

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนสร้างโปรตีน Pfs25 ของเชื้อมาลาเรีย
Plasmodium falciparum ในประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF THE GENE ENCODING Pfs25 PROTEIN OF
Plasmodium falciparum IN THAILAND



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

Department of Biology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนสร้างโปรตีน Pfs25 ของเชื้อมาลาเรีย <i>Plasmodium falciparum</i> ในประเทศไทย
โดย	น.ส.พรวิณี สุขพงษ์ไทย
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ หาญยุทธนาการ รองศาสตราจารย์ ดร.มรกต แก้วธรรมสอน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัชวาล ใจเชื้อกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ หาญยุทธนาการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.มรกต แก้วธรรมสอน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรภมร เพ็งสกุล)

พรปวีณ์ สุขพงษ์ไทย : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนสร้างโปรตีน Pfs25 ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในประเทศไทย. (GENETIC DIVERSITY OF THE GENE ENCODING Pfs25 PROTEIN OF *Plasmodium falciparum* IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.สิทธิพร ภัทรดิลลธรณ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, รศ. ดร.มรกต แก้วธรรมสอน

Pfs25 เป็นโปรตีนที่พบได้บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในระยะ sexual stage และเป็นหนึ่งในแอนติเจนของวัคซีนสำหรับป้องกันการติดต่อของโรคมาลาเรียชนิด transmission blocking vaccine (TBV) วัคซีนชนิดนี้สร้างจากแอนติเจน Pfs25 ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 และได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนถึงขั้นตอนทดสอบทางคลินิก อย่างไรก็ตาม การศึกษาความหลากหลายของยีน Pfs25 ในประชากร *P. falciparum* ในธรรมชาติทั้งในประเทศไทยและพื้นที่อื่น ๆ มีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้น วิทยานิพนธ์เรื่องนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน Pfs25 ของ *P. falciparum* ในประเทศไทยและพื้นที่อื่น ๆ ทั่วโลก ตัวอย่างประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pfs25 ของ *P. falciparum* ในประเทศไทยจำนวน 83 ตัวอย่าง และข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank และ PlasmoDB จำนวน 224 ตัวอย่าง ซึ่งการศึกษานี้ได้รวบรวมและสร้างฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ขึ้นเป็นครั้งแรก ทำการศึกษาความหลากหลายด้วยการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ประชากร ผลการศึกษาพบว่า Pfs25 ในประชากรเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลกมีจำนวน 11 haplotype ในจำนวนนี้ พบในประเทศไทยจำนวน 7 haplotype (H) โดย H2 เป็น haplotype ที่พบมากที่สุดในประชากรเชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชีย ส่วน H1 พบมากที่สุดในประชากรในทวีปแอฟริกาและทวีปอเมริกาและอเมริกาใต้ การวิเคราะห์ด้วย F_{st} แสดงให้เห็นว่าการกระจายของ haplotype ทั้งหมดแตกต่างกันตามแต่ละทวีป แสดงว่า เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* แบ่งออกเป็น 3 ประชากรย่อย ๆ ตามพื้นที่ คือ ประชากรในทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกาและอเมริกาใต้ นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ haplotype ด้วย haplotype network และ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า H1 และ H2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ haplotype อื่น ๆ ทั้งหมด ความหลากหลายในยีน Pfs25 เกิดจาก SNP จำนวน 10 ตำแหน่ง และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) เท่ากับ 0.00085 แสดงว่า Pfs25 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ คาดว่าเป็นผลจากการคัดเลือกเชิงลบ นอกจากนี้ การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศระบุว่า haplotype ทั้งหมดของโปรตีน Pfs25 มีรูปร่างเหมือนกัน ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงชนิดนิวคลีโอไทด์เหล่านี้อาจไม่ส่งผลโครงสร้างโปรตีน Pfs25 จึงคาดได้ว่า โปรตีน Pfs25 รูปแบบต่าง ๆ ที่พบในประชากร *P. falciparum* น่าจะเป็นเป้าหมายของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้อย่างดี ผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่า ยีน Pfs25 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และงานวิจัยชิ้นนี้สนับสนุนการใช้งาน Pfs25 เป็นวัคซีน TBV ในการควบคุมการติดต่อของโรคมาลาเรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6172013823 : MAJOR ZOOLOGY

KEYWORD: Pfs25 Plasmodium falciparum sequence diversity haplotype SNP

Pornpawee Sookpongthai : GENETIC DIVERSITY OF THE GENE ENCODING Pfs25 PROTEIN OF *Plasmodium falciparum* IN THAILAND. Advisor: Asst. Prof. SITTIPORN PATTARADILOKRAT, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. PONGCHAI HARNYUTTANAKORN, Ph.D., Assoc. Prof. MORAKOT KAEWTHAMASORN, Ph.D.

Pfs25 is a protein on the cell membrane of the sexual stages of *Plasmodium falciparum* and is chosen as a component of transmission-blocking vaccines (TBV) which are considered tools for controlling the spread of malaria. While Pfs25 vaccines made with the antigen of a lab strain 3D7 of *P. falciparum* are developed and now tested clinically, the diversity of the *Pfs25* gene in *P. falciparum* populations in Thailand or elsewhere is rarely studied. Thus, the present study aimed to investigate the diversity of the *Pfs25* gene of *P. falciparum* in Thailand and other global populations. The *Pfs25* sequences of 83 *P. falciparum* isolates in Thailand were generated and combined with 224 sequences from the GenBank and PlasmoDB databases, generating the first global database of *Pfs25* sequences. Various population genetic analyses were conducted. Results showed that there were 11 haplotypes of *Pfs25* in *P. falciparum* in the global population, 7 of which were prevalent in *P. falciparum* in Thailand. Interestingly, haplotype 2 (H2) was dominant in the *P. falciparum* population in Asia, while haplotype 1 (H1) was dominant in Africa and Central and South America. F_{st} analysis indicated that *Pfs25* haplotype distribution was distinct in different continents, indicating that *P. falciparum* populations in Asia, Africa, Central and South America were structurally different from each other. Despite the distinct haplotype patterns, the haplotype network and phylogenetic trees indicate that all rare haplotypes are closely related to either the major haplotype H1 or H2. The sequence diversity originated from 10 SNPs. The nucleotide diversity index (π) of 0.00085 indicates that the diversity of *Pfs25* was low, which could be due to the negative selection in the gene. Bioinformatics predictions showed that the secondary structures of Pfs25 haplotypes are highly conserved, suggesting that the mutations in Pfs25 are unlikely to cause structural changes in the Pfs25 antigen. It is suggested that all Pfs25 variants could be structurally the same and equally targeted by immunity induced by the current Pfs25 vaccines. In summary, this study reveals the low diversity of *Pfs25* and supports the use of Pfs25 as the TBV antigen for malaria control.

Field of Study: Zoology

Academic Year: 2021

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. สิทธิพร ภัทรดิลกรรัตน์ ที่ได้ให้โอกาสข้าพเจ้าในการทำวิจัยชิ้นนี้ ทั้งยังให้ความกรุณาอบรม สั่งสอน ชี้แนะเพื่อการพัฒนางานวิจัยให้ดียิ่งขึ้น และส่งเสริมให้ข้าพเจ้าได้ฝึกฝนทักษะด้านต่าง ๆ อยู่เสมอ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สำหรับตัวอย่างของเชื้อมาลาเรีย รวมทั้งความช่วยเหลือและการให้ความรู้ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. มรกต แก้วธรรมสอน สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร และคำแนะนำสำหรับการเขียนงานวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ดร. อธิกรมล เพ็งสกุล สำหรับตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากพื้นที่จังหวัดยะลา และคำแนะนำสำหรับการเขียนงานวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล และ ผศ.ดร. อัมพร วิเวกแก้ว สำหรับการสละเวลาคำแนะนำ และความช่วยเหลือในการดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณกรวิชญ์ อุทโยภาส ที่ให้ความช่วยเหลือทางเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณสุดาทิพย์ ชันธจิตต์ สำหรับความช่วยเหลือในการดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณภรดา พิรัชย์เดโช คุณจักรีทิพย์ อิศรางกูร ณ อยุธยา และคุณสุรวิรัตน์

นามเคน สำหรับความช่วยเหลือในการจัดทำเล่มวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และ โครงการพัฒนากำลังคนทางด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้าย ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัว โดยเฉพาะคุณวิลาศ สุขพงษ์ไทย มิตรสหาย สำหรับกำลังใจที่ให้มาตลอดการทำวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์

พรปวีณ์ สุขพงษ์ไทย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย.....	4
2.2 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i>	5
2.3 ยีนและหน้าที่ของแอนติเจน Pfs25 ในเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i>	25
2.4 ระบาดวิทยาของโรคมาลาเรียและผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคม.....	34
2.5 การศึกษาความหลากหลายของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ในประเทศไทย.....	40
2.6 สถิติและการทดสอบที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของยีน.....	44
2.7 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ.....	52
บทที่ 3 วิธีการศึกษา.....	53
3.1 ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i>	53
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย.....	53
3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ...	54

3.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูซิโพลีเมอเรส	55
3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Pfs25</i>	55
3.6 การสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลนานาชาติ	56
3.7 การวิเคราะห์รูปแบบและความหลากหลายของ haplotype ของยีน <i>Pfs25</i>	57
3.7.1 การวิเคราะห์จำนวน haplotype และการกระจายของ haplotype	57
3.7.2 การวิเคราะห์ค่า haplotype diversity (<i>hd</i>)	57
3.7.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างของสัดส่วนรูปแบบ haplotype.....	57
3.7.4 การวิเคราะห์ haplotype network ของยีน <i>Pfs25</i>	57
3.7.5 การสร้าง phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ของยีน <i>Pfs25</i>	58
3.8 การวิเคราะห์ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Pfs25</i>	59
3.8.1 การวิเคราะห์ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfs25</i>	59
3.8.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Pfs25</i>	59
3.8.3 การวิเคราะห์การคัดเลือกโดยธรรมชาติ ด้วย Tajima's <i>D</i> test.....	60
3.8.4 การวิเคราะห์การคัดเลือกโดยธรรมชาติ ด้วย Fu and Li's <i>D</i> * test และ Fu and Li's <i>F</i> * test.....	60
3.8.5 การวิเคราะห์การคัดเลือกโดยธรรมชาติด้วยอัตราส่วน d_N-d_S	60
3.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน <i>Pfs25</i> บริเวณที่มีการกลายพันธุ์.....	61
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	62
4.1 haplotype และการกระจายของ haplotype ในประเทศไทย	62
4.2 ความแตกต่างของสัดส่วนรูปแบบ haplotype ในประเทศไทย.....	67
4.3 รูปแบบและการกระจายของ haplotype ของยีน <i>Pfs25</i> ในเชื้อมาลาเรียทั่วโลก.....	69
4.4 การเปรียบเทียบรูปแบบ haplotype ของยีน <i>Pfs25</i> ของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ระหว่างทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย	72
4.5 การวิเคราะห์ haplotype network ของยีน <i>Pfs25</i>	73

4.6 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ของยีน <i>Pfs25</i>	75
4.7 ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfs25</i> และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์.....	77
4.8 การคัดเลือกโดยธรรมชาติ โดยสถิติ Tajima's <i>D</i> test, Fu and Li's <i>D*</i> test, Fu and Li's <i>F*</i> test และอัตราส่วน d_N-d_S	86
4.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน <i>Pfs25</i> บริเวณที่มีการกลายพันธุ์.....	90
บทที่ 5 อภิปรายผล.....	93
5.1 การอภิปรายเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน <i>Pfs25</i> ของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ในประเทศไทย	93
5.2 การอภิปรายเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน <i>Pfs25</i> ของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ทั่วโลก	98
5.3 การอภิปรายเกี่ยวกับความหลากหลายระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Pfs25</i> ของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i>	107
5.4 สรุปผลการทดลอง	113
5.5 ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	113
บรรณานุกรม.....	114
ภาคผนวก.....	142
ประวัติผู้เขียน.....	161

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายงานการพัฒนาวัคซีน Pfs25	29
ตารางที่ 2 ตัวอย่างของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ที่พบในธรรมชาติและ มีข้อมูล ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล PubMed	33
ตารางที่ 3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ในประเทศไทย.....	40
ตารางที่ 4 ตัวแปรที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า Tajima's <i>D</i> test	48
ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	55
ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ	56
ตารางที่ 7 การกระจาย haplotype ของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> จำนวน 7 haplotype ใน 7 จังหวัดของประเทศไทย	65
ตารางที่ 8 ค่า pairwise F_{st} ของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ในประเทศไทย	68
ตารางที่ 9 ค่า pairwise F_{st} ของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ทั่วโลก.....	72
ตารางที่ 10 ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> ทั่ว โลก จำนวน 307 ตัวอย่าง	80
ตารางที่ 11 ค่า nucleotide diversity (π) ของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> แยกตามแต่ละประเทศ และทวีป.....	82
ตารางที่ 12 ค่าสถิติ Tajima's <i>D</i> test, Fu and Li's <i>D</i> * test, Fu and Li's <i>F</i> * test และอัตราส่วน d_N-d_S ของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> ทั่วโลก	86

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 เชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ระยะ pre-erythrocytic stage.....	7
ภาพที่ 2 รูปร่างและออร์แกเนลล์หลักที่พบใน merozoite จากเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> ...	9
ภาพที่ 3 การบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของ merozoite.....	11
ภาพที่ 4 การพัฒนาของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ระยะ asexual stage ภายใน เม็ดเลือดแดง	14
ภาพที่ 5 การสร้าง gametocyte หรือ gametocytogenesis ของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ภายในเม็ดเลือดแดง	19
ภาพที่ 6 เชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ระยะ erythrocytic stage และการพัฒนาระยะ sexual stage	21
ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Pfs25</i> และลำดับกรดอะมิโนของ <i>Pfs25</i>	26
ภาพที่ 8 เชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ระยะ sexual stage ในยุง และแอนติเจนที่แสดงออก.....	27
ภาพที่ 9 แผนที่พื้นที่การระบาดของโรคมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> ทั่วโลกในปี ค.ศ. 2019	35
ภาพที่ 10 แผนที่พื้นที่ระบาดของโรคมาลาเรียในประเทศไทย ปี ค.ศ. 2019 (ภาพย่อย A), กราฟ อัตราการป่วยและอัตราการตายด้วยโรคมาลาเรียของประชากรในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010 ถึง ปี ค.ศ. 2019 (ภาพย่อย B).....	37
ภาพที่ 11 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน <i>Pfs25</i> ที่เพิ่มจำนวนจากจีโนมิกซีดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ในประเทศไทย.....	64
ภาพที่ 12 รูปแบบและการกระจายของ haplotype (H) ของยีน <i>Pfs25</i> ในเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> ในประเทศไทย.....	66
ภาพที่ 13 สัดส่วนและการกระจาย haplotype ของยีน <i>Pfs25</i> ของเชื้อมาลาเรีย <i>P. falciparum</i> แบ่งตามทวีป	71
ภาพที่ 14 haplotype network แสดงความสัมพันธ์ของ haplotype ของยีน <i>Pfs25</i> จากเชื้อ มาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i>	74

ภาพที่ 15 Bayesian phylogenetic tree ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* . 75

ภาพที่ 16 ตำแหน่ง mutation ของยีน *Pfs25* ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน บนสายพอลิเพปไทด์ของ *Pfs25* และ sliding window plot ของ nucleotide diversity ของยีน *Pfs25* จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 307 ตัวอย่าง ทั่วโลก..... 84

ภาพที่ 17 sliding window plot แสดงค่า Tajima’s *D* test (ภาพย่อย A), Fu and Li’s *D** test (ภาพย่อย B) และ Fu and Li’s *F** test (ภาพย่อย C) ที่ทดสอบกับยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 307 ตัวอย่าง ทั่วโลก..... 87

ภาพที่ 18 กราฟอัตราส่วน d_N-d_S ของยีน *Pfs25* จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 307 ตัวอย่าง 89

ภาพที่ 19 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน *Pfs25* แต่ละ haplotype บริเวณที่มีการกลายพันธุ์ จำนวน 10 ตำแหน่ง 91

ภาพที่ 20 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน *Pfs25* ตัดแปลงจากโครงสร้างตติยภูมิของ PDB id: 6B0G 92

ภาพที่ 21 จำนวนและสัดส่วน haplotype ของยีน *Pfs25* ของงานวิจัยชิ้นนี้เทียบกับข้อมูลการศึกษา ความหลากหลายระดับจีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 7,589 isolate ทั่วโลก.... 103

ภาพที่ 22 ค่า nucleotide diversity (π) ของแอนติเจนที่พบในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*.... 111

บทที่ 1

ความเป็นมาและความสำคัญ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* ชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์ มีจำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisi* และ *P. knowlesi* ในจำนวนนี้ *P. falciparum* เป็นสปีชีส์ที่พบการระบาดและก่อให้เกิดอัตราการตายมากที่สุด องค์การอนามัยโลกรายงานว่า ในปี ค.ศ. 2019 ผู้ป่วยโรคมาลาเรียทั่วโลกมีจำนวน 229 ล้านราย และเสียชีวิต 409,000 ราย (World Health Organization, 2020) ขณะเดียวกัน สำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข รายงานว่า ในปี ค.ศ. 2019 ประเทศไทยพบผู้ป่วยโรคมาลาเรียจำนวน 5,435 ราย และเสียชีวิต 5 ราย (พัชรिता หงษ์จันทร์, 2020) แม้ว่า การระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยมีแนวโน้มลดลง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึง 2019 แต่อัตราการเสียชีวิตกลับมีแนวโน้มที่ไม่แน่นอน ดังนั้น จะเห็นได้ว่า โรคมาลาเรียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับชาติและนานาชาติ

วงชีวิตของ *P. falciparum* ต้องอาศัยอยู่ทั้งในโฮสต์ที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือ มนุษย์ และโฮสต์ที่เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง คือ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) ระยะที่เชื้อมาลาเรียติดต่อจากมนุษย์ไปสู่ยุง เรียกว่า gametocyte ซึ่งหากสามารถยับยั้งการส่งต่อเชื้อมาลาเรีย จะช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ จึงมีการออกแบบและพัฒนาวัคซีนชนิดที่ป้องกันการระบาดของเชื้อมาลาเรีย (transmission-blocking vaccines) ขึ้น วัคซีนชนิดนี้อาศัยแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย ระยะ gametocyte เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น Pfs230 Pfs48/45 Pfs25 และ Pfs28 (Datta et al., 2017; Gozar et al., 1998; MacDonald et al., 2016; Talaat et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญของการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ เกิดจากแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังจะเห็นได้จากยีนสร้างแอนติเจน Merozoite Surface Protein-3 (MSP-3) Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) และ Glutamate-Rich Protein (GLURP) (Lumkul et al., 2018; Pattaradilokrat et al., 2016; Pattaradilokrat et al., 2018) ซึ่งพบว่า บางยีนอาจจะมีรูปแบบอัลลีลมากกว่า 10 รูปแบบ ในแต่ละประชากร ทำให้การออกแบบแอนติเจนที่เหมาะสมเป็นไปได้ยาก และหากแอนติเจนที่ใช้สร้างวัคซีนมีความแตกต่างจากแอนติเจนที่พบในเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ ก็อาจทำให้ภูมิคุ้มกันที่กระตุ้นโดยวัคซีนมีประสิทธิภาพต่ำ หรือไม่อาจป้องกันโรคมาลาเรียได้ ด้วยเหตุนี้ การออกแบบหรือพัฒนาแอนติเจนสำหรับใช้เป็นวัคซีน ต้องคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนนั้นในประชากรเชื้อมาลาเรียด้วย

แอนติเจนของเชื้อมาลาเรียในระยะ gametocyte มีความสำคัญต่อเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากแอนติเจนเหล่านี้ บางชนิดมีส่วนช่วยในการปฏิสนธิของเชื้อมาลาเรีย บางชนิดมีส่วนช่วยในการเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุง การยับยั้งการทำงานของแอนติเจนเหล่านี้ อาจมีส่วนช่วยให้การระบาดของโรคมาลาเรียเกิดได้ยากขึ้น แอนติเจนที่ปัจจุบันถูกนำมาพัฒนาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนต่อโรคมาลาเรีย คือ แอนติเจน Pfs25 โปรตีนชนิดนี้มีมวลโมเลกุล 25 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโน 217 เรซิดิว ถูกควบคุมด้วยยีน *Pfs25* ขนาด 654 คู่เบส และมีเพียงเอกซอนเดียว (single exon) สามารถพบโปรตีน Pfs25 ได้บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ระยะ gametocyte macrogamete zygote และ ookinete (Fries et al., 1990; Kaslow et al., 1988) ในระยะ macrogamete zygote และ ookinete การแสดงออกของโปรตีนจะมากขึ้นตามลำดับ Pfs25 ช่วยป้องกันเชื้อมาลาเรียจากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ในท่อทางเดินอาหารของยุงและมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงจากระยะ ookinete เป็นระยะ oocyst (Saxena et al., 2007; Tomas et al., 2001) เนื่องจาก Pfs25 เป็นโปรตีนที่พบได้ตั้งแต่ระยะ gametocyte และแสดงออกของโปรตีนจำนวนมากตั้งแต่ระยะ macrogamete ถึง ookinete ขณะนี้มีการผลิตวัคซีนที่สร้างจาก Pfs25 ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ) (Graaf et al., 2021) และได้ผ่านการทดสอบทางคลินิกระยะที่ 1 กับมนุษย์แล้ว อย่างไรก็ตาม ในการนำแอนติเจนมาใช้หรือทดลองในวงกว้าง จำเป็นต้องมีข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม ขณะนี้มีการศึกษาเพียง 4 เรื่องเท่านั้น (Da et al., 2013; Kaslow et al., 1989a; Kaur et al., 2017; Patel et al., 2017) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า แอนติเจน Pfs25 ที่ใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนในปัจจุบัน มีความเหมือนหรือแตกต่างจากแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติหรือไม่ และหากจะต้องมีการทดลองวัคซีนชนิดนี้ในประเทศไทย วัคซีนเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพหรือไม่ และในปัจจุบันมีข้อมูลยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย จากเชื้อเพียง 5 ไอโซเลต (isolate) เท่านั้น โดยเชื้อเหล่านี้มาจากจังหวัดตากทั้งหมด

ดังนั้น งานวิจัยชิ้นนี้มีเป้าหมายที่จะสร้างฐานข้อมูลยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียทั่วโลก โดยเริ่มจากการสร้างลำดับพันธุกรรมของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 83 ตัวอย่าง จากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูงในประเทศไทย และนำไปรวมกับข้อมูลยีน *Pfs25* จำนวน 224 ตัวอย่าง ในฐานข้อมูล NCBI และ PlasmoDB เพื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Pfs25* และความสัมพันธ์ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* แต่ละพื้นที่การระบาดขององค์ความรู้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย และเป็นข้อมูลสำหรับการออกแบบ สร้าง และพัฒนาวัคซีนที่มีความจำเพาะกับกลุ่มประชากร ซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนควบคุมและจัดการกับโรคมาลาเรียต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ การกระจายอัลลีล และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum*



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในสกุล *Plasmodium* และเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย เชื้อมาลาเรียดำรงชีวิตเป็นปรสิต ต้องอาศัยอยู่ในโฮสต์ที่เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (definitive host) ได้แก่ ยุง และโฮสต์ที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง (intermediate host) ได้แก่ กลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก และสัตว์เลื้อยคลาน (Roberts and Janovy, 2005)

สิ่งมีชีวิตสกุล *Plasmodium* จัดแบ่งตามอนุกรมวิธาน (Roberts and Janovy, 2005) ดังนี้

Kingdom	Protista
Phylum	Apicomplexa
Class	Aconoidasida
Order	Haemospororida
Family	Plasmodiidae
Genus	<i>Plasmodium</i>

สิ่งมีชีวิตในสกุล *Plasmodium* จัดจำแนกได้เป็นอย่างน้อย 120 สปีชีส์ (Sinden and Gilles, 2002) ในจำนวนนี้มี 5 สปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในมนุษย์ ได้แก่

1. *Plasmodium falciparum*
2. *Plasmodium vivax*
3. *Plasmodium malariae*
4. *Plasmodium ovale* แบ่งเป็น 2 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Plasmodium ovale curtisi* และ *Plasmodium ovale wallikeri* (Sutherland et al., 2010)
5. *Plasmodium knowlesi*

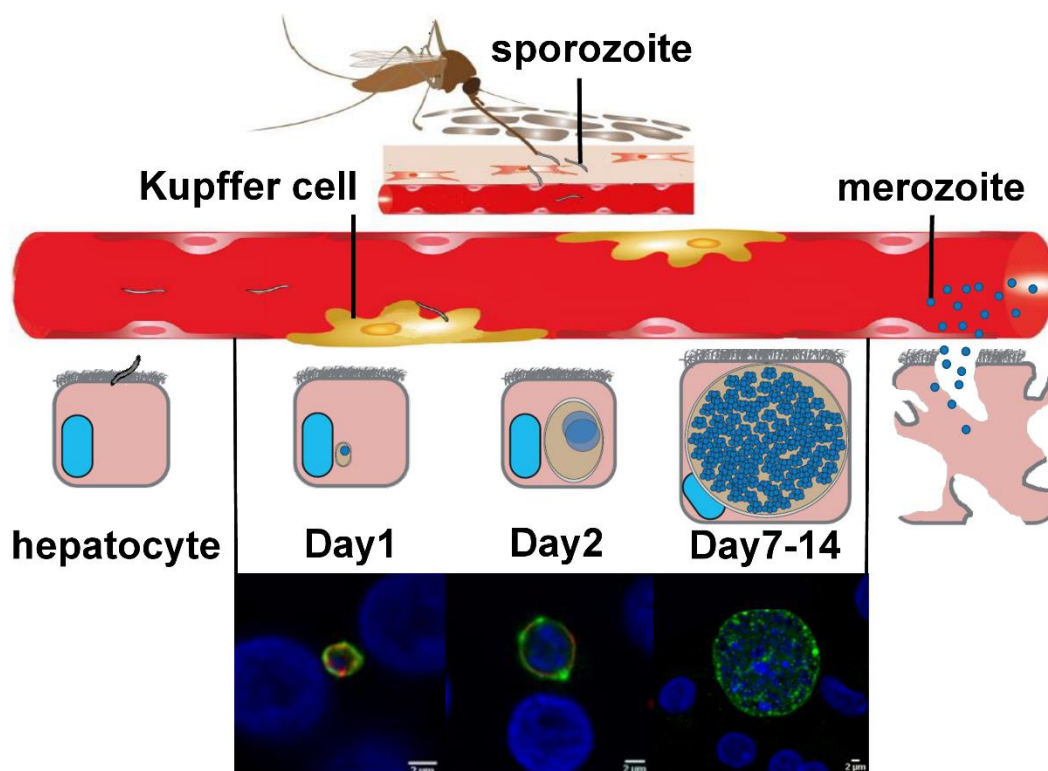
2.2 วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

เชื้อมาลาเรียเข้าสู่ร่างกายมนุษย์จากการดูดเลือดของยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เมื่อยุงแทง proboscis เข้าผิวหนังของมนุษย์ เชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite ซึ่งมีรูปร่างเรียวยาว ปลายทั้งสองด้านของเซลล์โค้งเข้าหากัน และอาศัยอยู่ที่ต่อมน้ำลายของยุงจะเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อเยื่อของมนุษย์ (dermis) เชื้อบางส่วนกระจายตัวเข้าสู่หลอดเลือดฝอย และระบบไหลเวียนโลหิต (ภาพที่ 1) (Chandramohan et al., 2021) จากการศึกษาในยุง *An. stephensi* การดูดเลือดแต่ละครั้งสามารถปล่อย sporozoite ออกมาได้มากถึง 978 เซลล์ และค่ามัธยฐานเท่ากับ 15 เซลล์ (Rosenberg et al., 1990) หลังจากเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต เชื้อมาลาเรียเคลื่อนที่ไปตามกระแสเลือดจนเข้าสู่ตับ ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของระยะ pre-erythrocytic stage development เชื้อมาลาเรียที่เข้าไปภายในตับจะจดจำเซลล์ตับโดยการทำงานของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของ sporozoite เช่น thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) (Akhouri et al., 2008) circumsporozoite protein (CSP) (Tewari et al., 2002) ซึ่งจะจับกับโปรตีนตัวรับบนเซลล์ตับ เช่น integrin $\alpha\beta 3$ (Dundas et al., 2018) heparin sulfate proteoglycans (HSPGs) (Zhao et al., 2016) หลังจากนั้น sporozoite สามารถเคลื่อนที่ผ่าน Kupffer cell หรือ hepatocyte จำนวนหนึ่งที่เรียงอยู่ติดกันอย่างต่อเนื่องจนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ หากการเคลื่อนที่ของ sporozoite ภายใน hepatocyte ถูกขัดขวางจะมีผลทำให้การเจริญของ sporozoite หยุดลง (Yang et al., 2017) อย่างไรก็ตาม การเคลื่อนที่ sporozoite ผ่าน hepatocyte อาจกระตุ้นให้เกิดเยื่อหุ้มเซลล์รั่วและการตายของเซลล์ (Mota et al., 2001) เหตุการณ์นี้อาจกระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ (Ishizuka et al., 2016) ส่วนเซลล์เป้าหมายของ sporozoite พบว่าเป็น hepatocyte ที่มีกระบวนการ glycolysis สูง หรือมีระดับของเอนไซม์ glucokinase ภายในไซโทพลาสซึมจำนวนมาก (Yang et al., 2021) ซึ่งช่วยให้เชื้อเจริญ เพราะเอนไซม์ glucokinase เร่งปฏิกิริยาการสร้าง glutamine ใน hepatocyte ที่จำเป็นต้องใช้สำหรับสร้างพิวรีน โปรตีน และลิพิดของเชื้อมาลาเรีย (Curi et al., 2005) ในขั้นตอนบุกรุกของเชื้อมาลาเรีย aquaporin-9 (AQP9) ที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ hepatocyte ของมนุษย์เป็นโปรตีนที่สำคัญ หากโปรตีนถูกยับยั้งการทำงาน จำนวนเซลล์ที่ถูกบุกรุกจะลดลง (Amanzougaghene et al., 2021) ทั้งนี้ มีการศึกษาพบว่า sporozoite ที่ออกมาพร้อมกับน้ำลายของยุงสามารถเดินทางไปยัง hepatocyte เป้าหมายได้มากถึงร้อยละ 80 (Lopaticki et al., 2017) ส่วนเซลล์ที่เหลืออาจถูกกำจัดโดย phagocyte ในเนื้อเยื่อของมนุษย์หรือ CD8⁺ T cell ใน lymph node

เมื่อเข้ามาสู่เซลล์เป้าหมายแล้ว จะพบว่า sporozoite เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างซึ่งเป็นผลจากการทำงานของ apetala 2 family transcription factor (AP2-L) และ Pumilio-2 (Puf2) โดยผลการศึกษาได้จาก *P. berghei* ซึ่งโปรตีนทั้งสองมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกัน (orthologs) กับ

โปรตีน *apetala 2* family transcription factor (AP2-L) และ mRNA-binding protein PUF2 (PfPuf2) ของ *P. falciparum* ตามลำดับ (Fan et al., 2004; Gomes-Santos et al., 2011; Iwanaga et al., 2012) จากนั้นเชื้อจะแบ่งเซลล์แบบ asexual multiplication เรียกเชื้อมาลาเรียที่มีการแบ่งเซลล์นี้ว่า liver stage schizont ภายในบรรจุ merozoite ไข่ หนึ่งของ *P. falciparum* การแบ่งเซลล์ใช้เวลา 7 ถึง 14 วัน (Siau et al., 2008) จึงเจริญเต็มที่ (ภาพที่ 1) และทำให้เส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ยาวได้มากถึง 60 ไมโครเมตร ส่งผลให้ hepatocyte ขนาดใหญ่ขึ้นจนเปิดเซลล์ที่อยู่ติดกัน เชื้อมาลาเรียระยะ liver stage schizont ใน hepatocyte 1 เซลล์ สามารถสร้าง merozoite ได้มากถึง 40,000 เซลล์ (Shortt et al., 1951) การพัฒนาของเชื้อขณะที่อยู่ใน hepatocyte ไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค สุดท้าย เมื่อ schizont เจริญเต็มที่ hepatocyte จะแตกออก และเชื้อระยะ merozoite ที่พร้อมบุกรุกเม็ดเลือดแดงจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตต่อไป



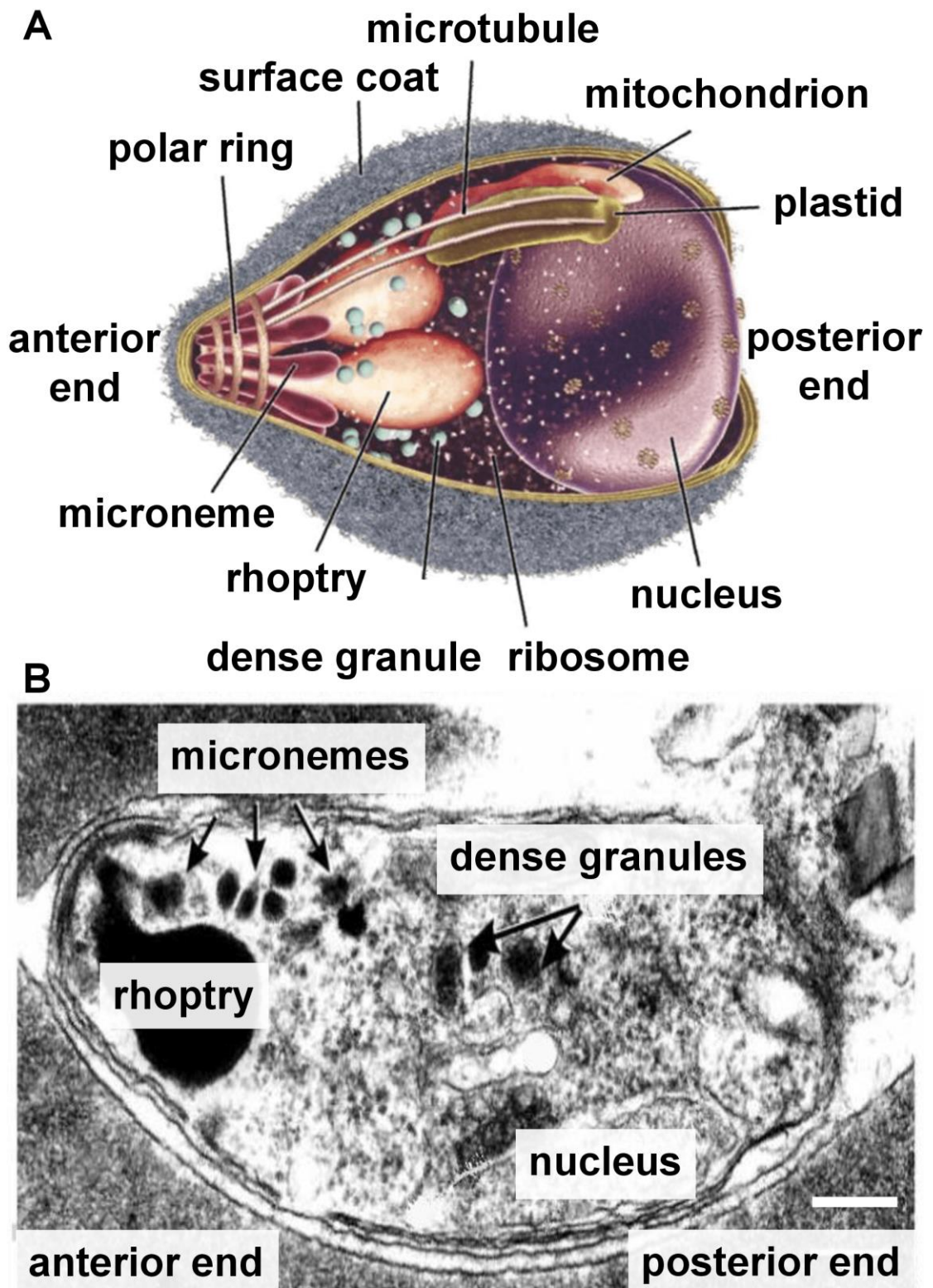


ภาพที่ 1 เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระยะ pre-erythrocytic stage

เชื้อมาลาเรียเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อเยื่อชั้น dermis ของมนุษย์ เข้าสู่เส้นเลือดฝอย ผ่าน Kupffer cell และเข้าสู่เซลล์ตับ (hepatocyte) เชื้อมาลาเรียเริ่มแบ่งนิวเคลียสในวันที่ 1 (สีน้ำเงิน) เพื่อสร้าง merozoite จนวันที่ 7 ถึง 14 hepatocyte มีขนาดใหญ่และแตกออกทำให้เชื้อมาลาเรียถูกปล่อยเข้าสู่เส้นเลือด immunofluorescence แสดงการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับวันที่ 1, 2 และวันที่ 7 ถึง 14 สีน้ำเงินแสดงนิวเคลียส สีแดงแสดง circumsporozoite protein (CSP) และสีเขียวแสดงเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ตับ จะเห็นว่า hepatocyte ที่ถูกบุกรุกมีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับ แถบมาตราส่วนเท่ากับ 2 ไมโครเมตร ดัดแปลงจาก Loubens et al. (2021); Siau et al. (2008); Swearingen and Lindner (2018)

ลักษณะเชื้อระยะ merozoite เป็นรูปไข่ ปลายด้าน anterior แหวมกว่า posterior และมีโครงสร้าง apical complex ปลายด้าน posterior โค้งมนและกว้าง (ภาพที่ 2) เซลล์กว้างประมาณ 1.40 ± 0.06 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1.98 ± 0.08 ไมโครเมตร (Dasgupta et al., 2014) โครงสร้าง apical complex ประกอบด้วย (1) polar ring จำนวน 1 ถึง 2 วง ไม่ปรากฏ conoid ดังกลุ่มสิ่งมีชีวิตใน Class Conoidasida (2) rhoptry ลักษณะเป็นโครงสร้างหนา ยาว ยื่นเข้าไปใน polar ring และ (3) microneme ลักษณะเป็นโครงสร้างยาว แต่สั้นกว่า rhoptry โค้งเล็กน้อย ซึ่งจะมีท่อเปิดร่วมกับ rhoptry ทางปลาย anterior นอกจากนี้ ออร์แกเนลล์หลักภายใน merozoite ประกอบด้วย microtubule ที่ยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของเซลล์ ไมโทคอนเดรีย plastid หรือ apicoplast dense granule ไรบิโอซอมและนิวเคลียส และบนเยื่อหุ้มเซลล์ของ merozoite พบโปรตีนจำนวนมากที่หุ้มเซลล์ไว้ (surface coat) (Roberts and Janovy, 2005)

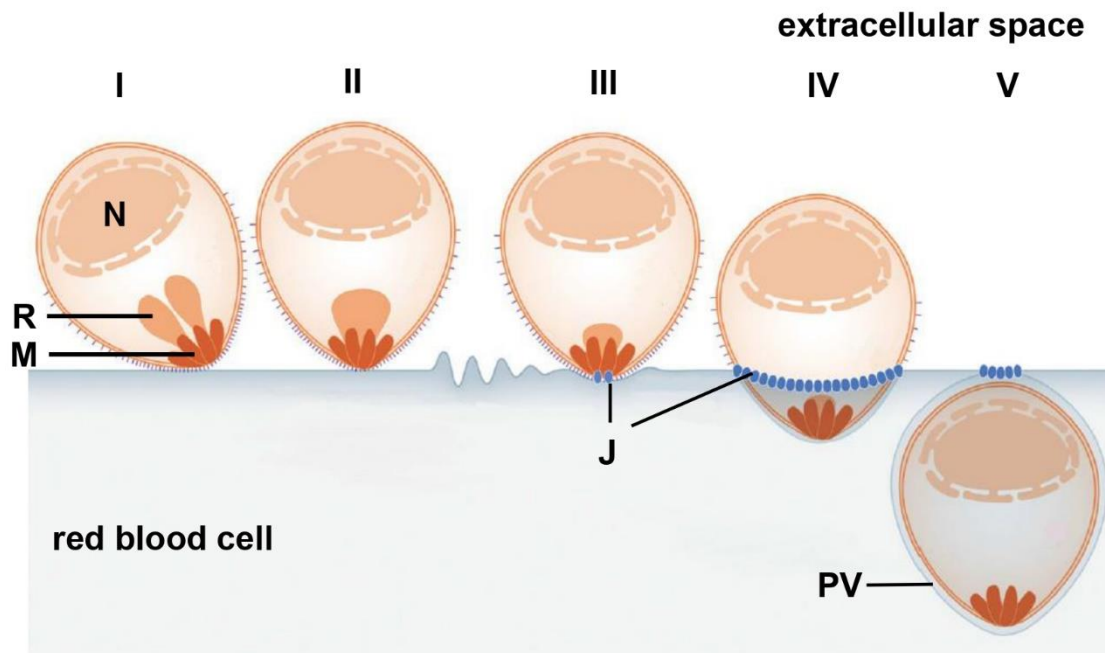
เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ของ merozoite สัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้เริ่มเกิดการจับกันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และ protein complex ของเชื้อที่ถูกควบคุมด้วย apetala 2 family domain transcription factor (PfAP2-I) (Santos et al., 2017) โดย merozoite surface protein 1 (MSP-1) เป็นโปรตีนสำคัญที่จับกับ glycophorin A ของเม็ดเลือดแดง ต่อมา merozoite หันด้าน anterior ให้สัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง (reorientation) แล้วเริ่มสร้าง tight junction ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของ merozoite และเม็ดเลือดแดง โดยโปรตีนสำคัญซึ่งหลังจากมาจากรูเปิดร่วมของ rhoptry และ microneme คือ rhoptry neck protein 2 (RON2) และ apical membrane antigen 1 (AMA-1) เมื่อปลายของ merozoite จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงดีแล้ว เชื้อจะเริ่มการเคลื่อนเข้าเม็ดเลือดแดง โปรตีน erythrocyte-binding antigen 175 (EBA-175) ที่จับกับ glycophorin A บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง (Koch et al., 2017) ส่งผลให้เชื้อแทรกเข้าเม็ดเลือดแดงได้จากแรงผลักที่เป็นผลการทำงานของ actin และ myosin (Robert-Paganin et al., 2019) อย่างไรก็ตาม เชื้อสามารถใช้กลไกนอกจากการจับกับ glycophorin A ได้ จากนั้นจะพบการเคลื่อนที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดงตามลำดับ ขณะเดียวกัน เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงจะเชื่อมปิดและเชื้อสร้าง parasitophorous membrane จากเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและโปรตีนจาก rhoptry เพื่อป้องกันการสัมผัสกับไซโทพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงโดยตรง (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 รูปร่างและออร์แกเนลล์หลักที่พบใน merozoite จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*

(ภาพย่อย A) แผนภาพโครงสร้างภายในเซลล์ของเชื้อมาลาเรียระยะ merozoite ประกอบด้วย polar ring, microtubule, microneme และ rhoptry รวมกันเป็นโครงสร้างของ apical complex, surface coat, mitochondrion, plastid หรือ apicoplast, dense granule, ribosome และ nucleus (ภาพย่อย B) ภาพจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ของเชื้อมาลาเรียระยะ merozoite ประกอบด้วย rhoptry, microneme, dense granule และ nucleus แถบมาตราส่วนเท่ากับ 200 นาโนเมตร ดัดแปลงจาก Bannister et al. (2003); Cowman and Crabb (2006)





ภาพที่ 3 การบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของ merozoite

ขั้นแรก (I) เยื่อหุ้มเซลล์ของ merozoite สัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง (attachment) ขั้นที่สอง (II) merozoite หันด้าน anterior สัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง (reorientation) ขั้นที่สาม (III) merozoite สร้าง tight junction (J) ระหว่าง merozoite และเม็ดเลือดแดงเพื่อเริ่มบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (invasion) ขั้นที่สี่ (IV) merozoite บุกกรุกเข้าเม็ดเลือดแดง ขั้นที่ห้า (V) merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์และสร้าง parasitophorous membrane เพื่อห่อหุ้มเซลล์จนกลายเป็น parasitophorous vacuole, N แทนนิวเคลียส, R แทน rhoptry, M แทน microneme, J แทน tight junction และ PV แทน parasitophorous vesicle ดัดแปลงจาก Koch and Baum (2016)

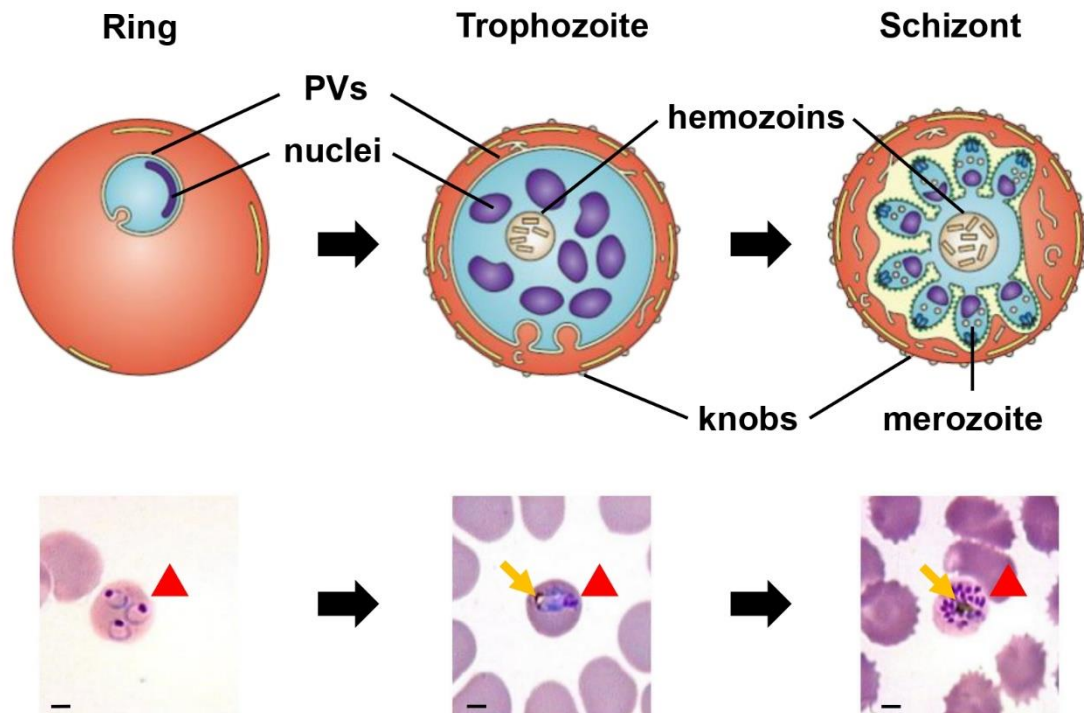
เมื่อเชื้อมาลาเรียระยะ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงเป็นที่เรียบร้อยแล้ว จะเกิดการสลายของ apical organelle เริ่มการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเพิ่มจำนวน เรียกว่าระยะ erythrocytic stage development แบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย คือ ring stage, trophozoite และ schizont

ในระยะ ring stage เชื้อส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมหรืออาจพบเป็นรูปร่างไม่แน่นอน (amoeboid form) (Grüring et al., 2011) ภายในเซลล์พบ 1 นิวเคลียส ระยะนี้เชื้อเริ่มนำ ฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงเข้ามาภายในเซลล์ด้วยการหว่าเข้า (invagination) และเก็บไว้ใน food vacuole (Dluzewski et al., 2008; Hanssen et al., 2011) เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa ซึ่งเป็นสี จำเพาะสำหรับแยกชนิดเชื้อมาลาเรีย จะพบว่า รูปร่างของเชื้อมาลาเรียมีลักษณะคล้ายวงแหวน (ภาพที่ 4) นิวเคลียสติดสีแดงและไซโทพลาสซึมติดสีน้ำเงินอยู่ใกล้กับขอบเซลล์ และสามารถพบ ระยะ ring stage ได้ประมาณ 2 ถึง 10 ชั่วโมง หลังการบุกรุกของ merozoite (Arnot et al., 2011)

ในระยะ trophozoite เชื้อเริ่มมีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) (Gupta et al., 2006) ไซโทพลาสซึมขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระยะ ring stage ภายใน food vacuole พบ hemozoin หรือ polymer ของ ferriprotoporphyrin IX ที่ย่อยไม่ได้จากฮีโมโกลบิน ร่วมกับ โปรตีนอื่น ๆ ของเชื้อ (Hanssen et al., 2011) อย่างไรก็ตาม เชื้อมาลาเรียยังมีช่องทางอื่น ๆ ในการนำ องค์ประกอบภายในไซโทพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงมายังเซลล์ได้ เช่น นำกลูโคสผ่านเข้าทาง hexose transporter (HT) (Low et al., 2019) สามารถพบ knob บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นโปรตีนที่ส่งมาจากเชื้อ เช่น *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1) (Azasi et al., 2021) subtelomeric variant open reading frame protein (STEVOR) (Niang et al., 2014) ทำให้เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อในระยะ trophozoite ไปยึดติดกับเซลล์อื่น ๆ ได้ เช่น endothelial cell และทำให้ขัดขวางการไหลเวียนของเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือด ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า cytoadhesion นอกจากนี้ เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียมีความสามารถยึด ติดกับเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ (Pipitaporn et al., 2000) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า rosetting ทำให้ เชื้อหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้ เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa พบนิวเคลียสติดสีแดง ไซโทพลาสซึมติดสีน้ำเงินมีขนาดใหญ่ hemozoin เป็นผลึกสีน้ำตาล (ภาพที่ 4) และสามารถพบ ระยะ trophozoite ได้ประมาณ 10 ถึง 26 ชั่วโมง หลังการบุกรุกของ merozoite (Arnot et al., 2011)

ในระยะ schizont เชื้อมีการแบ่งนิวเคลียสแบบ schizogony คือ การแบ่งนิวเคลียสทั้งหมด ก่อนจึงแบ่งไซโทพลาสซึม เพื่อสร้าง merozoite ใน *P. falciparum* พบเฉลี่ยจำนวน 22 เซลล์ แต่ อาจพบได้มากถึง 50 เซลล์ ในบางครั้ง (Garg et al., 2015) นอกจากนี้ พบการสร้างและแบ่ง ออร์แกเนลล์ที่สำคัญสำหรับ merozoite เช่น endoplasmic reticulum (ER) mitochondrion apicoplast (Dooren et al., 2005) จากนั้น เกิดการแบ่งไซโทพลาสซึมด้วยการหว่าเข้าของเยื่อหุ้ม

เซลล์ schizont มาขังนิวเคลียสและออร์แกเนลล์เพื่อสร้าง merozoite ที่สมบูรณ์ (Rudlaff et al., 2020) ในขั้นต่อไป schizont จะแตกออก เริ่มจากการเกิดรูที่ parasitophorous vacuole และเม็ดเลือดแดง ด้วยการสร้าง polymer ของ perforin-like protein 1 (PfPLP1) (Garg et al., 2013) ขณะเดียวกัน *P. falciparum* cGMP-dependent protein kinase (PfPKG) จะกระตุ้นให้ *P. falciparum* subtilase (PfSUB1) ออกจากเซลล์ไปยัง parasitophorous vacuole space ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นโปรตีนอื่น ๆ ทำงาน (Collins et al., 2013; Yeoh et al., 2007) เช่น serine repeat antigen 5 (SERA5) serine repeat antigen 6 (SERA6) โดย SERA6 เป็นโปรตีนสำคัญ เพราะเป็นแอนติเจนที่ไปตัด beta-spectrin ซึ่งเป็น cytoskeletal protein ของเม็ดเลือดแดงออก ทำให้โครงสร้างของเม็ดเลือดแดงเสียไป (Tan et al., 2021) นอกจากนี้ พบว่า MSP-1 เป็นอีกหนึ่งโปรตีนที่ส่งเสริมการแตกของเม็ดเลือดแดงด้วยการทำหน้าที่จับกับ cytoskeleton ของเม็ดเลือดแดง (Das et al., 2015) ด้วยกลไกเหล่านี้มีผลให้เม็ดเลือดแดงแตก และ merozoite เข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตอีกครั้งและบุกรุกเม็ดเลือดแดงถัดไป ทั้งนี้ ตั้งแต่ PfSUB1 ทำงาน SERA5 จะควบคุมไม่ให้เม็ดเลือดแดงแตกออกก่อนที่กลไกอื่น ๆ จะทำงานเสร็จ (Collins et al., 2017) เมื่อย้อมสี schizont ด้วยสี Giemsa จะพบ merozoite ที่ติดสีอยู่ภายในเซลล์จำนวนมาก และ hemozoin ติดสีน้ำตาล (ภาพที่ 4) สามารถพบการแบ่งนิวเคลียสครั้งแรกของ schizont ได้ตั้งแต่ 26 ถึง 28 ชั่วโมง หลังการบุกรุกของ merozoite ซึ่งตั้งแต่ 28 ถึง 42 ชั่วโมง สามารถพบ schizont ที่แบ่งนิวเคลียสแล้ว และพบการแตกของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อระยะ schizont เจริญเต็มที่ประมาณ 42 ถึง 48 ชั่วโมง หลังการบุกรุกของ merozoite (Arnot et al., 2011)



ภาพที่ 4 การพัฒนาของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระยะ asexual stage ภายในเม็ดเลือดแดง

หลังเข้าสู่เม็ดเลือดแดง เชื้อมาลาเรียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นลักษณะกลม นิวเคลียสอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่ง เมื่อย้อมสี Giemsa มีลักษณะคล้ายวงแหวน เรียกว่าระยะ ring stage ระยะถัดไป คือ ระยะ trophozoite เชื้อจำลองดีเอ็นเอ พบ hemozoin ภายในเซลล์ และเชื้อส่งออกโปรตีนเพื่อสร้าง knob บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง เมื่อย้อมด้วยสี Giemsa พบนิวเคลียสสีน้ำเงินขนาดใหญ่ขึ้นและ hemozoin สีน้ำตาล ระยะสุดท้าย คือ schizont เชื้อแบ่งนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมเพื่อสร้าง merozoite ย้อมสี Giemsa พบนิวเคลียสของ merozoite ขนาดเล็กจำนวนมากภายในเซลล์ และพบ hemozoin, PV แทน parasitophorous vacuole หัวลูกศรสีแดง แทนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย ลูกศรสีส้มชี้ไปยัง hemozoin แถบมาตราส่วนเท่ากับ 2 ไมโครเมตร ดัดแปลงจาก Maier et al. (2009); Poostchi et al. (2018)

เชื้อมาลาเรียและการเพิ่มจำนวนของเชื้อมาลาเรียเป็นวงจร เป็นสาเหตุให้เกิดอาการของโรคมาลาเรีย (pathogenesis) แบ่งกระบวนการก่อให้เกิดโรคได้ 2 ลักษณะ คือ

1. เชื้อมาลาเรียกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์
2. ของเสียจากเชื้อมาลาเรียจากการแตกของ schizont กระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์

เชื้อมาลาเรียระยะ erythrocytic stage development ส่งผลให้เกิดอาการของโรค กรณีผู้ป่วยอาการไม่รุนแรงพบแสดงอาการ ได้แก่ ครั่นเนื้อตัว ปวดหัว เวียนหัว ปวดบริเวณคอ หลัง ข้อต่อ ร่างกาย ทานอาหารได้น้อย คลื่นไส้ ปวดท้อง อาเจียน ถ่าย และมีไข้เป็นช่วง ๆ ประมาณ 2 ถึง 6 ชั่วโมง แล้วไข้จะลดลง แต่จะมีไข้อีกครั้ง สำหรับผู้ติดเชื้อ *P. falciparum* อาการไข้เกิดขึ้นทุก 36 ถึง 48 ชั่วโมง ช่วงที่ไม่เกิดอาการไข้เป็นระยะที่เชื้อพัฒนาในเม็ดเลือดแดง (Warrell, 2002)

อาการของผู้ป่วยรุนแรง (Warrell, 2002) ได้แก่ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง โดยตาของผู้ป่วยจะแข็งหรือส่ายไปมา ศีรษะส่ายไปมา กัดฟันตลอดเวลา ต่อมาผู้ป่วยอาจเกิดอาการโคม่าได้ มีการศึกษาพบว่า hemozoin ที่ถูกปล่อยออกมาหลังการแตกของเม็ดเลือดแดงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกับอาการมาลาเรียขึ้นสมอง (Raulf et al., 2019) ภาวะโลหิตจาง จะพบได้บ่อยในหญิงตั้งครรภ์ โดยปริมาณกรดยูริกจากเชื้อระยะ schizont และกรดยูริกที่ปล่อยออกมาหลังการแตกของเม็ดเลือดแดงสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ cytokine เช่น cytokine interleukine (IL)-6 tumor necrosis factor (TNF) ในกระแสเลือด (Lopera-Mesa et al., 2012) เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลให้การสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง ภาวะดีซ่านเนื่องจากตับทำงานผิดปกติ ไตวาย ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ เลือดออกตามผิวหนังหรืออวัยวะภายใน ภาวะน้ำท่วมปอด และอาการช็อค ความรุนแรงของโรคเป็นผลจากปริมาณของเชื้อมาลาเรียในร่างกายที่เพิ่มมากขึ้น (Bernabeu et al., 2016) ซึ่งหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษา จะส่งผลให้เสียชีวิตได้

ยาสำหรับรักษาผู้ป่วยมาลาเรียที่ติดเชื้อ *P. falciparum* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม สำหรับผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคต่างกัน (World Health Organization, 2021)

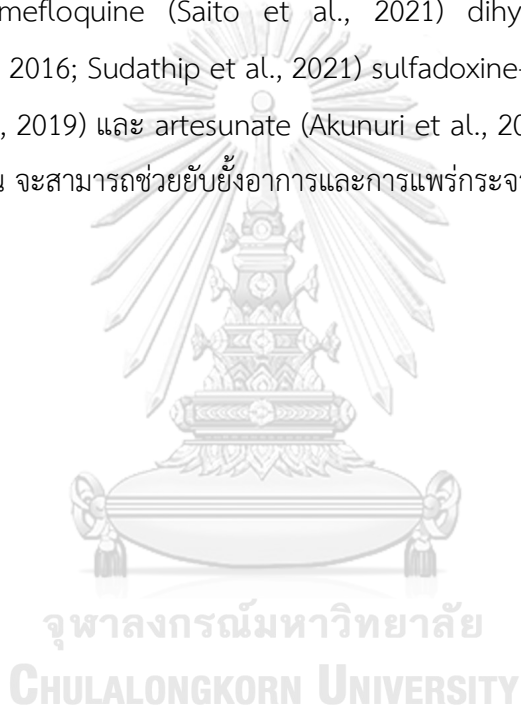
ยาสำหรับรักษาผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง ได้แก่

1. artemether ร่วมกับ lumefantrine
2. artesunate ร่วมกับ amodiaquine
3. artesunate ร่วมกับ mefloquine
4. dihydroartemisinin ร่วมกับ piperaquine
5. artesunate ร่วมกับ sulfadoxine-pyrimethamine

ยาสำหรับผู้ป่วยอาการรุนแรง คือ artesunate

ยาสำหรับรักษามาลาเรียในประเทศไทยในผู้ป่วยอาการไม่รุนแรง ได้แก่ artesunate ร่วมกับ pyronaridine และ primaquine, dihydroartemisinin ร่วมกับ piperaquine และ primaquine และยาสำหรับผู้ป่วยอาการรุนแรง คือ artesunate (กองโรคติดต่อทางนารีโดยแมลง กรมควบคุมโรค, 2021)

ยารักษาโรคมาลาเรียส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์กับเชื้อระยะ erythrocytic stage (Auparakkitanon et al., 2006; Bridgford et al., 2018; Gopalakrishnan and Kumar, 2015; Tempera et al., 2015) อย่างไรก็ตาม พบบางงานการื้อยา artemether-lumefantrine (Ebohon et al., 2019; Silva-Pinto et al., 2021) artesunate-amodiaquine (Mairet-Khedim et al., 2021) artesunate-mefloquine (Saito et al., 2021) dihydroartemisinin-piperaquine (Amaratunga et al., 2016; Sudathip et al., 2021) sulfadoxine-pyrimethamine (Amimo et al., 2020; Eijk et al., 2019) และ artesunate (Akunuri et al., 2018) ดังนั้น หากมีการนำวัคซีนต้านมาลาเรียมาใช้งาน จะสามารถช่วยยับยั้งอาการและการแพร่กระจายของโรคได้



หลังจากเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ระยะ erythrocytic stage ประมาณ 8.5 ถึง 12 วัน (Reuling et al., 2018) เชื้อระยะ schizont บางส่วนจะได้รับการกระตุ้นจากโฮสต์ เช่น ปริมาณ hemoglobin ที่ลดลงในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อมาลาเรีย (Nacher et al., 2002) ปริมาณที่ลดลงของ lysophosphatidylcholine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสร้าง phosphatidylcholine ของเชื้อ (Brancucci et al., 2017) การได้รับยา quinine, artemisinin, piperaquine หรือ sulfadoxine-pyrimethamine (Peatey et al., 2009; Reuling et al., 2018) หรือการกระตุ้นจากเชื้อเอง เช่น ปริมาณเชื้อในระบบไหลเวียนโลหิต (parasitemia) ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ merozoite ที่บุกรุกเม็ดเลือดแดงเซลล์ถัดไปพัฒนาเป็นเชื้อระยะ sexual stage แทนที่จะพัฒนาเป็นระยะ ring stage trophozoite และ schizont ตามลำดับ (asexual stage) การพัฒนาของเชื้อระยะ sexual stage เป็นการสร้าง gametocyte (gametocytogenesis) โดยมี transcription factor ที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเชื้อจาก asexual stage เป็น sexual stage คือ apetala 2 family transcription factor 2-G (AP2-G) (Josling et al., 2020; Kafsack et al., 2014) ขณะที่เชื้อแบ่งเซลล์แบบ asexual stage, heterochromatin protein 1 (HP1) เป็นตัวยับยั้งการแสดงออกของยีน apetala 2 family transcription factor 2-G (*ap2-g*) และเมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ sexual stage, gametocyte development protein 1 (GDV1) ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง HP1 (Filarsky et al., 2018; Rea et al., 2018)

เมื่อ merozoite ที่ถูกกำหนดให้เจริญเป็น gametocyte บุกกรุกเม็ดเลือดแดงแล้ว จะเดินทางไปยัง bone marrow หรือม้าม เพื่อพัฒนาเป็น gametocyte ที่พร้อมเข้าสู่ยุง (gametocytogenesis) สำหรับเชื้อ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 8 ถึง 12 วัน สามารถแบ่งการพัฒนาของ gametocyte ได้ 5 ระยะ (Sinden, 1982) (ภาพที่ 5) คือ

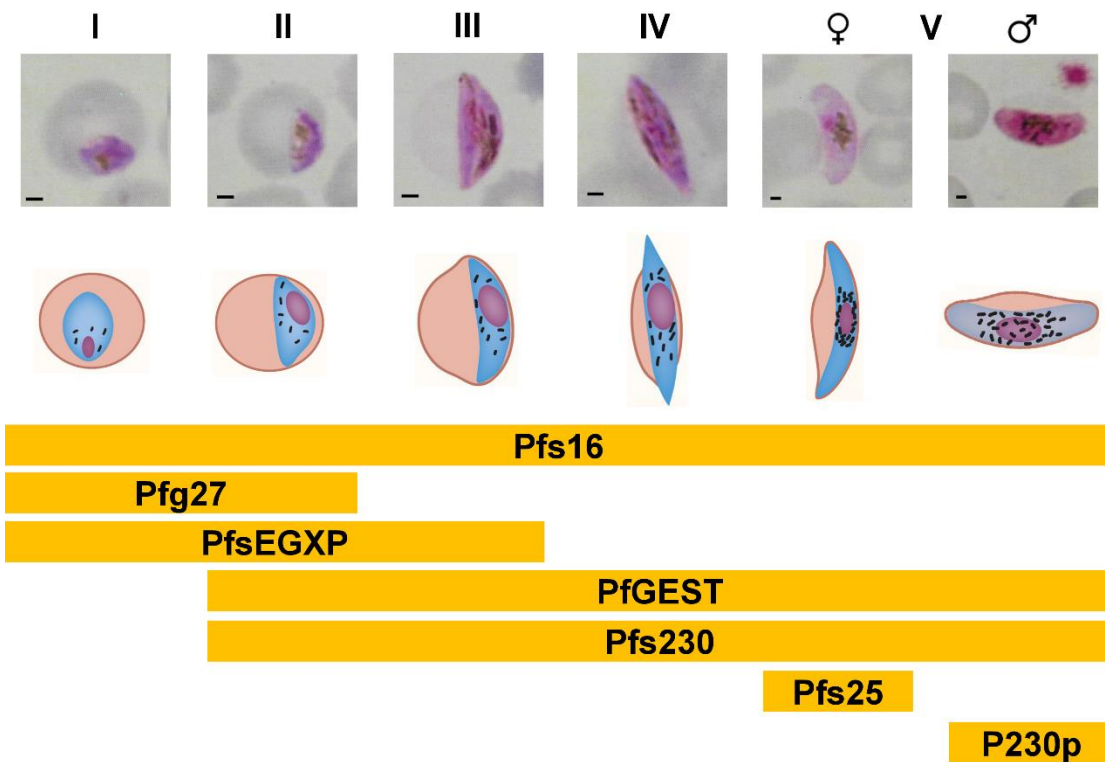
1. stage I gametocyte เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมเหมือนกับระยะ ring stage นิวเคลียสลักษณะกลม แต่สามารถแยก stage I gametocyte จากระยะ ring stage ได้ด้วยโปรตีน parasitophorous vacuole membrane protein S16 (Pfs16) ซึ่งจะพบบนเยื่อหุ้มเซลล์ parasitophorous และเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อระยะ gametocyte เท่านั้น (Bruce et al., 1994)

2. stage II gametocyte เซลล์เริ่มมีโครงสร้างยึดยาวออกมา แต่ไม่เกินรัศมีของเซลล์ นิวเคลียสลักษณะกลม นอกจากรูปร่างเซลล์แล้วสามารถแยกระยะนี้จาก stage I gametocyte ได้ด้วยโปรตีน Pfpeg-4 ซึ่งแสดงออกใน stage II gametocyte เท่านั้น (Silvestrini et al., 2005)

3. stage III gametocyte เซลล์มีโครงสร้างยึดยาวออกมาอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของรัศมีเซลล์ แต่ด้านหนึ่งของเซลล์มีความยาวมากกว่าอีกด้าน ส่งผลให้เซลล์มีรูปร่างคล้ายกับตัว D นิวเคลียสลักษณะกลม

4. stage IV gametocyte เซลล์ยี่ดียวขึ้นโดยแต่ละด้านของเซลล์ยาวเท่ากัน พบปลายเซลล์มีลักษณะแหลม นิวเคลียสหดเล็กลง

5. stage V gametocyte เซลล์ลักษณะยาว โค้ง ปลายเซลล์สองข้างมนเนื่องจากการสลายของ subpellicular microtubules นิวเคลียสจะยี่ดียวไปตามรูปร่างเซลล์ ส่งผลให้เซลล์รูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent-shaped) สามารถแยกระหว่าง gametocyte เพศผู้ (microgametocyte) และ gametocyte เพศเมีย (macrogametocyte) ได้โดยย้อมสี Giemsa นิวเคลียสของ microgametocyte มีขนาดใหญ่ติดแดงอ่อน ไซโทพลาสซึมสีน้ำเงินหรือน้ำเงินปนแดง และกระจายตัวมากกว่าเพศเมีย ขณะที่นิวเคลียสของ macrogametocyte มีขนาดเล็กติดสีแดงเข้ม ไซโทพลาสซึมสีน้ำเงินเข้มเนื่องจากมีไรโบโซมจำนวนมาก และยังพบ osmiophilic bodies จำนวนมาก ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของ gametocyte เมื่ออยู่ในท่อทางเดินอาหารของยุง (Koning-Ward et al., 2008) ยังพบอีกว่า macrogametocyte ถูกควบคุมการแสดงออกของโปรตีนด้วย apetala 2 family transcription factor (AP2-O3) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนเพศผู้ (Li et al., 2021) และพบโปรตีนที่แสดงออกใน macrogametocyte และ microgametocyte ที่เจริญเต็มที่แล้วจำนวน 1,244 และ 1,387 ชนิดตามลำดับ โดยมากกว่าโปรตีนที่พบในระยะ blood stage ซึ่งมีจำนวน 714 ชนิด (Lasonder et al., 2002; Miao et al., 2017) สุดท้าย gametocyte เจริญเต็มที่ก็จะกลับเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตอีกครั้ง

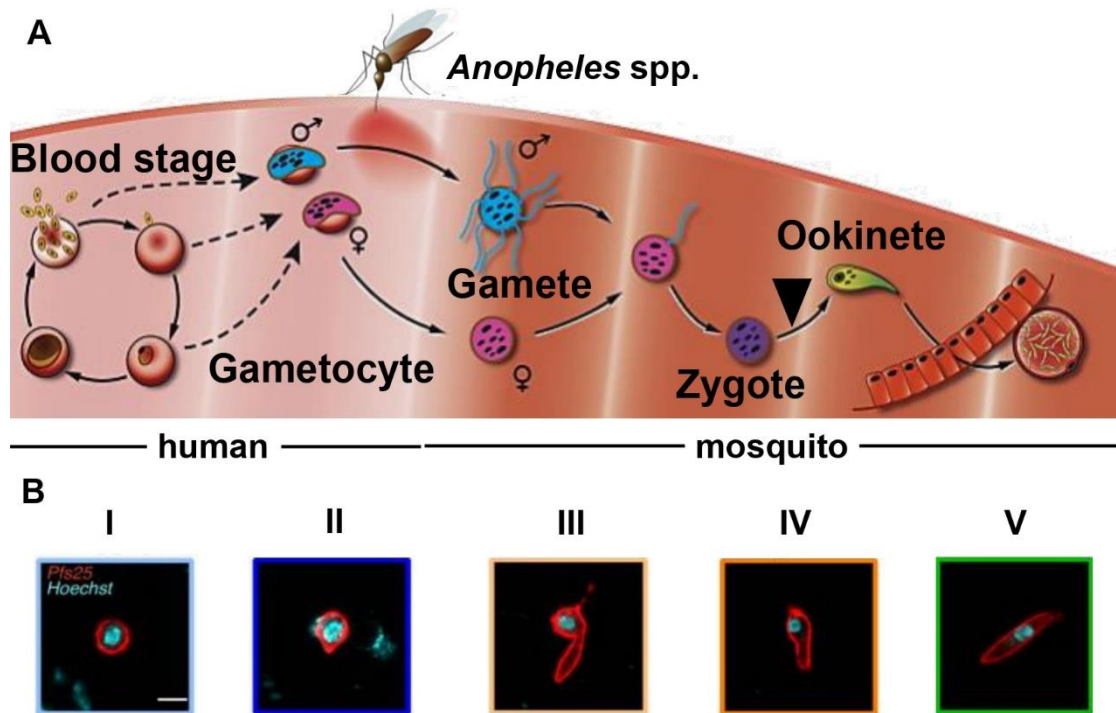


ภาพที่ 5 การสร้าง gametocyte หรือ gametocytogenesis ของเชื้อมาลาเรีย

P. falciparum ภายในเม็ดเลือดแดง

แบ่งออกได้ 5 ระยะ ระยะที่ I มีลักษณะคล้ายกับเชื้อมาลาเรียระยะ ring stage ระยะที่ II ถึง IV เซลล์จะยืดยาวขึ้น และยาวมากที่สุดในระยะที่ IV สุดท้าย ระยะที่ V ปลายของเซลล์จะกลมมน สามารถแยก gametocyte เพศเมียและเพศผู้ออกจากกันได้ด้วยการย้อมสี Giemsa gametocyte เพศเมีย (macrogametocyte) มีนิวเคลียสขนาดเล็กติดสีแดงเข้ม ไฮโทพลาสติดสีน้ำเงิน gametocyte เพศผู้ (microgametocyte) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ติดสีแดงอ่อน ไฮโทพลาสติดสีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินปนแดง gametocyte ระยะที่ I ถึง IV พัฒนาของอยู่ภายใน bone marrow หรือม้าม และระยะที่ V เท่านั้นที่พบในกระแสโลหิต แอนติเจนที่พบระหว่างการสร้าง gametocyte ได้แก่ parasitophorous vacuole membrane protein S16 (Pfs16), gamete antigen 27 (Pfg27), early gametocyte enriched phosphoprotein (PfsEGXP), gamete egress and sporozoite traversal protein (PfGEST), 6-cysteine protein P230 (Pfs230), ookinete surface protein P25 (Pfs25) และ 6-cysteine protein P230p (P230p) ความยาวของแถบแสดงช่วงการแสดงออกของแอนติเจน แถบมาตราส่วนเท่ากับ 1 ไมโครเมตร ดัดแปลงจาก สมชาย จงวุฒิเวศย์ และจตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ (2006); Josling et al. (2018)

เมื่อยุง *Anopheles* spp. ดูดเลือดจากผู้มีเชื้อมาลาเรียจะได้รับเชื้อมาลาเรียเข้าไปยังท่อทางเดินอาหาร (midgut) เชื้อมาลาเรียระยะ gametocyte เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นระยะถัดไปในยุงได้ gametocyte ในท่อทางเดินอาหารของยุงจะออกจากเม็ดเลือดแดงด้วยการกระตุ้นจากปัจจัยหลัก คือ กรด xanthurenic จากยุง (Yamamoto et al., 2018) และปัจจัยร่วม คือ ค่า pH ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 0.2 ถึง 0.3 ในท่อทางเดินอาหารของยุง และอุณหภูมิที่ลดลงประมาณ 5 องศาเซลเซียส (Billker et al., 1998) ส่งผลให้ protein kinase (PKG) (McRobert et al., 2008) ส่งสัญญาณไปยัง calcium-dependent protein kinase 1 (CDPK1) ส่งผลให้ gametocyte เปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลม จากนั้น parasitophorous vacuole membrane และเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงจะแตกออกซึ่งเป็นผลจากการทำงานของ cysteine protease, aspartic protease, cysteine/serine protease ส่งผลให้เชื้อมาลาเรียสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายในท่อทางเดินอาหารของยุง และพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) (Bansal et al., 2018; Sologub et al., 2011) ขณะที่ gamete เพศเมีย (macrogamete) มีขนาดใหญ่ขึ้น gametocyte เพศผู้ จะแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อสร้าง gamete เพศผู้ (microgamete) ที่มีลักษณะเรียวยาวเคลื่อนที่ได้ โดย 1 microgametocyte สร้างได้ 8 microgamete เรียกกระบวนการนี้ว่า exflagellation จากนั้น microgamete จะเดินทางไปปฏิสนธิกับ macrogamete และได้ zygote ซึ่งพบว่า conserved male-specific protein (HAP2) เป็นโปรตีนที่สำคัญกับการปฏิสนธิของ gamete (Angrisano et al., 2017) หลังจากนั้น zygote จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและแบ่งเซลล์แบบ meiosis (ภาพที่ 6A)



ภาพที่ 6 เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระยะ erythrocytic stage และการพัฒนาระยะ sexual stage

(ภาพย่อย A) ยุง (*Anopheles* spp.) ดูดเลือดผู้มีเชื้อมาลาเรียระยะ gametocyte หลังเชื้อเข้าไปยังท่อทางเดินอาหารของยุงจะสร้าง gamete เพศเมีย (macrogamete) ซึ่งเซลล์มีลักษณะกลมใหญ่ และ gamete เพศผู้ (microgamete) เกิดกระบวนการ exflagellation และเข้าผสมพันธุ์กับ macrogamete จนได้ zygote จากนั้น พัฒนาเป็น ookinete ที่มีรูปร่างเรียวยาวและแทรกผ่านเซลล์ผนังท่อทางเดินอาหารของยุงเพื่อสร้าง oocyst หัวลูกศรสีดำแทนช่วงการพัฒนาจาก zygote เป็น ookinete (ภาพย่อย B) การพัฒนารูปร่างจาก zygote เป็น ookinete ด้วยการย้อมสี immunofluorescence ประกอบด้วย 5 ระยะ ระยะที่ I ถึง III พบเซลล์ลักษณะกลมและนิวเคลียสอยู่บริเวณศูนย์กลางวงกลม แต่เซลล์ยืดยาวขึ้นตามลำดับ ระยะที่ IV นิวเคลียสเป็นทรงกลมอยู่กลางเซลล์ แต่บริเวณที่ยืดยาวมีความหนาเพิ่มขึ้น และระยะที่ V ookinete เจริญเต็มที่ เซลล์และนิวเคลียสยืดยาว นิวเคลียสติดสีน้ำเงิน โปรตีน Pfs25 บนเยื่อหุ้มเซลล์ติดสีแดง ดัดแปลงจาก Kooij and Matuschewski (2007); Siciliano et al. (2020)

เนื่องจาก zygote จำเป็นต้องเคลื่อนที่ออกจากท่อทางเดินอาหารของยุง เดินทางไปยังต่อมน้ำลายของยุง เพื่อไปยังโฮสต์ถัดไป zygote จึงเกิดการเปลี่ยนรูปร่างและโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์เป็นระยะ ookinete ซึ่งแบ่งการพัฒนารูปร่างได้ 5 ระยะ (ภาพที่ 6B) (Siciliano et al., 2020) คือ

1. เซลล์รูปร่างกลม ลักษณะเหมือน macrogamete นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์
2. เซลล์รูปร่างกลม แต่มี knob ยื่นออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ ความยาวของ knob ไม่เกินรัศมีของเซลล์ นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์
3. เซลล์รูปร่างกลม knob ยืดยาวมากขึ้นเกินรัศมีของเซลล์ นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์
4. เซลล์เริ่มเปลี่ยนรูปร่างเนื่องจากส่วนที่ยื่นยาวออกมามีความหนาเพิ่มขึ้น นิวเคลียสยังคงอยู่กลางเซลล์บริเวณเดิม
5. เซลล์มีรูปร่างยาว นิวเคลียสเคลื่อนที่มายังส่วนที่เคยยืดยาวออกมา ชั้นนี้ ookinete เจริญเต็มที่และมีความสามารถเคลื่อนที่ผ่านเซลล์ epithelial ของท่อทางเดินอาหารยุงได้

การแสดงออกโปรตีนของ ookinete ถูกควบคุมด้วย apetala 2 family transcription factor (PfAP2-O) (Cubillos et al., 2021; Yuda et al., 2009) หลังจากนั้นจะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ epithelium โดยขั้นแรกเชื้อจะสร้าง chitinase เพื่อย่อย chitin ที่อยู่ในชั้นของ peritrophic matrix (Tsai et al., 2001) ที่ปกคลุมบน epithelium ก่อน ต่อมาปลายของ ookinete ด้าน apical จับกับเซลล์ epithelium แล้วบุกรุกเข้าสู่เซลล์แรกและเคลื่อนที่ไปยังอีกเซลล์โดยผ่านทางด้านข้างของเซลล์ ส่งผลให้เซลล์แรกหลุดออกสู่ท่อทางเดินอาหารของยุง จากนั้น ookinete จะเดินทางไปยัง basal lamina เมื่อเดินทางมาถึง basal lamina เชื้อจะสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่และเริ่มเปลี่ยนเป็นระยะ oocyst ที่มีลักษณะกลม อย่างไรก็ตาม ระบบภูมิคุ้มกันของยุงจะตอบสนองต่อการเดินทางของ ookinete ผ่านเซลล์ epithelial เชื้อมาลาเรียจึงสร้างโปรตีนสำหรับหลบหลีกภูมิคุ้มกันของยุง เช่น *Plasmodium* infection of the mosquito midgut screen 43 (PIMMS43) ทำหน้าที่ขัดขวางการส่งสัญญาณในระบบภูมิคุ้มกันของยุง (Ukegbu et al., 2020) 6-cysteine protein P47 (Pfs47) ทำหน้าที่ขัดขวางการส่งสัญญาณที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ epithelium (Ramphul et al., 2015) ภายใน oocyst มีการแบ่งเซลล์เพื่อสร้าง sporozoite ที่มีรูปร่างเรียวยาว และมีโครงสร้างของ apical complex ใน 1 oocyst ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สามารถพบ sporozoite ตั้งแต่ 1,359 ถึง 4,554 เซลล์ (Rosenberg and Rungsiwongse, 1991) บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ sporozoite พบว่ามีโปรตีน CSP อยู่เป็นจำนวนมาก หากเชื้อขาด CSP ไปจะไม่สามารถสร้าง sporozoite ได้ (Marin-Mogollon et al., 2018) เมื่อ sporozoite เจริญเต็มที่ที่จะแตกออกจาก oocyst โดยการทำงานของ thrombospondin-related protein 1 (TRP1) ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการทำงานที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม TRP1 มีความเกี่ยวข้องกับการ

เคลื่อนที่ของ sporozoite ที่อยู่ใน oocyst และการเคลื่อนที่จะส่งผลให้ sporozoite สามารถออกมาจาก oocyst (Klug and Frischknecht, 2017) เพื่อเคลื่อนที่เข้าสู่ haemocoel และเดินทางไปยังต่อมน้ำลายของยุง TRAP บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ sporozoite ทำหน้าที่จับกับ saglin ของเซลล์ต่อมน้ำลายส่งผลให้หยุดการเคลื่อนที่ (O'Brochta et al., 2019) และเชื้อจะเข้าสู่เซลล์ต่อมน้ำลายยุง โดยอาศัยการทำงานของ epithelium serine protease (ESP) ของยุง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีน action ภายในเซลล์ต่อมน้ำลายจน sporozoite สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ต่อมน้ำลายได้ (Rodrigues et al., 2012) อย่างไรก็ตาม sporozoite ใน oocyst และต่อมน้ำลายยุงมีการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกัน พบว่า sporozoite ที่อยู่ภายใน oocyst และต่อมน้ำลายยุงมีโปรตีนจำนวน 1,430 และ 2,037 ตามลำดับ (Lindner et al., 2019) เมื่อยุงที่มีเชื้อระยะ sporozoite ปล่อน้ำลายออกขณะหาเลือดฝอยของมนุษย์ เชื้อมาลาเรียจะออกไปพร้อมกับน้ำลายและบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อของมนุษย์



วัคซีนต้านมาลาเรียเป็นวัคซีนสำหรับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่อเชื้อมาลาเรีย เมื่อติดเชื้อมาลาเรียจะทำให้ผู้ป่วยมีความรุนแรงจากโรคลดลงและสามารถลดจำนวนของผู้เสียชีวิตได้ เนื่องจาก เชื้อมาลาเรียมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่าง ๆ ส่งผลให้โปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกัน จึงแบ่งวัคซีนต้านมาลาเรียตามเป้าหมายการยับยั้งเชื้อ 3 ชนิด คือ

1. transmission-blocking vaccine (TBV) เป็นวัคซีนป้องกันการกระจายของเชื้อแอนติเจนได้จากโปรตีนที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ sexual blood stage ไปจนถึง oocyst ในยุง แอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจะยังยั้งไม่ให้เชื้อมีการเจริญและพัฒนาต่อในยุง ดังนั้น TBV จึงไม่ได้ลดความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยโดยตรง แต่ส่งผลให้การแพร่เชื้อมาลาเรียในประชากรลดลง แบ่งแอนติเจนของ TBV ได้ 2 ชนิด คือ

1.1 pre-fertilization antigen พบในเชื้อมาลาเรียก่อนเกิดการปฏิสนธิ เช่น 6-cysteine protein P230 (Pfs230), 6-cysteine protein (Pfs48/45) และ Pfs47 เป็นต้น

1.2 post-fertilization antigen พบในเชื้อมาลาเรียหลังเกิดการปฏิสนธิ เช่น ookinete surface protein P25 (Pfs25)

2. pre-erythrocytic stage vaccine เป็นวัคซีนยับยั้งการบุกรุกของเชื้อในตับ ส่งผลให้ไม่เกิดโรคในผู้มีภูมิคุ้มกันหรือจำนวนเชื้อมาลาเรียระยะ asexual blood stage ลดลง แอนติเจนของ pre-erythrocytic stage vaccine ได้จากโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ sporozoite เช่น CSP และ TRAP

3. asexual blood-stage vaccine เป็นวัคซีนยับยั้งการเจริญของเชื้อในเม็ดเลือดแดงหรือยับยั้งการบุกรุกของ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดง แอนติเจนของ asexual blood-stage vaccine ได้จากโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ merozoite เช่น glutamate-rich protein (GLURP), MSP-1 และ AMA-1 เป็นต้น

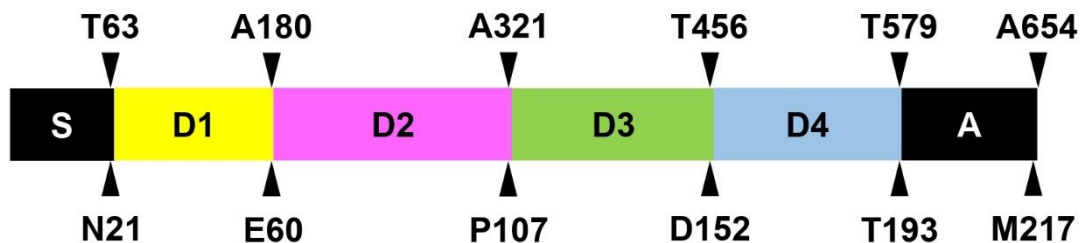
2.3 ยีนและหน้าที่ของแอนติเจน Pfs25 ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

Pfs25 หรือ 25 kDa ookinete surface antigen (P25) เป็นโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่มีมวลโมเลกุล 25,000 ดาลตัน แสดงออกบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรียในระยะ sexual stage ยีน *Pfs25* มีความยาวทั้งหมด 654 คู่เบส ไม่ปรากฏ exon อยู่ภายใน ยีนอยู่ ณ ตำแหน่งที่ 1253417 ถึง 1254070 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 ของจีโนมนิวเคลียสจากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ในระดับของโปรตีน Pfs25 เกิดจากการเรียงต่อกันของกรดอะมิโนจำนวน 217 เรซิดิว ลำดับการจัดเรียงของกรดอะมิโนคล้ายกับลำดับการจัดเรียงของ epidermal growth factor (EGF) ในมนุษย์ หนู และ *Caenorhabditis elegans* แบ่งออกเป็น 4 โดเมน ตามตำแหน่งที่ซ้ำกันของ cysteine (Kaslow et al., 1988) (ภาพที่ 7) การจัดเรียงตัวกันในสามมิติจะเกิดพันธะ disulfide จำนวน 11 พันธะ (Lee et al., 2018) ส่งผลให้ Pfs25 มีโครงสร้างเป็นแผ่นแบนบนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทางด้าน C-terminal เชื่อมต่อกับ phosphatidyl-inositol บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย

Pfs25 สามารถพบได้บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรียในระยะ sexual stage อย่างไรก็ตามก็ตีพบใน macrogametocyte เท่านั้น โดยมีการแสดงออกของโปรตีนตั้งแต่ระยะ macrogametocyte และมีการแสดงออกของโปรตีนมากขึ้นในระยะ macrogamete, zygote และ ookinete (Vermeulen et al., 1985) (ภาพที่ 8) นอกจากนี้ Pfs25 ของ *P. falciparum* เป็นโปรตีนที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกับ P25 ของเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น เช่น *P. berghei*, *P. gallinaceum*, *P. vivax* และเป็นโปรตีนที่ conserved (อนุรักษ์) ในแฟมิลี (Kaslow et al., 1989b; Tsuboi et al., 1997) (ตารางที่ S8) หน้าที่และการทำงานของ Pfs25 ยังไม่พบรายงานการศึกษา อย่างไรก็ตามก็พบการศึกษาในเชื้อมาลาเรีย *P. berghei* และพบว่า P25 มีหน้าที่และการทำงาน (Tomas et al., 2001) คือ

1. ป้องกัน ookinete จากสภาพแวดล้อมภายในท่อทางเดินอาหารของยุง ด้วยการทำให้ ookinete สามารถเกาะกันและส่งผลให้ ookinete สามารถทนต่อ trypsin ของยุงได้
2. ส่งเสริมให้ ookinete สามารถเจริญต่อระยะ oocyst ได้ เนื่องจากหากเชื้อมาลาเรียขาด P25 จำนวนของ oocyst จะลดลง

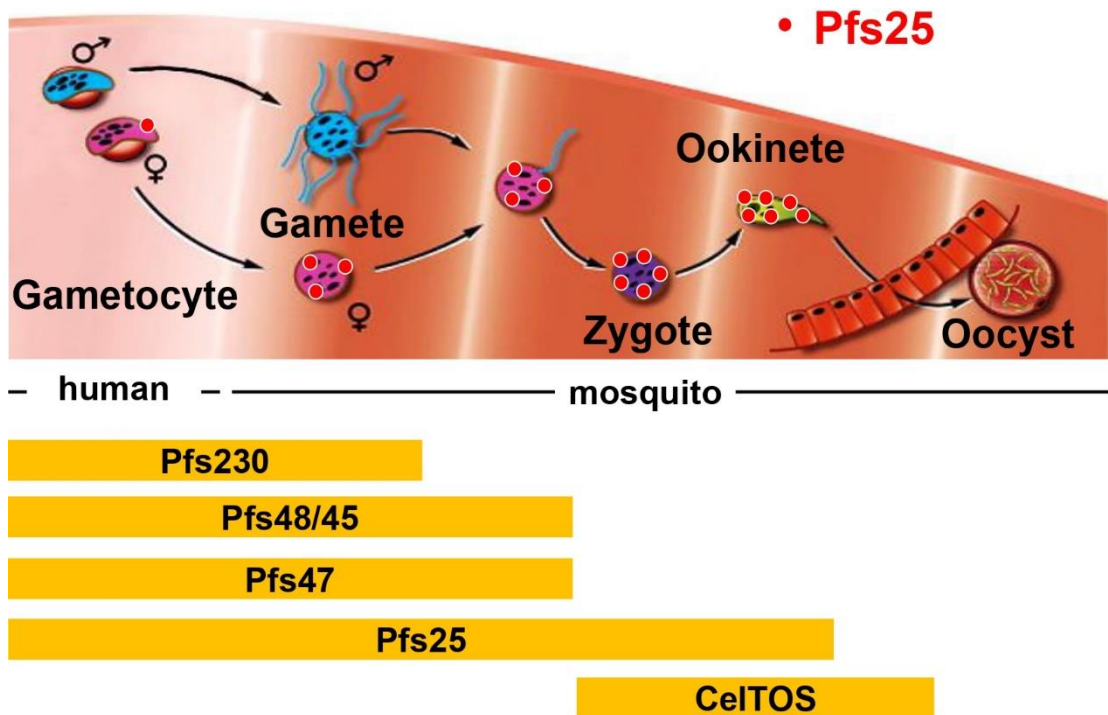
nucleotide position



amino acid position

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* และลำดับกรดอะมิโนของ *Pfs25*

ลำดับกรดอะมิโนของ *Pfs25* แบ่งออกเป็น 4 โดเมน รวมทั้ง signal sequence และ anchor sequence ตัวอักษรและตัวเลขด้านบนแสดงชนิดและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ ตัวอักษรและตัวเลขด้านล่างแสดงชนิดและตำแหน่งของกรดอะมิโน S แทน signal sequence, D1 แทนโดเมนที่ 1, D2 แทนโดเมนที่ 2, D3 แทนโดเมนที่ 3, D4 แทนโดเมนที่ 4, A แทน anchor sequence, A และ T ด้านบน คือ เบสอะดีนีน และเบสไทมีน ตามลำดับ N, E, P, D, T และ M ด้านล่าง คือ กรดอะมิโน แอสพาราจिन กรดกลูตามิก โพรลีน กรดแอสปาร์ติก ทรีโอนีน และเมไทโอนีน ตามลำดับ



ภาพที่ 8 เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระยะ sexual stage ในยุง และแอนติเจนที่แสดงออก ookinete surface protein P25 (Pfs25) แสดงออกบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ระยะ macrogametocyte, macrogamete, zygote และ ookinete การแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้นตามลำดับ จุดสีแดงแทนการแสดงออกของ Pfs25 จำนวนจุดสีแดงแทนปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ แอนติเจนอื่น ๆ ที่พบได้บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เช่น 6-cysteine protein P230 (Pfs230), 6-cysteine protein (Pfs48/45), 6-cysteine protein P47 (Pfs47) และ cell traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) ความยาวของแถบแทนช่วงการแสดงออกของแอนติเจน ดัดแปลงจาก Kooij and Matuschewski (2007)

Pfs25 สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในยุงได้ พบการศึกษาเกี่ยวกับแอนติเจน Pfs25 ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1985 โดย Pfs25 ถูกนำไปฉีดให้กับหนูทดลอง เพื่อให้หนูสร้างแอนติบอดี ต่อมาการทดสอบแอนติบอดีกับเชื้อมาลาเรียในยุง พบว่า จำนวน oocyst ลดลงจนแทบไม่ปรากฏ (Vermeulen et al., 1985) Pfs25 จึงได้รับการพัฒนาเพื่อสร้างเป็น TBV มาโดยตลอด มีการพัฒนาทั้งระบบสิ่งมีชีวิตใช้เพื่อแสดงออกโปรตีนและสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีน (adjuvant) และวัคซีน Pfs25 ได้รับการทดสอบทางคลินิกในระยะที่ 1 (phase 1 clinical trial) แล้ว **ดังตารางที่ 1** การทดสอบทางคลินิกครั้งแรก วัคซีน Pfs25 สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้ แต่พบอาการข้างเคียงจากการรับวัคซีน คือ การอักเสบบริเวณที่ฉีดวัคซีน (Wu et al., 2008) ขณะที่ การทดสอบทางคลินิกในอีก 3 การศึกษาถัดมา พบว่า วัคซีนกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้ อาการข้างเคียงไม่รุนแรง และวัคซีนสามารถยับยั้งการติดต่อของโรคได้ (Chichester et al., 2018; Graaf et al., 2021; Talaat et al., 2016)



ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ของ <i>P. falciparum</i>	สิ่งมีชีวิตใช้แสดงออกโปรตีน (host cell)	ตำแหน่งการดะมิโน	สารเสริมฤทธิ์ (adjuvant)	ผู้แต่ง
3D7	เซลล์แมลง	23-195	-	(Mlambo et al., 2010)
ไม่รายงาน	<i>Nicotiana benthamiana</i>	23-193	Alhydrogel	(Farrance et al., 2011)
3D7	หนูทดลอง	22-193	-	(Goodman et al., 2011)
VN	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	22-193	Freund's adjuvant	(Gregory et al., 2013)
PF3-3/YN	<i>Nicotiana benthamiana</i>	22-193	Alhydrogel	(Jones et al., 2013)
3D7	<i>Escherichia coli</i>	22-193	Freund's adjuvant, Montanide ISA51	(Kumar et al., 2014)
FCC1/HN	<i>Nicotiana benthamiana</i>	23-193	-	(Jones et al., 2015)
3D7	<i>Pichia pastoris</i>	22-193	IMX313	(Li et al., 2016)
3D7*	<i>Pichia pastoris</i>	22-193	Alhydrogel	(Talaat et al., 2016)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ของ <i>P. falciparum</i>	สิ่งมีชีวิตใช้แสดงออกโปรตีน (host cell)	ตำแหน่งการดะมิโน	สารเสริมฤทธิ์ (adjuvant)	ผู้แต่ง
PFD-3/MN*	<i>Nicotiana benthamiana</i>	22-193	Alhydrogel	(Chichester et al., 2018)
3D7*	<i>Pichia pastoris</i>	22-193	IMX313	(Graaf et al., 2021)

แอนติเจน Pfs25 ที่ใช้พัฒนาวัคซีนได้มาจาก *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 เกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยมาลาเรียสามารถติดเชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ได้ (Snounou et al., 1999) และแอนติบอดีมีการทำงานอย่างจำเพาะกับแอนติเจนบางสายพันธุ์ (Genton et al., 2002) ส่งผลให้การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของแอนติเจนมีความสำคัญกับการพัฒนาวัคซีน

จากการสืบค้นข้อมูลความหลากหลายของ Pfs25 ในฐานข้อมูล Public/Publisher Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (PubMed) พบว่า มีข้อมูลเกี่ยวกับยีน *Pfs25* ค่อนข้างจำกัด โดยพบว่า มีการรายงาน full-length sequence ของยีน *Pfs25* รวม 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เชื้อมาลาเรียที่มีการนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (laboratory strain) จำนวน 10 ตัวอย่าง (Kaslow et al., 1989a) และเชื้อมาลาเรียจากประเทศไทยจำนวน 5 ตัวอย่าง (Da et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบ ข้อมูล partial sequence ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียในประเทศอินเดียอีก 238 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างจากประเทศอินเดียจำนวน 202 ตัวอย่าง (Kaur et al., 2017; Patel et al., 2017) และอีก 36 ตัวอย่างจากประเทศบูร์กินาฟาโซ (Da et al., 2013) (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่า การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Pfs25* และจำนวนตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่นำมาศึกษามีจำนวนน้อย อีกทั้งแหล่งที่มาของเชื้อยังไม่ครอบคลุมพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่พบในธรรมชาติและมีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล PubMed

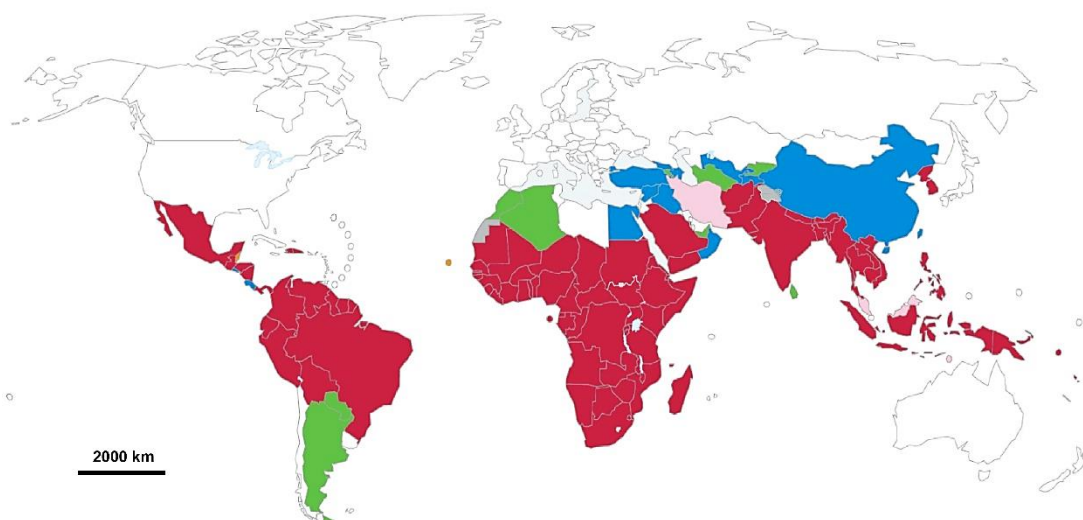
สืบค้นจากฐานข้อมูล PubMed วันที่ 28 มีนาคม ค.ศ. 2020

แหล่งที่มา	จำนวน	ชนิดของข้อมูล	จำนวน haplotype	ผู้แต่ง
ไทย	5	complete sequence	2	(Da et al., 2013)
บรูรินาฟาโซ	36	partial sequence	1	
อินเดีย	155		2	(Patel et al., 2017)
	47		2	(Kaur et al., 2017)
รวม	243			



2.4 ระบาดวิทยาของโรคมาลาเรียและผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคม

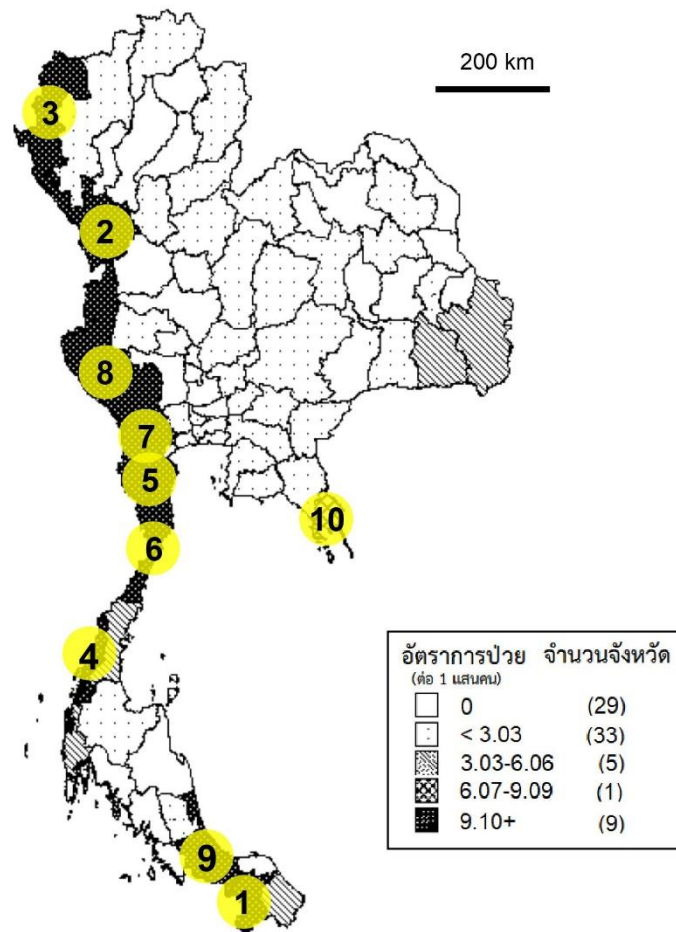
ปัจจุบัน การระบาดของโรคมาลาเรียสามารถพบได้ในหลายทวีปและภูมิภาคทั่วโลก เช่น ทวีปอเมริกากลาง ทวีปอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชีย ได้แก่ ภูมิภาคอาหรับ เอเชียกลาง เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากรายงานผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลก พบว่าในปี ค.ศ. 2019 พบผู้ติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 229 ล้านราย และเสียชีวิตจากเชื้อมาลาเรียจำนวน 409,000 ราย โดยพบผู้ป่วยและเสียชีวิตจากทวีปแอฟริกามากที่สุด (ภาพที่ 9) คิดเป็นร้อยละ 94 และ 51 ตามลำดับ ผู้ป่วยจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีจำนวนรองลงมา คิดเป็นร้อยละ 3 และพบผู้เสียชีวิตจำนวน 9,000 ราย ทั้งนี้ อัตราการติดเชื้อและการตายจากมาลาเรียมีแนวโน้มลดลง พบว่า ผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกในปี ค.ศ. 2000, 2015 และ 2019 มีจำนวน 80, 58 และ 57 รายต่อประชากรหนึ่งพันรายที่จัดเป็นกลุ่มเสี่ยงตามลำดับ และอัตราการตายจากโรคมาลาเรียในปี ค.ศ. 2000, 2015 และ 2019 มีจำนวน 25, 12 และ 10 รายต่อประชากรหนึ่งแสนรายที่จัดเป็นกลุ่มเสี่ยง ตามลำดับ จะเห็นว่า ในช่วงปี ค.ศ. 2000 ถึง 2015 อัตราการติดเชื้อและการตายจากมาลาเรียลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ระหว่างปี ค.ศ. 2015 ถึง 2019 อัตราการติดเชื้อและการตายลดลงอย่างไม่มากนัก (World Health Organization, 2020)



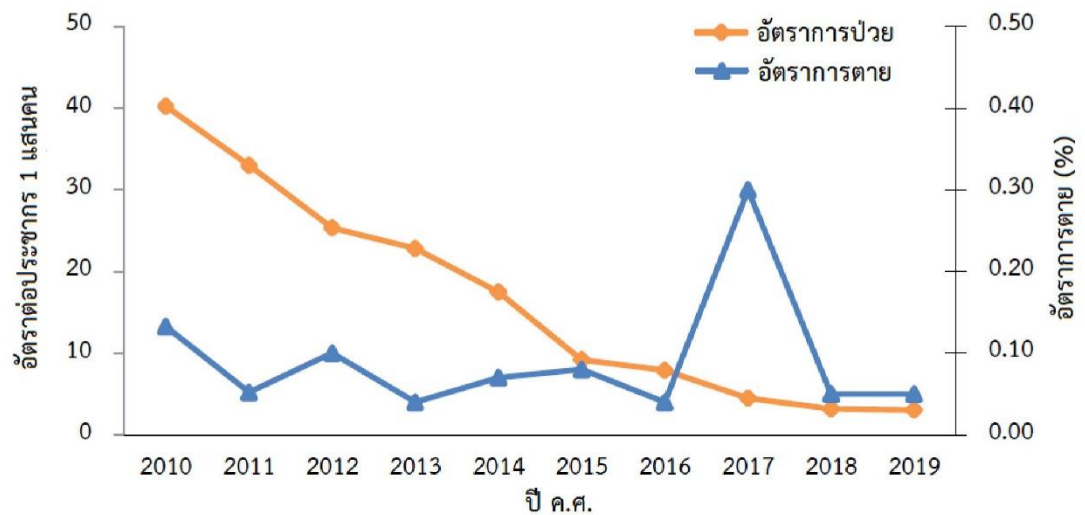
ภาพที่ 9 แผนที่พื้นที่การระบาดของโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทั่วโลกในปี ค.ศ. 2019 พื้นที่สีแดง คือ บริเวณที่พบผู้ป่วยโรคมาลาเรียมากกว่า 1 ราย จะเห็นว่า กระจายอยู่ทั้งทวีปอเมริกากลาง อเมริกาใต้ แอฟริกา เอเชียกลาง เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพื้นที่หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก พื้นที่สีชมพู คือ บริเวณที่ไม่พบโรคมาลาเรียระหว่างปี ค.ศ. 2018 ถึง 2019 พื้นที่สีส้ม คือ บริเวณที่ไม่พบโรคมาลาเรียในปี ค.ศ. 2019 พื้นที่สีฟ้า คือ บริเวณที่ไม่พบโรคมาลาเรียมากกว่า 3 ปี พื้นที่สีเขียว คือ บริเวณที่ไม่พบการเกิดโรคตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 พื้นที่สีขาว คือ บริเวณที่ไม่พบโรคมาลาเรีย และพื้นที่สีเทา คือ บริเวณที่ไม่ได้ทำการศึกษา ดัดแปลงจาก World Health Organization (2020)

โรคมาลาเรียยังคงมีการระบาดและพบผู้ติดเชื้อในประเทศไทย จากรายงานการระบาดของโรคในปี ค.ศ. 2019 พบผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 5,435 ราย อัตราการติดเชื้อคิดเป็น 0.08 รายต่อประชากรหนึ่งพันคน ประกอบด้วยคนไทยและต่างชาติ คิดเป็นร้อยละ 68.64 และ 31.36 ตามลำดับ ผู้เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียจำนวน 5 ราย เป็นชาวต่างชาติ 1 ราย จำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรียลดลงตามลำดับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึง 2019 (ภาพที่ 10B) ที่มีจำนวน 159,120 ราย อย่างไรก็ตาม อัตราการเสียชีวิตกลับมีแนวโน้มที่ไม่แน่นอน ผู้ป่วยส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในพื้นที่ชายแดนไทย-พม่า ไทย-กัมพูชา และไทย-มาเลเซีย โดยพื้นที่ 10 จังหวัด ที่มีการระบาดมากที่สุดเรียงตามลำดับ (ภาพที่ 10A) ได้แก่ จังหวัดยะลา ตาก แม่ฮ่องสอน ระนอง เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี กาญจนบุรี สงขลา และตรัง นอกจากนี้ ปัญหาสำคัญของการควบคุมเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย คือ เชื้อมาลาเรียเริ่มดื้อยา จากรายงานในปี ค.ศ. 2018 พบผู้ป่วยมาลาเรียติดเชื้อ *P. falciparum* ที่จังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานีแสดงอาการดื้อต่อยา Dihydroartemisinin-Piperaquine (DHA-PIP) ซึ่งเป็นยาขนานแรกที่ใช้กับผู้ป่วยในประเทศไทย (กองโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค, 2021) ซึ่งการดื้อยานี้อาจส่งผลกระทบต่อวิธีการรักษาและควบคุมโรคมาลาเรียในอนาคต

A



B



ภาพที่ 10 แผนที่พื้นที่ที่ระบาดของโรคมลาเรียในประเทศไทย ปี ค.ศ. 2019 (ภาพย่อย A), กราฟอัตราการป่วยและอัตราการตายด้วยโรคมลาเรียของประชากรในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010 ถึงปี ค.ศ. 2019 (ภาพย่อย B)

(ภาพย่อ A) แผนที่พื้นที่การระบาดของโรคมาลาเรียซึ่งกระจายอยู่ทั่วประเทศ 48 จังหวัดของประเทศไทยยังคงพบการเกิดโรคมาลาเรียได้ตั้งแต่ 3.03 ถึงมากกว่า 9.10 รายต่อประชากร 1 แสนคน จังหวัดที่พบการเกิดโรคมามากที่สุดอยู่บริเวณชายแดนติดกับประเทศเพื่อนบ้าน และจังหวัดที่พบโรคมาลาเรียมากที่สุด 10 ลำดับแรก ได้แก่ (1) จังหวัดยะลา (2) ตาก (3) แม่ฮ่องสอน (4) ระนอง (5) เพชรบุรี (6) ประจวบคีรีขันธ์ (7) ราชบุรี (8) กาญจนบุรี (9) สงขลา และ (10) ตราด ตัวเลขในวงกลมสีเหลืองแทนลำดับจังหวัดที่พบโรคมาลาเรีย (ภาพย่อ B) กราฟอัตราการป่วยและตายด้วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010 ถึง 2019 กราฟสีส้มแทนอัตราการป่วยด้วยโรคมาลาเรียต่อประชากร 1 แสนคน และกราฟสีฟ้าแทนร้อยละของอัตราการตายด้วยโรคมาลาเรีย คัดแปลงจาก พัชรिता หงษ์จันทร์ (2020)



โรคมมาลาเรียส่งผลกระทบต่อร่างกายของผู้ติดเชื้อโดยตรง แต่หลังหายจากโรคยังคงพบผลกระทบที่ตามมาทั้งทางร่างกายและทางเศรษฐกิจ พบว่า เด็กประมาณร้อยละ 10.4 หลังหายจากอาการมาลาเรียขึ้นสมองมีพฤติกรรมผิดปกติตามมา เช่น เด็กเป็นโรคต่อต้าน โรคสมาธิสั้น เนื่องจากเซลล์ประสาทขาดเลือดขณะเป็นโรค (Idro et al., 2016) ขณะเดียวกัน โรคมมาลาเรียส่งผลกระทบต่อตัวผู้ป่วยเองเมื่อต้องเสียเงินรักษาโรค พบรายงานที่ ผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศเคนยา คองโก และจีน เสียค่ารักษาต่อคนจำนวน 42, 36.3 และมากกว่า 424 ดอลลาร์สหรัฐตามลำดับ (Kayiba et al., 2021; Tang et al., 2017; Watts et al., 2021) ทั้งยังพบค่าใช้จ่ายอื่น เช่น ค่าเดินทาง ซึ่งค่าใช้จ่ายคิดเป็น 16.4 ดอลลาร์สหรัฐอเมริกา จากผู้ป่วยประเทศเคนยา นอกจากนี้ การลาหยุดของผู้ป่วยส่งผลกระทบต่อการทำงานของธุรกิจ พบว่า ธุรกิจกว่า 62 แห่งในประเทศกานาต้องสูญเสียเงินรวมจำนวน 6.58 ล้านดอลลาร์สหรัฐในปี ค.ศ. 2014 เนื่องจากพนักงานลาหยุดเพราะป่วยเป็นโรคมมาลาเรีย (Nonvignon et al., 2016) และยังพบว่าโรคมมาลาเรียมีความสัมพันธ์ทางลบกับรายได้เฉลี่ยต่อหัวของประชาชนใน 180 ประเทศ จาก 3 ทวีป ได้แก่ ทวีปเอเชีย แอฟริกา อเมริกากลางและอเมริกาใต้ และชาวหมู่เกาะทางตอนใต้ของทวีปแปซิฟิก เมื่อการเกิดโรคมมาลาเรียลดลงร้อยละ 10 ส่งผลให้รายได้เฉลี่ยต่อหัวเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 0.3 (Sarma et al., 2019) จะเห็นว่า โรคมมาลาเรียมีผลกระทบทั้งระดับตัวผู้ป่วยเอง ระดับประเทศ และระดับโลก

2.5 การศึกษาความหลากหลายของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย

เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทยถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง ดังตารางที่ 3 ได้แก่ การศึกษาความหลากหลายของยีนที่เป็นเครื่องหมายการดื้อยามาลาเรีย เช่น ยีน chloroquine resistant transporter (*crt*), ยีน multidrug resistance-1 (*mdr-1*) การศึกษาความหลากหลายของยีนที่สร้างแอนติเจน เช่น ยีน circumsporozoite protein (*csp*), ยีน surface-associated interspersed protein 4.2 (*surf_{4.2}*), ยีน surface-associated interspersed protein 1.1 (*surf_{1.1}*), ยีน merozoite surface protein 1 (*msp-1*), ยีน merozoite surface protein 2 (*msp-2*), ยีน merozoite surface protein 3 (*msp-3*), ยีน glutamate-rich protein (*glurp*), *var* gene และ ยีน apical membrane antigen 1 (*ama-1*) การศึกษาความหลากหลายของ housekeeping gene คือ ยีน L-lactate dehydrogenase (*ldh*) สำหรับพัฒนา Rapid Diagnostic Test (RDT) และการศึกษาสำหรับวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรีย เช่น microsatellite จำนวน 12 ตำแหน่ง (Pumpaibool et al., 2009) การศึกษาส่วนมากทำในยีนที่แสดงออกในระยะ erythrocytic stage ซึ่งพบว่า มีความหลากหลายสูง อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของยีนระยะ sexual stage จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทยยังไม่พบการรายงาน

ตารางที่ 3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย

จากยีน 12 ตำแหน่ง ประกอบด้วย *csp*, circumsporozoite protein; *ama-1*, apical membrane antigen 1; *crt*, chloroquine resistance transporter; *glurp*, glutamate-rich protein; *mdr1*, multidrug resistance protein 1; *msp-1*, merozoite surface protein 1; *msp-2*, merozoite surface protein 2; *msp-3*, merozoite surface protein 3; *surf_{1.1}*, surface-associated interspersed protein 1.1; *surf_{4.2}*, surface-associated interspersed protein 4.2; *ldh*, L-lactate dehydrogenase N แทนจำนวนตัวอย่าง π แทนค่า nucleotide diversity NA แทนข้อมูลไม่ปรากฏ (data NOT AVAILABLE)

ระยะ	ยีน	N	π	จังหวัด	ผู้แต่ง
pre-erythrocytic stage	<i>csp</i>	30	0.00231	กาญจนบุรี	(Tanabe et al., 2015)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ระยะ	ยีน	N	π	จังหวัด	ผู้แต่ง
erythrocytic stage	<i>ama-1</i>	65	0.0114	กาญจนบุรี ตราด แม่ฮ่องสอน ระนอง อุบลราชธานี	(Lumkul et al., 2018)
		32	0.0107	กาญจนบุรี	(Tanabe et al., 2015)
	<i>crt</i>	110	NA	NA	(Rungsihirunrat et al., 2009)
	<i>glurp</i>	65	0.0061	กาญจนบุรี ตราด แม่ฮ่องสอน ระนอง อุบลราชธานี	(Pattaradilokrat et al., 2018)
		156	NA	NA	(Congpuong et al., 2014)
	<i>mdr1</i>	110	NA	NA	(Rungsihirunrat et al., 2009)
	<i>msh-1</i>	26	0.0029	กาญจนบุรี	(Tanabe et al., 2015)
		156	NA	NA	(Congpuong et al., 2014)
		145	NA	ตาก	(Kuesap et al., 2014)
		61	NA	กาญจนบุรี ตราด แม่ฮ่องสอน	(Simpalipan et al., 2014)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ระยะ	ยีน	N	π	จังหวัด	ผู้แต่ง
erythrocytic stage				ระนอง อุบลราชธานี	
	<i>msp-2</i>	156	NA	NA	(Congpuong et al., 2014)
		145	NA	ตาก	(Kuesap et al., 2014)
	<i>msp-3</i>	59	0.0490	กาญจนบุรี ตราด แม่ฮ่องสอน ระนอง อุบลราชธานี	(Pattaradilokrat et al., 2016)
	<i>surf_{1.1}</i>	31	0.0038	ศรีสะเกษ	(Chaianantakul et al., 2021)
	<i>surf_{4.2}</i>	74	0.0430	ตาก	(Kaewthamasorn et al., 2012)
	<i>var gene</i>	213	NA	กาญจนบุรี ตาก ระนอง	(Sirisabhabhorn et al., 2021)
all stage	<i>ldh</i>	53	<0.0001	กาญจนบุรี ตาก แม่ฮ่องสอน ระนอง ตราด อุบลราชธานี	(Simpalipan et al., 2018)
sexual stage	<i>Pfs25</i>	5	NA	ตาก	(Da et al., 2013)

เนื่องจาก ข้อมูลของความหลากหลายของยีน *Pfs25* มีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะข้อมูลจาก เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่พบในธรรมชาติจากประเทศไทย พบข้อมูลจากการศึกษาของ Da และคณะ (2013) ที่ได้รายงาน full-length sequence จากเชื้อมาลาเรียจำนวน 5 ตัวอย่าง เท่านั้น ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาความหลากหลายของยีน *Pfs25* โดยเฉพาะตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจาก ประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาและการทำงานของวัคซีน *Pfs25*



2.6 สถิติและการทดสอบที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของยีน

haplotype คือ ชุดหรือกลุ่มของนิวคลีโอไทด์บริเวณโครโมโซมใดๆ ที่สนใจซึ่งจะส่งต่อให้สิ่งมีชีวิตรุ่นถัดไปทั้งชุด (Beebe and Rowe, 2008; Bromham, 2016)

haplotype diversity เป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์ความหลากหลายของ haplotype หรือความน่าจะเป็นที่การสุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ตัวอย่าง ได้ haplotype ที่แตกต่างกัน คำนวณได้จากความถี่ของ haplotype และจำนวนตัวอย่างทั้งหมด สามารถใช้วิเคราะห์ความหลากหลายของ haplotype ในประชากร หรือเปรียบเทียบระหว่างประชากร (Nei, 1978)
คำนวณได้จากสมการ

$$h = \frac{2n}{2n-1} \left(1 - \sum x_i^2\right)$$

n แทนจำนวนประชากร

x_i ความถี่ของ haplotype i ในประชากร

ค่า haplotype diversity ที่มีค่ามากแสดงว่า ประชากรมี haplotype ต่างชนิดกันจำนวนมาก ขณะที่ haplotype diversity มีค่าน้อยแสดงว่า ประชากรมี haplotype ต่างชนิดกันจำนวนน้อย หรือเกือบทั้งหมดเป็นชนิดเดียวกัน

Wright's F_{st} statistic เป็นสถิติที่ใช้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรสำหรับคาดคะเนว่าความหลากหลายจะส่งผลให้เกิดการแยกกันของประชากรหรือไม่ ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ประชากรเปรียบเทียบกันทีละคู่ (Wright, 1951)

คำนวณได้จากสมการ

$$F_{st} = \frac{(H_t - H_s)}{H_t}$$

H_t แทนค่าเฉลี่ยของ expected heterozygosity ระหว่าง 2 ประชากรที่ต้องการเปรียบเทียบ

H_s แทนค่า expected heterozygosity รวมของประชากร

ค่า F_{st} ที่ได้มีค่าระหว่าง 0 ถึง 1 ค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่าความหลากหลายของ 2 ประชากรส่งผลให้ประชากรสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่า

ความหลากหลายของประชากรทั้ง 2 มีลักษณะเดียวกัน นอกจากนี้ เมื่อค่า $F_{st} > 0.2$ แสดงว่าประชากรทั้งสองมีการแยกจากกันค่อนข้างมาก (Beebe and Rowe, 2008)

phylogenetic tree คือ แผนภูมิทางวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่คาดว่าเคยเกิดขึ้นในอดีต มีประโยชน์กับการหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตที่พบในปัจจุบัน การแบ่งแยกกลุ่มสิ่งมีชีวิตหรือยีนที่ศึกษา และอธิบายได้ว่า อาจมีเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นระหว่างวิวัฒนาการในอดีต (Bromham, 2016)

การสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining เป็นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการจับคู่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ระหว่างกันน้อยที่สุดไว้เป็นกลุ่มเดียวกันและจับคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จำนวนรองลงมาเป็นกลุ่มต่อกันตามลำดับจนครบทุกตัวอย่าง ความยาวของกิ่ง (branch length) แสดงค่าสัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน ข้อดี คือ สร้างได้อย่างรวดเร็ว ข้อเสีย คือ แผนภาพที่ได้อาจไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นในอดีต เนื่องจาก วิธี Neighbour-Joining ไม่ได้นำอัตราการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมาวิเคราะห์ร่วมด้วย (Saitou and Nei, 1987)

การสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood เป็นวิธีการค้นหา phylogenetic tree ที่มีความน่าจะเป็นหรือค่า likelihood สูงที่สุด ค่า likelihood เป็นการคำนวณความน่าจะเป็นของลำดับการแยกสายวิวัฒนาการร่วมกับ branch length หรือจำนวนการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสต่อตำแหน่งตามโมเดลของวิวัฒนาการที่กำหนดไว้ (Dhar and Minin, 2016) ข้อดีของการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood คือ เป็นการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ เพราะสามารถแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่อยู่ในข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทั้งหมด ข้อเสีย คือ อาจเกิดความผิดพลาดกับข้อมูลที่มีจำนวนน้อย หรือเสียเวลานานในการวิเคราะห์หา phylogenetic tree สำหรับข้อมูลขนาดใหญ่

การสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธีของ Bayesian interference เป็นการนำทฤษฎีของเบย์ (Bayes' theorem) มาช่วยวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่มีความน่าจะเป็นว่าจะอธิบายวิวัฒนาการในอดีตของสิ่งมีชีวิตที่สนใจได้มากที่สุด (Huelsenbeck et al., 2001)

ทฤษฎีของเบย์ (Bayes' theorem) แสดงดังสมการ

$$\Pr[\text{Tree} | \text{Data}] = \frac{\Pr[\text{Data} | \text{Tree}] \times \Pr[\text{Tree}]}{\Pr[\text{Data}]}$$

$Pr[\text{Tree} | \text{Data}]$ คือ posterior probability หรือความน่าจะเป็นของ phylogenetic tree ที่คาดว่าอธิบายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่สนใจได้ถูกต้องที่สุด

$Pr[\text{Data} | \text{Tree}]$ คือ ค่า likelihood หรือค่าความน่าจะเป็นที่จะพบ phylogenetic tree นั้น

$Pr[\text{Tree}]$ คือ prior probability หรือจำนวนของ phylogenetic tree ที่อาจเกิดขึ้นทั้งหมด

$Pr[\text{Data}]$ คือ ความน่าจะเป็นของ phylogenetic tree ทั้งหมดที่เป็นไปได้

การวิเคราะห์ทำได้โดยกำหนดค่าโมเดลทางวิวัฒนาการและค่า prior probability ของ phylogenetic tree ที่เป็นไปได้ทั้งหมด จากนั้นหาสัดส่วนของแต่ละ phylogenetic tree ที่เป็นไปได้ และคำนวณหาค่า posterior probability จากสมการทฤษฎีของเบย์ ผลของ phylogenetic tree ที่ได้มีการแสดงค่า posterior probability บนกิ่ง (branch) แสดงถึงความน่าจะเป็นของ clade นั้นบน phylogenetic tree การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีของ Bayesian inference สามารถวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่มีความน่าจะเป็นสูงสุดได้ผลได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม อาจมี phylogenetic tree ที่มีค่า posterior probability มากกว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ หากใช้เวลาวิเคราะห์นานขึ้น (Holder and Lewis, 2003)

haplotype network เป็นการวิเคราะห์ข้อมูล haplotype ในประชากรเพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง haplotype ของประชากรสิ่งมีชีวิตที่สนใจ (Leigh and Bryant, 2015) สามารถวิเคราะห์วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่แยกจากกันมากกว่า 2 สาย หรือความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันมาก รวมทั้งแสดงจำนวนของนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันระหว่าง haplotype และสัดส่วนประชากรแต่ละ haplotype อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ haplotype network จะไม่แสดงลำดับการแยกสายของวิวัฒนาการ (Huson and Bryant, 2006; Mardulyn, 2012)

การวิเคราะห์ haplotype network ด้วยวิธี median-joining network เป็นวิธีที่มีการสร้าง median vector หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นไปได้ระหว่าง haplotype เพื่อนำมาร่วมวิเคราะห์ เริ่มจากการสร้าง network ระหว่าง haplotype ที่มีความสัมพันธ์อย่างง่ายที่สุดขึ้นก่อน จากนั้นสร้าง median vector ขึ้นและวิเคราะห์การสร้าง network อีกครั้งจนไม่สามารถสร้าง median vector ได้อีก ส่งผลให้การสร้าง haplotype network รวดเร็ว เนื่องจากไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์ network ที่เป็นไปได้ทั้งหมด และน่าเชื่อถือ เพราะมีการวิเคราะห์ซ้ำของข้อมูล (Bandelt et al., 1999; Kong et al., 2016)

nucleotide diversity (π) ค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันต่อตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทีละคู่อย่างสุ่ม สามารถวิเคราะห์ระดับความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจในประชากร หรือเปรียบเทียบความหลากหลายระดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างประชากร (Nei and Li, 1979)

คำนวณได้จากสมการ

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

x_i แทนความถี่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ i ในประชากร

x_j แทนความถี่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ j ในประชากร

π_{ij} แทนจำนวนของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันต่อตำแหน่งระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ i และ j

nucleotide diversity ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่า ประชากรที่สนใจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันมาก ขณะที่ค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่า ประชากรที่สนใจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แตกต่างกัน

การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) เป็นกระบวนการที่ทำให้ลักษณะของสิ่งมีชีวิตในประชากรเปลี่ยนแปลง อธิบายคือ สิ่งมีชีวิตตัวใดที่มีลักษณะที่มีประโยชน์มากกว่าสิ่งมีชีวิตตัวอื่นแม้เพียงเล็กน้อยจะมีโอกาสอยู่รอดและมีลูกหลานมากกว่า ขณะที่ลักษณะใดที่ก่อให้เกิดอันตรายกับสิ่งมีชีวิตแม้เพียงเล็กน้อยจะส่งผลให้สิ่งมีชีวิตและลักษณะนั้นถูกกำจัดออกไปจากประชากร การคงไว้ซึ่งความหลากหลายของลักษณะที่มีประโยชน์และกำจัดลักษณะที่ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในประชากร เรียกว่า natural selection (Darwin, 1872) การคัดเลือกโดยธรรมชาติสามารถแบ่งเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่

1. การคัดเลือกเชิงบวก (positive selection) เมื่อแรงคัดเลือกเชิงบวกกระทำกับสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตเพิ่มขึ้น อาจเป็นได้ทั้งความหลากหลายระดับสิ่งมีชีวิต (individual) หรือระดับพันธุกรรม

2. การคัดเลือกเชิงลบ (negative selection) เมื่อแรงคัดเลือกเชิงลบกระทำกับสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้ลักษณะหรือยีนที่มีประโยชน์กับสิ่งมีชีวิตถูกตรึงไว้ (fixation) เพื่อลดความหลากหลายของลักษณะหรือยีน

3. การคัดเลือกที่อยู่ในสมดุล (neutral selection) ตามทฤษฎีของ neutral theory การเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จะเกิดขึ้นและถูกกำจัดออกไปด้วย genetic drift อย่างสมดุล ซึ่งจะไม่มีการคัดเลือกโดยธรรมชาติมาอิทธิพล

การทดสอบการคัดเลือกโดยธรรมชาติสามารถใช้สำหรับทดสอบ 4 สถิติ ได้แก่ Tajima's D test, Fu and Li's D^* test, Fu and Li's F^* test และ Z-test of selection

Tajima's D test เป็นสถิติที่ใช้ทดสอบว่า นิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันประชากรอยู่ในภาวะสมดุลตามทฤษฎี neutral theory หรือไม่ (Tajima, 1989) เนื่องจาก ชุดของนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในประชากรจะอยู่ในภาวะสมดุลก็ต่อเมื่อการเกิดขึ้นและหายไปของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงนั้นเท่ากัน และการหายไบนั้นไม่ได้เป็นผลมาจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Kimura, 1983)

คำนวณได้จากสมการ

$$D = \frac{\hat{k} - \frac{S}{a_1}}{\sqrt{e_1 S + e_2 S(S-1)}}$$

\hat{k} แทนค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างทั้งหมด

S แทนจำนวนของตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในประชากรทั้งหมด

n แทน effective population size (N_e)

ตัวแปรอื่นในสมการแสดงดังตารางที่ 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ตัวแปรที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า Tajima's D test

ประกอบด้วยตัวแปร $a_1, a_2, b_1, b_2, c_1, c_2, e_1$ และ e_2

ตัวแปรสำหรับวิเคราะห์ค่า e_1	ตัวแปรสำหรับวิเคราะห์ค่า e_2
$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$	$a_2 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i^2}$
$b_1 = \frac{n+1}{3(n-1)}$	$b_2 = \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)}$
$c_1 = b_1 - \frac{1}{a_1}$	$c_2 = b_2 - \frac{n+2}{a_1 n} + \frac{a_2}{a_1^2}$
$e_1 = \frac{c_1}{a_1}$	$e_2 = \frac{c_2}{a_1^2 + a_2}$

ผลการทดสอบ Tajima's D test อาจมีค่าเท่ากับศูนย์ หรือมากกว่าหรือน้อยกว่าศูนย์ เมื่อผลการทดสอบเท่ากับศูนย์แสดงว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจอยู่ในภาวะสมดุลตามทฤษฎี neutral theory ขณะที่ค่าที่มากกว่าศูนย์แสดงว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจถูกคัดเลือกไว้ด้วยการคัดเลือกเชิงบวก (positive selection) และค่าที่น้อยกว่าศูนย์แสดงว่า ถูกคัดเลือกไว้ด้วยการคัดเลือกเชิงลบ (negative selection)

Fu and Li's D^* test และ Fu and Li's F^* test เป็นสถิติที่ใช้ทดสอบว่า mutation ที่พบบนลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ภายใต้ selective neutrality, Fu and Li's D^* test เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างจำนวน singleton กับจำนวน mutation ทั้งหมด และ Fu and Li's F^* test เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างจำนวน singleton กับค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ละคู่อย่างสุ่ม โดย singleton คือ อัลลีลที่แตกต่างกับอัลลีลอื่นและพบเพียง 1 ตัวอย่าง (Fu and Li, 1993)

คำนวณค่า Fu and Li's D^* test ได้ดังสมการ

$$D^* = \frac{\left(\frac{n}{n-1}\right)\eta - a_n\eta_s}{\sqrt{u_{D^*}\eta + v_{D^*}\eta^2}}$$

คำนวณค่า Fu and Li's F^* test ได้ดังสมการ

$$F^* = \frac{\Pi_n - \frac{n-1}{n}\eta_s}{\sqrt{u_{F^*}\eta + v_{F^*}\eta^2}}$$

n แทนจำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์

k แทนจำนวนของตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่พบความหลากหลาย

η แทนจำนวน mutation ที่เกิดขึ้นทั้งหมด

η_s แทนจำนวนของ singleton

Π_n แทนค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ละคู่อย่างสุ่ม

$$\begin{aligned}
 a_n &= \sum_{k=1}^{n-1} \frac{1}{k} \\
 b_n &= \sum_{k=1}^{n-1} \frac{1}{k^2} \\
 c_n &= 2 \frac{na_n - 2(n-1)}{(n-1)(n-2)} \\
 d_n &= c_n + \frac{n-2}{(n-1)^2} + \frac{2}{n-1} \\
 u_{D^*} &= \frac{n}{n-1} \left(a_n - \frac{n}{n-1} \right) - v_{D^*} \\
 v_{D^*} &= \left[\left(\frac{n}{n-1} \right)^2 b_n + a_n^2 d_n - 2 \frac{na_n(a_n+1)}{(n-1)^2} \right] / (a_n^2 + b_n) \\
 u_{F^*} &= \left[\frac{n}{n+1} + \frac{n+1}{3(n-1)} - 2 \frac{2}{n(n-1)} + 2 \frac{n+1}{(n-1)^2} \cdot \left(a_{n+1} - \frac{2n}{n+1} \right) \right] / a_n - v_{F^*} \\
 v_{F^*} &= \left[d_n + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} - 2 \frac{1}{n-1} \left(4b_n - 6 + \frac{8}{n} \right) \right] / a_n^2 + b_n
 \end{aligned}$$

ค่า Fu and Li's D^* และ Fu and Li' F^* มีค่าเท่ากับศูนย์แสดงว่า ความหลากหลายที่พบอยู่ภายใต้ selective neutrality ขณะที่ค่าเป็นบวกแสดงว่า จำนวน singleton น้อยกว่าจำนวน mutation รวมหรือค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ละคู่อย่างสุ่มในประชากร ซึ่งเป็นผลจากการคัดเลือกเชิงบวก และค่าเป็นลบแสดงว่า ประชากรมี singleton อยู่เป็นจำนวนมากและเป็นผลมาจากการคัดเลือกเชิงลบ

Z-test of selection เป็นสถิติที่ใช้ทดสอบ positive selection ของนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจ วิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (nonsynonymous substitution) และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (synonymous substitution) (Kumar et al., 2016; Nei and Kumar, 2000)

คำนวณได้จากสมการ

$$Z = \frac{d_N - d_S}{\sqrt{(\text{Var}(d_S) + \text{Var}(d_N))}}$$

d_N แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการ nonsynonymous substitution ต่อตำแหน่งที่เกิด nonsynonymous substitution

d_S แทนจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการ synonymous substitution ต่อตำแหน่งที่เกิด synonymous substitution

$\text{Var}(d_N)$ และ $\text{Var}(d_S)$ แทนค่าความแปรปรวนของ d_N และ d_S ตามลำดับ

ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ หากมีค่าเท่ากับ 0 หมายถึงลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ภายใต้สมดุล (neutrality) ขณะที่ค่าที่มากกว่า 0 แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจถูกคัดเลือกด้วยการคัดเลือกทางบวก และค่าน้อยกว่า 0 แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจถูกคัดเลือกด้วยการคัดเลือกทางลบ



2.7 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ

โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (protein secondary structure) เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการขดม้วนของสายโพลีเพปไทด์และเกิดพันธะระหว่าง อะตอมของออกซิเจนของหมู่คาร์บอกซิลกับ อะตอมของไนโตรเจนของหมู่เอมีโน ส่งผลให้เกิดเป็นรูปร่าง 3 แบบ (Selzer et al., 2018; Xiong, 2006) ได้แก่

1. alpha-helix เป็นเกลียวคล้ายสปริง 1 รอบของเกลียวประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 3.6 เรซิดิว
2. beta-sheet เป็นแผ่นซ้อนทับกันไปมาที่ประกอบด้วยสายโพลีเพปไทด์มากกว่า 2 สาย
3. coil มีลักษณะเป็นเส้น อาจพบเป็นเส้นที่ขดม้วน

การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ คือ การทำนายโครงสร้างของกรดอะมิโนแต่ละตำแหน่งของสายโพลีเพปไทด์ เนื่องจาก โครงสร้างทุติยภูมิมีรูปแบบการจัดเรียงของลำดับกรดอะมิโนอย่างจำเพาะ จึงมีการนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการทำนายโครงสร้างจากสายโพลีเพปไทด์ (Xiong, 2006)

JPred4 เป็นเว็บเซิร์ฟเวอร์สำหรับนำเข้าข้อมูลลำดับกรดอะมิโน และแสดงผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ การทำนายโครงสร้างของ JPred 4 ใช้วิธีการของ JNet algorithm version 2.0 ในขั้นแรกลำดับกรดอะมิโนจะถูกเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอื่นด้วย PSI-BLAST ในฐานข้อมูลลำดับกรดอะมิโน UniRef90 version 2014_07 เพื่อสร้าง alignment แล้วนำไปหาข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนในฐานข้อมูล SCOPe/ASTRAL version 2.04 และโครงสร้างที่ได้จะถูกวิเคราะห์ซ้ำด้วย HMMer 3 (Drozdetskiy et al., 2015) ผลจากการทำนายแสดงได้ 3 โครงสร้าง ได้แก่ alpha-helix, beta-sheet และ coil การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิสามารถนำไปเป็นข้อมูลออกแบบการเพิ่ม-ลด กรดอะมิโนในโปรตีน และใช้สำหรับบ่งบอกตำแหน่งที่คาดว่าป็น functional domain

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

3.1 ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*

เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่ใช้ในการศึกษาจำนวนทั้งหมด 83 isolate ได้รับมาจาก 2 แหล่ง แบ่งเป็น เชื้อจำนวน 70 isolate ได้รับอนุเคราะห์จาก หน่วยวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เชื้อมาลาเรียเหล่านี้มาจากเลือดของผู้ป่วยโรคมมาลาเรียที่พบใน 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน ระนอง อุบลราชธานี และตราด จังหวัดละ 16, 15, 15, 13 และ 11 ตัวอย่างตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2002 ถึง ค.ศ. 2010 นำเชื้อมาลาเรียมาเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ณ หน่วยวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จนกระทั่งเชื้อมีค่า parasitemia เท่ากับ 5-10% และเก็บรักษาเชื้อไว้ในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ นำเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงตรวจสอบชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์จากแผ่นฟิล์มเลือด และทำการตรวจสอบจีโนมไทป์ของเชื้อมาลาเรียเบื้องต้นโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน merozoite surface protein-3 (Pattaradilokrat et al., 2016), glutamate rich protein (Pattaradilokrat et al., 2018) และ apical membrane antigen 1 (Lumkul et al., 2018) นอกจากนี้ ได้รับตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อมาลาเรีย จำนวน 13 ตัวอย่าง จาก รศ.ดร.ธีรภมร เพ็งสกุล คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งสกัดได้จากเลือดของผู้ป่วยโรคมมาลาเรียที่พบในจังหวัดยะลา ในปี ค.ศ. 2016 และ ค.ศ. 2019 เชื้อเหล่านี้ได้รับการตรวจสอบชนิดโดยกล้องจุลทรรศน์จากแผ่นฟิล์มเลือด

โครงการวิจัยนี้ได้อนุมัติให้ดำเนินการโดยคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ใบอนุญาตเลขที่ SC CU IBC-004/2020 คุณภาพผนวก)

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียด้วยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) เริ่มจากนำเลือดที่มีเชื้อมาลาเรีย 5-10% parasitemia ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) เป็น 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Proteinase K และสารละลายบัฟเฟอร์ B3 ปริมาตร 25 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง เป็นเวลา 10-20 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อครบเวลาเติม absolute ethanol ที่เย็นจัด

ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดในหลอด microcentrifuge ใส่ลงในหลอด NucleoSpin Blood Column ซึ่งสวมอยู่ใน Collection tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้งไป เติมสารละลายบัฟเฟอร์ BW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้งไป เติมสารละลายบัฟเฟอร์ B5 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน Collection tube ทิ้งไป แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที อีกรอบ ย้ายหลอด NucleoSpin Blood Column ที่มีดีเอ็นเออยู่บนฟิลเตอร์ใส่ลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ BE อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพื่อละลายดีเอ็นเอบนฟิลเตอร์ของ Collection tube ให้ลงมาในหลอด microcentrifuge ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที สุดท้ายเก็บสารละลายดีเอ็นเอในหลอด microcentrifuge ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *Pfs25* ต่อไป

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดแล้วด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 2.5-20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) สารละลายไพรเมอร์ forward primer *Pfs25* และ reverse primer *Pfs25* ความเข้มข้นชนิดละ 0.4 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 2 ไมโครลิตร ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 5 โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมที่ 10 ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 (NCBI Reference Sequence: NC_037281.1) ณ ตำแหน่งที่ 1253362-1253388 และ 1254216-1254240 ตามลำดับ ผสมกับสารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (Roche, ประเทศเยอรมัน) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย MgCl₂ ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ (Biotechrabbit, ประเทศเยอรมัน) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร สารละลาย PCR buffer ความเข้มข้น 1X (Biotechrabbit, ประเทศเยอรมัน) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ HotStart Taq DNA polymerase (Biotechrabbit, ประเทศเยอรมัน) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร นำสารผสมข้างต้นทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส (Mullis, 1990) โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Applied Biosystems, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทำปฏิกิริยาขั้น initial activation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยาขั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ปฏิกิริยาขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ปฏิกิริยาขั้น extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาขั้น denaturation annealing และ extension ซ้ำ

จำนวน 40 รอบ และปฏิกิริยาขั้น final extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาให้ตั้งค่าอุณหภูมิของเครื่องไว้ที่ 12 องศาเซลเซียส โดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จะมีขนาด 878 คู่เบส จากนั้นทำปฏิกิริยาจนครบทุกตัวอย่าง และเก็บผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (คู่เบส)	Tm (°C)
Forward	5' TGTTTTAACCTTGATAATTTACCATTT 3'	27	58
Reverse	5' TCTTTGTTTTCTTCAATTTATTCAT 3'	25	56

3.4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) (Lee et al., 2012) เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.2% (w/v) รองจานแข็งตัว วางลงใน electrophoresis chamber เติม 1X TBE buffer pH 8.0 หยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร สำหรับเทียบขนาดของดีเอ็นเอของหลอดผสมผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสปริมาตร 5 ไมโครลิตรกับ 6X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมถัดไปของเจล ทำเช่นนี้กับผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทุกตัวอย่าง แล้วเปิดใช้งานเครื่อง Gel Electrophoresis ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium Bromide ในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นและนำเจลส่องใต้แสง UV และถ่ายรูปเจลเก็บไว้สำหรับบันทึกผล ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แสดงผลแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวจะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอต่อไป

3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25*

เตรียมผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Pfs25* ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing (Sanger et al., 1977) โดยใช้ไพรเมอร์ forward primer *Pfs25* และ reverse primer *Pfs25* (ตารางที่ 6) ด้วยเครื่อง DNA sequencer รุ่น ABI Prism 377 การวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นบริการของบริษัท Bioneer สาธารณรัฐเกาหลี

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (คู่เบส)	Tm (°C)
Forward	5' TGTTTTAACCTTGATAATTTACCATTT 3'	27	58
Reverse	5' TCTTTGTTTTCTTCAATTTATTCAT 3'	25	56
Reverse	5'TTTGTTTCTTTTCCTTTTCATTCA3'	24	58

3.6 การสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลนานาชาติ

จัดเรียง (align) ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* จำนวน 83 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม MEGA7 (Kumar et al., 2016) จากนั้นค้นหาและบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* จากฐานข้อมูล Genbank และ PlasmDB สำหรับฐานข้อมูล Genbank ค้นหาโดยใช้ Nucleotide BLAST (version 2.10.0) โดยอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์จากเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* strain 3D7 (NCBI ID: NC_037281.1) (Gardner et al., 2002) เลือกทั้งฐานข้อมูลชนิด Nucleotide collection (nr/nt) และ Whole-genome shotgun contigs (WGS) ผลของการค้นหาจะเลือกเก็บข้อมูลเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่มีความยาวมากกว่า 654 คู่เบส หรือมีค่า query cover เท่ากับ 100% และค่า E-value ของลำดับนิวคลีโอไทด์มีค่าน้อยกว่า 0.1 นอกจากนี้ ทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมในฐานข้อมูล PubMed และบันทึกข้อมูลนั้นไว้

ฐานข้อมูล PlasmDB (Aurrecochea et al., 2009) ค้นหา *Pfs25* จากนั้นเลือก filter organisms เป็น *P. falciparum* และเลือกยีน PF3D7_1031000 ookinete surface protein P25 ในหัวข้อ Genetic variation บันทึกผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวมากกว่า 654 คู่เบส กรณีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน ทำการตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกตำแหน่งหรือไม่ หากเหมือนกันให้เลือกบันทึกเฉพาะอันใดอันหนึ่งไว้

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแล้วจึงทำการจัดเรียงด้วยโปรแกรม MEGA7 อีกครั้งเพื่อสร้าง alignment ของข้อมูลยีน *Pfs25* จากทั่วโลก จากนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน หากเหมือนกันจะเลือกเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากฐานข้อมูล Genbank เป็นหลัก เพราะมี accession number ที่ชัดเจน และบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .fas

3.7 การวิเคราะห์รูปแบบและความหลากหลายของ haplotype ของยีน *Pfs25*

3.7.1 การวิเคราะห์จำนวน haplotype และการกระจายของ haplotype

กำหนดกลุ่มข้อมูล alignment ของยีน *Pfs25* ด้วยการ define sequence sets และ define domain sets ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตามแต่ละจังหวัดของประเทศไทย แต่ละประเทศ และแต่ละทวีป ในโปรแกรม DnaSP version 6.0 (Rozas et al., 2017) บันทึกเป็นไฟล์ .nex ต่อมาวิเคราะห์จำนวน haplotype ของแต่ละจังหวัดของประเทศไทย แต่ละประเทศ และแต่ละทวีป โดยเลือก generate haplotype data file จากข้อมูล alignment ที่ได้กำหนดกลุ่มไว้แล้ว และบันทึกข้อมูลที่ได้ ถัดมา นำข้อมูล haplotype ที่ได้มาสร้างแผนภาพการกระจายของ haplotype ในประเทศไทยและทั่วโลก

3.7.2 การวิเคราะห์ค่า haplotype diversity (h_d)

วิเคราะห์ค่า h_d จากข้อมูล alignment ที่ได้กำหนดกลุ่มไว้แล้วด้วยโปรแกรม DnaSP version 6.0 เมื่อเปิดข้อมูลแล้วเลือก Analysis และ DNA Polymorphism โดยจะวิเคราะห์ค่า h_d ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตามแต่ละจังหวัดของประเทศไทย ตามแต่ละประเทศ และตามแต่ละทวีป จากนั้นบันทึกค่าที่ได้

3.7.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างของสัดส่วนรูปแบบ haplotype

เตรียมไฟล์จาก alignment ที่ได้จัดกลุ่มไว้แล้ว ในโปรแกรม DnaSP version 6.0 ด้วยการบันทึกเป็น Arlequin file format (.arp) จากนั้นจึงเปิดไฟล์ดังกล่าวในโปรแกรม Arlequin version 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2007) เลือกวิเคราะห์ในหัวข้อ Population comparisons แล้วเลือก compute pairwise F_{ST} และ compute pairwise differences (π) ตั้งค่า significant level ที่ 0.05 เมื่อตั้งค่าแล้วจึงเริ่มการวิเคราะห์ โดยที่ผลจะปรากฏจากหน้าต่างของ Microsoft Edge ทำการบันทึกผลของค่า F_{ST} และค่า P -value ที่ได้

3.7.4 การวิเคราะห์ haplotype network ของยีน *Pfs25*

ข้อมูลเพื่อนำเข้าโปรแกรม PopART version 1.7 (Leigh and Bryant, 2015) เพื่อสร้าง haplotype network ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ alignment ที่กำหนดชื่อลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นตัวเลขและบันทึกเป็น .nex ด้วยโปรแกรม MEGA7 และ DnaSP version 6.0 และข้อมูลที่กำหนดว่าชื่อที่เป็นตัวเลขนั้นจัดอยู่ในทวีปใด (traits) ใน 3 ทวีป คือ ทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย สามารถสร้างได้ใน Microsoft Excel กำหนดให้ ลำดับนิวคลีโอไทด์จัดอยู่

ในทวีปใดเป็นเลข 1 แต่ถ้าไม่ได้อยู่ที่ทวีปใดให้เป็นเลข 0 และทำการบันทึกไฟล์เป็น .csv ทั้งนี้ตัวเลขของไฟล์ alignment และไฟล์ traits ต้องตรงกัน

นำเข้าไฟล์ alignment และไฟล์ traits ที่เตรียมไว้แล้วในโปรแกรม PopART version 1.7 สร้าง haplotype network ด้วยการเลือก network และ Median Joining Network เมื่อผลของ haplotype network ปรากฏ ปรับสีของกราฟวงกลมตามต้องการและปรับตำแหน่งของกราฟวงกลมให้สอดคล้องกัน และบันทึกผลที่ได้เป็นรูปภาพ

3.7.5 การสร้าง phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ของยีน

Pfs25

ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับสร้าง phylogenetic tree มีจำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ haplotype 1 (H1) ถึง haplotype 11 (H11) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 25 kDa ookinete antigen จากเชื้อมาลาเรียของลิงชิมแปนซีชนิด *P. reichenowi* (NCBI ID LT969573.1 และ NCBI ID LVLA01000011.1) (Otto et al., 2014; Sundararaman et al., 2016) เป็น outgroup จำนวน 2 ตัวอย่าง ขั้นแรกสร้าง alignment ของ 13 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม MEGA7 ต่อมาหาโมเดลที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม jModelTest version 2.1.10 สำหรับข้อมูล alignment นี้ HKY+G เป็นโมเดลที่ดีที่สุด สุดท้าย บันทึกข้อมูล alignment เป็นไฟล์ .nex และ .phy ด้วยโปรแกรม DnaSP version 6.0 เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ด้วยวิธี Bayesian inference สร้างด้วย BEAUti version 1.10.4, BEAST version 1.10.4 (Suchard et al., 2018) และ TreeAnnotator version 1.10.4 นำเข้าข้อมูล alignment ที่เป็นไฟล์ .nex ในโปรแกรม BEAUti version 1.10.4 กำหนดค่า Substitution Model เป็น HKY+G หัวข้อ MCMC กำหนดให้ Length of chain เป็น 10000000, Log parameters every เป็น 1000 จากนั้น Generate BEAST file จะได้ไฟล์ .xml ต่อจากนั้นนำเข้าไฟล์ดังกล่าวในโปรแกรม BEAST version 1.10.4 แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูล สุดท้ายนำเข้าไฟล์ .trees ที่ได้ ใน TreeAnnotator version 1.10.4 เพื่อทำการ Burn-in กำหนด Specify the burnin as the number of states Burnin (as states) เท่ากับ 1000000 หรือกำหนดค่า burn-in เท่ากับ 10% นำเข้าผลของ phylogenetic tree ที่ได้ หลังจากการ burn-in ในโปรแกรม FigTree version 1.4.3 ทำการตรึงรากโดยเลือกกิ่งที่ต้องการ และกำหนดให้แสดงค่า Bootstrap ด้วย จากนั้นจัดกิ่งของ tree ที่ได้ให้ง่ายต่อการเข้าใจ และบันทึกภาพที่ได้

phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม PhyML version 3.1 นำเข้าข้อมูล alignment ที่เป็นไฟล์ .phy ทำ

การตั้งค่า Data type เป็น DNA, Input sequence เป็น interleaved, Model of nucleotide substitution เป็น HKY85, Gamma distribution เป็น yes, Optimize tree topology เป็น yes, Starting tree (BioNJ/parsimony/user tree) เป็น BioNJ, Tree topology search operations เป็น NNI moves (fast, approximate), Non parametric bootstrap analysis เป็น yes กำหนดค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 และให้ Print bootstrap tree ด้วย และการตั้งค่าอื่นนอกเหนือจากนี้ ให้เป็น default นำเข้าผลที่ได้ในโปรแกรม FigTree version 1.4.3 ทำการเรียงรากโดยเลือกกิ่งที่ต้องการและกำหนดให้แสดงค่า Bootstrap ด้วย จากนั้นจัดกิ่งของ tree ที่ได้ให้ง่ายต่อการเข้าใจ และบันทึกภาพที่ได้

phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) ด้วยโปรแกรม PAUP version 4 นำเข้าข้อมูล alignment ที่เป็นไฟล์ .nex และเลือก Execute ไฟล์ดังกล่าวอีกครั้ง ตั้งค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. reichenowi* เป็น outgroup (Otto et al., 2014; Sundararaman et al., 2016) ตั้งค่า Analysis เป็น Distance สร้าง phylogenetic tree โดยไปที่ Analysis, Neighbor Joining/UPGMA, Distance Options ตามลำดับ จากนั้น กำหนด DNA/RNA distance เป็น HKY85, Rates for variable sites เป็น Gamma แล้วทำการวิเคราะห์ ถัดมาสร้าง bootstrap และสร้าง consensus tree โดยเลือก Bootstrap/Jackknife ที่เมนู Analysis กำหนด Resampling method เป็น Bootstrap, Number of replicates เท่ากับ 1000, Type of search เลือกเป็น Neighbor-joining/UPGMA และ Consensus tree options เลือก Retain groups with frequency > 50% และ DNA/RNA distances เป็น HKY85 แล้วทำการวิเคราะห์ บันทึกผล Bootstrap consensus tree ที่ได้ จากนั้น ทำการสร้าง phylogenetic tree อีกครั้งหนึ่งตามข้างต้น และบันทึกผลที่ได้

3.8 การวิเคราะห์ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25*

3.8.1 การวิเคราะห์ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *Pfs25*

วิเคราะห์หาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนด้วยโปรแกรม DnaSP version 6.0 จากข้อมูล alignment ที่ได้กำหนดกลุ่มไว้แล้ว จากนั้น เลือก Analysis และ Polymorphic Sites กำหนดตำแหน่งที่วิเคราะห์ คือ site 1 ถึง site 654 แล้วเริ่มการวิเคราะห์จากนั้นบันทึกผลของตำแหน่งและจำนวนที่เกิด Synonymous/Replacement Changes

3.8.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25*

วิเคราะห์ค่า nucleotide diversity index (π) ด้วยโปรแกรม DnaSP version 6.0 จากข้อมูล alignment ที่ได้กำหนดกลุ่มไว้แล้ว จากนั้น เลือก Analysis และ DNA Polymorphism

กำหนดตำแหน่งที่วิเคราะห์ คือ site 1 ถึง site 654 แล้วเริ่มการวิเคราะห์ และบันทึกผลที่ได้ ถัดมาสร้างกราฟของค่า nucleotide diversity (π) เลือก Analysis และ DNA Polymorphism กำหนดตำแหน่งที่วิเคราะห์ คือ site 1 ถึง site 654 และเลือก Compute Sliding Window กำหนด Window length 25 sites และ Step sites 3 sites บันทึกตารางแสดงผลเป็นไฟล์ .out และสร้างกราฟด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

3.8.3 การวิเคราะห์การคัดเลือกโดยธรรมชาติ ด้วย Tajima's D test

วิเคราะห์ค่า Tajima's D ด้วยโปรแกรม DnaSP version 6.0 จากข้อมูล alignment ที่ได้กำหนดกลุ่มไว้แล้ว จากนั้น เลือก Analysis และ Tajima's Test (Tajima, 1989) กำหนดตำแหน่งที่วิเคราะห์ คือ site 1 ถึง site 654 และ The total number of mutation แล้วเริ่มการวิเคราะห์ และบันทึกผลที่ได้

ถัดมา สร้างกราฟของ Tajima's D เลือก Analysis และ Tajima's Test กำหนดตำแหน่งที่วิเคราะห์ คือ site 1 ถึง site 654 และเลือก Compute Sliding Window กำหนด Window length 25 sites และ Step sites 3 sites บันทึกตารางแสดงผลเป็นไฟล์ .out และสร้างกราฟด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

3.8.4 การวิเคราะห์การคัดเลือกโดยธรรมชาติ ด้วย Fu and Li's D^* test และ

Fu and Li's F^* test

วิเคราะห์ค่า Fu and Li's D^* และ Fu and Li's F^* (Fu and Li, 1993) ด้วยโปรแกรม DnaSP version 6.0 จากข้อมูล alignment ที่ได้กำหนดกลุ่มไว้แล้ว จากนั้น เลือก Analysis และ Fu and Li's (and other) Tests กำหนดตำแหน่งที่วิเคราะห์ คือ site 1 ถึง site 654 และ The total number of mutation แล้วเริ่มการวิเคราะห์ และบันทึกผลที่ได้

ถัดมา สร้างกราฟของ Fu and Li's D^* และ Fu and Li's F^* เลือก Analysis และ Fu and Li's (and other) Tests กำหนดตำแหน่งที่วิเคราะห์ คือ site 1 ถึง site 654 และเลือก Compute Sliding Window กำหนด Window length 25 sites และ Step sites 3 sites บันทึกตารางแสดงผลเป็นไฟล์ .out และสร้างกราฟด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

3.8.5 การวิเคราะห์การคัดเลือกโดยธรรมชาติด้วยอัตราส่วน d_N-d_S

วิเคราะห์อัตราส่วน d_N-d_S (Yang and Nielsen, 2000) ด้วยโปรแกรม MEGA7 นำเข้า alignment ของไฟล์ .fas กำหนดเป็น analyze file จากนั้นเลือก Codon-based Z-test of Selection กำหนด Test Hypothesis เป็น Neutrality ($H_A: d_N \neq d_S$), Bootstrap method

เป็น 1000, Substitution Model/Method เป็น Nei-Gojobori method และ Gaps/Missing Data Treatment เป็น Complete deletion จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ และบันทึกค่าที่ได้

ถัดมา สร้างกราฟของอัตราส่วน d_N-d_S เลือก Estimate Selection for each Codon (HyPhy) กำหนด Tree to Use เป็น Automatic (Neighbor-joining tree), Genetic Code Table เป็น Standard, Model/Method เป็น Felsenstein 1981 model และ Gaps/Missing Data Treatment เป็น Complete deletion และทำการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์จะแสดงเป็นข้อมูลใน Microsoft Excel จากนั้นสร้างกราฟ และบันทึกผลที่ได้

3.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Pfs25 บริเวณที่มีการกลายพันธุ์

เตรียมข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ โดยนำเข้า alignment ของไฟล์ .fas ในโปรแกรม MEGA7 แล้วแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน และบันทึกเป็นไฟล์ .fas จากนั้น ทำการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิโดยวางลำดับสายพอลิเพปไทด์ที่ได้ใน Input sequence ของ JPred 4 server (Jnet algorithm) (Drozdetskiy et al., 2015) โดยจะทำการวิเคราะห์ครั้งละ 1 สายพอลิเพปไทด์ ตั้งค่า Select type of input เป็น Raw/Fasta แล้วเริ่มทำการวิเคราะห์ บันทึกผลที่ได้ และเปิดในโปรแกรม Jalview เพื่อบันทึกผลของการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิเป็นรูปภาพ

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 haplotype และการกระจายของ haplotype ในประเทศไทย

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในประเทศไทยในฐานข้อมูล PubMed และ PlasmoDB มีจำนวน 6 ตัวอย่าง จากจังหวัดตาก แบ่งเป็น 5 ตัวอย่าง จากงานวิจัย Da และคณะ (2013) และ 1 ตัวอย่าง จากฐานข้อมูล PlasmoDB รูปแบบของยีน *Pfs25* แบ่งได้ 2 haplotype (H) คือ H1 และ H2 จำนวน 4 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

นอกจากนี้ เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในประเทศไทย งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้นำจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จาก 6 จังหวัดอื่น ได้แก่ แม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี ระนอง อุบลราชธานี ตราด และยะลา จำนวน 83 ตัวอย่าง มาเพิ่มจำนวนยีน *Pfs25* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ทั้งหมด มีจำนวน 1 แถบ (ภาพที่ 11) ซึ่งมีขนาด 878 คู่เบส ต่อมานำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งหมดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing จากนั้น นำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างจากจังหวัดตากจึงได้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* เชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยรวมทั้งหมด 89 ตัวอย่าง

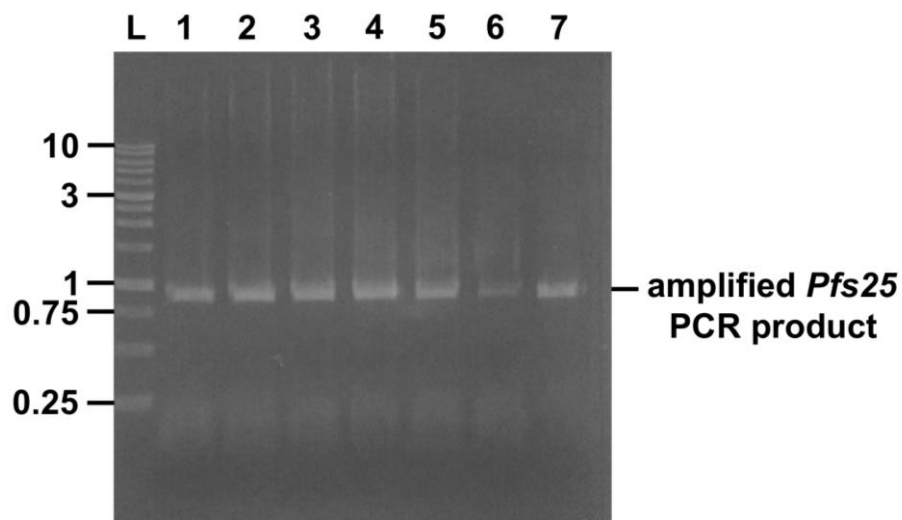
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทย พบว่า ยีน *Pfs25* แบ่งออกได้เป็น 7 แบบ โดย H3 ถึง H7 เป็นรูปแบบใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน (ตารางที่ 7 และภาพที่ 12) เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนและการกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ในประเทศไทย พบว่า H2 มีจำนวน 61 ตัวอย่าง จัดเป็นรูปแบบที่มีสัดส่วนสูงที่สุด (คิดเป็นร้อยละ 68) และมีการกระจายสูงสุดในประเทศไทย พบในทุกจังหวัด จึงจัดเป็นรูปแบบหลัก (major haplotype)

นอกจากนี้ ยังพบรูปแบบ H1 และ H3 จำนวน 13 และ 6 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 15 และ 7) ตามลำดับ โดย H1 มีการกระจายใน 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี ระนอง และอุบลราชธานี ในขณะที่ H3 มีการกระจายใน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดระนอง อุบลราชธานี และตราด ส่วนรูปแบบที่เหลือ ได้แก่ H4, H5, H6 และ H7 พบจำนวน 1, 1, 3 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ รูปแบบของยีนเหล่านี้มีการกระจายที่ค่อนข้างจำเพาะ กล่าวคือ H4, H5 และ H7 พบเฉพาะตัวอย่างจากจังหวัดยะลาเท่านั้น ส่วน H6 พบในจังหวัดแม่ฮ่องสอนและกาญจนบุรี ข้อมูล

เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย มีรูปแบบของยีน *Pfs25* ที่หลากหลาย และยีน *Pfs25* แต่ละรูปแบบมีการกระจายในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน

เพื่อที่เปรียบเทียบความหลากหลายของรูปแบบ haplotype ที่พบในแต่ละพื้นที่ จึงวิเคราะห์ค่า haplotype diversity (*hd*) ผลการศึกษาพบว่า ค่า *hd* ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียทั้งหมดในประเทศไทยมีค่า 0.507 ± 0.059 (ตารางที่ 7) และเมื่อวิเคราะห์ค่า *hd* ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่พบว่า ค่า *hd* สูงสุด พบในเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลา และค่า *hd* ต่ำสุดพบในเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดอุบลราชธานี ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าพื้นที่อื่น ๆ ของประเทศไทย





ภาพที่ 11 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *Pfs25* ที่เพิ่มจำนวนจากจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย

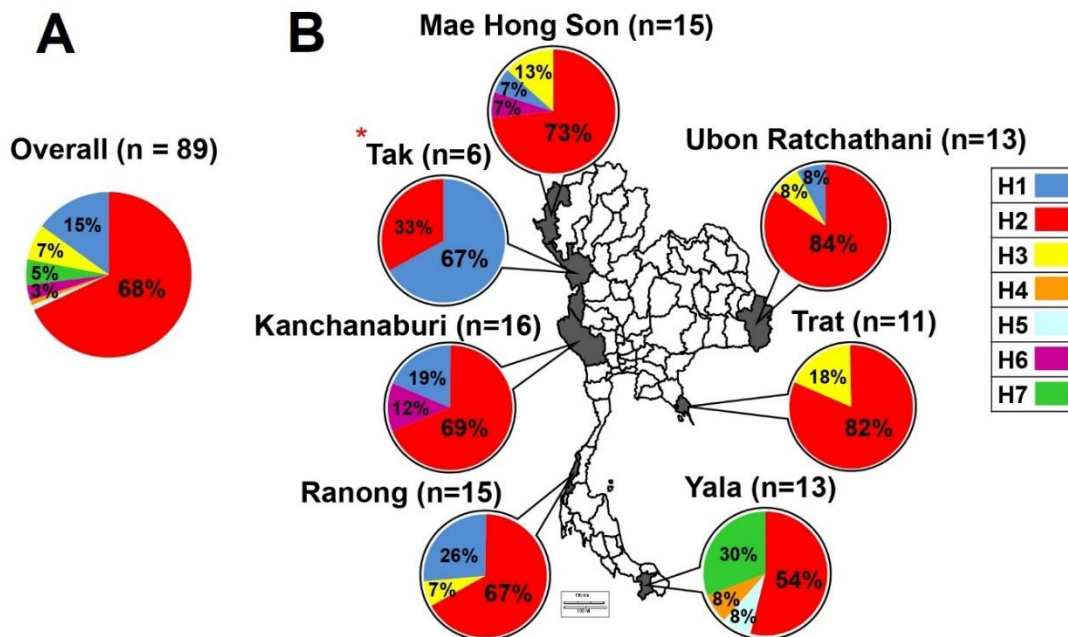
เลน L แสดง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb marker) มีขนาดตั้งแต่ 0.25 ถึง 10 กิโลเบส (Yeastern Biotech, ประเทศไทยหัววัน) เลน 2 ถึง 8 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย isolate K58, K60, K64, K66, K74, K165 และ T9/94 ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการมีขนาด 878 คู่เบส agarose gel ความเข้มข้น 1.2 % ย้อมด้วยสารละลาย Ethidium Bromide ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 การกระจาย haplotype ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*
จำนวน 7 haplotype ใน 7 จังหวัดของประเทศไทย

n แทนจำนวนตัวอย่าง H แทน haplotype *hd* แทนค่าเฉลี่ยของ haplotype diversity index \pm ค่า standard deviation และ % ในวงเล็บแทนร้อยละของ haplotype แต่ละรูปแบบ

จังหวัด	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	<i>hd</i>
แม่ฮ่องสอน (n=15)	1 (7%)	11 (73%)	2 (13%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)	0 (0%)	0.467 \pm 0.148
ตาก* (n=6)	4 (67%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.533 \pm 0.172
กาญจนบุรี (n=16)	3 (19%)	11 (69%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12%)	0 (0%)	0.508 \pm 0.126
ระนอง (n=15)	4 (26%)	10 (67%)	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.514 \pm 0.116
อุบลราชธานี (n=13)	1 (8%)	11 (84%)	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.295 \pm 0.156
ตราด (n=11)	0 (0%)	9 (82%)	2 (18%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.327 \pm 0.153
ยะลา (n=13)	0 (0%)	7 (54%)	0 (0%)	1 (8%)	1 (8%)	0 (0%)	4 (30%)	0.654 \pm 0.106
รวม (n=89)	13 (15%)	61 (68%)	6 (7%)	1 (1%)	1 (1%)	3 (3%)	4 (5%)	0.507 \pm 0.059

*หมายเหตุ: ข้อมูลจากการศึกษาของ Da และคณะ (2013) และฐานข้อมูล PlasmoDB



ภาพที่ 12 รูปแบบและการกระจายของ haplotype (H) ของยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย

(ภาพย่อย A) สัดส่วนของ haplotype ของยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทุกตัวอย่างในประเทศไทย (ภาพย่อย B) สัดส่วนของ haplotype ของยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทุกตัวอย่างในแต่ละจังหวัด ประกอบด้วย จังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี อุบลราชธานี ตรัง และยะลา สีเทาแสดงตำแหน่งของจังหวัดที่เป็นแหล่งของเชื้อ *P. falciparum* ตัวเลขในวงเล็บ (n) แสดงจำนวนตัวอย่างของแต่ละจังหวัด ตัวเลข % ในกราฟวงกลมแสดงร้อยละของ haplotype เครื่องหมายดอกจันสีแดง (*) หมายถึง ข้อมูลการศึกษาของ Da และคณะ (2013) และฐานข้อมูล PlasmoDB ภาพที่ 12 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว

4.2 ความแตกต่างของสัดส่วนรูปแบบ haplotype ในประเทศไทย

เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบสัดส่วนของ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในแต่ละจังหวัด จึงทำการวิเคราะห์ค่า pairwise F_{st} และรายงานค่าสถิติด้วยค่า P value หากค่า P value ต่ำกว่า 0.05 แสดงว่า รูปแบบ haplotype ของยีน *Pfs25* ที่เปรียบเทียบในสองประชากรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ P value เท่ากับหรือสูงกว่า 0.05 แสดงว่า รูปแบบ haplotype ของยีน *Pfs25* ที่เปรียบเทียบในสองประชากรมีรูปแบบคล้ายคลึงกัน

ตารางที่ 8 แสดงค่า F_{st} ที่ได้จากการเปรียบเทียบรูปแบบ haplotype ของยีน *Pfs25* ในแต่ละจังหวัดในประเทศไทย เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า F_{st} ระหว่างจังหวัดในฝั่งตะวันตกของประเทศไทย 4 จังหวัด พบว่า ค่า P value ส่วนใหญ่มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า รูปแบบของ *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียจาก 4 จังหวัด ในฝั่งตะวันตกของประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า F_{st} ระหว่างจังหวัดยะลา อุบลราชธานี และตราด พบว่า ค่า P value ทั้งหมดมีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า รูปแบบของ *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียจาก 4 จังหวัดในฝั่งตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบค่า F_{st} ระหว่างรูปแบบของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลากับจังหวัดในฝั่งตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่ แม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี และระนอง พบว่า ค่า P value ต่ำกว่า 0.05 นอกจากนี้ พบว่า ค่า P value ต่ำกว่า 0.05 สามารถพบได้จากการเปรียบเทียบรูปแบบของยีน *Pfs25* ระหว่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตราดกับเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตากและกาญจนบุรี และ ระหว่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดอุบลราชธานีกับเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย แบ่งเป็น 2 กลุ่มประชากรย่อย ได้แก่ กลุ่มประชากรในจังหวัดทางฝั่งตะวันตกของประเทศไทย และกลุ่มประชากรทางฝั่งตะวันออกและใต้ของประเทศไทย

ตารางที่ 8 ค่า pairwise F_{st} ของยีน *Pf*s25 จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนและสัดส่วน haplotype ของยีน *Pf*s25 ที่พบในเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในพื้นที่ 7 จังหวัดของประเทศไทย เครื่องหมายดอกจันแทน ค่า pairwise F_{st} ที่มีค่า P value < 0.05

จังหวัด	แม่ฮ่องสอน	ตาก	กาญจนบุรี	ระนอง	อุตรราชธานี	ตราด	ยะลา
แม่ฮ่องสอน	0						
ตาก	0.40276* ($P = 0.01832$)	0					
กาญจนบุรี	0.01575 ($P = 0.27928$)	0.21298 ($P = 0.14414$)	0				
ระนอง	-0.21980 ($P = 0.76577$)	0.29766 ($P = 0.00010$)	-0.02995 ($P = 0.71171$)	0			
อุตรราชธานี	-0.05186 ($P = 0.99099$)	0.59351* ($P = 0.00000$)	0.07249 ($P = 0.07207$)	0.01027 ($P = 0.29730$)	0		
ตราด	-0.03086 ($P = 0.61261$)	0.64136* ($P = 0.00000$)	0.16062* ($P = 0.01832$)	0.09518 ($P = 0.09009$)	-0.03143 ($P = 0.57658$)	0	
ยะลา	0.12240* ($P = 0.00000$)	0.49092* ($P = 0.00000$)	0.18895* ($P = 0.00901$)	0.17167* ($P = 0.00000$)	0.12500 ($P = 0.06306$)	0.13916 ($P = 0.05405$)	0

4.3 รูปแบบและการกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรียทั่วโลก

เพื่อที่จะศึกษารูปแบบและการกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่พบในพื้นที่อื่น ๆ นอกจากประเทศไทย งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้สืบค้นและรวบรวมข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank และ ฐานข้อมูล PlasmoDB

ผลการสืบค้นพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในฐานข้อมูล GenBank และ PlasmoDB จำนวน 42 และ 202 ตัวอย่าง ตามลำดับ และพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 19 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวอย่างชนิดเดียวกัน หรือมาจากสายพันธุ์ ของเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกัน เช่น สายพันธุ์ 3D7 ซึ่งเป็นโคลน (clone) ของ isolate NF54 เป็นต้น ดังนั้น เมื่อนำมารวมกับข้อมูลยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย (ดูผลการทดลอง 4.1) จะได้ ฐานข้อมูลยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียทั่วโลก รวมทั้งหมด 307 ตัวอย่าง (ภาพที่ 13) เชื้อมาลาเรียที่ ปรากฏในฐานข้อมูลเหล่านี้มีต้นกำเนิดมาจาก 22 ประเทศ ประกอบด้วย (1) 4 ประเทศในทวีป อเมริกากลางและอเมริกาใต้ ได้แก่ ประเทศเอลซัลวาดอร์ ฮอนดูรัส เฟรนช์เกียนา และบราซิล รวม 29 ตัวอย่าง (2) 10 ประเทศในทวีปแอฟริกา ได้แก่ ประเทศเซเนกัล แกมเบีย กินี กานา โตโก มาลี ซูดาน คองโก ยูกันดา และเคนยา รวม 173 ตัวอย่าง (ข้อมูลนี้รวมเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ที่มีต้น กำเนิดจากทวีปแอฟริกา แต่ไม่สามารถระบุประเทศได้) และ (3) 8 ประเทศในทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศอินเดีย จีน ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย รวม 105 ตัวอย่าง

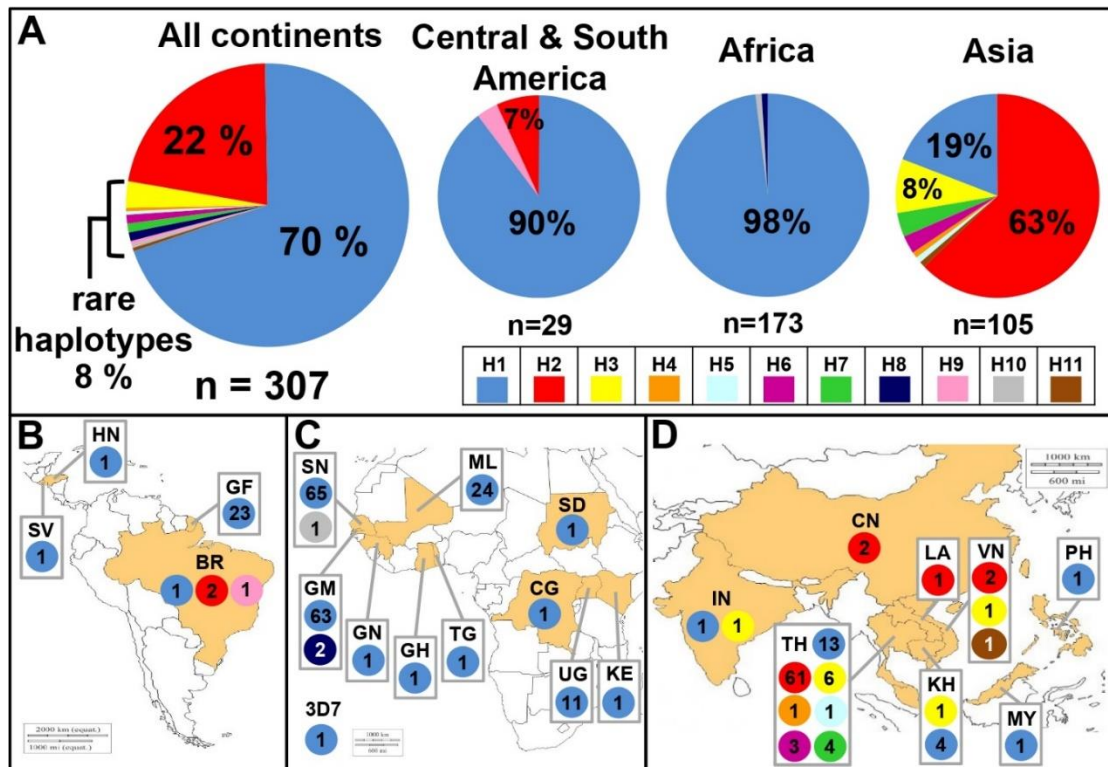
เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทุก ตัวอย่าง พบว่า ยีน *Pfs25* มีรูปแบบของ haplotype จำนวน 11 แบบ และมีค่า *hd* เท่ากับ 0.456 ± 0.028 ในภาพที่ 13A พบว่า รูปแบบของยีน *Pfs25* ที่พบมากที่สุด คือ H1 และ H2 ซึ่งพบ จำนวน 216 และ 68 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 70 และ 22) ตามลำดับ ในขณะที่ haplotype แบบ อื่น (H3 ถึง H11) มีจำนวน 23 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 8) ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า H1 และ H2 เป็น รูปแบบหลักของยีน *Pfs25* ที่พบมากในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลก

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของยีน *Pfs25* ที่พบในแต่ละทวีป พบว่า จำนวนรูปแบบและการ กระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* แตกต่างกันเชื้อมาลาเรียแต่ละประชากร ในทวีปอเมริกา กลางและอเมริกาใต้ มีเชื้อมาลาเรียจำนวน 29 ตัวอย่าง มี haplotype ของยีน *Pfs25* จำนวน 3 แบบ ได้แก่ H1, H2 และ H9 (ภาพที่ 13B) จำนวน 26, 2, และ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 90, 7 และ 3 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงว่า haplotype หลัก (major haplotype) ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ คือ H1 พบได้ในทุกประเทศ นอกจากนี้ H2 และ H9 จัดเป็น rare haplotype พบที่ประเทศบราซิล เท่านั้น

ส่วนผลการวิเคราะห์จำนวนรูปแบบและการกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา พบว่า เชื้อมาลาเรียมีจำนวน 173 ตัวอย่าง ประกอบด้วย haplotype ของยีน *Pfs25* จำนวน 3 แบบ ได้แก่ H1, H2 และ H9 (ภาพที่ 13C) จำนวน 170, 2 และ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 98.2, 1.2 และ 0.6 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงว่า haplotype หลัก (major haplotype) ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา คือ H1 ซึ่งพบได้ในทุกประเทศ นอกจากนี้ พบ H8 และ H10 จัดเป็น rare haplotype พบเฉพาะที่ประเทศแกมเบียและเซเนกัล ตามลำดับ

และผลการวิเคราะห์จำนวนรูปแบบและการกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชีย พบว่า เชื้อมาลาเรียมีจำนวน 105 ตัวอย่าง ประกอบด้วย haplotype ของยีน *Pfs25* จำนวน 8 แบบ โดย haplotype ที่พบมาก มี 3 รูปแบบ คือ H1, H2 และ H3 ซึ่งพบ H1 ในประเทศอินเดีย ไทย กัมพูชา มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ จำนวนรวม 20 ตัวอย่าง H2 ในประเทศจีน ไทย ลาว และเวียดนาม จำนวนรวม 66 ตัวอย่าง และ H3 ในประเทศอินเดีย ไทย กัมพูชา และเวียดนาม จำนวนรวม 9 ตัวอย่าง โดย H1, H2 และ H3 คิดเป็นร้อยละ 19, 63 และ 8 ตามลำดับ ส่วน haplotype อื่น ๆ ได้แก่ H4, H5, H6 และ H7 เป็น rare haplotype ที่พบเฉพาะในประเทศไทย (จากพื้นที่จังหวัดยะลา) และ H11 เป็น rare haplotype ที่พบในประเทศไทยเวียดนาม จำนวน 1 ตัวอย่าง

เมื่อเปรียบเทียบจำนวน haplotype (H) และค่า haplotype diversity index (hd) ในยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียที่พบในแต่ละทวีป จะพบว่า ยีน *Pfs25* เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปเอเชียมีจำนวน (H) 8 haplotype และค่า hd เท่ากับ 0.564 ± 0.049 ส่วนยีน *Pfs25* เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปแอฟริกาและทวีปอเมริกาและอเมริกาใต้แม้ว่าจะมีจำนวน (H) 3 haplotype เท่ากัน แต่ยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปอเมริกา กลางและอเมริกาใต้มีค่า hd เท่ากับ 0.197 ± 0.095 ซึ่งมีค่าสูงกว่า ค่า hd ของเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.034 ± 0.019 ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายของยีน *Pfs25* ในประชากรของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน โดยเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปเอเชียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุด และเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปแอฟริกามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำสุด



ภาพที่ 13 สัดส่วนและการกระจาย haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย

P. falciparum แบ่งตามทวีป

(ภาพย่อย A) กราฟวงกลมแรกแสดงสัดส่วนของ haplotype ที่ของเชื้อมาลาเรียทั่วโลก และเชื้อมาลาเรียที่พบในแต่ละทวีป ได้แก่ ทวีปอเมริกากลางและใต้ ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย ค่า n แสดงจำนวนตัวอย่าง และ % แสดงร้อยละของแต่ละ haplotype (ภาพย่อย B) การกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียใน 4 ประเทศในทวีปอเมริกากลางและใต้ (ภาพย่อย C) การกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียใน 10 ประเทศทวีปแอฟริกา และรวมเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกา และ (ภาพย่อย D) การกระจายของ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียใน 8 ประเทศ ในทวีปเอเชีย ตัวเลขในวงกลมแสดงจำนวนเชื้อที่มี haplotype แต่ละชนิด อักษรย่อแสดงชื่อประเทศ ได้แก่ เอลซัลวาดอร์ (SV) ฮอนดูรัส (HN) เฟรนช์เกียนา (GF) บราซิล (BR) เซเนกัล (SN) แกมเบีย (GM) กินี (GN) กานา (GH) โตโก (TG) มาลี (ML) ซูดาน (SD) คองโก (CG) ยูกันดา (UG) เคนยา (KE) อินเดีย (IN) จีน (CN) ไทย (TH) ลาว (LA) กัมพูชา (KH) เวียดนาม (VN) มาเลเซีย (MY) และ ฟิลิปปินส์ (PH) ภาพที่ 13 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว

4.4 การเปรียบเทียบรูปแบบ haplotype ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระหว่างทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย

เมื่อนำรูปแบบ haplotype ของยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่พบในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย มาเปรียบเทียบและนำมาวิเคราะห์ค่า pairwise F_{st} ผลการศึกษา พบว่า ค่า pairwise F_{st} ของระหว่างประชากรในทวีปเอเชียและทวีปแอฟริกา ระหว่างประชากรในทวีปเอเชียและทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และระหว่างประชากรในทวีปแอฟริกาและทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ มีค่า 0.67745, 0.44847 และ 0.07858 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ค่า P value ทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่า สัดส่วนของ haplotype ของยีน *Pfs25* ที่พบในแต่ละทวีปมีความแตกต่างกัน ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อมาลาเรียในสามทวีปนอกจากจะมีความแตกต่างกันกันเชิงภูมิศาสตร์แล้ว ยังมีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร (population structure) ที่แตกต่างกันอีกด้วย

ตารางที่ 9 ค่า pairwise F_{st} ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลก

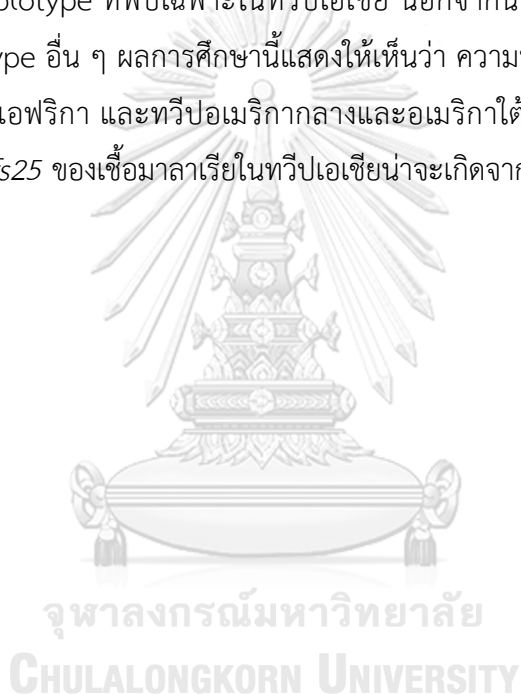
จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของสัดส่วน haplotype ของยีน *Pfs25* ที่พบในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย เครื่องหมายดอกจัน (*) แทนค่า P value น้อยกว่า 0.05

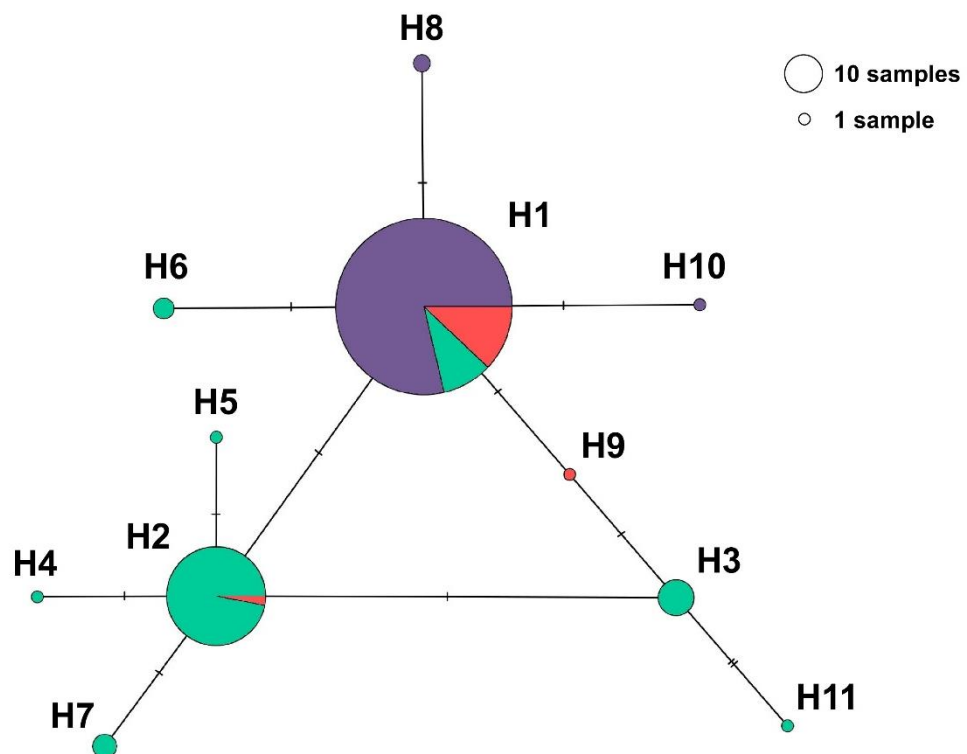
ประชากร	แอฟริกา	เอเชีย
เอเชีย	0.67745* ($P = 0.00000$)	0
อเมริกากลางและอเมริกาใต้	0.07858* ($P = 0.00901$)	0.44847* ($P = 0.00000$)

4.5 การวิเคราะห์ haplotype network ของยีน *Pfs25*

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype ของยีน *Pfs25* จึงได้สร้าง haplotype network ด้วยโปรแกรม PopART version 1.7 ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า haplotype เกือบทั้งหมดมีความเชื่อมโยงกับ H1 และ H2 ซึ่งจัดเป็น major haplotype (ภาพที่ 14)

ผลการศึกษาแสดงว่า มี rare haplotype ที่มีความใกล้ชิดกับ H1 จำนวน 3 haplotype ได้แก่ H6 ซึ่งเป็น rare haplotype ที่พบในทวีปเอเชีย H8 และ H10 ซึ่งเป็น rare haplotype ที่พบในทวีปแอฟริกา และ H9 เป็น rare haplotype ที่พบในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ในขณะที่ rare haplotype ที่มีความใกล้ชิดกับ H2 มีจำนวน 4 haplotype ได้แก่ H3, H4, H5 และ H7 ซึ่งทั้งหมดเป็น rare haplotype ที่พบเฉพาะในทวีปเอเชีย นอกจากนี้ พบว่า H11 มีความใกล้ชิดกับ H3 มากกว่า haplotype อื่น ๆ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ น่าจะเกิดจาก H1 และความหลากหลายของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชีย น่าจะเกิดจาก H2 และ H3





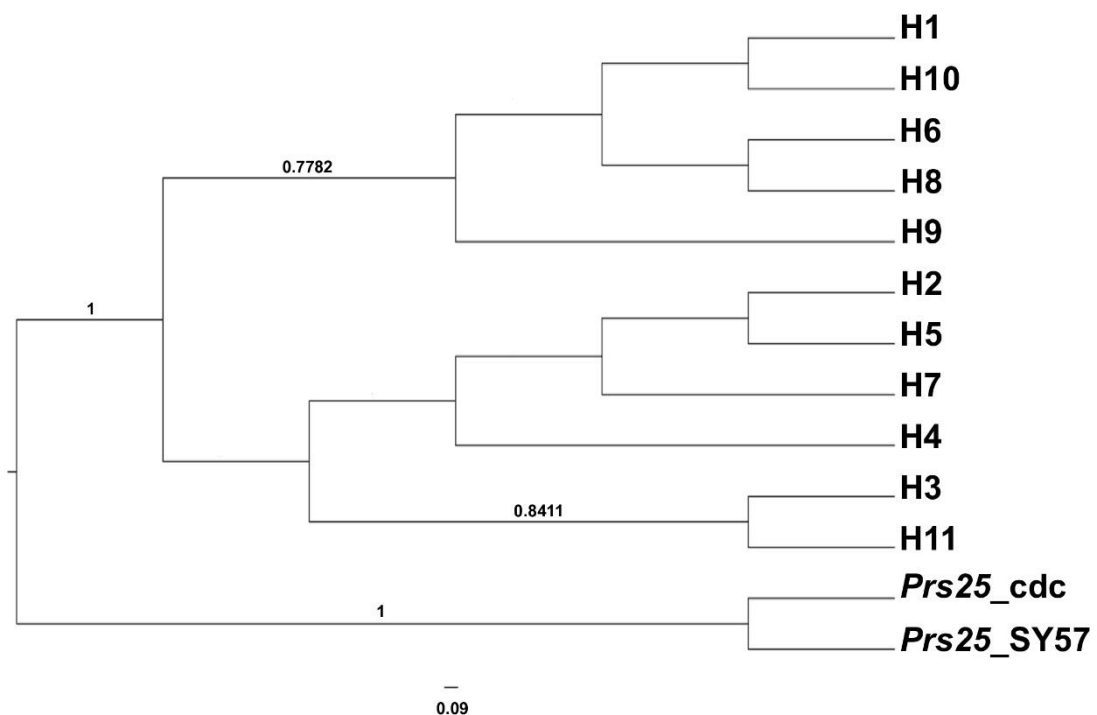
ภาพที่ 14 haplotype network แสดงความสัมพันธ์ของ haplotype ของยีน *Pfs25* จากเชื้อ มาลาเรียชนิด *P. falciparum*

ตัวอักษร H แทน haplotype ของยีน *Pfs25* ขนาดของวงกลมแทนจำนวนตัวอย่างของแต่ละ haplotype สีในวงกลมแสดงแหล่งที่มาของตัวอย่าง ได้แก่ สีแดงแทนตัวอย่างจากทวีปอเมริกากลาง และอเมริกาใต้ สีม่วงแทนตัวอย่างจากทวีปแอฟริกา และสีเขียวแทนตัวอย่างจากทวีปเอเชีย เส้นเชื่อมวงกลมแสดงความสัมพันธ์ของ haplotype ที่เกิดจาก mutation และจำนวนขีดบนเส้นเชื่อม haplotype แทนจำนวน mutation ที่เกิดระหว่าง haplotype ภาพที่ 14 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว

4.6 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype ของยีน *Pfs25*

นอกจากการวิเคราะห์ haplotype network งานวิจัยชิ้นนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *Pfs25* โดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธีของ Bayesian และใช้ยีน *Prs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. reichenowi* เป็น outgroup ได้ผล ดังภาพที่ 15

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นกระบวนการ diversification ของยีน *Pfs25* ออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยกลุ่มแรก (H1 clade) ประกอบด้วย H1, H6, H8, H9 และ H10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า rare haplotype ที่พบในเชื้อมาลาเรียในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และทวีปแอฟริกา มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ H1 มากที่สุด ในขณะที่ในกลุ่มที่ 2 (H2 clade) พบการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยแรกประกอบด้วย H2, H5, H4 และ H7 และกลุ่มย่อยที่สองประกอบด้วย H3 และ H11 ผลการศึกษานี้สนับสนุนผลการศึกษาที่ได้จาก haplotype network analysis ว่า rare haplotype ที่พบในเชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชียมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ H2 มากที่สุด และข้อมูลนี้ยังแสดงให้เห็นว่า H3 และ H11 อยู่ในกลุ่มเดียวกับ H2 clade ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายที่พบเฉพาะในทวีปเอเชีย



ภาพที่ 15 Bayesian phylogenetic tree ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*

ใช้โมเดลวิวัฒนาการเป็น HKY+G ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า posterior probability ความยาวกิ่งแสดง ความยาวตามจำนวนการแทนที่ (substitution) ต่อตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ตรึงรากโดยยีน *Prs25* จาก เชื้อมาลาเรียชนิด *P. reichenowi* (NCBI ID LT969573.1 และ NCBI ID LVLA01000011.1) ภาพที่ 15 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว



4.7 ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *Pfs25* และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* พบว่า มีตำแหน่งของ single nucleotide polymorphism (SNPs) รวม 10 ตำแหน่ง (loci) ดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 16A โดยพบว่า SNPs 3 ตำแหน่ง ที่นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 117 (AGT/AGC), 333 (AAG/AAA) และ 519 (GGA/GGG) เป็น synonymous SNPs แปรรหัสเป็นกรดอะมิโน 39 Ser, 111 Lys และ 173 Gly ตามลำดับ ส่วน SNPs อื่น ๆ อีก 7 ตำแหน่ง ที่พบที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 226 (GAT/AAT), 392 (GGA/GCA), 412 (GGC/AGC), 428 (GTA/GCA), 433 (GAT/AAT), 561 (AAT/AAA) และ 651 (ATG/ATA) จัดเป็น non-synonymous SNPs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 76 Asp/Asn, 131 Gly/Ala, 141 Gly/Ser, 143 Val/Ala, 145 Asp/Asn, 187 Asn/Lys and 217 Met/Ile (ภาพที่ 16B) ผลการศึกษานี้ แสดงว่า SNPs ที่พบในยีน *Pfs25* มี 10 ตำแหน่ง และแต่ละตำแหน่งมีนิวคลีโอไทด์เพียง 2 รูปแบบ (dimorphism) เท่านั้น

นอกจากนี้ ตารางที่ 10 แสดงความถี่ของ SNP ที่พบในยีน *Pfs25* ผลการศึกษา พบว่า รูปแบบของ SNP ที่พบใน H1 เป็น SNP ที่พบในสัดส่วนสูงกว่า SNP ที่พบใน haplotype แบบอื่น ๆ โดยสัดส่วนของ SNP ของ H1 ในทุกตำแหน่งมีค่าระหว่าง 0.964 ถึง 0.999 ยกเว้นที่ตำแหน่ง 392 ซึ่งมีค่าสัดส่วนลดลงเป็น 0.726 ผลการศึกษานี้แสดงว่า รูปแบบนิวคลีโอไทด์ของ H1 เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด ในยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ haplotype ที่พบว่า H1 เป็น haplotype ที่มีสัดส่วนสูงสุดในประชากรเชื้อมาลาเรีย

เพื่อทำการเปรียบเทียบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ที่พบในยีน *Pfs25* แต่ละประชากร จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ที่พบในเชื้อมาลาเรียแต่ละประเทศมาคำนวณค่า nucleotide diversity index (π) ผลการศึกษาพบว่า ค่า π ในยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั้งหมด (จำนวน 307 ตัวอย่าง) เท่ากับ 0.00085 ± 0.00007

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่า π ในแต่ละประเทศ (เฉพาะประเทศที่มีข้อมูลนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2 ตัวอย่างขึ้นไป) ค่า nucleotide diversity สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.00306 ± 0.00153 จากประเทศอินเดีย และต่ำที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.00000 จากประเทศจีน มาลี ยูกันดา และเฟรนช์เกียนา ดังตารางที่ 11 โดยยีน *Pfs25* ในประชากรเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่พบในทวีปเอเชียจำนวน 4 ประเทศ ได้แก่ ประเทศกัมพูชา ไทย เวียดนาม และอินเดีย และเชื้อมาลาเรียในประเทศบราซิลมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ย ในขณะที่ยีน *Pfs25* ในประชากรเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่พบในทวีปแอฟริกาจำนวน 2 ประเทศ (ประเทศแกมเบีย และเซเนกัล) มีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ย ผลการศึกษานี้ยังแสดงว่า ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน *Pfs25* ที่พบในแต่ละประเทศมีความแตกต่างกัน ดังนั้น ข้อมูลนี้

สนับสนุนว่า ยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในทวีปเอเชียมีความหลากหลายระดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทวีปอื่น ๆ



นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของ SNP ที่พบในยีน *Pfs25* ผลการศึกษาพบว่า SNPs ที่พบในยีน *Pfs25* ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณ Epidermal Growth Factor (EGF)-like domain แบ่งเป็น 1, 1, 5 และ 2 SNPs ใน EGF domain 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบ 1 SNP ใน anchor domain หรือ transmembrane domain ทั้งนี้ non-synonymous SNPs ส่วนใหญ่จะพบมากที่สุดอยู่ใน EGF domain 3 (ภาพที่ 16A และ 16B)

เพื่อทำการคำนวณค่า π ในแต่ละ domain และเปรียบเทียบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละบริเวณภายในยีน *Pfs25* ด้วยเทคนิค sliding window plot analysis ผลการศึกษาพบว่า ค่า π สูงที่สุดเท่ากับ 0.01621 โดยช่วงที่ค่า nucleotide diversity สูงที่สุด คือนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 388 ถึง 415 ภายใน EGF domain 3 (ภาพที่ 16C)



ตารางที่ 10 ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทำโลก จำนวน 307 ตัวอย่าง
 แถบสีเทา แสดงตำแหน่ง synonymous mutation

Haplotype	Nucleotide position										
	117	226	333	392	412	428	433	519	561	651	
H1	AGI	GAT	AAG	GGA	GGC	GIA	GAT	GGA	AAI	ATG	
	Ser	Asp	Lys	Gly	Gly	Val	Asp	Gly	Asn	Met	
H2	-	-	-	GCA	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	Ala	-	-	-	-	-	-	
H3	-	-	-	GCA	-	GCA	-	-	-	-	
	-	-	-	Ala	-	Ala	-	-	-	-	
H4	-	-	-	GCA	-	-	AAT	-	-	-	
	-	-	-	Ala	-	-	Asn	-	-	-	
H5	-	-	AAA	GCA	-	-	-	-	-	-	
	-	-	Lys	Ala	-	-	-	-	-	-	
H6	AGC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H7	-	AAT	-	GCA	-	-	-	-	-	-	
	-	Asn	-	Ala	-	-	-	-	-	-	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Haplotype	Nucleotide position										
	117	226	333	392	412	428	433	519	561	651	
H8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ATA
H9	-	-	-	-	-	GCA	-	-	-	-	Ile
H10	-	-	-	-	-	Ala	-	-	-	-	-
H11	-	-	-	-	-	-	-	GGG	-	-	-
Frequency of H1 SNP	0.990	0.987	0.997	0.726	0.997	0.964	0.997	0.997	0.997	0.994	

หมายเหตุ: ตารางที่ 10 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว

ตารางที่ 11 ค่า nucleotide diversity (π) ของยีน *Pfs25* จากเชื้ออมาลาเรียชนิด

P. falciparum แยกตามแต่ละประเทศ และทวีป

n แทน จำนวนตัวอย่าง และ ค่า π แทน nucleotide diversity index \pm standard error of mean NA แทนไม่สามารถวิเคราะห์ได้

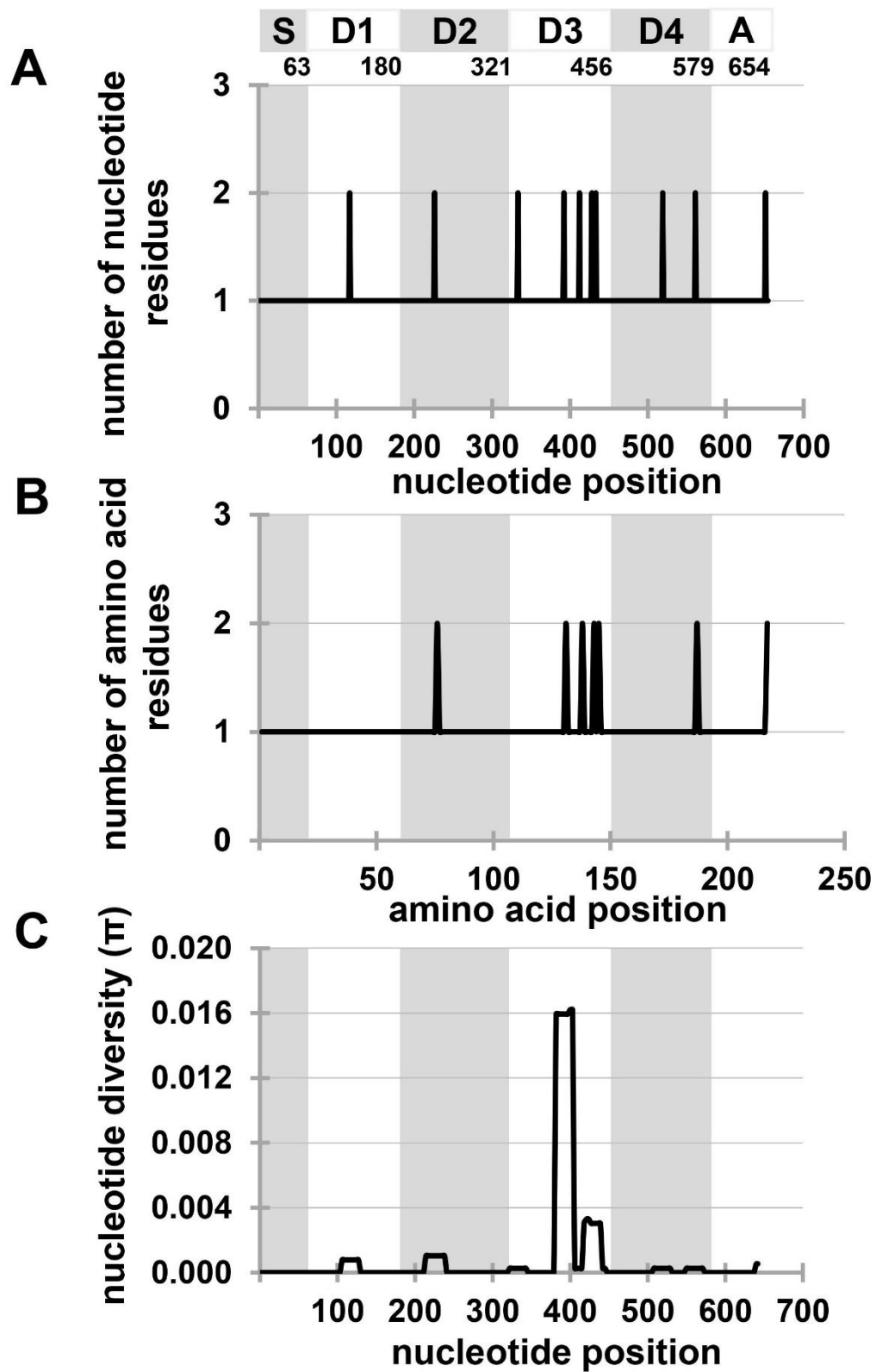
ประชากรเชื้ออมาลาเรีย	n	π
กัมพูชา	5	0.00122 \pm 0.00073
จีน	2	0.00000
ไทย	89	0.00095 \pm 0.00014
ฟิลิปปินส์	1	NA
มาเลเซีย	1	NA
ลาว	1	NA
เวียดนาม	4	0.00255 \pm 0.00092
อินเดีย	2	0.00306 \pm 0.00153
ทวีปเอเชีย	105	0.00111 \pm 0.00014
กานา	1	NA
กินี	1	NA
แกมเบีย	65	0.00009 \pm 0.00006
คองโก	1	NA
เคนยา	1	NA
ซูดาน	1	NA
เซเนกัล	66	0.00005 \pm 0.00004
โตโก	1	NA
มาลี	24	0.00000
ไม่ทราบแหล่งที่มา (3D7)	1	NA
ยูกันดา	11	0.00000
ทวีปแอฟริกา	173	0.00005 \pm 0.00003
บราซิล	4	0.00178 \pm 0.00056
เฟรนช์เกียนา	23	0.00000
เอลซัลวาดอร์	1	NA
ฮอนดูรัส	1	NA

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ประชากรเชื่อมมาลาเรีย	n	π
ทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้	29	0.00031±0.00015
ทั่วโลก	307	0.00085±0.00007

หมายเหตุ: ค่า nucleotide diversity ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เมื่อตัวอย่างมีจำนวนน้อยกว่า 2 ตัวอย่าง





ภาพที่ 16 ตำแหน่ง mutation ของยีน *Pfs25* ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ของ *Pfs25* และ sliding window plot ของ nucleotide diversity ของยีน *Pfs25* จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 307 ตัวอย่าง ทั่วโลก

(ภาพย่อย A) ตำแหน่ง mutation บนยีน *Pfs25* ที่มีความยาว 654 คู่เบส (ภาพย่อย B) ตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ที่เป็นผลมาจาก mutation ความยาว 217 residues (ภาพย่อย C) กราฟ nucleotide diversity สร้างโดยใช้ sliding window plot ที่มี window length เท่ากับ 25 คู่เบส และ step size เท่ากับ 3 คู่เบส ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์และสายพอลิเพปไทด์ แบ่งออกเป็น 5 แขนง signal sequence นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 ถึง 63 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 21, D1 แขนงโดเมน 1 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 64 ถึง 180 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 22 ถึง 60, D2 แขนงโดเมน 2 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 181 ถึง 321 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 61 ถึง 107, D3 แขนงโดเมน 3 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 322 ถึง 456 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 108 ถึง 152, D4 แขนงโดเมน 4 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 457 ถึง 579 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 153 ถึง 193 และ A แขนง anchor sequence นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 580 ถึง 651 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 194 ถึง 21 ภาพที่ 16 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว



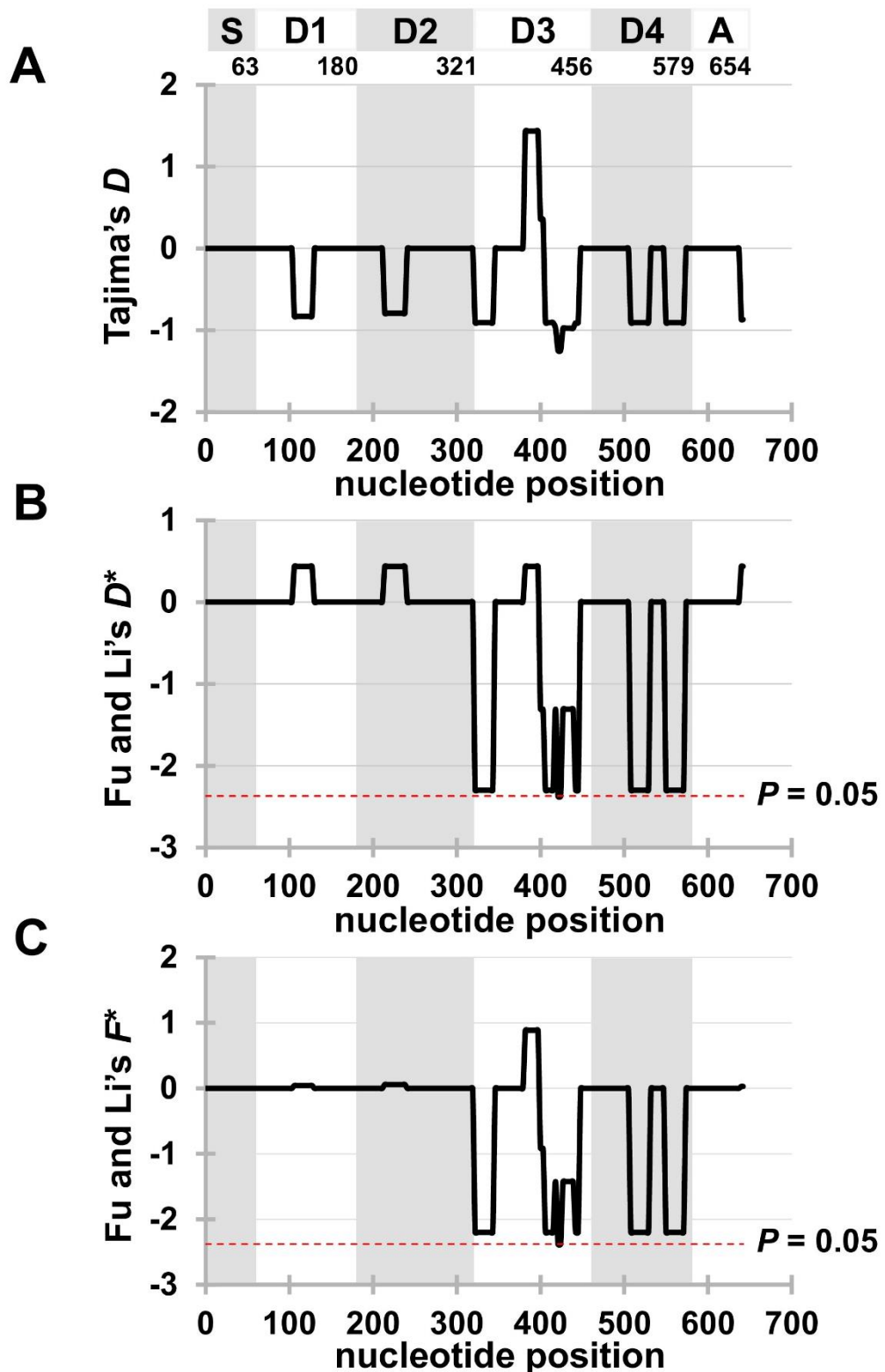
4.8 การคัดเลือกโดยธรรมชาติ โดยสถิติ Tajima's D test, Fu and Li's D^* test, Fu and Li's F^* test และอัตราส่วน d_N-d_S

ผลการทดสอบการคัดเลือกโดยธรรมชาติของยีน *Pfs25* จากประชากรทั่วโลกด้วย Fu and Li's D^* test และ Fu and Li's F^* test พบว่า มีค่าน้อยกว่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ -2.78081 และ -2.74867 ตามลำดับ (ตารางที่ 12) แสดงว่า ยีน *Pfs25* อยู่ภายใต้แรงคัดเลือกโดยธรรมชาติทางลบ (negative selection) ในขณะที่ Tajima's D test และอัตราส่วน d_N-d_S มีค่าน้อยกว่าและมากกว่าศูนย์ตามลำดับ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12) แสดงว่า การที่ยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำน่าจะมาจากอิทธิพลของแรงคัดเลือกโดยธรรมชาติทางลบ ซึ่งน่าจะเกิดการที่ยีนชนิดนี้มีความสำคัญต่อความอยู่รอดและการสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย ทำให้โอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์ในยีนอยู่ในระดับต่ำ หรือเกิดขึ้นได้ยาก

เมื่อทดสอบการคัดเลือกโดยธรรมชาติของยีน *Pfs25* โดยใช้เทคนิค sliding window พบผลการทดสอบ Fu and Li's D^* และ Fu and Li's F^* ของช่วงนิวคลีโอไทด์เดียวกัน คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 409-436 (ภาพที่ 17B และ 17C) มีแรงคัดเลือกโดยธรรมชาติทางลบมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จัดอยู่ในโดเมนที่ 3 ของ *Pfs25* แต่ผลการทดสอบของ Tajima's D test และอัตราส่วน d_N-d_S ด้วยเทคนิค sliding window ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงใดมีค่ามากกว่าหรือน้อยกว่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 17A และ 18) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดสอบด้วย Tajima's D test และอัตราส่วน d_N-d_S ที่ทดสอบทุกบริเวณของยีน

ตารางที่ 12 ค่าสถิติ Tajima's D test, Fu and Li's D^* test, Fu and Li's F^* test และอัตราส่วน d_N-d_S ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทั่วโลก

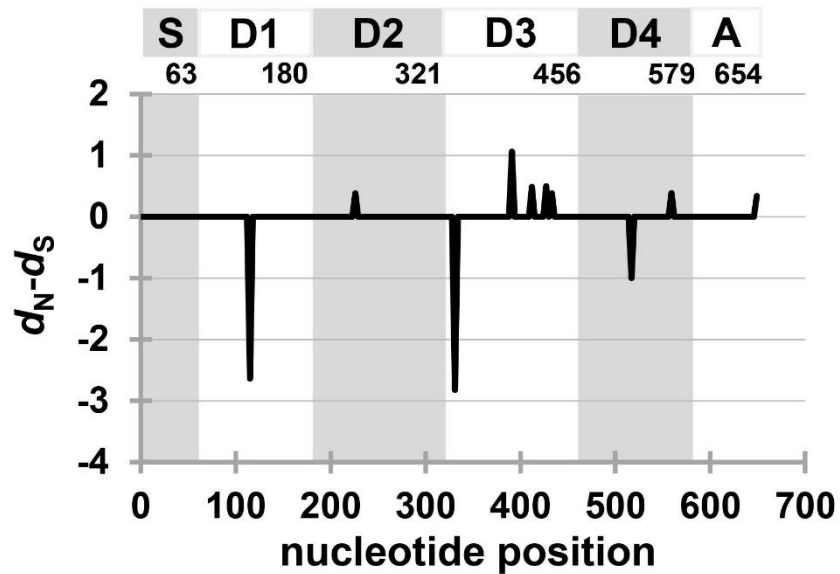
สถิติที่ใช้ทดสอบ	ค่าสถิติที่ใช้ทดสอบ (P value)
Tajima's D test	-1.43957 $P > 0.05$
Fu and Li's D^*	-2.78081 $P < 0.05$
Fu and Li's F^*	-2.74867 $P < 0.05$
d_N-d_S ratio	1.01 $P > 0.05$



ภาพที่ 17 sliding window plot แสดงค่า Tajima's D test (ภาพย่อย A), Fu and Li's D^* test (ภาพย่อย B) และ Fu and Li's F^* test (ภาพย่อย C) ที่ทดสอบกับยีน *Pfs25* จากเชื้อ มาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 307 ตัวอย่าง ทั่วโลก

กราฟสร้างโดยใช้ sliding window plot ที่มี window length เท่ากับ 25 คู่เบส และ step size เท่ากับ 3 คู่เบส เส้นประสีแดงแสดงค่าที่มีนัยสำคัญ ($P = 0.05$) โดยกราฟ Fu and Li's D^* test มีค่า -2.3706 และกราฟ Fu and Li's F^* test มีค่า -2.3795 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์แบ่งออกเป็น S แทน signal sequence นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 ถึง 63, D1 แทนโดเมน 1 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 64 ถึง 180, D2 แทนโดเมน 2 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 181 ถึง 321, D3 แทนโดเมน 3 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 322 ถึง 456, D4 แทนโดเมน 4 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 457 ถึง 579 และ A แทน anchor sequence นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 580 ถึง 651 ภาพที่ 17 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว





ภาพที่ 18 กราฟอัตราส่วน d_N-d_S ของยีน *Pfs25* จากตัวอย่างเชื้อมาลาเรียชนิด

P. falciparum จำนวน 307 ตัวอย่าง

เมื่ออัตราส่วน d_N-d_S เท่ากับหรือเข้าใกล้ค่าศูนย์ หมายถึง ยีนบริเวณนั้นถูกคัดเลือกโดย neutral selection ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ แบ่งออกเป็น S แทน signal sequence นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 1 ถึง 63, D1 แทนโดเมน 1 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 64 ถึง 180, D2 แทนโดเมน 2 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 181 ถึง 321, D3 แทนโดเมน 3 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 322 ถึง 456, D4 แทนโดเมน 4 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 457 ถึง 579 และ A แทน anchor sequence นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 580 ถึง 654 ภาพที่ 18 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว

4.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Pfs25 บริเวณที่มีการกลายพันธุ์

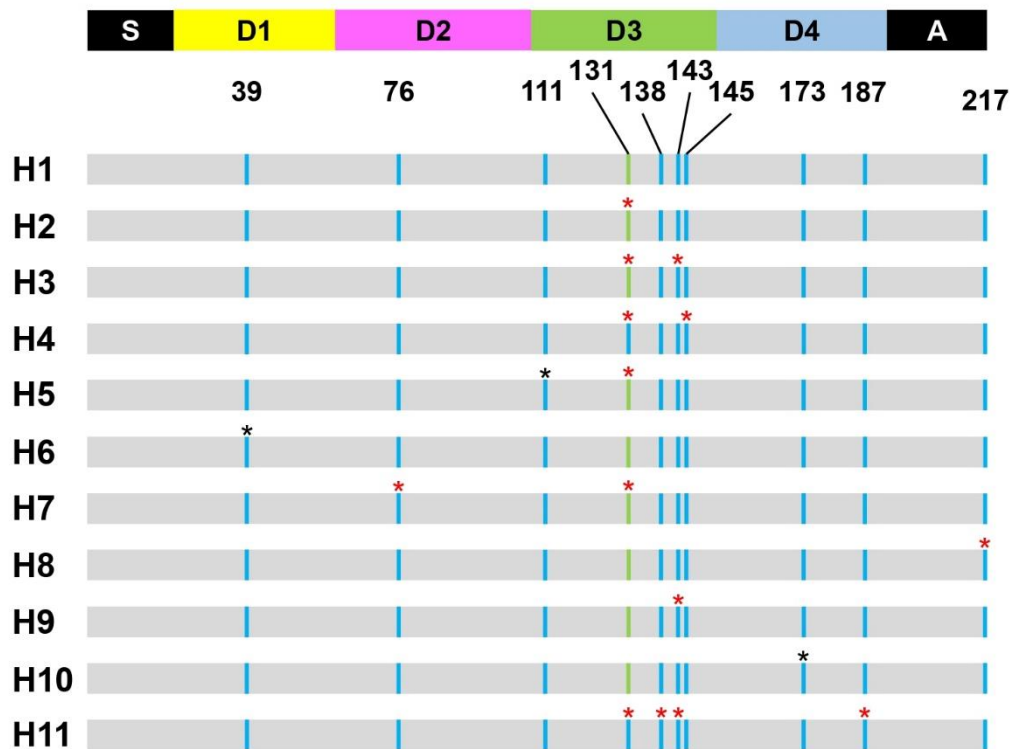
เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* haplotype อื่นกับ H1 พบ SNPs จำนวน 10 ตำแหน่ง ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 117, 226, 333, 392, 412, 428, 433, 519, 561 และ 651 ตรงกับกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ตำแหน่งที่ 39, 76, 111, 131, 138, 143, 145, 173, 187 และ 217 ของโปรตีน Pfs25 โดย SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง (ที่ตำแหน่ง 117, 333 และ 519) เป็น synonymous SNPs และ SNPs ที่ตำแหน่งอื่น ๆ จัดเป็น non-synonymous SNPs

ในปัจจุบัน เนื่องจากวัคซีน *Pfs25* ที่ถูกพัฒนาเป็น transmission-blocking vaccine ได้ถูกพัฒนามาจากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ซึ่งมีรูปแบบของยีน *Pfs25* แบบ H1 งานวิจัยชิ้นนี้ จึงสนใจที่จะศึกษาว่า การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่พบในโปรตีน Pfs25 ส่งผลต่อรูปร่างทุติยภูมิของโปรตีนหรือไม่ จึงนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Pfs25 ทั้ง 11 รูปแบบ ไปทำนายโครงสร้างทุติยภูมิด้วย JPred4 server

ผลการศึกษา แสดงว่า โครงสร้างทุติยภูมิทั้ง 10 ตำแหน่งของ H1 ประกอบด้วย โครงสร้างแบบ coil จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่ง 39, 76, 111, 138, 143, 145, 173, 187 และ 217 ดังภาพที่ 19 ขณะที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131 เพียงตำแหน่งเดียวมีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบแผ่นบีตา (beta-sheet)

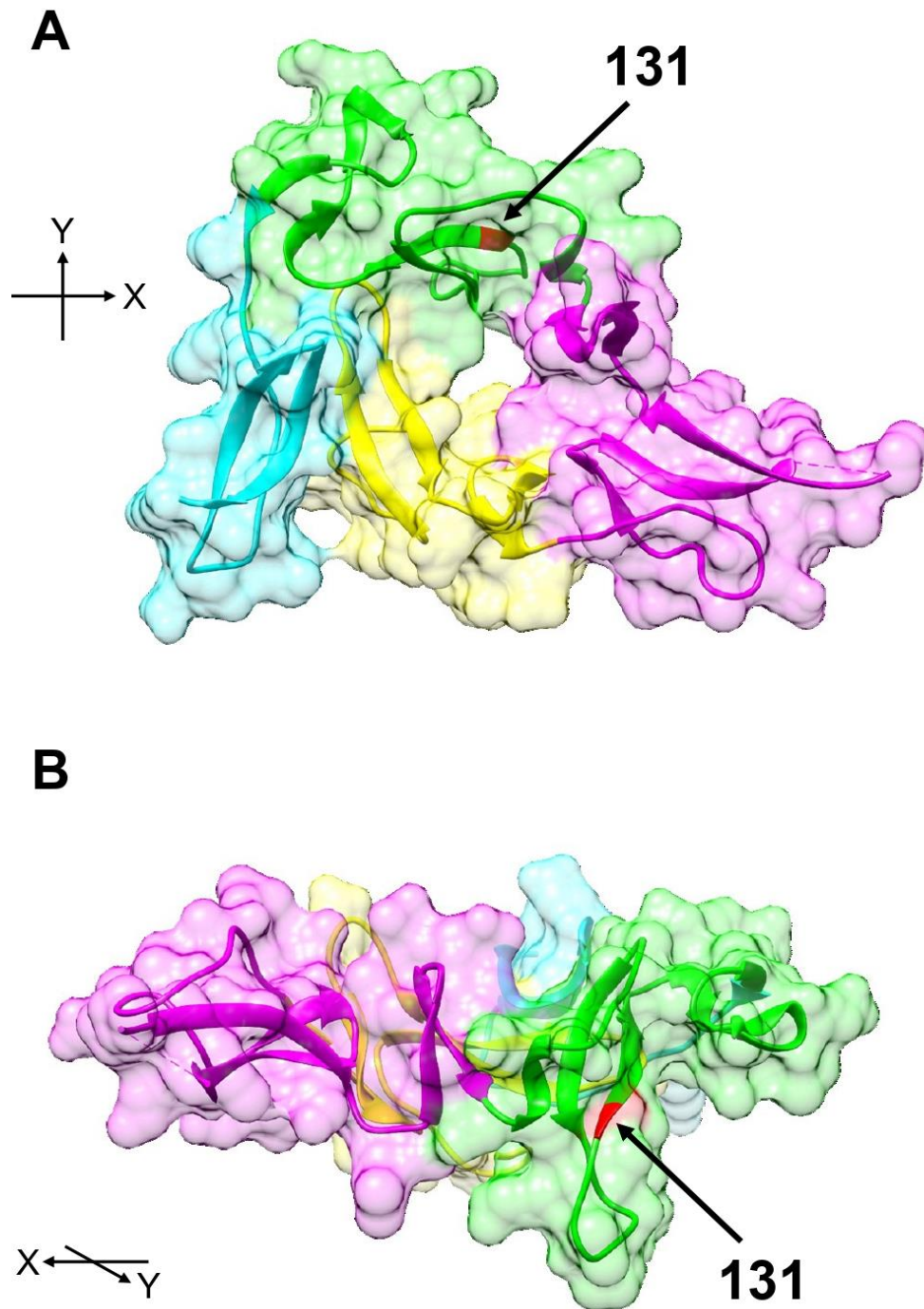
เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทุติยภูมิของกรดอะมิโนทั้ง 10 ตำแหน่ง ใน H2 ถึง H11 จะพบว่า โครงสร้างทุติยภูมิทุกตำแหน่งมีโครงสร้างแบบ coil เหมือนกับ H1 ยกเว้นที่ตำแหน่ง 131 ซึ่งพบว่า มีโครงสร้างทุติยภูมิ 2 รูปแบบ ได้แก่ โครงสร้างแบบแผ่นบีตา ซึ่งพบใน H1, H6, H8, H9 และ H10 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 392 เป็น GGA และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 131 Gly (ภาพที่ 20) นอกจากนี้ พบว่า H2, H3, H5 และ H6 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 392 เป็น GCA และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 131 Ala มีโครงสร้างแบบบีตาเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม พบว่า มีเพียง 2 haplotype คือ H4 และ H11 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 392 เป็น GCA และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 131 Ala

ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า แม้ว่ายีน *Pfs25* จะมีความหลากหลายของ haplotype และมีความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่พบในโปรตีน Pfs25 ส่งผลน้อยมากต่อรูปร่างทุติยภูมิของโปรตีน นอกจากนี้ แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอาจพบใน H4 และ H11 แต่ haplotype ทั้งสองแบบนี้ มีสัดส่วนในประชากรรวมคิดเป็นร้อยละ 1.3 แสดงว่า โปรตีน Pfs25 ที่พบในประชากรเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่มีรูปร่างคล้ายกับโปรตีน Pfs25 ของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 ซึ่งมีรูปแบบ H1



ภาพที่ 19 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Pfs25 แต่ละ haplotype บริเวณที่มีการกลายพันธุ์ จำนวน 10 ตำแหน่ง

แถบสีเทาแทนบริเวณ conserved ของกรดอะมิโน ซีดสีฟ้าแทนโครงสร้างแบบ coil ซีดสีเขียวแทนโครงสร้างแบบแผ่นปีกตา เครื่องหมายดอกจันสีดำแทนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์แล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโน เครื่องหมายดอกจันสีแดงแทนตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโน ตัวเลขแทนตำแหน่งของกรดอะมิโน, H แทน haplotype, S แทน signal sequence กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 21, D1 แทนโดเมน 1 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 22 ถึง 60, D2 แทนโดเมน 2 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 61 ถึง 107, D3 แทนโดเมน 3 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 108 ถึง 152, D4 แทนโดเมน 4 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 153 ถึง 193 และ A แทน anchor sequence กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 194 ถึง 217 ภาพที่ 19 ได้ตีพิมพ์ (Sookpongthai et al., 2021) และได้รับอนุญาตจากผู้ประพันธ์บรรณกิจ (corresponding author) แล้ว



ภาพที่ 201 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน Pfs25 ตัดแปลงจากโครงสร้างตติยภูมิของ PDB id: 6B0G

(ภาพย่อย A) ด้านหน้าของโปรตีน Pfs25 (ภาพย่อย B) ด้านข้างของโปรตีน Pfs25 สีแดงแทนกรดอะมิโนตำแหน่ง 131, สีเหลืองแทนโดเมน 1, สีเขียวแทนโดเมนที่ 2, สีฟ้าแทนโดเมนที่ 3 และสีฟ้าแทนโดเมนที่ 4 ลูกศร X และ Y แทนระนาบโปรตีน Pfs25 ที่แตกต่างกันของ A และ B

บทที่ 5 อภิปรายผล

5.1 การอภิปรายเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย

จากการสืบค้นฐานข้อมูล PubMed GenBank และ PlasmoDB พบว่า มีข้อมูลลำดับเบสของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียจำนวนทั้งสิ้น 224 สายพันธุ์ (isolate) ในจำนวนนี้มีข้อมูลยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จากประเทศไทย จำนวน 6 สายพันธุ์ (Da et al., 2013; Wang et al., 2000) และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีในเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยก่อนงานวิจัยชิ้นนี้ พบว่า ยีน *Pfs25* แบ่งออกเป็น 2 haplotype ได้แก่ H1 และ H2 โดยเชื้อ 4 สายพันธุ์มียีนแบบ H1 และ 2 สายพันธุ์แบบ H2 ข้อมูลของเชื้อมาลาเรียทั้งหมดได้จากเชื้อมาลาเรียที่มาจากจังหวัดตากเพียงแห่งเดียวเท่านั้น จะเห็นได้ว่า ข้อมูลของยีน *Pfs25* มีจำกัดและไม่อาจเป็นตัวแทนของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยได้ ดังนั้น จึงเป็นที่มาของงานวิจัยซึ่งต้องการศึกษาความหลากหลายของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย โดยจะต้องมีการรวบรวมตัวอย่างในพื้นที่ที่มีการระบาดอื่น ๆ ด้วย

จากข้อมูลการศึกษาการระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย (พัชรिता หงษ์จันทร์, 2020) พบว่า โรคมาลาเรียระบาดในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย แต่พบการระบาดจำนวนมากในจังหวัดชายแดนประเทศไทยติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้าน ได้แก่ ชายแดนประเทศไทยติดต่อกับประเทศพม่า ชายแดนประเทศไทยติดต่อกับประเทศกัมพูชา และชายแดนประเทศไทยติดต่อกับประเทศมาเลเซีย จังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียสูง 10 อันดับ ได้แก่ จังหวัดยะลา ตาก แม่ฮ่องสอน หนองเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี กาญจนบุรี สงขลา และตราด ตามลำดับ แนวโน้มการเป็นมาลาเรียต่อประชากร 100,000 คน ของคนไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010 ถึงปี ค.ศ. 2019 ลดลงตามลำดับ ปี ค.ศ. 2010 มีอัตราการป่วยด้วยโรคมาลาเรีย 40.3 รายต่อประชากรแสนคน ขณะที่ ปี ค.ศ. 2019 อัตราการป่วยด้วยโรคมาลาเรีย 3.03 รายต่อประชากรแสนคน ส่วนอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมาลาเรียไม่คงที่ โดยมีสัดส่วนร้อยละ 0.04 ถึง 0.30 อัตราเสียชีวิตมากที่สุดในปี ค.ศ. 2017 เนื่องจากการระบาดของโรคมาลาเรียต่อปีที่มีแนวโน้มลดลง ดังรายงานผู้ป่วยในปี ค.ศ. 2019 มีจำนวนเพียง 5,435 ราย แต่การเกิดการติดเชื้อมาลาเรียไม่สามารถทำนายได้ว่าจะเกิดในพื้นที่จังหวัดใดก่อน-หลังในหนึ่งปี หรือพื้นที่ใดอาจไม่เกิดมาลาเรีย ดังนั้น การศึกษาตัวอย่างที่ได้เก็บรวบรวมไว้แล้วในช่วงระยะเวลาหนึ่งจะสามารถแก้ปัญหานี้ได้

งานวิจัยชิ้นนี้จึงนำตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่เก็บรักษาไว้ ณ หน่วยวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทางหน่วยวิจัยได้เก็บรวบรวมเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จากผู้ป่วยในจังหวัดที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียไว้เป็นจำนวนมาก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002 ถึงปี ค.ศ. 2010 โดยได้แยกสายพันธุ์และเพาะเลี้ยงจนมีจำนวนมากแล้วมาทำการศึกษา การนำเชื้อมาลาเรียเหล่านี้มาศึกษาจะสามารถลดระยะเวลาการเก็บตัวอย่างได้มาก อีกทั้งเชื้อเหล่านี้ได้รับการแยกสายพันธุ์และทราบถึงปีที่ได้เก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ ได้รับอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลาจาก รศ.ดร. อธิกรม พลึงสกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นเชื้อมาลาเรียที่ได้รับการยืนยันชนิด โดยกล้องจุลทรรศน์จากแผ่นฟิล์มเลือด ดังนั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในพื้นที่ 6 จังหวัดที่มีการระบาดของมาลาเรียสูงในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี ระนอง ตรัง อุบลราชธานี และยะลา

ความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยโดยศึกษาความหลากหลายยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* พบจำนวน haplotype หรือรูปแบบของยีนซึ่งมีการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน จำนวน 7 haplotype ในจำนวนนี้ 2 haplotype สามารถพบได้ในฐานข้อมูล GenBank และ PlasmoDB งานวิจัยชิ้นนี้ได้ค้นพบ haplotype ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนจำนวน 5 haplotype ได้แก่ H3, H4, H5, H6 และ H7 จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อมาลาเรียในประเทศไทยมีความหลากหลายที่ค่อนข้างสูง และแสดงให้เห็นว่าฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย GenBank และ PlasmoDB ยังมีข้อมูลไม่ครบ ดังนั้น การทำวิจัยชิ้นนี้ทำให้เห็นข้อมูลความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียสมบูรณ์ขึ้น

เมื่อศึกษาการกระจายของ haplotype ทั้ง 7 รูปแบบ ในประเทศไทย พบว่า haplotype แต่ละชนิดกระจายแตกต่างกัน haplotype ที่มีการกระจายและสัดส่วนมากที่สุด คือ H2 เนื่องจาก haplotype ชนิดนี้พบได้ทุกจังหวัดที่ศึกษา นอกจากนี้ อีก 2 haplotype ที่พบจำนวนมาก และพบได้มากกว่า 1 จังหวัด คือ H1 และ H3 แสดงให้เห็นว่า 3 haplotype นี้มีความสำคัญ และอาจเลือกนำมาใช้เป็นแอนติเจนในการผลิต transmission-blocking vaccine เพื่อป้องกันการระบาดของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม บาง haplotype พบได้เฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น เช่น H4, H5 และ H7 พบเฉพาะในพื้นที่จังหวัดยะลา และ H6 พบได้ในพื้นที่ฝั่งตะวันตกของประเทศไทย การพบ haplotype ใหม่ ๆ เช่น H4, H5 และ H7 อาจเกิดจากมาลาเรียในจังหวัดยะลา มีการระบาดสูงอย่างต่อเนื่อง โดยพบอัตราการป่วยอยู่ในกลุ่มการระบาดสูง 10 ลำดับแรกของประเทศไทย ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010 ถึง ค.ศ. 2018 (จามร เมฆอรุณ, 2011; จันทพร ทานนท์, 2014; เทวพร จานนอก, 2015, 2016, 2017; ปภาณีจ สวงโท, 2012, 2013; พัชริดา หงษ์จันทร์, 2019; อรพรรณ กัญยะมี, 2018) อีกทั้งสถานการณ์ความรุนแรงที่เกิดขึ้นใน 3 จังหวัด ชายแดนภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดยะลา ปัตตานี

และนราธิวาส ส่งผลให้ประสิทธิภาพของระบบสาธารณสุขลดลง (ดิษฐ์ สิงหเสนี และคณะ, 2011; ประณิต ส่งวัฒนา และหทัยรัตน์ แสงจันทร์, 2015) การระบาดของมาลาเรียในจังหวัดยะลาจึงยังคงสูง ประกอบกับการอพยพเข้า-ออก ของแรงงานที่เป็นพาหะของโรคมาลาเรียจากประเทศมาเลเซียที่ส่งผลให้มีการเพิ่มความหลากหลายของยีนเข้ามายังประชากรและทำให้เกิดการผสมพันธุระหว่างประชากรเชื้อมาลาเรีย จะเห็นได้จากการศึกษาความหลากหลายของ *PfMSP-1*₁₉ จากตัวอย่างภาคใต้ของประเทศไทยและประเทศมาเลเซีย พบว่า จำนวน haplotype ทั้งหมด 5 haplotype ของประเทศมาเลเซียตรงกับ haplotype ที่พบในจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย (Goh et al., 2021) จากปัจจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า พื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยมีความหลากหลายของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สูง และอาจทำให้เจอ haplotype ใหม่ ๆ ได้

ความหลากหลายของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* แต่ละจังหวัดที่ศึกษาต่างกัน เนื่องมาจากพบจำนวน haplotype ของยีน *Pfs25* แตกต่างกัน จากผลการศึกษาพบว่า เชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลาและแม่ฮ่องสอนมีจำนวน haplotype มากที่สุด เท่ากับ 4 haplotype ขณะที่เชื้อมาลาเรียในจังหวัดตราดและตากมีจำนวน haplotype น้อยที่สุด เพียง 2 haplotype แสดงให้เห็นว่าจำนวนรูปแบบ haplotype มีความแตกต่างหลากหลายในแต่ละประชากร อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบว่าประชากรเชื้อมาลาเรียพื้นที่ใดมีความหลากหลายสูงหรือความหลากหลายต่ำจำเป็นต้องนำขนาดของตัวอย่างแต่ละประชากรมาเปรียบเทียบกับ กรณีนี้นี้จึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบความหลากหลายโดยใช้ค่า haplotype diversity index หรือ *hd* ซึ่งพบว่า จังหวัดยะลามีค่า *hd* สูงสุด เท่ากับ 0.654 ± 0.106 และจังหวัดอุบลราชธานีมีค่า *hd* ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.295 ± 0.156 ข้อมูลนี้ยืนยันว่า เชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม จำนวน haplotype จากงานวิจัยชิ้นนี้ขัดแย้งกับการศึกษาความหลากหลายของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ด้วย microsatellite จำนวน 12 ตำแหน่ง ได้แก่ Poly α , TA60, ARA2, Pfg377, PfPK2, TA87, TA109, TA80, ARP2, TA1, TA81 และ C1M8 จาก 346 ตัวอย่าง ของ 7 จังหวัด ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี ระนอง อุบลราชธานี ตราด และยะลา ตั้งแต่ ปี ค.ศ. 2002 ถึงปี ค.ศ. 2007 เนื่องจาก พบว่า microsatellite มีรูปแบบรวมกัน 300 haplotype โดยจังหวัดกาญจนบุรีมีจำนวน haplotype มากที่สุด จำนวน 162 haplotype (N=175) ขณะที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนและยะลาพบ 18 (N=18) และ 1 haplotype (N=31) ตามลำดับ ซึ่งไม่จัดว่ามากที่สุด นอกจากนี้ พบเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดตากและตราดมีจำนวน 47 (N=48) และ 18 haplotype (N=18) ตามลำดับ (Pumpaibool et al., 2009) ซึ่งไม่จัดว่าน้อยที่สุด ผลการศึกษาที่ขัดแย้งกันอาจเกิดจากเชื้อมาลาเรียเป็นคนละตัวอย่างกัน และเก็บตัวอย่างคนละปี ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลาของงานวิจัยชิ้นนี้เก็บเมื่อปี ค.ศ. 2016 และ ปี ค.ศ. 2019 ขณะที่ Pumpaibool และคณะ (2009) เก็บตัวอย่างระหว่างปี ค.ศ. 2002 ถึงปี ค.ศ. 2007 แสดงให้เห็นว่า มาลาเรียระบาดอย่างต่อเนื่องและ

มีการเปลี่ยนแปลง จึงอาจจำเป็นต้องมีการเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียอื่น ๆ ในพื้นที่ภาคใต้เพื่อ ยืนยันว่า ความหลากหลายสูงหรือต่ำ ปัจจุบันพบว่า มาลาเรียระบาดหลายจังหวัดในภาคใต้ของ ประเทศไทย ดังการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดของโรคมาลาเรียในพื้นที่ภาคใต้ซึ่งได้รวบรวมข้อมูลของโรค จากหน่วยควบคุมโรคติดต่อมาโดยแมลงตั้งแต่ ปี ค.ศ. 2013 ถึง ปี ค.ศ. 2016 ใน 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ภูเก็ต ระนอง และสุราษฎร์ธานี มาวิเคราะห์เปรียบเทียบ อัตราการเกิดโรคมาลาเรียของประชากร พบว่า อัตราการเกิดโรคมาลาเรียในจังหวัดระนองมีมากที่สุด เกือบ 1,000 รายต่อประชากรแสนคนในปี ค.ศ. 2013 อัตราการเกิดโรคมาลาเรียรองลงมาคือ จังหวัด สุราษฎร์ธานี ชุมพร และพังงา ส่วนอีก 3 จังหวัด ได้แก่ นครศรีธรรมราช กระบี่ และภูเก็ต พบอัตรา การเกิดมาลาเรียน้อยกว่า (Chaivisit et al., 2020) ดังนั้น สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียเพิ่มเติม จากจังหวัดเหล่านี้ได้

นอกจากเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดยะลาที่มีความหลากหลายสูงแล้ว ยังพบว่า เชื้อแถบชายแดน ไทย-พม่าหลากหลายสูงกว่าเชื้อแถบชายแดนไทย-ลาว และชายแดนไทย-กัมพูชา เนื่องจาก ค่า *hd* ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียในจังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี และระนอง เท่ากับ 0.467 ± 0.148 , 0.533 ± 0.172 , 0.508 ± 0.126 และ 0.514 ± 0.116 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่า *hd* จาก เชื้อมาลาเรียจังหวัดอุบลราชธานีและตราด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.295 ± 0.156 และ 0.327 ± 0.153 ตามลำดับ ข้อมูลเหล่านี้สอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายมาลาเรียในประเทศไทยด้วยยีน *msp-3* ผลการศึกษาระบุว่า เชื้อมาลาเรียในจังหวัดแม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี และระนอง มีจำนวน 5 haplotype ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากจังหวัดอุบลราชธานีมีเพียง 3 haplotype นอกจากนี้ ยังสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายด้วยยีน *ama-1* ซึ่งพบว่า เชื้อมาลาเรียในจังหวัด แม่ฮ่องสอน และกาญจนบุรี มีรูปแบบของยีน *ama-1* เท่ากับ 7 และ 12 haplotype ตามลำดับ แต่ เชื้อมาลาเรียในจังหวัดอุบลราชธานีและตราดมีรูปแบบของยีน *ama-1* เพียง 4 และ 6 haplotype ตามลำดับ การพบว่า เชื้อมาลาเรียในแถบจังหวัดที่มีชายแดนติดกับประเทศพม่ามี ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเชื้อมาลาเรียในแถบจังหวัดที่มีชายแดนติดกับประเทศลาวและ กัมพูชาอาจเกิดจากการระบาดของเชื้อมาลาเรียในแถบจังหวัดที่มีชายแดนติดกับประเทศพม่าสูงกว่า ในแถบชายแดนติดกับประเทศลาวและกัมพูชา งานวิจัยชิ้นนี้เก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002 ถึงปี ค.ศ. 2010 ช่วงเวลาดังกล่าวจำนวนผู้ป่วยมาลาเรียจาก ประเทศพม่าพบจำนวนน้อยที่สุดตั้งแต่ 1,017,917 ราย ในปี ค.ศ. 2006 ถึงจำนวนมากที่สุด 2,017,344 ราย ในปี ค.ศ. 2010 ขณะเดียวกัน จำนวนผู้ป่วยมาลาเรียจากประเทศกัมพูชามีน้อยที่สุด ตั้งแต่ 191,169 ราย ในปี ค.ศ. 2007 ถึงจำนวนมากที่สุด 464,899 ราย ในปี ค.ศ. 2003 และจำนวน ผู้ป่วยมาลาเรียจากประเทศลาวมีน้อยที่สุดตั้งแต่ 38,773 ราย ในปี ค.ศ. 2005 ถึงจำนวนมากที่สุด 70,761 ราย ในปี ค.ศ. 2006 (World Health Organization, 2020) นอกจากนี้ การเข้ามาของ

ผู้อพยพหรือแรงงานจากประเทศเหล่านี้ ผู้อพยพอาจเป็นพาหะของเชื้อมาลาเรีย ดังรายงานผู้ติดเชื้อมาลาเรีย 621 ราย ที่คลินิกมาลาเรียในหมู่บ้านสวนอ้อย จังหวัดตาก พบว่า ผู้อพยพชาวพม่าที่เพิ่งเข้ามาอาศัยในประเทศไทยน้อยกว่า 6 เดือน เป็นโรคมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มากกว่าชาวไทยในพื้นที่ประมาณ 4 เท่า และมากกว่าผู้อพยพชาวพม่าที่เข้ามาอยู่ในประเทศไทยมากกว่า 6 เดือน 2.49 เท่า และการเก็บตัวอย่างยุงพาหะ *An. minimus* และ *An. maculatus* ในหมู่บ้านสวนอ้อยพบว่า ผู้ป่วยมาลาเรียมีความสัมพันธ์ทางลบกับอัตราการพบยุงทั้งสองชนิด แต่กลับพบผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นในช่วงเดือนธันวาคมถึงเมษายน ซึ่งเป็นฤดูเก็บเกี่ยว (Sriwichai et al., 2017) แสดงว่า การระบาดของโรคมาลาเรียจากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เป็นผลมาจากการอพยพเข้า-ออกของประชากร ขณะเดียวกันจังหวัดสระแก้ว จันทบุรีและตราด ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีชายแดนติดต่อกับประเทศกัมพูชา ได้มีการสำรวจเกี่ยวกับการอพยพเข้ามาทำงานนำประเทศไทยของแรงงานต่างด้าว รวม 1,719 ราย ผลการสำรวจเป็นที่น่าสนใจว่า ผู้อพยพประมาณหนึ่งในสามของทั้งหมดเคยเป็นโรคมาลาเรียหรือมีบุคคลใกล้ชิดเป็นโรคมาลาเรีย (Wangroongsarb et al., 2011) อย่างไรก็ตาม การศึกษา *msp-3* และ *ama-1* ยังมีข้อจำกัด เพราะไม่ได้ทำการศึกษาในจังหวัดยะลา แต่มีข้อมูลที่สอดคล้องกับงานวิจัยความหลากหลายของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* คือ ประชากรเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ชายแดนไทย-พม่า มีความหลากหลายมากกว่าประชากรในพื้นที่ชายแดนไทย-ลาว และไทย-กัมพูชา

ความหลากหลายของ haplotype ของยีน *Pfs25* จากตัวอย่างแต่ละจังหวัดที่ศึกษาแตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบและสัดส่วนของยีน *Pfs25* ด้วยการวิเคราะห์ค่า F_{st} พบว่า เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 เชื้อมาลาเรียที่อยู่ในจังหวัดทางฝั่งตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี และระนอง และกลุ่ม 2 เชื้อมาลาเรียที่อยู่ทางฝั่งตะวันออก ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี ตราด รวมทั้งจังหวัดยะลา ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษารูปแบบและการกระจายของยีน *msp-3* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จาก 5 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี ระนอง อุบลราชธานี และตราด ซึ่งพบว่า ค่า F_{st} ทำให้แบ่งเชื้อมาลาเรียเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อมาลาเรียในจังหวัดฝั่งตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี ระนอง รวมทั้งจังหวัดตราด และเชื้อมาลาเรียที่จังหวัดอุบลราชธานี (Pattaradilokrat et al., 2016) และงานวิจัยชิ้นนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษารูปแบบและการกระจาย allele ของยีน *dhfr* ในประเทศไทยจาก 11 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ตาก กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง ชุมพร ศรีสะเกษ จันทบุรี ตราด และยะลา ซึ่งพบ 10 haplotype กระจายอยู่แตกต่างกัน และ haplotype ที่มีจำนวนมากที่สุด 3 haplotype ได้แก่ SGEA, SNGA และ AGEAA ซึ่ง SGEA กระจายมากในจังหวัดฝั่งตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ตาก กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และระนอง ขณะที่ AGEAA กระจายมากในจังหวัดฝั่งตะวันออกของประเทศไทย

ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ จันทบุรีและตราด การศึกษานี้จึงสนับสนุนการแบ่งประชากรเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เป็น 2 กลุ่มประชากร นอกจากนี้ การศึกษารูปแบบและการกระจายของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ด้วย microsatellite พบว่า ประชากรเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สามารถจัดเป็นกลุ่มประชากรทางฝั่งตะวันตกและฝั่งตะวันออกของประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ข้อมูลจาก microsatellite แสดงว่า ประชากรในจังหวัดยะลามีความแตกต่างจากประชากรในพื้นที่อื่น ๆ เนื่องจากพบเพียง 1 haplotype ขณะที่ จังหวัดอื่นมี haplotype ระหว่าง 4-20 รูปแบบ (Pumpaibool et al., 2009) ผลดังกล่าวขัดแย้งกับการศึกษาโดยใช้ยีน *Pfs25* เพราะพบว่า เชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลามีความหลากหลายสูง จึงยังสรุปไม่ได้ว่า ประชากรเชื้อมาลาเรียในจังหวัดยะลาจะจัดอยู่ในฝั่งตะวันออกหรือควรแยกออกมาเป็นอีกกลุ่มประชากร ดังนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างจากภาคใต้ในพื้นที่อื่นนอกจากจังหวัดยะลา รวมถึงการใช้ยีนอื่น ๆ หรือการทำ whole genome sequencing

5.2 การอภิปรายเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลก

เมื่อทำการสืบค้นการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในฐานข้อมูล PubMed พบการศึกษาจำนวน 4 เรื่อง ซึ่งรายงานยีน *Pfs25* ที่มีลำดับเบสแบบ full-length sequence จำนวน 13 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่มาจากเชื้อมาลาเรีย wild isolate ในประเทศไทย จำนวน 5 ตัวอย่าง (Da et al., 2013) (แบ่งเป็น H1 จำนวน 4 ตัวอย่าง และ H2 จำนวน 1 ตัวอย่าง) และตัวอย่างเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยสายพันธุ์ HB3, CAMP, 7G8, LE5, LF4, GH1 และ NF54 ซึ่งมี haplotype เป็นแบบ H1 และสายพันธุ์ Dd2 ซึ่งมี haplotype เป็นแบบ H2 (Kaslow et al., 1989a) ทั้งนี้ H1 และ H2 เป็น haplotype ที่พบได้ในประเทศไทย นอกจากนี้ พบรายงานยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรียอีกจำนวน 36 และ 203 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากประเทศบราซิล กินีฟาโซ และอินเดีย ตามลำดับ แต่ข้อมูลเหล่านี้มีลำดับเบสแบบ partial sequence หรือไม่มีการระบุชื่อสายพันธุ์ที่ชัดเจน จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียจากประเทศไทยได้ (Kaur et al., 2017; Patel et al., 2017)

อย่างไรก็ดี นอกจากข้อมูลที่มีการรายงานใน PubMed แล้ว ยังมีข้อมูลลำดับเบสของยีน *Pfs25* แบบ full-length sequence ที่พบในฐานข้อมูล GenBank และ PlasmoDB จำนวน 36 ตัวอย่าง และ 202 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตัวอย่างเหล่านี้เป็นตัวอย่างจากประเทศอื่นจำนวน 21 ประเทศ เมื่อรวมกับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการตีพิมพ์จำนวน 6 ตัวอย่าง (Da et al., 2013; Wang et al., 2000) และตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากงานวิจัยชิ้นนี้ จำนวน 83 ตัวอย่าง จะมี

ตัวอย่างทั้งหมด 327 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามพบสายพันธุ์เชื่อมมาลาเรียที่ซ้ำกันในฐานข้อมูล GenBank และ PlasmoDB และสายพันธุ์ในฐานข้อมูล GenBank ที่ซ้ำกับสายพันธุ์เชื่อมมาลาเรียของงานวิจัยชิ้นนี้ จำนวน 19 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังนั้น ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* จากเชื่อมมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ที่แตกต่างกันจากทั่วโลกจำนวน 307 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่างานวิจัยชิ้นนี้ได้รวบรวมฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื่อมมาลาเรีย *P. falciparum* ชิ้นเป็นครั้งแรกของโลก

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างในฐานข้อมูลสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างจากประเทศในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ตัวอย่างจากประเทศในทวีปแอฟริกา และตัวอย่างจากประเทศในทวีปเอเชีย รายละเอียด ดังนี้

เชื่อมมาลาเรียจำนวน 29 ตัวอย่าง ในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้มาจาก 4 ประเทศ ได้แก่ ประเทศเอลซัลวาดอร์ ฮอนดูรัส เฟรนช์เกียนา และบราซิล จำนวน 1, 1, 23 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบ 3 haplotype ได้แก่ H1, H2 และ H9 โดย H1 และ H2 เป็น haplotype ที่สามารถพบได้ในประเทศไทย ในขณะที่ H9 พบได้เฉพาะในประเทศบราซิล

เชื่อมมาลาเรียจากทวีปแอฟริกาจำนวน 173 ตัวอย่าง จาก 10 ประเทศ ได้แก่ ประเทศเซเนกัล แกมเบีย กินี กานา โตโก มาลี ชูดาน คองโก ยูกันดา และเคนยา จำนวน 66, 65, 1, 1, 1, 24, 1, 1, 11 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ และเชื่อมมาลาเรียสายพันธุ์ 3D7 ซึ่งไม่ทราบแหล่งที่มาสามารถแบ่งออกได้ 3 haplotype ได้แก่ H1, H8 และ H10 โดย H1 เป็น haplotype ที่พบได้ในประเทศไทย ขณะที่ H8 และ H10 พบได้เฉพาะในประเทศแกมเบีย และเซเนกัล ตามลำดับ

เชื่อมมาลาเรียจากทวีปเอเชียจำนวน 105 ตัวอย่าง จากประเทศไทยจำนวน 89 ตัวอย่าง และประเทศอื่น ๆ ในทวีปเอเชียจำนวน 7 ประเทศ ได้แก่ ประเทศอินเดีย จีน ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย และฟิลิปปินส์จำนวน 2, 2, 1, 5, 4, 1 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เชื่อมมาลาเรียในทวีปเอเชียนอกจากประเทศไทยแบ่งรูปแบบของยีน *Pfs25* ได้เป็น 4 haplotype ได้แก่ H1, H2, H3 และ H11 โดย H1, H2 และ H3 เป็น haplotype ที่พบในประเทศไทย แต่ H11 พบได้เฉพาะประเทศเวียดนาม

ดังนั้น จากฐานข้อมูลเหล่านี้สรุปได้ว่า ยีน *Pfs25* ของเชื่อมมาลาเรีย *P. falciparum* มีจำนวน 11 haplotype โดย H1 ถึง H7 เป็น haplotype ที่พบในประเทศไทย ขณะที่ H8, H9, H10 และ H11 เป็น haplotype ใหม่ที่มีการรายงานเป็นครั้งแรกและไม่พบในประเทศไทย

เมื่อวิเคราะห์สัดส่วน haplotype แต่ละชนิดพบว่า H1 มีจำนวนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 70 ส่วน H2 มีจำนวนรองลงมา คือ ร้อยละ 22 และอีก 9 haplotype มีจำนวนรวมกัน ร้อยละ 8 ข้อมูลแสดงให้เห็นว่า H1 เป็น haplotype หลักของยีน *Pfs25* อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์สัดส่วน haplotype ของเชื่อมมาลาเรียแต่ละทวีป พบว่า haplotype หลักที่พบต่างกัน กล่าวคือ H1 มีสัดส่วน

มากที่สุดในการเชื่อมาลาเรียจากทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และแอฟริกา คิดเป็นร้อยละ 90 และ 98 ตามลำดับ แต่ H2 มีสัดส่วนมากที่สุดในตัวอย่างจากทวีปเอเชีย คือ ร้อยละ 63 ส่วน H1 มีจำนวนรองลงมา ร้อยละ 19 เช่นเดียวกันกับประเทศไทยซึ่งพบ H2 มากที่สุด และ H1 มีจำนวนรองลงมา ร้อยละ 68 และ 15 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปรากฏว่า ปัจจุบันยังไม่พบข้อมูลหรือการศึกษารายละเอียดว่า เหตุใดเชื่อมาลาเรียแต่ละทวีปมี haplotype หลักของยีน *Pfs25* แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้ ทำการทดสอบความจำเพาะของ H1 และ H2 กับยุงพาหะมาลาเรียจาก 3 ทวีป คือ ทวีปอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย ได้แก่ ยุง *An. albimanus*, *An. gambiae* และ *An. dirus* ตามลำดับ ด้วยเทคนิค membrane feeding assay และชุดควบคุม คือ เชื่อมาลาเรียที่ไม่มียีน *Pfs25* แล้วติดตามผลว่า เชื่อมาลาเรีย H1 และ H2 สามารถสร้าง oocyst ในยุงทั้งสามชนิดได้หรือไม่ และถ้าสร้างได้ จะพบจำนวน oocyst จากเชื่อมาลาเรีย H1 และ H2 ในทวีปใดสูงสุดและต่ำสุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม การทดลองลักษณะนี้เคยมีรายงานไว้เพื่อติดตามความจำเพาะของยีน *Pfs47* ของเชื่อมาลาเรียจาก 3 ประเทศ คือ ประเทศเซเนกัล กัมพูชา และบราซิล กับยุง 3 ชนิด คือ *An. albimanus*, *An. gambiae* และ *An. dirus* ซึ่งได้นำเชื่อมาลาเรียจากแต่ละประเทศให้กับยุงแต่ละทวีป ด้วยเทคนิค membrane feeding assay พบว่า ยีน *Pfs47* ของเชื่อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกาและเอเชียมีความจำเพาะกับยุง *An. gambiae* และ *An. dirus* ตามลำดับ แต่เชื่อมาลาเรียจากทวีปอเมริกาสามารถทำให้ยุงทั้ง 3 ชนิดติดเชื้อได้ (Molina-Cruz et al., 2015)

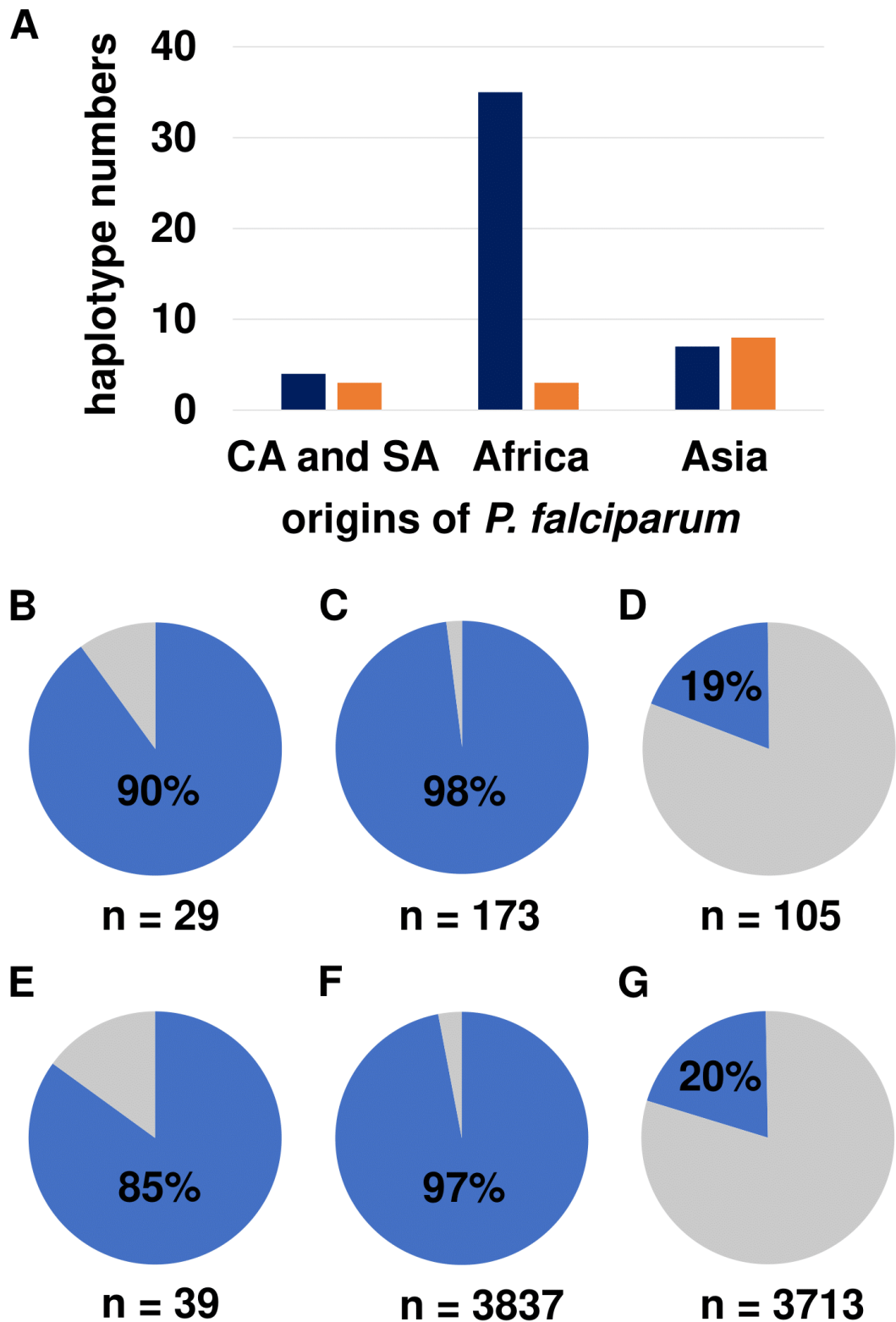
เนื่องจากจำนวน haplotype และตัวอย่างของยีน *Pfs25* ที่พบใน 3 ทวีปทั่วโลกแตกต่างกัน ทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชีย พบจำนวน 3, 3 และ 8 haplotype ตามลำดับ ขณะเดียวกัน ตัวอย่างจาก 3 ทวีป มีจำนวน 29, 173 และ 105 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังนั้น เพื่อทำการเปรียบเทียบความหลากหลายของ haplotype จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ค่า haplotype diversity หรือค่า *hd* ซึ่งพบว่า มีค่าเท่ากับ 0.197 ± 0.095 , 0.034 ± 0.019 และ 0.564 ± 0.049 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายของเชื่อมาลาเรียในทวีปเอเชียสูงที่สุด รองลงมา คือ เชื่อมาลาเรียในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และความหลากหลายของเชื่อมาลาเรียในทวีปแอฟริกาต่ำที่สุด แม้ว่า จำนวน haplotype จากทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และแอฟริกาจะเท่ากัน คือ 3 haplotype ก็ตาม แต่จำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน

อย่างไรก็ดี การศึกษาความหลากหลายของยีนสร้างแอนติเจนจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *CeITOS*, *Pfs48/45*, *Pfs47* และ *ama-1* จากเชื่อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 218, 44, 334 และ 740 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งได้มาจากเชื่อมาลาเรียใน 3 ทวีป ได้แก่ ทวีปอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย แสดงให้เห็นว่า เชื่อมาลาเรียในทวีปแอฟริกามีความหลากหลายของ haplotype ของยีนทั้ง 4 ยีน สูงกว่าเชื่อมาลาเรียในทวีปเอเชีย ขณะที่เชื่อมาลาเรียในทวีปเอเชียมีความหลากหลายของยีนทั้ง 4 ยีน สูงกว่าในทวีปอเมริกา (ตารางที่ S1 S2 S3 และ S4) ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า เชื่อมาลาเรียในทวีป

แอฟริกามีความหลากหลายมากที่สุด ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาของยีน *Pfs25* การพบว่า ความหลากหลายของ haplotype ของเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกามีมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทวีปอื่น เป็นผลมาจากการระบาดของเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกาสูงที่สุด จากรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรียและผู้เสียชีวิตจากโรคมมาลาเรียทั่วโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 ถึงปี ค.ศ. 2019 เท่ากับ 1.5 พันล้านราย และ 7.6 ล้านราย ตามลำดับ ในจำนวนนี้ เป็นผู้ติดเชื้อมาลาเรียและผู้เสียชีวิตจากทวีปแอฟริการ้อยละ 81.8 และ 94.1 ตามลำดับ ขณะที่ผู้ติดเชื้อมาลาเรียและเสียชีวิตในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้คิดเป็นร้อยละ 10.1 และ 3.0 ตามลำดับ และผู้ติดเชื้อมาลาเรียและเสียชีวิตในทวีปอเมริกามีเพียงร้อยละ 1.1 และ 0.1 ตามลำดับ (World Health Organization, 2020) จะเห็นว่าเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกามีการระบาดมากกว่าทวีปอื่น ๆ ทำให้เชื้อมาลาเรียมีโอกาสเกิด recombination ได้สูงขึ้นตามด้วย และทำให้พบความหลากหลายของรูปแบบยีนสร้างแอนติเจนได้มากกว่าพื้นที่ทวีปอื่น

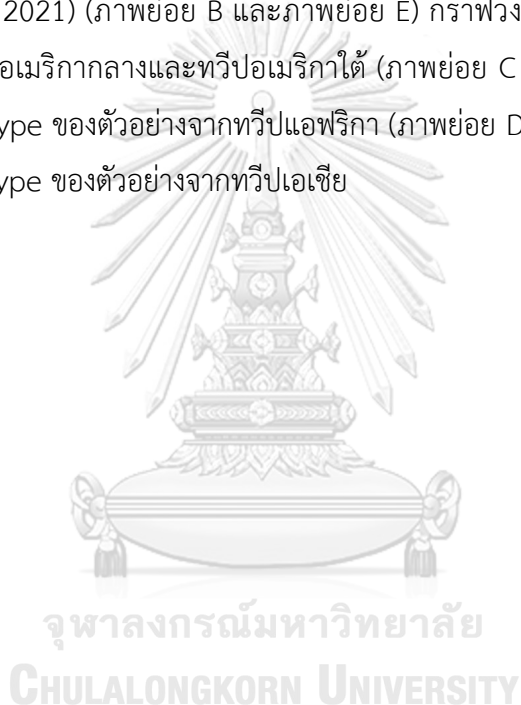


นอกจากนี้ การศึกษาความหลากหลายระดับจีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลก จำนวน 7,589 isolate (MalariaGEN et al., 2021) แสดงให้เห็นว่า เชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกา มีความหลากหลายสูงกว่าเชื้อมาลาเรียจากทวีปเอเชีย และอเมริกากลางและอเมริกาใต้ (ภาพที่ 21A) เนื่องจากจำนวน haplotype ของยีน *Pfs25* ที่เป็นไปได้ของตัวอย่างจากทวีปแอฟริกา มีจำนวนสูงกว่า 34 haplotype ขณะที่ haplotype ของเชื้อมาลาเรียจากทวีปเอเชีย และอเมริกากลางและอเมริกาใต้มีจำนวน 7 และ 3 haplotype ตามลำดับ ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยชิ้นนี้ที่พบว่า ความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียจากทวีปเอเชียมีมากที่สุด อย่างไรก็ตาม สัดส่วนของ haplotype 1 ของเชื้อมาลาเรียแต่ละทวีปสอดคล้องกัน คือ ประชากรเชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกา มากกว่าร้อยละ 97 ของทั้งสองการศึกษาจัดเป็น haplotype 1 (ภาพที่ 21C และ 21F) เช่นเดียวกับกับสัดส่วน haplotype 1 ของเชื้อมาลาเรียจากทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ที่พบมากกว่าร้อยละ 85 (ภาพที่ 21B และ 21E) ขณะที่สัดส่วน haplotype 1 จากงานวิจัยชิ้นนี้และการศึกษาความหลากหลายระดับจีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 7,589 isolate พบร้อยละ 19 และ 20 ตามลำดับ (ภาพที่ 21D และ 21G) แสดงให้เห็นว่า จำนวน haplotype ของเชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกาควรมีมากที่สุด ดังนั้น หากต้องการข้อมูลความหลากหลายของยีน *Pfs25* จากประชากรเชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกาที่แท้จริงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกาให้มีจำนวนมากกว่า 3,800 ตัวอย่าง และนำมาวิเคราะห์ผล อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบสัดส่วน haplotype 1 จากตัวอย่างทั้ง 3 ทวีปสอดคล้องกัน และสามารถใช้ในการทำนายสัดส่วน haplotype 1 ของเชื้อมาลาเรียตามแต่ละทวีปเมื่อมีการเก็บตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เพิ่มเติมในอนาคต



ภาพที่ 21 จำนวนและสัดส่วน haplotype ของยีน *Pfs25* ของงานวิจัยชิ้นนี้เทียบกับข้อมูลการศึกษาความหลากหลายระดับจีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 7,589 isolate ทั่วโลก

(ภาพย่อย A) กราฟจำนวน haplotype ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ใน 3 ทวีป ได้แก่ ทวีปอเมริกากลาง (CA) และอเมริกาใต้ (SA) ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย กราฟสีน้ำเงินแทนจำนวน haplotype จากการศึกษาความหลากหลายระดับจีโนมของ *P. falciparum* จำนวน 7,589 isolate ทั่วโลก (MalariaGEN et al., 2021) กราฟสีส้มแทนจำนวน haplotype จากงานวิจัยชิ้นนี้ (ภาพย่อย B ถึง G) กราฟวงกลมแสดงสัดส่วนของ haplotype ของยีน *Pfs25* พื้นที่สีฟ้าแสดงสัดส่วนของ haplotype 1 พื้นที่สีเทาแสดงสัดส่วนของ non-haplotype 1 (ภาพย่อย B ถึง D) กราฟวงกลมแสดงสัดส่วน haplotype จากการศึกษาชิ้นนี้ (ภาพย่อย E ถึง G) กราฟวงกลมแสดงสัดส่วน haplotype จากการศึกษาความหลากหลายระดับจีโนมของ *P. falciparum* จำนวน 7,589 isolate (MalariaGEN et al., 2021) (ภาพย่อย B และภาพย่อย E) กราฟวงกลมแสดงสัดส่วน haplotype ของตัวอย่างจากทวีปอเมริกากลางและทวีปอเมริกาใต้ (ภาพย่อย C และภาพย่อย F) กราฟวงกลมแสดงสัดส่วน haplotype ของตัวอย่างจากทวีปแอฟริกา (ภาพย่อย D และภาพย่อย G) กราฟวงกลมแสดงสัดส่วน haplotype ของตัวอย่างจากทวีปเอเชีย



จากผลการศึกษาความหลากหลาย haplotype ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลก พบว่า ความหลากหลายของยีนจากเชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชียมีมากที่สุด รองลงมา คือ เชื้อมาลาเรียจากทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และเชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกา มีความหลากหลายของ haplotype ต่ำที่สุด จะเห็นว่า ผลของงานวิจัยชิ้นนี้ขัดแย้งกับการศึกษาความหลากหลายของ 4 แอนติเจนก่อนหน้า และการศึกษาความหลากหลายระดับจีโนมของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จากทั่วโลก (MalariaGEN et al., 2021) แต่ยังไม่พบการศึกษาที่อธิบายถึงความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชียซึ่งมากกว่าในทวีปแอฟริกา อย่างไรก็ตาม ความหลากหลายของเชื้อมาลาเรียที่พบในงานวิจัยชิ้นนี้ อาจเป็นผลมาจากจำนวนชนิดของยุงพาหะมาลาเรียในพื้นที่ทวีปเอเชียมากกว่าทวีปอื่น เนื่องจาก *Pfs25* เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อมาลาเรียในระยะที่อยู่ในยุง ตั้งแต่ระยะ macrogamete zygote ไปจนถึง ookinete (Vermeulen et al., 1985) *Pfs25* จะจับกับโปรตีน laminin ของเซลล์ epithelium ของยุง (Sharma, 2008; Vlachou et al., 2001) ซึ่งจะทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถแทรกผ่านผนังของกระเพาะอาหารเพื่อสร้าง oocyst ได้ ดังนั้น รูปแบบของยีน *Pfs25* ที่ปรากฏอยู่ในประชากรจึงถูกคัดเลือกด้วยโปรตีน laminin หากจำนวนชนิดของยุงเพิ่มขึ้น ความหลากหลายของโปรตีน laminin จึงเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะส่งผลต่อความหลากหลายของยีน *Pfs25* จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการสร้างแผนที่ยุงกระจายของยุง *Anopheles* ชนิดที่เป็นพาหะหลักของเชื้อมาลาเรียจากทั่วโลก จำนวน 41 ชนิด พบว่า ยุงกระจายต่างกันในแต่ละทวีป และแบ่งกลุ่มยุงออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ยุงในกลุ่มทวีปอเมริกา ยุงในกลุ่มทวีปยุโรปและเอเชียกลาง ยุงในกลุ่มทวีปแอฟริกา และยุงในกลุ่มทวีปเอเชีย และพบว่า จำนวนชนิดของยุง *Anopheles* ในกลุ่มทวีปเอเชียมีมากที่สุด คือ 19 ชนิด ขณะที่ยุงในกลุ่มทวีปอเมริกาและกลุ่มทวีปแอฟริกามีจำนวน 9 และ 7 ชนิด ตามลำดับ (Sinka et al., 2012) ในการศึกษาความหลากหลายของยีน *Pfs25* ซึ่งพบเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในทวีปแอฟริกามีความหลากหลายต่ำที่สุดนั้น เกิดจากการพบ H1 มากถึงร้อยละ 98 แต่พบ H8 และ H10 เพียงร้อยละ 1 เท่านั้น การพบสัดส่วน haplotype ลักษณะนี้ อาจเป็นผลมาจากการเกิด haplotype ใหม่ ๆ ไม่เหมาะสมกับเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกาจึงทำให้เชื้อมาลาเรียที่มี haplotype ใหม่ ๆ เหล่านั้น ถูกกำจัดออกไปจากประชากร อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการศึกษาสำหรับอธิบายถึงผลของ haplotype อื่น ๆ กับการอยู่รอดของเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา ดังนั้น จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้ ทำการทดสอบความสามารถการจับกันของโปรตีน *Pfs25* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกับ 8 haplotype ที่ไม่พบในเชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกา ได้แก่ H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9 และ H11 กับโปรตีน laminin ของยุง *An. gambiae* ซึ่งเป็นยุงพาหะหลักในทวีปแอฟริกาด้วยเทคนิค bioluminescence resonance energy transfer (BRET) (Pfleger et al., 2006) ชุดควบคุม คือ โปรตีน *Pfs25* ซึ่งมี

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ H1 แล้วติดตามผลว่า โปรตีน Pfs25 ทั้ง 8 haplotype สามารถจับกับ โปรตีน laminin ของยุงได้เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไรกับ H1

เนื่องจากรูปแบบและสัดส่วน haplotype ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่พบใน 3 ทวีป คือ ทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แตกต่างกัน อาจส่งผลให้เกิดการแยกกันของประชากรเชื้อมาลาเรีย จึงได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบและสัดส่วน haplotype ด้วยค่า F_{st} พบว่า ประชากรเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั้ง 3 ทวีป มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 เชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชีย กลุ่ม 2 เชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา และกลุ่ม 3 เชื้อมาลาเรียในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ การแบ่งประชากรเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เป็นกลุ่มตามทวีป สอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของ 2 ยีน ได้แก่ ยีน *msh-3* และ *csp* จากการศึกษาวิเคราะห์ค่า F_{st} ของยีน *msh-3* ซึ่งทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 1,356 ตัวอย่าง จาก 9 ประเทศทั่วโลก ได้แก่ ประเทศไทย ไนจีเรีย สาธารณรัฐคองโก แคมeroon กานา บูร์กินาฟาโซ เซเนกัล อิหร่าน และเปรู พบว่า สัดส่วนอัลลีลของยีน *msh-3* ของเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยแตกต่างกับเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกาและประเทศเปรู นอกจากนี้ สัดส่วนอัลลีลของยีน *msh-3* ของเชื้อมาลาเรียในประเทศเปรูก็แตกต่างกับเชื้อมาลาเรียที่พบในทวีปแอฟริกาและประเทศไทย แต่ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบอัลลีลในเชื้อมาลาเรียใน 7 ประเทศจากทวีปแอฟริกา (รวมประเทศอิหร่าน) (ตารางที่ S5) เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ค่า F_{st} ของยีน *csp* จากจำนวน 2,296 ตัวอย่าง ใน 4 ทวีป ได้แก่ ทวีปเอเชีย แอฟริกา อเมริกา และโอเชียเนีย รวม 24 ประเทศ พบว่า สัดส่วนอัลลีลของยีน *csp* จากเชื้อมาลาเรียในทวีปเอเชียแตกต่างกับเชื้อมาลาเรียจากทวีปแอฟริกา อเมริกา และโอเชียเนีย ในลักษณะเดียวกัน สัดส่วนอัลลีลของยีน *csp* จากเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกาก็แตกต่างกับเชื้อมาลาเรียจากทวีปเอเชีย อเมริกา และโอเชียเนีย นอกจากนี้ สัดส่วนอัลลีลของยีน *csp* จากเชื้อมาลาเรียในทวีปอเมริกาและโอเชียเนียยังแตกต่างกับเชื้อมาลาเรียจากทวีปเอเชียและแอฟริกา รวมทั้งสัดส่วนอัลลีลของเชื้อมาลาเรียจากทวีปอเมริกาและโอเชียเนียเองก็แตกต่างกัน (ตารางที่ S6) จะเห็นได้ว่า ข้อมูลสัดส่วนของอัลลีลของยีน *Pfs25*, *msh-3* และ *csp* มีรูปแบบและการกระจายที่แตกต่างกันในเชื้อมาลาเรียในแต่ละทวีป ดังนั้น ข้อมูลความหลากหลายของยีนสร้างแอนติเจนในเชื้อมาลาเรียเหล่านี้ ทำให้ทราบว่าเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* แต่ละทวีปมีการแยกกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน และทำให้เข้าใจว่า รูปแบบอัลลีลในแต่ละทวีปเป็นรูปแบบที่จำเพาะ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการนำไปศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนต่าง ๆ ในอนาคต

การศึกษาความหลากหลายของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลก สรุปได้ว่า ยีน *Pfs25* มีทั้งหมด 11 haplotype ซึ่งเชื้อมาลาเรียแต่ละพื้นที่ทั่วโลกมีความหลากหลายที่ต่างกัน haplotype เด่นของเชื้อมาลาเรียจากทวีปอเมริกาและแอฟริกาเป็นคนละ haplotype เด่นกับเชื้อมาลาเรียจากทวีปเอเชีย และความแตกต่างนี้ทำให้สามารถแบ่งประชากรเป็น 3 กลุ่มย่อยตาม

ทวีป จากงานวิจัยชิ้นนี้ จึงสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลของการออกแบบเพื่อพัฒนาแอนติเจน Pfs25 สำหรับเป็น transmission-blocking vaccine ซึ่งใช้ได้กับประชากรเชื้อมาลาเรียในแต่ละพื้นที่ทั่วโลกได้ในอนาคต

5.3 การอภิปรายเกี่ยวกับความหลากหลายระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

จากการสืบค้นข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน *Pfs25* ในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในฐานข้อมูล PubMed พบ 2 การศึกษา ซึ่งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแบบ full-length sequence หรือมีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 654 คู่เบส (Da et al., 2013; Kaslow et al., 1989a) จำนวนรวม 13 ตัวอย่าง แบ่งได้เป็น 2 haplotype คือ H1 และ H2 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 haplotype มาเปรียบเทียบกัน พบนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน (SNPs) ณ ตำแหน่งที่ 392 ประกอบด้วยเบส 2 รูปแบบ ได้แก่ G พบใน H1 จำนวน 11 ตัวอย่าง และ C พบใน H2 จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน Gly และ Ala ณ ตำแหน่ง 131 ของโปรตีน Pfs25 ตามลำดับ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทย และจาก 3 ฐานข้อมูล คือ PubMed GenBank และ PlasmoDB มีตัวอย่างเชื้อมาลาเรียรวมกัน 307 ตัวอย่าง แบ่งออกได้เป็น 11 haplotype คือ H1 ถึง H11 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 11 haplotype มาเปรียบเทียบกัน พบ SNPs จำนวน 10 ตำแหน่ง ในจำนวนนี้ ตำแหน่ง ได้แก่ 117, 226, 333, 412, 428, 433, 519, 561 และ 651 พบเป็นครั้งแรกในงานวิจัยชิ้นนี้ นิวคลีโอไทด์ทั้ง 10 ตำแหน่ง ประกอบด้วยเบสเพียง 2 รูปแบบเท่านั้น การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบ H1 ด้วย H5, H6 และ H10 ได้แก่ T117C, G333A และ A519G ตามลำดับ ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (sSNPs) ขณะที่การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ 7 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบ H1 ด้วย H2, H3, H4, H5, H7, H8, H9 และ H11 ได้แก่ G226A, G392C, G412A, T428C, G433A, T561A และ G651A ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (nsSNPs) ได้แก่ Asp76Asn, Gly131Ala, Gly138Ser, Val143Ala, Asp145Asn, Asn187Lys, และ Met217Ile ตามลำดับ การพบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสเพิ่มเติมจาก 2 การศึกษาในฐานข้อมูล PubMed (Da et al., 2013; Kaslow et al., 1989a) แสดงให้เห็นว่า นิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียทั่วโลกมีความหลากหลาย และข้อมูลนี้นำไปใช้พัฒนาแอนติเจน Pfs25 ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ haplotype ทั้ง 11 รูปแบบได้

จากงานวิจัยชิ้นนี้ SNPs ส่วนใหญ่กระจายอยู่บนบริเวณโดเมนที่ 3 มากที่สุด พบจำนวน 5 ตำแหน่ง ในขณะที่ SNPs ที่เหลือพบกระจายอยู่ในโดเมนที่ 1, 2, 4 และ anchor sequence จำนวน

2, 1, 1, 1 ตำแหน่ง ตามลำดับ ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่า SNPs เหล่านี้จะส่งผลทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือเปลี่ยนแปลงการทำงาน หรือส่งผลกับการจับกับแอนติบอดีที่มาจากวัคซีนหรือไม่ จากการทำนายรูปร่างทุติยภูมิของโปรตีน Pfs25 ด้วย JPred4 server พบว่า SNPs ทุกตำแหน่งยกเว้นที่ตำแหน่ง 392 ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ส่วนตำแหน่ง 392 บนโดเมนที่ 3 นั้น ผลการทำนายส่วนใหญ่พบว่าตำแหน่งนี้มีโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet แต่ใน H4 และ H11 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 0.65 ของจำนวนเชื้อทั้งหมดมีโครงสร้างโปรตีนเป็น coil เพราะฉะนั้น หากพิจารณาถึงความถี่ของแต่ละ haplotype ที่พบและรูปร่างของโปรตีนพร้อม ๆ กัน จะเห็นว่าโปรตีน Pfs25 จำนวน 9 haplotype ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 99.35 มีรูปร่างแบบเดียวกัน นั้นแสดงให้เห็นว่า SNPs ที่พบภายในยีน *Pfs25* น่าจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทางโปรตีนน้อยมาก ในอนาคตจำเป็นต้องพิสูจน์ด้วยวิธีการอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น การศึกษาด้วยแบบจำลอง ด้วยเทคนิค molecular dynamics simulation (Mortier et al., 2015) ด้วยการนำโครงสร้าง Pfs25 รูปแบบ H1 ที่จับกับแอนติบอดีในฐานข้อมูล Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) มาสร้าง mutation ณ ตำแหน่งกรดอะมิโน 131 จาก Gly เป็น Ala และตรวจสอบการจำลองว่ารูปร่างของโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างไร หรือทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิค X-ray crystallography เช่นในการศึกษาของ Scally และคณะ (2017) พบว่า บริเวณของ Pfs25 ที่จับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Pfs25 มี 2 บริเวณ ได้แก่ โดเมนที่ 3 ของ Pfs25 แอนติบอดีส่วนใหญ่ร้อยละ 80 จะจับส่วนนี้ และบริเวณที่ 2 ประกอบด้วย epitope ที่กระจายอยู่ทั้ง 4 โดเมน งานวิจัยข้างต้น แอนติเจน Pfs25 เป็น H1 ดังนั้น จึงอาจใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแอนติบอดีกับ haplotype อื่น ๆ ได้

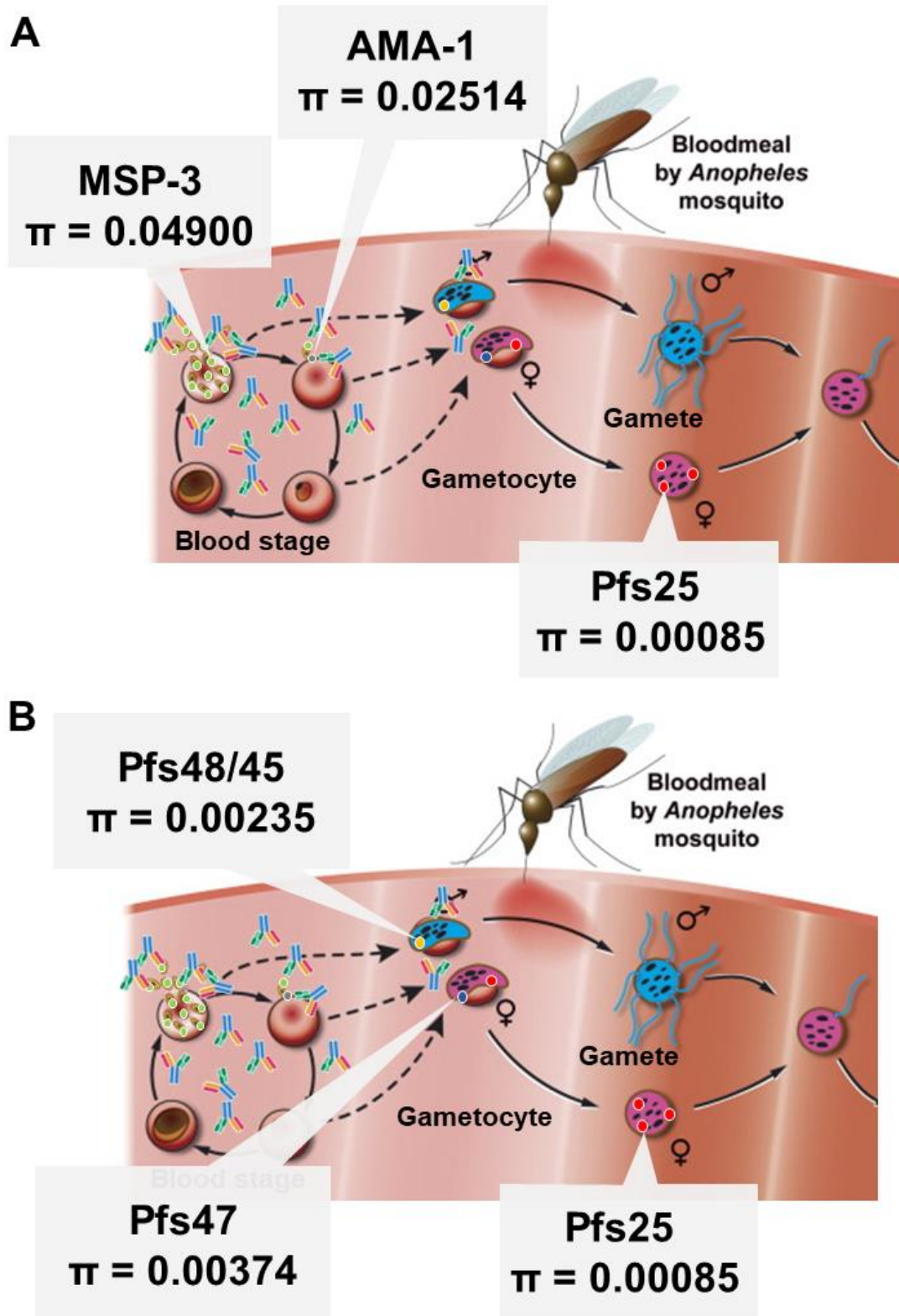
ทั้งนี้ การที่ SNPs เหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนน้อยมากน่าจะเป็นผลมาจากกระบวนการ negative selection จากผลทดสอบการคัดเลือกโดยใช้ธรรมชาติ ด้วย 4 สถิติ ได้แก่ Tajima's D test, Fu and Li's D^* test, Fu and Li's F^* test และอัตราส่วน d_N-d_S ให้ผลตรงกันว่า ยีน *Pfs25* ไม่ได้ถูกคัดเลือกไว้ด้วยกระบวนการ positive selection เนื่องจาก 2 สถิติ ได้แก่ Fu and Li's D^* test และ Fu and Li's F^* test มีค่าน้อยกว่าศูนย์อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ค่า Tajima's D test และอัตราส่วน d_N-d_S ที่ได้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จะเห็นว่า สถิติที่ใช้ยังสรุปไม่ได้ว่า SNPs ที่พบถูกคัดเลือกด้วย negative selection หรือเกิดแบบ neutrality อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Pfs25 พบว่า SNPs ที่เกิดขึ้นเกือบทั้งหมดไม่ส่งผลให้โครงสร้างทุติยภูมิเปลี่ยนแปลง ส่วน SNPs ที่ถูกทำนายว่าส่งผลให้โครงสร้างทุติยภูมิเปลี่ยนแปลงก็พบจำนวนน้อยมาก เพียงร้อยละ 0.65 แสดงว่า โปรตีน Pfs25 ถูกคัดเลือกไว้ด้วย negative selection นอกจากนี้ การศึกษาเกี่ยวกับการจับกันระหว่างโปรตีนใน family เดียวกันกับ Pfs25 กับโปรตีน laminin ในยุงพาหะ ด้วยเทคนิค yeast two-hybrid พบว่า โดเมนที่ 1 และ 4 ของโปรตีน

P25 ในเชื้อมาลาเรีย *P. berghei* จะจับกับโปรตีน laminin $\gamma 1$ ของยุง *An. gambiae* (Sharma, 2008; Vlachou et al., 2001) สอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ที่พบตำแหน่ง SNPs บริเวณโดเมนที่ 1 และ 4 เพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น เนื่องจาก Pfs25 และ P25 จัดอยู่ใน family เดียวกัน จึงคาดได้ว่า Pfs25 จะจับกับโปรตีนของยุงลักษณะเดียวกัน จากผลการทำนายว่าโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Pfs25 มีโครงสร้างทุติยภูมิเหมือนกันเกือบทั้งหมด และพบว่าโปรตีน Pfs25 มีบริเวณจับกับโปรตีน laminin ในยุง จึงสรุปได้ว่า SNPs ที่พบถูกคัดเลือกไว้ด้วยกระบวนการ negative selection

การพัฒนาแอนติเจน Pfs25 เป็น transmission-blocking vaccine ได้เริ่มขึ้นเพราะพบว่าแอนติบอดี Pfs25 สามารถยับยั้งการพัฒนาของ ookinete และการสร้าง oocyst ได้ (Vermeulen et al., 1985) จากนั้นพบรายงานเกี่ยวกับการพัฒนาแอนติเจนเพื่อสร้างวัคซีน Pfs25 มาตลอด (Goodman et al., 2011; W.-C. Huang et al., 2020; Kaslow et al., 1994; Kumar et al., 2014; Li et al., 2016; Sala et al., 2018; Talaat et al., 2016; Wu et al., 2008; Zou et al., 2003) แอนติเจน Pfs25 ส่วนใหญ่ได้จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* strain 3D7 หรือเป็น H1 ปัจจุบัน วัคซีน Pfs25 ได้มีการทดสอบทางคลินิกกับมนุษย์ในระยะที่ 1 แล้ว ดังจะเห็นได้จากการศึกษาความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีน ChAd63/MVA Pfs25-IMX313 ที่ฉีดให้กับอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 22 ราย พบว่า อาสาสมัครสร้างแอนติบอดีตอบสนองและไม่แสดงอาการต่อต้านวัคซีนที่รุนแรง การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่สร้างด้วยเทคนิค standard membrane feeding assay (SMFA) พบว่า วัคซีนส่งผลให้จำนวน oocyst ลดลง (Graaf et al., 2021) และการศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีน Pfs25-EPA/Alhydrogel ฉีดให้กับอาสาสมัครสุขภาพดี 23 ราย พบว่า อาสาสมัครสร้างแอนติบอดีตอบสนองกับวัคซีน ส่วนอาการข้างเคียงของการฉีดวัคซีนมีน้อยถึงปานกลาง และเมื่อนำแอนติบอดี Pfs25 ไปทดสอบประสิทธิภาพด้วย standard membrane feeding assay พบว่า สามารถยับยั้งการเกิด oocyst ได้ร้อยละ 20 (Talaat et al., 2016) เนื่องจาก วัคซีน Pfs25 ที่กำลังถูกทดสอบและพัฒนาเป็นรูปแบบเดียวกัน H1 และเป็นรูปแบบเดียวกับแอนติเจนที่ใช้ศึกษาการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี Pfs25 (Sally et al., 2017) จะเห็นว่า วัคซีน Pfs25 ที่ทดลองและพัฒนาอยู่สามารถใช้ได้กับเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกา และอเมริกากลางและอเมริกาใต้ เนื่องจาก H1 พบกระจายอยู่มากที่สุดทั้ง 2 ทวีป คิดเป็นร้อยละ 98 และ 90 ตามลำดับ อีกทั้ง จากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ Pfs25 แสดงให้เห็นว่า วัคซีน Pfs25 จะใช้กับ haplotype อื่น ๆ ในทวีปแอฟริกา (H8 และ H10) และทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ (H2 และ H9) ขณะเดียวกันกับในทวีปเอเชีย วัคซีน Pfs25 จะใช้ได้กับเชื้อมาลาเรียเกือบทั้งหมด แม้ว่าในทวีปเอเชียมี H2 กระจายอยู่มากที่สุดก็ตาม เพราะผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิชี้ให้เห็นว่า H2 มีโครงสร้างทุติยภูมิเหมือนกับ H1 และ haplotype อื่น ๆ (H3,

H5, H6 และ H7) แสดงให้เห็นว่า วัคซีน Pfs25 ที่กำลังมีการพัฒนาในปัจจุบันสามารถใช้ได้กับประชากรเกือบทั้งหมดของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลก

การใช้วัคซีน Pfs25 ในการควบคุมโรคมาลาเรียอาจมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้วัคซีนที่ผลิตจากแอนติเจนระยะอื่น เนื่องจาก ยีน *Pfs25* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมาก โดยค่า nucleotide diversity index (π) ค่าเท่ากับ 0.00085 ± 0.00007 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกของแอนติเจนในระยะ erythrocytic stage ได้แก่ ยีน *msp-3* และ ยีน *ama-1* ซึ่งมีค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.04900 และ 0.02514 (ภาพที่ 22A) (Pattaradilokrat et al., 2016; Wang et al., 2019) และในระยะ pre-erythrocytic stage ได้แก่ *csp* บริเวณ Th2R และ Th3R มีค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.07917 และ 0.06179 ตามลำดับ (Escalante et al., 2002) นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกในระยะ gametocyte เช่น ยีน *Pfs47* และยีน *Pfs48/45* ซึ่งมีค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.00374 และ 0.00235 ตามลำดับ (ภาพที่ 22B) (Barry et al., 2009; Molina-Cruz et al., 2015) แสดงให้เห็นว่า ยีนที่แสดงออกในระยะ gametocyte มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ดังนั้น transmission-blocking vaccine จึงอาจนำไปใช้ในการควบคุมมาลาเรียได้มีประสิทธิภาพมากกว่า vaccine ระยะอื่น ๆ



ภาพที่ 22 ค่า nucleotide diversity (π) ของแอนติเจนที่พบในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

(ภาพย่อย A) ค่า nucleotide diversity ของแอนติเจนที่แสดงออกในระยะ blood stage ได้แก่ merozoite surface protein-3 (MSP-3) และ apical membrane antigen-1 (AMA-1) เปรียบเทียบกับค่า nucleotide diversity ของแอนติเจน Pfs25 (ภาพย่อย B) ค่า nucleotide diversity ของแอนติเจนที่แสดงออกในระยะ gametocyte ได้แก่ 6-cysteine protein P47 (Pfs47) และ 6-cysteine protein (Pfs48/45) เปรียบเทียบกับค่า nucleotide diversity ของแอนติเจน Pfs25 ดัดแปลงจาก Kooij and Matuschewski (2007)



5.4 สรุปผลการทดลอง

1. ยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทยมี 7 haplotype H2 พบมากที่สุด
2. การกระจายของยีน *Pfs25* จำนวน 7 haplotype ในประเทศไทย ทำให้แบ่งเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ออกได้เป็น 2 กลุ่มประชากร
3. ยีน *Pfs25* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ทั่วโลกมี 11 haplotype H1 พบมากที่สุดในประชากรโลก รวมทั้งประชากรในทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แต่ H2 พบมากที่สุดในทวีปเอเชีย
4. การกระจายของยีน *Pfs25* 11 haplotype ทั่วโลก ทำให้แบ่งเชื้อมาลาเรียออกได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทวีปเอเชีย กลุ่มทวีปแอฟริกา และกลุ่มทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้
5. ยีน *Pfs25* มี SNPs จำนวน 10 ตำแหน่ง 7 ตำแหน่งเป็น nsSNPs และ 3 ตำแหน่งเป็น sSNPs โดย SNPs กระจายอยู่ในโดเมนที่ 3 มากที่สุด
6. ยีน *Pfs25* มีความหลากหลายต่ำ เนื่องจากถูกคัดเลือกไว้ด้วย negative selection
7. SNPs ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน *Pfs25* น้อยมาก

5.5 ข้อจำกัดของงานวิจัย

1. ตัวอย่างเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* แต่ละจังหวัดในประเทศไทย งานวิจัยชิ้นนี้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างจากทุกจังหวัดได้ เพราะผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วประเทศมีจำนวนลดลง และหลายจังหวัดตอนกลางของประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อมาลาเรียน้อยมาก (พัชรिता หงษ์จันทร์, 2020)
2. ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจากแต่ละประเทศในงานวิจัยมีจำนวนน้อย จะเห็นว่าเชื้อมาลาเรีย 6 จาก 22 ประเทศ เท่านั้นที่มีจำนวนมากกว่า 10 ตัวอย่าง
3. ตัวอย่างจากหลายประเทศในทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และเอเชีย เช่น ประเทศเปรู แองโกลา อินโดนีเซีย ไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pfs25*

บรรณานุกรม

- กองโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค. (2021). *แนวทางเวชปฏิบัติในการรักษาผู้ป่วยโรคไข้
มาลาเรีย พ.ศ. 2564* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: อักษรกราฟฟิกแอนดี้ไซน์.
- จามร เมฆอรุณ. (2011). โรคมาลาเรีย. ใน ภาสกร อัครเสวี (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2553*. นนทบุรี: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- จันทพร ทานนท์. (2014). โรคมาลาเรีย. ใน ธนรัชต์ ผลิพัฒน์ (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2556*. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- ดิษฐ์ สิงห์เสนี, มติรุท มุ่งถิ่น, เสาวนีย์ ลิละยูวะ, สมชาย อินทนาคม, ปรียาภรณ์ ชูย์ดา, นันทนา
สุวรรณดิษฐ์กุล, และนฤมล สิทธิโชติ. (2011). *การศึกษาระบาดวิทยาระดับอนุชีวะของ
มาลาเรีย 3 จังหวัดภาคใต้ (ยะลา นราธิวาส ปัตตานี)*. กรุงเทพมหานคร: วิทยาลัยแพทยศาสตร์
พระมงกุฎเกล้า.
- เทวพร जानนอก. (2015). โรคมาลาเรีย. ใน ธนรัชต์ ผลิพัฒน์ (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2557*. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- เทวพร जानนอก. (2016). โรคมาลาเรีย. ใน ธนรัชต์ ผลิพัฒน์ (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2558*. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- เทวพร जानนอก. (2017). โรคมาลาเรีย. ใน พจมาน ศิริอารยาภรณ์ (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้า
ระวังโรค ประจำปี 2559*. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- ปภาณีจ สวงโท. (2012). โรคมาลาเรีย. ใน ภาสกร อัครเสวี (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2555*. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- ปภาณีจ สวงโท. (2013). โรคมาลาเรีย. ใน ภาสกร อัครเสวี (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2554*. กรุงเทพมหานคร: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์.
- ประณีต ส่งวัฒนา และหทัยรัตน์ แสงจันทร์. (2015). การบริการการแพทย์ฉุกเฉินในสถานการณ์ความ
ไม่สงบในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้: การทบทวนวรรณกรรม. *Princess of Naradhiwas
University Journal*, 7(2), 74-87.
- พัชรिता หงษ์จันทร์. (2019). โรคมาลาเรีย. ใน ฐิติพงษ์ ยิ่งยง (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2561*. กรุงเทพมหานคร: แคนนา กราฟฟิก.
- พัชรिता หงษ์จันทร์. (2020). โรคมาลาเรีย. ใน ฐิติพงษ์ ยิ่งยง (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง
โรค ประจำปี 2562*. นนทบุรี: กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- อรพรรณ กันยะมี. (2018). โรคมาลาเรีย. ใน นคร เปรมศรี (บรรณาธิการ), *สรุปรายงานการเฝ้าระวัง*

โรค ประจำปี 2560. นนทบุรี: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.

- Akhouri, R. R., Sharma, A., Malhotra, P., & Sharma, A. (2008). Role of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein in host-cell interactions. *Malaria Journal*, 7, 63-73.
- Akunuri, S., Shraddha, P., Palli, V., & MuraliSantosh, B. (2018). Suspected artesunate resistant malaria in South India. *Journal of Global Infectious Diseases*, 10(1), 26-27.
- Amanzougaghene, N., Tajeri, S., Yalaoui, S., Lorthiois, A., Soulard, V., Gego, A., Rametti, A., Risco-Castillo, V., Moreno, A., Tefit, M., Gemert, G.-J. v., Sauerwein, R. W., Vaillant, J.-C., Ravassard, P., Pérignon, J.-L., Froissard, P., Mazier, D., & Franetich, J.-F. (2021). The host protein Aquaporin-9 is required for efficient *Plasmodium falciparum* sporozoite entry into human hepatocytes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 704662-704673.
- Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Mao, S., Sopha, C., Sam, B., Dek, D., Try, V., Amato, R., Blessborn, D., Song, L., Tullo, G. S., Fay, M. P., Anderson, J. M., Tarning, J., & Fairhurst, R. M. (2016). Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 357-365.
- Amimo, F., Lambert, B., Magit, A., Sacarlal, J., Hashizume, M., & Shibuya, K. (2020). *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in Africa: a systematic analysis of national trends. *BMJ Global Health*, 5(11), e003217.
- Angrisano, F., Sala, K. A., Da, D. F., Liu, Y., Pei, J., Grishin, N. V., Snell, W. J., & Blagborough, A. M. (2017). Targeting the conserved fusion loop of HAP2 inhibits the transmission of *Plasmodium berghei* and *falciparum*. *Cell Reports*, 21(10), 2868-2878.
- Arnot, D. E., Ronander, E., & Bengtsson, D. C. (2011). The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. *International Journal for Parasitology*, 41(1), 71-80.
- Aparakkitanon, S., Chapoomram, S., Kuaha, K., Chirachariyavej, T., & Wilairat, P. (2006). Targeting of hematin by the antimalarial pyronaridine. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy, 50(6), 2197–2220.

- Aurrecochea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D. F., Roos, D. S., Ross, C., Jr, C. J. S., Treatman, C., & Wang, H. (2009). PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research*, 37, D539–D543.
- Azasi, Y., Low, L. M., Just, A. N., Raghavan, S. S. R., Wang, C. W., Valenzuela-Leon, P., Rowe, J. A., Smith, J. D., Lavstsen, T., Turner, L., Calvo, E., & Miller, L. H. (2021). Complement C1s cleaves PfEMP1 at interdomain conserved sites inhibiting *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(22), e2104166118.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Dluzewski, A. R., Margos, G., Williams, I. T., Blackman, M. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W., & Mitchell, G. H. (2003). *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of Cell Science*, 116(18), 3825–3834.
- Bansal, A., Molina-Cruz, A., Brzostowski, J., Liu, P., Luo, Y., Gunalan, K., Li, Y., Ribeiro, J. M. C., & Miller, L. H. (2018). PfCDPK1 is critical for malaria parasite gametogenesis and mosquito infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(4), 774–779.
- Barr, P. J., Green, K. M., Gibson, H. L., Bathurst, I. C., Quakyi, I. A., & Kaslow, D. C. (1991). Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(5), 1203–1208.
- Barry, A. E., Schultz, L., Buckee, C. O., & Reeder, J. C. (2009). Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Plos One*, 4(12), e8497.
- Beebee, T., & Rowe, G. (2008). *An introduction to molecular ecology* (2 ed.). New York:

Oxford University Press.

- Bernabeu, M., Danziger, S. A., Avril, M., Vaz, M., Babar, P. H., Brazier, A. J., Herricks, T., Maki, J. N., Pereira, L., Mascarenhas, A., Gomes, E., Chery, L., Aitchison, J. D., Rathod, P. K., & Smith, J. D. (2016). Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(23), E3270–E3279.
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E., & Morris, H. R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, *392*(6673), 289–292.
- Brancucci, N. M. B., Gerdt, J. P., Wang, C., Niz, M. D., Philip, N., Adapa, S. R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S. D., Laffitte, M.-C., Clark, M. A., Grüning, C., Ravel, D., Soares, A. B., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-Garcia, A., Wirth, D. F., Gendaszewska-Darmach, E., Duraisingh, M. T., Adams, J. H., Voss, T. S., Waters, A. P., Jiang, R. H. Y., Clardy, J., & Marti, M. (2017). Lysophosphatidylcholine regulates sexual stage differentiation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, *171*(1), 1532–1544.
- Bridgford, J. L., Xie, S. C., Cobbold, S. A., Pasaje, C. F. A., Herrmann, S., Yang, T., Gillett, D. L., Dick, L. R., Ralph, S. A., Dogovski, C., Spillman, N. J., & Tilley, L. (2018). Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nature Communications*, *9*(1), 3801–3809.
- Bromham, L. (2016). *An introduction to molecular evolution and phylogenetics* (2 ed.). New York: Oxford University Press.
- Bruce, M. C., Carter, R. N., Nakamura, K., Aikawa, M., & Carter, R. (1994). Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *65*(1), 11–22.
- Chaianantakul, N., Sungkapong, T., Changpad, J., Thongma, K., Sim-Ut, S., & Kaewthamasorn, M. (2021). Genetic polymorphism of the extracellular region in surface associated interspersed 1.1 gene of *Plasmodium falciparum* field isolates from Thailand. *Malaria Journal*, *20*(1), 343–356.
- Chaivisit, P., Chujun, S., & Chutinantakul, A. (2020). Modelling malaria incidence in the

- upper part of Southern Thailand. *Journal of Public Health and Development*, 18(3), 16-27.
- Chandramohan, D., Zongo, I., Sagara, I., Cairns, M., Yerbanga, R.-S., Diarra, M., Nikiéma, F., Tapily, A., Sompougdou, F., Issiaka, D., Zoungrana, C., Sanogo, K., Haro, A., Kaya, M., Sienou, A.-A., Traore, S., Mahamar, A., Thera, I., Diarra, K., Dolo, A., Kuepfer, I., Snell, P., Milligan, P., Ockenhouse, C., Ofori-Anyinam, O., Tinto, H., Djimde, A., Ouédraogo, J.-B., Dicko, A., & Greenwood, B. (2021). Seasonal malaria vaccination with or without seasonal malaria chemoprevention. *The New England Journal of Medicine*, 385(11), 1005-1017.
- Chichester, J. A., Green, B. J., Jones, R. M., Shoji, Y., Miura, K., Long, C. A., Lee, C. K., Ockenhouse, C. F., Morin, M. J., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2018). Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: a phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine*, 36(39), 5865-5871.
- Collins, C. R., Hackett, F., Atid, J., Tan, M. S. Y., & Blackman, M. J. (2017). The *Plasmodium falciparum* pseudoprotease SERA5 regulates the kinetics and efficiency of malaria parasite egress from host erythrocytes. *PLoS Pathogens*, 13(7), e1006453.
- Collins, C. R., Hackett, F., Strath, M., Penzo, M., Withers-Martinez, C., Baker, D. A., & Blackman, M. J. (2013). Malaria parasite cGMP-dependent protein kinase regulates blood stage merozoite secretory organelle discharge and egress. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003344.
- Congpuong, K., Hoonchaiyapoom, T., & Inorn, K. (2014). *Plasmodium falciparum* genotype diversity in artemisinin derivatives treatment failure patients along the Thai-Myanmar border. *The Korean Journal of Parasitology*, 52(6), 631-637.
- Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124(4), 755-766.
- Cubillos, E. F. G., Prata, I. O., Fotoran, W. L., Ranford-Cartwright, L., & Wunderlich, G. (2021). The transcription factor PfAP2-O influences virulence gene transcription and sexual development in *Plasmodium falciparum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 669088-669101.

- Curi, R., Lagranha, C. J., Doi, S. Q., Sellitti, D. F., Procopio, J., Pithon-Curi, T. C., Corless, M., & Newsholme, P. (2005). Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology*, *204*(2), 392-401.
- Da, D. F., Dixit, S., Sattabonkot, J., Mu, J., Abate, L., Ramineni, B., Ouedraogo, J. B., MacDonald, N. J., Fay, M. P., Su, X.-z., Cohuet, A., & Wu, Y. (2013). Anti-Pfs25 human plasma reduces transmission of *Plasmodium falciparum* isolates that have diverse genetic backgrounds. *Infection and Immunity*, *81*(6), 1984-1989.
- Darwin, C. (1872). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life* (6 Ed.). London: John Murray.
- Das, S., Hertrich, N., Perrin, A. J., Withers-Martinez, C., Collins, C. R., Jones, M. L., Watermeyer, J. M., Fobes, E. T., Martin, S. R., Saibil, H. R., Wright, G. J., Treeck, M., Epp, C., & Blackman, M. J. (2015). Processing of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein MSP1 activates a spectrin-binding function enabling parasite egress from RBCs. *Cell Host and Microbe*, *18*(4), 433-444.
- Dasgupta, S., Auth, T., Gov, N. S., Satchwell, T. J., Hanssen, E., Zuccala, E. S., Riglar, D. T., Toye, A. M., Betz, T., Baum, J., & Gompper, G. (2014). Membrane-wrapping contributions to malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Biophysical Journal*, *107*(1), 43-54.
- Datta, D., Bansal, G. P., Grasperge, B., Martin, D. S., Philipp, M., Gerloff, D., Ellefsen, B., Hannaman, D., & Kumar, N. (2017). Comparative functional potency of DNA vaccines encoding *Plasmodium falciparum* transmission blocking target antigens Pfs48/45 and Pfs25 administered alone or in combination by *in vivo* electroporation in rhesus macaques. *Vaccine*, *35*(50), 7049-7059.
- Dhar, A., & Minin, V. N. (2016). Maximum likelihood phylogenetic inference. In R. M. Kliman (Ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (pp. 499-506). Oxford: Academic Press.
- Dluzewski, A. R., Ling, I. T., Hopkins, J. M., Grainger, M., Margos, G., Mitchell, G. H., Holder, A. A., & Bannister, L. H. (2008). Formation of the food vacuole in *Plasmodium falciparum*: a potential role for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP1(19)). *Plos One*, *3*(8), e3085.

- Dooren, G. G. v., Marti, M., Tonkin, C. J., Stimmler, L. M., Cowman, A. F., & McFadden, G. I. (2005). Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, *57*(2), 405-419.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W389-W394.
- Dundas, K., Shears, M. J., Sun, Y., Hopp, C. S., Crosnier, C., Metcalf, T., Girling, G., Sinnis, P., Billker, O., & Wright, G. J. (2018). Alpha-v-containing integrins are host receptors for the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein, TRAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(17), 4477-4482.
- Ebohon, O., Irabor, F., Ebohon, L. O., & Omoregie, E. S. (2019). Therapeutic failure after regimen with artemether-lumefantrine combination therapy: a report of three cases in Benin City, Nigeria. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *52*, e20190163.
- Eijk, A. M. v., Larsen, D. A., Kayentao, K., Koshy, G., Slaughter, D. E. C., Roper, C., Okell, L. C., Desai, M., Gutman, J., Khairallah, C., Rogerson, S. J., Sibley, C. H., Meshnick, S. R., Taylor, S. M., & Kuile, F. O. T. (2019). Effect of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the effectiveness of intermittent preventive therapy for malaria in pregnancy in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(5), 546-556.
- Escalante, A. A., Grebert, H. M., Isea, R., Goldman, I. F., Basco, L., Magris, M., Biswas, S., Kariuki, S., & Lal, A. A. (2002). A study of genetic diversity in the gene encoding the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum* from different transmission areas--XVI. Asembo Bay Cohort Project. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *125*(1-2), 83-90.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2007). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, *1*, 47-50.
- Fan, Q., Li, J., Kariuki, M., & Cui, L. (2004). Characterization of PfPuf2, member of the Puf family RNA-binding proteins from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

DNA and Cell Biology, 23(11), 753-760.

- Farrance, C. E., Chichester, J. A., Musiychuk, K., Shamloul, M., Rhee, A., Manceva, S. D., Jones, R. M., Mamedov, T., Sharma, S., Mett, V., Streatfield, S. J., Roeffen, W., Vegte-Bolmer, M. v. d., Sauerwein, R. W., Wu, Y., Muratova, O., Miller, L., Duffy, P., Sinden, R., & Yusibov, V. (2011). Antibodies to plant-produced *Plasmodium falciparum* sexual stage protein Pfs25 exhibit transmission blocking activity. *Human Vaccines*, 7, 191-198.
- Filarsky, M., Fraschka, S. A., Niederwieser, I., Brancucci, N. M. B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., & Voss, T. S. (2018). GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science*, 359(6381), 1259-1263.
- Fries, H. C., Lamers, M. B., Deursen, J. v., Ponnudurai, T., & Meuwissen, J. H. (1990). Biosynthesis of the 25-kDa protein in the macrogametes/zygotes of *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology*, 71(2), 229-235.
- Fu, Y.-X., & Li, W.-H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693-709.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M. A., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., & Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 498-511.
- Garg, S., Agarwal, S., Dabral, S., Kumar, N., Sehrawat, S., & Singh, S. (2015). Visualization and quantification of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic merozoites. *Systems and Synthetic Biology*, 9(Suppl 1), 23-26.
- Garg, S., Agarwal, S., Kumar, S., Yazdani, S. S., Chitnis, C. E., & Singh, S. (2013). Calcium-dependent permeabilization of erythrocytes by a perforin-like protein during egress of malaria parasites. *Nature Communications*, 4, 1736-1747.

- Genton, B., Betuela, I., Felger, I., Al-Yaman, F., Anders, R. F., Saul, A., Rare, L., Baisor, M., Lorry, K., Brown, G. V., Pye, D., Irving, D. O., Smith, T. A., Beck, H.-P., & Alpers, M. P. (2002). A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *The Journal of Infectious Diseases*, *185*(6), 820-827.
- Goh, X. T., Lim, Y. A. L., Lee, P. C., Nissapatorn, V., & Chua, K. H. (2021). Diversity and natural selection of *Merozoite surface Protein-1* in three species of human malaria parasites: Contribution from South-East Asian isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *244*, 111390-111401.
- Gomes-Santos, C. S. S., Braks, J., Prudêncio, M., Carret, C., Gomes, A. R., Pain, A., Feltwell, T., Khan, S., Waters, A., Janse, C., Mair, G. R., & Mota, M. M. (2011). Transition of *Plasmodium* sporozoites into liver stage-like forms is regulated by the RNA binding protein Pumilio. *PLoS Pathogens*, *7*(5), e1002046.
- Goodman, A. L., Blagborough, A. M., Biswas, S., Wu, Y., Hill, A. V., Sinden, R. E., & Draper, S. J. (2011). A viral vectored prime-boost immunization regime targeting the malaria Pfs25 antigen induces transmission-blocking activity. *Plos One*, *6*(12), e29428.
- Gopalakrishnan, A. M., & Kumar, N. (2015). Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(1), 317-325.
- Gozar, M. M., Price, V. L., & Kaslow, D. C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae*-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in mice. *Infection and Immunity*, *66*(1), 59-64.
- Graaf, H. d., Payne, R. O., Taylor, I., Miura, K., Long, C. A., Elias, S. C., Zaric, M., Minassian, A. M., Silk, S. E., Li, L., Poulton, I. D., Baker, M., Draper, S. J., Gbesemete, D., Brendish, N. J., Martins, F., Marini, A., Mekhaieel, D., Edwards, N. J., Roberts, R., Vekemans, J., Moyle, S., Faust, S. N., Berrie, E., Lawrie, A. M., Hill, F., Hill, A. V. S., & Biswas, S. (2021). Safety and immunogenicity of ChAd63/MVA Pfs25-IMX313 in a phase I first-in-human trial. *Frontiers in Immunology*, *12*, 694759-694771.
- Gregory, J. A., Topol, A. B., Doerner, D. Z., & Mayfield, S. (2013). Alga-produced cholera

- toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccine. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 3917-3925.
- Grüring, C., Heiber, A., Kruse, F., Ungefehr, J., Gilberger, T.-W., & Spielmann, T. (2011). Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nature Communications*, 2, 165-175.
- Gupta, A., Mehra, P., Nitharwal, R., Sharma, A., Biswas, A. K., & Dhar, S. K. (2006). Analogous expression pattern of *Plasmodium falciparum* replication initiation proteins PfMCM4 and PfORC1 during the asexual and sexual stages of intraerythrocytic developmental cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 261(1), 12-18.
- Hanssen, E., Knoechel, C., Klonis, N., Abu-Bakar, N., Deed, S., LeGros, M., Larabell, C., & Tilley, L. (2011). Cryo transmission X-ray imaging of the malaria parasite, *P. falciparum*. *Journal of Structural Biology*, 173(1), 161-168.
- Holder, M., & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics*, 4(4), 275-284.
- Huang, H.-Y., Liang, X.-Y., Lin, L.-Y., Chen, J.-T., Ehapo, C. S., Eyi, U. M., Li, J., Jiang, T.-T., Zheng, Y.-Z., Zha, G.-C., Xie, D.-D., He, J.-Q., Chen, W.-Z., Liu, X.-Z., Mo, H.-T., Chen, X.-Y., & Lin, M. (2020). Genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein on Bioko Island, Equatorial Guinea and global comparative analysis. *Malaria Journal*, 19(1), 245-257.
- Huang, W.-C., Deng, B., Mabrouk, M. T., Seffouh, A., Ortega, J., Long, C., Miura, K., Wu, Y., & Lovell, J. F. (2020). Particle-based, Pfs230 and Pfs25 immunization is effective, but not improved by duplexing at fixed total antigen dose. *Malaria Journal*, 19(1), 309-320.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., & Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294(5550), 2310-2314.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254-267.
- Idro, R., Kakooza-Mwesige, A., Asea, B., Ssebyala, K., Bangirana, P., Opoka, R. O., Lubowa, S. K., Semrud-Clikeman, M., John, C. C., & Nalugya, J. (2016). Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a

- long-term cohort. *Malaria Journal*, 15, 184-194.
- Ishizuka, A. S., Lyke, K. E., DeZure, A., Berry, A. A., Richie, T. L., Mendoza, F. H., Enama, M. E., Gordon, I. J., Chang, L.-J., Sarwar, U. N., Zephir, K. L., Holman, L. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., C, N. K., Murshedkar, T., DeCederfelt, H., Plummer, S. H., Hendel, C. S., Novik, L., Costner, P. J. M., Saunders, J. G., Laurens, M. B., Plowe, C. V., Flynn, B., Whalen, W. R., Todd, J. P., Noor, J., Rao, S., Sierra-Davidson, K., Lynn, G. M., Epstein, J. E., Kemp, M. A., Fahle, G. A., Mikolajczak, S. A., Fishbaugher, M., Sack, B. K., Kappe, S. H. I., Davidson, S. A., Garver, L. S., Björkström, N. K., Nason, M. C., Graham, B. S., Roederer, M., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Ledgerwood, J. E., & Seder, R. A. (2016). Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nature Medicine*, 22(6), 614-623.
- Iwanaga, S., Kaneko, I., Kato, T., & Yuda, M. (2012). Identification of an AP2-family protein that is critical for malaria liver stage development. *Plos One*, 7(11), e47557.
- Jones, R. M., Chichester, J. A., Manceva, S., Gibbs, S. K., Musiychuk, K., Shamloul, M., Norikane, J., Streatfield, S. J., Vegte-Bolmer, M. v. d., Roeffen, W., Sauerwein, R. W., & Yusibov, V. (2015). A novel plant-produced Pfs25 fusion subunit vaccine induces long-lasting transmission blocking antibody responses. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11(1), 124-132.
- Jones, R. M., Chichester, J. A., Mett, V., Jaje, J., Tottey, S., Manceva, S., Casta, L. J., Gibbs, S. K., Musiychuk, K., Shamloul, M., Norikane, J., Mett, V., Streatfield, S. J., Vegte-Bolmer, M. v. d., Roeffen, W., Sauerwein, R. W., & Yusibov, V. (2013). A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against *Plasmodium falciparum* in immunized mice. *Plos One*, 8(11), e79538.
- Josling, G. A., Russell, T. J., Venezia, J., Orchard, L., Biljon, R. v., Painter, H. J., & Llinás, M. (2020). Dissecting the role of PfAP2-G in malaria gametocytogenesis. *Nature Communications*, 11(1), 1503-1515.
- Josling, G. A., Williamson, K. C., & Llinás, M. (2018). Regulation of sexual commitment

- and gametocytogenesis in malaria parasites. *Annual Review of Microbiology*, 72, 501-519.
- Kaewthamasorn, M., Yahata, K., Alexandre, J. S. F., Xangsayarath, P., Nakazawa, S., Torii, M., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R., & Kaneko, O. (2012). Stable allele frequency distribution of the polymorphic region of SURFIN(4.2) in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Parasitology International*, 61(2), 317-323.
- Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., Williams, A. E., Drought, L. G., Kwiatkowski, D. P., Baker, D. A., Cortés, A., & Llinás, M. (2014). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature*, 507(7491), 248-252.
- Kaslow, D. C., Bathurst, I. C., Lensen, T., Ponnudurai, T., Barr, P. J., & Keister, D. B. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* recombinant Pfs25 adsorbed to alum elicits antibodies that block transmission of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 62(12), 5576-5580.
- Kaslow, D. C., Isaacs, S. N., Quakyi, I. A., Gwadz, R. W., Moss, B., & Keister, D. B. (1991). Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Science*, 252(5010), 1310-1313.
- Kaslow, D. C., Quakyi, I. A., & Keister, D. B. (1989a). Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32(1), 101-103.
- Kaslow, D. C., Quakyi, I. A., Syin, C., Raum, M. G., Keister, D. B., Coligan, J. E., McCutchan, T. F., & Miller, L. H. (1988). A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, 333(6168), 74-76.
- Kaslow, D. C., Syin, C., McCutchan, T. F., & Miller, L. H. (1989b). Comparison of the primary structure of the 25 kDa ookinete surface antigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium gallinaceum* reveal six conserved regions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33(3), 283-287.
- Kaur, H., Sehgal, R., Goyal, K., Makkar, N., Yadav, R., Bharti, P. K., Singh, N., Sarmah, N. P., Mohapatra, P. K., Mahanta, J., Bansal, D., Sultan, A. A., & Kanwar, J. R. (2017). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (block 2), glutamate-rich protein and sexual stage antigen Pfs25 from Chandigarh, North

- India. *Tropical Medicine & International Health*, 22(12), 1590-1598.
- Kayiba, N. K., Yobi, D. M., Devleeschauwer, B., Mvumbi, D. M., Kabututu, P. Z., Likwela, J. L., Kalindula, L. A., DeMol, P., Hayette, M.-P., Mvumbi, G. L., Lusamba, P. D., Beutels, P., Rosas-Aguirre, A., & Speybroeck, N. (2021). Care-seeking behaviour and socio-economic burden associated with uncomplicated malaria in the Democratic Republic of Congo. *Malaria Journal*, 20(1), 260-274.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Klug, D., & Frischknecht, F. (2017). Motility precedes egress of malaria parasites from oocysts. *eLife*, 6, e19157.
- Koch, M., & Baum, J. (2016). The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. *Cellular Microbiology*, 18(3), 319-329.
- Koch, M., Wright, K. E., Otto, O., Herbig, M., Salinas, N. D., Tolia, N. H., Satchwell, T. J., Guck, J., Brooks, N. J., & Baum, J. (2017). *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen 175 triggers a biophysical change in the red blood cell that facilitates invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(16), 4225-4230.
- Kong, S., Sánchez-Pacheco, S. J., & Murphy, R. W. (2016). On the use of median-joining networks in evolutionary biology. *Cladistics*, 32(6), 691-699.
- Koning-Ward, T. F. d., Olivieri, A., Bertuccini, L., Hood, A., Silvestrini, F., Charvalias, K., Díaz, P. B., Camarda, G., McElwain, T. F., Papenfuss, T., Healer, J., Baldassarri, L., Crabb, B. S., Alano, P., & Ranford-Cartwright, L. C. (2008). The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 67(2), 278-290.
- Kooij, T. W., & Matuschewski, K. (2007). Triggers and tricks of *Plasmodium* sexual development. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 547-533.
- Kubler-Kielb, J., Majadly, F., Wu, Y., Narum, D. L., Guo, C., Miller, L. H., Shiloach, J., Robbins, J. B., & Schneerson, R. (2007). Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* elicited in mice by protein

- conjugates of Pfs25. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 293-298.
- Kuesap, J., Chaijaroenkul, W., Ketprathum, K., Tattiyapong, P., & Na-Bangchang, K. (2014). Evolution of genetic polymorphisms of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein (*PfMSP*) in Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 52(1), 105-109.
- Kumar, R., Angov, E., & Kumar, N. (2014). Potent malaria transmission-blocking antibody responses elicited by *Plasmodium falciparum* Pfs25 expressed in *Escherichia coli* after successful protein refolding. *Infection and Immunity*, 82(4), 1453-1459.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J. S., Vermunt, A. M. W., Pain, A., Sauerwein, R. W., Eling, W. M. C., Hall, N., Waters, A. P., Stunnenberg, H. G., & Mann, M. (2002). Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*, 419(6906), 537-542.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y.-H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62), 3923-3927.
- Lee, S.-M., Plieskatt, J., & King, C. R. (2018). Disulfide bond mapping of Pfs25, a recombinant malaria transmission blocking vaccine candidate. *Analytical Biochemistry*, 542, 20-23.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Li, Y., Leneghan, D. B., Miura, K., Nikolaeva, D., Brian, I. J., Dicks, M. D. J., Fyfe, A. J., Zakutansky, S. E., Cassan, S. d., Long, C. A., Draper, S. J., Hill, A. V. S., Hill, F., & Biswas, S. (2016). Enhancing immunogenicity and transmission-blocking activity of malaria vaccines by fusing Pfs25 to IMX313 multimerization technology. *Scientific Reports*, 6, 18848-18861.
- Li, Z., Cui, H., Guan, J., Liu, C., Yang, Z., & Yuan, J. (2021). *Plasmodium* transcription repressor AP2-O3 regulates sex-specific identity of gene expression in female

- gametocytes. *EMBO Reports*, 22(5), e51660.
- Lindner, S. E., Swearingen, K. E., Shears, M. J., Walker, M. P., Vrana, E. N., Hart, K. J., Minns, A. M., Sinnis, P., Moritz, R. L., & Kappe, S. H. I. (2019). Transcriptomics and proteomics reveal two waves of translational repression during the maturation of malaria parasite sporozoites. *Nature Communications*, 10(1), 4964-4976.
- Lopaticki, S., Yang, A. S. P., John, A., Scott, N. E., Lingford, J. P., O'Neill, M. T., Erickson, S. M., McKenzie, N. C., Jennison, C., Whitehead, L. W., Douglas, D. N., Kneteman, N. M., Goddard-Borger, E. D., & Boddey, J. A. (2017). Protein O-fucosylation in *Plasmodium falciparum* ensures efficient infection of mosquito and vertebrate hosts. *Nature Communications*, 8(1), 561-570.
- Lopera-Mesa, T. M., Mita-Mendoza, N. K., Hoef, D. L. v. d., Doumbia, S., Konaté, D., Doumbouya, M., Gu, W., Traoré, K., Diakité, S. A. S., Remaley, A. T., Anderson, J. M., Rodriguez, A., Fay, M. P., Long, C. A., Diakité, M., & Fairhurst, R. M. (2012). Plasma uric acid levels correlate with inflammation and disease severity in Malian children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Plos One*, 7(10), e46424.
- Loubens, M., Vincensini, L., Fernandes, P., Briquet, S., Marinach, C., & Silvie, O. (2021). *Plasmodium* sporozoites on the move: Switching from cell traversal to productive invasion of hepatocytes. *Molecular Microbiology*, 115(5), 870-881.
- Low, L. M., Azasi, Y., Sherling, E. S., Garten, M., Zimmerberg, J., Tsuboi, T., Brzostowski, J., Mu, J., Blackman, M. J., & Miller, L. H. (2019). Deletion of *Plasmodium falciparum* protein RON3 affects the functional translocation of exported proteins and glucose uptake. *mBio*, 10(4), e01460-01419.
- Lumkul, L., Sawaswong, V., Simpalipan, P., Kaewthamasorn, M., Harnyuttanakorn, P., & Pattaradilokrat, S. (2018). Unraveling haplotype diversity of the apical membrane antigen-1 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 56(2), 153-165.
- MacDonald, N. J., Nguyen, V., Shimp, R., Reiter, K., Herrera, R., Burkhardt, M., Muratova, O., Kumar, K., Aebig, J., Rausch, K., Lambert, L., Dawson, N., Sattabongkot, J., Ambroggio, X., Duffy, P. E., Wu, Y., & Narum, D. L. (2016). Structural and immunological characterization of recombinant 6-cysteine domains of the *Plasmodium falciparum* sexual stage protein Pfs230. *The Journal of Biological*

Chemistry, 291(38), 19913-19922.

- Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F., & Tilley, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 341-354.
- Mairet-Khedim, M., Leang, R., Marmai, C., Khim, N., Kim, S., Ke, S., Kauy, C., Kloeung, N., Eam, R., Chy, S., Izac, B., Bouth, D. M., Bustos, M. D., Ringwald, P., Ariey, F., & Witkowski, B. (2021). Clinical and In Vitro resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-amodiaquine in Cambodia. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(3), 406-413.
- MalariaGEN, Ahouidi, A., Ali, M., Almagro-Garcia, J., Amambua-Ngwa, A., Amaratunga, C., Amato, R., Amenga-Etego, L., Andagalu, B., Anderson, T. J. C., Andrianaranjaka, V., Apinjoh, T., Ariani, C., Ashley, E. A., Auburn, S., Awandare, G. A., Ba, H., Baraka, V., Barry, A. E., Bejon, P., Bertin, G. I., Boni, M. F., Borrmann, S., Bousema, T., Branch, O., Bull, P. C., Busby, G. B. J., Chookajorn, T., Chotivanich, K., Claessens, A., Conway, D., Craig, A., D'Alessandro, U., Dama, S., Day, N. P., Denis, B., Diakite, M., Djimdé, A., Dolecek, C., Dondorp, A. M., Drakeley, C., Drury, E., Duffy, P., Echeverry, D. F., Egwang, T. G., Erko, B., Fairhurst, R. M., Faiz, A., Fanello, C. A., Fukuda, M. M., Gamboa, D., Ghansah, A., Golassa, L., Goncalves, S., Hamilton, W. L., Harrison, G. L. A., 3, L. H., Henrichs, C., Hien, T. T., Hill, C. A., Hodgson, A., Hubbard, C., Imwong, M., Ishengoma, D. S., Jackson, S. A., Jacob, C. G., Jeffery, B., Jeffreys, A. E., Johnson, K. J., Jyothi, D., Kamaliddin, C., Kamau, E., Kekre, M., Kluczynski, K., Kochakarn, T., Konaté, A., Kwiatkowski, D. P., Kyaw, M. P., Lim, P., Lon, C., Loua, K. M., Maïga-Ascofaré, O., Malangone, C., Manske, M., Marfurt, J., Marsh, K., Mayxay, M., Miles, A., Miotto, O., Mobegi, V., Mokuolu, O. A., Montgomery, J., Mueller, I., Newton, P. N., Nguyen, T., Nguyen, T.-N., Noedl, H., Nosten, F., Noviyanti, R., Nzila, A., Ochola-Oyier, L. I., Ocholla, H., Oduro, A., Omedo, I., Onyamboko, M. A., Ouedraogo, J.-B., Oyebola, K., Pearson, R. D., Peshu, N., Physo, A. P., Plowe, C. V., Price, R. N., Pukrittayakamee, S., Randrianarivelojosa, M., Rayner, J. C., Ringwald, P., Rockett, K. A., Rowlands, K., Ruiz, L., Saunders, D., Shayo, A., Siba, P., Simpson, V. J., Stalker, J., Su, X.-Z., Sutherland, C., Takala-Harrison, S., Tavul, L., Thathy, V., Tshefu, A., Verra, F., Vinetz, J., Wellems, T. E., Wendler, J., White, N. J., Wright, I., Yavo, W., & Ye, H.

- (2021). An open dataset of *Plasmodium falciparum* genome variation in 7,000 worldwide samples. *Wellcome Open Research*, 6, 42-63.
- Mardulyn, P. (2012). Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Molecular Ecology*, 21(14), 3385-3390.
- Marin-Mogollon, C., Pul, F. J. A. v., Miyazaki, S., Imai, T., Ramesar, J., Salman, A. M., Winkel, B. M. F., Othman, A. S., Kroeze, H., Chevalley-Maurel, S., Reyes-Sandoval, A., Roestenberg, M., Franke-Fayard, B., Janse, C. J., & Khan, S. M. (2018). Chimeric *Plasmodium falciparum* parasites expressing *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein fail to produce salivary gland sporozoites. *Malaria Journal*, 17(1), 288-303.
- McRobert, L., Taylor, C. J., Deng, W., Fivelman, Q. L., Cummings, R. M., Polley, S. D., Billker, O., & Baker, D. A. (2008). Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS Biology*, 6(6), e139.
- Miao, J., Chen, Z., Wang, Z., Shrestha, S., Li, X., Li, R., & Cui, L. (2017). Sex-specific biology of the human malaria parasite revealed from the proteomes of mature male and female gametocytes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(4), 537-551.
- Mlambo, G., Kumar, N., & Yoshida, S. (2010). Functional immunogenicity of baculovirus expressing Pfs25, a human malaria transmission-blocking vaccine candidate antigen. *Vaccine*, 28(43), 7025-7029.
- Molina-Cruz, A., Canepa, G. E., Kamath, N., Pavlovic, N. V., Mu, J., Ramphul, U. N., Ramirez, J. L., & Barillas-Mury, C. (2015). *Plasmodium* evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), 15178–15183.
- Mortier, J., Rakers, C., Bermudez, M., Murgueitio, M. S., Riniker, S., & Wolber, G. (2015). The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand–macromolecule complexes. *Drug Discovery Today*, 20(6), 686-702.
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., & Rodríguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291(5501), 141-144.

- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 162(4), 56-65.
- Nacher, M., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Treeprasertsuk, S., Tosukhowong, T., Vannaphan, S., Gay, F., Mazier, D., & Looareesuwan, S. (2002). Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage. *The Journal of Parasitology*, 88(1), 97-101.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Nei, M., & Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269-5273.
- Niang, M., Bei, A. K., Madhani, K. G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., Gunalan, K., Amaladoss, A., Yeo, K. P., Bob, N. S., Malleret, B., Duraisingh, M. T., & Preiser, P. R. (2014). STEVOR is a *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell Host and Microbe*, 16(1), 81-93.
- Nonvignon, J., Aryeetey, G. C., Malm, K. L., Agyemang, S. A., Aubyn, V. N. A., Peprah, N. Y., Bart-Plange, C. N., & Aikins, M. (2016). Economic burden of malaria on businesses in Ghana: a case for private sector investment in malaria control. *Malaria Journal*, 15(1), 454-463.
- O'Brochta, D. A., Alford, R., Harrell, R., Aluvihare, C., Eappen, A. G., Li, T., Chakravarty, S., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., & Billingsley, P. F. (2019). Is Saglin a mosquito salivary gland receptor for *Plasmodium falciparum*? *Malaria Journal*, 18(1), 2-12.
- Otto, T. D., Rayner, J. C., Böhme, U., Pain, A., Spottiswoode, N., Sanders, M., Quail, M., Ollomo, B., Renaud, F., Thomas, A. W., Prugnolle, F., Conway, D. J., Newbold, C., & Berriman, M. (2014). Genome sequencing of chimpanzee malaria parasites reveals possible pathways of adaptation to human hosts. *Nature Communications*, 5, 4754-4762.
- Patel, P., Bharti, P. K., Bansal, D., Raman, R. K., Mohapatra, P. K., Sehgal, R., Mahanta, J.,

- Sultan, A. A., & Singh, N. (2017). Genetic diversity and antibody responses against *Plasmodium falciparum* vaccine candidate genes from Chhattisgarh, Central India: Implication for vaccine development. *Plos One*, *12*(8), e0182674.
- Pattaradilokrat, S., Sawaswong, V., Simpalipan, P., Kaewthamasorn, M., Siripoon, N., & Harnyuttanakorn, P. (2016). Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Malaria Journal*, *15*(1), 517-531.
- Pattaradilokrat, S., Trakoolsoontorn, C., Simpalipan, P., Warrit, N., Kaewthamasorn, M., & Harnyuttanakorn, P. (2018). Size and sequence polymorphisms in the glutamate-rich protein gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in Thailand. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 49-58.
- Peatey, C. L., Skinner-Adams, T. S., Dixon, M. W. A., McCarthy, J. S., Gardiner, D. L., & Trenholme, K. R. (2009). Effect of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(10), 1518-1521.
- Pfleger, K. D. G., Seeber, R. M., & Eidne, K. A. (2006). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nature Protocols*, *1*(1), 337-345.
- Pipitaporn, B., Sueblinvong, T., Dharmkrong-at, A., & Udomsangpetch, R. (2000). Rosetting of *Plasmodium falciparum* required multiple components of the uninfected erythrocytes. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, *18*(1), 29-35.
- Pirahmadi, S., Zakeri, S., Mehrizi, A. A., & Djadid, N. D. (2018). Analysis of genetic diversity and population structure of gene encoding cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) vaccine candidate antigen in global *Plasmodium falciparum* populations. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *59*, 113-125.
- Poostchi, M., Silamut, K., Maude, R. J., Jaeger, S., & Thoma, G. (2018). Image analysis and machine learning for detecting malaria. *Translational Research : the Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *194*, 36-55.
- Pumpaibool, T., Arnathau, C., Durand, P., Kanchanakhan, N., Siripoon, N., Suegorn, A.,

- Sitthiamorn, C., Renaud, F., & Harnyuttanakorn, P. (2009). Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand, a low transmission country. *Malaria Journal*, 8, 155-165.
- Ramphul, U. N., Garver, L. S., Molina-Cruz, A., Canepa, G. E., & Barillas-Mury, C. (2015). *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), 1273-1280.
- Raulf, M.-K., Johannssen, T., Matthiesen, S., Neumann, K., Hachenberg, S., Mayer-Lambertz, S., Steinbeis, F., Hegermann, J., Seeberger, P. H., Baumgärtner, W., Strube, C., Ruland, J., & Lepenies, B. (2019). The C-type Lectin Receptor CLEC12A recognizes *Plasmodial* hemozoin and contributes to cerebral malaria development. *Cell Reports*, 28(1), 30-38.e35.
- Rea, E., Roch, K. G. L., & Tewari, R. (2018). Sex in *Plasmodium falciparum*: silence play between GDV1 and HP1. *Trends in Parasitology*, 34(6), 450-452.
- Reuling, I. J., Schans, L. A. v. d., Coffeng, L. E., Lanke, K., Meerstein-Kessel, L., Graumans, W., Gemert, G.-J. v., Teelen, K., Siebelink-Stoter, R., Vegte-Bolmer, M. v. d., Mast, Q. d., Ven, A. J. v. d., Ivinson, K., Hermsen, C. C., Vlas, S. d., Bradley, J., Collins, K. A., Ockenhouse, C. F., McCarthy, J., Sauerwein, R. W., & Bousema, T. (2018). A randomized feasibility trial comparing four antimalarial drug regimens to induce *Plasmodium falciparum* gametocytemia in the controlled human malaria infection model. *eLife*, 7, e31549.
- Robert-Paganin, J., Robblee, J. P., Auguin, D., Blake, T. C. A., Bookwalter, C. S., Kremontsova, E. B., Moussaoui, D., Previs, M. J., Jousset, G., Baum, J., Trybus, K. M., & Houdusse, A. (2019). *Plasmodium* myosin A drives parasite invasion by an atypical force generating mechanism. *Nature Communications*, 10(1), 3286-3297.
- Roberts, L. S., & Janovy, J. J. (2005). *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology* (7 ed.). New York: McGraw-Hill.
- Rodrigues, J., Oliveira, G. A., Kotsyfakis, M., Dixit, R., Molina-Cruz, A., Jochim, R., & Barillas-Mury, C. (2012). An epithelial serine protease, AgESP, is required for *Plasmodium* invasion in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Plos One*, 7(4), e35210.

- Rosenberg, R., & Rungsiwongse, J. (1991). The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *45*(5), 574-577.
- Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Schneider, I., & Burge, R. (1990). An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(2), 209-212.
- Rudlaff, R. M., Kraemer, S., Marshman, J., & Dvorin, J. D. (2020). Three-dimensional ultrastructure of *Plasmodium falciparum* throughout cytokinesis. *PLoS Pathogens*, *16*(6), e1008587.
- Rungsihirunrat, K., Chaijareonkul, W., Seugorn, A., Na-Bangchang, K., & Thaithong, S. (2009). Association between chloroquine resistance phenotypes and point mutations in *pfcr* and *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Acta Tropica*, *109*(1), 37-40.
- Saito, M., Carrara, V. I., Gilder, M. E., Min, A. M., Tun, N. W., Pimanpanarak, M., Viladpai-Nguen, J., Paw, M. K., Haohankhunnatham, W., Konghahong, K., Phyo, A. P., Chu, C., Turner, C., Lee, S. J., Duanguppama, J., Imwong, M., Bancone, G., Proux, S., Singhasivanon, P., White, N. J., Nosten, F., & McGready, R. (2021). A randomized controlled trial of dihydroartemisinin-piperazine, artesunate-mefloquine and extended artemether-lumefantrine treatments for malaria in pregnancy on the Thailand-Myanmar border. *BMC Medicine*, *19*(1), 132-145.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406-425.
- Sala, K. A., Angrisano, F., Da, D. F., Taylor, I. J., Churcher, T. S., & Blagborough, A. M. (2018). Immunization with transgenic rodent malaria parasites expressing Pfs25 induces potent transmission-blocking activity. *Scientific Reports*, *8*(1), 1573-1582.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467.
- Santos, J. M., Josling, G., Ross, P., Joshi, P., Orchard, L., Campbell, T., Schieler, A., Cristea, I. M., & Llinás, M. (2017). Red blood cell invasion by the malaria parasite is

- coordinated by the PfAP2-I transcription factor. *Cell Host and Microbe*, 21(6), 731-741.
- Sarma, N., Patouillard, E., Cibulskis, R. E., & Arcand, J.-L. (2019). The economic burden of malaria: revisiting the evidence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(6), 1405-1415.
- Sawaswong, V., Simpallipan, P., Siripoon, N., Harnyuttanakorn, P., & Pattaradilokrat, S. (2015). Allelic diversity and geographical distribution of the gene encoding *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 in Thailand. *Korean Journal of Parasitology*, 53(2), 177-187.
- Saxena, A. K., Wu, Y., & Garboczi, D. N. (2007). *Plasmodium* P25 and P28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1260-1265.
- Scally, S. W., McLeod, B., Bosch, A., Miura, K., Liang, Q., Carroll, S., Reponen, S., Nguyen, N., Giladi, E., Rämisch, S., Yusibov, V., Bradley, A., Lemiale, F., Schief, W. R., Emerling, D., Kellam, P., King, C. R., & Julien, J.-P. (2017). Molecular definition of multiple sites of antibody inhibition of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25. *Nature Communications*, 8(1), 1568-1578.
- Selzer, P. M., Marhofer, R. J., & Koch, O. (2018). *Applied bioinformatics an introduction* (2 ed.). Cham: Springer International.
- Sharma, B. (2008). Structure and mechanism of a transmission blocking vaccine candidate protein Pfs25 from *P. falciparum*: a molecular modeling and docking study. *In Silico Biology*, 8(3-4), 193-206.
- Shortt, H. E., Fairley, N. H., Covell, G., Shute, P. G., & Garnham, P. C. C. (1951). The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(4), 405-419.
- Siau, A., Silvie, O., Franetich, J.-F., Yalaoui, S., Marinach, C., Hannoun, L., Gemert, G.-J. v., Luty, A. J. F., Bischoff, E., David, P. H., Snounou, G., Vaquero, C., Froissard, P., & Mazier, D. (2008). Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection. *PLoS Pathogens*, 4(8), e1000121.
- Siciliano, G., Costa, G., Suárez-Cortés, P., Valleriani, A., Alano, P., & Levashina, E. A.

- (2020). Critical steps of *Plasmodium falciparum* ookinete maturation. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 269-277.
- Silva-Pinto, A., Domingos, J., Cardoso, M., Reis, A., Benavente, E. D., Caldas, J. P., Conceição, C., Toscano, C., Baptista-Fernandes, T., Clark, T. G., Mansinho, K., Campino, S., & Nogueira, F. (2021). Artemether-lumefantrine treatment failure of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in travellers coming from Angola and Mozambique. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, *110*, 151-154.
- Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., Giulio, E. D., Bultrini, E., Picci, L., Derisi, J. L., Pizzi, E., & Alano, P. (2005). Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *143*(1), 100-110.
- Simpalipan, P., Pattaradilokrat, S., & Harnyuttanakorn, P. (2018). Global sequence diversity of the lactate dehydrogenase gene in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, *17*(1), 16-27.
- Simpalipan, P., Pattaradilokrat, S., Siripoon, N., Seugorn, A., Kaewthamasorn, M., Butcher, R. D., & Harnyuttanakorn, P. (2014). Diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand based on the spatial and temporal haplotype patterns of the C-terminal 19-kDa domain of merozoite surface protein-1. *Malaria Journal*, *13*(54), 1-11.
- Sinden, R. E. (1982). Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology*, *84*(1), 1-11.
- Sinden, R. E., & Gilles, H. M. (2002). The malaria parasites. In D. E. Warrell & H. M. Giles (Eds.), *Essential malariology* (4th ed.). London: Arnold international students' edition.
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Burkot, T. R., Harbach, R. E., & Hay, S. I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, *5*, 69-79.
- Sirisabhabhorn, K., Chaijaroenkul, W., Muhamad, P., & Na-Bangchang, K. (2021). Genetic

- diversity and distribution patterns of PfEMP1 in *Plasmodium falciparum* isolates along the Thai-Myanmar border. *Parasitology International*, 84, 102397-102401.
- Snounou, G., Zhu, X., Siripoon, N., Jarra, W., Thaithong, S., Brown, K. N., & Viriyakosol, S. (1999). Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(4), 369-374.
- Sologub, L., Kuehn, A., Kern, S., Przyborski, J., Schillig, R., & Pradel, G. (2011). Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cellular Microbiology*, 13(6), 897-912.
- Sookpongthai, P., Utayopas, K., Sitthiyotha, T., Pengsakul, T., Kaewthamasorn, M., Wangkanont, K., Hanyuttanakorn, P., Chunsriviro, S., & Pattaradilokrat, S. (2021). Global diversity of the gene encoding the Pfs25 protein-a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Parasites and Vectors*, 14(1), 571-589.
- Sriwichai, P., Karl, S., Samung, Y., Kiattibutr, K., Sirichaisinthop, J., Mueller, I., Cui, L., & Sattabongkot, J. (2017). Imported *Plasmodium falciparum* and locally transmitted *Plasmodium vivax*: cross-border malaria transmission scenario in northwestern Thailand. *Malaria Journal*, 16(1), 258-266.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1), vey016.
- Sudathip, P., Saejeng, A., Khantikul, N., Thongrad, T., Kitchakarn, S., Sugaram, R., Lertpiriyasuwat, C., Areechokchai, D., Gopinath, D., Sintasath, D., Ringwald, P., Naowarat, S., Pinyajeerapat, N., Bustos, M. D., & Shah, J. A. (2021). Progress and challenges of integrated drug efficacy surveillance for uncomplicated malaria in Thailand. *Malaria Journal*, 20(1), 261-276.
- Sundararaman, S. A., Plenderleith, L. J., Liu, W., Loy, D. E., Learn, G. H., Li, Y., Shaw, K. S., Ayoub, A., Peeters, M., Speede, S., Shaw, G. M., Bushman, F. D., Brisson, D., Rayner, J. C., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2016). Genomes of cryptic chimpanzee *Plasmodium* species reveal key evolutionary events leading to human malaria.

Nature Communications, 7, 11078-11091.

- Sutherland, C. J., Tanomsing, N., Nolder, D., Oguike, M., Jennison, C., Pukrittayakamee, S., Dolecek, C., Hien, T. T., Rosário, V. E. d., Arez, A. P., Pinto, J., Michon, P., Escalante, A. A., Nosten, F., Burke, M., Lee, R., Blaze, M., Otto, T. D., Barnwell, J. W., Pain, A., Williams, J., White, N. J., Day, N. P. J., Snounou, G., Lockhart, P. J., Chiodini, P. L., Imwong, M., & Polley, S. D. (2010). Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(10), 1544-1550.
- Swearingen, K. E., & Lindner, S. E. (2018). *Plasmodium* parasites viewed through proteomics. *Trends in Parasitology*, 34(11), 945-960.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Talaat, K. R., Ellis, R. D., Hurd, J., Hentrich, A., Gabriel, E., Hynes, N. A., Rausch, K. M., Zhu, D., Muratova, O., Herrera, R., Anderson, C., Jones, D., Aebig, J., Brockley, S., MacDonald, N. J., Wang, X., Fay, M. P., Healy, S. A., Durbin, A. P., Narum, D. L., Wu, Y., & Duffy, P. E. (2016). Safety and immunogenicity of Pfs25-EPA/Alhydrogel, a transmission blocking vaccine against *Plasmodium falciparum*: an open label study in malaria naïve adults. *Plos One*, 11(10), 1-17.
- Tan, M. S. Y., Koussis, K., Withers-Martinez, C., Howell, S. A., Thomas, J. A., Hackett, F., Knuepfer, E., Shen, M., Hall, M. D., Snijders, A. P., & Blackman, M. J. (2021). Autocatalytic activation of a malarial egress protease is druggable and requires a protein cofactor. *The EMBO Journal*, 40(11), e107226.
- Tanabe, K., Zollner, G., Vaughan, J. A., Sattabongkot, J., Khuntirat, B., Honma, H., Mita, T., Tsuboi, T., & Coleman, R. (2015). *Plasmodium falciparum*: genetic diversity and complexity of infections in an isolated village in western Thailand. *Parasitology International*, 64(3), 260-266.
- Tang, S., Feng, D., Wang, R., Ghose, B., Hu, T., Ji, L., Wu, T., Fu, H., Huang, Y., & Feng, Z. (2017). Economic burden of malaria inpatients during National Malaria Elimination Programme: estimation of hospitalization cost and its inter-province variation. *Malaria Journal*, 16(1), 291-300.
- Tempera, C., Franco, R., Caro, C., André, V., Eaton, P., Burke, P., & Hänscheid, T. (2015).

- Characterization and optimization of the haemozoin-like crystal (HLC) assay to determine Hz inhibiting effects of anti-malarial compounds. *Malaria Journal*, 14, 403-414.
- Tewari, R., Spaccapelo, R., Bistoni, F., Holder, A. A., & Crisanti, A. (2002). Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47613-47618.
- Tomas, A. M., Margos, G., Dimopoulos, G., Lin, L. H. v., Koning-Ward, T. F. d., Sinha, R., Lupetti, P., Beetsma, A. L., Rodriguez, M. C., Karras, M., Hager, A., Mendoza, J., Butcher, G. A., Kafatos, F., Janse, C. J., Waters, A. P., & Sinden, R. E. (2001). P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *The EMBO Journal*, 20(15), 3975-3983.
- Tsai, Y. L., Hayward, R. E., Langer, R. C., Fidock, D. A., & Vinetz, J. M. (2001). Disruption of *Plasmodium falciparum* chitinase markedly impairs parasite invasion of mosquito midgut. *Infection and Immunity*, 69(9), 4048-4054.
- Tsuboi, T., Kaslow, D. C., Cao, Y. M., Shiwaku, K., & Torii, M. (1997). Comparison of *Plasmodium yoelii* ookinete surface antigens with human and avian malaria parasite homologues reveals two highly conserved regions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 87(1), 107-111.
- Ukegbu, C. V., Giorgalli, M., Tapanelli, S., Rona, L. D. P., Jaye, A., Wyer, C., Angrisano, F., Blagborough, A. M., Christophides, G. K., & Vlachou, D. (2020). PIMMS43 is required for malaria parasite immune evasion and sporogonic development in the mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(13), 7363–7373.
- Vermeulen, A. N., Ponnudurai, T., Beckers, P. J., Verhave, J. P., Smits, M. A., & Meuwissen, J. H. (1985). Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *The Journal of Experimental Medicine*, 162(5), 1460-1476.
- Vlachou, D., Lycett, G., Sidén-Kiamos, I., Blass, C., Sinden, R. E., & Louis, C. (2001). *Anopheles gambiae* laminin interacts with the P25 surface protein of *Plasmodium berghei* ookinetes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 112(2),

229-237.

- Wang, Y.-N., Lin, M., Liang, X.-Y., Chen, J.-T., Xie, D.-D., Wang, Y.-L., Ehapo, C. S., Eyi, U. M., Huang, H.-Y., Wu, J.-L., Xu, D.-Y., Chen, Z.-M., Cao, Y.-L., & Chen, H.-B. (2019). Natural selection and genetic diversity of domain I of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 on Bioko Island. *Malaria Journal*, *18*(1), 317-332.
- Wang, Y. H., Chen, H. F., Luo, S. H., & Yu, X. B. (2000). Sequencing and homologous analysis of the sexual stage *Pfs25* gene from *Plasmodium falciparum* PFD-3/YN isolate. *Chinese Journal of Zoonoses*, *16*(6), 19-20.
- Wangroongsarb, P., Satimai, W., Khamsiriwatchara, A., Thwing, J., Eliades, J. M., Kaewkungwal, J., & Delacollette, C. (2011). Respondent-driven sampling on the Thailand-Cambodia border. II. Knowledge, perception, practice and treatment-seeking behaviour of migrants in malaria endemic zones. *Malaria Journal*, *10*, 117-128.
- Warrell, D. A. (2002). Clinical features of malaria. In D. A. Warrell & H. M. Gilles (Eds.), *Essential Malariology* (4 ed.). Pondicherry: Replika.
- Watts, C., Atieli, H., Alacapa, J., Lee, M.-C., Zhou, G., Githeko, A., Yan, G., & Wiseman, V. (2021). Rethinking the economic costs of hospitalization for malaria: accounting for the comorbidities of malaria patients in western Kenya. *Malaria Journal*, *20*(1), 429-437.
- World Health Organization. (2020). *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization. (2021). *WHO Guidelines for malaria*. Geneva: WHO Global Malaria Programme.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, *15*(4), 323-354.
- Wu, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., Fay, M. P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A. P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., Miller, L. H., & Durbin, A. P. (2008). Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates *Pfs25* and *Pvs25* formulated with montanide ISA 51. *Plos One*, *3*(7), e2636.
- Xiong, J. (2006). *Essential bioinformatics*. New York: Cambridge University Press.

- Yamamoto, D. S., Sumitani, M., Hatakeyama, M., & Matsuoka, H. (2018). Malaria infectivity of xanthurenic acid-deficient anopheline mosquitoes produced by TALEN-mediated targeted mutagenesis. *Transgenic Research*, 27(1), 51-60.
- Yang, A. S. P., O'Neill, M. T., Jennison, C., Lopaticki, S., Allison, C. C., Armistead, J. S., Erickson, S. M., Rogers, K. L., Ellisdon, A. M., Whisstock, J. C., Tweedell, R. E., Dinglasan, R. R., Douglas, D. N., Kneteman, N. M., & Boddey, J. A. (2017). Cell traversal activity is important for *Plasmodium falciparum* liver infection in humanized mice. *Cell Reports*, 18(13), 3105-3116.
- Yang, A. S. P., Waardenburg, Y. M. v., Vegte-Bolmer, M. v. d., Gemert, G.-J. A. v., Graumans, W., Wilt, J. H. W. d., & Sauerwein, R. W. (2021). Zonal human hepatocytes are differentially permissive to *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *The EMBO Journal*, 40(6), e106583.
- Yang, Z., & Nielsen, R. (2000). Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 17(1), 32-43.
- Yeoh, S., O'Donnell, R. A., Koussis, K., Dluzewski, A. R., Ansell, K. H., Osborne, S. A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G. H., Bannister, L. H., Bryans, J. S., Kettleborough, C. A., & Blackman, M. J. (2007). Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell*, 131(6), 1072-1083.
- Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., Mair, G. R., Janse, C. J., Waters, A. P., Kato, T., & Kaneko, I. (2009). Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. *Molecular Microbiology*, 71(6), 1402-1414.
- Zhao, J., Bhanot, P., Hu, J., & Wang, Q. (2016). A comprehensive analysis of *Plasmodium* circumsporozoite protein binding to hepatocytes. *Plos One*, 11(8), e0161607.
- Zou, L., Miles, A. P., Wang, J., & Stowers, A. W. (2003). Expression of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25 in *Pichia pastoris* for use in human clinical trials. *Vaccine*, 21(15), 1650-1657.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน สายงานบริหารวิจัย งานวิจัยและบริการวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ โทรศัพท์ 02 2185041

ที่ อว 64.16/ 03616

วันที่ 18 สิงหาคม 2563

เรื่อง ผลการประเมินโครงการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริทิพร ภทรศิริรัตน์

สิ่งที่ส่งมาด้วย ใบรับรองเลขที่ SC CU-IBC-004/2020

ตามที่ท่านส่งโครงการวิจัยเรื่อง “Genetic diversity of the gene encoding Pfs25 protein in *Plasmodium falciparum* in Thailand” เพื่อขอประเมินโครงการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพนั้น คณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ได้ประเมินโครงการดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว จึงขอแจ้งผลการประเมินโครงการ ดังนี้

ผู้ประเมินลำดับที่ 1 Approve

ผู้ประเมินลำดับที่ 2 Approve

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ ทั้งนี้ คณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ขอออกใบรับรองเลขที่ SC CU-IBC-005/2020 ตามที่แนบมาพร้อมบันทึกนี้


(ศาสตราจารย์ ดร. พลภุชณ์ แสงวงษ์)

คณบดี

ประธานคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

ภาพที่ S1 ใบอนุญาตเลขที่ SC CU IBC-004/2020 (ภาษาไทย) ออกโดยคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CU-IBC10



Chulalongkorn University
Institutional Biosafety Committee

Certificate of Approval

Approval No. : SC.CU-IBC-004/2020

Project Title : Genetic diversity of the gene encoding Pfs25 protein in *Plasmodium falciparum* in Thailand

Subproject Title :

Principal Investigator of the project : Assistant Professor Dr. Sittiporn Pattaradilokrat

Principal Investigator of the subproject :

Affiliation : Department of Biology, Faculty of Science

Risk Group :

Pathogen Risk group 1 Risk group 2 Risk group 3 Risk group 4

Animal toxin Risk group 1 Risk group 2 Risk group 3

Other..... Risk group/LD₅₀.....

Biocontainment Level :

Biosafety level 1 Biosafety level 2 Biosafety level 2 enhanced Biosafety level 3 Biosafety level 4


This project has been reviewed and approved by CU-IBC in accordance with the levels of risk in pathogens and animal toxins list in the Risk Group of Pathogen and Animal Toxin (2017) published by Department of Medical Sciences (Ministry of Public Health), the Pathogen and Animal Toxin Act (2015) and Biosafety Guidelines for Modern Biotechnology BIOTEC (2016).

The official signing to certify that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow the levels of risk in pathogens and animal toxins list in the Risk Group of Pathogen and Animal Toxin (2017) published by Department of Medical Sciences (Ministry of Public Health), the Pathogen and Animal Toxin Act (2015) and Biosafety Guidelines for Modern Biotechnology BIOTEC (2016).

The approval is subjected to assurance given in the levels of risk in pathogens and animal toxins list in the Risk Group of Pathogen and Animal Toxin (2017) published by Department of Medical Sciences (Ministry of Public Health), the Pathogen and Animal Toxin Act (2015) and Biosafety Guidelines for Modern Biotechnology BIOTEC (2016) and may be required for future investigations and reviews.

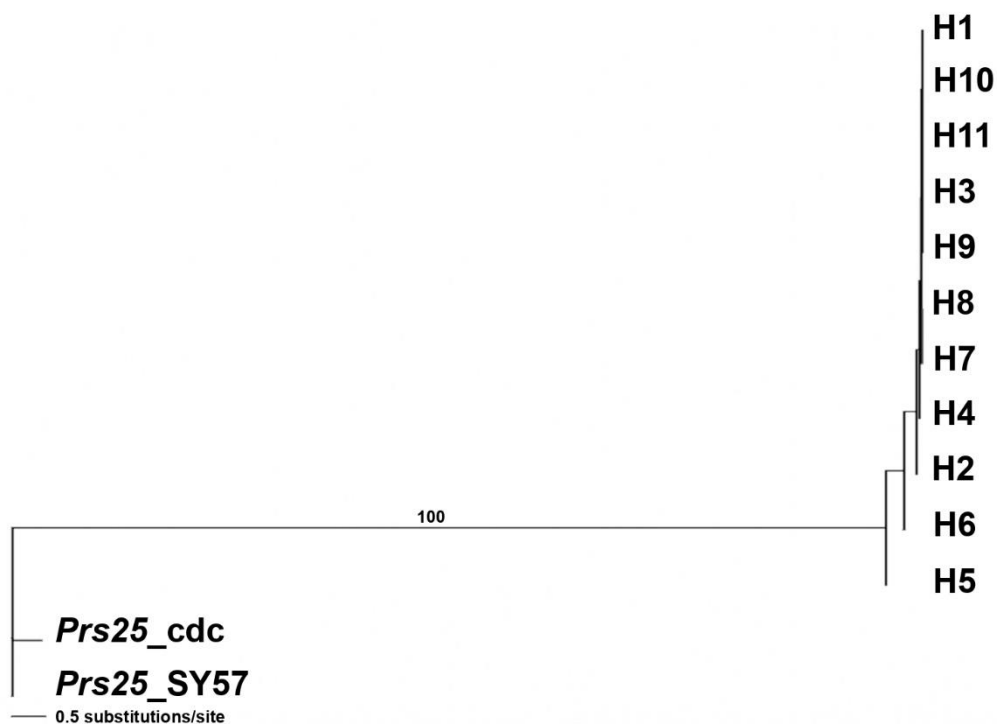
If there are any changes in information, please notify CU-IBC.

Effective date: 02 April 2020 Expiration date: 31 December 2020

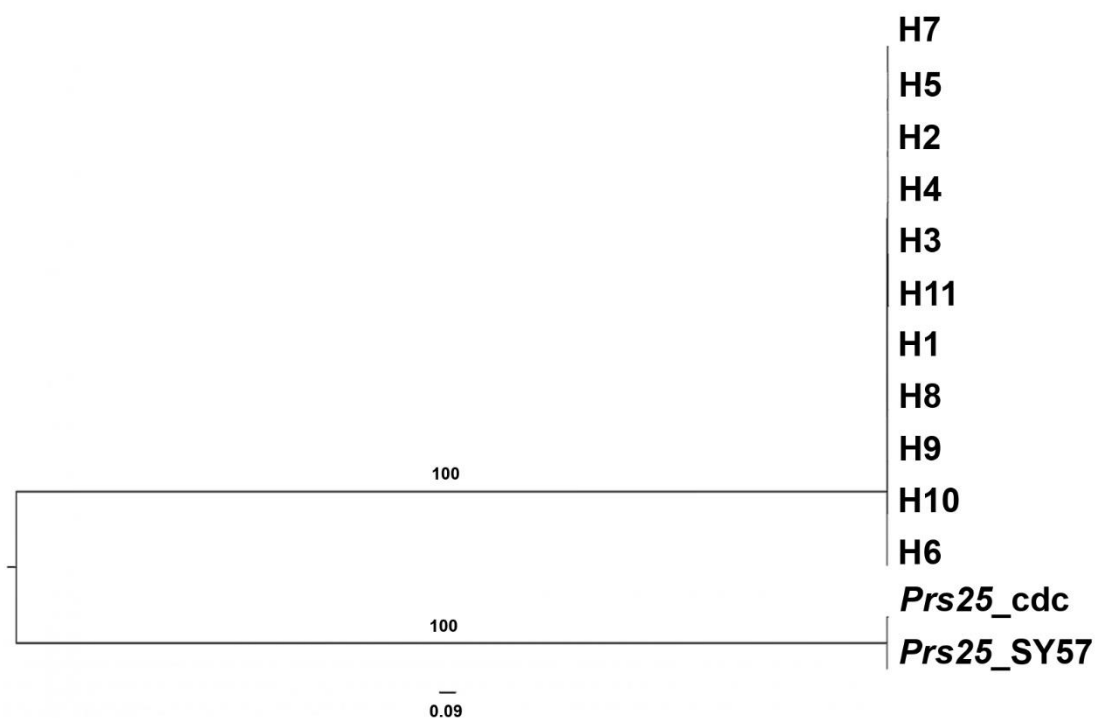
Signature 

(Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)
Faculty of Science-IBC Chair

ภาพที่ S2 ใบอนุญาตเลขที่ SC CU IBC-004/2020 (ภาษาอังกฤษ) ออกโดยคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ S3 Neighbor-Joining tree ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่าร้อยละจากการทำ bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง ความยาวกิ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสต่อตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ตรึงรากโดยยีน *Prs25* จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. reichenowi* (NCBI ID LT969573.1 และ NCBI ID LVLA0100011.1)



ภาพที่ S4 Maximum likelihood tree ของยีน *Pfs25* ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่าร้อยละจากการทำ bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง ความยาวกิ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสต่อตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ตรึงรากโดยยีน *Prs25* จากเชื้อมาลาเรียชนิด *P. reichenowi* (NCBI ID LT969573.1 และ NCBI ID LVLA01000011.1)

ตารางที่ S1 ค่า hd ของยีน *CelTOS* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จาก 6 ประเทศ ใน 3 ทวีป รวมจำนวน 218 ตัวอย่าง

ทวีป	ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง	ค่า hd	อ้างอิง
เอเชีย	อิหร่าน	92	0.403	(Pirahmadi et al., 2018)
แอฟริกา	เซเนกัล	50	0.940	
	แกมเบีย	40	0.897	
	มาลี	15	0.857	
	ยูกันดา	4	1.000	
อเมริกา	เฟรนช์เกียนา	17	0.118	

ตารางที่ S2 ค่า hd ของยีน *Pfs48/45* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จาก 4 ประเทศ ใน 3 ทวีป รวมจำนวน 44 ตัวอย่าง

ทวีป	ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง	ค่า hd	อ้างอิง
เอเชีย	ไทย	10	0.200	(Barry et al., 2009)
	อินเดีย	10	0.530	
แอฟริกา	เคนยา	15	0.880	
อเมริกา	เวเนซุเอลา	9	0.830	

ตารางที่ S3 ค่า hd ของยีน *Pfs47* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จาก 14 ประเทศ ใน 3 ทวีป รวมจำนวน 334 ตัวอย่าง

ทวีป	ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง	ค่า hd	อ้างอิง
เอเชีย	ไทย	41	0.545	(Molina-Cruz et al., 2015)
	ลาว	3	0.667	
	กัมพูชา	31	0.714	
แอฟริกา	มาลี	47	0.742	
	ยูกันดา	8	0.714	
	เฟรนช์เกียนา	22	0.416	
	แกมเบีย	65	0.649	
	กานา	3	0.667	
	เซเนกัล	66	0.786	

ตารางที่ S3 (ต่อ)

ทวีป	ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง	ค่า <i>hd</i>	อ้างอิง
แอฟริกา	เคนยา	19	0.766	(Molina-Cruz et al., 2015)
	ซูดาน	2	1.000	
	บูร์กินาฟาโซ	16	0.817	
อเมริกา	เปรู	3	0.000	
	บราซิล	8	0.000	

ตารางที่ S4 ค่า *hd* ของยีน *ama-1* domain 1 ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จาก 9 ประเทศ ใน 3 ทวีป รวมจำนวน 740 ตัวอย่าง

ทวีป	ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง	ค่า <i>hd</i>	อ้างอิง
เอเชีย	ไทย	80	0.919	(Wang et al., 2019)
แอฟริกา	อิเควทอเรียลกินี	214	0.991	
	กานา	37	0.967	
	แทนซาเนีย	62	0.972	
	ไนจีเรีย	51	0.979	
	แกมเบีย	114	0.970	
	เคนยา	129	0.980	
	เบนิน	23	0.993	
อเมริกา	เวเนซุเอลา	30	0.482	

ตารางที่ S5 ค่า pairwise F_{st} ของยีน *msp-1* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 1,356 ตัวอย่าง จาก 9 ประเทศทั่วโลก (Sawaswong et al., 2015)

ประชากรของ ประเทศ	ไทย	ไนจีเรีย	สาธารณรัฐ คองโก	แคเมอรูน	กานา	บูร์กินาฟาโซ	เซเนกัล	อิหร่าน
ไนจีเรีย	0.23075 $P = 0.00$							
สาธารณรัฐ คองโก	0.07000 $P = 0.01$	0.04031 $P = 0.07$						
แคเมอรูน	0.11270 $P = 0.00$	0.01184 $P = 0.22$	-0.00605 $P = 0.55$					
กานา	0.16490 $P = 0.00$	-0.00825 $P = 0.60$	0.01106 $P = 0.17$	-0.00554 $P = 0.54$				
บูร์กินาฟาโซ	0.08982 $P = 0.00$	0.02729 $P = 0.09$	-0.00676 $P = 0.69$	-0.00667 $P = 0.71$	0.00447 $P = 0.26$			
เซเนกัล	0.13957 $P = 0.00$	0.00031 $P = 0.40$	0.0024 $P = 0.30$	-0.00899 $P = 0.77$	-0.00993 $P = 0.76$	-0.00146 $P = 0.40$		
อิหร่าน	0.10221 $P = 0.00$	0.01888 $P = 0.12$	-0.00623 $P = 0.62$	-0.00907 $P = 0.92$	-0.00094 $P = 0.36$	-0.000256 $P = 0.80$	-0.0055 $P = 0.62$	
เปรู	0.67676 $P = 0.00$	0.29079 $P = 0.00$	0.49502 $P = 0.00$	0.43042 $P = 0.00$	0.36281 $P = 0.00$	0.41456 $P = 0.00$	0.38946 $P = 0.00$	0.42448 $P = 0.00$

ตารางที่ S6 ค่า pairwise F_{st} ของยีน *csp* จากเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จำนวน 2,296 ตัวอย่าง จาก 24 ประเทศ ใน 4 ทริปทั่วโลก (H.-Y. Huang et al., 2020)

ประชากรของทริป	แอฟริกา	อเมริกา	เอเชีย
อเมริกา	0.19194 $P < 0.05$		
เอเชีย	0.24167 $P < 0.05$	0.21294 $P < 0.05$	
โอเชียเนีย	0.25712 $P < 0.05$	0.42132 $P < 0.05$	0.06564 $P < 0.05$

ตารางที่ S7 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ SNP จำนวน 10 ตำแหน่ง ในแต่ละ haplotype

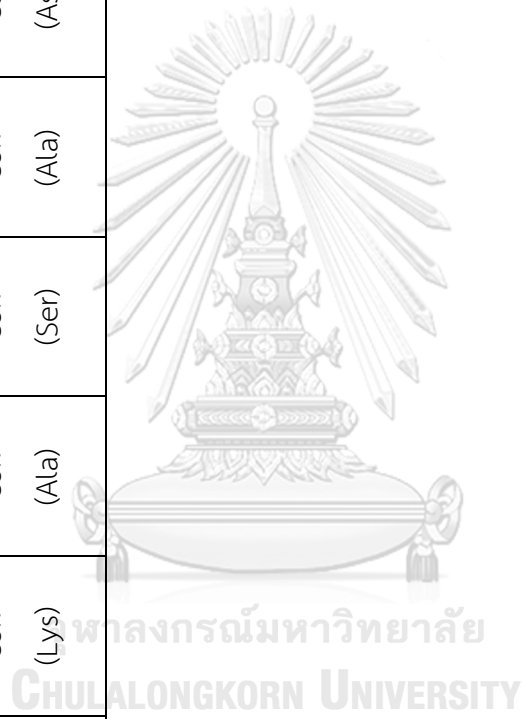
haplotype	amino acid position									
	39	76	111	131	138	143	145	173	187	217
H1 (n=216)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Gly)	coil (Gly)	coil (Val)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)
H2 (n=68)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Ala)	coil (Gly)	coil (Val)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)
H3 (n=9)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Ala)	coil (Gly)	coil (Ala)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)
H4 (n=1)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	coil (Ala)	coil (Gly)	coil (Val)	coil (Asn)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)
H5 (n=1)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Ala)	coil (Gly)	coil (Val)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)

ตารางที่ S7 (ต่อ)

haplotype	amino acid position									
	39	76	111	131	138	143	145	173	187	217
H6 (n=3)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Gly)	coil (Gly)	Coil (Val)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)
H7 (n=4)	coil (Ser)	Coil (Asn)	coil (Lys)	beta- strand (Ala)	coil (Gly)	coil (Val)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)
H8 (n=2)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Gly)	coil (Gly)	coil (Val)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Ile)
H9 (n=1)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Gly)	coil (Gly)	coil (Ala)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)
H10 (n=1)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	beta- strand (Gly)	coil (Gly)	coil (Val)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Asn)	coil (Met)

ตารางที่ S7 (ต่อ)

haplotype	amino acid position									
	39	76	111	131	138	143	145	173	187	217
H11 (n=1)	coil (Ser)	Coil (Asp)	coil (Lys)	coil (Ala)	coil (Ser)	coil (Ala)	coil (Asp)	coil (Gly)	coil (Lys)	coil (Met)



ตารางที่ S8 สิ่งมีชีวิตสกุล *Plasmodium* ที่พบการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในแฟมิลี P25 จากฐานข้อมูล PlasmoDB

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ whole genome sequencing สืบค้นจากฐานข้อมูล PlasmoDB วันที่ 5 เมษายน ค.ศ. 2022

สปีชีส์	โฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูก กระดูกสันหลัง	สายพันธุ์	โครโมโซม	ตำแหน่งบนโครโมโซม	Genomic sequence ID
<i>P. falciparum</i>	มนุษย์	3D7	10	1,253,373 ถึง 1,254,412	PF3D7_1031000
		7G8 2019	NA	1,206,451 ถึง 1,207,104	Pf7G8-2_ 000316300
		7G8	10	1,206,674 ถึง 1,207,327	Pf7G8_100035300
		CD01	10	1,255,756 ถึง 1,256,409	PfCD01_ 100036100
		Dd2	10	1,229,771 ถึง 1,230,424	PfDd2_ 100036200
		GA01	10	1,267,617 ถึง 1,268,270	PfGA01_ 100036200
		GB4	10	1,236,684 ถึง 1,237,337	PfGB4_ 100035900

ตารางที่ S8 (ต่อ)

สปีชีส์	โฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยง กระดูกสันหลัง	สายพันธุ์	โครโมโซม	ตำแหน่งบนโครโมโซม	Genomic sequence ID
<i>P. falciparum</i>	มนุษย์	GN01	10	1,281,419 ถึง 1,282,072	PfGN01_ 100036400
		HB3	10	1,207,085 ถึง 1,207,738	PfHB3_ 100035300
		IT	10	1,192,302 ถึง 1,192,955	PfIT_ 100034900
		KE01	10	1,266,416 ถึง 1,267,069	PfKE01_ 100036200
		KH01	10	1,217,682 ถึง 1,218,335	PfKH01_ 100035400
		KH02	10	1,247,182 ถึง 1,247,835	PfKH02_ 100036300
		ML01	10	1,207,992 ถึง 1,208,645	PfML01_ 100035100
		NF135.C10	NA	1,274,450 ถึง 1,275,103	PfNF135_ 100036000

ตารางที่ S8 (ต่อ)

สปีชีส์	โฮสต์ที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง	สายพันธุ์	โครโมโซม	ตำแหน่งบนโครโมโซม	Genomic sequence ID
<i>P. falciparum</i>	มนุษย์	NF166	NA	1,271,066 ถึง 1,271,719	PfNF166_100035600
		NF54	NA	1,014,549 ถึง 1,015,202	PfNF54_100035800
		SD01	10	1,217,189 ถึง 1,217,842	PfSD01_100035500
		SN01	10	1,259,913 ถึง 1,260,566	PfSN01_100036300
		TG01	10	1,248,427 ถึง 1,249,080	PfTG01_100036200
<i>P. knowlesi</i>	มนุษย์, ลิงแสม, ลิงกัง	A1H1	6	695,665 ถึง 696,324	PKA1H_060020800
		H	6	686,497 ถึง 687,156	PKNH_0615700
		Malayan Strain PK1 A	NA	714,552 ถึง 715,211	PKNOH_503330500

ตารางที่ S8 (ต่อ)

สปีชีส์	โฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยง กระดูกสันหลัง	สายพันธุ์	โครโมโซม	ตำแหน่งบนโครโมโซม	Genomic sequence ID
<i>P. malariae</i>	มนุษย์	UG01	10	1,533,585 ถึง 1,534,235	PmUG01_ 10042200
<i>P. ovale curtisi</i>	มนุษย์	GH01	10	599,129 ถึง 599,782	PocGH01_ 06024100
<i>P. vivax</i>	มนุษย์	P01	6	669,833 ถึง 671,486	PVP01_0616100
		Sal-1	6	663,994 ถึง 665,046	PVX_111175
<i>P. adleri</i>	กอดิล่า	G01	10	1,139,994 ถึง 1,140,647	PADL01_1029400
<i>P. billcollinsi</i>	ชิมแปนซี	G01	10	1,222,898 ถึง 1,223,551	PBILCG01_ 1030000
<i>P. blacklocki</i>	กอดิล่า	G01	10	1,147,227 ถึง 1,147,880	PBLACG01_ 1029500
<i>P. coatneyi</i>	ลิงวอก, ลิงแสม	Hackeri	6	606,216 ถึง 609,312	PCOAH_00013950

ตารางที่ S8 (ต่อ)

สปีชีส์	โฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยง กระดูกสันหลัง	สายพันธุ์	โครโมโซม	ตำแหน่งบนโครโมโซม	Genomic sequence ID
<i>P. cynomolgi</i>	ลิงวอก, ลิงแสม	B	6	687,138 ถึง 687,864	PCYB_062520
<i>P. gaboni</i>	ชิมแปนซี	M	6	731,685 ถึง 732,344	PcyM_0619900
		G01	10	1,121,215 ถึง 1,121,868	PGABG01_1028900
<i>P. praefalciparum</i>	กอลิต่า	SY75	10	1,136,988 ถึง 1,137,641	PGSY75_1031000
		G01	10	1,264,586 ถึง 1,265,239	PPRFG01_1032100
<i>P. reichenowi</i>	ชิมแปนซี	CDC	10	1,198,086 ถึง 1,198,739	PRCDC_1030300
		G01	10	1,179,907 ถึง 1,180,560	PRG01_1029500
<i>P. berghei</i>	หนู mice, หนู rats	ANKA	5	561489 ถึง 562142	PBANKA_0515000

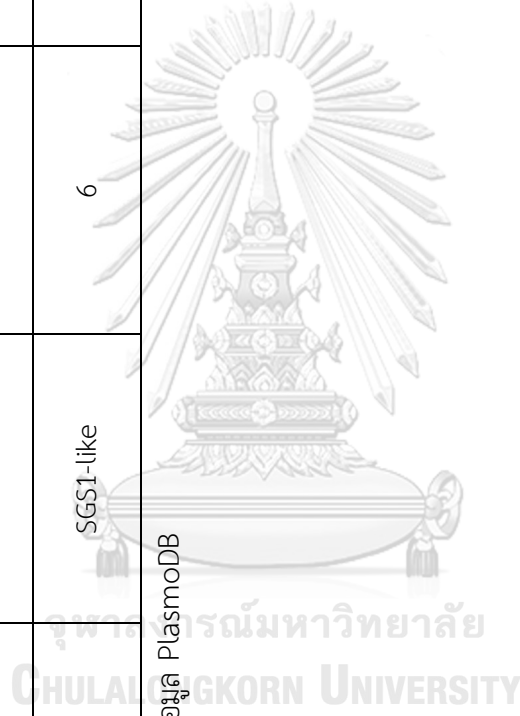
ตารางที่ S8 (ต่อ)

สปีชีส์	โฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยง กระดูกสันหลัง	สายพันธุ์	โครโมโซม	ตำแหน่งบนโครโมโซม	Genomic sequence ID
<i>P. chabaudi</i> <i>chabaudi</i>	หนู mice, หนู rats	AS	5	560,389 ถึง 561,042	PCHAS_0515100
<i>P. vinckei</i>	หนู mice, หนู rats	Cameroon EL	13	1,621,690 ถึง 1,622,343	PVSEL_1304310
<i>P. vinckei</i> <i>brucechwatti</i>	หนู mice, หนู rats	DA	5	583,409 ถึง 584,062	PVBDA_0501560
<i>P. vinckei lentum</i>	หนู mice, หนู rats	DE	5	540,282 ถึง 540,935	PVLDE_0501530
<i>P. vinckei petteri</i>	หนู mice, หนู rats	CR 2020	13	1,650,629 ถึง 1,651,282	PVPCR_1304420
<i>P. vinckei vinckei</i>	หนู mice, หนู rats	CY	5	558,989 ถึง 559,642	PWVCY_0501550
<i>P. yoelii yoelii</i>	หนู mice, หนู rats	YM	5	611,615 ถึง 612,268	PYYM_0515400
		17X	5	669,833 ถึง 671,486	PY17X_0516000

ตารางที่ S8 (ต่อ)

สปีชีส์	โฮสต์ที่เป็นสัตว์เลี้ยง กระดูกสันหลัง	สายพันธุ์	โครโมโซม	ตำแหน่งบนโครโมโซม	Genomic sequence ID
<i>P. gallinaceum</i>	ไก่	8A	NA	710,499 ถึง 711,146	PGAL8A_00490300
<i>P. relictum</i>	นก	SGS1-like	6	575,235 ถึง 575,879	PRELSG_0614700

หมายเหตุ : NA แทนไม่พบรายงานในฐานข้อมูล Plasmadb



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พรปวีณ์ สุขพงษ์ไทย
วัน เดือน ปี เกิด	12 ธันวาคม 2538
สถานที่เกิด	ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)
ที่อยู่ปัจจุบัน	32/1/1 หมู่5 ซอยสุขประยูร12 ถนนสุขประยูร ตำบลบางตีนเป็ด อำเภอเมืองฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา 24000
ผลงานตีพิมพ์	Global diversity of the gene encoding the Pfs25 protein-a Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidate
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลดีเด่นเหรียญทอง ประเภท oral presentation กลุ่มที่ 1 สาขาชีววิทยาและการประยุกต์ วิทยาศาสตร์การประมง วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์การเกษตร วิทยาศาสตร์สุขภาพ จุลชีววิทยา วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยาประยุกต์ วิทยาศาสตร์การอาหาร และเทคโนโลยีทางอาหาร ในการประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 12 ระหว่าง วันที่ 6-7 พฤษภาคม พ.ศ. 2564 จัดโดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร