

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินความไวต่อยาต้านมาลาเรีย และการตรวจเอกลักษณ์ยีนดื้อยาในเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> จากผู้ป่วยโรคมาลาเรียในพื้นที่อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน	
ผู้เขียน	นางสาวพัชราภรณ์ แสงรัตน์วัชร	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล อ. ดร. ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียยังคงเป็นหนึ่งในโรคติดต่อร้ายแรงในหลายประเทศ โดยเฉพาะบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น เป็นสาเหตุนำไปสู่การเสียชีวิตในผู้ติดเชื้อและยังสามารถแพร่ระบาดสู่ประชากรที่อยู่ในพื้นที่ของการระบายนั่นๆอย่างกว้างขวางซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วยเช่นกัน และแม้ว่าทั่วโลกจะมีการป้องกันแก้ไขมากมายด้วยหลากหลายวิธี แต่ความรุนแรงของโรคนั้นก็ถูกจำกัดด้วยปัจจัยหลายๆ ด้าน อีกทั้งยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการป้องกันรักษา และความสามารถของเชื้อมาลาเรียในการพัฒนาตนเองเพื่อให้มีความต้านทานต่อยารักษาโรคมาลาเรียที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันมากขึ้นนั้นถือเป็นปัญหาที่สำคัญต่อการควบคุมและรักษาโรคมาลาเรีย มีการศึกษาพบความสามารถของเชื้อมาลาเรียในการดื้อต่อยารักษาโรคมาลาเรียซึ่งเคยถูกใช้ในการรักษาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันบางประเภท ได้แก่ ยาไพริเมธามีน และยาคลอโรควิน อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมาไม่นานนี้ยังมีการรายงานการดื้อต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อมาลาเรียที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันยกตัวอย่างเช่นยามเฟควิน และการดื้อต่อยาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในปัจจุบันเช่นยาในกลุ่มอาร์ทิมีซินิน โดยมีการศึกษาพบการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อต่อยากลุ่มอาร์ทิมีซินินในแถบบริเวณชายแดนไทยกัมพูชา และชายแดนไทยพม่าตามลำดับ และนี่อาจเป็นสัญญาณที่เตือนให้ทราบว่าในอนาคตอันใกล้นี้ เชื้อมาลาเรียอาจมีการพัฒนาตัวเองให้สามารถทนทานต่อยาต้านมาลาเรียเกือบทั้งหมดที่มีใช้ในการรักษา และการควบคุมป้องกันหรือการรักษาอาจไม่เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพด้วยสาเหตุนี้จึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งในการศึกษาและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาเหล่านี้ ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาต้านมาลาเรียประเภทต่างๆ ที่ใช้ในอดีตและปัจจุบันรวมถึงยาที่มีการคิดค้นขึ้นใหม่

และศึกษาเพื่อตรวจเอกลักษณ์ของยีนคือยาในเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้ได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับยาที่ทำการศึกษา 2 ยีนได้แก่ยีน *Pfcr* (Chloroquine Resistance Transporter) และยีน *Pfdhfr* (Dihydrofolate reductase) จากเชื้อมาลาเรียพลาสมอดิเคียมฟาลซิพารัม จากผู้ป่วยติดเชื้อมาลาเรียในพื้นที่อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน โดยเชื้อปรสิตมาลาเรียจากผู้ป่วยคิดในพื้นที่การแพร่ระบาดของภาคเหนือของประเทศไทยเหล่านี้ได้ถูกเก็บและทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำมาทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านมาลาเรียได้แก่ยาไพริเมธาซีน ยาคลอโรควิน ยามโฟควิน รวมทั้งยากุ่มอาร์ทิมิซินิน คือตัวอนุพันธ์ไดไฮโดรอาร์ทิมิซินิน ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้การรักษาผู้ป่วยในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านมาลาเรียชนิดใหม่คือ P218 ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนติโฟเลต ด้วยวิธี Malaria SYBR Green I-based fluorescence (MSF) assay พบว่าเชื้อมาลาเรียทั้งหมดที่ถูกนำมาทดสอบการคือต่อยาต้านมาลาเรียไพริเมธาซีน และยาคลอโรควิน และเชื้อมาลาเรียบางตัวคือต่อยาต้านมาลาเรียเมโฟควิน แม้ก่อนหน้านี้จะมีการรายงานถึงการคือต่อยาในกลุ่มอาร์ทิมิซินินของเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ระบาดชายแดนไทยพม่า นั้น แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ยังคงพบว่าเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยในพื้นที่ระบาดที่ทำการศึกษานี้เกือบทั้งหมดยังมีความไวต่อยาต้านมาลาเรียไดไฮโดรอาร์ทิมิซินินอยู่ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพสาร P218 ต่อเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ พบว่าให้ประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยยาไพริเมธาซีน ซึ่งเป็นยากุ่มเดียวกัน และจากการตรวจเอกลักษณ์การกลายพันธุ์ของยีน *Pfcr* และยีน *Pfdhfr* ซึ่งเป็นสาเหตุของการคือต่อยาต้านมาลาเรียคลอโรควินและยาไพริเมธาซีนตามลำดับ พบว่าเชื้อมาลาเรียที่ทำการศึกษาทั้งหมดมีตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีน *Pfcr* ที่ตำแหน่งเดียวกันคือ K76T และสัมพันธ์กับการคือต่อยาต้านมาลาเรียคลอโรควิน ขณะที่เชื้อมาลาเรียที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *Pfdhfr* นั้นมีการกลายพันธุ์หลายแบบ โดยพบการกลายพันธุ์เป็นแบบสอง สาม และสี่ตำแหน่ง มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N51I C59R S108N และ I164L และยังคงสัมพันธ์กับการคือต่อยาต้านมาลาเรียไพริเมธาซีนเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ จากข้อมูลที่ได้รับในการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ยาต้านมาลาเรียไพริเมธาซีน และยาคลอโรควินแม้จะมีได้ถูกใช้ในการรักษาโรคมมาลาเรียในพื้นที่การศึกษามาเป็นเวลานาน แต่เชื้อปรสิตมาลาเรียยังคงมีความทนทานต่อยาต้านมาลาเรียทั้งสองชนิดนี้อยู่ นอกจากนี้ยังทราบว่าเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยในพื้นที่ของการศึกษานี้ยังคงมีความไวต่อการรักษาด้วยยาไดไฮโดรอาร์ทิมิซินินได้ดี สารต้านมาลาเรียชนิดใหม่ P218 สามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียจากผู้ป่วยมาลาเรียได้ดี ข้อมูลเหล่านี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการใช้เป็นแนวทางในการวางแผนเพื่อการรักษาควบคุม และป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียคือยาในพื้นที่ที่มีการระบาดได้อีกด้วย

