในมนุษย์ที่พบมากเป็นอันดับสองนอกทวีปแอฟริกา ขณะที่เชื้อมาลาเรียกำลังบุกรุกเข้าสู่ของเม็ดเลือดแดง เชื้อต้องอาศัยโปรตีน high molecular weight complex rhoptry proteins (RhopH proteins) ซึ่งอยู่ในบริเวณของ apical complex จากรายงานพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *P. vivax* Sall และ VCG stains พบว่ายีนมี polymorphic สูง ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจสารชีวโมเลกุลของยีน RhopH-1 มากขึ้นจึงจำเป็นต้องศึกษายีน *PvRhopH-1* ที่แยกได้จากบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียสูงเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียต่ำ นอกจากนี้ในปัจจุบันมีรายการความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *P. vivax* ในบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย สำหรับประเทศไทย บริเวณชายแดนตะวันตกพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. vivax* ที่สูง นอกจากนี้ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *P. vivax* จากภาคใต้ ยังมีการศึกษาไม่มากนัก เพื่อการควบคุมโรคและกำจัดเชื้อมาลาเรีย จึงจำเป็นสำหรับการทำความเข้าใจการเปลี่ยนแปลงและการแพร่กระจายลักษณะจีโนไทป์ของเชื้อ *P. vivax* การศึกษานี้มีสองวัตถุประสงค์ 1). เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของยีน *PvRhopH-1* ระหว่างเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ระบาดสูงกับเชื้อที่แยกได้จากทางตอนใต้ 2). เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *P. vivax* ที่แยกจากภาคใต้ ตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่างมาจากภาคใต้ (n = 20), จังหวัดตาก (n = 7) และจังหวัดจันทบุรี (n = 3) ตามลำดับ พบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่งที่ 1099, 1100, 1105, 1117, 1119 และ 1122 ผลการศึกษา phylogenetic tree พบยีน *P. vivax* RhopH1 ที่แยกได้จากประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับ *P. vivax* isolate VCG-1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *P. vivax* จากภาคใต้ ด้วย MSP3 α , MSP3 β , MSP1 F2 และ microsatellite 8 ตำแหน่ง พบการติดเชื่อแบบผสมจีโนไทป์ 17% จาก PvMSP3 β และ 55% จาก microsatellite marker (มีค่า MOI เท่ากับ 1.62) ดังนั้นในการศึกษาลำดับสารชีวโมเลกุลของยีน *PvRhopH-1* ทำให้ได้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับยีน *P. vivax* RhopH-1 ยีนเพื่อให้สามารถผลิตวัคซีนในอนาคต ในขณะที่เดียวกันความหลากหลายของเชื้อ *P. vivax* ในภาคใต้ของประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้จากทางตะวันตกของประเทศไทย อาจเป็นผลมาจากการอพยพผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียจากชายแดนไทยไปยังพื้นที่อื่นจึงมีผลต่อรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. vivax*

Abstract

Plasmodium vivax is the second predominant cause of malaria outside Africa. During the invasion of red blood cells, they require the rhoptry high molecular weight complex proteins 1 (RhopH1) bind to erythrocyte membrane. *P. vivax* RhopH-1 gene have been studied and resulted in high polymorphic regions of *P. vivax* laboratory strains. It is a critical step in understanding the molecular basis of parasite intervention and essential to study the molecular sequences of RhopH-1 gene from *P. vivax* isolated from the field study. The genetic diversity study of *P. vivax* has been conducted in endemic areas. For Thailand, the western border of Thailand demonstrated that different parasite strains were circulating in the human host. Knowledge of the genetic diversity of *P. vivax* in the southern part of Thailand is still ambiguity. For malaria control and elimination, the malaria parasites population studies are required for understanding the dynamics of disease transmission. Aimed at studies have two topics; First; to compare the characterization of PvRhopH-1 gene between *P. vivax* flowing in the endemic area and *P. vivax* isolated the southern part of Thailand from and second; to study on the genetic diversity of *P. vivax* distributed from the south part of Thailand. In thirty samples were received from the south of Thailand (20), Tak (7) and Chanthaburi (3) provinces, respectively. We found six locations showed the high genetic polymorphic included 1099, 1100, 1105, 1117, 1119 and 1122. The phylogenetic tree showed that *P. vivax* RhopH1 gene isolated from Thailand is closely related to *P. vivax* isolate VCG-1. The genotyping of *P. vivax* circulation in the south of Thailand was analyzed by 3 groups of antigenic markers (MSP3 α , MSP3 β , MSP1 F2) and eight microsatellite markers. Mixed-genotype infections were found 17% by PvMSP3 β marker and 55% by microsatellite markers (MOI 1.62). In conclusion, the molecular sequences of PvRhopH-1 gene are provided the basic knowledge of parasite intervened to host. This result is driving to produce a vaccine in the future. Simultaneously, high diversity of *P. vivax* certain in the southern part of Thailand similar to the previous studies from western Thailand. It may cause due to the migration of parasite-carrying different patients from Thailand border into another area that affects patterns of genetic diversity of *P. vivax* spreading over an endemic area.