



การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Kelch13* Propeller ที่มีความสัมพันธ์
กับการดื้อยาอาร์ทิมีซินินในเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยวิธี
Loop - Mediated Isothermal Amplification
Detection of C580Y Mutation in *Kelch13* Propeller Gene Associated with
Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Using
Loop - Mediated Isothermal Amplification Method

ธัญชนก ค่ำมณี

Thunchanok Khammanee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Kelch13* Propeller ที่มีความสัมพันธ์
กับการดื้อยาอาร์ทิมีซินินในเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยวิธี

Loop - Mediated Isothermal Amplification

Detection of C580Y Mutation in *Kelch13* Propeller Gene Associated with
Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Using
Loop - Mediated Isothermal Amplification Method

ธัญชนก คำมณี

Thunchanok Khammanee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Microbiology

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Kelch13* Propeller ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาอาร์ทิมีซิโตนในเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยวิธี Loop - Mediated Isothermal Amplification

ผู้เขียน นางสาวธัญชนก คำมณี

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงเยาว์ สว่างเจริญ)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.องอาจ มหิทธิกร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงเยาว์ สว่างเจริญ)

.....
(ดร.สุภิญญา ธนาพงษ์ภักขิต)

.....กรรมการ
(ดร.สุภิญญา ธนาพงษ์ภักขิต)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทย์วงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสูง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.นงเยาว์ สว่างเจริญ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(ดร. สุภิญญา ธนาพงษ์ภักขิชาติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นางสาวธัญชนก คำมณี)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวธัญชนก คำมณี)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน <i>Kelch13</i> Propeller ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาอาร์ทิมีซินินในเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> โดยวิธี Loop - Mediated Isothermal Amplification
ผู้เขียน	นางสาวธัญชนก คำมณี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ติดต่อกลุ่มยาอาร์ทิมีซินินในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นอุปสรรคสำคัญในการควบคุมและการกำจัดเชื้อมาลาเรียให้หมดไป และจะวิกฤตมากขึ้นหากเชื้อดื้อยาแพร่ระบาดไปยังแอฟริกาซึ่งมีผู้ติดเชื้อมาลาเรียเป็นจำนวนมาก ปัจจัยสำคัญคือต้องจำกัดการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาไม่ให้ขยายวงกว้างออกไป การดื้อยาอาร์ทิมีซินินเกี่ยวข้องกับ การกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง C580Y พบมากที่สุด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย ดังนั้นการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการเฝ้าระวังและติดตามการดื้อยา จึงได้พัฒนาเทคนิค SNP-loop-mediated isothermal amplification (SNP-LAMP) เพื่อตรวจหาการดื้อยาของยีน *Pfkelch13* C580Y ได้อย่างรวดเร็ว โดยออกแบบชุด primer ให้มีความจำเพาะต่อยีน *Pfkelch13* C580Y ศึกษาหาสภาวะการทำงานและความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในปฏิกิริยาโดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นยีน *Pfkelch13* C580Y เป็น positive control พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบยีนคือที่อุณหภูมิ 56°C โดยใช้เวลา 45 นาที ที่ความเข้มข้น 5 mM MgSO₄, 0.8 mM dNTPs, 8 U *Bst* DNA polymerase และ 1 M betaine ทำให้ในปฏิกิริยาผลพบเห็นการเปลี่ยนแปลงของสี hydroxynaphthol blue (HNB) จากสีม่วงเป็นสีฟ้าได้ด้วยตาเปล่า เมื่อยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธี gel electrophoresis จะปรากฏ ladder like pattern bands และเมื่อทดสอบหาความจำเพาะและความไว พบว่า primer ชุดนี้มีความจำเพาะต่อ *Pfkelch13* C580Y เท่านั้น ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Plasmodium* spp. อื่น, DNA มนุษย์, ยีน *Pfkelch13* wild type และ *Pfkelch13* ที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ P574L สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 copies ซึ่งมีความไวมากกว่าวิธี PCR 10 เท่า เมื่อนำเอาเทคนิค SNP-LAMP มาประยุกต์ใช้กับ genomic DNA ที่สกัดจากจุดเลือดแห้งของผู้ป่วยจำนวน 120 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่มียีน *Pfkelch13* C580Y สามารถตรวจสอบได้ที่ปริมาณเชื้อต่ำสุด 335 parasites/ μ l

และไม่ให้ผลบวกกับ genomic DNA ของ *Pfkelch13* wild type และ *P. vivax* เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค LAMP กับ DNA sequencing ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานพบว่าเทคนิค LAMP มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเป็นร้อยละ 100 ทั้งหมด และมีความสามารถในการทำซ้ำ ความสามารถในการทำเหมือน ดังนั้นเทคนิค SNP-LAMP ที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบ *Pfkelch13* C580Y และง่ายต่อการใช้งาน จึงสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยและประเมินการดื้อยาอาร์ทิมีซินินในพื้นที่ระบาดของมาลาเรียได้

Thesis title Detection of C580Y Mutation in *Kelch13* Propeller Gene Associated with Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Using Loop - Mediated Isothermal Amplification Method

Author Miss Thunchanok Khammanee

Major Program Microbiology

Academic Year 2018

Abstract

Plasmodium falciparum resistance to artemisinin based combination therapies in Southeast Asia become a major obstacle for malaria control and elimination efforts. This could be more critical if it spreading to Africa, where plenty of people are infected with malaria. The important factor is limit the spreading of drug resistance malaria. The artemisinin resistance is related to the mutations of the *Pfkelch13* gene, especially at the C580Y position. This point mutation is the most widespread in Southeast Asia, including Thailand. Accordingly, the employment of effective molecular biology techniques is one method that can be used for surveillance and monitoring of drug resistance. This study therefore developed SNP-loop-mediated isothermal amplification (SNP-LAMP) to detect C580Y mutation. A set of primers specific for *Pfkelch13* C580Y gene were designed and the LAMP reaction conditions and concentration of reagent were optimized by using a plasmid containing the *Pfkelch13* C580Y gene as positive control. It was found that the best LAMP reaction conditions were at 56°C 45 minutes and a concentration of 5 mM MgSO₄, 0.8 mM dNTPs, 8 U *Bst* DNA polymerase and 1 M betaine. A positive reaction is designated when the color of hydroxynaphthol blue (HNB) change from purple to sky blue when view with naked eye. The products confirmed by gel electrophoresis showed ladder like pattern bands. The LAMP primers were specifically distinguished only the C580Y mutation. *No cross reactivity* was observed with other *Plasmodium* spp., human DNA or *Pfkelch13* wild type and *Pfkelch13* P574L gene. LAMP reaction was able to detect

as low as 50 copies of plasmid per reaction, The sensitivity is 10-fold higher than conventional PCR method. A total of 120 dried blood spots from patients were analyzed. The LAMP assay successfully differentiate positive samples containing *Pfkelch13* C580Y gene from wild type. The detection limit of LAMP assay is 335 parasites/ μ l. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) showed all 100% along with good repeatability and reproducibility to detect C580Y mutation. Therefore, this technique has the advantages of rapidity, simplicity, sensitivity, specificity and could be used as a clinical diagnosis tool in field testing as well as surveillance of artemisinin resistance.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นงเยาว์ สว่างเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ดร.สุภิญญา ธนาพงษ์ภักขิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูง ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้การสนับสนุนการทำวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รองอาจ มหิทธิกร ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ทั้งยังกรุณาตรวจสอบจนวิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทย์วงศ์ ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ทั้งยังกรุณาตรวจสอบจนวิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ ทุนผู้ช่วยวิจัย (Research Assistant) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาและค่าครองชีพตลอดระยะเวลา 2 ปี

ขอขอบคุณ คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำและความรู้ตลอดระยะเวลาการศึกษา รวมถึงเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาชีววิทยาทุกคน ที่เป็นเพื่อนที่น่ารัก ให้การช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณครอบครัวที่เป็นส่วนสำคัญที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ธัญชนก คำมณี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	31
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุอุปกรณ์	32
วิธีการทดลอง	35
3. ผลการทดลอง	47
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	61
5. สรุปผลการทดลอง	66
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก ก	80
ภาคผนวก ข	81
ประวัติผู้เขียน	89

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	primers ที่ใช้ในแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR	37
2	องค์ประกอบสารที่ใช้ในการทำ nested PCR สำหรับแยกชนิดเชื้อ <i>Plasmodium</i> spp.	37
3	สภาวะที่ใช้ในการทำ nested PCR เพื่อแยกชนิดเชื้อ <i>Plasmodium</i> spp.	38
4	primers ที่ใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfkelch13</i>	39
5	องค์ประกอบสารที่ใช้ในการทำ nested PCR เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfkelch13</i>	40
6	สภาวะที่ใช้ในการทำ nested PCR เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfkelch13</i>	40
7	สารที่ใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างชิ้น DNA กับ vector (ligation)	41
8	ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfkelch13</i> แยกตามจังหวัดและปีที่เก็บตัวอย่าง	48
9	LAMP primers และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษา	50
10	องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยา LAMP	52
11	องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์จาก gDNA	58
12	ค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค LAMP เปรียบเทียบกับ DNA sequencing	59
13	ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา, ผลการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfkelch13</i> ความเข้มข้นของ DNA, ค่า parasitemia และค่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย	8

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Plasmodium</i> spp.	3
2	แผนที่การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย	7
3	ประวัติการใช้ยาและการดื้อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆของเชื้อ <i>P. falciparum</i>	9
4	โปรตีน Kelch13 ของเชื้อ <i>P. falciparum</i> และ โครงสร้างสามมิติ	12
5	กลไกการดื้อยาอาร์ทิมีซินินของเชื้อ <i>P. falciparum</i>	13
6	ลักษณะของเชื้อมาลาเรียระยะต่างๆเมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์	17
7	LAMP primer และตำแหน่งจับกับยีนเป้าหมาย	20
8	ขั้นตอน non- cyclic step ของเทคนิค LAMP	22
9	ขั้นตอน cyclic step ของเทคนิค LAMP	23
10	การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยการดูความขุ่น	24
11	การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยการดูสีฟลูออเรสเซนซ์	24
12	การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยการดูสี calcein	25
13	การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยการดูสี HNB	25
14	การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยวิธี gel electrophoresis	26
15	การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยการใช้อุปกรณ์ real time turbidimeter	26
16	แผนภูมิแสดงการทดลองทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้	34
17	ผลการแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR	47
18	ผลการตรวจสอบโคโลนีลูกผสมด้วยวิธี colony PCR	49
19	LAMP primers ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y	51
20	ผลของความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ LAMP	53
21	ผลของความเข้มข้นของ LAMP primers ต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ LAMP	54
22	ผลของความเข้มข้นของ <i>Bst</i> DNA polymerase ต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ LAMP	55
23	การทดสอบความจำเพาะของวิธี SNP-LAMP	56
24	การทดสอบความไวของวิธี SNP-LAMP	57
25	ความจำเพาะของ LAMP primers ในการตรวจสอบ gDNA ของเชื้อ <i>P. falciparum</i> ที่มียีน <i>Pfkelch13</i> C580Y และ wild type	59
26	ความจำเพาะของ LAMP primers ในการตรวจสอบ gDNA ของเชื้อผสมระหว่าง <i>P. falciparum</i> ที่มียีน <i>Pfkelch13</i> C580Y และ wild type กับ <i>P. vivax</i>	60
27	ตัวอย่าง chromatogram ของการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfkelch13</i>	88

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

bp	=	base pair
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxynucleotide triphosphates
LAMP	=	Loop-mediated isothermal amplification
PCR	=	Polymerase chain reaction
ml	=	Milliliter
μ l	=	Microliter
μ g	=	Microgram
mg	=	Miligram
M	=	Molar
μ M	=	Micromolar
nm	=	Nanometer
rpm	=	Revolutions per minute
UV	=	Ultraviolet
%	=	Percentage

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อปรสิตที่สำคัญในมนุษย์และยังคงมีอุบัติการณ์ในหลายพื้นที่ทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนและร้อนชื้น สำหรับประเทศไทยไข้มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ต้องเฝ้าระวังถึงแม้สถานการณ์โดยภาพรวมมีแนวโน้มที่ลดลง กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข รายงานผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียปี พ.ศ. 2560 จำนวน 10,919 ราย ลดลงจากปี พ.ศ. 2559 ถึงร้อยละ 40.75 (กรมควบคุมโรค, 2560) แต่อุปสรรคสำคัญของการควบคุมและกำจัดโรคมมาลาเรียคือปัญหาการดื้อยาต้านมาลาเรียของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ในภูมิภาคกลุ่มแม่น้ำโขง (Greater Mekhong sub region; GMS) ที่ประกอบด้วยประเทศกัมพูชา พม่า ลาว เวียดนาม และไทย ซึ่งเป็นบริเวณที่พบปัญหาการดื้อยาต้านมาลาเรียมากกว่า 50 ปี ตั้งแต่พบการดื้อยาคลอโรควินบริเวณชายแดนไทยกัมพูชา ช่วงปลายทศวรรษ 1950 จนมีการระบาดการดื้อยาไปทั่วโลก (Lin *et al.*, 2010) ปัจจุบันเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ดื้อต่อกลุ่มยาอาร์ทิมิซินิน (artemisinin - based combination therapies; ACTs) ซึ่งเป็นยาขนานแรกที่ต้องคัดการอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* (Dondorp *et al.*, 2009)

การดื้อยาอาร์ทิมิซินินของเชื้อ *P. falciparum* มีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* (Ariey *et al.*, 2014) โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง C580Y มีผลทำให้การตอบสนองต่อยาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้มีการแพร่ระบาดมากที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย (Ashley *et al.*, 2014, Straimer *et al.*, 2015, Talundzic *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการดื้อยา ACTs ในทวีปแอฟริกาซึ่งเป็นพื้นที่ที่มาลาเรียระบาดและยาสูตรนี้ยังคงใช้รักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (WHO, 2018) ดังนั้นการสำรวจเพื่อเฝ้าระวังการแพร่ระบาดและติดตามการดื้อยาดังวิธีตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วจึงเป็นสิ่งจำเป็น

เทคนิค Loop - mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ได้โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase และ primer จำนวน 4-6 เส้น ที่จับได้อย่างจำเพาะกับยีนเป้าหมาย 6-8 ตำแหน่ง จึงเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง (Notomi *et al.*, 2000) สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ได้ด้วยตาเปล่าภายในเวลาอันสั้น ปัจจุบันเทคนิค LAMP ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ รวมถึงการกลายพันธุ์ของยีน (Wong *et al.*, 2018) การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ในการหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* ซึ่งวิธีในการวิจัยครั้งนี้จะทำให้ตรวจสอบหา

การดื้อยาอาร์ทิมิซิ닌ได้ง่ายและรวดเร็ว อีกทั้งเป็นเครื่องมือในการประเมินสถานการณ์การดื้อยาและควบคุมการดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทตรวจเอกสาร

1. มาลาเรีย

อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย

Kingdom Protista

Subkingdom Protozoa

Phylum Apicomplexa

Class Aconoidasida

Order Haemosporida

Family Plasmodiidae

Genus *Plasmodium*

เชื้อในสกุล *Plasmodium* ที่ก่อโรคในมนุษย์ประกอบด้วย 5 ชนิด คือ

P. falciparum, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi*

1.1 วงจรชีวิตของมาลาเรีย

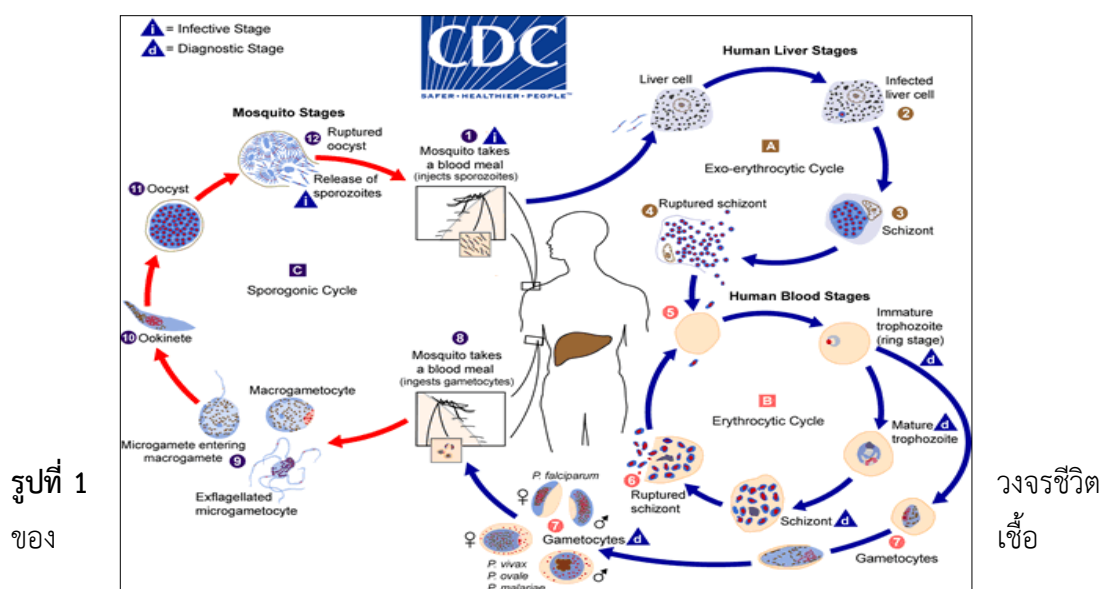
วงจรชีวิตของมาลาเรียต้องอาศัยโฮสต์ 2 ชนิด คือ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เพศเมียเป็น definitive host ซึ่งเชื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือ sporogony และคนเป็น intermediate host เชื่อมีการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศหรือ schizogony โดยแบ่งเป็นระยะที่เจริญเติบโตในเซลล์ตับและในเม็ดเลือดแดง เรียกว่า exo - erythrocytic schizogony และ erythrocytic schizogony ตามลำดับ (รูปที่ 1)

1.2.1 วงจรชีวิตในยุง

เมื่อยุงกัดคนที่มีเชื้อ *Plasmodium* spp. จะได้รับเชื้อระยะ gametocyte ซึ่งมีทั้งตัวผู้ (microgametocyte) และตัวเมีย (macrogametocyte) เข้าไปในกระเพาะยุง เชื้อตัวผู้ผสมกับเชื้อตัวเมียได้เป็น zygote ต่อมาจะเจริญเติบโตเป็น ookinete และเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุง เจริญเติบโตเป็น oocyst ซึ่งภายในมีการแบ่งเซลล์ sporozoites จำนวนมาก เมื่อ oocyst แตกออก sporozoites เหล่านี้จะเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำลาย พร้อมทั้งจะถูกส่งเข้ากระแสเลือดคนเมื่อยุงกัดคน

1.2.2 วงจรชีวิตในคน

วงจรชีวิตในคนประกอบด้วย 2 ระยะ คือ ระยะในตับและระยะในเม็ดเลือดแดง โดยเมื่อคนได้รับเชื้อระยะ sporozoite จากยุง เชื้อจะเข้าสู่เซลล์ตับ (hepatocyte) ภายใน 30 นาที เพื่อเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ จนได้ merozoite จำนวนมาก เรียกรวมการเจริญเติบโตในเซลล์ตับนี้ว่า exo-erythrocytic schizogony สำหรับ *P. vivax* และ *P. ovale* นั้น sporozoite บางตัวเข้าไปอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับได้เป็นเวลานาน เชื้อที่อยู่ในระยะนี้จะเรียกว่า hypnozoite ซึ่งทำให้เกิดไข้กลับ (relapse) เมื่อเซลล์ตับแตกออก merozoite จะเข้าสู่กระแสเลือด เจริญเติบโตต่อไปในเม็ดเลือดแดงซึ่งแบ่งออกเป็นระยะ ring form, trophozoite และ schizont ประมาณ 2 สัปดาห์ merozoites ในระยะ schizont จะแตกออกมาจากเม็ดเลือดแดง เข้าสู่เม็ดเลือดแดงตัวใหม่ และมี merozoites บางส่วนเจริญเป็น gametocyte ตัวผู้และตัวเมีย ซึ่งจะมีการเจริญเติบโตในยุงต่อไป



Plasmodium spp. (CDC, 2015)

1.2 อาการของโรคมาลาเรีย

ผู้ป่วยมาลาเรียในระยะแรกจะมีอาการคล้ายเป็นไข้หวัดทั่วไป ปวดศีรษะ ปวดเมื่อย กล้ามเนื้อตามร่างกาย คลื่นไส้ เบื่ออาหาร อาการเหล่านี้จะแสดงออกมาขึ้นอยู่กักระยะฟักตัวของเชื้อแต่ละชนิด เช่น เชื้อ *P. falciparum* มีระยะฟักตัวประมาณ 2 สัปดาห์ ในขณะที่ *P. malariae* อาจมากถึง 40 วัน นอกจากนี้ยังขึ้นกับจำนวน sporozoite ที่ผู้ป่วยได้รับเข้าไป และระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ มาลาเรียของร่างกายผู้ป่วย ในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อมาลาเรีย เชื้ออาจเจริญถึงระยะแก่ไม่พร้อมกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากได้รับเชื้อในเวลาต่างกัน ทำให้การแตกของเม็ดเลือดแดงเกิดไม่พร้อมกัน ทำให้ผู้ป่วยมีไข้สูงได้ตลอดวัน แต่เมื่อผ่านไประยะหนึ่งแล้วการแตกของเม็ดเลือดแดงพร้อมกัน จึงเห็นผู้ป่วยมีการจับไข้หนาวสั่นเป็นเวลาสม่ำเสมอเรียกว่า paroxysm ประกอบด้วย 3 ระยะคือ

- 1) ระยะหนาวสั่น ผู้ป่วยจะมีอาการหนาวสั่น ผิวหนังเย็น แห้งและซีด ประมาณ 10 - 30 นาที
- 2) ระยะไข้ตัวร้อน มีอาการไข้สูงอุณหภูมิร่างกายอาจถึง 41°C หน้าแดง ผิวแห้ง อาจมีคลื่นไส้ อาเจียนระยะนี้กินเวลา 2-6 ชั่วโมง
- 3) ระยะเหงื่อออก สุดท้ายผู้ป่วยจะมีไข้ลดลงและมีเหงื่อออกทั่วตัว ประมาณ 2-3 ชั่วโมง อาการไข้หนาวสั่นตามช่วงเวลาของไข้มาลาเรียเกิดจากการแตกออกของเม็ดเลือดแดง แล้วมีเชื้อระยะ schizont ออกมาในกระแสเลือด (Bartoloni and Zammarchi, 2012)

1.2.1 ไข้มาลาเรียชนิดรุนแรง

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จะทำให้มีอาการรุนแรงมากกว่าการติดเชื้อ *Plasmodium* ชนิดอื่น โดยเฉพาะในรายที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรค ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria), ปัสสาวะดำ (hemoglobinuria), น้ำท่วมปอด (pulmonary edema), ภาวะดีซ่าน (jaundice), ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure), ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia), ภาวะเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงสูง (hyperparasitemia), ภาวะเลือดเป็นกรด (metabolic acidosis) และภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) และโลหิตจางขั้นรุนแรง (severe anemia) อาจมีอาการชักหมดสติจากภาวะมาลาเรียขึ้นสมองซึ่งหากเกิดกับหญิงมีครรภ์จะมีอัตราการตายสูงและเป็นอันตรายต่อทารกในครรภ์ โดยพบการอุดตันของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรีย และเม็ดเลือดขาวในเส้นเลือดฝอยในสมอง ทำให้ permeability ของเส้นเลือดฝอยเพิ่มขึ้นส่งผลให้น้ำเลือดรั่วไหลออกมานอกเส้นเลือด พบรายงานการเสียชีวิตจากภาวะมาลาเรียขึ้นสมองมากในเด็กชาวแอฟริกัน (WHO, 2016b) นอกจากนี้การอุดตันของเส้นเลือดฝอยรอบไตทำให้เลือดไปเลี้ยงไตได้น้อยลง ผู้ป่วยจึงมีอาการไตวายเฉียบพลันส่งผลให้การทำงานของอวัยวะสำคัญในร่างกายล้มเหลว อัตราการเสียชีวิตจะเพิ่มขึ้นหากมีเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดมากกว่าร้อยละ 2 ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อทั้งหมด (White *et al.*, 2014) ซึ่งการดำเนินไปของโรคอาจรวดเร็วจึงจำเป็นต้องได้รับการวินิจฉัยและการรักษาอย่างทันที่

1.3 ยุงพาหะนำเชื้อมาลาเรีย

ยุงที่สามารถแพร่เชื้อมาลาเรียได้ เป็นยุงก้นปล่องเพศเมียเท่านั้น ยุงพาหะที่สำคัญของการนำเชื้อโรคมมาลาเรียที่สำคัญ (Overgaard *et al.*, 2015) ได้แก่

1.3.1 ยุงพาหะหลัก คือ ยุงที่มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายโรค

- *Anopheles dirus* มีความสามารถในการแพร่เชื้อได้มากกว่ายุงชนิดอื่นๆที่พบในประเทศไทยจึงมีความสำคัญมาก พบได้ทุกภาคในพื้นที่ป่าเขา สวนยาง มีแหล่งเพาะพันธุ์ตามแหล่งน้ำขังตามธรรมชาติในป่า

- *Anopheles minimus* พบได้ทุกภาคเช่นกัน บริเวณชายป่าเชิงเขา มีแหล่งเพาะพันธุ์ตามลำธารน้ำใส ไหลเอื่อยๆ

- *Anopheles maculatus* พบได้ทุกภาคบริเวณชายป่าเชิงเขา ป่าสวนยาง มีแหล่งเพาะพันธุ์ตามลำธารน้ำไหล แต่พบว่าเป็นพาหะเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทยติดเขตประเทศมาเลเซีย

1.3.2 ยุงพาหะรอง มีความสามารถในการนำเชื้อและแพร่เชื้อได้น้อยรองลงมา

- *Anopheles sudaicus* พบตามชายทะเล ตลอดจนเกาะแก่งต่างๆ มีแหล่งเพาะพันธุ์ในน้ำกร่อย แสงแดดส่องถึง

- *Anopheles aconitus* พบทั่วไปเกือบทุกภาค โดยเฉพาะในที่ราบ ทุ่งนา บริเวณป่าสวนผลไม้ มีแหล่งเพาะพันธุ์ในน้ำขังตามธรรมชาติ

1.4 การติดต่อของเชื้อสู่คน

1.4.1 ยุงกัด

เชื้อมาลาเรียสามารถติดต่อสู่คนโดยการถูกยุงก้นปล่องตัวเมียที่มีเชื้อมาลาเรียกัด เมื่อกัดแล้วยุงจะปล่อยเชื้อระยะติดต่อ sporozoite เข้าสู่กระแสเลือดคน วิธีการนี้เป็นการติดต่อปกติที่พบบ่อยที่สุด

1.4.2 การให้เลือด

เป็นการติดต่อเชื้อจากคนสู่คนโดยตรง ซึ่งพบได้น้อยแต่จะพบในการบริจาคเลือด โดยผู้รับบริจาคโลหิตอาจได้รับเชื้อในระยะ trophozoite และ merozoite ที่ยังคงเหลืออยู่ในกระแสเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่เป็นพาหะซึ่งไม่แสดงอาการของโรค เช่น เชื้อ *P. falciparum* คงอยู่ได้

ในเลือดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 28 วัน ระยะเวลาที่เกิดเป็นมาลาเรียภายหลังการได้รับเลือดขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อและชนิดของเชื้อมาลาเรียและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (Faruk, 2016) ดังนั้น

จึงต้องมีการคัดกรองผู้บริจาคโลหิตโดยการบริจาคโลหิตในรายที่เคยเดินทางไปยังพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรียในระยะ 1 ปี และเคยป่วยเป็นโรคมาลาเรียในระยะ 3 ปี

1.4.3 ติดต่อจากแม่สู่ลูก

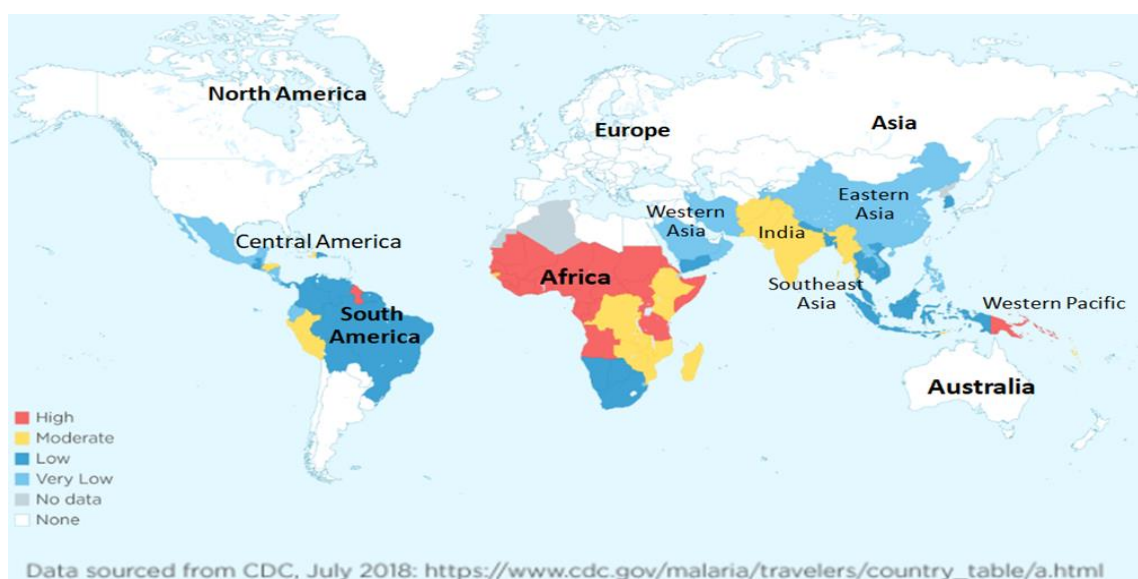
มารดาที่ติดเชื้อมาลาเรียระหว่างการตั้งครรภ์ครั้งแรกและอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรียจะเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ง่าย ส่วนใหญ่จะพบเป็นเชื้อ *P. falciparum* อาการที่พบบ่อยในมารดา คือ โลหิตจางชนิดรุนแรง ปวดบวม น้ำตาลในเลือดต่ำ และส่งผลให้ทารกคลอดก่อนกำหนด ทารกแรกเกิดน้ำหนักน้อย แห้งบุดร หรือถึงขั้นเสียชีวิต จากการศึกษาพบว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อรวมถึงเม็ดเลือดขาวและ malaria pigment จะอุดตันอยู่ในรกจำนวนมากซึ่งมีมากกว่าที่พบในกระแสเลือด ทำให้การแลกเปลี่ยนสารอาหารของมารดากับทารกในครรภ์ไม่ดี นอกจากนี้ยังเกิดการอักเสบของเซลล์ในรกซึ่งจะไปกระตุ้น cytokines ทำให้เกิดการอักเสบมากขึ้น มารดาที่ตั้งครรภ์เป็นครั้งที่ 2 หรือ 3 จะมีภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย แต่ในพื้นที่ที่มีความชุกของมาลาเรียน้อย อัตราการเสียชีวิตของแม่จะสูงไม่ว่าจะเป็นครรภ์แรกหรือครรภ์หลัง (Sharma and Shukla, 2017) และมีโอกาสที่เชื้อจะผ่านรกไปสู่ทารกในครรภ์ได้ ทำให้เด็กเป็นมาลาเรียแต่กำเนิดซึ่งมักจะได้รับเชื้อในระหว่างการคลอดและจะตรวจพบเชื้อมาลาเรียภายใน 7 วันหลังคลอด ทารกแรกคลอดที่เป็นมาลาเรียจะมีอาการไข้ ไม่ดูดนม กระสับกระส่าย ตับม้ามโต ตัวเหลือง ซีด (Rai *et al.*, 2015) การติดต่อจากแม่สู่ลูกเกิดขึ้นได้น้อยมากในมารดาที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรียสูงซึ่งมักมีภูมิคุ้มกันต่อมาลาเรียอยู่แล้ว ดังนั้น IgG จากแม่จะสามารถผ่านรกเป็นภูมิคุ้มกันทำให้ทารกไม่เป็นมาลาเรียแต่กำเนิด

1.5 การกระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย

มาลาเรียเป็นโรคที่พบในประเทศเขตร้อนและร้อนชื้นแถบเส้นศูนย์สูตรที่ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในมากกว่า 90 ประเทศทั่วโลก โดยพบมากที่สุดในทวีปแอฟริกา ผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่เป็นเด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบที่อาศัยอยู่ในแอฟริกา (WHO, 2017) พบในอเมริกากลางและอเมริกาใต้บางประเทศ, เอเชียตะวันออกเฉียงใต้, เอเชียใต้, เอเชียตะวันออกเฉียงกลางและแปซิฟิกตะวันตก และหลายประเทศที่ปลอดจากเชื้อโดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้ว ได้แก่ ประเทศในยุโรป, อเมริกาเหนือ, เอเชียกลาง (ทางเหนือของอัฟกานิสถาน), ศรีลังกา และบางประเทศในละตินอเมริกา (Ashley *et al.*, 2018) ในปี ค.ศ. 2017 องค์การอนามัยโลกรายงานมีจำนวนผู้ป่วยมาลาเรียทั่วโลกประมาณ 219 ล้านคน ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในทวีปแอฟริกาคิดเป็นร้อยละ 92 รองลงมาอยู่ในภูมิภาคเอเชีย

ตะวันออกเฉียงใต้และแถบเมดิเตอร์เรเนียน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* (WHO, 2017) *P. ovale* พบมากในเขตร้อนของทวีปแอฟริกา และในเอเชีย *P. knowlesi* พบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศมาเลเซีย *P. malariae* พบได้ทั่วโลก ในแอฟริกา อเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Autino *et al.*, 2012)

การแพร่ระบาดและอุบัติการณ์ของมาลาเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายด้าน เช่น ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ปริมาณน้ำฝน โดยในช่วงฤดูฝนจะแพร่พันธุ์ได้ดีจึงพบการแพร่ระบาดมาก อุณหภูมิช่วง 18-40°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตและดำรงชีวิตอยู่ในยุงพาหะได้ดี และความชื้นสูงประมาณร้อยละ 60 จะเป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่พันธุ์ของยุงพาหะ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านสังคม เช่น การเคลื่อนย้ายของประชากร การย้ายถิ่นของประชากรเพื่อปัจจัยทางเศรษฐกิจ การเมืองและสังคม การขยายเมือง การตั้งถิ่นฐานใหม่ การจ้างแรงงาน เช่น คนงานเหมือง เกษตรกร เป็นต้น มีผลต่อการระบาดและได้รับเชื้อมาลาเรีย (STPRC and Reddy, 2014)



รูปที่ 2 การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของเชื้อมาลาเรีย

(ดัดแปลงจาก <https://www.treated.com/malaria/world-map-risk>)

1.6 ระบาดวิทยาของมาลาเรียในประเทศไทย

มาลาเรียพบได้ทุกภาคของประเทศไทย มีความชุกมากบริเวณแนวชายแดนที่ติดกับประเทศพม่า กัมพูชา ลาว และมาเลเซีย เช่น จังหวัดตาก ระนอง กาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน ตราด จันทบุรี สระแก้ว ยะลา ซึ่งเป็นพื้นที่ป่า ภูเขาสูง มีแหล่งน้ำลำธาร มีสภาพภูมิประเทศภูมิอากาศเหมาะสมแก่การแพร่พันธุ์ของยุงก้นปล่อง มีการระบาดมากในช่วงฤดูฝนตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม เนื่องจากบริเวณชายแดนมีการเคลื่อนย้ายประชากรอย่างต่อเนื่องเพื่อการใช้แรงงาน การค้าขาย การท่องเที่ยว ทำให้การควบคุมและป้องกันมาลาเรียบริเวณนี้ยากยิ่งขึ้น (Kaewpitoon *et al.*, 2015) สถานการณ์มาลาเรียโดยรวมในประเทศไทยเป็นไปในทิศทางที่ดีขึ้นมีผู้ป่วยมาลาเรียลดลงเพราะมีการพัฒนาด้านสาธารณสุขที่ดีขึ้น จากรายงานของสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขเมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 รายงานจำนวนผู้ป่วยโรคไขมาลาเรีย 6,329 ราย ผู้ป่วยลดลงจากปี 2560 ณ ช่วงเวลาเดียวกัน ร้อยละ 41.11 ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเกษตรกร (ร้อยละ 51.12) ส่วนใหญ่เป็นเชื้อชนิด *P. vivax* (ร้อยละ 82.32) และ *P. falciparum* (ร้อยละ 11.79) 10 จังหวัด ที่พบผู้ป่วยมาลาเรียมากที่สุดคือ จังหวัดตาก ยะลา ศรีสะเกษ แม่ฮ่องสอน นราธิวาส อุบลราชธานี สงขลา กาญจนบุรี จันทบุรี และประจวบคีรีขันธ์ (กรมควบคุมโรค, 2561)

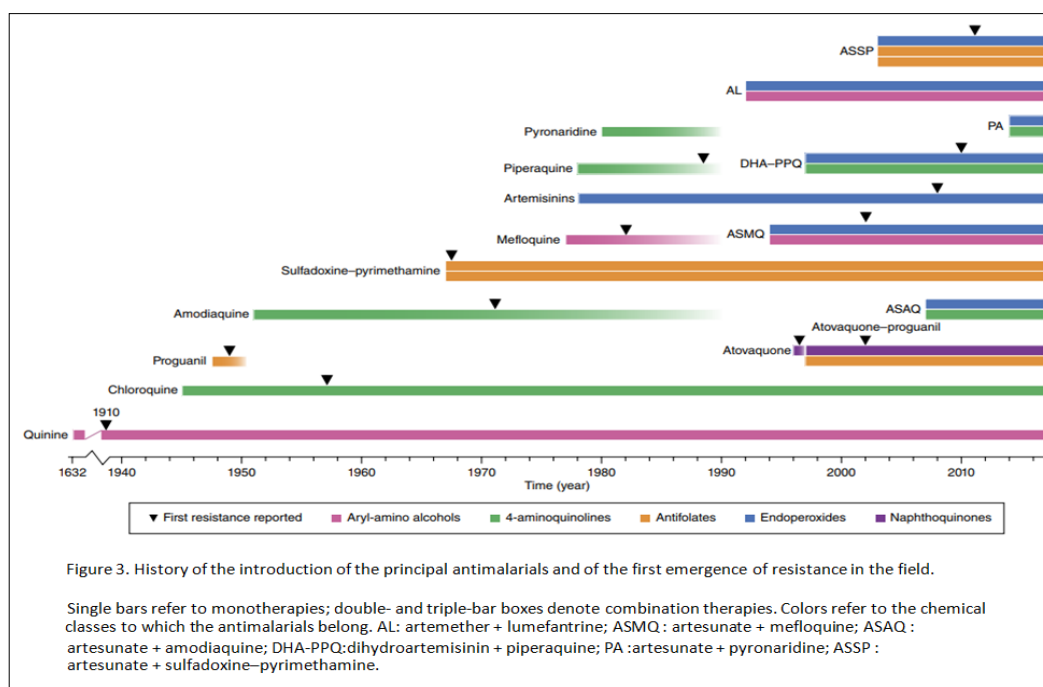
อีกหนึ่งสาเหตุที่การควบคุมและป้องกันมาลาเรียบริเวณแนวชายแดนทำได้ยากคือปัญหาการดื้อยาต้านมาลาเรียของเชื้อ *P. falciparum* เนื่องจากพฤติกรรมของตัวผู้ป่วยที่ซื้อยามารับประทานเอง ซึ่งอาจได้รับยาที่ไม่มีประสิทธิภาพ การไม่ปฏิบัติตามข้อกำหนดการใช้ยา และการรับประทานยาไม่ต่อเนื่อง ทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อในร่างกายได้หมด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ได้รับ, ระดับภูมิคุ้มกันและการบริหารยาภายในร่างกายของแต่ละบุคคล (Wongsrichanalai *et al.*, 2001) การดื้อยาต้านมาลาเรียหลายชนิดในประเทศไทยมักเกิดขึ้นจากบริเวณชายแดนไทยพม่าและชายแดนไทยกัมพูชา เช่น ยาควินิน (quinin), ยาคลอโรควิน (chloroquine), ยาซัลฟาดอกซินและไพริเมธาไมน (sulfadoxine-pyrimethamine), ยาเมโฟลควิน (mefloquine) และปัจจุบันพบการดื้อยาผสมอนุพันธ์อาร์ทีมิซินิน (Artemisinin based combination therapies; ACTs)

2. ยาด้านมาลาเรีย (Antimalarial drugs)

2.1 Chloroquine (CQ)

ยา CQ จัดอยู่ในกลุ่ม 4-aminoquinolone คาดว่ามีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ heme polymerization ของเชื้อ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เชื้อเปลี่ยน heme ที่ได้จากการย่อยฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อให้เป็น hemozoin โดยการย่อยเกิดขึ้นภายใน food vacuole เชื้อจึงไม่สามารถเปลี่ยน heme ให้เป็น hemozoin ได้ เชื้อจึงตายในที่สุด แต่เกิดการดื้อยาโดยการกลายพันธุ์ของยีน *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*t) ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนขนส่งสารต่างๆที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของ food vacuole ทำให้ยาไม่สามารถเข้าเซลล์เพื่อยับยั้งกระบวนการดังกล่าวได้ (Fidock *et al.*, 2000)

ในช่วงทศวรรษที่ 1950 มีการใช้ยา CQ อย่างกว้างขวางและเป็นยาที่จะใช้ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียซึ่งมีประสิทธิภาพมากและราคาถูก แต่พบการดื้อยา CQ ของ *P. falciparum* ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตามแนวชายแดนไทยกัมพูชาแล้วแพร่กระจายไปยังประเทศอื่นๆ ในเอเชียแล้วระบาดไปยังทวีปแอฟริกาทำให้มีผู้เสียชีวิตจำนวนมาก (Harinasuta *et al.*, 1965, Young *et al.*, 1963) ช่วงเวลาดังกล่าวมีการใช้ยา CQ และเริ่มมีรายงานการดื้อยาแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ประวัติการใช้ยาและการดื้อยาด้านมาลาเรียชนิดต่างๆของเชื้อ *P. falciparum* (Blasco *et al.*, 2017)

2.2 Sulfadoxine และ Pyrimethamine (SP)

ยา SP จัดอยู่ในกลุ่มยา antifolate เป็นยาออกฤทธิ์เสริมกันโดยมีเป้าหมายการคือยับยั้งเอนไซม์ dihydropteroate synthase และ dihydrofolate reductase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองมีความจำเป็นในกระบวนการสร้างสารพันธุกรรมของเชื้อ ยา SP ใช้แทน CQ แต่พบการระบาดของการดื้อยาชนิดนี้ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เมื่อกลางทศวรรษที่ 1960 การดื้อยาสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *P. falciparum* dihydropteroate syntase (*pf dhps*) และ *P. falciparum* dihydrofolate reductase (*pf dhfr*) โดยรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อย คือ codon ที่ 108, 51, 59 และ 164 และ codon ที่ 437, 540, 581 ของยีน *Pf dhps* และ ยีน *Pf dhfr* ตามลำดับ (Roper *et al.*, 2003)

2.3 Mefloquine (MQ)

กลไกการออกฤทธิ์ของยา MQ ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดแต่คาดว่ามีการออกฤทธิ์คล้ายกับยา CQ ซึ่งการดื้อยา MQ จะสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์และการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *P. falciparum* multidrug resistance gene1 (*pfmdr1*) ที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน P-glycoprotein homologue-1 (Pgh-1) ซึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ food vacuole (Price *et al.*, 2004)

2.4 Artemisinin based combination therapies (ACTs)

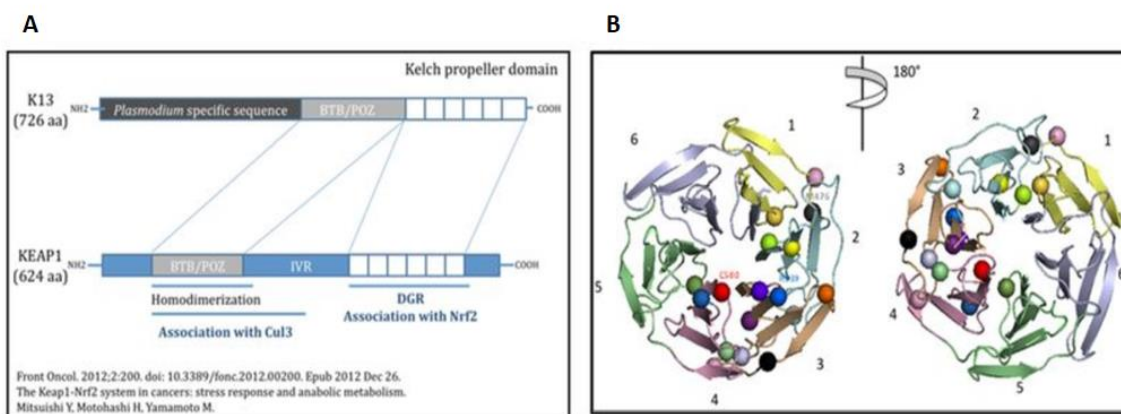
ACTs เป็นยารักษาแรกที้องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้ในการรักษาโรคมalaria ที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ที่มีอาการไม่รุนแรง (WHO, 2001) เป็นยาที่ผสมระหว่างยาอาร์ทิมีซินินและอนุพันธ์ (อนุพันธ์ของอาร์มิซินิน ได้แก่ อาร์ติซูนเนต, อาร์ติมีเตออร์, อาร์ติอีเตออร์, และไดไฮโดรอาร์ทิมีซินิน) กับยาต้านมาลาเรียอื่นที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน ปัจจุบันยา ACTs มี 5 สูตร ได้แก่ อาร์ติมีเตออร์-ลูมิแฟนทริน (artemether-lumefantrine), อาร์ติซูนเนต-เอโมไดอาควิน (artesunate-amodiaquine), อาร์ติซูนเนต-เมฟโลควิน (artesunate-mefloquine), อาร์ติซูนเนต-ซัลฟาดอกซินไพริเมตามีน (artesunate sulfadoxine-pyrimethamine) และ ไดไฮโดรอาร์ทิมีซินิน-ไพเพอราควิน (dihydroartemisinin-piperaquine) โดยให้ยานาน 3 วัน การใช้ยาสูตรผสมเพื่อให้ยาออกฤทธิ์เสริมกันในการกำจัดเชื้อปรสิต ซึ่งกลุ่มยาอาร์ทิมีซินินสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทุกระยะทั้งไม่อาศัยเพศ (ring form, trophozoites) และอาศัยเพศ (immature gametocyte) (Pukrittayakamee *et al.*, 2004) สามารถกำจัดเชื้อส่วนใหญ่ในกระแสเลือดได้ จึงลดการแพร่ระบาดของโรคได้เป็นอย่างดีอีกทั้งยังฆ่าเชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีความปลอดภัยสูง (Woodrow *et al.*, 2005) และยาอีกตัวจะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อที่คงเหลือในกระแสเลือดให้หมดไป

อาร์ทิมิซินินเป็นสารสกัดจากสมุนไพรจีนชื่อว่า ชิงเฮา หรือ sweet wormwood ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Artemisia annua* มีโครงสร้างทางเคมีเป็น sesquiterpene lactone โดยมีพันธะเอโนโดเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย เมื่อยาเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในรูปสารประกอบ dihydroartemisinin (DHA) ซึ่งค่าครึ่งชีวิตสั้นเพียง 1 ชั่วโมง จึงต้องใช้ร่วมกับยาอีกขนานที่มีค่าครึ่งชีวิตนานกว่าและมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกันจึงจะสามารถฆ่าเชื้อที่เหลือได้หมด สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้คาดว่าอาศัยกระบวนการสร้างอนุโมลอิสระเพื่อไปทำลายเชื้อเพราะเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในเม็ดเลือดแดงเชื้อจะย่อยฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงโดยเปลี่ยนเหล็กในรูป Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ซึ่ง Fe^{2+} ที่เกิดขึ้นจะสามารถเร่งปฏิกิริยาในการสลายพันธะเอโนโดเปอร์ออกไซด์ของยาทำให้เกิดสารที่เป็นอนุโมลอิสระจะไปจับกับโปรตีนของเชื้อมาลาเรียทำให้เชื้อถูกทำลาย (Krungkrai and Krungkrai, 2016)

ในประเทศไทยใช้ยามสมระหว่างอาร์ทิซินเนตและเมโฟลควินตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995 ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการรักษาดีขึ้นถึงแม้จะมีปัญหาการดื้อยาเมโฟลควินอยู่ก่อนจึงช่วยลดปัญหาการดื้อยา (Satimai *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของยา ACTs สูตรนี้ลดลงในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น จึงเปลี่ยนมาใช้ยาสูตรไดไฮโดรอาร์ทิมิซินิน-ไพเพอราควิน (DHA-PPQ) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2015 (WHO, 2018) จากการศึกษาทางอณูชีววิทยาโดยการทำ whole genome sequencing ทำให้ทราบว่าการดื้อยาเกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน *Kelch13* ของเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งทำให้การตอบสนองต่อยาลดลงทั้งเชื้อที่เลี้ยงในหลอดทดลองและในร่างกายผู้ป่วย (Ariey *et al.*, 2014)

3. *Plasmodium falciparum kelch* gene

ยีน *Kelch* ของเชื้อ *P. falciparum* (PF3D7_1343700) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13 จึงเรียกยีนนี้ว่า *Kelch13* (*K13*) โดยยีน *Kelch13* ของเชื้อ *P. falciparum* (*Pfkelch13*) มีขนาด 2,181 bp ถอดรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 726 ตัว โปรตีนนี้ประกอบด้วย 3 โดเมน คือ ส่วนที่เป็น *Plasmodium*-specific domain, BTB/POZ domain และ *kelch* propeller domain ซึ่งการดื้อยาอาร์ทิมิซินินของเชื้อเกิดจากการกลายพันธุ์ในส่วนของ *kelch* propeller domain ซึ่ง *kelch* propeller domain อยู่บริเวณปลาย C ของสายเปปไทด์ เรียงตัวแบบ beta - sheet ประกอบด้วย 6 blades มีลักษณะคล้ายใบพัดหรือกังหัน เรียกว่า propeller (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 (A) โพรตีน kelch13 ของเชื้อ *P. falciparum* (PF3D7_1343700) ซึ่งมีความคล้าย (homology) กับโพรตีน KEAP1 ของมนุษย์ และ (B) โครงสร้างสามมิติของโพรตีน kelch13 propeller domain (Ariey *et al.*, 2014)

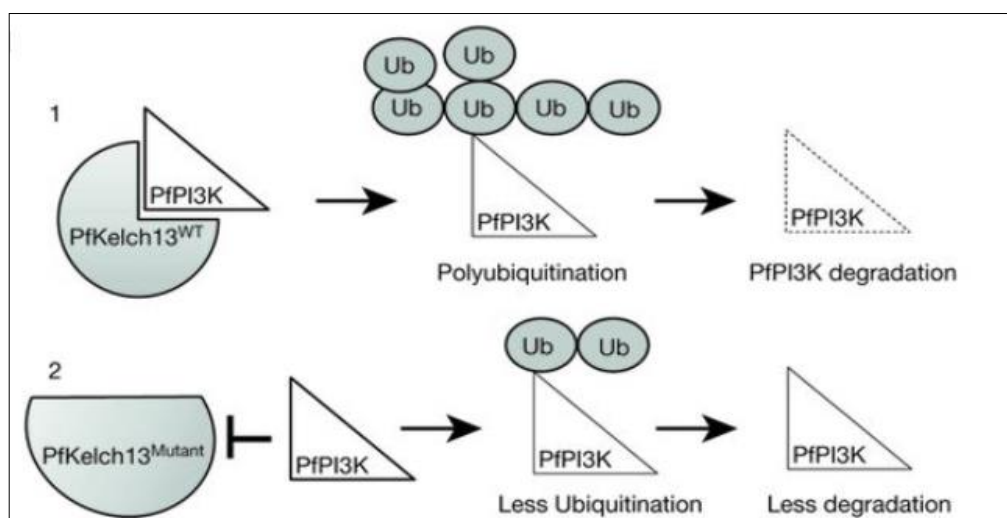
3.1 กลไกการดื้อยาอาร์ทิมิซินิน

ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงหน้าที่ที่แน่ชัดของโพรตีน kelch แต่คาดว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ต่อสภาวะ oxidative stress จาก pro - oxidant activity ของอนุพันธ์ของยาอาร์ทิมิซินินเพราะมีความคล้าย (homology) กับโพรตีน KEAP1 ของมนุษย์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการปรับตัวต่อสภาวะ oxidative stress และคล้ายกับโพรตีน KLHL12 กับ KLHL2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโพรตีน (ubiquitin-based protein degradation) ในกระบวนการแสดงออกของยีนเป็นโพรตีน (Ariey *et al.*, 2014)

โพรตีน KEAP1 ในมนุษย์เป็น negative regulator (ตัวควบคุมการแสดงออกของยีนแบบลบ) ของ transcription factor (TF) ตัวหนึ่งในกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองของเซลล์ต่อสภาวะออกซิเดชัน โดยในสภาวะปกติ KEAP1 จะจับกับ TF เพื่อเข้าสู่กระบวนการสลายโพรตีนด้วยระบบ ubiquitin-proteasome system (UPS) โดยอาศัย ubiquitin เป็นตัวพาโพรตีนไปจากนั้นจะถูกสลายด้วย proteasome ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามปกติเพื่อรักษาสมดุลของโพรตีนภายในเซลล์ เมื่อเซลล์เกิดภาวะเครียด KEAP1 จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ไม่สามารถจับกับ TF ทำให้ TF ไม่ถูกทำลายและถูกสะสมไว้ในนิวเคลียส ส่งผลให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านอนุมูลอิสระและการป้องกันตัวเองของเซลล์ทำงาน เมื่อนำเอายีน KEAP1 เป็นต้นแบบจำลองเพื่อสันนิษฐานการทำงานของโพรตีน Kelch13 โดยพิจารณาเชื้อสายพันธุ์ที่ไวต่อยาอาร์ทิมิซินิน โพรตีน Kelch13 จะจับกับ TF เพื่อนำไปสลาย แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนทำให้ยีนเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ไม่สามารถจับกับ TF และเซลล์ตอบสนองโดยการป้องกันตัวเองเมื่อได้รับยาจนเกิดการดื้อยา เป้าหมายการทำงานของยาอาร์ทิมิซินินคือจะทำลาย

เอนไซม์ phosphatidylinositol-3-kiase (PI3K) ของเชื้อ โดยเอนไซม์นี้มียีน *kelch13* ทำหน้าที่ควบคุมเพื่อนำไปสลายด้วยระบบ UPS เมื่อเอนไซม์ PI3K สลาย จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็น PI3-phosphate (PI3P) ลดลง โดย PI3P มีความจำเป็นต่อเชื้อในการเจริญเติบโต การพัฒนาเชื้อจากระยะวงแหวน (ring) เป็น ระยะชิซอนท์ (schizont) และการซ่อมแซม DNA ดังนั้นเชื้อที่ไวต่อยาจะถูกกำจัดได้ในขณะที่เชื้อดื้อยาซึ่งก็คือเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *Kelch13* เอนไซม์ PI3K จะไม่สามารถจับกับ *Kelch13* จะเกิด PI3P เพิ่มมากขึ้น ทำให้เชื้อยังมีชีวิตรอด เช่น เชื้อที่มียีนกลายพันธุ์ที่ C580Y จะมีระดับ PI3P มากกว่าปกติ 1.5 - 2 เท่า (รูปที่ 5) (Mbengue *et al.*, 2015)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Kelch13* ในระดับ mRNA (transcriptomics) ของเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกจากผู้ป่วยที่เป็นมาลาเรียแบบเฉียบพลันจำนวน 1,043 ตัวอย่าง พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *Kelch13* เกี่ยวข้องกับยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการหดหรือม้วนตัวและการซ่อมแซมโปรตีน ทำให้มีการแสดงออกของ unfolded protein response pathways (UPR) เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการทำลายโปรตีนของเชื้อสายพันธุ์ที่มียีนดื้อยาลดลง และยังเกี่ยวข้องกับยีนที่ทำหน้าที่ในการจำลองตัวเองของ DNA ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระยะของเชื้อภายในเม็ดเลือดแดง โดยเชื้อที่มียีนดื้อยาจะหยุดการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะ immature ring stage มากกว่าระยะที่เป็น mature stages เช่น trophozoites หรือ early schizonts (Mok *et al.*, 2015)



รูปที่ 5 กลไกการดื้อยาอาร์ทิมีซินินของเชื้อ *P. falciparum* (Mbengue *et al.*, 2015)

4. การดื้อยาอาร์ทิมิซินิน

ประเทศไทยใช้ยา ACTs สูตรยาผสมระหว่างอาร์ติซูนและเมโฟลควินในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *P. falciparum* ที่มีอาการไม่รุนแรงเป็นเวลา 2 วัน โดยเริ่มใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ.1995 ในพื้นที่ที่มีการดื้อยาเมโฟลควิน ได้แก่ จังหวัด ตาก, จันทบุรี, กาญจนบุรี, ตราด และแม่ฮ่องสอน ต่อมาพบเชื้อดื้อยาเมโฟลควินเพิ่มขึ้นจึงเปลี่ยนมาใช้ยารักษาเป็นเวลา 3 วัน และพบว่ามีประสิทธิภาพดีขึ้น (Congpuong *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของยา ACTs สูตรนี้ลดลงเพิ่มมากขึ้นในประเทศไทย จึงเปลี่ยนมาใช้ยาสูตรไดไฮโดรอาร์ทิมิซินิน-ไพเพอราควิน (DHA-PPQ) เมื่อปี ค.ศ. 2015 ซึ่งกำลังเฝ้าระวังและประเมินประสิทธิภาพของยาสูตรนี้ (WHO, 2018) มีรายงานการดื้อยาสูตรนี้ของเชื้อในประเทศกัมพูชาซึ่งใช้ยามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 2008 พบว่าเชื้อดื้อยาไพเพอราควินเพิ่มมากขึ้นและเชื้อสายพันธุ์ที่แยกจากจังหวัดศรีสะเกษของประเทศไทยเริ่มมีความไวต่อยาไพเพอราควินลดลงเช่นกัน ในขณะที่เชื้อที่แยกจากจังหวัดกาญจนบุรียังคงไวต่อยา (Chaorattanakawee *et al.*, 2016)

ในอดีตที่ผ่านมาการดื้อยาต้านมาลาเรียหลายชนิดของเชื้อ *P. falciparum* เกิดขึ้นในประเทศกลุ่มลุ่มแม่น้ำโขงที่ประกอบด้วยประเทศกัมพูชา พม่า ลาว เวียดนาม และไทยโดยเฉพาะบริเวณชายแดนไทยกัมพูชา ชายแดนไทยพม่า เป็นบริเวณสำคัญที่มีปัญหาการดื้อยาจำนวนมาก เช่น การดื้อยาคโลโรควิน (Harinasuta *et al.*, 1965) ยาซัลฟาดอกซิน-ไพริเมธามีน (Bjorkman and Phillips-Howard, 1990) ยาเมโฟลควิน (Shanks, 1994) จนมีการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อไปยังภูมิภาคอื่นทั่วโลก รวมถึงแอฟริกาซึ่งมีความชุกของโรคมาลาเรียสูงมากที่สุดในโลก ส่งผลให้มีผู้เสียชีวิตจำนวนมาก เนื่องจากยาที่รักษาไม่ได้ผล (Flegg *et al.*, 2013) การดื้อยาอาร์ทิมิซินินของเชื้อ *P. falciparum* มีรายงานครั้งแรกจากจังหวัดไพลินของประเทศกัมพูชาซึ่งอยู่บริเวณชายแดนไทยกัมพูชา (Noedl *et al.*, 2008, Dondorp *et al.*, 2009) การดื้อยาทำให้กำจัดเชื้อออกจากกระแสเลือดผู้ป่วย (*in vivo*) ได้ช้าลง ยังคงตรวจเจอเชื้อในกระแสเลือดหลังจากให้การรักษาด้วยยา ACTs ครบ 3 วัน ส่งผลให้ค่า parasite clearance half-life มีค่ามากขึ้นซึ่งคำนวณจากการนับเชื้อที่ยังคงเหลือในกระแสเลือดหลังจากให้การรักษาแล้วเทียบกับเวลา โดยหาก parasite clearance half-life มีค่ามากกว่า 5 ชั่วโมง จะแสดงถึงการดื้อยา การศึกษาของ White และคณะ พบว่าค่า parasite clearance half-life ของเชื้อที่ดื้อยาในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีค่าถึง 6.5 ชั่วโมง ต่างจากเชื้อที่ไวต่อยามีค่าเฉลี่ยเพียง 3 ชั่วโมง (White *et al.*, 2015) และมีรายงานค่า parasite clearance half-life มากถึง 7 ชั่วโมง จากจ.ศรีสะเกษ ซึ่งอยู่บริเวณชายแดนไทยกัมพูชา (Ashley *et al.*, 2014) นอกจากนี้สามารถประเมินการดื้อยาโดยทดสอบความไวของเชื้อต่อยาที่ความเข้มข้นต่างๆในหลอดทดลอง (*in vitro*) จาก ring stage assay survival rate (RSA_{0-3h}) โดยคิดปริมาณเชื้อในระยะวงแหวนที่มีชีวิตรอดภายใน 3 ชั่วโมง เนื่องจากพบว่าเชื้อดื้อยาจะหยุดการพัฒนาอยู่ที่ระยะวงแหวนในขณะที่ยาสามารถกำจัดเชื้อระยะอื่นได้หมดเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Witkowski *et al.*, 2010, Witkowski *et al.*, 2013) ซึ่งเชื้อในระยะวงแหวนนี้จะสงบนิ่งอยู่ในเซลล์แต่จะสามารถกลับมาพัฒนาได้อีกครั้งเมื่อยาหมดฤทธิ์ อย่างไรก็ตาม

ก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลต่อการกำจัดเชื้อ เช่น จำนวนเชื้อเริ่มต้น ปริมาณยาที่ได้รับ การบริหารยาในร่างกายผู้ป่วย และภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (Ye *et al.*, 2016) การดื้อยาอาร์ทิมีซินินยังเกี่ยวข้องกับ การกลายพันธุ์ของยีน *kelch13* ของเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งทำให้การตอบสนองต่อยาลดลงทั้งเชื้อที่เลี้ยงในหลอดทดลองและที่แยกได้จากผู้ป่วย (Ariey *et al.*, 2014) พบการกลายพันธุ์ 17 ตำแหน่งของยีน *Pfkelch13* โดยตำแหน่งที่พบมากและมีความสัมพันธ์กับค่า parasite clearance half-life ที่เพิ่มขึ้นและการมีชีวิตรอดของเชื้อในระยะวงแหวนลดลง (RSA_{0-3h}) คือ Y493H, R539T, I543T และ C580Y (Ariey *et al.*, 2014) และถูกยืนยันแล้วว่าตำแหน่งกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการดื้อยาโดยการทำ genome editing ในเชื้อดื้อยาและไวต่อยาด้วยระบบ CRISPR/Cas9 (Ghorbal *et al.*, 2014) และ zinc-finger nucleases (ZFNs) พบว่าอัลลีน C580Y ส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* อย่างมีนัยสำคัญและแพร่ระบาดมากที่สุด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ariey *et al.*, 2014, Straimer *et al.*, 2015) และเป็นตำแหน่งที่พบการแพร่ระบาดมากที่สุดในประเทศไทย มีการสำรวจการกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* จาก 10 จังหวัดในประเทศไทย (แม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ระนอง ศรีสะเกษ จันทบุรี ตราด และยะลา) พบการกลายพันธุ์ 7 ตำแหน่ง คือ N458Y, R539T, E556D, P574L, R575K, C580Y และ S621F โดยพบอัลลีน C580Y มากที่สุด (Talundzic *et al.*, 2015) การสำรวจการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาอาร์ทิมีซินินในจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมีบริเวณติดกับชายแดนลาวและกัมพูชามักพบยีน *Pfkelch13* กลายพันธุ์ถึงร้อยละ 93 ส่วนใหญ่เป็นตำแหน่ง C580Y แต่ยังคงใช้ยาอาร์ทิมีซินินและเมโฟลควินได้ประสิทธิภาพดีเนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่มีจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* น้อยซึ่งแสดงถึงเชื้อยั้งไวต่อยาเมโฟลควิน (Imwong *et al.*, 2015) แต่มีรายงานบริเวณชายแดนไทยพม่าถึงการรักษาด้วยยาอาร์ทิมีซินินและเมโฟลควินที่ไม่ได้ผลต้องเปลี่ยนมาใช้ยาไดไฮโดรออกซีอาร์ทิมีซินินและไพเพอราควิน ในปี 2012 เนื่องจากพบว่าจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ปี 2003 - 2013 โดยตั้งแต่ปี 2010 ตำแหน่ง C580Y พบมากขึ้นแทนที่ตำแหน่ง E252Q แสดงว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงของยีนเกิดขึ้นด้วย (Phyo *et al.*, 2016) Tun และคณะได้สำรวจการแพร่ระบาดการดื้อยาอาร์ทิมีซินินในประเทศพม่าพบยีน *Pfkelch13* ที่มีอัลลีน C580Y มีความชุกสูงบริเวณชายแดนไทยพม่ารวมถึง จ. ตาก ของประเทศไทย (Tun *et al.*, 2015) ในขณะที่ทางตอนเหนือของพม่าใกล้กับชายแดนจีนจะพบตำแหน่งกลายพันธุ์ F446I เด่นชัด รวมถึงในประเทศอินเดีย (Tun *et al.*, 2015, Mishra *et al.*, 2016) ซึ่ง F446I เป็นตำแหน่งที่ส่งผลให้การกำจัดเชื้อปรสิตในกระแสเลือดนานขึ้นประมาณ 4 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ไวต่อยาที่ใช้เวลาเพียง 2.5 ชั่วโมง และเชื้อที่พบอัลลีน C580Y ต้องใช้เวลานานถึง 9 ชั่วโมง (Bonnington *et al.*, 2017) แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งการกลายพันธุ์ C580Y ส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อมากกว่า ประสิทธิภาพของการรักษาในการใช้ยาไดไฮโดรอาร์ทิมีซินินและไพเพอราควิน ในผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในประเทศกัมพูชา พบว่ายารักษาไม่ได้ผลยังตรวจเจอเชื้อหลังจากให้ยาครบ 3 วัน ซึ่งสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 65 นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละ 53

ของผู้ป่วยที่มียีนกลายพันธุ์ C580Y เกิดอาการไข้กกลับซ้ำ (recrudescence) ภายในช่วง 12 - 42 วัน (Spring *et al.*, 2015) ปัจจุบันยังไม่พบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาอาร์ทิมีซินินในแอฟริกา ถึงแม้จะพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ A578S แต่เป็นจุดที่ไม่สัมพันธ์กับความไวต่อยาในหลอดทดลอง (Menard *et al.*, 2016) ดังนั้นการสำรวจและการเฝ้าระวังยังเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งการใช้วิธีทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีที่มีประโยชน์และรวดเร็วสำหรับการติดตามการดื้อยาเพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้ยารักษาและใช้เป็นแนวทางในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้

5. การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย

การวินิจฉัยต้องอาศัยการซักประวัติผู้ป่วยที่มีไข้และอาจอาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดของมาลาเรียหรือเดินทางไปยังพื้นที่ที่มีการระบาดของสูงสงสัยว่าติดเชื้อมาลาเรีย ควบคู่กับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจเพื่อยืนยันโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการ

5.1 การตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียคือการตรวจเชื้อมาลาเรียจากแผ่นฟิล์มเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบ่งเป็นชนิดฟิล์มหนา (thick blood film) และชนิดฟิล์มบาง (thin blood film) การตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีนี้สามารถดูปริมาณ จำแนกระยะและชนิดของเชื้อได้ ใช้เวลาไม่นาน ค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ต้องอาศัยผู้ชำนาญในการดูกล้องและแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้อย่างถูกต้อง โดยใช้เลือดจากปลายนิ้ว (finger prick) หรือเจาะจากหลอดเลือดดำ (venipuncture) สีย้อมฟิล์มเลือด นิยมใช้โดยทั่วไปคือ สี Giemsa หรือสี Wright จะย้อมนิวเคลียสของเชื้อมาลาเรียให้ติดสีแดงม่วง และไซโทพลาสซึมจะติดสีน้ำเงินปนเทา (WHO, 2016a)

5.1.1 การทำฟิล์มหนา (thick blood film)

โดยนำเลือดหยดลงสไลด์แก้วเกลี่ยเลือดให้ให้มีพื้นที่ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ทิ้งให้แห้ง นำไปย้อมสี Giemsa หรือสี Wright แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะมีโอกาสเห็นเชื้อมาลาเรียได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเลือดบาง แต่จะไม่เห็นเม็ดเลือดแดง และแยกชนิดของมาลาเรียได้ยาก โดยนับจำนวนเชื้อต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 200 ตัว แต่หากนับจำนวนเชื้อได้น้อยกว่า 100 ตัว ต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว ให้นำจำนวนเชื้อต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว 500 ตัว คำนวณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียเมื่อเลือด 1 μ l มี เม็ดเลือดขาว 8,000 cells จากสูตร

$$\text{parasites}/\mu\text{l} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้} \times 8,000}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้}}$$

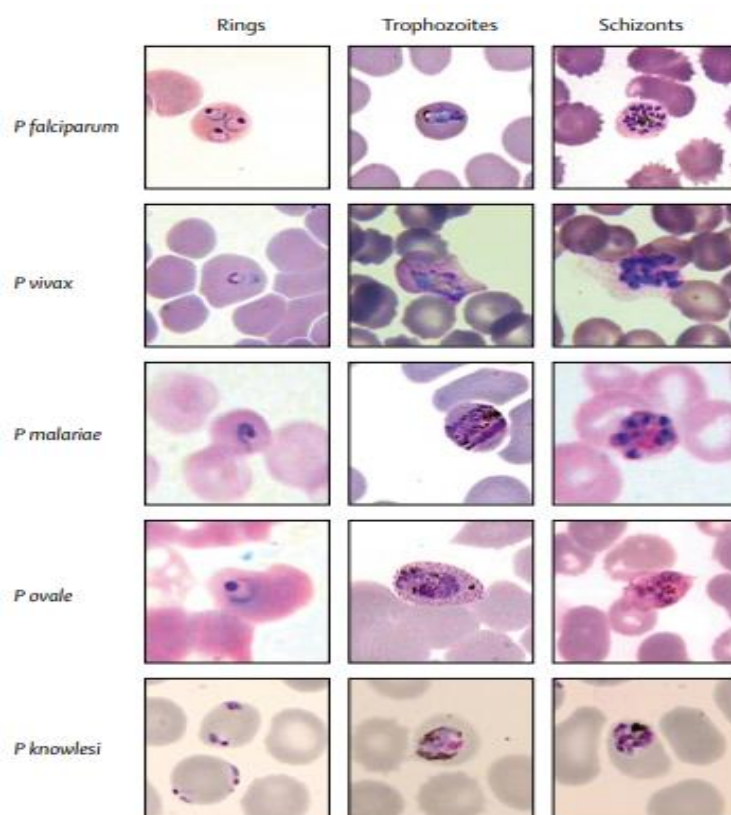
5.1.2 การทำฟิล์มบาง (thin blood film)

นำเลือดหยดลงสไลด์แก้ว แล้วใช้สไลด์สะอาดอีกอันไถสไลด์โดยทำมุมประมาณ 45 องศา ทิ้งให้แห้ง นำไปย้อมสี ในฟิล์มเลือดบางจะเห็นลักษณะของเชื้อมาลาเรียชัดเจนเห็นเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ เลือกนับบริเวณที่มีเม็ดเลือดแดง 250 cells/oil field ตรวจนับ 20 oil field ตรวจนับแยกชนิดและระยะของเชื้อมาลาเรีย รูปร่างลักษณะของเชื้อแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 6 คำนวณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียเมื่อเลือด 1 μ l มี เม็ดเลือดแดง 5,000,000 cells จากสูตร

$$\text{parasites}/\mu\text{l} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ} \times 5,000,000}{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้}}$$

5.1.3 การย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ หรือ Quantitative buffy coat (QBC)

ใช้สี acridine orange ในการย้อมนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ปนแยกเม็ดเลือดแดงออกจากพลาสมาเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียจะลอยขึ้นไปอยู่ชั้นบนสุดของชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) เนื่องจากมีความหนาแน่นน้อยกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อจะเรืองแสง วิธี QBC ตรวจเชื้อมาลาเรียได้ผลแม่นยำเท่ากับการตรวจพลมเลือดชนิดหนา และรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดของวิธี QBC คือมีราคาแพง



รูปที่ 6 ลักษณะของเชื้อมาลาเรียระยะต่างๆเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Ashley *et al.*, 2018)

5.2 การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

อาศัยการตรวจหาแอนติเจนหรือเอนไซม์ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียโดยใช้ชุดตรวจ (rapid diagnostic test) ได้แก่ histidine rich protein-2 (HRP-2) เป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. falciparum* แต่จะยังคงอยู่ในกระแสเลือดได้นานถึงแม้เชื้อมาลาเรียจะถูกทำลายไปแล้วซึ่งอาจแสดงผลบวกปลอมได้จึงไม่เหมาะสำหรับใช้เพื่อติดตามการรักษา และการตรวจหาเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) เป็นโปรตีนที่มีลักษณะแตกต่างกันระหว่างเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด ส่วนใหญ่เป็นการตรวจหา *P. falciparum* และ *P. vivax* ใช้แยกระหว่างการติดเชื้อ *P. falciparum* กับ non-*P. falciparum* เป็นวิธีที่สะดวก ง่ายและรวดเร็ว (Sungkapong, 2016)

5.3 การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

วิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย (DNA หรือ RNA) ที่เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์และใช้กันอย่างแพร่หลายเพราะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความจำเพาะสูง เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย จาก DNA ต้นแบบ ภายในหลอดทดลองจนได้ DNA สายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่าจากการเกิดปฏิกิริยาหมุนเวียนกันหลายรอบภายใต้การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิซึ่งเป็นไปตามขั้นตอนที่ตั้งไว้โดยอาศัยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

5.3.1 Polymerase chain reaction (PCR)

การตรวจหา DNA ของเชื้อมาลาเรีย โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อทำให้สามารถแยกชนิดของเชื้อได้ว่าเป็นชนิดใด จึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง การตรวจเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA บนบริเวณ 18S small subunit ribosomal RNA gene (18S rRNA) ด้วยการทำ PCR 2 รอบ โดยใช้ primers 2 ชุด สำหรับ PCR รอบที่หนึ่งเป็น primer ที่จำเพาะต่อจีโนม *Plasmodium* และ PCR รอบที่สอง ประกอบด้วยคู่ primer ที่จำเพาะต่อแต่ละสปีชีส์ของเชื้อมาลาเรีย 4 ชนิด *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* (Snounou *et al.*, 1993) ตรวจสอบเชื้อแต่ละชนิดจากขนาดที่แตกต่างกันของผลิตภัณฑ์ PCR โดยทำการแยกแถบ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel electrophoresis)

5.3.2 Multiplex PCR

มีการใช้วิธี multiplex PCR เพื่อจำแนกเชื้อมาลาเรียในคน 5 สปีชีส์ คือ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* และ *P. knowlesi* โดยปฏิกิริยาแรกตรวจการติดเชื้อจีโนม *Plasmodium* และปฏิกิริยาที่ 2 ตรวจสอบสปีชีส์ของเชื้อทั้ง 5 ชนิด บนบริเวณ 18S rRNA ได้ในครั้งเดียวโดยรวมเอา primers ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิดไว้ในปฏิกิริยาเดียวกัน จึงเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะสูง รวดเร็วกว่าวิธี nested PCR มีประโยชน์ในการจำแนกการติดเชื้อสปีชีส์เดียวหรือ

มากกว่า 1 สปีชีส์ แต่มีความยุ่งยากในขั้นตอนการออกแบบ primer และการหาอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในปฏิกิริยา (Miguel-Oteo *et al.*, 2017)

5.3.3 Real time PCR

ตรวจสอบเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี real time PCR สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ได้จากได้จากการวิเคราะห์ melting curve ซึ่งเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* จะมีค่า melting temperature (Tm) เฉพาะตัวแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณ GC และความยาวของผลิตภัณฑ์ โดยติดตามได้ทุกระยะระหว่างที่ปฏิกิริยาดำเนินอยู่ด้วยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เช่น การใช้สี SYBR Green โดยไม่ต้องนำมาวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis (Mangold *et al.*, 2005) หรือการใช้ probe ติดตาม โดยออกแบบ primer ให้จำเพาะกับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดและติดตามด้วยการใช้ TaqMan probe ที่ติดฉลากสารเรืองแสง reporter dye ที่ปลาย 5' และติดฉลาก quencher dye ที่ปลาย 3' เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปมีการเติมนิวคลีโอไทด์จนมาถึง probe เอนไซม์ DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติ 5' nuclease จะตัด reporter ให้หลุดออกไปและ quencher สามารถเรืองแสงได้ อ่านผลจากกราฟ amplification curve สามารถแยกเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ คือ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* ได้ (Lee *et al.*, 2002)

6. เทคนิค Loop - mediated isothermal amplification (LAMP)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจโดยใช้อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว (isothermal amplification) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง มีความรวดเร็วและไม่ต้องอาศัยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ซับซ้อน เช่น เครื่อง PCR มีด้วยกันหลายวิธี ตัวอย่างเช่น nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), helicase - dependent amplification (HDA), rolling circle amplification (RCA) และ strand displacement amplification (SDA) (Asiello and Baeumner, 2011, Yan *et al.*, 2014) สำหรับเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆอย่างแพร่หลาย

วิธีการเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค LAMP ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 2000 โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่น (Notomi *et al.*, 2000) ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองเหมือนกับเทคนิค PCR แต่เทคนิค LAMP อาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ทำหน้าที่แยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (strand displacement) ภายใต้อุณหภูมิคงที่ประมาณ 55 - 65°C และอาศัย primer จำนวน 4-6 เส้น ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 6-8 ตำแหน่ง (รูปที่ 7) สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ถึง 10⁹ เท่า ในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง การเพิ่มขยายยีนในปฏิกิริยา LAMP จะมีการปลดปล่อยสาร

pyrophosphate ออกมาจับกับ magnesium ion ที่อยู่ในสารละลายกลายเป็น magnesium pyrophosphate ซึ่งเป็นตะกอนสีขาวสามารถมองเห็นความขุ่นด้วยตาเปล่า (Mori *et al.*, 2001)

LAMP primer จำนวน 4 เส้น ประกอบด้วย outer primer จำนวน 2 เส้น และ inner primer จำนวน 2 เส้น ดังนี้

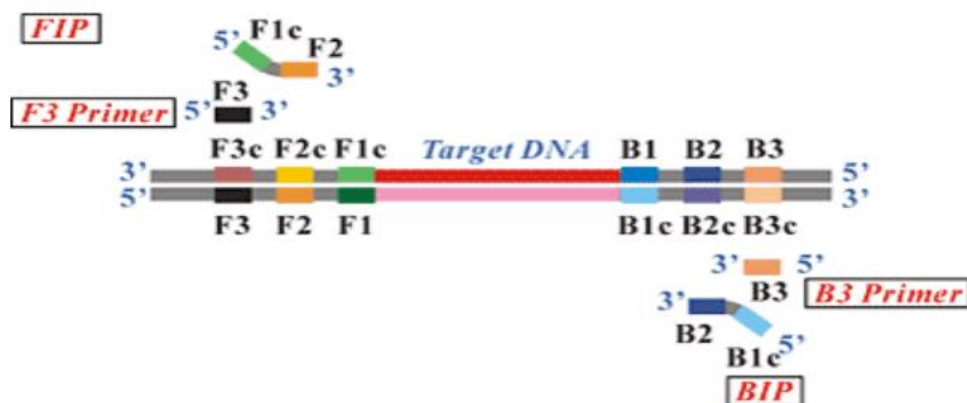
forward outer primer (F3) : ประกอบด้วยบริเวณ F3 มีเบสคู่สมกับ F3c ของยีนเป้าหมาย

reverse outer primer (B3) : ประกอบด้วยบริเวณ B3 มีเบสคู่สมกับ B3c ของยีนเป้าหมาย

forward inner primer (FIP) : ประกอบด้วยบริเวณ F1c ที่ปลาย 5' และ F2 ที่ปลาย 3' มีเบสคู่สมกับ F1 และ F2c ของยีนเป้าหมาย ตามลำดับ

backward inner primer (BIP) : ประกอบด้วยบริเวณ B1c ปลาย 5' และ B2 ที่ปลาย 3' มีเบสคู่สมกับ B1 และ B2c ของยีนเป้าหมาย ตามลำดับ

นอกจากนี้การเพิ่ม loop primer อีก 2 เส้น ซึ่งจำเพาะกับบริเวณ loop ของ LAMP product จะทำให้ primer มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมายมากขึ้นถึง 8 ตำแหน่ง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาให้เกิดเร็วยิ่งขึ้น (Nagamine *et al.*, 2002)

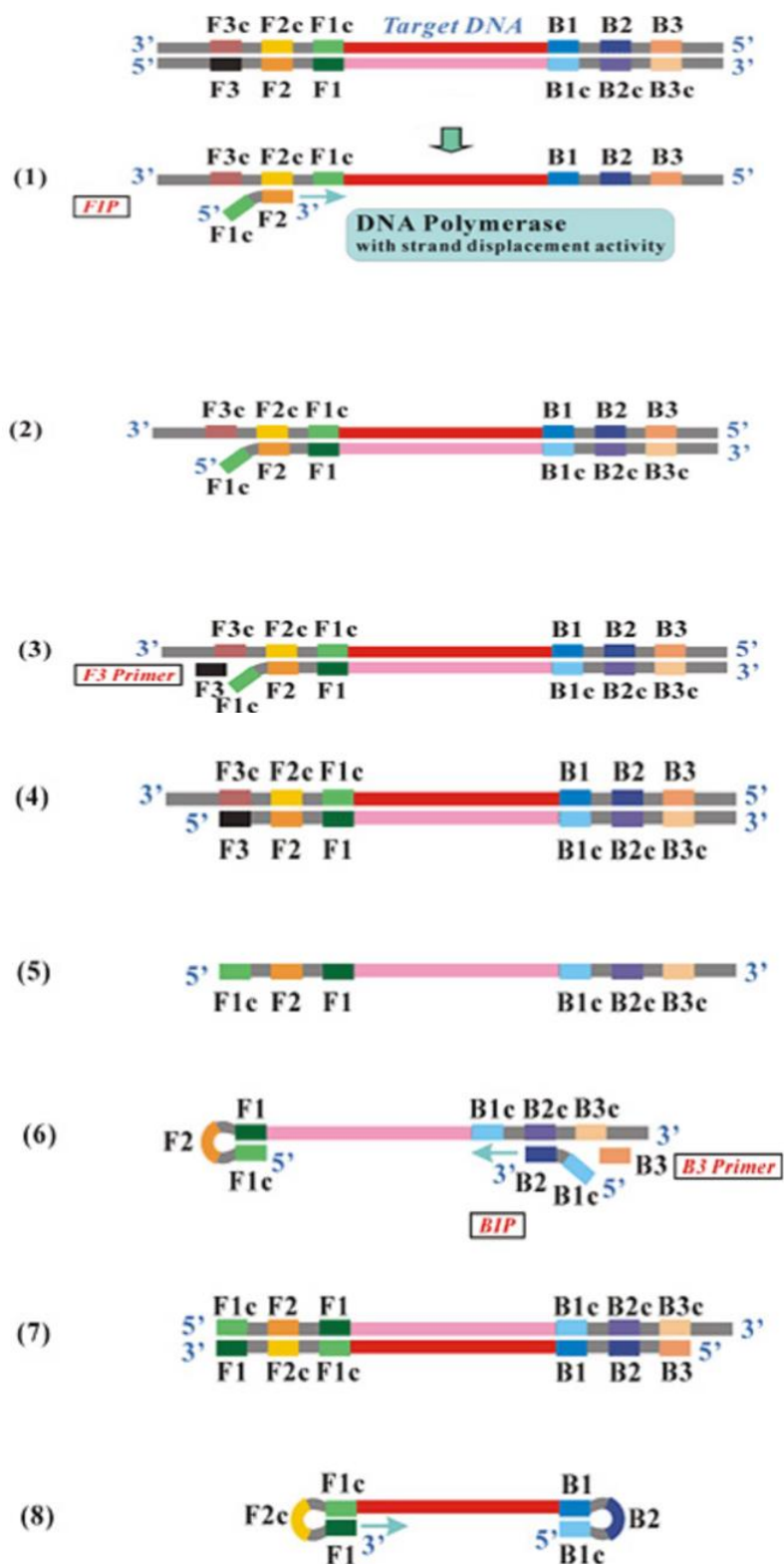


รูปที่ 7 LAMP primer จำนวน 4 เส้น จำเพาะกับยีนเป้าหมาย 6 ตำแหน่ง (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

6.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาของ LAMP

6.1.1 Non - cyclic step

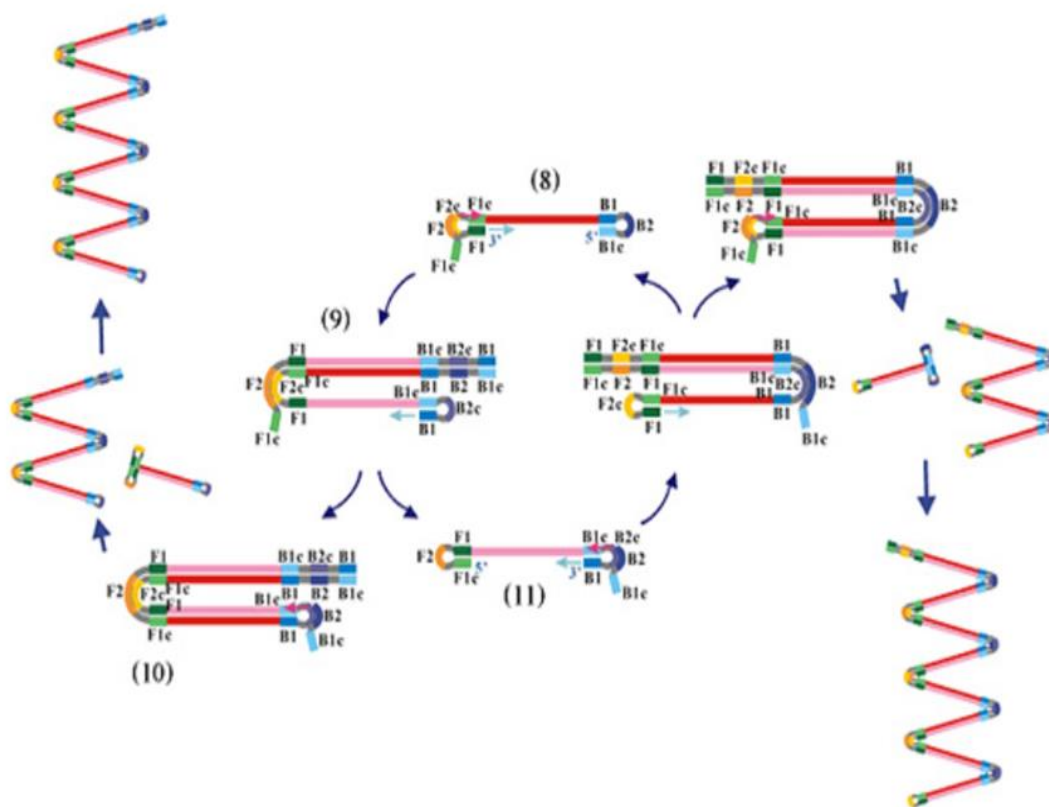
ในปฏิกิริยา LAMP ใช้อุณหภูมิประมาณ 65°C ซึ่ง inner primer จะสามารถจับกับยีนเป้าหมาย (dsDNA) และมีเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ทำหน้าที่สังเคราะห์สาย DNA โดยอาศัยคุณสมบัติ strand displacement โดยไม่ต้องมีขั้นตอน denaturation เหมือนกับวิธี PCR ที่ต้องแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวก่อน เริ่มจาก FIP primer ตำแหน่ง F2 (ปลาย 3') จะเข้าจับกับบริเวณ F2c ของยีนเป้าหมาย ส่วนด้านปลาย 5' F1c เป็นปลาย overhang ยื่นออกมา และมีการเริ่มสร้างสาย DNA ต่อจากปลาย 3' ของ primer F2 จากนั้น F3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง F3c เอนไซม์จะทำหน้าที่สร้าง DNA สายใหม่ พร้อมกับแยกสาย FIP-link complementary strand ออกไป (DNA สายเดี่ยวที่สร้างขึ้นจากการเข้าจับของ FIP primer) ซึ่งเส้นนี้ ด้านปลาย 5' จะมีตำแหน่งของ F1c และ F1 ซึ่งเป็นส่วนที่มีลำดับเบสคู่สมกัน จึงสามารถจับกันและเกิดเป็น loop ได้ ต่อจากนั้น ตำแหน่ง B2 ของ BIP primer จะเข้าจับกับตำแหน่ง B2c ของยีนเป้าหมาย (ปลาย 5' B1c overhang) และทำการสังเคราะห์สาย DNA ที่ปลาย 3' ของ B2 primer จากนั้น B3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง B3c เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase สร้าง DNA สายใหม่ต่อจากปลาย 3' ของ B3 พร้อมกับแยกสาย BIP-link complementary strand ออกไป ซึ่ง DNA ที่ถูกแยกออกมานี้จะมีการจับกันเป็น loop ของตำแหน่ง B1c และ B1 เช่นกัน และเกิด loop ทั้งปลายสองข้างของ DNA ขั้นตอนนี้จึงเป็นขั้นตอนการสร้าง loop ทั้งสองข้างของยีนเป้าหมายซึ่งมีรูปร่างคล้ายดัมเบล (dumbbell - shaped DNA structure) เพื่อเป็นโครงสร้างเริ่มต้นในการเพิ่มขยายยีนแบบวนซ้ำ (LAMP cycling) ต่อไป (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ขั้นตอน non - cyclic step ของเทคนิค LAMP
(Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

6.1.2 Cyclic amplification step

DNA สามารถสร้างต่อจากปลายเปิดด้าน 3' ซึ่งมีการจับกันนิวคลีโอไทด์คู่สมอยู่ (ตำแหน่ง F1 และ F1c) FIP inner primer สามารถเข้าจับตรงบริเวณ loop ของสาย DNA และมีการสร้างสาย DNA ต่อ จนได้เป็น loop DNA ที่ปลาย 3' มีนิวคลีโอไทด์คู่สมระหว่าง B1 และ B1c ซึ่งสร้าง DNA ต่อได้จากปลายนี้ได้ และทำให้มีการปลดปล่อยสาย FIP-link complementary strand ออกมา BIP inner primer เข้าจับตรงบริเวณ loop และมีการสร้างสาย DNA สาย FIP-link complementary strand ซึ่งมีโครงสร้างเป็น dumbbell - shaped DNA structure สามารถสร้างสาย DNA จากปลายเปิดด้าน 3' ได้อีกเหมือนขั้นตอนเดิม เกิดการทำงานเวียนซ้ำไปเช่นนี้อย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการสร้างสาย DNA ที่ยาวและมีขนาดแตกต่างกันมากมาย มีโครงสร้างคล้ายดอกกะหล่ำ (cauliflower - like structure) (รูปที่ 9)

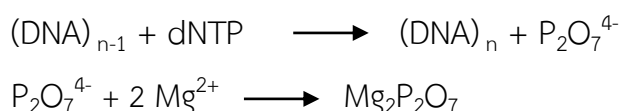


รูปที่ 9 ขั้นตอน cyclic step ของเทคนิค LAMP

(Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

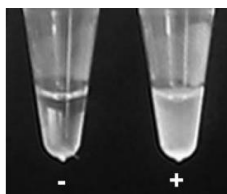
6.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP

ระหว่างการสังเคราะห์ DNA โดยการทำงานของ *Bst* DNA polymerase ในปฏิกิริยา LAMP จะมีการปลดปล่อย pyrophosphate ions จาก dNTPs เป็นผลผลิตพลอยได้ (Mori et al., 2001) pyrophosphate ions ($P_2O_7^{4-}$) จะสามารถจับกับ magnesium ions (Mg^{2+}) เกิดเป็นตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate ($Mg_2P_2O_7$) เห็นได้ด้วยตาเปล่าดังสมการ



6.2.1 การดูความขุ่น

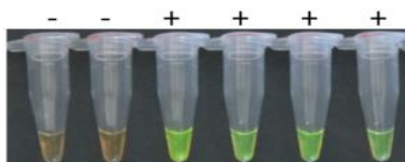
ตะกอน magnesium pyrophosphate ทำให้สารละลายขุ่นเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ความขุ่นที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณ DNA ที่ถูกสร้างขึ้น (Mori et al., 2001) หรืออาจปั่นเพื่อดูตะกอน (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วยการดูความขุ่น; (-) ผลลบ, (+) ผลบวก (Kubota et al., 2008)

6.2.2 การใช้สีฟลูออเรสเซนต์

การใช้สีฟลูออเรสเซนต์ เช่น SYBR Green I เป็น DNA-binding dyes ซึ่งจะจับกับ dsDNA ทำให้เห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ดูภายใต้แสง UV บางครั้งในปฏิกิริยา ตะกอนเกิดขึ้นน้อยทำให้สังเกตได้ยาก การใช้สีจึงมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าการดูตะกอนเพียงอย่างเดียว โดยเติมสีหลังจากเกิดปฏิกิริยา LAMP เสร็จสิ้น ถ้ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียวเมื่อดูภายใต้แสง UV (รูปที่ 11)

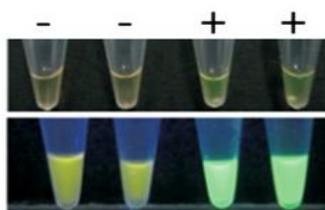


รูปที่ 11 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วยการดูสีฟลูออเรสเซนต์; (-) ผลลบ, (+) ผลบวก (Zhou et al., 2014)

6.2.3 การใช้ colorimetric indicators

1. การใช้ calcein

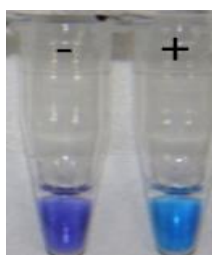
เป็น metal indicator สามารถเติมได้ตั้งแต่เริ่มการทดสอบทำให้ลดปัญหาการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ LAMP จากการเปิดฝาหลอดหลังปฏิกิริยา โดย calcein จะจับกับ manganese ion และจะถูกบดบังการเรืองแสงไว้ เมื่อมีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจากก็จะเกิด pyrophosphate จะไปแย่งจับกับ manganese ion ทำให้สาร calcein เป็นอิสระแล้วเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา ผลบวกจะเห็นสารละลายเป็นสีเขียว ผลลบเป็นสีส้ม เมื่อส่องภายใต้แสง UV หรือดูภายใต้แสงสีขาว (Tomita *et al.*, 2008) (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วยการดูสี calcein; (-) ผลลบ, (+) ผลบวก (Zhou *et al.*, 2014)

2. การใช้ hydroxynaphthol blue (HNB)

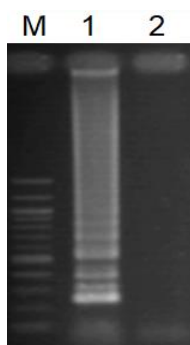
HNB เป็น metal ion-binding indicator dye ซึ่งจะเติมก่อนเริ่มปฏิกิริยา เช่นเดียวกับ calcein ทำให้ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนจากการเปิดปิดฝาหลอด ตอนเริ่มต้น HNB จะจับอยู่กับ Mg^{2+} และปรากฏสีเป็นสีม่วง เมื่อเกิดการ polymerization ไอออน Mg^{2+} จะถูกใช้ไปในปฏิกิริยา ทำให้หลุดเป็นอิสระจาก HNB จึงเปลี่ยนเป็นสีฟ้า (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยการดูสี HNB; (-) ผลลบ, (+) ผลบวก (Duan *et al.*, 2014)

6.2.4 การใช้ gel electrophoresis

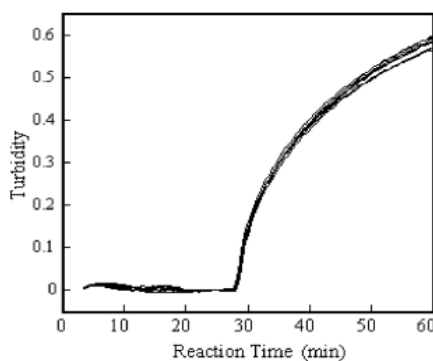
การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคนิค LAMP ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จะเห็น band หลายขนาด (ladder like pattern band) เนื่องจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี LAMP จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีความยาวแตกต่างกัน (Notomi *et al.*, 2000) (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา LAMP ด้วยวิธี gel electrophoresis; M คือ ladder, แถวที่ 1: ผลบวก, แถวที่ 2: ผลลบ

6.2.5 การใช้เครื่อง real time turbidimeter

หากมีตะกอนของผลิตภัณฑ์ LAMP เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบจากเครื่องวัดความขุ่นแบบ real time ที่ความยาวคลื่นที่จำเพาะ จะแสดงผลเป็นรูปกราฟความขุ่นเทียบกับเวลา (Mori *et al.*, 2004) (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 การตรวจสอบ LAMP ด้วยการใช้เครื่อง real time turbidimeter (Mori *et al.*, 2004)

ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา

6.3 ข้อดีของเทคนิค LAMP

6.3.1 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ที่อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว ไม่มีขั้นตอน denaturation จึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) เหมือนวิธี PCR ซึ่งมีราคาแพงกว่า สามารถใช้ heat block หรือ water bath เพื่อตั้งค่าอุณหภูมิก็เพียงพอ เทคนิค LAMP จึงเป็นวิธีที่ง่าย

6.3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA และการตรวจสอบผลทำได้ในขั้นตอนเดียวโดยวิธีการอ่านผลทำได้ง่าย สามารถดูผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า ทั้งการดูความขุ่น, การอ่านผลจากสี ฟลูออเรสเซนซ์ หรือสีย้อมอื่นๆ การเพิ่มปริมาณ DNA และการตรวจสอบผลทำได้ในขั้นตอนเดียว

6.3.3 เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงจากการใช้ primer 4-6 เส้น ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย 6-8 ตำแหน่ง และ มีความไวสูงสามารถตรวจสอบ DNA ได้ที่ 6 copies/reaction (Notomi *et al.*, 2000)

การตรวจหาเชื้อ *Arcobacter* species เป็นเชื้อที่พบปนเปื้อนในอาหารและเป็นสาเหตุของอาการท้องเสีย ด้วยวิธี LAMP และวิธี multiplex PCR พบว่า เทคนิค LAMP มีความไวมากกว่าวิธี multiplex PCR 10 - 1,000 เท่า (Wang *et al.*, 2014)

6.3.4 เทคนิค LAMP ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดของวิธี PCR ที่อาจมีตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) เช่น ไขมัน, โกลโคเจน, phenolic compounds, โลหะหนัก, ฮีม, ฮีโมโกลบิน, ยูเรีย, ไมโอโกลบิน และอื่นๆ จากตัวอย่างที่ใช้ไม่ว่าจะเป็น ตัวอย่างจากอาหาร ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างจากสารคัดหลั่งในร่างกาย เลือด ปัสสาวะ เนื้อเยื่อต่างๆ เป็นต้น (Wilson, 1997)

Poon และคณะ ตรวจหาการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จากยีน 18SrRNA ด้วยวิธี LAMP จากตัวอย่างเลือดโดยตรงโดยไม่ผ่านการสกัด DNA เพียงแค่ให้ความร้อน และพบว่าไม่มีตัวยับยั้งปฏิกิริยา ต่างจากวิธี PCR ที่ฮีมจากเลือดมีผลรบกวนปฏิกิริยา (Poon *et al.*, 2006)

Edwards และคณะ ได้ทดสอบหาเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ในตัวอย่างปัสสาวะ พบว่าปฏิกิริยา LAMP จะไม่ถูกรบกวนเมื่อความเข้มข้นของยูเรียน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.8 M ในขณะที่ปฏิกิริยา PCR ต้องมีความเข้มข้นน้อยกว่า 100 mM (Edwards *et al.*, 2014)

อย่างไรก็ตามข้อด้อยของเทคนิค LAMP คือการออกแบบ primer ที่ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมาย 6-8 ตำแหน่ง

6.4 การออกแบบ LAMP primer

การออกแบบ LAMP primer ควรต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ดังนี้ (Lee *et al.*, 2007, Parida *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2016)

6.4.1 GC content

GC content ของ primers ควรมีค่าประมาณ 50-60% สำหรับยีนเป้าหมายที่เป็น GC rich (GC content > 60%) และ 40-50% สำหรับ AT rich (GC content < 45%)

6.4.2 Melting temperature (T_m)

ค่า T_m ของ primer ควรมีค่าอยู่ในช่วง 60-65°C สำหรับยีนเป้าหมายที่เป็น GC rich และ 55-60°C สำหรับ AT rich

6.4.3 การเกิด secondary structure

การออกแบบ primer ควรหลีกเลี่ยงการเกิด secondary structure โดยปลาย 3' ของ primer ไม่ควรเป็น AT rich และตรวจสอบว่า primer แต่ละเส้นจะไม่จับกันเอง

6.4.4 The stability of primer end หรือ ความเสถียรด้านปลายของ primer

ปลาย 3' ของ F2, B2, F3 และ B3 และ ปลาย 5' ของ F1P และ B1P ซึ่งเป็นบริเวณเริ่มต้นในการสร้างสาย DNA ควรมีค่า ΔG หรือ การเปลี่ยนแปลง free energy ที่เกิดขึ้นระหว่างตัวเริ่มต้นปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ น้อยกว่า -4 kcal/mol

6.4.5 ความยาวของ primer และระยะห่างระหว่าง primer

- F1c และ B1c ควรมีความยาวประมาณ 18-23 bp
- F2, B2, F3 และ B3 ควรมีความยาวประมาณ 18-22 bp
- ปลาย 5' ของ F2 และ B2 ควรห่างกันประมาณ 120-180 bp
- ปลาย 5' ของ F2 ถึง 5' ของ F1 และ ปลาย 5' ของ B2 ถึง 5' ของ B1 ควรห่างกันประมาณ 40-60 bp
- ระยะระหว่าง F2 ถึง F3 และ B2 ถึง B3 ควรห่างกันประมาณ 0-20 bp

6.5 การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP เพื่อระบุชนิดของเชื้อชนิดต่างซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคทางคลินิกมากมาย เช่น ไวรัสของมะเร็งปากมดลูก (Enomoto *et al.*, 2005, Sugiyama *et al.*, 2005) RNA virus ของเชื้อเดงกี (Parida *et al.*, 2005) การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Iwamoto *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2012, Lim *et al.*, 2013) เชื้อรา (Sun *et al.*, 2010) และเชื้อปรสิต เช่น *Entamoeba histolytica* (Mwendwa *et al.*, 2017), *Naegleria fowleri* (Mahittikorn *et al.*, 2015), *Toxoplasma gondii* (Sun, X. M. *et al.*, 2017) เป็นต้น รวมถึงการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย

Han และคณะ ใช้เทคนิค LAMP ในการจำแนกชนิดเชื้อมาลาเรีย 4 ชนิด คือ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* โดยออกแบบ LAMP primer ให้จำเพาะต่อจีโนมและสปีชีส์ของยีนบริเวณ 18s rRNA และเปรียบเทียบผลกับวิธี nested PCR พบว่าได้ผลที่สอดคล้องกัน แต่เทคนิค LAMP สามารถตรวจเชื้อที่มีปริมาณน้อยกว่าและเวลาน้อยกว่า (Han *et al.*, 2007) การทดลองของ Lau และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจสอบเชื้อมาลาเรียทั้ง 5 ชนิด ที่ก่อโรคในคน โดยสามารถตรวจสอบเชื้อ *P. falciparum*, *P. vivax* และ *P. malariae* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเพียง 1 copy และ 10 copies สำหรับเชื้อ *P. knowlesi* และ *P. ovale* และพบว่าวิธี LAMP มีความไวมากกว่าวิธี nested PCR 10 เท่า (Lau *et al.*, 2016)

เทคนิค LAMP ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน เช่น ในด้านเกษตรกรรมมีการนำเอาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ติดตามการดื้อยาฆ่าเชื้อรา โดยตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน beta-tubulin ที่ตำแหน่ง F167Y ในเชื้อ *Fusarium graminearum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค fusarium head blight (Duan *et al.*, 2014) และตำแหน่ง E198A และ F200Y ของยีน beta-tubulin ที่เกี่ยวข้องกับสารดื้อยาที่ทำให้พืชผลทางการเกษตรเกิดความเสียหาย (Duan *et al.*, 2014, Duan *et al.*, 2015, Duan *et al.*, 2016) มีการใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจหาการดื้อยาฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid ของยุงก้นปล่องซึ่งเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *kdr* ที่ตำแหน่ง L1014F (Badolo *et al.*, 2012) และยีน *ace-1* ที่ตำแหน่ง G119S ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate และ carbamate (Badolo *et al.*, 2015) จึงเป็นวิธีที่มีประโยชน์ใช้ในการติดตามและเป็นแนวทางควบคุมการแพร่ระบาดของดื้อยาได้ การใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจสอบการดื้อยาต้านมาลาเรียคลอโรควินของเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง K76T ของยีน *Pfcr* ตรวจสอบผลได้ด้วยตาเปล่าได้ที่ความเข้มข้น DNA ต่ำสุดน้อยกว่า 2 ng/ μ l (Chahar *et al.*, 2017) มีการใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับ lateral flow strip ตรวจสอบการดื้อยาไพริเมธามีน ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* สามารถตรวจสอบ DNA ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1 pg และ 1 ng ตามลำดับ (Yongkiettrakul *et al.*, 2017)

การออกแบบ primer ให้จำเพาะต่อตำแหน่งการกลายพันธุ์ มักออกแบบให้ตำแหน่งกลายพันธุ์อยู่ที่ปลาย 3' หรือ 5' ของ FIP หรือ BIP primer (Badolo *et al.*, 2012, Duan *et al.*, 2014, Duan *et al.*, 2014, Duan *et al.*, 2015, Duan *et al.*, 2016, Chahar *et al.*, 2017) หรือมีตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ปลาย 5' ของทั้ง FIP หรือ BIP primer (Zhang *et al.*, 2016) ทำให้สามารถแยกยีนกลายพันธุ์ออกจากยีน wild type ได้ หรือมีการเพิ่ม mismatch nucleotide จะทำให้ความจำเพาะของ primer ต่อยีนเป้าหมายมากขึ้น

เทคนิค LAMP จึงเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้มากถึง 10^9 เท่า ภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว จึงเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง ถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในห้องปฏิบัติการทั้งด้านงานวิจัยทางชีวโมเลกุล ดานการแพทย์ สำหรับการดื้อยาอาร์ทิมีซินินของเชื้อ *P. falciparum* เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาและพัฒนาเทคนิค SNP-LAMP เพื่อใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13*

การศึกษาของ Mohon และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ C580Y ของยีน *Pfkelch13* พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อได้ตั้งแต่ 500-1,000,000 parasites/ μ l ภายในเวลา 65 นาที ด้วยการวัดความขุ่นกับเครื่อง nanodrop และการดูด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ มีความไวและความจำเพาะของวิธีทดสอบเท่ากับ 100 และ 97.3% ตามลำดับ และการศึกษาของ Imai และคณะ ได้ ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ด้วยเทคนิค LAMP เช่นกัน โดยใช้ร่วมกับ MinION nanopore sequencer ที่สามารถตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องภายในเวลาไม่นาน สามารถตรวจสอบเชื้อได้ต่ำสุดที่ 10 copies/reaction มีความไวและความจำเพาะของวิธีเท่ากับ 100% (Imai *et al.*, 2018) ซึ่งล้วนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่มีข้อจำกัดบางประการ เช่น การเติมสีฟลูออเรสเซนต์จะต้องเติมหลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้นซึ่งการเปิดปิดฝาหลังจากการเพิ่มจำนวนยีนแล้วอาจทำให้มีการฟุ้งของผลิตภัณฑ์ LAMP ทำให้เกิดการปนเปื้อนและผลบวกปลอมได้ การตรวจสอบความขุ่นของผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วยเครื่อง nanodrop และ การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการใช้เครื่อง MinION nanopore sequencer ซึ่งยังต้องอาศัยเครื่อง fluorometer วัดความเข้มข้นของ DNA, rapid barcoding sequencing kit สำหรับอ่านบาร์โคด สำหรับเครื่องมือเหล่านี้มีราคาแพงและไม่ใช้กันในห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* ด้วยการดูการเปลี่ยนแปลงของสี hydroxynathol blue (HNB) ได้ด้วยตาเปล่า และใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิอย่างง่ายเช่น water bath หรือ heat block โดยออกแบบ primer ให้จำเพาะต่อตำแหน่งกลายพันธุ์ C580Y เพื่อสามารถตรวจสอบการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ ณ จุดดูแลผู้ป่วยและใช้ในการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการดื้อยาได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค SNP-LAMP ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยาอาร์ทิมีซิ닌
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค SNP-LAMP ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* กับวิธี DNA sequencing
3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค SNP-LAMP ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y จากจุดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum*

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Luria Bertani (LB) broth	Difco
Luria Bertani (LB) agar	Difco

2. ยาปฏิชีวนะ

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Ampicillin	Sigma

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Boric acid	Merck
Ethidium bromide	Sigma
Tris base	Promega

3.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

ชนิด	บริษัทผู้ผลิต
Agarose	Promega
Betaine	Sigma
<i>Bst</i> DNA polymerase	New England Biolabs
dNTPs	BioLabs
hydroxyl naphthol blue (HNB)	Sigma
Platinum <i>Taq</i> DNA polymerase	Invitrogen

Primers

Sigma

3.3 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade) (ต่อ)

ชนิด

บริษัทผู้ผลิต

Taq DNA polymerase

Invitrogen

T₄ DNA ligase

Promega

10X *Bst* buffer

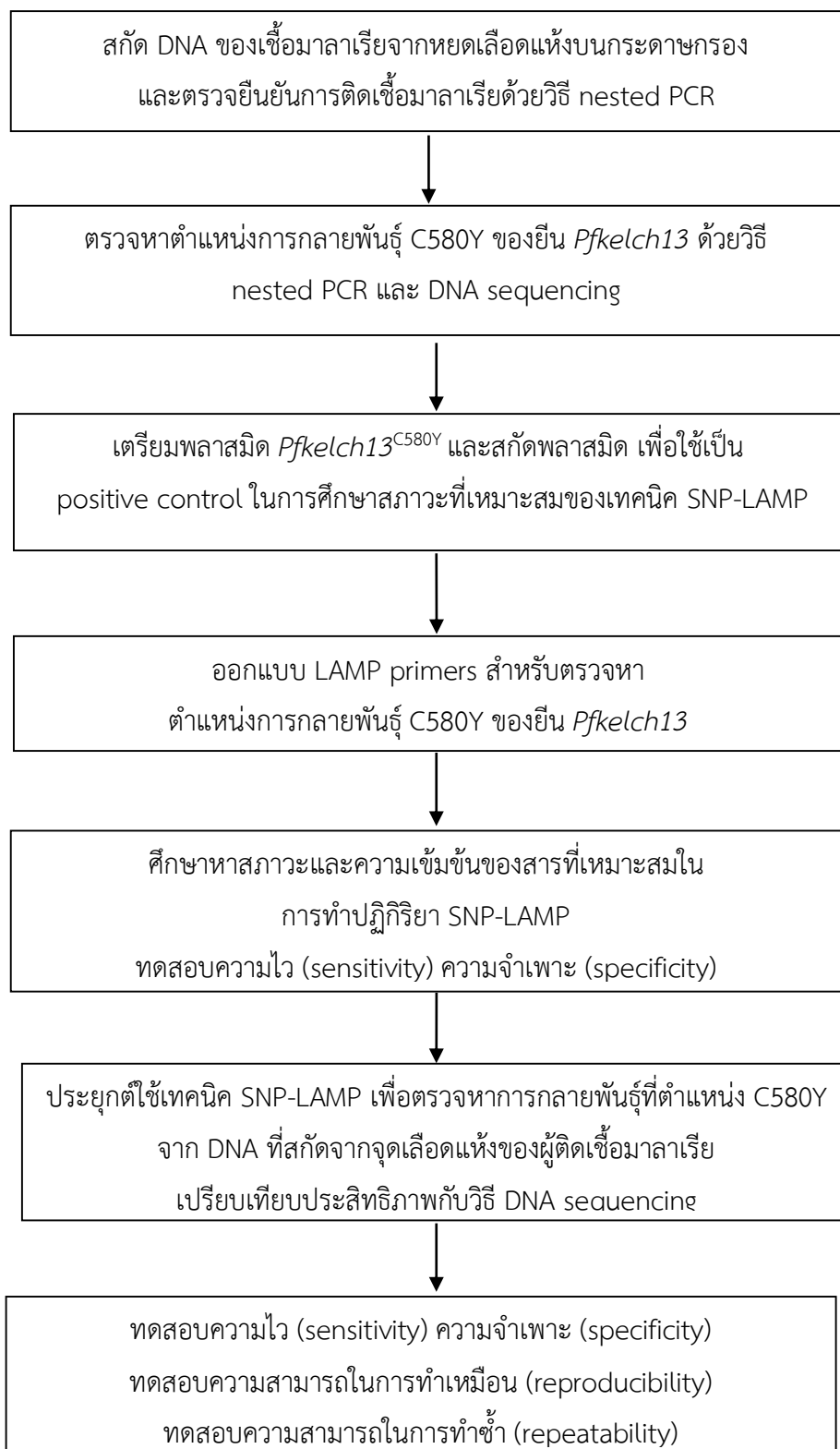
New England Biolabs

100 bp DNA ladder

New England Biolabs

4. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วสำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- เครื่องชั่ง (Denver Instrument, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf, Germany)
- เครื่อง vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- เครื่องวัด pH (Metrohm, Switzerland)
- เครื่อง PCR (Bio-Rad, T100 Thermal cycler, USA)
- ตู้แช่แข็ง -20°C และ -70°C (Sanyo, Japan)
- ตู้อบร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Heraeus, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Labline Instrument Inc, USA)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Tomy, Japan)
- ชุดเจล electrophoresis และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า power supply (Bio-Rad)
- Gel Documentation (Syngene, USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Julabo, Germany)
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- หลอด PCR ขนาด 0.2 ml
- Automatic pipette ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 µl (Eppendorf, Germany)



รูปที่ 16 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลองทั้งหมดในการศึกษานี้

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ ได้รับมาจากสำนักป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช และ 12 จังหวัดสงขลา ซึ่งได้รวบรวมตัวอย่างดังกล่าวมาจากพื้นที่ที่มีการพบเชื้อมาลาเรียในบริเวณภาคใต้ของไทย 5 จังหวัดได้แก่ จังหวัดชุมพร, ระนอง, สุราษฎร์ธานี พังงา และยะลา ช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 2557-2560 โดยเจ้าหน้าที่เป็นผู้ทำการเจาะเลือดจากปลายนิ้วเพื่อตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ และหยดเลือดประมาณ 4-5 จุด ประมาณ 80 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 3) ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บใส่ถุงพลาสติกเพื่อนำมาสกัดสารพันธุกรรมต่อไป โดยตัวอย่างเลือดที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทั้งหมดจำนวน 227 ตัวอย่าง 16 ตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร 14 ตัวอย่างจากพังงา 109 ตัวอย่างจากจังหวัดระนอง 65 ตัวอย่าง จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี และ 23 ตัวอย่าง จากจังหวัดยะลา

การศึกษาคั้งนี้ได้รับเอกสารรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (REC57-0077-19-2 และ REC60-096-19-2)

2. การสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ออกจากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN, Hidden, Germany) โดยตัดกระดาษที่มีจุดเลือดแห้ง ขนาดประมาณ 3 ตารางมิลลิเมตร ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลังจากนั้นเติมน้ำยา ATL ปริมาตร 180 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเติมน้ำยา proteinase K ปริมาตร 20 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงเติมน้ำยา AL ปริมาตร 200 μ l และ vortex อีกครั้ง นำหลอด microcentrifuge ไป incubate ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา จึงเติม absolute ethanol (96–100%) ปริมาตร 200 μ l ลงในสารละลายผสมกันอย่างรวดเร็วโดยการใช้ pipette ดูดขึ้นลง ย้ายสารละลายลง QIAamp mini spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ตกลงด้านล่างทิ้ง เติม buffer DW1 ปริมาตร 500 μ l ลงใน column เติม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง spin column membrane เทสารละลายที่ตกลงด้านล่างทิ้ง และเติม buffer DW2 ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ปั่นเหวี่ยง spin column membrane เพื่อระเหย absolute ethanol เหลืออยู่ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAamp mini spin column ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml อันใหม่ เติมน้ำเกรด PCR ปริมาตร 100 μ l ลงใน spin column membrane ปิดฝา

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลาย DNA ไว้ที่ -20°C

3. การตรวจแยกชนิดของเชื้อมาลาเรีย

ตรวจแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR ตามวิธีของ Snounou และคณะ (Snounou *et al.*, 1993) โดย primer มีความจำเพาะต่อยีน 18s rRNA ใน PCR ขั้นที่ 1 ตรวจหาจีโนมโดยใช้ genus-specific primer rPLU1/rPLU5 หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาเป็นต้นแบบของ PCR ขั้นที่ 2 โดยใช้ primer คู่ rPLU3/rPLU4

นำ PCR product ในขั้นที่ 1 มาเป็นต้นแบบใน PCR รอบที่ 2 สำหรับ species-specific PCR ซึ่งจะใช้คู่ primer ที่จำเพาะต่อชนิดเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด การตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ใช้ primer คู่ rFAL1/rFAL2 ตรวจหาเชื้อ *P. vivax* ใช้ primer คู่ rVIV1/rVIV2 ตรวจหาเชื้อ *P. malariae* ใช้ primer คู่ rMAL1/rMAL2 และ *P. ovale* ใช้ primer rOVA1/rOVA2 สำหรับ primers ที่ใช้ในขั้นตอนแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียได้แสดงในตารางที่ 1 องค์ประกอบสารในการทำปฏิกิริยา PCR และสถานะในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 2 และ 3 หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.5% gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ที่กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation

นำ DNA ที่ตรวจสอบว่าเป็นชนิด *P. falciparum* ไปทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยการระเหยแห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระเหยสารแบบสุญญากาศ (speed vacuum) ด้วยความเร็วประมาณ 1,700 rpm ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำเกรด PCR ในปริมาตร 20 μl ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex ตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ทั้งก่อนและหลังการระเหยแห้ง โดยการนำสารละลาย DNA ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (Maestrogen, Las Vegas, USA) เก็บรักษาสารละลาย DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งานต่อไป

ตารางที่ 1 primers ที่ใช้ในแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR

	Primer	Sequence 5'→3'	product size (bp)		
Genus - specific	Nest1	rPLU1	TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTA	1,640	
		rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC		
	Nest2	rPLU3	TTTTTATAAGGATAACTACGAAAAGCTGT		240
		rPLU4	TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC		
Species - specific	<i>P. falciparum</i>	rFAL1	TTAAACTGGTTTTGGAAAACCAAATATATT	205	
		rFAL2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC		
	<i>P. vivax</i>	rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	121	
		rVIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		
	<i>P. ovale</i>	rOVA1	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA	787	
		rOVA2	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTA GTG		
	<i>P. malariae</i>	rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	144	
		rMAL2	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA		

ตารางที่ 2 องค์ประกอบสารที่ใช้ในปฏิกิริยา nested PCR สำหรับแยกชนิดเชื้อ *Plasmodium* spp.

ส่วนผสม	PCR รอบที่ 1 ปริมาตร (μl)	PCR รอบที่ 2 ปริมาตร (μl)
10X buffer (1.5 mM MgCl ₂)	2	2
25 mM MgCl ₂	0.4	0.4
0.25 μM primers	2	2
0.25 mM dNTPs	1	1
<i>Taq</i> polymerase (5U/μl)	0.08	0.08
Water (PCR grade)	11.52	13.02
DNA template		
genomic DNA	3	
PCR product nested1		1.5
ปริมาตรรวม	20	20

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการทำ nested PCR เพื่อแยกชนิดเชื้อ *Plasmodium* spp.

ขั้นตอน	PCR รอบที่ 1	PCR รอบที่ 2
Initial denaturation	95°C, 5 นาที	95°C, 5 นาที
Denaturation	94°C, 1 นาที	94°C, 2 นาที
Annealing	58°C, 2 นาที	58°C, 2 นาที
Extension	72°C, 2 นาที	72°C, 2 นาที
Final extension	72°C, 5 นาที	72°C, 5 นาที
Number of cycles	25	30

4. การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13*

เพิ่มปริมาณยีน *Pfkelch13* ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้วิธีที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Ariei และคณะ (Ariei *et al.*, 2014) โดย PCR รอบที่ 1 เป็นการเพิ่มปริมาณยีน *Pfkelch13* ครอบคลุมทั้งยีนจากตำแหน่งที่ 1 จนถึง 2283 pb โดยใช้ primer คู่ K13.1F/2283R และการทำ PCR รอบที่ 2 ใช้ primer คู่ K13.1344F/2129R ซึ่งจะครอบคลุมตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่สนใจคือ ตำแหน่ง 1,740 (G1740A) หรือตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 580 (C580Y) (ตารางที่ 4) องค์ประกอบของสารในการทำปฏิกิริยา PCR และสภาวะในการทำ PCR แสดงดังตารางที่ 5 และ 6 จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จาก PCR ขั้นที่ 2 ซึ่งมีขนาด 786 มาตรวจสอบด้วย 1.5% gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ที่กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation

5. PCR purification และ DNA sequencing

ทำ PCR purification ของตัวอย่าง PCR product ที่ปรากฏแถบ DNA บน 1.5% agarose gel electrophoresis ขนาด 786 bp ด้วยชุดน้ำยา GeneJET PCR purification Kit (Thermo scientific, Vilnius, Lithuania)

5.1 การทำ PCR purification

ผสม PCR product ปริมาตร 100 μ l กับ binding buffer ปริมาตร 100 μ l ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และ spin down หลังจากนั้นย้ายส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน purification column และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm 1 นาที เทของเหลวส่วนล่างทิ้งแล้วเติม wash buffer ปริมาตร 700 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm 1 นาที เทของเหลวส่วนล่างทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14,000 rpm 1 นาที แล้วจึงย้าย purification column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm 1 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ PCR purification product ด้วยวิธี gel electrophoresis อีกครั้งหนึ่ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพระหว่างรอส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริษัท Macrogen ต่อไป

5.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบชนิดของยีนโดยนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม SeqMan ของ DNASTAR Lasergene® (DNASTAR, Inc., USA) เพื่อตรวจสอบ chromatogram รวบรวม sequence ของยีน และปรับแต่ง sequence แสดง open reading frame ด้วย SeqBuilder

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง (multiple alignment) ร่วมกับ PF3D7_1343700 (*P. falciparum* 3D7 *Kelch13* gene สายพันธุ์อ้างอิง, <http://PlasmoDB.org>) ด้วยโปรแกรม Bioedit sequence alignment editor เพื่อหาตำแหน่งการกลายพันธุ์

ตารางที่ 4 primers ที่ใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13*

Primers	Sequence (5'->3')	PCR product size (bp)	
K13.1F	TGGAAGGAGAAAAAGTAAAAACAAA	2283	
K13.2283R	TGTGCATGAAAATAAATATTAAGAAG		
K13.1344F	AGGTGGATTTGATGGTGTAGAA		786
K13.2129R	GGCCAAGCTGCCATTCATTTGT		

ตารางที่ 5 องค์ประกอบสารที่ใช้ในการทำ nested PCR เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13*

ส่วนผสม	PCR รอบที่ 1 ปริมาตร (μl)	PCR รอบที่ 2 ปริมาตร (μl)
10X buffer	2	2
50 mM MgCl ₂	1.2	1.2
0.25 μM primers	2	2
0.25 mM dNTPs	2	2
Platinum <i>Taq</i> polymerase (5U/μl)	0.1	0.1
Water (PCR grade)	8.7	10.7
DNA template		
genomic DNA	4	
PCR product nested1		2
ปริมาตรรวม	20	20

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการทำ nested PCR เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *PfKelch13*

ขั้นตอน	PCR รอบที่ 1	PCR รอบที่ 2
Initial denaturation	95°C, 5 นาที	95°C, 5 นาที
Denaturation	94°C, 1 นาที	94°C, 2 นาที
Annealing	58°C, 2 นาที	60°C, 2 นาที
Extension	72°C, 2 นาที	72°C, 2 นาที
Final extension	72°C, 10 นาที	72°C, 10 นาที
Number of cycles	25	30

6. การเชื่อมยีน *Pfkelch13*^{C580Y} เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T Easy ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109

นำ PCR product ขนาด 786 bp ที่มีชิ้นส่วน *Pfkelch13*^{C580Y} เชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pGEM®-T Easy vector (Promega, Wilcosin, USA) โดยใช้เอนไซม์ T₄ DNA ligase และองค์ประกอบสารดังตารางที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ competent *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่เก็บในอุณหภูมิ -80°C (ปริมาตร 100 µl) มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำ DNA ที่เชื่อมต่อกับ vector ที่เตรียมไว้ มาใส่ในหลอดที่มี competent cell แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำมาให้ความร้อนที่ 42°C (heat shock) เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม Luria - Bertani (LB) broth ปริมาตร 900 µl นำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ส่วนที่เหลือผสมให้เข้ากันแล้วมาทำการ spread plate บน LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 สารที่ใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างชิ้น DNA กับ vector (ligation)

สารที่ใช้	ปริมาตร (µl)
2X Rapid Ligation Buffer	5
pGEM®-T Easy vector	1
PCR product	3
T ₄ DNA ligase (3 U/µl)	1
ปริมาตรรวม	10

7. การคัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีลูกผสมด้วยวิธี PCR และสกัดพลาสมิด

คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดจากสุ่มตรวจโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตได้บน LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml จำนวน 15 - 20 โคโลนี นำไปคัดเลือกด้วยวิธี colony PCR โดยใช้คู่ primer K13.1344F และ K13.2129R หลังจากนั้นเลือกโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน ไปเลี้ยงต่อใน อาหารเหลว LB broth 5 ml ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific, Vilnius, Lithuania)

สกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียทำตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต โดยนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทอาหารทิ้ง ทำซ้ำ 3 – 5 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย resuspension solution 250 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม lysis solution 250 μ l กลับหลอดไปมาเบาๆ 4 – 6 ครั้ง เติม neutralization solution 350 μ l กลับหลอดไปมาเบาๆ 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่ลงใน GeneJET spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทสารละลายใสที่ตกลงด้านล่างทิ้ง เติม wash solution 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทสารละลายที่ตกลงด้านล่างทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัด wash solution ที่ค้างอยู่ให้หมด ย้าย GeneJET spin column ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติมน้ำเกรด PCR ปริมาตร 50 μ l ลงใน spin column membrane บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เก็บรักษาพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับการใช้งานต่อไป

นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และทำการตรวจสอบชนิดของยีนโดยนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) จากนั้นนำมาวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (Maestrogen, Las Vegas, USA) ค่าที่ได้จะเป็นหน่วยเป็น ng/ μ l นำมาคำนวณให้มีหน่วยเป็น copy number ตามสูตร (Whelan *et al.*, 2003)

$$\text{Number of copies (molecules)} = \frac{\text{Mass (g)} \times \text{Avogadro's number}}{\text{Length of dsDNA} \times 660 \text{ daltons}}$$

เมื่อ 660 Daltons (g/mole) = average mass of 1 bp dsDNA

Avogadro's number = 6.022×10^{23} molecules/mole

ความเข้มข้นของพลาสมิด = 215.56 ng/ μ l = 2.15×10^{-7} g/ μ l

ขนาดของพลาสมิดและชิ้น DNA ที่สอดแทรก = 3,015 และ 786 bp ตามลำดับ

ดังนั้น Number of copies = 5.2×10^{10} copies

8. ออกแบบ primer สำหรับ SNP-LAMP

LAMP primer ออกแบบโดยใช้ PlasmoDB : PF3D7_1343700 เป็นต้นแบบ LAMP primer ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 4 เส้น ได้แก่ F3 primer (forward outer primer), B3 primer (backward outer primer), FIP (forward inner primer) ประกอบด้วย F1c และ F2 และ BIP (backward inner primer) ประกอบด้วย B1c และ B2 ซึ่งมีความจำเพาะบน 6 ตำแหน่งของยีน *Pfkelch13* โดย F3 และ B3 จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1686 ถึง 1704 และตำแหน่ง 1942 ถึง 1958 ตามลำดับ ระยะตั้งแต่ปลาย 5' ของ F3 ถึงปลาย 5' ของ B3 มีขนาด 271 bp เพื่อให้ primer LAMP สามารถตรวจติดตามได้เฉพาะตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ ดังนั้นปลาย 3' ของบริเวณ F2 ของ FIP primer สามารถจับกับตำแหน่งการกลายพันธุ์ C580Y และมีการเพิ่ม mismatched nucleotide 1 เบส ในตำแหน่งถัดจากปลาย 3' ของ FIP primer ทำการตรวจสอบความจำเพาะของ primer LAMP ด้วยโปรแกรม in silico (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) พบว่ามีความจำเพาะต่อยีน *Pfkelch13* สำหรับการสังเคราะห์ FIP และ BIP primer เป็นแบบ HPLC (high performance liquid chromatography) grade ส่วน F3 และ B3 primer เป็น desalted grade ออกแบบ primer ตามคำแนะนำจาก A Guide to LAMP primer designing (http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html) และ คำนึงถึงค่า T_m (melting temperature), GC content, ความเสถียร (stability) ของปลาย primer, การเกิด secondary structure, ความยาวของ primer และระยะห่างระหว่าง primer (Lee *et al.*, 2007, Parida *et al.*, 2008)

9. การทดสอบหาความเข้มข้นของสารและสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา SNP-LAMP

ทดสอบความเข้มข้นของ MgSO₄ ตั้งแต่ 4 ถึง 8 mM, ความเข้มข้นของ inner primer ตั้งแต่ 1.2 ถึง 1.8 μM, ความเข้มข้นของ outer primer ตั้งแต่ 0.2 ถึง 0.4 μM, ความเข้มข้นของ Bst DNA polymerase ตั้งแต่ 4 ถึง 10 U และส่วนผสมอื่นๆ ประกอบด้วย 1X thermopol buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100), 0.8 mM dNTPs, 1 M betaine, 120 μM HNB ใช้พลาสมิด *Pfkelch13*^{C580Y} เป็น positive control และใช้น้ำเกรด PCR เป็น negative control และเติมน้ำเกรด PCR จนครบปริมาตร 25 μl นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 56, 57, 58, 59, 60, 63 และ 65°C เป็นเวลา 30, 45, 50 และ 60 นาที เพื่อทดสอบหาอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาที่ 80°C เป็นเวลา 5 นาที ดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ที่เกิดขึ้น ผลบวกลบแสดงผลสีฟ้าและตรวจยืนยันผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

10. ทดสอบหาความจำเพาะ (specificity) ของวิธี LAMP

ทดสอบหาความจำเพาะของ SNP-LAMP primer ที่ออกแบบด้วยการทดสอบกับ DNA ของ *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* ที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ P574L, human gDNA, *Pfkelch13* wild type และ น้ำเกรต PCR เป็น negative control และ ใช้พลาสมิด *Pfkelch13*^{C580Y} เป็น positive control ดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ที่เกิดขึ้น หากผลบวกแสดงสีฟ้าและผลลบแสดงสีม่วง และตรวจยืนยันด้วย agarose gel electrophoresis

11. ทดสอบหาความไว (sensitivity) ของวิธี LAMP

ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (detection limit) ของ SNP-LAMP primer และเปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR โดยการทำให้ 10-fold serial dilution ของพลาสมิด *Pfkelch13*^{C580Y} ตั้งแต่ $10^7 - 10^{-1}$ copies และใช้ น้ำเกรต PCR เป็น negative control ดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ที่เกิดขึ้น หากผลบวกแสดงสีฟ้าและผลลบแสดงสีม่วง และตรวจยืนยันด้วย agarose gel electrophoresis

11.1 PCR assay

เตรียม PCR ในปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 1X buffer, 2 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 0.25 μ M F3 และ B3 primers, 1U of Taq polymerase (Invitrogen, California, USA) ที่สภาวะ initial denaturation 94°C, 5 นาที และ 35 รอบของ denaturation 94°C, 1 นาที, annealing 56°C 1 นาที, extension 72°C 2 นาที และขั้นตอน final extension 72°C 5 นาที ตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

12. การประยุกต์ใช้ SNP-LAMP เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* จากตัวอย่างจุดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของผู้ป่วย

12.1 การทดสอบ SNP-LAMP กับ genomic DNA ของยีน *Pfkelch13* ที่มี C580Y และ *Pfkelch13* wild type

ประเมินประสิทธิภาพของ SNP-LAMP ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y จากตัวอย่างจุดเลือดแห้งของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 120 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *Pfkelch13* ที่มี C580Y 30 ตัวอย่าง, *Pfkelch13* wild type 87 ตัวอย่าง และ *Pfkelch13* ที่มี P574L, V510G และ N554S+I590T 3 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจยืนยันแล้วโดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การทดสอบปฏิกิริยา LAMP ในตัวอย่างผู้ป่วยทำโดยใช้ DNA ต้นแบบ ปริมาตร 5 μ l และใช้พลาสมิด *Pfkelch13*^{C580Y} เป็น positive control และน้ำเกรด PCR เป็น negative control เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาอ่านผลการเปลี่ยนสีของ HNB ที่เกิดขึ้น ผลบวกแสดงสีฟ้าและผลลบแสดงสีม่วง และยืนยันผลด้วย agarose gel electrophoresis

คำนวณความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย (parasite density) จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ได้รับทั้ง 120 ตัวอย่าง เมื่อทราบค่า parasitemia หรือ จำนวนเชื้อในกระแสเลือดที่นับได้ต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว โดยคำนวณตามวิธีการขององค์การอนามัยโลกซึ่งแนะนำให้ใช้ค่าเม็ดเลือดขาวต่อเลือด 1 μ l เท่ากับ 8,000 เป็นค่าอ้างอิง (WHO, 2010) (ภาคผนวก ข)

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้} \times 8,000}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้}}$$

(parasites/ μ l)

12.1.1 การคำนวณค่าความไว, ค่าความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ

คำนวณหาค่าความไว, ค่าความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก หรือ positive predictive value (PPV) และ ค่าทำนายผลลบ หรือ negative predictive value (NPV) ของเทคนิค LAMP โดยใช้ วิธี PCR และ DNA sequencing เป็นวิธีมาตรฐาน ตามวิธีคำนวณดังนี้

ความไว (%)	=	ผลบวกจริง / (ผลบวกจริง + ผลลบปลอม) \times 100
ความจำเพาะ (%)	=	ผลลบจริง / (ผลลบจริง + ผลบวกปลอม) \times 100
ค่าทำนายผลบวก (%)	=	ผลบวกจริง / (ผลบวกจริง + ผลบวกปลอม) \times 100
ค่าทำนายผลลบ (%)	=	ผลลบจริง / (ผลลบจริง + ผลลบปลอม) \times 100

12.2 การทดสอบ SNP-LAMP กับ เชื้อที่ผสมระหว่าง genomic DNA ของ *P. vivax* กับ *Pfkelch13* ที่มี C580Y และ *P. vivax* กับ *Pfkelch13* wild type

ประเมินประสิทธิภาพของ SNP-LAMP ในการตรวจสอบตำแหน่งกลายพันธุ์ C580Y ของเชื้อที่ผสมระหว่าง *Pfkelch13* ที่มี C580Y กับ *P. vivax* และเชื้อผสมระหว่าง *Pfkelch13* wild type กับ *P. vivax* โดยทำการผสม genomic DNA ของเชื้อแต่ละชนิดในปริมาตรอย่างละ 5 µl หลังจากนั้นจึงนำ DNA ผสมทั้ง 2 แบบ มาใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา LAMP โดยมีน้ำเกรด PCR เป็น negative control และ ใช้พลาสมิด *Pfkelch13*^{C580Y} เป็น positive control จากนั้นอ่านผลการเปลี่ยนสีของ HNB ที่เกิดขึ้น ผลบวกแสดงสีฟ้าและผลลบแสดงสีม่วงและยืนยันผลด้วย agarose gel electrophoresis

13. ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (repeatability test) และความสามารถในการทำเหมือน (reproducibility) ของปฏิกิริยา

13.1 repeatability test

สุ่ม DNA ของเชื้อ *P. falciparum* ที่ได้จากผู้ป่วยมาทดสอบหาตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ C580Y ด้วย SNP-LAMP ที่พัฒนาขึ้น ทำการทดสอบในวันเดียวกัน รอบเดียวกันและน้ำยาชุดเดียวกัน

13.2 reproducibility test

สุ่ม DNA ของเชื้อ *P. falciparum* ที่ได้จากผู้ป่วยมาทดสอบหาตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ C580Y ด้วย SNP-LAMP ที่พัฒนาขึ้นทำ 2 ครั้งโดยห่างกัน 2 สัปดาห์ ผู้ที่ทำการทดลองต่างคนกัน และน้ำยาต่างชุดกัน

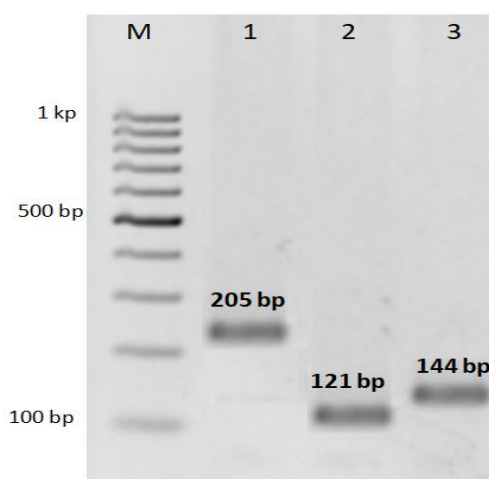
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR และผลการตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA

การจำแนกเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR จากตัวอย่าง DNA 227 ตัวอย่าง การตรวจสอบพบเชื้อ *P. falciparum* จำนวน 124 ตัวอย่าง, เชื้อ *P. vivax* จำนวน 97 ตัวอย่าง และพบการติดเชื้อผสมของ *P. falciparum* และ *P. vivax* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *P. malariae* จำนวน 1 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ขนาดของ DNA ใน 1.5% agarose gel electrophoresis เชื้อ *P. falciparum*, *P. vivax* และ *P. malariae* จะปรากฏแถบ DNA ที่มีขนาด 205, 121 และ 144 bp ตามลำดับ (รูปที่ 17)

การตรวจสอบความเข้มข้น DNA ที่ได้จากการสกัด DNA พบว่าความเข้มข้นของ DNA อยู่ในช่วง 1.79-14.91 ng/ μ l (ค่าเฉลี่ย = 5.97 ng/ μ l) หลังจากนำสารละลาย DNA ไปทำความเข้มข้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระเหยสารแบบสูญญากาศ ความเข้มข้นของ DNA อยู่ในช่วง 9.1-76.56 ng/ μ l (ค่าเฉลี่ย = 29.43 ng/ μ l)



รูปที่ 17 ผลการตรวจแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี nested PCR แถบ DNA บน 1.5% agarose gel ในแถวที่ 1: *P. falciparum*, แถวที่ 2: *P. vivax*, แถวที่ 3: *P. malariae* และ M : 100 bp ladder

2. ผลการเพิ่มปริมาณยีน *Pfkelch13* ด้วยวิธี nested PCR และการวิเคราะห์หาตำแหน่งการกลายพันธุ์

การทำ nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *Pfkelch13* ขนาด 786 bp ได้จำนวน 120 ตัวอย่าง นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (PF3D7_1343700) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน พบตำแหน่งการกลายพันธุ์แบบ non-synonymous SNPs 5 ตำแหน่ง ใน 120 ตัวอย่าง คือ ตำแหน่ง C580Y จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25, ยีน wild type จำนวน 87 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 72.5 และตำแหน่งอื่นๆ ได้แก่ ตำแหน่ง P574L จำนวน 1 ตัวอย่าง, ตำแหน่ง V510G 1 ตัวอย่าง, ตำแหน่ง N554S และ I590T 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.4 ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* แยกตามจังหวัดและปีที่เก็บตัวอย่างดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆของยีน *Pfkelch13* แยกตามจังหวัดและปีที่เก็บตัวอย่าง

พ.ศ.	จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง					รวม
		wild-type	C580Y	P574L	V510G	N554S+I590T	
2557	ชุมพร	8	6	-	-	1	15
	ระนอง	3	-	1	-	-	4
	สุราษฎร์ธานี	26	-	-	-	-	26
	พังงา	3	-	-	1	-	4
2558	ระนอง	4	3	-	-	-	7
	สุราษฎร์ธานี	3	-	-	-	-	3
2559	สุราษฎร์ธานี	10	-	-	-	-	10
2560	ระนอง	26	21	-	-	-	47
	ยะลา	4	-	-	-	-	4
รวม		87	30	1	1	1	120
(ร้อยละ)		(72.5)	(25)	(0.8)	(0.8)	(0.8)	

3. ผลการเตรียมพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *Pfkelch13*^{C580Y}

สุ่มเลือกโคลนที่เจริญบนอาหาร LB agar ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml เพื่อคัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี colony PCR พบว่า การตรวจสอบ 20 โคลน มี 13 โคลน ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมซึ่งปรากฏแถบ DNA ขนาด 786 bp ที่คมชัด บน 1.5% gel electrophoresis (รูปที่ 18) หลังจากสกัดพลาสมิดแล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าตรงกับยีน *Kelch13* ของเชื้อ *P. falciparum* และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (PF3D7_1343700) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง



รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบโคลนที่ลูกผสมด้วยวิธี colony PCR แถวที่ 1-20 : โคลนที่เลือกมาทำ PCR, แถวที่ 21 : negative control; M 100bp ladder

4. ผลการออกแบบ LAMP primers

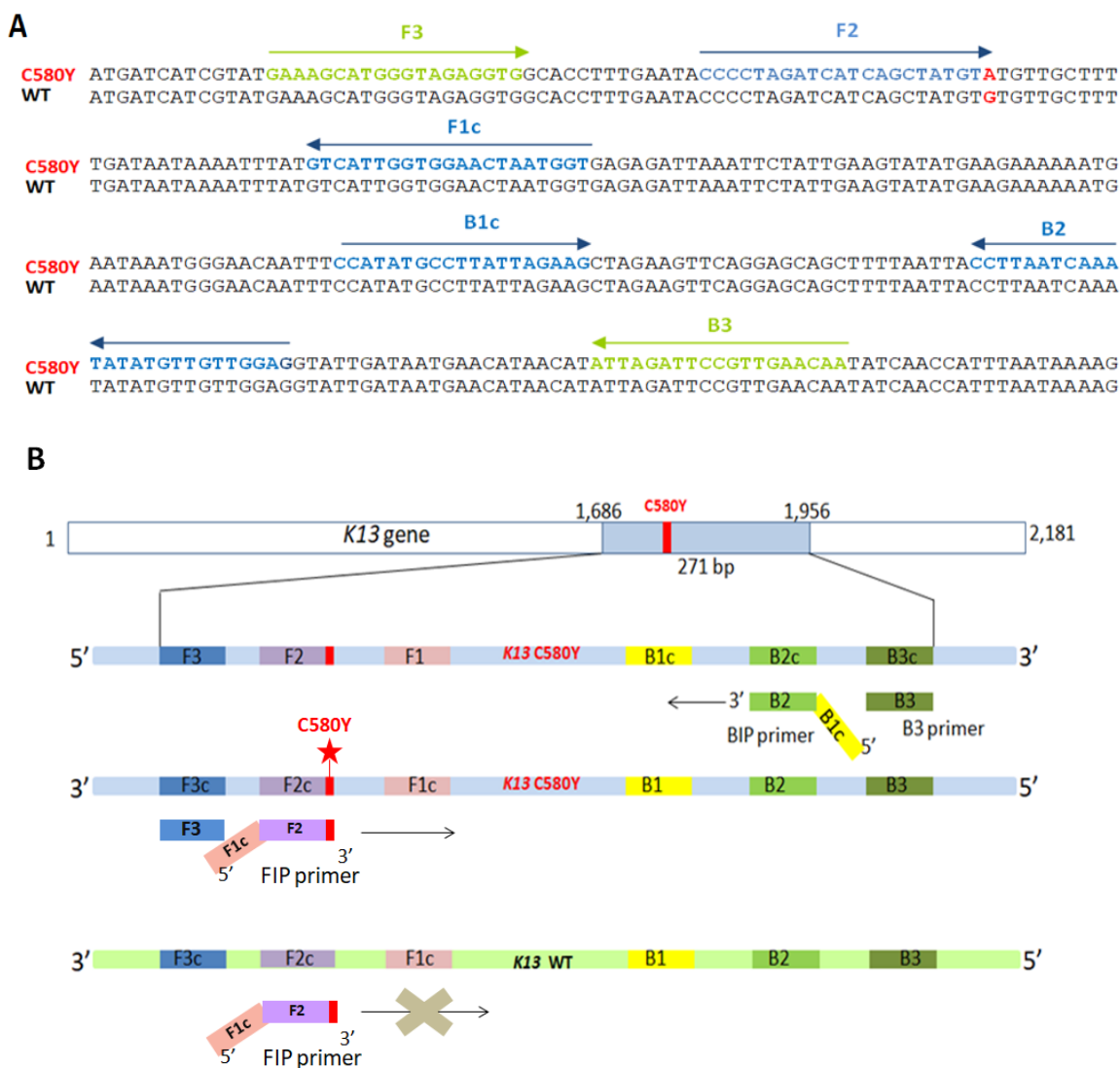
การศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบ primer จำนวน 4 เส้น ที่จำเพาะต่อ 6 ตำแหน่ง ของยีน *Pfkelch13* ที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ G1740A (TGT>TAT) หรือ C580Y โดยปลาย 3' ของ FIP primer จับกับตำแหน่งกลายพันธุ์ และเพิ่ม mismatched nucleotide 1 เบส ในตำแหน่งถัดจากปลาย 3' ของ FIP primer เพื่อเพิ่มความจำเพาะของ primer กับยีนเป้าหมาย ตรวจสอบได้เฉพาะยีน *Pfkelch13*^{C580Y} และสามารถแยกออกจากยีน wild type (รูปที่ 19) ลำดับนิวคลีโอไทด์, ความยาว, ค่า Tm และ GC content ของ primer แสดงดังตารางที่ 9 สำหรับยีนเป้าหมาย *Pfkelch13* จัดเป็น AT rich (GC content = 32%) ค่า Tm และ GC content ของแต่ละบริเวณของ primer ควรจะมีค่าอยู่ในช่วง 55-60°C และ 40-50% ตามลำดับ (Parida *et al.*, 2008) แต่ primer บางเส้นมีค่า Tm และ GC content ต่ำกว่าช่วงดังกล่าว ปลาย 3' ของ F3, B3, F2, B2 และ ปลาย 5' ของ F1c และ B1c เป็นบริเวณที่มีการเติมเบสเพื่อต่อสาย DNA ต่อจาก primer จึงประกอบด้วยเบส G และ C ในส่วน

5 เบสสุดท้าย แต่ไม่เกิน 3 เบส (Borah, 2011) ระยะห่างระหว่าง primer แต่ละช่วงอยู่ในระยะที่เหมาะสม ระยะตั้งแต่ปลาย 5' ของ F2 ถึง 5' ของ F1 และ ปลาย 5' ของ B2 ถึง 5' ของ B1 เป็นส่วนของ loop ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของ LAMP product มีความยาว 47 และ 54 bp ตามลำดับ ซึ่งโดยปกติควรมีค่าอยู่ในช่วง 40-60 bp (Lee *et al.*, 2007, Parida *et al.*, 2008) ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer มีความจำเพาะกับยีน *Pfkelch13* ที่มี C580Y และ primer ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *Pfkelch13* wild type อย่างไรก็ตามการอ่านผลจากการดูเปลี่ยนแปลงของ สี HNB ไม่ชัดเจน แต่ผลการตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ปรากฏ ladder like pattern bands ที่ชัดเจน (รูปที่20)

ตารางที่ 9 LAMP primers และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษา

primers	sequence (5'-3')	length (bp)	Tm (°C)	%GC content
F3	GAAAGCATGGGTAGAGGTG	19	52	52
B3	TTGTTCAACGGAATCTAAT	19	47	32
FIP (F1c-F2)		43		
F1c	ACCATTAGTTCCACCAATGAC	21	50	43
F2	CCCCTAGATCATCAGCTATGcA ^a	22	55	50
BIP (B1c-B2)		45		
B1c	CCATATGCCTTATTAGAAG	19	45	37
B2	CTCCAACAACATATATTTGATTAAGG	26	52	32

^a หมายถึง "A" คือ ตำแหน่งการกลายพันธุ์ และ "c" คือ mismatched nucleotide



รูปที่ 19 LAMP primers ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y (A) ตำแหน่งการจับของ LAMP primers บนยีน *Pfkelch13* ที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์ C580Y ตัวอักษรหนาสีแดงระบุตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ เบส A สำหรับยีนกลายพันธุ์ และเบส G สำหรับยีน wild type (B) โครงสร้างโดยรวมของยีนเป้าหมาย ตำแหน่งของ primers และกระบวนการเพิ่มปริมาณยีนเมื่อยีนต้นแบบเป็นยีนกลายพันธุ์และยีน wild type

2. การหาสภาวะและความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในปฏิกิริยา LAMP

ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP คือ การใช้ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 45 นาที โดยปฏิกิริยาไม่สามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 59-65°C ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 56-58°C ซึ่งที่อุณหภูมิ 56°C เวลา 45 นาที เห็นการเปลี่ยนแปลงของสี HNB จากสีม่วง เป็นสีฟ้าและปรากฏ ladder like pattern band ชัดเจนที่สุดในปฏิกิริยาผลบวก โดยใช้ปริมาตรสุทธิ 25 μ l มีองค์ประกอบดังนี้ (ตารางที่ 10)

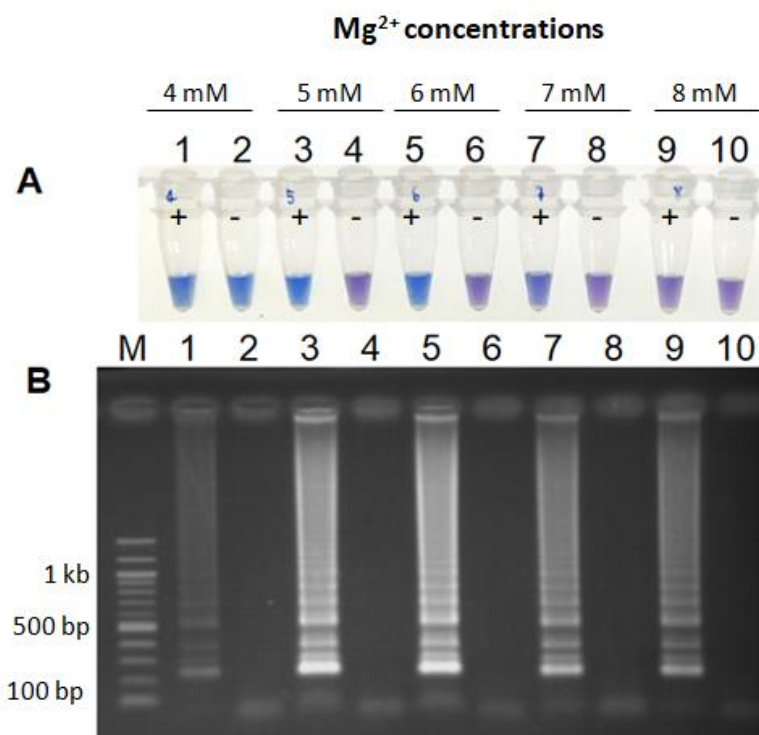
ตารางที่ 10 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยา LAMP

ส่วนผสมของ LAMP reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μ l)
10X <i>Bst</i> buffer	1X	2.5
100 mM MgSO ₄	5 mM	1.25
10 mM dNTPs	0.8 mM	2
20 μ M FIP primer	1.6 μ M	2
20 μ M BIP primer	1.6 μ M	2
10 μ M F3 primer	0.2 μ M	0.5
10 μ M B3 primer	0.2 μ M	0.5
5 M betaine	1 M	5
10 mM HNB	120 μ M	0.3
8 U <i>Bst</i> DNA polymerase	8 U	1
PCR-grade water	-	6.95
Plasmid DNA	-	1
ปริมาตรสุทธิ	-	25

ผลการทดสอบความเข้มข้นของสารเป็นดังนี้

2.1 ผลการทดสอบความเข้มข้นของ $MgSO_4$

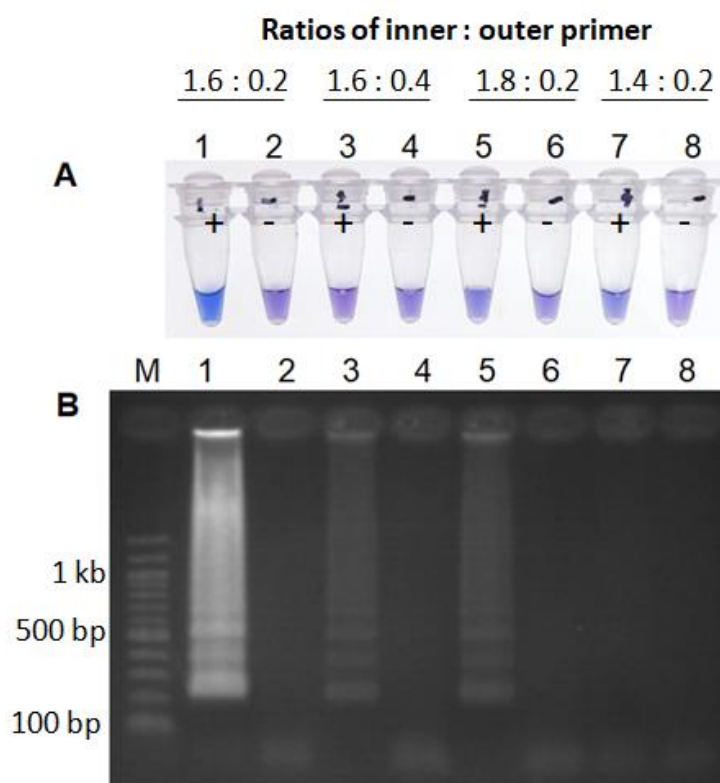
จากการใช้ $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 4, 5, 6, 7 และ 8 mM พบว่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสมในปฏิกิริยานี้ คือ ที่ความเข้มข้น 5 และ 6 mM ซึ่งทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ LAMP ที่เห็นได้ชัดเจนจากการเปลี่ยนแปลงของสี HNB จากสีม่วงเป็นสีฟ้า และ ladder like pattern band จาก gel electrophoresis (หลอดและแถวที่ 3 - 6) $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 4, 7 และ 8 mM ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสี HNB ระหว่างผลบวกและผลลบได้ด้วยตาเปล่า แต่เห็นผลจาก gel electrophoresis เท่านั้น เนื่องจาก $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 6 mM ให้ผลเช่นเดียวกับที่ 5 mM ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้น 5 mM (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 ผลของความเข้มข้นของ $MgSO_4$ ต่อการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB (A) และ agarose gel electrophoresis (B) หลอดและแถวที่ 1, 3, 5, 7, 9 : พลาสมิดที่มียีน *Pfkelch13*^{C580Y} หลอดและแถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 : น้ำเกรด PCR, ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในหลอดและแถวที่ 1-2 : 4 mM, 3-4 : 5 mM, 5-6 : 6 mM, 7-8 : 7 mM และ 9-10 : 8 mM ; M : 100 bp ladder

2.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นของ inner primer ต่อ outer primer

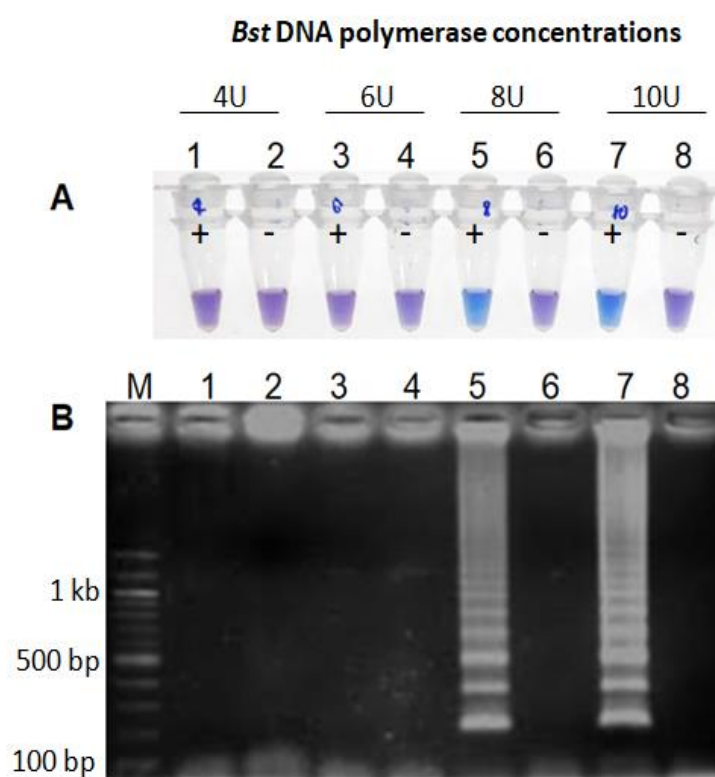
จากการใช้ความเข้มข้นของ inner primer และ outer primer ที่อัตราส่วน 1.6 : 0.2, 1.6:0.4, 1.8 : 0.2 และ 1.4 : 0.2 พบความเข้มข้นที่เหมาะสมของของปฏิกิริยานี้คือใช้ inner primer 1.6 μ M และ outer primer 0.2 μ M หรือมีอัตราส่วน inner primer ต่อ outer primer เท่ากับ 8:1 (หลอดและแถวที่ 1 และ 2) ที่ความเข้มข้นอื่นๆให้ผลไม่ชัดเจนทั้งจากการเปลี่ยนแปลงของสี HNB และผลจาก gel electrophoresis (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 ผลของความเข้มข้นของ inner primer และ outer primer ต่อการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB (A) และ agarose gel electrophoresis (B) หลอดและแถวที่ 1, 3, 5, 7 : พลาสมิดที่มียีน *Pfkelch13*^{C580Y} หลอดและแถวที่ 2, 4, 6, 8 : น้ำเกรต PCR, อัตราส่วนระหว่าง inner primer ต่อ outer primer ในหลอดและแถวที่ 1-2 : 1.6/0.2, 3-4 : 1.6/0.4, 5-6 : 1.8/0.2 และ 7-8 : 1.4/0.2; M : 100 bp ladder

2.3 ผลการทดสอบความเข้มข้นของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase

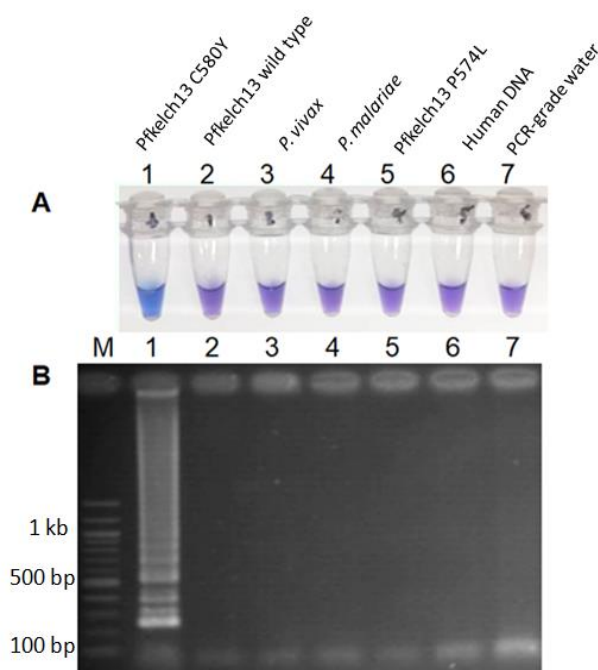
เมื่อทดสอบความเข้มข้นของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่ 4, 6, 8 และ 10 U พบว่าที่ความเข้มข้น 8U และ 10U ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ (หลอดและแถวที่ 5-8) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ LAMP ที่ชัดเจนทั้งจากการเปลี่ยนแปลงของสี HNB จากสีม่วงเป็นสีฟ้า และ ladder like pattern band จาก gel electrophoresis (หลอดและแถวที่ 5 และ 6) ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 8 U ไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ LAMP ได้ และถึงแม้ที่ความเข้มข้นที่ 10 U สังเกตเห็น ladder like pattern band เข้มกว่าเล็กน้อย แต่ที่ความเข้มข้นที่ 8 U ก็เพียงพอและเหมาะสมต่อปฏิกิริยานี้ (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ต่อการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB (A) และ agarose gel electrophoresis (B) หลอดและแถวที่ 1, 3, 5, 7 : พลาสมิดที่มียีน *Pfkelch13*^{C580Y} หลอดและแถวที่ 2, 4, 6, 8 : น้ำเกรต PCR, ความเข้มข้นของ *Bst* DNA polymerase ในหลอดและแถวที่ 1-2 : 4 U, 3-4 : 6 U, 5-6 : 8 U และ 7-8 : 10 U; M : 100 bp ladder

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของวิธี SNP-LAMP

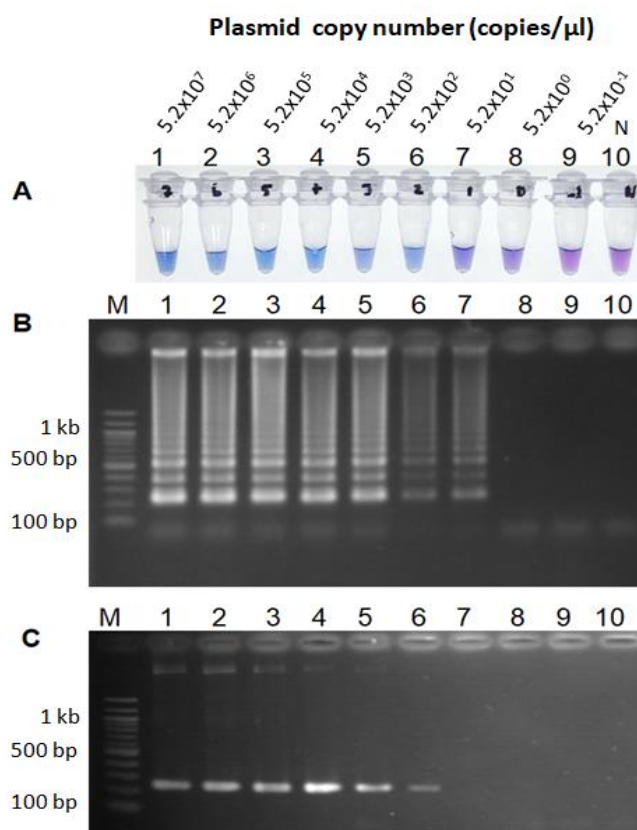
การทดสอบความจำเพาะของ LAMP primers ชุดนี้ พบว่าให้ผลบวกต่อการตรวจสอบยีน *Pfkelch13*^{C580Y} และให้ผลลบต่อเชื้อ *Pfkelch13* wild type, *P. vivax*, *P. malariae*, *Pfkelch* ที่มี P574L, human gDNA และ น้ำเกรด PCR (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 ความจำเพาะของ LAMP primers ต่อการตรวจสอบตำแหน่งการกลายพันธุ์ C580Y เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB (A) และ agarose gel electrophoresis (B) ในหลอดและแถวที่ 1 : พลาสมิดที่มียีน *Pfkelch13*^{C580Y}, 2 : *Pfkelch13* wild type, 3 : *P. vivax*, 4 : *P. malariae*, 5 : *Pfkelch13* ที่มี P574L, 6 : human gDNA และ 7 : น้ำเกรด PCR; M : 100 bp ladder

4. ผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธี SNP-LAMP

เมื่อใช้พลาสมิดที่มี *Pfkelch13*^{C580Y} ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^7 - 10^{-1} copies พบว่า วิธี LAMP สามารถตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 copies ในขณะที่วิธี PCR ตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 500 copies แสดงให้เห็นว่า วิธี SNP-LAMP มีความไวมากกว่าวิธี PCR 10 เท่า เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะดังกล่าว ซึ่งเห็นได้ชัดจากการทำ gel electrophoresis แต่เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB จะมีค่า detection limit ที่ 500 copies เท่ากับวิธี PCR (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 ความไวของวิธี LAMP เปรียบเทียบกับวิธี PCR ในการตรวจสอบตำแหน่งการกลายพันธุ์ C580Y เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB (A) ผลิทัศน์ LAMP ที่แยกบน agarose gel electrophoresis (B) ผลิทัศน์ PCR ที่แยกบน agarose gel electrophoresis (C) หลอดและแถวที่ 1-9 พลาสมิดที่มียีน *Pfkelch13*^{C580Y} ความเข้มข้นตั้งแต่ 5.2×10^7 , 5.2×10^6 , 5.2×10^5 , 5.2×10^4 , 5.2×10^3 , 5.2×10^2 , 5.2×10^1 , 5.2×10^0 และ 5.2×10^{-1} copies ตามลำดับ หลอดและแถวที่ 10 : negative control; M : 100 bp ladder

5. การใช้เทคนิค SNP-LAMP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์จาก genomic DNA ที่แยกจากจุดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของผู้ป่วย

เมื่อทำการตรวจสอบการกลายพันธุ์จาก gDNA โดยใช้องค์ประกอบสารดังตารางที่ 11 พบว่า primer ชุดนี้สามารถใช้ตรวจสอบ gDNA ที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ C580Y ของยีน *Pfkelch13* ทั้ง 12 ตัวอย่าง โดยแสดงผลบวกทั้งการดูด้วยสี HNB และ gel electrophoresis และให้ผลลบกับยีน wild type และตำแหน่งกลายพันธุ์อื่นๆ (รูปที่ 25) ซึ่งผลการทดสอบที่ได้จากวิธี LAMP ให้ผลการทดสอบตรงกับการทำ PCR และ DNA sequencing ผลการหาค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก หรือ positive predictive value (PPV) และ ค่าทำนายผลลบ หรือ negative predictive value (NPV) แสดงดังตารางที่ 12 และเมื่อทดสอบกับ gDNA ที่ผสมระหว่าง gDNA ของเชื้อ *Pfkelch13* ที่มี C580Y และ gDNA ของเชื้อ *P. vivax* พบว่าเกิดปฏิกิริยาผลบวกทั้งการดูด้วยสี HNB และ gel electrophoresis ในขณะที่การผสมระหว่าง gDNA ของเชื้อ *Pfkelch13* wild type และ gDNA ของเชื้อ *P. vivax* แสดงผลลบ (รูปที่ 26) แสดงให้เห็นว่า primer ชุดนี้มีความจำเพาะ กับยีนเป้าหมายที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ C580Y และไม่เกิด cross reaction กับสปีชีส์อื่น

ผลการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (repeatability) และความสามารถในการทำเหมือน (reproducibility) พบว่าทำซ้ำแล้วให้ผลการทดลองเหมือนเดิม แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของวิธีทดสอบ

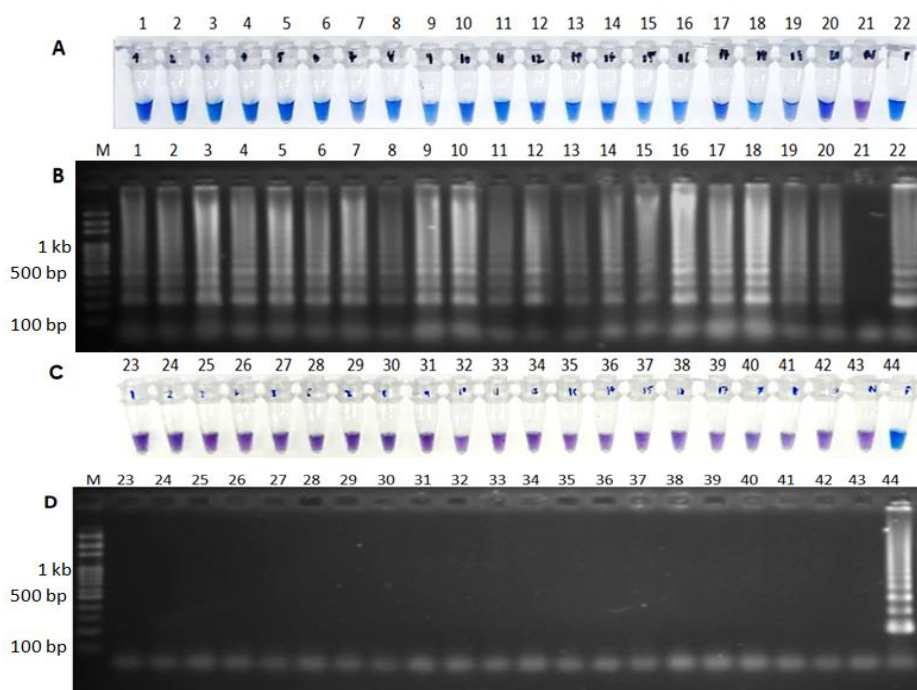
ตารางที่ 11 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์จาก gDNA

ส่วนผสมของ LAMP reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X <i>Bst</i> buffer	1X	2.5
100 mM MgSO ₄	5 mM	1.25
10 mM dNTPs	0.8 mM	2
20 μM FIP primer	1.6 μM	2
20 μM BIP primer	1.6 μM	2
10 μM F3 primer	0.2 μM	0.5
10 μM B3 primer	0.2 μM	0.5
5 M betaine	1 M	5
10 μM HNB	120 μM	0.3
8 U <i>Bst</i> DNA polymerase	8 U	1
PCR-grade water	-	2.95
genomic DNA	-	5

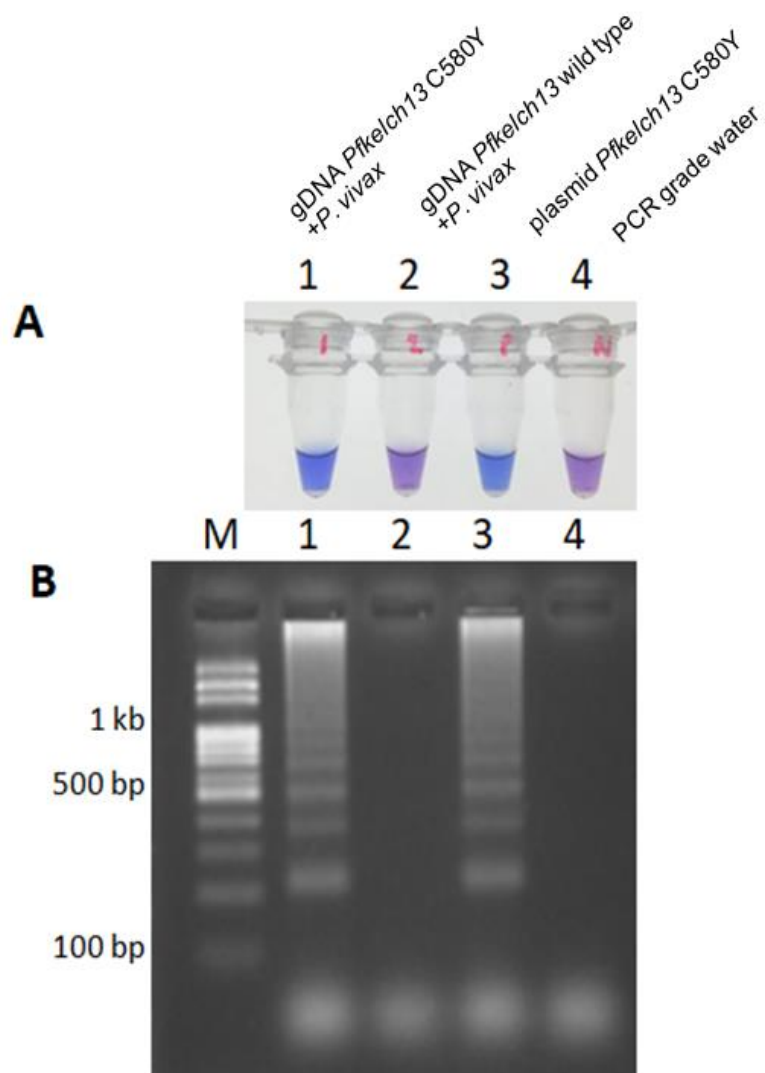
ปริมาณธาตุ	-	25
------------	---	----

ตารางที่ 12 ค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก (PPV) และ ค่าทำนายผลลบ (NPV) ของเทคนิค LAMP เปรียบเทียบกับ DNA sequencing

Test	DNA sequencing			specificity (%)	sensitivity (%)	PPV (%)	NPV (%)
	C580Y (n=30)	wild-type (n=87)	other mutations (n=3)				
LAMP positive (sky blue)	30	0	0	100	100	100	100
LAMP negative (violet)	0	87	3				



รูปที่ 25 ความจำเพาะของ LAMP primers ในการตรวจสอบ gDNA ของเชื้อ *P. falciparum* ที่มียีน *Pfkelch13* C580Y และ wild type เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสี HNB (A,C) และวิธี agarose gel electrophoresis (B,D) หลอดและแถวที่ 1-20: genomic DNA ที่มียีน *Pfkelch13* ที่มี C580Y , หลอดและแถวที่ 23-42 : genomic gDNA ที่เป็น wild type หลอดและแถวที่ 21 และ 43 : น้ำเกรด PCR หลอดและแถวที่ 22 และ 44 : พลาสมิดที่มียีน *Pfkelch13*^{C580Y}; M : 100 bp ladder



รูปที่ 26 ความจำเพาะของ LAMP primers ในการตรวจสอบ gDNA ของเชื้อผสมระหว่าง *P. falciparum* ที่มียีน *Pfkelch13* C580Y และ wild type กับ *P. vivax* (A) และวิธี agarose gel electrophoresis (B) หลอดและแถวที่ 1: gDNA เชื้อ *Pfkelch13* ที่มี C580Y ผสมกับ gDNA เชื้อ *P. vivax*, หลอดและแถวที่ 2 : gDNA เชื้อ *Pfkelch13* wild type ผสมกับ gDNA เชื้อ *P. vivax*, หลอดและแถวที่ 3 : พลาสมิดที่มียีน *Pfkelch13* ^{C580Y}, หลอดและแถวที่ 4 : น้ำเกรด PCR; M : 100 bp ladder

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การดื้อยาอาร์ทิมีซินินของเชื้อ *P. falciparum* มีรายงานครั้งแรกจากพื้นที่ชายแดนไทย กัมพูชาเมื่อปี ค.ศ. 2009 (Dondorp *et al.*, 2009) จนกระทั่งปัจจุบันพบว่าเชื้อดื้อยาสูตรนี้เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในภูมิภาคลุ่มแม่น้ำโขง บริเวณชายแดนไทยกัมพูชา ชายแดนไทยพม่า (Ariey *et al.*, 2014, Ashley *et al.*, 2014, Imwong *et al.*, 2017) จากสถานการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้มีความจำเป็นต้อง ประเมินสถานการณ์การดื้อยาและเฝ้าระวังการดื้อยาไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดไปยังพื้นที่อื่นๆ การใช้วิธีทางอณูชีววิทยาเพื่อสำรวจและระบุการกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยาอาร์ทิมีซินินเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว (Ariey *et al.*, 2014) การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y, R539T, Y493H และ I543T ของยีน *Pfkelch13* ทำให้เชื้อตอบสนองต่อยาลดลงทั้งในร่างกายผู้ป่วย และในหลอดทดลอง ซึ่งตรวจสอบยืนยันแล้วว่าส่งผลทำให้เกิดการดื้อยา (Ariey *et al.*, 2014, Straimer *et al.*, 2015) การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* จาก 5 จังหวัด ในภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดระนอง, จังหวัดชุมพร ซึ่งอยู่บริเวณชายแดนไทยพม่า, จังหวัดพังงา, จังหวัดสุราษฎร์ธานี ไม่มีพื้นที่ติดชายแดน และ จังหวัดยะลา อยู่ติดกับชายแดนไทยมาเลเซีย ซึ่งพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y มากที่สุดจากตัวอย่างที่เก็บในจังหวัดระนอง C580Y เป็นตำแหน่งที่มีรายงานการแพร่ระบาดมากในประเทศพม่า กัมพูชา เวียดนาม และภาคอื่นๆในประเทศไทย (Ariey *et al.*, 2014, Talundzic *et al.*, 2015, Putaporntip *et al.*, 2016) การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง P574L พบในตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดชุมพร ซึ่งตำแหน่งนี้มีการแพร่ระบาดอยู่บริเวณชายแดนไทยพม่า เช่นกัน (Talundzic *et al.*, 2015, Putaporntip *et al.*, 2016) พบการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง (N554S และ I590T) ในหนึ่งตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดระนอง และ พบตำแหน่ง V510G ในตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดพังงา สำหรับตำแหน่ง N554S พบว่าเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่เคยมีรายงานในประเทศเคนย่า (Isozumi *et al.*, 2015) ส่วน V510G และ I590T เป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงาน ซึ่งทั้ง N554S, V510G และ I590T ยังไม่ได้รับการยืนยันว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยาอาร์ทิมีซินิน ดังนั้นจากข้อมูลในงานวิจัยชิ้นนี้พบตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับ การดื้อยาอาร์ทิมีซินินเฉพาะในจังหวัดที่มีพื้นที่ติดกับชายแดนไทยพม่า ไม่พบการแพร่ระบาดไปยัง บริเวณอื่นรวมถึงจังหวัดยะลาบริเวณชายแดนไทยมาเลเซียเช่นเดียวกับการศึกษาของ Putaporntip และคณะ (Putaporntip *et al.*, 2016) บริเวณชายแดนมักเป็นพื้นที่ป่าทึบ เทือกเขาสูง แหล่งน้ำ ความชื้น และมีอุณหภูมิที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของยุงก้นปล่องรวมถึงมีการเคลื่อนย้าย

ประชากรอย่างต่อเนื่องเพื่อประกอบอาชีพเพื่อการค้าขายหรือใช้แรงงานทำให้การควบคุมและป้องกัน มาลาเรียทำได้ยากขึ้น

เพื่อติดตามและเฝ้าระวังการดื้อยาอาร์ทิมีซินินของเชื้อ *P. falciparum* ที่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ C580Y ด้วยการใช้วิธีที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว จึงได้พัฒนาเทคนิค SNP-LAMP เพื่อใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งเทคนิค LAMP เป็นวิธีทางอณูชีวโมเลกุลที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ 10^9 เท่าภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิคงที่ มีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลอโรควิน (Chahar *et al.*, 2017) และยาไพริเมธามีน (Yongkiettrakul *et al.*, 2017) ของเชื้อ *P. falciparum* ได้สำเร็จ

การออกแบบ primer เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล PlasmoDB (PF3D7_1343700) มีการออกแบบให้ FIP primer มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง C580Y โดยให้ปลาย 3' ของ F2 ของ FIP primer สามารถจับกับตำแหน่งกลายพันธุ์และมีการเพิ่ม mismatch nucleotide ในตำแหน่งถัดจากปลาย 3' ของ FIP primer เพื่อให้ความจำเพาะของ primer ต่อยีนเป้าหมายเพิ่มมากขึ้น (Badolo *et al.*, 2012, Duan *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2016) สามารถเพิ่มปริมาณยีนขนาด 271 bp ได้ภายในเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 56°C ซึ่งโดยทั่วไปขนาดของผลิตภัณฑ์ LAMP ควรมีความยาวไม่เกิน 300 bp เพราะจะส่งผลต่อความไวและความเร็วของปฏิกิริยา (Notomi *et al.*, 2000)

การพัฒนาเทคนิค SNP-LAMP ได้ทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยทดสอบความเข้มข้นของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ตั้งแต่ 4 - 10 ยูนิต พบว่าที่ความเข้มข้น 8 ยูนิต เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของสี HNB จากสีม่วงเป็นสีฟ้าและเห็น ladder like pattern band ที่ชัดเจนจาก gel electrophoresis ซึ่งปฏิกิริยาจะไม่สามารถเกิดได้เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำกว่า 8 U การศึกษาอื่นก็พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา LAMP ดีขึ้น (Nie, 2005, Su *et al.*, 2016) สำหรับการศึกษาของ Zhou และคณะ ใช้เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase เพียงแค่ 2 U ก็สามารถตรวจสอบยีน *cry1Ac* ด้วยวิธี LAMP ได้ (Zhou *et al.*, 2014) การทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase อาศัย Mg^{2+} เป็น cofactor สำหรับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสมในการทดสอบครั้งนี้คือ 5 mM เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4-8 mM ความเข้มข้นของ Mg^{2+} เป็นปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยามีผลต่อการเข้าจับของ primer และการทำงานของเอนไซม์ polymerase (Banerjee *et al.*, 2016) จากการทดสอบความเข้มข้นของ Mg^{2+} มีผลต่อประสิทธิภาพของวิธีทดสอบและการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ในปฏิกิริยา กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไปจะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 7 และ 8 mM ทำให้ไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ได้ด้วยตาเปล่าถึงแม้ในปฏิกิริยาผลบวกจะปรากฏ ladder like pattern band บนแผ่นวุ้นที่จางลงแสดงถึงการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ลดลง ดังนั้นความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เพิ่มขึ้นทำให้ปฏิกิริยาเกิด

ได้ดีขึ้น (Su *et al.*, 2016) แต่เมื่อความเข้มข้นมากเกินไปทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้ลดลงเช่นกัน (Huang *et al.*, 2015, Su *et al.*, 2016, Sun, X.-m. *et al.*, 2017) การเพิ่มปริมาณยีนแบบหมุนเวียนต่อเนื่องของเทคนิค LAMP ต้องอาศัย inner primer (FIP และ BIP) ซึ่งจำเป็นในขั้นตอน non cyclic และ cyclic เพื่อให้เกิดการสร้าง loop ส่วน outer primer (F3 และ B3) ถูกใช้ในการขั้นตอน non cyclic เท่านั้น การทดสอบความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา LAMP คือ การใช้ inner primer 1.6 μ l และ outer primer 0.2 μ l หรืออัตราส่วนของ inner primer ต่อ outer primer เป็น 8:1 เนื่องจาก inner primer จะถูกใช้ในปฏิกิริยามากกว่า outer primer ซึ่งหากอัตราส่วนเพิ่มขึ้นหรือน้อยลงจะส่งผลต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ LAMP ที่น้อยลงสังเกตได้ชัดเจนจาก ladder like pattern band ที่ค่อนข้างจาง ในการตรวจสอบเมล็ดแก้วที่ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี LAMP พบว่าการใช้อัตราส่วนของ inner primer ต่อ outer primer เป็น 20:1 ทำให้ได้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพ (Ji *et al.*, 2015) และมักพบว่าอัตราส่วนของ inner primer ต่อ outer primer โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 4:1 - 10:1 นอกจากนี้การเติม betaine ไปในปฏิกิริยายังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยา LAMP (Notomi *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2015, Ji *et al.*, 2015) เนื่องจาก betaine เป็น enhancer reagent ที่ช่วยลดการเกิด secondary structure โดยเฉพาะในยีนเป้าหมายที่เป็น GC rich (Chen *et al.*, 2011) และอาจไม่จำเป็นในปฏิกิริยาที่มียีนเป้าหมายเป็น AT rich (Zhou *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้จำเป็นต้องเติม betaine ถึงแม้ยีนเป้าหมายจะเป็นแบบ AT rich ก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติม betaine ความเข้มข้น 1M ในปฏิกิริยาพบว่า ในหลอด positive หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาสารละลายเปลี่ยนเป็นสีฟ้าทั้งที่เติมและไม่เติม betaine แต่ในหลอด negative ที่ไม่ได้เติม betaine สารละลายยังคงเป็นสีม่วงแต่ปรากฏ ladder like pattern band จากการทำ gel electrophoresis ซึ่งอาจเป็นผล false positive ที่น่าจะเกิดจาก non specific amplification จากการจับกันเองของ primer ดังนั้นการเติม betaine จะช่วยลดการเกิด non specific amplification ได้ (Wang *et al.*, 2015) จากที่กล่าวมานั้นสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ *Bst* DNA polymerase, $MgSO_4$, inner และ outer primer รวมถึง betaine ส่งผลต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยา LAMP รวมถึงการเปลี่ยนสีของ HNB เช่นกัน

เนื่องจากการทำปฏิกิริยา LAMP จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์คือตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate แต่บางครั้งตะกอนสีขาวเกิดขึ้นน้อยจึงสังเกตความขุ่นได้ยาก การดูด้วยสีจึงช่วยให้การอ่านผลง่ายขึ้น การศึกษาครั้งนี้จึงใช้ HNB ซึ่งเป็น metal ion indicator จะจับอยู่กับ Mg^{2+} ทำให้สารละลายมีสีม่วง เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป Mg^{2+} จะถูกใช้ไปในปฏิกิริยา รวมถึง dNTPs ถูกใช้ในการสร้างสาย DNA และมีการปลดปล่อย pyrophosphate ออกมา จะไปจับกับ Mg^{2+} ในปฏิกิริยา กลายเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate เมื่อ Mg^{2+} หลุดออกจาก HNB ทำให้สารละลายค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีฟ้า (Goto *et al.*, 2009) HNB จะถูกเติมก่อนเริ่มต้นปฏิกิริยาพร้อมกับสารอื่นๆจึงเสร็จสิ้นในขั้นตอนเดียว ในขณะที่การใช้ฟลูออเรสเซนต์ เช่น SYBR green หรือ Picogreen จะต้อง

เดิมหลังปฏิกิริยาสิ้นสุดจึงอาจเกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ LAMP ขณะเปิดฝาหลอดได้ (Goto *et al.*, 2009, Balne *et al.*, 2015) Goto และคณะ ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสี HNB, calcein (เป็น metal-ion indicator เช่นกัน) และ สีฟลูออเรสเซนซ์ SYBR green พบว่าการใช้สี HNB ในปฏิกิริยา LAMP ให้ค่า detection limit เท่ากับ การใช้ SYBR green และให้ค่ามากกว่า calcein 10 เท่า (Goto *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าความไวของการทดสอบที่ใช้ สีฟลูออเรสเซนซ์ SYBR green ต่ำกว่าการใช้สี HNB (Zhang *et al.*, 2013)

สำหรับค่า detection limit ของการทดสอบ LAMP ครั้งนี้เท่ากับ 50 copies เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR ที่มีค่าเท่ากับ 500 copies แสดงให้เห็นว่าวิธี LAMP มีความไวมากกว่าวิธี conventional PCR 10 เท่า ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ แต่จะสังเกตว่าสี HNB ที่เกิดขึ้นในหลอดที่มีพลาสมิด 50 copies เปลี่ยนสีน้อยมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผลลบและผลบวกได้ด้วยตาเปล่า แต่เห็นได้จากการทำ gel electrophoresis เท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อดูด้วยตาเปล่าอาจแปลผลได้ว่า LAMP มีความไวเท่ากับวิธี PCR ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น คือการเพิ่ม loop primer ลงไปในปฏิกิริยาซึ่งอาจทำให้ความไวของวิธีทดสอบนี้เพิ่มขึ้น (Nagamine *et al.*, 2002) การศึกษาอื่นๆ รายงานว่าเทคนิค LAMP จะมีความไวมากกว่าวิธี PCR 10 - 1,000 เท่า (Xie *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015) Zhou และคณะ ใช้วิธี LAMP ตรวจสอบยีน *cry1Ac* transgenic sugarcane ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 43.1 copies มีความไวมากกว่าวิธี PCR 10 เท่า Xie และคณะ ตรวจสอบไวรัสในเปิด ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 20 copies พบว่า LAMP ให้ค่าความไวมากกว่าวิธี PCR 100 เท่า Lee และคณะ ใช้วิธี LAMP ตรวจสอบเชื้อ *N. meningitidis* มีความไวมากกว่าวิธี PCR 1,000 เท่า

สำหรับ LAMP primers ชุดนี้มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* สามารถแยกแยะหว่างยีนกลายพันธุ์และยีน wild type ได้ รวมทั้งไม่เกิด cross reaction กับ เชื้อ *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* ที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ P574L และ human gDNA การตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C580Y ของยีน *Pfkelch13* จาก genomic DNA ที่สกัดจากจุดเลือดแห้งบนกระดาษกรองของผู้ป่วยซึ่งจะมีปริมาณเชื้อน้อย ดังนั้นหลังจากขั้นตอนการสกัด DNA และตรวจแยกชนิดเชื้อมาลาเรียจึงระเหยน้ำออกด้วยการ speed vac แล้วเติมน้ำในปริมาณที่น้อยลงจะทำให้ DNA มีความเข้มข้นขึ้นซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของทั้งปฏิกิริยา PCR และ LAMP (Imwong *et al.*, 2014) ในปฏิกิริยา LAMP สามารถตรวจสอบจำนวนเชื้อได้ตั้งแต่ 335 parasites/ μ l ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ชัดเจนในปฏิกิริยาผลบวกและแยกออกจากยีน wild type ซึ่งแสดงผลบทั้งหมด ผลที่ได้เปรียบเทียบกับวิธี DNA sequencing เป็นวิธีมาตรฐาน มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ได้เท่ากับ 100% ทั้งหมด การศึกษาของ Mohon และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจหายีน *Pfkelch13* ที่มี C580Y จากตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองเช่นกัน โดยดูการเปลี่ยนแปลงของสีฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ

ได้ในช่วง 500 - 10,000 parasites/ μ l ในเวลา 65 นาที มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 97.3% ตามลำดับ (Mohon *et al.*, 2018) Imai และคณะ ตรวจสอบการกลายพันธุ์ C580Y ของยีน *Pfkelch13* ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องพกพาได้ MinION nanopore sequencer เพื่อยืนยันความถูกต้อง ถึงแม้จะสะดวกรวดเร็ว แต่ต้องใช้เครื่องมือหลายชนิดซึ่งมีราคาแพง อีกทั้งชุด primer ไม่ได้ออกแบบให้จำเพาะกับตำแหน่ง C580Y จึงต้องใช้เครื่องตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกครั้ง (Imai *et al.*, 2018)

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิค LAMP ขึ้นนี้สามารถใช้ในตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยกว่าวิธี PCR ซึ่งการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี PCR ต้องอาศัยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ที่มีราคาแพงใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง, การตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis, การทำ PCR purification ก่อนการส่ง sequencing ซึ่งรวมทั้งหมดแล้วเสียเวลาและเสียค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธี LAMP อย่างไรก็ตามหากจะนำไปทำการทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วยอาจจะต้องมีการพัฒนาเทคนิคนี้ให้มีความไวเพิ่มขึ้นเพื่อให้สามารถตรวจสอบเลือดผู้ป่วยที่มี parasitemia ที่ต่ำ ให้สามารถตรวจสอบด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ข้อจำกัดอีกประการคือยังต้องอาศัยขั้นตอนการสกัด DNA ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี SNP-LAMP ซึ่งจะมีอุปกรณ์และขั้นตอนที่ยุ่งยากเพิ่มขึ้นหากมีการนำไปใช้ในพื้นที่ยุติ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

มาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อปรสิตที่สำคัญในมนุษย์และเป็นปัญหาสุขภาพของประชากรโลกหลายล้านคนต่อปี ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้ตั้งเป้าหมายให้มาลาเรียหมดสิ้นไปจากโลกนี้ ด้วยความก้าวหน้าทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์ทำให้มีการวิจัยด้านต่างๆ เช่น การพัฒนายาตัวใหม่ๆ เพื่อสามารถใช้ในการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ การติดตามและประเมินประสิทธิภาพของยาที่ใช้รักษา การเฝ้าระวังควบคุมยุงที่เป็นพาหะนำโรค การให้ความรู้แก่ประชาชนในการป้องกันตัวเอง แนวทางการรักษาและการปฏิบัติเมื่อเป็นโรคแล้วซึ่งต้องให้ยาให้เหมาะสมและทำตามคำแนะนำของแพทย์ การตรวจวินิจฉัยโรคที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงการเฝ้าระวังการเกิดเชื้อดื้อยา ซึ่งปัญหาเชื้อมาลาเรียดื้อยาเป็นอุปสรรคสำคัญในการควบคุมและกำจัดเชื้อมาลาเรีย หลายการศึกษาได้มีการพัฒนาวิธี LAMP เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนดื้อยาซึ่งเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีที่จำเพาะ รวดเร็ว และมีประโยชน์สำหรับการเฝ้าระวังการดื้อยา เช่น การติดตามการดื้อยาคลอโรควิน (Chahar *et al.*, 2017) และยาไพริเมธามีน (Yongkiettrakul *et al.*, 2017)

การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ในการติดตามการดื้อยาอาร์ทิมิซินิน โดยตรวจสอบการกลายพันธุ์ C580Y ของยีน *Pfkelch13* เป็นวิธีการตรวจสอบที่ง่ายและรวดเร็ว เพิ่มปริมาณ DNA ได้ปริมาณมากที่อุณหภูมิเดียวด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิหรือ heat block ภายในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง และตรวจผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนแปลงของสี HNB รวมถึงองค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาต้องมีความเหมาะสมเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะสูงจากการใช้ primers จำนวน 4 เส้น ให้จับกับ 6 ตำแหน่งของยีนเป้าหมาย โดยมี FIP primer จำเพาะต่อตำแหน่งกลายพันธุ์ C580Y จึงสามารถใช้ในการติดตามการดื้อยาอาร์ทิมิซินิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการดื้อยาด้านมาลาเรีย รวมถึงเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อแนวทางการใช้ยาที่เหมาะสมเพื่อลดการแพร่ระบาดของการดื้อยาได้ เทคนิค LAMP เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาหรือยีนที่ทำให้เกิดโรคอื่นๆ อีกได้

เอกสารอ้างอิง

- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., Kim, S., *et al.* 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 505(7481): 50-55.
- Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., *et al.* 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*. 371(5): 411-423.
- Ashley, E. A., Pyae Phyo, A., and Woodrow, C. J. 2018. Malaria. *The Lancet*. 391(10130): 1608-1621.
- Asiello, P. J., and Baeumner, A. J. 2011. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab on a Chip*. 11(8): 1420-1430.
- Autino, B., Noris, A., Russo, R., and Castelli, F. 2012. Epidemiology of malaria in endemic areas. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 4(1).
- Badolo, A., Bando, H., Traore, A., Ko-Ketsu, M., Guelbeogo, W. M., Kanuka, H., Ranson, H., *et al.* 2015. Detection of G119S *ace-1* (R) mutation in field-collected *Anopheles gambiae* mosquitoes using allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) method. *Malaria Journal*. 14: 477-484.
- Badolo, A., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Aonuma, H., Bando, H., Fukumoto, S., Sagnon, N., *et al.* 2012. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F *kdr-w* mutation in *Anopheles gambiae s. l.* *Malaria Journal*. 11: 227-233.
- Balne, P., Basu, S., Rath, S., Barik, M., and Sharma, S. 2015. Loop mediated isothermal amplification assay using hydroxy naphthol blue, conventional polymerase chain reaction and real-time PCR in the diagnosis of intraocular tuberculosis. *Indian journal of medical microbiology*. 33(4): 568.
- Banerjee, A., Roy, S., Sharma, S. K., Dutta, S. K., Chandra, S., and Ngachan, S. 2016. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid diagnosis of chilli veinal mottle virus. *Archives of virology*. 161(7): 1957-1961.
- Bartoloni, A., and Zammarchi, L. 2012. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 4(1).
- Bjorkman, A., and Phillips-Howard, P. 1990. The epidemiology of drug-resistant malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84(2): 177-180.
- Blasco, B., Leroy, D., and Fidock, D. A. 2017. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nature medicine*. 23(8): 917.

- Bonnington, C. A., Phyo, A. P., Ashley, E. A., Imwong, M., Sriprawat, K., Parker, D. M., Proux, S., *et al.* 2017. Plasmodium falciparum Kelch 13 mutations and treatment response in patients in Hpa-Pun District, Northern Kayin State, Myanmar. *Malaria Journal*. 16: 480.
- Borah, P. 2011. Primer designing for PCR. *Science Vision*. 11(3): 134-136.
- CDC. 2015. Malaria: Laveran and the Discovery of the Malaria Parasite. <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/laveran.html> (accessed 10 November).
- Chahar, M., Mishra, N., Anvikar, A., Dixit, R., and Valecha, N. 2017. Establishment and application of a novel isothermal amplification assay for rapid detection of chloroquine resistance (K76T) in Plasmodium falciparum. *Scientific reports*. 7.
- Chaorattanakawee, S., Lon, C., Jongsakul, K., Gawee, J., Sok, S., Sundrakes, S., Kong, N., *et al.* 2016. Ex vivo piperazine resistance developed rapidly in Plasmodium falciparum isolates in northern Cambodia compared to Thailand. *Malaria Journal*. 15(1): 519.
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J. C., Stein, R. E., and Ge, B. 2011. Rapid detection of viable salmonellae in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol*. 77(12): 4008-4016.
- Congpuong, K., Bualombai, P., Banmairuroi, V., and Na-Bangchang, K. 2010. Compliance with a three-day course of artesunate-mefloquine combination and baseline anti-malarial treatment in an area of Thailand with highly multidrug resistant falciparum malaria. *Malaria Journal*. 9(1): 43.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., *et al.* 2009. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine*. 361(5): 455-467.
- Duan, Y., Yang, Y., Wang, Y., Pan, X., Wu, J., Cai, Y., Li, T., *et al.* 2016. Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Rapid Detection of the F200Y Mutant Genotype of Carbendazim-Resistant Isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*. 100(5): 976-983.
- Duan, Y., Zhang, X., Ge, C., Wang, Y., Cao, J., Jia, X., Wang, J., *et al.* 2014. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Scientific reports*. 4: 7094.
- Duan, Y. B., Yang, Y., Wang, J. X., Liu, C. C., He, L. L., and Zhou, M. G. 2015. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detecting the highly benzimidazole-resistant isolates in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific reports*. 5: 17278.
- Edwards, T., Burke, P., Smalley, H. B., Gillies, L., and Hobbs, G. 2014. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Test for the Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Urine Samples

- and the Tolerance of the Assay to the Presence of Urea. *Journal of clinical microbiology*. JCM. 00314-00314.
- Enomoto, Y., Yoshikawa, T., Ihira, M., Akimoto, S., Miyake, F., Usui, C., Suga, S., *et al.* 2005. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol.* 43(2): 951-955.
- Faruk, J. A. 2016. Blood transfusion malaria: A literature review. *Annals of Nigerian Medicine.* 10(2): 49.
- Fidock, D. A., Nomura, T., Talley, A. K., Cooper, R. A., Dzekunov, S. M., Ferdig, M. T., Ursos, L. M. B., *et al.* 2000. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. *Molecular Cell.* 6(4): 861-871.
- Flegg, J. A., Metcalf, C. J. E., Gharbi, M., Venkatesan, M., Shewchuk, T., Hopkins Sibley, C., and Guerin, P. J. 2013. Trends in Antimalarial Drug Use in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 89(5): 857-865.
- Ghorbal, M., Gorman, M., Macpherson, C. R., Martins, R. M., Scherf, A., and Lopez-Rubio, J.-J. 2014. Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotech.* 32(8): 819-821.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., and Hanaki, K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques.* 46(3): 167-172.
- Han, E.-T., Watanabe, R., Sattabongkot, J., Khuntirat, B., Sirichaisinthop, J., Iriko, H., Jin, L., *et al.* 2007. Detection of four *Plasmodium* species by genus-and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *Journal of clinical microbiology.* 45(8): 2521-2528.
- Harinasuta, T., Suntharasamai, P., and Viravan, C. 1965. Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. *The Lancet.* 286(7414): 657-660.
- Huang, S., Xu, Y., Yan, X., Shang, Y., Zhu, P., Tian, W., and Xu, W. 2015. Development and application of a quantitative loop-mediated isothermal amplification method for detecting genetically modified maize MON863. *J Sci Food Agric.* 95(2): 253-259.
- Imai, K., Tarumoto, N., Runtuwene, L. R., Sakai, J., Hayashida, K., Eshita, Y., Maeda, R., *et al.* 2018. An innovative diagnostic technology for the codon mutation C580Y in kelch13 of *Plasmodium falciparum* with MinION nanopore sequencer. *Malaria Journal.* 17(1): 217.
- Imwong, M., Hanchana, S., Malleret, B., Rénia, L., Day, N. P., Dondorp, A., Nosten, F., *et al.* 2014. High throughput ultra-sensitive molecular techniques to quantify low density malaria parasitaemias. *Journal of clinical microbiology*. JCM. 01057-01014.

- Imwong, M., Jindakhad, T., Kunasol, C., Sutawong, K., Vejakama, P., and Dondorp, A. M. 2015. An outbreak of artemisinin resistant falciparum malaria in Eastern Thailand. *Scientific reports*. 5: 17412 - 17418.
- Imwong, M., Suwannasin, K., Kunasol, C., Sutawong, K., Mayxay, M., Rekol, H., Smithuis, F. M., *et al.* 2017. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis*. 17(5): 491-497.
- Isozumi, R., Uemura, H., Kimata, I., Ichinose, Y., Logedi, J., Omar, A. H., and Kaneko, A. 2015. Novel mutations in K13 propeller gene of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Emerg Infect Dis*. 21(3): 490.
- Iwamoto, T., Sonobe, T., and Hayashi, K. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 41(6): 2616-2622.
- Ji, G., Li, G., Wu, Y., Guo, J., Yang, D., Zhao, J., Lai, X., *et al.* 2015. Rapid Visual Event-Specific Detection of Soybean DP-356043-5 by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Food Science and Technology Research*. 21(4): 517-523.
- Kaewpitoon, N., Loyd, R., Kaewpitoon, S., and Rujirakul, R. 2015. *Malaria Risk Areas in Thailand Border*. City.
- Krungkrai, J., and Krungkrai, S. R. 2016. Antimalarial qinghaosu/artemisinin: the therapy worthy of a Nobel Prize. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(5): 371-375.
- Kubota, R., Vine, B., Alvarez, A., and Jenkins, D. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*. 98(9): 1045-1051.
- Lau, Y.-L., Lai, M.-Y., Fong, M.-Y., Jelip, J., and Mahmud, R. 2016. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Identification of Five Human *Plasmodium* Species in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. 94(2): 336-339.
- Lee, D., Kim, E. J., Kilgore, P. E., Kim, S. A., Takahashi, H., Ohnishi, M., Anh, D. D., *et al.* 2015. Clinical evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid. *PLoS ONE*. 10(4): e0122922.
- Lee, M.-A., Tan, C.-H., Aw, L.-T., Tang, C.-S., Singh, M., Lee, S.-H., Chia, H.-P., *et al.* 2002. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *Journal of clinical microbiology*. 40(11): 4343-4345.
- Lee, S.-Y., Lee, C.-N., Mark, H., Meldrum, D. R., Lee, C.-K., and Lin, C.-W. 2007. Optimal hepatitis B virus primer sequence design for isothermal amplification. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*. 19(03): 137-144.

- Li, J.-j., Xiong, C., Liu, Y., Liang, J.-s., and Zhou, X.-w. 2016. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): emergence as an alternative technology for herbal medicine identification. *Frontiers in plant science*. 7: 1956.
- Lim, K. T., Teh, C. S., and Thong, K. L. 2013. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res Int*. 2013: 895816.
- Lin, J. T., Juliano, J. J., and Wongsrichanalai, C. 2010. Drug-Resistant Malaria: The Era of ACT. *Curr Infect Dis Rep*. 12(3): 165-173.
- Mahittikorn, A., Mori, H., Popruk, S., Roobthaisong, A., Sutthikornchai, C., Koompapong, K., Siri, S., *et al*. 2015. Development of a rapid, simple method for detecting *Naegleria fowleri* visually in water samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *PLoS ONE*. 10(3): e0120997.
- Mangold, K. A., Manson, R. U., Koay, E. S., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R. B., Peterson, L. R., *et al*. 2005. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *Journal of clinical microbiology*. 43(5): 2435-2440.
- Mbengue, A., Bhattacharjee, S., Pandharkar, T., Liu, H., Estiu, G., Stahelin, R. V., Rizk, S. S., *et al*. 2015. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 520(7549): 683-687.
- Menard, D., Khim, N., Beghain, J., Adegnik, A. A., Shafiul-Alam, M., Amodu, O., Rahim-Awab, G., *et al*. 2016. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *N Engl J Med*. 374(25): 2453-2464.
- Miguel-Oteo, M., Jiram, A. I., Ta-Tang, T. H., Lanza, M., Hisam, S., and Rubio, J. M. 2017. Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 10(3): 299-304.
- Mishra, N., Bharti, R. S., Mallick, P., Singh, O. P., Srivastava, B., Rana, R., Phookan, S., *et al*. 2016. Emerging polymorphisms in *falciparum* Kelch 13 gene in Northeastern region of India. *Malaria Journal*. 15(1): 583.
- Mohon, A. N., Menard, D., Alam, M. S., Perera, K., and Pillai, D. R. 2018. A Novel Single-Nucleotide Polymorphism Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Open Forum Infect Dis*. 5(4): ofy011.
- Mok, S., Ashley, E. A., Ferreira, P. E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., Chotivanich, K., *et al*. 2015. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*. 347(6220): 431-435.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., and Notomi, T. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 59(2): 145-157.

- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. 2001. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289(1): 150-154.
- Mwendwa, F., Mbae, C. K., Kinyua, J., Mulinge, E., Mburugu, G. N., and Njiru, Z. K. 2017. Stem loop-mediated isothermal amplification test: comparative analysis with classical LAMP and PCR in detection of *Entamoeba histolytica* in Kenya. *BMC Research Notes*. 10(1): 142.
- Nagamine, K., Hase, T., and Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. 16(3): 223-229.
- Nie, X. 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of Potato virus Y. *Plant Disease*. 89(6): 605-610.
- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B. L., Socheat, D., and Fukuda, M. M. 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*. 359(24): 2619-2620.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28(12): E63.
- Overgaard, H. J., Suwonkerd, W., and Hii, J. 2015. The malaria landscape: Mosquitoes, transmission, landscape, insecticide resistance, and integrated control in Thailand. In *Socio-ecological dimensions of infectious diseases in Southeast Asia*. editors. Springer, City, pp. 123-153.
- Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P. K., Saxena, P., Jana, A. M., Islam, M. A., *et al*. 2005. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*. 43(6): 2895-2903.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V., and Morita, K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol*. 18(6): 407-421.
- Phyo, A. P., Ashley, E. A., Anderson, T. J. C., Bozdech, Z., Carrara, V. I., Sriprawat, K., Nair, S., *et al*. 2016. Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against *P. Falciparum* Malaria on the Thai–Myanmar Border (2003–2013): The Role of Parasite Genetic Factors. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 63(6): 784-791.
- Poon, L. L., Wong, B. W., Ma, E. H., Chan, K. H., Chow, L. M., Abeyewickreme, W., Tangpukdee, N., *et al*. 2006. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria:

- detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clinical chemistry*. 52(2): 303-306.
- Price, R. N., Uhlemann, A.-C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., *et al.* 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *The Lancet*. 364(9432): 438-447.
- Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Chantra, A., Clemens, R., Looareesuwan, S., and White, N. J. 2004. Activities of artesunate and primaquine against asexual-and sexual-stage parasites in falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(4): 1329-1334.
- Putaporntip, C., Kuamsab, N., Kosuwin, R., Tantiwattanasub, W., Vejakama, P., Sueblinvong, T., Seethamchai, S., *et al.* 2016. Natural selection of K13 mutants of *Plasmodium falciparum* in response to artemisinin combination therapies in Thailand. *Clin Microbiol Infect*. 22(3): 285.e281-288.
- Rai, P., Majumdar, K., Sharma, S., Chauhan, R., and Chandra, J. 2015. Congenital malaria in a neonate: case report with a comprehensive review on differential diagnosis, treatment and prevention in Indian perspective. *Journal of Parasitic Diseases*. 39(2): 345-348.
- Roper, C., Pearce, R., Bredenkamp, B., Gumede, J., Drakeley, C., Mosha, F., Chandramohan, D., *et al.* 2003. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *The Lancet*. 361(9364): 1174-1181.
- Satimai, W., Sudathip, P., Vijaykadga, S., Khamsiriwatchara, A., Sawang, S., Potithavoranan, T., Sangvichean, A., *et al.* 2012. Artemisinin resistance containment project in Thailand. II: Responses to mefloquine-artesunate combination therapy among falciparum malaria patients in provinces bordering Cambodia. *Malaria Journal*. 11(1): 300.
- Shanks, G. D. 1994. 1993 Sir Henry Wellcome Medal and Prize recipient. The rise and fall of mefloquine as an antimalarial drug in South East Asia. *Military medicine*. 159(4): 275-281.
- Sharma, L., and Shukla, G. 2017. Placental Malaria: A new insight into the Pathophysiology. *Frontiers in medicine*. 4: 117.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V. E., Thaithong, S., *et al.* 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology*. 61(2): 315-320.
- Spring, M. D., Lin, J. T., Manning, J. E., Vanachayangkul, P., Somethy, S., Bun, R., Se, Y., *et al.* 2015. Dihydroartemisinin-piperaquine failure associated with a triple mutant including *kelch13* C580Y in Cambodia: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 15(6): 683-691.

- STPRC, P. K., and Reddy, N. 2014. Factors affecting malaria disease transmission and incidence: A special focus on Visakhapatnam district. *Int J Rec Sci Res.* 5: 312-317.
- Straimer, J., Gnädig, N. F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A. P., Dacheux, M., *et al.* 2015. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *New York Science Journal.* 347(6220): 428-431.
- Su, Y., Yang, Y., Peng, Q., Zhou, D., Chen, Y., Wang, Z., Xu, L., *et al.* 2016. Development and application of a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. *Scientific reports.* 6: 23994.
- Sugiyama, H., Yoshikawa, T., Ihira, M., Enomoto, Y., Kawana, T., and Asano, Y. 2005. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions. *J Med Virol.* 75(4): 583-587.
- Sun, J., Najafzadeh, M. J., Vicente, V., Xi, L., and de Hoog, G. S. 2010. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. *J Microbiol Methods.* 80(1): 19-24.
- Sun, X. M., Ji, Y. S., Liu, X. Y., Xiang, M., He, G., Xie, L., Suo, J. X., *et al.* 2017. Improvement and evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Toxoplasma gondii* infection in human blood samples. *PLoS ONE.* 12. : e0169125.
- Sungkapong, T. 2016. Efficiency of Malaria Rapid Diagnostic Test. *Journal of The Medical Technologist Association of Thailand.* 44(2): 5587-5596.
- Talundzic, E., Okoth, S. A., Congpuong, K., Plucinski, M. M., Morton, L., Goldman, I. F., Kachur, P. S., *et al.* 2015. Selection and spread of artemisinin-resistant alleles in Thailand prior to the global artemisinin resistance containment campaign. *PLoS Pathog.* 11(4): e1004789.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., and Notomi, T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protocols.* 3(5): 877-882.
- Tun, K. M., Imwong, M., Lwin, K. M., Win, A. A., Hlaing, T. M., Hlaing, T., Lin, K., *et al.* 2015. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *The Lancet Infectious Diseases.* 15(4): 415-421.
- Wang, D.-G., Brewster, J. D., Paul, M., and Tomasula, P. M. 2015. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules.* 20(4): 6048-6059.
- Wang, F., Jiang, L., and Ge, B. 2012. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Detecting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Human Stools. *Journal of clinical microbiology.* 50(1): 91-97.

- Wang, X., Seo, D. J., Lee, M. H., and Choi, C. 2014. Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of *Arcobacter* species. *Journal of clinical microbiology*. 52(2): 557-563.
- Whelan, J. A., Russell, N. B., and Whelan, M. A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of immunological methods*. 278(1-2): 261-269.
- White, L. J., Flegg, J. A., Phyto, A. P., Wiladpai-Ngern, J. H., Bethell, D., Plowe, C., Anderson, T., *et al.* 2015. Defining the in vivo phenotype of artemisinin-resistant *falciparum* malaria: a modelling approach. *PLoS Med*. 12(4): e1001823.
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., and Dondorp, A. M. 2014. Malaria. *The Lancet*. 383(9918): 723-735.
- WHO. 2001. Antimalarial drug combination therapy. Report of a WHO technical consultation. WHO. 2010. Basic Malaria Microscopy. (
- WHO. 2016a. Malaria microscopy standard operating procedures. In edited by.: Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific. Original edition.
- WHO. 2016b. World malaria report 2015: summary. In edited by. Geneva: World Health Organization. Original edition.
- WHO. 2017. World malaria report 2017. In edited by. Original edition.
- WHO. 2018. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy: status report.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10): 3741.
- Witkowski, B., Khim, N., Chim, P., Kim, S., Ke, S., Kloeung, N., Chy, S., *et al.* 2013. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother*. 57(2): 914-923.
- Witkowski, B., Lelievre, J., Barragan, M. J., Laurent, V., Su, X. Z., Berry, A., and Benoit-Vical, F. 2010. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(5): 1872-1877.
- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., and Chee, H. Y. 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of applied microbiology*. 124(3): 626-643.
- Wongsrichanalai, C., Sirichaisinthop, J., Karwacki, J. J., Congpuong, K., Miller, R. S., Pang, L., and Thimasarn, K. 2001. Drug resistant malaria on the Thai-Myanmar and Thai-Cambodian borders. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 32(1): 41-49.
- Woodrow, C., Haynes, R., and Krishna, S. 2005. Artemisinins. *Postgraduate medical journal*. 81(952): 71-78.

- Xie, L., Xie, Z., Zhao, G., Liu, J., Pang, Y., Deng, X., Xie, Z., *et al.* 2014. A loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of duck circovirus. *Virology journal*. 11(1): 76.
- Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A. S., Roembke, B. T., Nakayama, S., and Sintim, H. O. 2014. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Molecular BioSystems*. 10(5): 970-1003.
- Ye, R., Hu, D., Zhang, Y., Huang, Y., Sun, X., Wang, J., Chen, X., *et al.* 2016. Distinctive origin of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* on the China-Myanmar border. *Scientific reports*. 6: 20100.
- Yongkiettrakul, S., Kampeera, J., Chareanchim, W., Rattanajak, R., Pornthanakasem, W., Kiatpathomchai, W., and Kongkasuriyachai, D. 2017. Simple detection of single nucleotide polymorphism in *Plasmodium falciparum* by SNP-LAMP assay combined with lateral flow dipstick. *Parasitol Int*. 66(1): 964-971.
- Young, M. D., Contacos, P. G., Stitcher, J. E., and Millar, J. 1963. Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *American journal of tropical medicine and hygiene*. 12(3): 305-314.
- Zhang, C., Yao, Y., Zhu, J.-L., Zhang, S.-N., Zhang, S.-S., Wei, H., Hui, W.-L., *et al.* 2016. Establishment and application of a real-time loop-mediated isothermal amplification system for the detection of *CYP2C19* polymorphisms. *Scientific reports*. 6: 26533-26539.
- Zhang, J., Zhu, J., Ren, H., Zhu, S., Zhao, P., Zhang, F., Lv, H., *et al.* 2013. Rapid visual detection of highly pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2 using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of clinical microbiology*. JCM. 01183-01113.
- Zhou, D., Guo, J., Xu, L., Gao, S., Lin, Q., Wu, Q., Wu, L., *et al.* 2014. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Scientific reports*. 4: 4912.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani (LB) agar

Yeast extract	5	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ชั่ง LB agar 35 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที วางให้เย็นลงประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

2. Luria Bertani (LB) broth

Yeast extract	5	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ชั่ง LB broth 20 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 ml นำไปต้มจนส่วนผสมเข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

1.1 loading dye

ชั่ง bromophenol blue 0.25 g และ sucrose 4 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.2 10X Tris borate EDTA (TBE) buffer

ชั่ง Tris base 108 g และ Boric acid 55 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 ml นำไปต้มพอให้ละลาย แล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 40 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml นำไปใช้โดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.5X TBE

1.3 Ethidium bromide (10mg/ml)

ชั่ง Ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนให้เข้ากันโดยใช้แท่งแม่เหล็กจนกว่าจะละลาย เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (สวมถุงมือทุกครั้งเตรียมและระวังอย่าหายใจเอาผง ethidium bromide เข้าไประหว่างการชั่ง)

2. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

2.1 Ampicillin 100 mg/ml

ชั่งยา 0.5 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 µm แบ่งใส่หลอด microcentrifuge เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

ภาคผนวก ข
ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 13 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแยกตามปี พ.ศ.และจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* ความเข้มข้นของ DNA, parasitemia (จำนวนเชื้อที่นับได้ต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้) และ ค่าความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย (parasite density)

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปี พ.ศ.	จังหวัด	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ความเข้มข้น DNA (ng/ μ l)		parasitemia	parasite density (parasite/ μ l)
						ก่อน	หลัง		
1	NS163	2557	ระนอง	-	-	4.34	21.56	73/200	2920
2	NS257	2557	ระนอง	-	-	4.55	20.69	51/201	2040
3	NS499	2557	ระนอง	T1529G	V510G	5.89	28.42	66/204	2588
4	NS501	2557	พังงา	-	-	5.44	29.49	56/204	2196
5	NS675	2557	พังงา	-	-	5.65	28.32	12/208	461
6	NS677	2557	ระนอง	A1661G,T1769C	I590T,N554S	6.89	34.01	101/200	4040
7	NS678	2557	ระนอง	-	-	5.76	29.45	51/225	1813
8	NS685	2557	ระนอง	-	-	4.66	22.54	5/209	191
9	NS695	2557	ระนอง	-	-	8.34	43.49	328/203	12926
10	NS26	2557	ชุมพร	-	-	2.54	13.38	31/213	1164
11	MT36	2557	ชุมพร	-	-	4.67	20.51	25/218	917

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปี พ.ศ.	จังหวัด	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ความเข้มข้น DNA (ng/ μ l)		parasitemia	parasite density (parasite/ μ l)
						ก่อน	หลัง		
12	MT67	2557	ชุมพร	-	-	2.78	10.89	12/204	470
13	MT43	2557	ระนอง	G1740A	C580Y	3.98	17.12	28/208	1076
14	MT54	2557	ระนอง	-	-	5.51	27.54	100/201	3980
15	MT56	2557	ระนอง	-	-	3.54	15.52	2/222	72
16	MT70	2557	ระนอง	G1740A	C580Y	2.06	11.33	5/212	188
17	MT71	2557	ระนอง	G1740A	C580Y	4.98	20.31	13/208	500
18	MT72	2557	ระนอง	G1740A	C580Y	4.76	20.67	122/200	4880
19	MT73	2557	ระนอง	G1740A	C580Y	6.83	33.53	75/222	2702
20	MT84	2557	ระนอง	G1740A	C580Y	5.91	30.21	45/201	1791
21	ST41	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.39	26.72	119/201	4736
22	ST49	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	6.56	34.24	49/203	1931
23	ST51	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	6.84	35.14	25/208	961
24	ST54	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	10.94	54.67	1000/205	39024
25	ST56	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	9.52	50.33	792/200	31680
26	ST59R	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.29	27.49	256/203	10088
27	ST88	2557	ชุมพร	C1721T	P574L	6.59	33.87	416/210	15847
28	ST143	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	2.16	11.12	4/212	151
29	ST144	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.15	28.31	22/211	834
30	ST149	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	9.12	47.44	280/205	10926

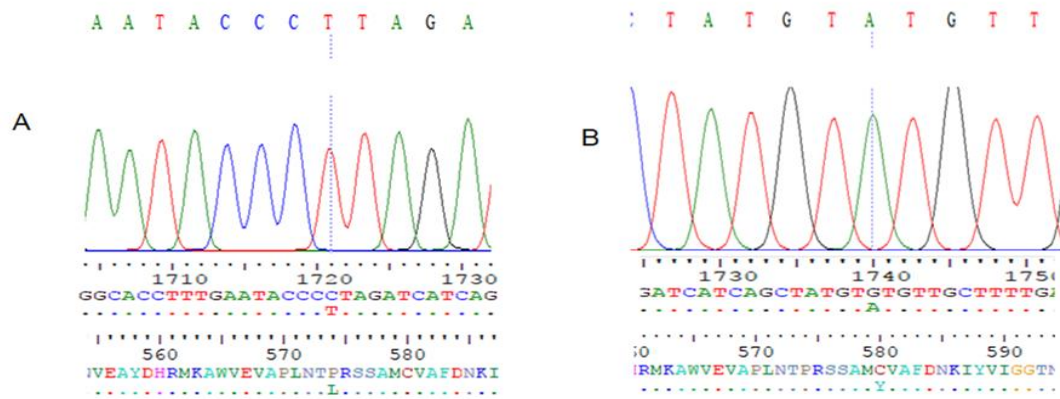
ลำดับ	ตัวอย่าง	ปี พ.ศ.	จังหวัด	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ความเข้มข้น DNA (ng/μl)		parasitemia	parasite density (parasite/μl)
						ก่อน	หลัง		
31	ST150	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	8.43	44.45	159/209	6086
32	ST153	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	2.51	10.26	2/200	80
33	ST155	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	7.18	39.31	50/214	1869
34	ST156	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	7.91	38.33	46/201	1830
35	ST160	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	3.55	16.64	9/216	333
36	STM1	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	6.64	34.32	29/205	1131
37	STM2	2557	พังงา	-	-	5.79	27.45	22/208	846
38	STM4	2557	พังงา	-	-	6.4	31.22	60/200	2400
39	STM65	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.25	29.12	232/200	9280
40	STM66	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	7.67	37.31	92/203	3625
41	STM67	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	8.76	43.49	608/205	23726
42	STM68	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	14.91	76.56	1150/200	46000
43	STM69	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	4.38	22.87	8/200	320
44	STM70	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	7.65	36.06	96/208	3692
45	STM71	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	8.98	42.23	724/220	26327
46	STM72	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.85	29.56	198/204	7764
47	STM73	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.47	28.87	200/205	7843
48	STM74	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.78	29.51	164/214	6130
49	STM76	2557	สุราษฎร์ธานี	-	-	8.16	41.35	56/200	2240

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปี พ.ศ.	จังหวัด	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ความเข้มข้น DNA (ng/μl)		parasitemia	parasite density (parasite/μl)
						ก่อน	หลัง		
50	STM77	2558	สุราษฎร์ธานี	-	-	7.13	36.59	310/200	12400
51	STM78	2558	สุราษฎร์ธานี	-	-	4.42	21.34	188/204	7372
52	STM80	2558	สุราษฎร์ธานี	-	-	4.68	23.68	208/222	7495
53	STM169	2558	ระนอง	G1740A	C580Y	2.44	13.21	190/208	7307
54	STM170	2558	ระนอง	G1740A	C580Y	4.67	24.69	290/200	11600
55	STM171	2558	ระนอง	G1740A	C580Y	14.45	76.34	2184/208	84000
56	STM943	2558	ระนอง	-	-	4.82	25.43	140/200	5600
57	STM944	2558	ระนอง	-	-	4.12	21.45	260/200	10400
58	STM945	2558	ระนอง	-	-	3.59	18.96	214/202	8475
59	STM952	2558	ระนอง	-	-	4.61	22.91	108/202	4277
60	SUT1	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	8.55	36.32	210/204	8235
61	SUT3	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	4.72	19.11	29/203	1142
62	SUT4	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	6.13	26.54	110/203	4335
63	SUT5	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	8.12	33.59	228/200	9120
64	SUT8A	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	11.08	45.32	372/212	14037
65	SUT12	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.92	25.34	38/204	1490
66	SUT13	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.15	22.93	29/202	1148
67	SUT14	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	3.86	16.52	6/204	235
68	SUT15	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	5.08	26.89	15/200	9000

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปี พ.ศ.	จังหวัด	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ความเข้มข้น DNA (ng/ μ l)		parasitemia	parasite density (parasite/ μ l)
						ก่อน	หลัง		
69	SUT16	2559	สุราษฎร์ธานี	-	-	13.98	55.97	521/200	20840
70	YA22	2560	ยะลา	-	-	4.41	22.98	31/200	1240
71	YL55	2560	ยะลา	-	-	3.96	17.45	5/209	191
72	YACY41	2560	ยะลา	-	-	2.47	14.21	284/201	11303
73	YACY61	2560	ยะลา	-	-	5.66	29.56	398/202	15762
74	H20	2560	ระนอง	-	-	4.68	23.9	53/205	2068
75	H21	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	1.79	9.1	10/211	379
76	H22	2560	ระนอง	-	-	3.53	16.56	5/219	182
77	H23	2560	ระนอง	-	-	7.92	32.87	92/204	3607
78	H24	2560	ระนอง	-	-	7.67	31.86	74/218	2715
79	H25	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	5.06	20.63	20/200	800
80	H26	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	4.87	19.51	18/217	663
81	H27	2560	ระนอง	-	-	7.12	36.44	51/211	1933
82	H28	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	7.35	37.12	48/201	1910
83	H29	2560	ระนอง	-	-	8.67	40.23	74/218	2715
84	H33	2560	ระนอง	-	-	9.93	46.43	166/216	6148
85	H34	2560	ระนอง	-	-	2.09	13.69	2/205	78
86	H35	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	5.54	28.51	21/200	840
87	H36	2560	ระนอง	-	-	2.97	15.96	3/210	114

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปี พ.ศ.	จังหวัด	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ความเข้มข้น DNA (ng/ μ l)		parasitemia	parasite density (parasite/ μ l)
						ก่อน	หลัง		
88	H37	2560	ระนอง	-	-	4.08	18.67	11/249	353
89	H38	2560	ระนอง	-	-	5.58	29.51	48/201	1910
90	H39	2560	ระนอง	-	-	11.68	59.84	450/200	18000
91	H40	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	9.47	46.24	131/204	5137
92	H41	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	9.75	47.65	160/200	6400
93	H42	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	5.23	22.01	19/211	720
94	H43	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	2.98	13.58	2/238	67
95	H44	2560	ระนอง	-	-	13.92	69.53	870/200	2000
96	H45	2560	ระนอง	-	-	2.36	13.23	12/209	459
97	H46	2560	ระนอง	-	-	4.45	24.12	96/208	3692
98	H49	2560	ระนอง	-	-	5.43	28.43	310/210	11809
99	H51	2560	ระนอง	-	-	5.32	27.12	296/200	11840
100	H52	2560	ระนอง	-	-	4.85	25.68	118/201	4696
101	H57	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	3.48	18.14	44/203	1733
102	H58	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	4.51	23.44	52/201	2069
103	H59	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	5.76	29.46	203/203	8000
104	H60	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	6.12	31.03	110/208	4230
105	H61	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	5.89	30.38	405/210	15428

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปี พ.ศ.	จังหวัด	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ความเข้มข้น DNA (ng/ μ l)		parasitemia	parasite density
						ก่อน	หลัง		
106	H65	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	4.5	21.76	74/210	2819
107	H66	2560	ระนอง	-	-	3.54	19.43	30/214	1121
108	H67	2560	ระนอง	-	-	2.68	14.32	48/202	1900
109	H68	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	2.59	13.02	40/204	1568
110	H69	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	3.51	18.69	104/204	4078
111	H70	2560	ระนอง	-	-	5.41	28.13	95/213	3568
112	H71	2560	ระนอง	-	-	2.43	13.15	16/204	627
113	H72	2560	ระนอง	-	-	5.56	29.58	152/209	5818
114	H73	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	5.78	29.65	308/204	12078
115	H74	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	4.88	25.34	64/213	2403
116	H75	2560	ระนอง	-	-	5.71	29.71	260/205	10146
117	H81	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	8.52	43.66	862/210	32838
118	H82	2560	ระนอง	G1740A	C580Y	6.43	33.89	142/201	5651
119	H83	2560	ระนอง	-	-	5.89	29.32	174/204	6823
120	H84	2560	ระนอง	-	-	4.61	23.12	100/222	3603



รูปที่ 27 ตัวอย่าง chromatogram ของการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *Pfkelch13* (A) คือ P574L (เบส C>T ที่ตำแหน่ง 1,721) และ (B) คือ C580Y (เบส G>A ที่ตำแหน่ง 1,740)