**Thesis Title** Evaluation of Antimalarial Drug Sensitivity and Identification of Drug Resistance Genes in *Plasmodium falciparum* from Malaria Patients in Mae-Sariang District Area, Mae Hong Son Province

**Author** Miss Patcharaporn Saengratwatchara

**Degree** Master of Science (Biochemistry)

**Advisory Committee** Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool Advisor  
Dr. Chairat Uthaipibull Co-advisor

## ABSTRACT

Malaria is still one of the severe infectious tropical diseases causing mortality and mobility in population living in the endemic areas including Thailand. Despite the severity of the disease, the global control of malaria is limited by many factors including the non-availability of effective vaccine and the acquisition of resistance to currently available antimalarial drugs by the parasites. With the increasing resistance to the available drugs developed by the parasites, it is a real threat to malaria disease control and treatment. Parasites resistant to standard drugs such as chloroquine (CQ), mefloquine (MQ), and pyrimethamine (PYR) have spread worldwide. The most recent alarming signal was a report from the Thai-Cambodian and Thai-Myanmar borders describing the possibility of artemisinin resistance developed by the parasites. This was the signal that the parasites will soon be developing against all the available antimalarial drugs and that the control and treatment will be impossible. Therefore, there is an urgent need to monitor emergence of novel resistant parasites and limit their prevalence. Thus, the main objective of this study is to determine anti-malarial drug resistance and to identify mutations of drug resistance genes (*Pfcr* and *Pf dhfr*) in *P. falciparum* isolates from malaria patients in Mae-Sariang district area, Mae Hong Son province. Parasites from infected patients living in endemic areas of Northern Thailand were collected and adapted to *in vitro*

culture in the laboratory. The adapted parasite isolates were tested against antimalarial drugs including dihydroartemisinin (DHA), PYR, CQ and MQ. In this study a new antimalarial drug candidate ‘P218’ developed by researcher team at National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) was also included. It was shown that all of the tested parasite isolates were resistant to PYR and CQ. Some, but not all, isolates were resistant to MQ. Despite the reports of artemisinin resistant parasites in Thai-Myanmar border areas, almost all of the tested isolates were still sensitive to DHA. The tested parasite isolates showed good efficacy to P218 when compared with PYR. We have then checked for the mutations in *Pfcr1* and *Pfdhfr* genes that cause resistance to CQ and PYR respectively. All CQ-resistant isolates contain the reported K76T mutation in *Pfcr1* gene, while PYR-resistant isolates contain the N51I, C59R, S108N and I164L mutations in *Pfdhfr* gene as expected. The obtained information of resistance genes suggested that, although PYR and CQ have not been used in the area for a long time, the parasites are still resistant to these drugs. Furthermore, the parasites are still sensitive to DHA. The newly developed antimalarial compound P218 also showed good efficacy against the field isolates. The study allows us to plan effective treatment and monitor against the spread of resistance parasite in the endemic areas.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, Malaria, Antimalarial drugs

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved