

รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์

การตอบสนองและกลไกการดื้อยาต่อกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin
และยาต้านมาลาเรียที่ใช้ร่วมในเชื้อ *Plasmodium falciparum*

In vitro sensitivity and resistance mechanism of artemisinin derivatives
and their combined antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*

พันเอก ศาสตราจารย์ มหิรุทธ มุ่งถิ่น
วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

1.1 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเครือข่ายวิจัยกลุ่มสถาบันแพทยศาสตร์แห่งประเทศไทย (Medical Research Network: MedResNet) และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยและอำนวยความสะดวกในทุกด้านจนทำให้โครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลบ่อไร่ อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด โรงพยาบาลคลองใหญ่ อำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด โรงพยาบาลค่ายสุรสีห์ อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี และเจ้าหน้าที่กองกำลังสุรนารี เขาพระวิหาร อ.กันทรลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ ที่ช่วยเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อ

1.2 บทคัดย่อ (Abstract)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวต่อยาต้านมาลาเรียกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin และยาที่ใช้ร่วมใน artemisinin derivative based combination therapy (ACT) และลักษณะทางพันธุกรรมของการดื้อยาในเชื้อ *Plasmodium falciparum* จากชายแดนไทยพม่าและไทยกัมพูชาจำนวน 95 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อเกือบทั้งหมดเป็นเชื้อที่ไม่ดื้อต่อ artesunate และ dihydroartemisinin พบจุดกลายพันธุ์บนยีนดื้อยา artemisinin, Kelch13 propeller ประมาณ 77% ซึ่งจุดกลายพันธุ์ส่วนใหญ่คือ C580Y เชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชา มี *pfmdr1* 184F allele ทุกสายพันธุ์และ copy number ประมาณ 1 copy เชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยพม่า พบว่ามี *pfmdr1* 184F allele อยู่ 47.2% และมี copy number เฉลี่ย 2.5 copy เชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อ mefloquine ซึ่งอาจนำมาสู่การล้มเหลวจากการรักษาโดย artesunate-mefloquine ในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขจึงได้พิจารณาเปลี่ยนยาหลักสำหรับการรักษามาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* เป็น dihydroartemisinin-piperaquine การศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ในครั้งนี้พบว่าเชื้อที่มี *pfmdr1* 86Y allele จะมีความไวต่อ piperaquine ลดลง การนำ dihydroartemisinin-piperaquine มาใช้ในประเทศไทย ควรมีการทดสอบก่อนใช้ และการเฝ้าระวังอย่างเหมาะสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งชายแดนไทยมาเลเซีย ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่มี *pfmdr1* 86Y allele artesunate-pyronaridine เป็น ACT ใหม่ที่มีประสิทธิภาพ ค่า pyronaridine IC₅₀ ของเชื้อในการศึกษานี้ต่ำกว่าค่าที่เคยรายงานไว้ในเชื้อ recrudescence ในประเทศไทย 3-220 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. falciparum* ที่มี *pfmdr1* haplotype ต่างกัน ไม่พบว่าค่า IC₅₀ ของ pyronaridine มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม ดังนั้น artesunate-pyronaridine อาจเป็นยา ACT ที่เหมาะสมสำหรับพื้นที่ที่เชื้อ *P. falciparum* มีความหลากหลายของลักษณะยีนดื้อยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *pfmdr1* ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่แตกต่างกันทำให้เชื้อ *P. falciparum* มีความไวต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกัน การทดสอบความไวต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ และการสำรวจข้อมูลพื้นฐานของลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาในเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยจะต้องทำอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อ ข้อมูลเหล่านี้ยังนำไปใช้พิจารณาการใช้ยาที่เหมาะสม

คำสำคัญ: *Plasmodium falciparum*, drug resistance, Thailand, *pfmdr1*, Kelch13 propeller, artemisinin, artemisinin derivative based combination therapy (ACT), piperaquine, pyronaridine

This study aimed to determine in vitro sensitivities of artemisinin derivatives and their partner drugs in artemisinin derivative based combination therapy (ACT) and genetic characterization of resistant genes in 95 *Plasmodium falciparum* isolates collected from Thai-Myanmar and Thai-Cambodia borders. Almost all isolates were sensitive to artesunate and dihydroartemisinin. Approximately seventy seven percent of the samples had a mutation on an artemisinin-resistant gene, Kelch13 propeller which C580Y mutation was predominant. All parasites isolated from Thai-Cambodia border contained 184F allele with 1 copy number of *pfmdr1* gene. In contrast, the parasites collected from Thai-Myanmar border had the *pfmdr1* 184F allele at 47.2% and contained a few copy number of the *pfmdr1* gene with the average of 2.5 copies. Most isolates were resistant to mefloquine which might lead to treatment failure of artesunate-mefloquine in Thailand. Consequently, The Ministry of Public Health has changed the first-line treatment for falciparum malaria to dihydroartemisinin-piperaquine. The present study shows that the parasites containing the *pfmdr1* 86Y allele exhibited reduced piperaquine sensitivity. Prior to nationwide implication of dihydroartemisinin-piperaquine usage in Thailand, efficacy testing should be conducted. In addition, regular monitoring should be properly performed especially in Thai-Malaysia border where most parasites contained the *pfmdr1* 86Y allele. Artesunate-pyronaridine is a new effective ACT. The parasites' pyronaridine IC₅₀ in this study were 3-220 times lower than the IC₅₀ of a recrudescence parasite previously reported in Thailand. In addition, there was no significant difference of pyronaridine IC₅₀ among the parasites with different haplotypes. Thus, artesunate-pyronaridine may be a suitable ACT of choice in the area containing parasites with varied resistant haplotypes especially the *pfmdr1* haplotypes. In vitro sensitivities and genotypic characterization of the resistant genes of *P. falciparum* should be continuously monitored in order to detect the emergence of antimalarial resistance. Rationale drug use can be guided using this information.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, drug resistance, Thailand, *pfmdr1*, Kelch13 propeller, artemisinin, artemisinin derivative based combination therapy (ACT), piperaquine, pyronaridine

1.3 สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	ii
บทคัดย่อ (Abstract)	iii
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	v
สารบัญตาราง (List of Tables)	vii
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	ix
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัยฯ (List of Abbreviations)	ix
บทนำ (Introduction)	1
เครื่องมือและวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)	6
ลักษณะตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา	6
การเลี้ยงเชื้อ	6
การทดสอบการตอบสนองต่อยา	6
การศึกษาพันธุกรรมของยีนดื้อยา <i>pfcr</i> และ <i>pfmdr1</i> โดย Polymerase Chain Reaction (PCR)	7
การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน K13-propeller จะทำโดยเทคนิค nested PCR	9
การเก็บรวบรวมข้อมูล	10
การวิเคราะห์ผลการวิจัย	10
ผลการวิจัย	10
การพัฒนาเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559	10
การทดสอบการตอบสนองต่อยาเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559	10
ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา <i>pfcr</i> และ <i>pfmdr1</i> ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559	12

ความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา <i>pfmdr1</i>	14
ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา K13 propeller ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559	14
การตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียและลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาของเชื้อ <i>P. falciparum</i> ที่แยกจากจังหวัดตราด ได้ในช่วงเวลาต่างๆ	16
การตอบสนองต่อยา piperazine และลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่มีผลต่อยา piperazine ในเชื้อ <i>P. falciparum</i>	24
การตอบสนองต่อยา pyronaridine และลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่มีผลต่อยา pyronaridine ในเชื้อ <i>P. falciparum</i>	29
การพัฒนาเชื้อ <i>P. falciparum</i> สายพันธุ์ดื้อยา artemether ในหลอดทดลอง (Intermittent drug pressure)	32
ข้อวิจารณ์ (Discussion)	33
สรุปและขอเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	39
บรรณานุกรม (Bibliography)	42

1.4 สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 Primer and probe sequences ที่ใช้ในการตรวจหา polymorphisms ของยีน <i>pfcr</i> และ <i>pfmdr1</i>	8
ตารางที่ 2 ผลความไวของเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> ต่อยาต้านมาลาเรียต่างๆ	11
ตารางที่ 3 เชื้อดื้อยาต้านมาลาเรียที่ตรวจพบในพื้นที่ต่างๆ	12
ตารางที่ 4 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา <i>pfcr</i> และ <i>pfmdr1</i> ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ไทยกัมพูชาและไทยพม่า	13
ตารางที่ 5 จุดกลายพันธุ์ที่ตรวจพบบน Kelch 13 propeller gene ในเชื้อ <i>Plasmodium falciparum</i> สายพันธุ์ไทยจำนวน 135 สายพันธุ์	15
ตารางที่ 6 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา <i>pfcr</i> และ <i>pfmdr1</i> ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ	16
ตารางที่ 7 จุดกลายพันธุ์ที่ตรวจพบบน Kelch 13 propeller gene ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ	17
ตารางที่ 8 ความไวต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ	19
ตาราง 9 สัดส่วนของเชื้อดื้อยา chloroquine, quinine, mefloquine, artesunate, dihydroartemisinin และ atovaquone ของเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ	22
ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีพันธุกรรมยีนดื้อยา <i>pfmdr1</i> ที่ต่างกัน ต่อยาต้านมาลาเรียในเชื้อที่แยกได้จากจังหวัดตราด	23
ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยของ piperazine IC ₅₀ และ <i>pfmdr1</i> mutations ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ไทยพม่าและไทยกัมพูชา	25
ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีพันธุกรรมยีนดื้อยา <i>pfmdr1</i> ที่ต่างกันต่อยา piperazine	26

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อต่อยา piperaquine ในเชื้อที่มี <i>pfmdr1</i> haplotype กลุ่มต่างๆ	27
ตารางที่ 14 การวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อที่ลดค่าความไวต่อ piperaquine โดยใช้ Univariate and multivariate analysis	28
ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยของ pyronaridine IC ₅₀ และ <i>pfmdr1</i> mutations ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ ไทยพม่าและไทยกัมพูชา	30
ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีพันธุกรรมยีนดื้อยา <i>pfmdr1</i> ที่ต่างกันต่อยา pyronaridine	31
ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อต่อยา pyronaridine ในเชื้อที่มี <i>pfmdr1</i> haplotype กลุ่มต่างๆ	32
ตารางที่ 18 ค่า Artemether IC ₅₀ , Dihydroartemisinin IC ₅₀ , % Ring survival และ K13 propeller ของเชื้อ K1AM1000 และ G112AM1000 เมื่อเปรียบเทียบกับ K1 และ G112	33
ตารางที่ 19 นิยามของพื้นที่ระบาดเชื้อดื้อยา artemisinin (WHO, 2016)	34

1.5 สารบัญภาพ (List of Illustrations)

-

1.6 คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ACT	Artemisinin-based combination therapy
IC ₅₀	Inhibitory concentration of 50%
K13 propeller	Kelch 13 propeller
N	number
nM	nanomolar
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfcr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
<i>Pfmdr1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistance 1
RSA	Ring-stage survival assay
WHO	World Health Organization

บทนำ (Introduction)

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขสำหรับประเทศไทย โดยเฉพาะมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญเนื่องจากสามารถก่อให้เกิดอาการรุนแรงจนเสียชีวิตได้ เช่น มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ไตวายเฉียบพลัน (Acute renal failure) และ ปอดบวมน้ำ (Pulmonary edema) เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยได้พัฒนาจนสามารถลดการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียได้หลายชนิดทั้งในกลุ่ม quinolines และ antifolates ภาวะการดื้อยานี้ทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา (อ.บ่อไร่ จ.ตราด) และชายแดนไทย-พม่า (อ.แม่สอด จ.ตาก) เนื่องจากปัญหาในการดื้อยาประเทศไทย จึงมีการนำยากลุ่มใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษามาลาเรียเกิดจากเชื้อ *P. falciparum* มาใช้และได้ผลเป็นที่น่าพอใจคือ กลุ่มอนุพันธ์ artemisinin การให้การรักษาด้วยยาในกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin นี้ตัวเดียวพบการกลับเป็นซ้ำ (recrudescence) ได้สูง โดยเฉพาะในรายที่มีอาการรุนแรงและในผู้ป่วยที่มีเชื้อในเลือดสูง องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้แนะนำให้ใช้ยาในกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin เช่น artesunate และ artemether ร่วมกับยาอื่น ๆ ในการรักษามาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ดังนั้นทำให้มีการใช้ยาเหล่านี้ทั่วโลกในแบบการใช้ร่วมกับยาอื่น (artemisinin-based combination therapy, ACT) (WHO, 2010) ในประเทศไทยยาในกลุ่มนี้คือ artesunate ซึ่งถูกใช้ร่วมกับยาในกลุ่มที่มีค่าครึ่งชีวิตยาวคือ mefloquine จากการสำรวจอัตราการหายขาดในผู้ป่วยมาลาเรียบริเวณถิ่นระบาดทั่วประเทศไทยในปี พ.ศ. 2546 พบว่าการรักษาด้วย artesunate ร่วมกับ mefloquine ในบางพื้นที่ให้ผลการรักษาหายขาดไม่ถึง 80% (Vijaykadga et al., 2006)

การเฝ้าระวังการหายขาดของการใช้ยาร่วมระหว่าง artesunate และ mefloquine บริเวณ อ.บ่อไร่ จ.ตราด พบอัตราการหายขาดอยู่ระหว่าง 75.0-93.3% ในช่วงปี พ.ศ.2545-2549 การศึกษาอัตราการหายขาดของการรักษามาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมโดยใช้ artesunate และ mefloquine ที่ จ.ไพลิน กัมพูชา เปรียบเทียบกับ จ.ตาก ประเทศไทยพบอัตราการหายขาด 95% อย่างไรก็ตามพบว่าที่ไพลินยาสามารถกำจัดเชื้อในกระแสเลือดได้ช้ากว่าผู้ป่วยจาก จ.ตาก (Dondrop et al., 2009) จากหลักฐานดังกล่าวอาจเป็น

ข้อบ่งชี้ว่าเชื้ออาจมีการพัฒนาให้ดื้อต่อยากลุ่มนี้แล้ว จากการติดตามการรักษาโดยใช้ artesunate และ mefloquine ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ที่จังหวัดตาก เป็นเวลา 13 ปี พบว่าอัตราการหายขาดยังสูงกว่า 90% อย่างไรก็ตามพบว่ายาสามารถกำจัดเชื้อภายใน 48 ชั่วโมงได้เพียง 70% ในช่วงปี พ.ศ.2547-2548 ในขณะที่ในช่วงปี พ.ศ.2542-2543 พบว่าเกือบร้อยละแปดสิบที่สามารถกำจัดเชื้อให้หายไปได้ภายใน 48 ชั่วโมง (Carrara et al., 2009) ปัจจุบัน WHO จึงได้กำหนดให้มีการตรวจเพื่อเฝ้าระวังเชื้อในกระแสเลือดหลังจากให้ยาแล้ว 72 ชั่วโมงว่าหมดไปหรือไม่ เพื่อเป็นการเฝ้าระวัง artemisinin resistance (WHO, 2014a) ในปี พ.ศ.2552 การศึกษาบริเวณชายแดนไทยกัมพูชาพบผู้ป่วยที่มีเชื้อหลังจากให้ยาแล้ว 72 ชั่วโมง ประมาณ 50% อย่างไรก็ตามการศึกษาในผู้ป่วยจะต้องใช้การติดตามผู้ป่วยเป็นเวลานานและเจาะเลือดหลายครั้งซึ่งทำให้ไม่สะดวกต่อการศึกษา ในปี พ.ศ.2556 Witkowski และคณะได้นำเทคนิค In vitro ring survival assay มาใช้ ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *P. falciparum* 72 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มียา dihydroartemisinin เข้มข้น 700 nM มีความสัมพันธ์กับ half-life ของเชื้อที่พบในกระแสเลือดผู้ป่วยหลังได้รับการรักษาด้วยยาร่วม ACT เป็นอย่างดี ข้อดีของเทคนิค In vitro ring survival assay คือสามารถทดสอบในเชื้อ *P. falciparum* ที่ถูกเลี้ยงในห้องทดลองหรือเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวได้ (Witkowski et al., 2013)

ปี พ.ศ. 2557 Arieu และคณะได้รายงานการค้นพบจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา artemisinin (Arieu et al., 2014) โดยคณะผู้วิจัยได้พัฒนาเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ดื้อยา artemisinin ในหลอดทดลองด้วยวิธี In vitro drug pressure จากนั้นได้ทำ whole genome sequencing ของเชื้อดื้อยาเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น พบว่าเชื้อที่มี จุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ที่ตำแหน่ง C580Y และ R539T มี Ring survival rate ที่นานกว่าเชื้อที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อมีการศึกษาในผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยมาลาเรียที่พบเชื้อที่มีจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ที่ตำแหน่ง C580Y, R539T และ Y493H จะมี parasite clearance half-life นานกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่ไม่มีจุดกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหลังจากนั้นก็ได้มีการรายงานการกระจายของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ดื้อยา artemisinin ซึ่งมีจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ไปหลายๆ พื้นที่ในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ashley et al., 2014; Takala-Harrison et al., 2015; Talundzic et al., 2015; Tun et

al., 2015; Wang et al., 2015) การศึกษาในปัจจุบันพบว่าประเทศที่มีเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ดื้อยา artemisinin กระจายอยู่จะพบจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง ตัวอย่างเช่นในประเทศพม่าเมือง Shan, Kayin, Sagaing และ Mon พบ 66.7%, 47.6%, 45.7% และ 37.5% ตามลำดับ (Ashley et al., 2014) ที่แม่สอด จังหวัดตาก ประเทศไทยพบได้ 77.6% ในประเทศกัมพูชาพบว่ามีจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ได้สูงในเมืองที่ติดชายแดนไทย เช่นที่ Pailin พบ 95% Battambang พบ 93% ในขณะที่เมืองที่ติดชายแดนลาวจะพบน้อยกว่า เช่น Preah Vihear พบ 16% หรือ Ratanakiri พบเพียง 6% (Ariey et al., 2014) ในขณะที่บางประเทศที่ยังไม่มีปัญหาเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ดื้อยา artemisinin จะพบว่าเชื้อมีจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำ เช่น บังคลาเทศ และ เซเนกาล เป็นต้น (Mohon et al., 2014; Torrentino-Madamet et al., 2014)

ปัจจุบัน WHO ได้บรรจุ K13 marker surveillance เข้าไปใน revised definition of artemisinin resistance (WHO, 2014b) อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของยีน K13 propeller ในประเทศไทยยังมีจำกัด การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน K13 propeller ในประเทศไทยควรจะทำการศึกษาในเชื้อ *P. falciparum* ที่มาจากหลายหลายพื้นที่ เนื่องจากเชื้อเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งในแง่ phenotype และ genotype ของการดื้อยา ซึ่งในหลายประเทศ เช่น พม่า และกัมพูชา ได้รายงานเปอร์เซ็นต์ของการกลายพันธุ์ของยีน K13 propeller มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ของประเทศ นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างของการกระจายของตำแหน่งกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละพื้นที่ด้วย การศึกษาในประเทศพม่าพบว่าจุดกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยคือ C580Y, F446I และ M476I ส่วนจุดกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในประเทศกัมพูชาคือ C580Y, R539T และ Y493H (WHO, 2016)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาการศึกษาถึงลักษณะ multidrug resistance ในเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งจะมีการดื้อข้าม (cross resistance) ระหว่าง mefloquine, halofantrine และ quinine กลไกการดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ในระดับยีนจะพบว่าขึ้นอยู่กับยีน *pfmdr1* ยีนนี้มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยา mefloquine, halofantrine และ quinine ทั้งเชื้อที่เลี้ยงในห้องทดลองและเชื้อที่แยกได้จากการศึกษาผู้ป่วยในพื้นที่ (Wilson et al., 1989; Wilson et al., 1993; Price et al., 1999) Wilson และคณะ (1989) ศึกษาเชื้อที่เลี้ยงในห้องทดลองพบว่าเชื้อที่มีจำนวนชุด (copy number) ของยีน *pfmdr1* มากขึ้น (amplification) จะมี

ความสัมพันธ์กับการลดลงของการตอบสนองต่อยา mefloquine, halofantrine และ quinine หลังจากนั้นได้มีการทดสอบเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก็พบความสัมพันธ์นี้เช่นกัน (Wilson et al., 1993) ถึงแม้ว่าการศึกษาในประเทศไทยโดย Price และคณะ พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่แสดงการดื้อต่อ mefloquine, halofantrine และ quinine ส่วนหนึ่งเท่านั้นที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* (Price et al., 1999) ความสัมพันธ์นี้ได้มีการยืนยันโดยการทดลองทำให้เชื้อดื้อต่อ mefloquine (In vitro selection for mefloquine resistance) พบว่าเชื้อเหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* มากขึ้น (Cowman et al., 1994; Peel et al., 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรียในประเทศไทย ทั้งที่ทำได้โดย Price และคณะ และ Chaiyaroj และคณะ พบเชื้อที่ดื้อต่อยา mefloquine บางสายพันธุ์มียีน *pfmdr1* ชุดเดียว (Price et al., 1999; Chaiyaroj et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อที่ทำให้ดื้อต่อ mefloquine บางสายพันธุ์ที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* (Lim et al., 1996) ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับที่พบในการทดลองที่ทำให้เชื้อดื้อต่อ halofantrine (In vitro selection for halofantrine resistance) เชื้อนี้แสดงลักษณะดื้อข้ามต่อ mefloquine และ quinine และไม่พบการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* เมื่อเทียบกับเชื้อแม่พันธุ์ (Ritchie et al., 1996) ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อเหล่านี้อาจมีกลไกการดื้อยาอื่นๆ อย่างไรก็ตามกลไกอื่นที่เชื่อว่ามีผลต่อทำให้เชื้อดื้อยา mefloquine, halofantrine และ quinine ในปัจจุบันยังคงมีความเกี่ยวข้องกับยีน *pfmdr1* กล่าวคือ เชื้อที่มีลักษณะของยีนเป็น wild type จะดื้อต่อยากลุ่มนี้มากกว่าเชื้อที่มีลักษณะยีนที่กลายพันธุ์ (Mungthin et al., 1999; Reed et al., 2000) ลักษณะยีน *pfmdr1* ที่กลายพันธุ์มี 2 ลักษณะคือ K1-type ซึ่งพบในทวีปเอเชียและแอฟริกา และ 7G8-type ซึ่งพบในทวีปอเมริกาใต้ (Foote et al., 1990) การทดลองโดยใช้ระบบ Transfection ในเชื้อ *P. falciparum* พบว่าเมื่อมีการถ่ายทอดยีน *pfmdr1* ชนิด wild type จะทำให้เชื้อดื้อต่อ mefloquine, halofantrine และ quinine มากขึ้น (Reed et al., 2000) ความไวของยา quinoline ตัวใหม่ที่นำมาใช้ร่วมกับยาอนุพันธ์ artemisinin เช่น lumefantrine ก็พบว่าถูกควบคุมโดยยีน *pfmdr1* เช่นกัน (Mungthin et al., 2010a)

นอกจากจะมีผลในการกำหนดการตอบสนองต่อยาในกลุ่ม quinoline แล้ว ยีน *pfmdr1* น่าจะมีผลต่อการตอบสนองต่อยาในกลุ่ม artemisinin ด้วย การทดลองในเชื้อที่ได้จากการทำ genetic cross ระหว่าง HB3 และ 3D7 พบว่าการกลายพันธุ์ของ amino acid ที่ตำแหน่ง 184 บนยีน *pfmdr1* มีผลต่อการ

ตอบสนองต่อกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin (Duraisingh et al., 2000a) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรีย ประเทศแอมบีย ไม่พบความสัมพันธ์นี้ แต่พบว่าในเชื้อที่มีการตอบสนองไวต่อกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin กว่า จะพบการกลายพันธุ์ของ amino acid ที่ตำแหน่ง 86 บนยีน *pfmdr1* (Duraisingh et al., 2000a) การศึกษาในผู้ป่วยพบว่าการตอบสนองต่อยา artesunate มีความสัมพันธ์กับจำนวน copy ของยีน *pfmdr1* (Alker et al., 2007; Lim et al., 2009) อย่างไรก็ตาม การศึกษาความสัมพันธ์นี้ทำอยู่ในวงจำกัด การศึกษาเชื้อจากพื้นที่ต่างๆทั่วโลกจะเป็นหลักฐานในการยืนยันความสัมพันธ์เหล่านี้

ปัจจุบันประเทศไทยได้พิจารณาการรักษามาลาเรียชนิดพัลซิพารัมที่มีอาการไม่รุนแรงตัวใหม่เพื่อทดแทนยาาร่วม artesunate และ mefloquine ยามาลาเรียใหม่ที่ผลิตออกมามีไม่มากนัก เป็นยาที่อยู่ในกลุ่ม ACT ทั้งหมด โดยยาใหม่เหล่านี้จะเป็นยาที่อยู่ในเม็ดเดียวกันทั้งสองตัว ได้แก่ artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, dihydroartemisinin-piperaquine และ artesunate-pyronaridine (WHO, 2010; Anthony et al., 2012) อย่างไรก็ตามข้อมูลการตอบสนองต่อยาเหล่านี้ (In vitro sensitivity) การดื้อข้าม (Cross resistance) และความสัมพันธ์ของการตอบสนองของยากับยีนดื้อยาต่างๆ ในเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยยังมีไม่เพียงพอ ถึงแม้ว่าในประเทศไทยจะเคยมีการรายงานลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาของเชื้อ *P. falciparum* ในอดีต อย่างไรก็ตามลักษณะเหล่านี้มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทย และจะเปลี่ยนไปในช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ยาด้านมาลาเรียที่แตกต่างกันในแต่ละช่วง (Mungthin et al., 2010a; Mungthin et al., 2010b; Poyomtip et al., 2012) คณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะการตอบสนองต่อยาของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ไทยต่อกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin และยาที่ใช้ร่วมใน artemisinin derivative based combination therapy (ACT) ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่อาจมีผลต่อการตอบสนองต่อยากลุ่มอนุพันธ์ artemisinin และยาที่ใช้ร่วมใน ACT ของเชื้อ *P. falciparum* และเพื่อศึกษาลักษณะการตอบสนองต่อยากลุ่มอนุพันธ์ artemisinin ของเชื้อ *P.* ในลักษณะต่างๆ เช่น Ring-stage survival assay (RSA) เป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการตัดสินใจเลือกยาที่เหมาะสมสำหรับการรักษามาลาเรียชนิดพัลซิพารัมที่มีอาการไม่รุนแรงในประเทศไทย นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาตัวใหม่เพื่อใช้ในการรักษามาลาเรียชนิดพัลซิพารัมที่ดื้อยา

ต่อไป และข้อมูลทางลักษณะอนุพันธุ์กรรมยังเป็นประโยชน์ที่สามารถนำมาทำนายผลการรักษาและใช้เป็น
เครื่องบ่งชี้ในการเลือกใช้ยาได้

2.2 เนื้อเรื่อง (Main body)

2.2.1 เครื่องมือและวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

2.2.1.1 ลักษณะตัวอย่างหรือประชากรที่ทำการศึกษา

เชื้อ *P. falciparum* ประมาณ 95 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรียซึ่งมาตรวจรักษาที่
สถานพยาบาล ในพื้นที่ระบาดชายแดนไทย-พม่า และไทย-กัมพูชา โดยเลือดที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัย
ถูกนำมาเลี้ยงในห้องทดลองและเก็บอยู่ในถังไนโตรเจนเหลว ภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัย
แพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

2.2.1.2 การเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *P. falciparum* ถูกเลี้ยงใน sterile flask ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Trager and Jensen, 1976)
ในน้ำเลี้ยงเชื้อ complete medium (RPMI1640, 10% AB serum, 2.5% ของ 1M HEPES, 0.1% ของ 10
มก./มล. Gentamicin solution) ภายใต้ 93% N₂, 3% O₂, 4% CO₂ และอุณหภูมิ 37°C ปริมาณเชื้อถูก
ตรวจโดยการย้อมด้วย Giemsa ทุกวัน โดยเจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 1-2% parasitemia ยกเว้นในกรณี
ที่ต้องการเชื้อในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่านี้ เชื้อที่เหลือใช้ถูกเก็บในถังไนโตรเจนเหลว โดยผสมเชื้อใน
cryoprotectant (glycerol/sorbitol in normal saline) ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อต้องการใช้เชื้อเหล่านี้สามารถ
เอาออกมาใช้ได้โดย การปั่นร่วมกับ 3.5% NaCl และล้างด้วย RPMI และเลี้ยงในสภาวะที่กล่าวข้างต้น

2.2.1.3 การทดสอบการตอบสนองต่อยา

การทดสอบการตอบสนองต่อยา artemisinin derivative ได้แก่ artesunate, และ
dihydroartemisinin และยาร่วม ได้แก่ mefloquine, piperaquine, pyronaridine และ amodiaquine
นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบต่อยาต้านมาลาเรียหลัก ได้แก่ chloroquine และ quinine อีกด้วย เชื้อที่แยก
ได้จากจังหวัดตราดจะถูกทดสอบความไวต่อยา atovaquone และ proguanil ด้วย การทดสอบความไวต่อ
ยาทำโดยวิธีของ Desjardins et al. (1979) ซึ่งจะเป็นการวัด hypoxanthine uptake ของเชื้อในน้ำเลี้ยงเชื้อ
ที่มียาในความเข้มข้นที่ต่างกัน เปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา ยาถูกเตรียมในน้ำกลั่น, ethanol,

methanol หรือ DMSO ในความเข้มข้น 10^{-2} M และจะถูกเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วย complete medium เชื้อที่ใช้จะถูกเจือจางให้ได้ 1% parasitemia และใส่รวมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่มียาและไม่มียา และเลี้ยงภายใต้ 93% N₂, 3% O₂, 4% CO₂ และอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ titrated hypoxanthine และทิ้งไว้ภายใต้สภาวะเดิม 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเชื้อใส่แผ่นกรอง ทิ้งไว้ให้แห้งและวัดระดับ hypoxanthine ด้วย scintillation counter ค่าที่วัดได้ในเชื้อที่อยู่ในน้ำเลี้ยงที่มียาถูกเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับเชื้อที่อยู่ในน้ำเลี้ยงที่ไม่มียา ซึ่งสามารถเอามาคำนวณเป็น IC₅₀ (ความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 50%) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ GRAFIT ค่า IC₅₀ ของเชื้อที่ตอบสนองต่อยานี้เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

2.2.1.4 การศึกษาพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfcr* และ *pfmdr1* โดย Polymerase Chain Reaction (PCR)

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* จะทำโดยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reactions-Restriction Fragment Length Polymorphism) โดยใช้ primer ที่ encode ยีน *pfmdr1* ตามด้วยการย่อยโดย restriction endonuclease ที่เฉพาะเจาะจงต่อส่วนที่มีการกลายพันธุ์ โดยใช้ primers และ condition ตามที่ Duraisingh และคณะทำไว้ในปี ค.ศ. 2000 (Duraisingh et al., 2000b) ผลที่ได้จากการศึกษาทางพันธุกรรมนี้จะนำไปเปรียบเทียบกับ การตอบสนองของเชื้อต่อยา การศึกษาจำนวน copy ของยีน *pfmdr1* ในเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ทำโดยเทคนิค TaqMan real-time PCR (Price et al., 2004) โดยใช้ ABI sequence detector 7000 (Applied Biosystems, Warrington, UK)

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *pfcr* จะทำโดยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reactions-Restriction Fragment Length Polymorphism) โดยใช้ primer ที่ encode ยีน *pfmdr1* ตามด้วยการย่อยโดย restriction endonuclease ที่เฉพาะเจาะจงต่อส่วนที่มีการกลายพันธุ์ โดยใช้ primers และ condition ตามที่ Djimde และคณะทำไว้ในปี ค.ศ. 2001 (Djimde et al., 2001) ตารางที่ 1 แสดง Primer and probe sequences ที่ใช้ในการตรวจหา polymorphisms ของยีน *pfcr* และ *pfmdr1*

ตารางที่ 1 Primer and probe sequences ที่ใช้ในการตรวจหา polymorphisms ของยีน *pfcr1* และ *pfmdr1*

Polymorphisms	Primer	Sequence
<i>Pfcr1</i>	TCRP1	5' CCGTTAATAATAAATACACGCAG 3'
	TCRP2	5' CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC 3'
	TCRD1	5' TGTGCTCATGTGTTTAACTT 3'
	TCRD2	5' CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG 3'
<i>Pfmdr1</i> mutations	A1	5' TGTGAAAGATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG 3'
	A3	5' TACTTTCTTATTACATATGACACCACAAACA 3'
	A2	5' GTCAAACGTGCATTTTTTTATTAATGACCATTA 3'
	A4	5' AAAGATGGTAACCTCAGTATCAAAGAAGAG 3'
	O1	5' AGAAGATTATTTCTGTAATTTGATACAAAAAGC 3'
	O2	5' ATGATTCGATAAATTCATCTATAGCAGCAA 3'
	1034f	5'AGAATTATTGTAAATGCAGCTTTATGGGGACTC 3'
	1042r	5'AATGGATAATATTTCTCAAATGATAACTTAGCA 3'
	1246f	5' ATGATCACATTATATTAATAAATGATATGACAAAT 3'
<i>Pfmdr1</i> copy number	<i>pfmdr1</i> -1F	5' TGCATCTATAAACGATCAGACAAA 3'
	<i>pfmdr1</i> -1R	5' TCGTGTGTTCCATGTGACTGT 3'

	<i>pfmdr1</i> -probe	5'TTTAATAACCCTGATCGAAATGGAACCTTTG 3'
	β -tubulin-1F	5' TGATGTGCGCAAGTGATCC 3'
	β -tubulin-1R	5' TCCTTTGTGGACATTCTTCCTC 3'
	β -tubulin-probe	5' TAGCACATGCCGTTAAATATCTTCCATGTCT 3'

2.2.1.5 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน K13-propeller จะทำโดยเทคนิค nested PCR

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน K13-propeller จะทำโดยเทคนิค nested PCR และ sequencing โดยใช้ primer และ condition ตามที่ Ariei และคณะทำไว้ในปี ค.ศ. 2014 (Ariei et al., 2014) โดยใช้ primers K13_PCR_F/K13_PCR_R (forward: 5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA-3' and reverse: 5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC-3') สำหรับ nested แรกและ primers K13_N1_F/K13_N1_R (forward: 5'-GCCAAGCTGCCATTCATTTG-3' and reverse: 5'-GCCTTGTTGAA AGAAGCAGA-3') สำหรับ nested ที่สอง PCR product ที่ได้จะถูกนำไป sequence เพื่อหาจุดกลายพันธุ์

2.2.1.6 การพัฒนาเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ดื้อยา artemether ในหลอดทดลอง (Intermittent drug pressure)

เชื้อ clone K1 และ G112 ถูกนำมาเลี้ยงใน medium ที่มียา artemether ที่ความเข้มข้น IC_{50} (2 nM) เมื่อเชื้อสามารถเจริญเติบโตดีเมื่อเทียบกับ control เชื้อจะถูกเลี้ยงในความเข้มข้นของยาที่สูงขึ้น จนในที่สุดเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้หลังจากถูกเลี้ยงในความเข้มข้นของยา 1,000 nM จากนั้นเชื้อจะถูกนำมาทดสอบหาค่า IC_{50} ดื้อยา artemether และ dihydroartemisinin เทียบกับเชื้อตั้งต้น นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ 72 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มียา dihydroartemisinin เข้มข้น 700 nM โดยใช้เทคนิค In vitro ring survival assay (Witkowski et al., 2013) นอกจากนี้ยังทำการศึกษา DNA sequence ของยีนดื้อยา artemisinin ได้แก่ K13 propeller เปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้น

2.2.1.7 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลจะถูกเก็บรวบรวมในโปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป

2.2.1.8 การวิเคราะห์ผลการวิจัย

ค่าการตอบสนองของเชื้อต่อยา ที่นำมารายงานจะเป็นค่า mean $\pm$ standard deviation ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง และสามารถทดสอบความแตกต่างในกลุ่มต่างๆ Independent *t* test หรือ One-way ANOVA จากโปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อยาและลักษณะทางพันธุกรรมของยีนจะทดสอบโดยใช้ Chi-square หรือ Fisher's Exact test ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อที่มีความไวลดลงต่อยาด้านมาลาเรียวิเคราะห์โดย Univariate และ Multivariate analysis

2.2.2 ผลการวิจัย

2.2.2.1 การพัฒนาเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559

คณะผู้วิจัยได้ทำการแยกเชื้อ *P. falciparum* จากผู้ป่วยบริเวณชายแดนไทยพม่า จำนวน 36 ตัวอย่าง (ระนอง 12 ตัวอย่าง กาญจนบุรี 24 ตัวอย่าง) และบริเวณชายแดนไทยกัมพูชา จำนวน 59 ตัวอย่าง (ศรีสะเกษ 26 ตัวอย่าง ตราด 33 ตัวอย่าง) รวมทั้งสิ้น 95 ตัวอย่าง และได้นำมาเลี้ยงในห้องทดลองเพื่อทดสอบการตอบสนองต่อยาด้านมาลาเรียชนิดต่างๆ และลักษณะทางพันธุกรรม

2.2.2.2 การทดสอบการตอบสนองต่อยาเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559

เชื้อที่เลี้ยงสำเร็จในห้องทดลองถูกทดสอบความไวต่อยาดังต่อไปนี้คือ chloroquine, mefloquine, quinine, pyronaridine, amodiaquine, piperazine, dihydroartemisinin และ artesunate ผลความไวของเชื้อ *P. falciparum* ต่อยาด้านมาลาเรียดังกล่าวได้ถูกแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลความไวของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ต่อยาต้านมาลาเรียต่างๆ

	Mean (nM)	SD (nM)	Min (nM)	Max (nM)
Pyronaridine	4.0	2.0	0.2	11.3
Amodiaquine	8.8	1.9	1.4	26.8
Piperaquine	22.7	6.7	8.0	33.3
Chloroquine	98.1	45.8	25.7	197.0
Mefloquine	57.0	41.8	4.7	196.6
Quinine	267.4	151.0	52.4	741.3
Dihydroartemisinin	2.4	1.2	0.4	6.3
Artesunate	4.1	2.1	0.9	10.7

เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ chloroquine resistance ที่ $IC_{50} \geq 25$ nM (Pradines et al., 1998b) พบว่าเชื้อทั้งหมดเป็นเชื้อที่ดื้อต่อ chloroquine เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ quinine resistance ที่ $IC_{50} \geq 500$ nM (Pradines et al., 1998b) พบเชื้อดื้อต่อ quinine 12 สายพันธุ์ (12.6%) เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ mefloquine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 30$ nM (Hutin et al., 1992) พบเชื้อดื้อต่อ mefloquine 75 สายพันธุ์ (78.9%) เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ artesunate resistance ที่ $IC_{50} \geq 10.5$ nM (Pradines et al., 1998a) พบเชื้อดื้อยาจำนวน 1 สายพันธุ์ (1.1%) ไม่พบเชื้อดื้อยา dihydroartemisinin และ amodiaquine เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ dihydroartemisinin resistance ที่ $IC_{50} \geq 10.5$ nM (Pradines et al., 1998a) และค่า cut-off point ของ amodiaquine resistance ที่ $IC_{50} \geq 60$ nM (Pradines et al., 1998b) ตารางที่ 3 แสดงเชื้อดื้อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ ในแต่ละพื้นที่ พบสัดส่วนของเชื้อดื้อยา quinine ($p = 0.032$, Fisher's Exact test) และ mefloquine ($p < 0.001$, Fisher's Exact test) ในชายแดนไทยพม่าสูงกว่าชายแดนไทยกัมพูชาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3 เชื้อดื้อยาต้านมาลาเรียที่ตรวจพบในพื้นที่ต่างๆ

พื้นที่	จำนวน	Chloroquine resistance	Amodiaquine resistance	Quinine resistance	Mefloquine resistance	Artesunate resistance	Dihydroartemisinin resistance
		≥ 25 nM	≥ 60 nM	≥ 500 nM	≥ 30 nM	≥ 10.5 nM	≥ 10.5 nM
ไทยกัมพูชา	59	59 (100%)	0 (0%)	4 (6.8%)*	40 (67.8%)*	1 (1.7%)	0 (0%)
ตราด	33	33 (100%)	0 (0%)	2 (6.1%)	26 (78.8%)	0 (0%)	0 (0%)
ศรีสะเกษ	26	26 (100%)	0 (0%)	2 (7.7%)	14 (53.8%)	1 (3.8%)	0 (0%)
ไทยพม่า	36	36 (100%)	0 (0%)	8 (22.2%)	35 (97.2%)	0 (0%)	0 (0%)
กาญจนบุรี	24	24 (100%)	0 (0%)	6 (25.0%)	23 (95.8%)	0 (0%)	0 (0%)
ระนอง	12	12 (100%)	0 (0%)	2 (16.7%)	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
รวม	95	95 (100%)	0 (0%)	12 (12.6%)	75 (78.9%)	1 (1.1%)	0 (0%)

*Significant different determined by Fisher's Exact test ($p < 0.05$)

2.2.2.3 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfcr1* และ *pfmdr1* ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfcr1* และ *pfmdr1* ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ไทยกัมพูชาและไทยพม่า พบว่าเชื้อทั้งหมดมีลักษณะทางพันธุกรรมดื้อต่อ chloroquine โดยมี *pfcr1* 76T allele ทุกสายพันธุ์ ในขณะที่พบว่าเชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชามี *pfmdr1* 184F allele ทุกสายพันธุ์และมี *pfmdr1* copy number ประมาณ 1 copy เมื่อเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยพม่าพบว่ามี *pfmdr1* 184F allele อยู่ 47.2% ซึ่งแตกต่างจากเชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, Fisher's Exact test) และมี *pfmdr1* copy number เฉลี่ยประมาณ 2.5 copy ซึ่งมากกว่าเชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, Independent *t* test)

ตารางที่ 4 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfcr* และ *pfmdr1* ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ไทยกัมพูชา และไทยพม่า

พื้นที่	จำนวน	<i>Pfcr</i>	<i>Pfmdr1</i>	<i>Pfmdr1</i> mutations				
		76T	copy number	86Y	184F	1034C	1042D	1246Y
ไทยกัมพูชา	59	59 (100%)	1.1 ± 0.2	0	59 (100%)	0	0	0
ตราด	33	33 (100%)	1.1 ± 0.1	0	33 (100%)	0	0	0
ศรีสะเกษ	26	26 (100%)	1.1 ± 0.3	0	26 (100%)	0	0	0
ไทยพม่า	36	36 (100%)	2.5 ± 0.9	0	17 (47.2%)	0	0	0
กาญจนบุรี	24	24 (100%)	2.4 ± 0.9	0	8 (33.3%)	0	0	0
ระนอง	12	12 (100%)	2.9 ± 0.8	0	9 (75%)	0	0	0

2.2.2.4 ความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfmdr1*

ไม่พบความแตกต่างของความไวของยา chloroquine, mefloquine, quinine, pyronaridine, amodiaquine, piperazine, dihydroartemisinin และ artesunate ในเชื้อที่มี *pfmdr1* Y184 และ *pfmdr1* 184F allele ($p < 0.05$, Independent t test) เชื้อที่มี *pfmdr1* copy number มากกว่า 1 copy จะมีค่า IC_{50} ของ mefloquine (69.9 ± 46.3) สูงกว่าเชื้อที่มี *pfmdr1* copy number น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 copy (47.2 ± 27.2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, Independent t test)

2.2.2.5 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา K13 propeller ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559

คณะผู้วิจัยได้การตรวจจุลกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในช่วงปี พ.ศ. 2556-2559 จำนวน 135 ประกอบด้วยเชื้อจากผู้ป่วยบริเวณชายแดนไทยพม่า จำนวน 59 ตัวอย่าง และบริเวณชายแดนไทยกัมพูชา จำนวน 76 ตัวอย่าง รวมเป็น 135 สายพันธุ์ซึ่ง ตัวอย่างจำนวน 55 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างที่เก็บได้จากกระทรวงสาธารณสุข ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจพบจุลกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller พบเชื้อที่มีจุลกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller 77.1% โดยเชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชา พบว่ามีจุลกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller 82.9% ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยพม่า พบว่ามีจุลกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller 62.7% ซึ่งจุลกลายพันธุ์ส่วนใหญ่คือ C580Y คิดเป็น 47.4%

ตารางที่ 5 จุดกลายพันธุ์ที่ตรวจพบบน Kelch 13 propeller gene ในเชื้อ *Plasmodium falciparum* สาย

พันธุ์ไทยจำนวน 135 สายพันธุ์

พื้นที่	ไทยกัมพูชา		ไทยพม่า		ทั้งหมด	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
Wild type	13	17.1	22	37.3	35	22.9
C580Y	43	56.6	21	35.6	64	47.4
R539T	16	21.1	2	3.4	18	13.3
Y493H	2	2.6	0	0.0	2	1.5
G538V	1	1.3	4	6.8	5	3.7
T474I	1	1.3	0	0.0	1	0.7
P574L	0	0.0	4	6.8	4	3.0
R561H	0	0.0	1	1.7	1	0.7
A675V	0	0.0	3	5.1	3	2.2
E566D	0	0.0	1	1.7	1	0.7
L514F	0	0.0	1	1.7	1	0.7
รวม	76	100.0	59	100.0	135	100.0

2.2.2.6 การตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียและลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาของเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกจากจังหวัดตราด ได้ในช่วงเวลาต่างๆ

เนื่องจากในปีพ.ศ. 2552 กระทรวงสาธารณสุขได้มีโครงการ Artemisinin Containment ที่พื้นที่ชายแดนไทยกัมพูชาโดยมีการใช้ยา Malarone® (atovaquone-proguanil) แทนที่ artesunate-mefloquine เพื่อลด drug pressure ในบริเวณพื้นที่นี้ ทางผู้วิจัยจึงนำเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากบริเวณชายแดนไทยกัมพูชาในช่วงเวลาก่อนเริ่มโครงการ Artemisinin Containment ซึ่งเก็บในห้องทดลอง มาเปรียบเทียบกับเชื้อบริเวณเดียวกันที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อที่แยกได้หลังจากเริ่มโครงการ Artemisinin Containment ในพื้นที่ชายแดนไทยกัมพูชา มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfcr* 76T allele และ *pfmdr1* 184F allele เกือบทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfcr* และ *pfmdr1* ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ

ปี พ.ศ.	จำนวน	<i>Pfcr</i> 76T	<i>Pfmdr1</i> copy number	<i>Pfmdr1</i> mutations				
				86Y	184F	1034C	1042D	1246Y
2531- 2532	20	0	1.2 ± 0.7	4 (20.0%)	16 (80.0%)	8 (40.0%)	12 (60.0%)	0 (0%)
2534- 2536	15	0	1.2 ± 0.6	1 (6.7%)	13 (86.7%)	2 (13.3%)	4 (26.7%)	0 (0%)
2546	15	2 (13.3%)	1.1 ± 0.3	2 (13.3%)	13 (86.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
หลัง 2552	51	0	1.1 ± 0.2	0 (0%)	49 (96.1%)	2 (3.9%)	0 (0%)	0 (0%)

นอกจากนี้ยังพบสัดส่วนของเชื้อที่มีจุดกลายพันธุ์บน K13 propeller gene สูงขึ้น โดยเฉพาะ C580Y อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$, Chi square test) หลังจากหลังจากเริ่มโครงการ Artemisinin Containment ในปี พ.ศ. 2552 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จุดกลายพันธุ์ที่ตรวจพบบน Kelch 13 propeller gene ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ

พื้นที่	2531-2532		2534-2536		2546		หลัง 2552	
	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
Wild type	15	78.9	11	84.6	9	60.0	6	15.8
C580Y	2	10.5	2	15.4	5	33.3	23	60.5
R539T	0	0	0	0	1	6.7	7	18.4
Y493H	0	0	0	0	0	0	1	2.6
G538V	0	0	0	0	0	0	1	2.6
T474I	1	5.3	0	0	0	0	0	0
V568G	1	5.3	0	0	0	0	0	0
รวม	19	100	13	100	15	100	38	100

ตารางที่ 8 แสดงความไวต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อที่แยกได้ในช่วงต่างๆ พบว่าเชื้อมีค่า IC50 ของ chloroquine, quinine, mefloquine และ artesunate ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, One-way ANOVA) เมื่อใช้ Post Hoc analysis พบว่า เชื้อที่แยกได้หลัง พ.ศ.2552 มีค่าเฉลี่ยของ quinine IC50 สูงกว่าเชื้อในปีพ.ศ. 2546 อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.013$, Scheffe test) เชื้อที่แยกในปี พ.ศ.2531-2532 ค่าเฉลี่ยของ mefloquine IC50 ต่ำกว่า เชื้อที่แยกได้หลัง พ.ศ.2552 ($p = 0.001$, Scheffe test) และ เชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ.2534-2536 ($p = 0.040$, Scheffe test) และ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เชื้อที่แยกได้หลัง พ.ศ.2552 มีค่าเฉลี่ยของ artesunate IC50 สูงกว่าเชื้อในปีพ.ศ. 2546 อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.023$, Scheffe test) ส่วนการตอบสนองของเชื้อต่อ atovaquone ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.717$, Independent t test) ในขณะที่เชื้อที่แยกได้หลัง พ.ศ.2552 มีค่าเฉลี่ยของ proguanil IC50 สูงกว่าเชื้อในปีพ.ศ. 2546 อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.005$, Independent t test)

ตารางที่ 8 ความไวต่อยาต้านมาลาเรียของเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ

ยา	ปี	จำนวน	IC50 (nM)		p value
			Mean	SD	
chloroquine	2531-2532	20	88.5	35.3	0.027
	2534-2536	15	110.9	34.8	
	2546	15	71.8	34.6	
	หลัง 2552	43	111.7	59.2	
quinine	2531-2532	20	195.1	104.2	0.011
	2534-2536	15	220.0	132.9	
	2546	15	124.6	55.4	
	หลัง 2552	45	248.7	142.7	
mefloquine	2531-2532	20	10.9	9.9	< 0.001
	2534-2536	15	35.0	35.3	
	2546	15	18.6	11.7	
	หลัง 2552	45	37.7	26.8	
artesunate	2531-2532	20	3.1	1.3	0.005
	2534-2536	15	2.3	1.4	
	2546	15	2.1	0.7	
	หลัง 2552	45	3.7	2.1	
dihydroartemisinin	2531-2532	16	2.7	1.5	0.449
	2534-2536	14	2.9	1.0	
	2546	14	2.4	1.1	

	หลัง 2552	47	2.3	1.1	
atovaquone	2531-2532	0	.	.	0.717*
	2534-2536	0	.	.	
	2546	9	2.9	1.5	
	หลัง 2552	48	2.3	5.1	
proguanil	2531-2532	0	.	.	0.005*
	2534-2536	0	.	.	
	2546	9	35.0	4.3	
	หลัง 2552	47	55.2	20.3	

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA, $p < 0.05$

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติวิเคราะห์ด้วย Independent t test, $p < 0.05$

เมื่อนำเกณฑ์ cut-off point สำหรับเชื้อดื้อยาใช้ดังต่อไปนี้ Chloroquine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 25$ nM, Quinine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 500$ nM (Pradines et al., 1998b), Mefloquine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 30$ nM (Hatin et al., 1992), Artesunate resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 10.5$ nM, Dihydroartemisinin resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 10.5$ nM (Pradines et al., 1998a) และ Atovaquone resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 1900$ nM (Musset et al., 2006) พบว่าเชื้อทั้งหมดดื้อต่อ chloroquine พบเชื้อดื้อ quinine หลังพ.ศ. 2552 จำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่แยกได้หลัง พ.ศ. 2552 ดื้อต่อ mefloquine มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$, Chi square test) ไม่พบเชื้อดื้อยาต่อ artesunate, dihydroartemisinin และ atovaquone ดังได้แสดงในตารางที่ 9

ตาราง 9 สัดส่วนของเชื้อดื้อยา chloroquine, quinine, mefloquine, artesunate, dihydroartemisinin และ atovaquone ของเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดตราดในช่วงเวลาต่างๆ

ยา	ปี	จำนวนทั้งหมด	Resistant phenotype		p value
			จำนวน	%	
Chloroquine	2531-2532	20	20	100	0.154
	2534-2536	15	15	100	
	2546	15	15	100	
	หลัง 2552	43	43	100	
Quinine	2531-2532	20	0	0	0.200
	2534-2536	15	0	0	
	2546	15	0	0	
	หลัง 2552	45	4	8.9	
Mefloquine	2531-2532	20	2	10.0	< 0.001
	2534-2536	15	6	40.0	
	2546	15	3	20.0	
	หลัง 2552	45	28	62.2	
Artesunate	2531-2532	20	0	0	
	2534-2536	15	0	0	
	2546	15	0	0	
	หลัง 2552	45	0	0	
Dihydroartemisinin	2531-2532	16	0	0	
	2534-2536	14	0	0	
	2546	14	0	0	

	หลัง 2552	47	0	0	
Atovaquone	2531-2532	0	0	0	
	2534-2536	0	0	0	
	2546	9	0	0	
	หลัง 2552	48	0	0	

Chloroquine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 25$ nM, Quinine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 500$ nM, Mefloquine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 30$ nM, Artesunate resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 10.5$ nM, Dihydroartemisinin resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 10.5$ nM และ Atovaquone resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 1900$ nM

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีพันธุกรรมยีนดื้อยา *pfmdr1* ที่ต่างกันต่อยาด้านมาลาเรียในเชื้อที่แยกได้จากจังหวัดตราด

<i>Pfmdr1</i> genotypes		Chloroquine IC_{50} (nM)	Quinine IC_{50} (nM)	Mefloquine IC_{50} (nM)	Artesunate IC_{50} (nM)	Dihydroartemisinin IC_{50} (nM)
86	N86	102.8 ± 49.5	222.9 ± 128.4	30.3 ± 26.6*	3.2 ± 1.8	2.4 ± 1.1
	86Y	67.8 ± 41.9	92.3 ± 71.0	7.6 ± 3.9	2.5 ± 0.9	3.1 ± 1.8
184	Y184	74.7 ± 38.3	104.1 ± 67.7*	12.6 ± 11.6*	2.6 ± 1.1	2.9 ± 1.5
	184F	103.2 ± 50.2	226.1 ± 129.1	30.5 ± 26.9	3.2 ± 1.8	2.4 ± 1.1
1034	S1034	97.8 ± 51.4	210.7 ± 133.0	31.5 ± 26.7*	3.2 ± 1.8	2.5 ± 1.1
	1034C	116.2 ± 33.1	231.2 ± 103.8	8.4 ± 7.8	2.6 ± 1.5	2.6 ± 1.5
1042	N1042	99.0 ± 52.3	207.1 ± 133.8	32.8 ± 26.8*	3.2 ± 1.8	2.4 ± 1.2
	1042D	105.5 ± 34.8	243.6 ± 103.7	7.7 ± 4.8	2.8 ± 1.6	2.7 ± 1.3
Copy No.	≤ 1	96.7 ± 41.2	186.1 ± 96.6	24.1 ± 24.7	2.5 ± 1.1*	2.8 ± 1.5
	> 1	101.7 ± 53.3	225.2 ± 140.5	30.6 ± 26.8	3.4 ± 1.9	2.4 ± 1.0

IC₅₀ values are shown as mean values $\pm$ s.d., * Significant difference determined by Independent *t* test, $p < 0.05$

ตารางที่ 10 แสดงค่าความไวของเชื้อที่มีพันธุกรรมยีนดื้อยา *pfmdr1* ที่ต่างกันต่อยาต้านมาลาเรียในเชื้อที่แยกได้จากจังหวัดตราด พบความแตกต่างของความไวต่อยา mefloquine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงที่จุดกลายพันธุ์ N86Y ($p < 0.001$), Y184F ($p < 0.041$), S1034C ($p < 0.001$) และ N1042D ($p < 0.001$) การเปลี่ยนแปลงที่จุดกลายพันธุ์ Y184F มีผลต่อความไวต่อยา quinine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.004$) สายพันธุ์ที่มียีน *pfmdr1* มากกว่า 1 copy จะมีความไวต่อยา artesunate ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.007$)

2.2.2.7 การตอบสนองต่อยา piperazine และลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่มีผลต่อยา piperazine ในเชื้อ *P. falciparum*

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองของเชื้อในประเทศไทยต่อยา piperazine และผลของลักษณะทางพันธุกรรมยีนดื้อยา คณะผู้วิจัยได้เปรียบเทียบเชื้อในช่วงปีต่างๆ ได้แก่ พ.ศ. 2531-2532 จำนวน 12 สายพันธุ์ พ.ศ. 2536 จำนวน 9 สายพันธุ์ พ.ศ. 2541 จำนวน 60 สายพันธุ์ พ.ศ. 2546 จำนวน 27 สายพันธุ์ และ พ.ศ. 2555-2559 จำนวน 24 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้นจำนวน 132 สายพันธุ์ และเชื้อห้องทดลองมาตรฐานจำนวน 5 สายพันธุ์ (K1, T994, M12, 3D7 and G112) พบว่า piperazine IC₅₀ ของเชื้อทั้ง 132 สายพันธุ์อยู่ระหว่าง 6.4-33.7 nM เชื้อ K1, T994, M12, 3D7 and G112 มี piperazine IC₅₀ ที่ 37.8, 24.7, 37.9, 18.9 และ 14.2 nM ตามลำดับ ตารางที่ 11 แสดงถึงค่าเฉลี่ยของ piperazine IC₅₀ ของเชื้อสายพันธุ์ไทย ไม่พบว่า piperazine IC₅₀ ของเชื้อที่แยกได้จากฝั่งไทยพม่าและฝั่งไทยเขมรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Independent *t* test, $p = 0.223$) ค่าเฉลี่ยของ piperazine IC₅₀ ในเชื้อที่แยกในแต่ละปีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (One-way ANOVA, $p = 0.438$) (ปีพ.ศ. 2531-2532 = 14.9 ± 6.1 nM, พ.ศ. 2536 = 16.1 ± 9.0 nM, ปีพ.ศ. 2541 = 16.4 ± 5.9 nM, พ.ศ. 2546 = 16.8 ± 5.4 nM และพ.ศ. 2555-2559 = 18.6 ± 7.0 nM)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยของ piperazine IC₅₀ และ *pfmdr1* mutations ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ไทยพม่าและ
ไทยกัมพูชา

Area	No.	Piperaquine IC ₅₀ (nM)	<i>pfmdr1</i> copy number	<i>pfmdr1</i> mutations				
				86Y	184F	1034C	1042D	1246Y
Thai- Myanmar	72	16.5±5.8	2.8±1.4	5 (6.9%)	25 (34.7%)	4 (5.6%)	4 (5.6%)	-
Thai- Cambodia	60	16.6±5.2	1.4±0.9	7 (11.7%)	52 (86.7%)	6 (10.0%)	10 (16.7%)	-
Total	132	16.7±6.3	2.2±1.4	12 (9.1%)	77 (58.3%)	10 (7.6%)	14 (10.6%)	-

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีจุดกลายพันธุ์บนยีน *pfmdr1* ที่ต่างกันต่อยา
piperazine เชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงที่จุดกลายพันธุ์ N86Y และ N1042D มีผลต่อความไวต่อยา
piperazine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$ และ $p = 0.003$ ตามลำดับ)

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีพันธุกรรมยีนดื้อยา *pfmdr1* ที่ต่างกันต่อยา
piperaquine

<i>pfmdr1</i> genotypes		No. (%)	Mean piperaquine IC ₅₀ (nM)	<i>p</i> value
Mutations				
86	N86	122 (89.1)	16.0 ± 5.7	< 0.001*
	86Y	15 (10.9)	25.8 ± 8.2	
184	Y184	59 (43.1)	17.3 ± 7.6	0.252
	184F	78 (56.9)	16.5 ± 5.9	
1034	S1034	127 (92.7)	17.3 ± 6.8	0.177
	1034C	10 (7.3)	14.3 ± 3.8	
1042	N1042	123 (89.8)	17.5 ± 6.8	0.003*
	1042D	14 (10.2)	13.5 ± 3.9	
Copy no.	≤ 1	41 (30.0)	17.3 ± 7.2	0.365
	> 1-2	35 (25.5)	17.8 ± 7.0	
	> 2-3	24 (17.5)	16.8 ± 6.3	
	> 3-4	18 (13.1)	18.4 ± 6.7	
	≥ 4	19 (13.9)	14.3 ± 4.8	

* Significant difference determined by independent *t* test

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อต่อยา piperazine ในเชื้อที่มี *pfmdr1* haplotype กลุ่มต่าง ๆ

Group	<i>Pfmdr1</i> haplotype					N	Piperaquine IC ₅₀ (nM)
	86	184	1034	1042	Copy No.		
I	Y	Y	S	N	0.87-5.0	15	25.8±8.2
II	N	F	S	N	0.76-5.0	65	17.1±6.1*
III	N	Y	C	D	0.87-3.4	9	14.8±3.7**
IV	N	Y	S	D	1.0-4.7	4	11.3±3.8**
V	N	F	C	D	1.0	1	10.1
VI	N	Y	C	N	≤ 1	4	16.5±5.9
VII	N	Y	C	N	> 1	39	15.1±5.1*

Significant difference among groups ($p < 0.001$, one-way ANOVA)

*Significant difference compared to group I ($p < 0.001$, Post hoc analysis)

**Significant difference compared to group I ($p = 0.003$, Post hoc analysis)

เมื่อจัดกลุ่มตาม *pfmdr1* haplotype ดังตารางที่ 13 พบว่าเชื้อที่มี *pfmdr1* mutation ที่ตำแหน่ง 86 จะมีค่า piperazine IC₅₀ สูงกว่าเชื้อกลุ่มที่มี *pfmdr1* mutation ที่ตำแหน่ง 184 ($p < 0.001$) เชื้อที่ *pfmdr1* mutation ที่ตำแหน่ง 1034 และ 1042 ($p = 0.003$) เชื้อที่ *pfmdr1* mutation ที่ตำแหน่ง 1042 ($p = 0.003$) และ เชื้อที่ *pfmdr1* copy number มากกว่า 1 ($p < 0.001$)

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อที่ลดค่าความไวต่อ piperazine โดยใช้

Univariate and multivariate analysis

Factors	No. (%)	Reduced piperazine sensitivity (%)	Crude OR (95% CI)	<i>p</i> value	Adjusted OR (95% CI)	<i>p</i> value
<i>Pfmdr1</i>						
N86	122 (89.1)	6 (4.9)	1	< 0.001	1	< 0.001
86Y	15 (10.9)	7 (46.7)	16.9 (4.6-62.4)		15.7 (4.0-60.8)	
<i>Pfmdr1</i>						
N1042	123 (89.8)	13 (10.6)	1	0.570		
1042D	14 (10.2)	0 (0)	0.6 (0.1-5.4)			
<i>Pfmdr1</i>						
Copy no. ≤ 1	41 (30.0)	5 (12.2)	1	0.339		
Copy no. > 1	96 (70.0)	8 (8.3)	0.7 (0.2-2.1)			
Chloroquine resistance						
< 100 nM	87 (63.5)	5 (5.7)	1	0.050		
≥ 100 nM	50 (36.5)	8 (16.0)	3.1 (1.0-10.1)			

Adjusted for *pfmdr1* N1042D mutation, *pfmdr1* copy number and chloroquine resistance

ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อที่ลดค่าความไวต่อ piperazine เมื่อใช้ค่าเฉลี่ยของ piperazine IC_{50} บวกด้วย 2 SD เท่ากับ 28.3 มาเป็นเกณฑ์สำหรับเชื้อที่ลดความไวต่อยา piperazine ปัจจัยที่สัมพันธ์ต่อเชื้อที่ลดความไวต่อยา piperazine วิเคราะห์โดย Univariate และ Multivariate analysis ได้แก่ เชื้อที่มี *pfmdr1* mutation ที่ตำแหน่ง 86 (adjusted OR = 15.7, 95% CI 4.0-60.8, $p < 0.001$)

2.2.2.8 การตอบสนองต่อยา pyronaridine และลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่มีผลต่อยา pyronaridine ในเชื้อ *P. falciparum*

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองของเชื้อในประเทศไทยต่อยา pyronaridine และผลของลักษณะทางพันธุกรรมยีนดื้อยา คณะผู้วิจัยได้เปรียบเทียบเชื้อในช่วงปีต่างๆ ได้แก่ พ.ศ. 2532 จำนวน 6 สายพันธุ์ พ.ศ. 2536 จำนวน 7 สายพันธุ์ พ.ศ. 2541 จำนวน 51 สายพันธุ์ พ.ศ. 2546 จำนวน 22 สายพันธุ์ และ พ.ศ. 2555-2559 จำนวน 38 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้นจำนวน 124 สายพันธุ์ พบว่า pyronaridine IC_{50} ของเชื้อทั้ง 124 สายพันธุ์อยู่ระหว่าง 0.2-15.4 nM ตารางที่ 15 แสดงถึงค่าเฉลี่ยของ pyronaridine IC_{50} ของเชื้อสายพันธุ์ไทย ไม่พบว่า pyronaridine IC_{50} ของเชื้อที่แยกได้จากฝั่งไทยพม่าและฝั่งไทยเขมรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Independent *t* test, $p = 0.678$) ค่าเฉลี่ยของ pyronaridine IC_{50} ในเชื้อที่แยกในแต่ละปีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (One-way ANOVA, $p = 0.001$) (ปีพ.ศ. 2532 = 5.7 ± 1.9 nM, พ.ศ. 2536 = 9.3 ± 4.1 nM, ปีพ.ศ. 2541 = 5.8 ± 3.2 nM, พ.ศ. 2546 = 5.9 ± 2.8 nM และพ.ศ. 2555-2559 = 4.2 ± 2.1 nM) Post Hoc analysis พบว่าเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2536 มีค่า pyronaridine IC_{50} สูงกว่าเชื้อที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2555-2559 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Scheffe test, $p = 0.001$)

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยของ pyronaridine IC₅₀ และ *pfmdr1* mutations ในเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ไทยพม่าและ
ไทยกัมพูชา

Area	No.	Pyronaridine IC ₅₀ (nM)	<i>pfmdr1</i> copy number	<i>pfmdr1</i> mutations				
				86Y	184F	1034C	1042D	1246Y
Thai- Myanmar	65	5.6±3.2	2.8±1.4	4 (6.2%)	23 (35.4%)	3 (4.6%)	3 (4.6%)	-
Thai- Cambodia	59	5.4±2.9	1.3±0.8	6 (10.2%)	52 (88.1%)	3 (5.1%)	7 (8.5%)	-
Total	124	5.5±3.0	2.1±1.4	10 (8.1%)	82 (66.1%)	6 (4.8%)	10 (8.1%)	-

ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีจุดกลายพันธุ์บนยีน *pfmdr1* ที่ต่างกันต่อยา
pyronaridine เชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงที่จุดกลายพันธุ์ N86Y และ Y184F มีผลต่อความไวต่อยา
pyronaridine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.022$ และ $p = 0.044$ ตามลำดับ)

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อที่มีพันธุกรรมยีนดื้อยา *pfmdr1* ที่ต่างกันต่อยา pyronaridine

<i>pfmdr1</i> genotypes		No. (%)	Mean pyronaridine IC ₅₀ (nM)	<i>p</i> value
Mutations				
86	N86	114 (80.6)	5.3 ± 3.0	0.022
	86Y	10 (9.4)	7.6 ± 3.3	
184	Y184	49 (39.5)	4.2 ± 3.4	0.044
	184F	75 (60.5)	5.0 ± 2.7	
1034	S1034	118 (95.2)	5.5 ± 6.8	0.878
	1034C	6 (4.8)	5.3 ± 3.8	
1042	N1042	116 (89.8)	5.5 ± 3.1	0.990
	1042D	8 (10.2)	5.5 ± 1.6	
Copy no.	≤ 1	31 (30.0)	4.9 ± 2.6	0.213*
	> 1-2	21 (25.5)	6.1 ± 3.4	
	> 2-3	18 (17.5)	6.4 ± 4.0	
	> 3-4	12 (13.1)	4.6 ± 1.6	
	≥ 4	16 (13.9)	5.8 ± 3.0	

Significant difference determined by independent *t* test

* Significant difference determined by One-way ANOVA

ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบค่าความไวของเชื้อต่อยา pyronaridine ในเชื้อที่มี *pfmdr1* haplotype กลุ่มต่างๆ

Group	<i>Pfmdr1</i> haplotype					N	Pyronaridine IC ₅₀ (nM)
	86	184	1034	1042	Copy No.		
I	Y	Y	S	N	0.9-3.9	10	7.6 ± 3.3
II	N	F	S	N	0.8-5.0	67	4.9 ± 2.8
III	N	Y/F	S/C	D	0.9-4.7	8	5.5 ± 1.6
IV	N	Y	C	N	≤ 3	22	6.2 ± 3.6
V	N	Y	C	N	> 3	17	5.5 ± 3.1

$p = 0.095$, one-way ANOVA

เมื่อจัดกลุ่มตาม *pfmdr1* haplotype ดังตารางที่ 17 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่า pyronaridine IC₅₀ ในเชื้อที่มี *pfmdr1* haplotype แตกต่างกัน ($p = 0.095$, one-way ANOVA)

2.2.2.9 การพัฒนาเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ดื้อยา artemether ในหลอดทดลอง (Intermittent drug pressure)

เชื้อ clone K1 และ G112 ถูกนำมาเลี้ยงใน medium ที่มียา artemether ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจนเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในความเข้มข้นของยา 1,000 nM พบว่าเชื้อ K1AM1000 และ G112AM1000 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า artemether IC₅₀ แต่มีการเปลี่ยนแปลงค่า dihydroartemisinin IC₅₀ (ตารางที่ 18) เมื่อทดสอบเชื้อทั้งสองเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้นพบว่าเชื้อทั้งสองมีค่า % ring survival ที่สูง อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ยีนดื้อยา artemisinin

ตารางที่ 18 ค่า Artemether IC₅₀, Dihydroartemisinin IC₅₀, % Ring survival และ K13 propeller ของ เชื้อ K1AM1000 และ G112AM1000 เมื่อเปรียบเทียบกับ K1 และ G112

Strain	Artemether IC ₅₀ (nM)	Dihydroartemisinin IC ₅₀ (nM)	% Ring survival	K13 propeller
K1	2.8 ± 1.0	2.5 ± 0.5	0	Wild type
K1Am1000	3.0 ± 0.7	8.3 ± 0.3*	96.0	Wild type
G112	2.4 ± 0.4	4.0 ± 0.1	0.3	Wild type
G112Am1000	2.7 ± 0.8	8.6 ± 0.2*	30.7	Wild type

* Significant difference at *p* value of < 0.001 (Mann-Whitney U test)

2.3 ข้อวิจารณ์ (Discussion)

เชื้อ *P. falciparum* ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เกือบทั้งหมดมีค่า artesunate และ dihydroartemisinin IC₅₀ ต่ำกว่า 10.5 nM (Pradines et al., 1998a) มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่มี IC₅₀ ของ artesunate เท่ากับ 10.7 nM ดังนั้นเชื้อเกือบทั้งหมดเหล่านี้ยังเป็นเชื้อที่ไม่ดื้อต่อ artesunate และ dihydroartemisinin อย่างไรก็ตาม การศึกษาในปัจจุบันพบเชื้อ *P. falciparum* จะตอบสนองต่อยาในกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin ช้าลง กล่าวคือเชื้อจะหายไปจากกระแสเลือดหลัง 72 ชั่วโมง WHO ให้คำนิยามของ artemisinin resistance โดยใช้ลักษณะดังกล่าว คือมีการกำจัดเชื้อในกระแสเลือดช้า (delayed parasite clearance) หลังจากให้การรักษาด้วย artesunate monotherapy หรือ artemisinin-based combination therapy (ACT) (WHO, 2014a) อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวมักไม่มีความสัมพันธ์กับการรักษาไม่หายขาดของ ACT ดังนั้นลักษณะนี้เป็นเพียง partial resistance (WHO, 2016) นอกจากนี้ยังได้มีการใช้ In vitro ring survival assay ซึ่งพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *P. falciparum* 72 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี ยา dihydroartemisinin เข้มข้น 700 nM เนื่องจากพบว่าค่าที่ได้มีความสัมพันธ์กับ half-life ของเชื้อที่พบในกระแสเลือดผู้ป่วยหลังได้รับการรักษาด้วยยา ACT เป็นอย่างดี (Witkowski et al., 2013) ซึ่งค่าทั้ง

In vitro และ In vivo ดังกล่าว ถูกนำไปศึกษาหาความสัมพันธ์กับยีนดื้อยาจนพบว่าพบจุดกลายพันธุ์บนยีน Kelch13 (K13) propeller มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยากลุ่มอนุพันธ์ artemisinin ที่ต่ำลง (Ariey et al., 2014) จุดกลายพันธุ์บนยีนนี้หลายจุดที่มีความสัมพันธ์กับ delayed parasite clearance ซึ่งจุดกลายพันธุ์เหล่านี้ถูกนำมาเป็น genetic marker ของการดื้อยาในกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin

ตารางที่ 19 นิยามของพื้นที่ระบาดเชื้อดื้อยา artemisinin (WHO, 2016)

Suspected endemic artemisinin resistance is defined as:	$\geq 5\%$ of patients carrying K13 resistance-confirmed mutations;
	or
	$\geq 10\%$ of patients with persistent parasitaemia by microscopy at 72 hours (± 2 hours; i.e., day 3) after treatment with ACT or artesunate monotherapy; or
	$\geq 10\%$ of patients with a half-life of the parasite clearance slope ≥ 5 hours after treatment with ACT or artesunate monotherapy.
Confirmed endemic artemisinin resistance is defined as:	$\geq 5\%$ of patients carrying K13 resistance-confirmed mutations, all of whom have been found to have either persistent parasitaemia by microscopy on day 3 after treatment with ACT or artesunate monotherapy, or a half-life of the parasite clearance slope ≥ 5 hours.

การศึกษาในปัจจุบันพบว่า จังหวัดตาก ประเทศไทยพบได้ 77.6% ในประเทศกัมพูชาพบว่ามีจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller ได้สูงในเมืองที่ติดชายแดนไทย เช่นที่ Pailin พบ 95% Battambang พบ 93% ในขณะที่เมืองที่ติดชายแดนลาวจะพบน้อยกว่า เช่น Preah Vihear พบ 16% หรือ Ratanakiri พบเพียง 6% (Ariey et al., 2014) การศึกษาในครั้งนี้พบจุดกลายพันธุ์ใกล้เคียงกับการศึกษาอื่นๆ พบจุดกลายพันธุ์

บนยีน K13 propeller ทั้งสิ้น 77.1% เชื่อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชามีจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller (82.9%) สูงกว่าเชื่อที่แยกได้จากชายแดนไทยพม่า (62.7%) ซึ่งจุดกลายพันธุ์ส่วนใหญ่คือ C580Y คิดเป็น 47.4% ปัจจุบันพบจุดกลายพันธุ์บนยีนนี้กว่า 200 จุด ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มประเทศใน South-East Asia และจีน โดยจุดกลายพันธุ์ที่พบในแต่ละพื้นที่จะแตกต่างกัน เช่น ประเทศกัมพูชา ลาว และเวียดนามมักจะพบ C580Y, R539T, Y493H และ I543T ในขณะที่เชื่อจากจีน พม่า และไทย จะพบ F446L, N458Y, P574L และ R561H (WHO, 2016) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื่อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชามีจุดกลายพันธุ์คล้ายคลึงกับเชื่อในประเทศเหล่านี้ โดยพบ C580Y 56.6% และ R539T 21.1% Y493H 2.6% G538V และ T474I 1.3% เท่ากัน ในขณะที่เชื่อที่แยกได้จากชายแดนไทยพม่ามีความหลากหลายของจุดกลายพันธุ์มากกว่า จุดกลายพันธุ์ที่พบคือ C580Y (35.6%), R539T (3.4%), G538V (6.8%), P574L (6.8%), R561H (1.7%), A675V (5.1%), E566D (1.7%) และ L514F (1.7%) พบว่าจุดกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ C580Y ซึ่งตรงกับผลที่พบในประเทศกัมพูชา (92.6%) และลาว (48.8%) จากการศึกษาเชื่อจากจังหวัดตราดที่แยกได้จากช่วงเวลาต่างๆ กัน พบว่าจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller สูงขึ้น จาก 21.1% ในปี พ.ศ. 2531-2532 15.4% ในปี พ.ศ. 2534-2536 40.0% ในปี พ.ศ. 2546 และ 84.2% หลังปี พ.ศ. 2552 จากการศึกษาโดย Talundzic และคณะในปี 2558 พบว่าเชื่อที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรีและตราดในปี พ.ศ. 2550 2 ปีก่อนเริ่มโครงการ Artemisinin containment พบจุดกลายพันธุ์บนยีน K13 propeller 45.5% (10/22 สายพันธุ์) (Talundzic et al., 2015) ซึ่งจะเห็นได้ว่าหลังจากที่เริ่มโครงการ Artemisinin containment แล้วเชื่อที่มียีนดื้อยา artemisinin นี้ไม่ได้ลดลงแต่กลับมีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้น ซึ่งอาจจะอธิบายได้จากตัวโครงการเองที่ไม่ได้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด หรืออาจเกิดจากการอพยพย้ายถิ่นของแรงงานเพื่อนบ้าน ซึ่งอาจนำเอาเชื่อสายพันธุ์ดื้อต่อ artemisinin เข้ามาในประเทศไทย เป็นต้น Delayed parasite clearance ที่พบในเชื่อ *P. falciparum* มักจะไม่สัมพันธ์กับการล้มเหลวของการรักษาด้วย ACT การล้มเหลวของการรักษาด้วย ACT มักจะเกิดจากการดื้อยาที่ใช้ร่วมในของ ACT มากกว่าที่จะเกิดจากการดื้อ artemisinin (WHO, 2016) ประเทศไทยใช้ยาร่วม artesunate-mefloquine ในการรักษา มาลาเรียที่เกิดจากเชื่อ *P. falciparum* มานานกว่า 20 ปี อย่างไรก็ตามมีรายงานพบอัตราการหายขาดจากการใช้ยาร่วมคู่นี้ต่ำกว่า 90% ในบางพื้นที่ของประเทศไทย (Vijaykadga et al., 2006) จากการสำรวจเชื่อ

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อ mefloquine เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ mefloquine resistance เมื่อ $IC_{50} \geq 30$ nM (Hatin et al., 1992) พบเชื้อดื้อต่อ mefloquine 78.9% โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้จากฝั่งไทยพบว่ามีเชื้อดื้อ mefloquine คิดเป็น 97.2% ส่วนเชื้อที่แยกได้จากฝั่งไทยกัมพูชามีเชื้อดื้อ mefloquine คิดเป็น 67.8% ในขณะที่เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ artesunate resistance ที่ $IC_{50} \geq 10.5$ nM (Pradines et al., 1998a) พบเชื้อดื้อยาจำนวน 1 สายพันธุ์ (1.1%) ไม่พบเชื้อดื้อยา dihydroartemisinin เมื่อใช้ค่า cut-off point ของ dihydroartemisinin resistance ที่ $IC_{50} \geq 10.5$ nM (Pradines et al., 1998a) ยากลุ่มอนุพันธ์ artemisinin ที่ใช้ใน ACT จะสามารถฆ่าเชื้อในกระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเมื่อมี delayed parasite clearance จากการดื้อต่อยากลุ่มอนุพันธ์ artemisinin (partial resistance) อาจทำให้เชื้อสัมผัสกับยาร่วมได้นานขึ้น ส่งผลให้มี drug pressure และอาจทำให้เชื้อดื้อยาได้เร็วขึ้น

ในปัจจุบันประสิทธิภาพของการรักษาด้วย ACT มักจะให้ผลหายขาดที่ดี ถ้ายาร่วมยังมีประสิทธิภาพที่ดีอยู่ แม้ว่าผู้ป่วยจะมีการกำจัดเชื้อในกระแสเลือดที่ช้ากว่าปกติ (delayed parasite clearance response) ก็ตาม ดังนั้นการเลือกใช้ยาร่วมที่ ACT เหมาะสมควรคำนึงถึงยาร่วมที่เหมาะสม ในปัจจุบันยาร่วม ACT มีให้เลือกคือ artesunate-mefloquine, artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine และ dihydroartemisinin-piperaquine (WHO, 2015) การเลือกยาจะต้องคำนึงถึงยาร่วมที่มีประสิทธิภาพ เชื้อ *P. falciparum* อาจมีกลไกการดื้อยาร่วมเหล่านี้ผ่านยีนดื้อยาต่างๆ เช่น *pfcr* และ *pfmdr1* เป็นต้น โดย *pfcr* เป็นยีนดื้อยาหลักของ chloroquine ยาในกลุ่ม 4-aminoquinolines ส่วน ยีน *pfmdr1* เป็นยีนดื้อยาที่มีผลต่อความไวของยากลุ่ม quinolines และกลุ่มอนุพันธ์ artemisinin เชื้อ *P. falciparum* ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา chloroquine ทั้งหมด ทั้ง phenotype คือ $IC_{50} \geq 25$ nM และ genotype คือมี *pfcr* 76T allele แม้ว่าประเทศไทยไม่ได้ใช้ chloroquine ในการรักษามาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* มากกว่า 50 ปี แต่ chloroquine ยังเป็นยาหลักในการรักษามาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. vivax* ซึ่งมีถิ่นระบาดบริเวณเดียวกัน ดังนั้นอาจจะมี chloroquine pressure สำหรับ *P. falciparum* ได้ตลอดเวลาทำให้เชื้อในประเทศไทยยังดื้อต่อ chloroquine ซึ่งส่งผลให้การพิจารณาเลือกใช้ artesunate-amodiaquine ยาตัวเลือก ACT ตัวหนึ่ง อาจไม่เหมาะสมในประเทศไทยเนื่องจาก amodiaquine เป็นยาในกลุ่มเดียวกับ chloroquine จึงพบว่าการดื้อข้ามระหว่าง

amodiaquine และ chloroquine ได้ นอกจากนี้ amodiaquine อาจมี adverse effect ที่รุนแรงเช่น hepatitis และ agranulocytosis (WHO, 2015)

เชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยมีเปอร์เซ็นต์ที่ดื้อต่อ pyrimethamine และ sulfadoxine สูง ซึ่ง WHO ไม่แนะนำให้พิจารณานำ artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine มาใช้ เมื่อพิจารณา artemether-lumefantrine พบว่าเชื้อ *P. falciparum* จากประเทศไทยมีการดื้อข้ามกันระหว่าง artemether, lumefantrine และ mefloquine จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Mungthin และคณะ (2010a) พบว่าประมาณหนึ่งในสี่ของเชื้อ *P. falciparum* ที่ทำการศึกษามีการลดลงของความไวต่อ lumefantrine ทั้งๆ ที่ยังไม่ได้นำยารวมคู่นี้มาใช้ในประเทศไทย (Mungthin et al., 2010a) ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างของยา lumefantrine คล้ายคลึงกับยา mefloquine เนื่องจากในปัจจุบันเชื้อ *P. falciparum* ดื้อต่อ mefloquine ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง การพิจารณายา artemether-lumefantrine มาใช้อาจจะต้องมีการทดสอบก่อนใช้และเฝ้าระวังอย่างเหมาะสม Dihydroartemisinin-piperaquine เป็นยา ACT อีกตัวเลือกที่ประเทศไทยได้นำมาใช้แทน artesunate-mefloquine ในปัจจุบัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยมีค่าเฉลี่ย IC_{50} อยู่ที่ 16.7 ± 6.3 nM ซึ่งจะอยู่ช่วงเดียวกับค่าเฉลี่ย IC_{50} ของเชื้อที่รายงานจากประเทศอื่นๆ ในเอเชีย ในประเทศกัมพูชาได้ใช้ยา dihydroartemisinin-piperaquine เป็นยาหลักในการรักษามาลาเรียตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ปัจจุบันพบว่าการตอบสนองหายขาดหลังจากได้รับยา dihydroartemisinin-piperaquine ลดลงอย่างมาก (Leang et al., 2015; Spring et al., 2015; Amaratunga et al., 2016) ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศกัมพูชาดื้อ piperaquine อยู่แล้วเนื่องจากในประเทศกัมพูชาเคยใช้ยา piperaquine เป็นยาเดียวในการรักษามาลาเรียที่เกิดจาก *P. falciparum* ประมาณเกือบ 20 ปีมาแล้ว (Davis, 2005) มีรายงานพบว่าเชื้อที่มี *pfmdr1* จำนวน 1 copy number จะมีความไวต่อ piperaquine น้อยกว่าเชื้อที่มี *pfmdr1* จำนวนมากกว่า 1 copy number (Eastman et al., 2011; Veiga et al., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้เชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยกัมพูชามี *pfmdr1* 184F allele ทุกสายพันธุ์และมี *pfmdr1* copy number ประมาณ 1 copy เมื่อเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากชายแดนไทยพบว่า 47.2% และมี *pfmdr1* copy number เฉลี่ยประมาณ 2.5 copy อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว แต่พบว่าเชื้อที่มี *pfmdr1* 86Y allele จะมีความไวต่อ

piperaquine ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการศึกษาโดยใช้เทคนิค Transfection ในเชื้อ *P. falciparum* พบว่าจุดกลายพันธุ์ N86Y และ Y184F บนยีน *pfmdr1* มีผลต่อความไวของยา piperaquine (Veiga et al., 2016) ในแต่ละพื้นที่ระบาดของมาลาเรียในประเทศไทยจะมีเชื้อ *P. falciparum* ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *pfmdr1* ซึ่งจะส่งผลให้มีการตอบสนองต่อยาที่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Mungthin และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากชายแดนไทยมาเลเซียส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อที่มี *pfmdr1* 86Y allele (Mungthin et al., 2014) การนำ dihydroartemisinin-piperaquine มาใช้ในประเทศไทยควรมีการทดสอบก่อนใช้และเฝ้าระวังอย่างเหมาะสม

Artesunate-pyronaridine เป็น ACT ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษามาลาเรียจากเชื้อ *P. falciparum* ที่ไม่ต่างจาก artemether-lumefantrine และ artesunate-mefloquine การศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยพบว่าค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ pyronaridine อยู่ที่ 5.5 ± 3.0 nM เมื่อเปรียบกับการศึกษาของ Childs และคณะ ในปี พ.ศ.2531 พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยมีค่า IC_{50} ของ pyronaridine อยู่ที่ 8.4 nM (Childs et al., 1988) นอกจากนี้จากการศึกษาประสิทธิภาพของยา pyronaridine ตัวเดียวในการรักษามาลาเรียจากเชื้อ *P. falciparum* โดย Looareesuwan และคณะในปี พ.ศ.2539 พบว่าเชื้อที่ตอบสนองได้ดีต่อ pyronaridine มีค่า IC_{50} ของ pyronaridine อยู่ที่ 30.3 nM ในขณะที่เชื้อที่ recrudescence จะมีค่า IC_{50} ของ pyronaridine อยู่ที่ 44.4 nM (Looareesuwan et al., 1996) pyronaridine IC_{50} ของเชื้อในการศึกษารั้งนี้อยู่ระหว่าง 0.2-15.4 nM ซึ่งยังต่ำกว่าค่าที่พบในเชื้อ recrudescence อย่างต่ำสามเท่า เมื่อเปรียบเทียบค่าความไว pyronaridine ในเชื้อที่มีจุดกลายพันธุ์ที่ต่างกันพบว่าจุดกลายพันธุ์ N86Y และ Y184F มีผลต่อค่าความไว pyronaridine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.022$, $p = 0.044$ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามการแตกต่างที่พบอาจไม่มีความสำคัญทางคลินิก เนื่องจากระดับ IC_{50} ยังอยู่ในช่วงเดียวกันคือความเข้มข้นในหลักหน่วย และเมื่อเปรียบเทียบแยกตาม *pfmdr1* haplotype ดังตารางที่ 17 ไม่พบค่า IC_{50} ของ pyronaridine มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของ pyronaridine ที่พบนี้ artesunate-pyronaridine อาจเป็นยา ACT ที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทยหรือประเทศอื่นๆ ที่เชื้อ *P. falciparum* มีความหลากหลายของลักษณะยีนดื้อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *pfmdr1* ข้อควรระวังในกาใช้ artesunate-pyronaridine ที่ยังต้องมีการศึกษา

เพิ่มเติมคือ ผู้ป่วยที่ได้รับ artesunate-pyronaridine บางคนจะมี transaminases สูงขึ้นได้เมื่อเทียบกับ ACT คู่อื่น (Duparc et al., 2013) ดังนั้นยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อพิษต่อตับของยานี้

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้เลือกเชื้อ *P. falciparum* ให้ดื้อต่อ artemether ในหลอดทดลอง โดยเทคนิค Intermittent drug exposure พบว่าเชื้อ K1 และ G112 clone สามารถพัฒนาตัวเองให้ทนต่อยาที่ความเข้มข้น 1,000 nM ได้ เมื่อทดสอบความไวต่อยา artemether ไม่พบว่า K1AM1000 และ G112AM1000 มี IC₅₀ ที่ต่างจากเชื้อ K1 และ G112 อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งสองลดความไวต่อยา dihydroartemisinin 3.3 เท่า และ 2.2 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบ % ring survival พบว่าเชื้อ K1AM1000 และ G112AM1000 มีการรอดชีวิตที่สูงมากเมื่อเทียบกับเชื้อต้นแบบ เมื่อศึกษายีนดื้อยา artemisinin, K13 propeller ไม่พบจุดกลายพันธุ์บนยีนนี้ในเชื้อ K1AM1000 และ G112AM1000 จากการทดลองนี้คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาเชื้อที่มีลักษณะดื้อต่อยานุพันธ์กลุ่ม artemisinin ได้ การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้ถูกกำหนดโดยยีน K13 propeller เชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถนำมาเป็นต้นแบบในการหายีนดื้อยา artemisinin อื่นๆ ได้ในอนาคต

2.4 สรุปและขอเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)

2.4.1 ปัจจุบันมีรายงานเชื้อ *P. falciparum* ดื้อต่อยากลุ่มอนุพันธ์ artemisinin โดยเฉพาะชายแดนไทยพม่า และไทยกัมพูชา ลักษณะที่ใช้ในการบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อดื้อยา artemisinin คือ การล่าช้าในการกำจัดเชื้อในกระแสเลือด (delayed parasite clearance) หลังจากให้การรักษาด้วย artesunate monotherapy หรือ artemisinin-based combination therapy (ACT) ลักษณะนี้เป็นเพียงลักษณะ partial resistance ซึ่งอาจจะไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการหายขาด

2.4.2 ลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับ delayed parasite clearance คือจุดกลายพันธุ์บนยีน Kelch 13 propeller ปัจจุบันพบการกลายพันธุ์บนยีนนี้มากกว่า 200 แบบ อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงที่ amino acid หลังตำแหน่งที่ 400 มักจะมีผลต่อการตอบสนองต่อ artemisinin ซึ่งการกลายพันธุ์เหล่านี้มักจะพบในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และจีน ในพื้นที่ที่ต่างกันมักพบจุดกลาย

พันธุ์ที่ต่างกัน โดยประเทศกัมพูชา ลาว และเวียดนาม มักพบ C580Y, R539T, Y493H และ I543T ได้บ่อย ในขณะที่ประเทศจีน และพม่า พบ F446L, N458Y, P574L และ R561H ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ไทยพม่าและไทยกัมพูชา พบจุดกลายพันธุ์ C580Y เป็นส่วนใหญ่

2.4.3 หลังจากเริ่มโครงการ artemisinin containment บางส่วนของชายแดนไทยกัมพูชาในปี พ.ศ.2552 โดยมีการเปลี่ยนยาหลักในการรักษามาลาเรียจากเชื้อ *P. falciparum* จาก artesunate-mefloquine เป็น atovaquone-proguanil เพื่อลด drug pressure ของ artemisinin เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่พบว่าเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่นี้ดื้อต่อ atovaquone อย่างไรก็ตามเชื้อเหล่านี้มีเปอร์เซ็นต์ของการดื้อ mefloquine สูงขึ้น และเชื้อทั้งหมดมีพันธุกรรมของยีนดื้อยา *pfmdr1* 184F allele และมี *pfmdr1* copy number ประมาณ 1 copy number นอกจากนี้ยังพบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่มีจุดกลายพันธุ์บน K13 propeller สูงขึ้น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าวสามารถอยู่รอดได้ในธรรมชาติอย่างดี โครงการนี้ครอบคลุมพื้นที่เพียงบางบริเวณเท่านั้นดังนั้นการลด drug pressure ของ artemisinin อาจทำได้ไม่เต็มที่ พื้นที่ดังกล่าวมีเคลื่อนย้ายประชากรจากกัมพูชาเข้ามาตลอดเวลาอาจทำให้มีการนำเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งมีลักษณะดื้อต่อ artemisinin เข้ามา เป็นต้น

2.4.4 การล้มเหลวจากการรักษาโดย ACT มักจะเกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ลดความไวต่อยาที่ใช้รวมมากกว่ายากลุ่มอนุพันธ์ artemisinin เอง ซึ่งเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยในปัจจุบันส่วนใหญ่ดื้อต่อ mefloquine ประเทศไทยจึงได้พิจารณาเปลี่ยนยาหลักของประเทศสำหรับการรักษามาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* เป็น dihydroartemisinin-piperaquine

2.4.5 ในประเทศกัมพูชาได้มีการใช้ dihydroartemisinin-piperaquine เป็นยาหลักในการรักษามาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่าการตอบสนองหายขาดหลังจากได้รับยา dihydroartemisinin-piperaquine ลดลงอย่างมาก เนื่องจากเชื้อดื้อยา piperaquine ดังนั้นการเริ่มนำ dihydroartemisinin-piperaquine มาใช้ในประเทศไทยต้องมีการเฝ้าระวังอย่างเหมาะสม การศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยครั้งนี้พบว่าเชื้อที่มี *pfmdr1* 86Y allele จะมีความไวต่อ piperaquine ลดลงในพื้นที่ระบาดของมาลาเรียต่างๆ จะมีเชื้อ *P. falciparum* ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *pfmdr1* พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากชายแดนไทยมาเลเซียส่วนใหญ่จะ

เป็นเชื้อที่มี *pfmdr1* 86Y allele การนำ dihydroartemisinin-piperaquine มาใช้ในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งชายแดนไทยมาเลเซียควรมีการทดสอบก่อนใช้และการเฝ้าระวังอย่างเหมาะสม

2.4.6 Artesunate-pyronaridine เป็น ACT ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษามาลาเรียจากเชื้อ *P. falciparum* ที่ไม่ต่างจาก artemether-lumefantrine และ artesunate-mefloquine ค่า pyronaridine IC₅₀ ของเชื้อในการศึกษาครั้งนี้อยู่ระหว่าง 0.2-15.4 nM ซึ่งยังต่ำกว่าค่าที่เคยรายงานไว้ในเชื้อ recrudescence ในประเทศไทย 3-220 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเชื้อ *P. falciparum* ที่มี *pfmdr1* haplotype ต่างกัน ไม่พบว่า ค่า IC₅₀ ของ pyronaridine มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม ดังนั้น artesunate-pyronaridine อาจเป็นยา ACT ที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทยหรือประเทศอื่นๆ ที่เชื้อ *P. falciparum* มีความหลากหลายของ ลักษณะยีนดื้อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *pfmdr1*

2.4.7 จากการใช้เทคนิค Intermittent drug exposure ทำให้เชื้อ *P. falciparum* ทนต่อยา artemether ในหลอดทดลอง พบว่าเชื้อ K1AM1000 และ G112AM1000 มีความไวต่อยา dihydroartemisinin ลดลง 3.3 เท่า และ 2.2 เท่า ตามลำดับ และมี % ring survival สูงขึ้นมากเมื่อเทียบกับเชื้อต้นแบบ อย่างไรก็ตามไม่พบจุดกลายพันธุ์บนยีนยีนดื้อยา artemisinin, K13 propeller ดังนั้นการดื้อยาที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจาก ลักษณะทางพันธุกรรมอื่น

2.4.8 ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาที่แตกต่างกันทำให้เชื้อ *P. falciparum* มีความไวต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกัน การทดสอบความไวต่อยาต้านมาลาเรียชนิดต่างๆ และการสำรวจข้อมูลพื้นฐานของลักษณะทางพันธุกรรมของยีนดื้อยาในเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยควรจะต้องทำอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อ เนื่องจากเชื้อ *P. falciparum* ในประเทศไทยมีสามารถพัฒนาการดื้อยาได้อย่างต่อเนื่อง และยังสามารถเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ยาได้อย่างเหมาะสมอีกด้วย

3. ส่วนประกอบตอนท้าย

3.1 บรรณานุกรม (Bibliography)

Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, Tsuyuoka R, Maguire JD, Fandeur T, Arie F, Wongsrichanalai C, Meshnick SR. *Pfmdr1* and in vivo resistance to artesunate-mefloquine in falciparum malaria on the Cambodian-Thai border. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Apr;76(4):641-7.

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 GS, Fay MP, Anderson JM, Tarning J, Fairhurst RM. Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Mar;16(3):357-65.

Anthony MP, Burrows JN, Duparc S, JMoehrle J, Wells TNC. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malaria J.* 2012; 11:316.

Arie F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Ménard D. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2014 Jan 2;505(7481):50-5.

Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runchaoen R, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye KH, Mokuolu OA, Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton PN,

Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Phyo AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA, Samad R, Rahman MR, Hasan MM, Islam A, Miotto O, Amato R, MacInnis B, Stalker J, Kwiatkowski DP, Bozdech Z, Jeeyapant A, Cheah PY, Sakulthaew T, Chalk J, Intharabut B, Silamut K, Lee SJ, Vihokhern B, Kunasol C, Imwong M, Tarning J, Taylor WJ, Yeung S, Woodrow CJ, Flegg JA, Das D, Smith J, Venkatesan M, Plowe CV, Stepniewska K, Guerin PJ, Dondorp AM, Day NP, White NJ; Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC).. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med. 2014 Jul 31;371(5):411-23.

Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, Price RN, Stepniewska K, Barends M, Brockman A, Anderson T, McGready R, Phaiphun L, Proux S, van Vugt M, Hutagalung R, Lwin KM, Phyo AP, Preechapornkul P, Imwong M, Pukrittayakamee S, Singhasivanon P, White NJ, Nosten F. Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. PLoS One. 2009;4(2):e4551.

Chaiyaroj SC, Buranakiti A, Angkasekwina P, Looressuwan S, Cowman AF. Analysis of mefloquine resistance and amplification of *pfmdr1* in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. Am J Trop Med Hyg. 1999 Nov;61(5):780-3.

Childs GE, Häusler B, Milhous W, Chen C, Wimonwattrawatee T, Pooyindee N, Boudreau EF. In vitro activity of pyronaridine against field isolates and reference clones of *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 1988 Jan;38(1):24-9.

Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):1143-7.

Davis TM, Hung TY, Sim IK, Karunajeewa HA, Ilett KF. Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs*. 2005;65(1):75-87.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979 Dec;16(6):710-8.

Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, Coulibaly D, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2001 Jan 25;344(4):257-63.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455-67.

Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Craft CJ, Arbe-Barnes S, Miller RM, Shin CS, Fleckenstein L. Safety and efficacy of pyronaridine-artesunate in uncomplicated acute malaria: an integrated analysis of individual patient data from six randomized clinical trials. *Malar J*. 2013 Feb 21;12:70.

Duraisingh MT, Roper C, Walliker D, Warhurst DC. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2000a May;36(4):955-61.

Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol*. 2000b Apr 30;108(1):13-23.

Eastman RT, Dharia NV, Winzeler EA, Fidock DA. Piperaquine resistance is associated with a

- copy number variation on chromosome 5 in drug-pressured *Plasmodium falciparum* parasites. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Aug;55(8):3908-16.
- Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, Cowman AF. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1990 May 17;345(6272):255-8.
- Hatin I, Trape JF, Legros F, Bauchet J, Le Bras J. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* strains to mefloquine in an urban area in Senegal. *Bull WHO*. 1992;70(3):363-367.
- Leang R, Taylor WR, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, Kim S, Witkowski B, Duru V, Domergue A, Khim N, Ringwald P, Menard D. Evidence of *Plasmodium falciparum* Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):4719-26.
- Lim AS, Galatis D, Cowman AF. *Plasmodium falciparum*: amplification and overexpression of *pfmdr1* is not necessary for increased mefloquine resistance. *Exp Parasitol*. 1996 Aug;83(3):295-303.
- Lim P, Alker AP, Khim N, Shah NK, Incardona S, Doung S, Yi P, Bouth DM, Bouchier C, Puijalon OM, Meshnick SR, Wongsrichanalai C, Fandeur T, Le Bras J, Ringwald P, Arieu F. *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malar J*. 2009 Jan 12;8:11.
- Looareesuwan S, Kyle DE, Viravan C, Vanijanonta S, Wilairatana P, Wernsdorfer WH. Clinical study of pyronaridine for the treatment of acute uncomplicated *falciparum* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Feb;54(2):205-9.
- Mohon AN, Alam MS, Bayih AG, Folefoc A, Shahinas D, Haque R, Pillai DR. Mutations in

- Plasmodium falciparum* K13 propeller gene from Bangladesh (2009-2013). Malar J. 2014 Nov 18;13:431.
- Mungthin M, Bray PG, Ward SA. Phenotypic and genotypic characteristics of recently adapted isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. Am J Trop Med Hyg. 1999 Mar;60(3):469-74.
- Mungthin M, Khositnithikul R, Sitthichot N, Suwandittakul N, Wattanaveeradej V, Ward SA, Na-Bangchang K. Association between the *pfmdr1* gene and in vitro artemether and lumefantrine sensitivity in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 2010a Nov;83(5):1005-9.
- Mungthin M, Suwandittakul N, Chaijaroenkul W, Rungsrihirunrat K, Harnyuttanakorn P, Seugorn A, Na Bangchang K. The patterns of mutation and amplification of *Plasmodium falciparum* *pfcr1* and *pfmdr1* genes in Thailand during the year 1988 to 2003. Parasitol Res. 2010b Aug;107(3):539-45.
- Mungthin M, Intanakom S, Suwandittakul N, Suida P, Amsakul S, Sitthichot N, Thammapalo S, Leelayoova S. Distribution of *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolated from Southern Thailand. Malar J. 2014 Mar 27;13:117.
- Musset L, Pradines B, Parzy D, Durand R, Bigot P, Le Bras J. Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. J Antimicrob Chemother. 2006 Jan;57(1):110-5.
- Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric RS. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (*pfmdr1*) of *Plasmodium falciparum* in vitro. Am J Trop Med Hyg. 1994 Nov;51(5):648-58.
- Poyomtip T, Suwandittakul N, Sitthichot N, Khositnithikul R, Tan-ariya P, Mungthin M.

- Polymorphisms of the *pfmdr1* but not the *pfnhe-1* gene is associated with in vitro quinine sensitivity in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*. Malar J. 2012 Jan 5;11:7.
- Pradines B, Rogier C, Fusai T, Tall A, Trape JF, Doury JC. In vitro activity of artemether against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial drugs. Am J Trop Med Hyg. 1998a Mar;58(3):354-7.
- Pradines B, Tall A, Parzy D, Spiegel A, Fusai T, Hienne R, Trape JF, Doury JC. In-vitro activity of pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial agents. J Antimicrob Chemother. 1998b Sep;42(3):333-9.
- Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, Nosten F, Krishna S. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Dec;43(12):2943-9.
- Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. Lancet. 2004 Jul 31-Aug 6;364(9432):438-47.
- Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. Nature. 2000 Feb 24;403(6772):906-9.
- Ritchie GY, Mungthin M, Green JE, Bray PG, Hawley SR, Ward SA. In vitro selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of Pgh1. Mol Biochem Parasitol. 1996 Dec 2;83(1):35-46.
- Spring MD, Lin JT, Manning JE, Vanachayangkul P, Somethy S, Bun R, Se Y, Chann S,

- Ittiverakul M, Sia-ngam P, Kuntawunginn W, Arsanok M, Buathong N, Chaorattanakawee S, Gosi P, Ta-aksorn W, Chanarat N, Sundrakes S, Kong N, Heng TK, Nou S, Teja-isavadharm P, Pichyangkul S, Phann ST, Balasubramanian S, Juliano JJ, Meshnick SR, Chour CM, Prom S, Lanteri CA, Lon C, Saunders DL. Dihydroartemisinin-piperaquine failure associated with a triple mutant including kelch13 C580Y in Cambodia: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015 Jun;15(6):683-91.
- Talundzic E, Okoth SA, Congpuong K, Plucinski MM, Morton L, Goldman IF, Kachur PS, Wongsrichanalai C, Satimai W, Barnwell JW, Udhayakumar V. Selection and spread of artemisinin-resistant alleles in Thailand prior to the global artemisinin resistance containment campaign. *PLoS Pathog*. 2015 Apr 2;11(4):e1004789.
- Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, Cummings MP, Silva JC, Dondorp AM, Fukuda MM, Hien TT, Mayxay M, Noedl H, Nosten F, Kyaw MP, Nhien NT, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Arie F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, Newton PN, Khanthavong M, Hongvanthong B, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Khan WA, Phyo AP, Nyunt MM, Nyunt MH, Brown TS, Adams M, Pepin CS, Bailey J, Tan JC, Ferdig MT, Clark TG, Miotto O, MacInnis B, Kwiatkowski DP, White NJ, Ringwald P, Plowe CV. Independent emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *J Infect Dis*. 2015 Mar 1;211(5):670-9.
- Torrentino-Madamet M, Fall B, Benoit N, Camara C, Amalvict R, Fall M, Dionne P, Ba Fall K, Nakoulima A, Diatta B, Diemé Y, Ménard D, Wade B, Pradines B. Limited polymorphisms in k13 gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal in 2012-2013. *Malar J*. 2014 Dec 4;13:472.
- Tun KM, Imwong M, Lwin KM, Win AA, Hlaing TM, Hlaing T, Lin K, Kyaw MP, Plewes K, Faiz

- MA, Dhorda M, Cheah PY, Pukrittayakamee S, Ashley EA, Anderson TJ, Nair S, McDew-White M, Flegg JA, Grist EP, Guerin P, Maude RJ, Smithuis F, Dondorp AM, Day NP, Nosten F, White NJ, Woodrow CJ. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect Dis*. 2015 Apr;15(4):415-21.
- Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673-75.
- Veiga MI, Ferreira PE, Malmberg M, Jörnham L, Björkman A, Nosten F, Gil JP. *Pfmdr1* amplification is related to increased *Plasmodium falciparum* in vitro sensitivity to the bisquinoline piperazine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jul;56(7):3615-9.
- Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Strainer J, Gnädig N, Uhlemann AC, Martin RE, Lehane AM, Fidock DA. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat Commun*. 2016 May 18;7:11553.
- Vijaykadge S, Rojanawatsirivej C, Cholpol S, Phoungmanee D, Nakavej A, Wongsrichanalai C. In vivo sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Thailand in 2003. *Trop Med Int Health*. 2006 Feb;11(2):211-9.
- Wang Z, Shrestha S, Li X, Miao J, Yuan L, Cabrera M, Grube C, Yang Z, Cui L. Prevalence of K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* from China-Myanmar border in 2007-2012. *Malar J*. 2015 Apr 18;14:168.
- Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF. Amplification of

- a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*.
Science. 1989 Jun 9;244(4909):1184-6.
- Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, Wirth DF.
Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in
Plasmodium falciparum from Thailand. Mol Biochem Parasitol. 1993 Jan;57(1):151-60.
- Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam
B, Anderson JM, Duong S, Chuor CM, Taylor WR, Suon S, Mercereau-Puijalon O,
Fairhurst RM, Menard D. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-
resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response
studies. Lancet Infect Dis. 2013 Dec;13(12):1043-9.
- World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria-Second edition, 2010,
WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. Status report on artemisinin resistance. 2014, World Health
Organization, Geneva, Switzerland.
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status_rep_artemisinin_resistance_jan2014.pdf?ua=1
- World Health Organization. Update on artemisinin resistance. 2014, World Health
Organization, Geneva, Switzerland.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/update-artemisinin-resistance-sep2014/en/>
- World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria-Third edition. 2015, World
Health Organization, Geneva, Switzerland.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
- World Health Organization. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance.
2016, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/update-artemisinin-resistance-october2016/en/>

ปกปิด

รหัสโครงการ P-๑๓-๕๐๑๑๒