Study of Genetic Diversity and Genetic Relationship of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (*cox1*) Gene of *Plasmodium knowlesi* in Thailand

Tuvaporn Suvanla[1, 3] and Dujdow Songthamwat[1, 2*]

[1]*Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand*
[2]*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand*
[3]*Division of Vector Borne Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand*

Abstract

Malaria affects 40% of people worldwide. *Plasmodium knowlesi* is found in *Macaca fascicularis* in Southeast Asian countries and can be transmitted to humans. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox1*) is an important mitochondrial DNA encoding important protein subunits in the cellular respiratory process. *Cox1* is commonly used to identify species and study the evolution of living beings. The objective of this research is to study of genetic diversity and genetic relationship of Mitochondrial *cox*1 gene of *Plasmodium knowlesi* in Thailand. In this research, forty DNA samples were collected from 11 provinces in Thailand and confirmed as *P. knowlesi*. *Cox1* gene was used as the DNA target for amplification by PCR. The phylogenetic tree was constructed from nucleotides sequence data of *cox1* gene to classify *P. knowlesi* cluster in Thailand by using the Maximum Parsimony method. The correlations between clusters and patient data, residential area, and parasite density were analyzed. The results showed that the phylogenetic tree can divide *P. knowlesi* into 13 clusters (Cluster I-XIII). Cluster I (8 isolates), Cluster II (7 isolates), Cluster III (3 isolates), Cluster IV (1 isolate), Cluster V (4 isolates), Cluster VI (1 isolate), Cluster VII (3 isolates), Cluster VIII (1 isolate), Cluster IX (1 isolate), Cluster X (3 isolates), Cluster XI (2 isolates), Cluster XII (1 isolate), and Cluster XIII (5 isolates). There were more males infected with *P. knowlesi* (35 males) than females (5 females). The age group infected with *P. knowlesi* < 40 years old was 15 persons and age group ≥ 40 years old

***Corresponding author E-mail address:** sdujdow@hotmail.com
Received: 3 June 2023 Revised: 1 July 2023 Accepted: 3 July 2023

#in2 66-4.indd 8859 5/3/2567 BE 11:29

was 25 persons. Thirty-nine persons are Thai and 1 person is Myanmar. Twenty-six patients from 33 patients have parasite density < 10,000 /μL of blood and 7 patients have parasite density ≥ 10,000 /μL of blood. In conclusion, *P. knowlesi* were divided into 13 clusters. The parasites in the same clusters are similar in genetics and most isolates in different areas have different nucleotide sequences. This research is preliminary data of molecular epidemiology of *P. knowlesi* in Thailand. This data can be applied in public health and planning for malaria control and malaria eradication in Thailand.

Keywords: Cluster, *Cox1*, Maximum Parsimony (MP), Phylogenetic tree, *P. knowlesi*

#in2 66-4.indd 8860 5/3/2567 BE 11:29

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (*cox1*) ของเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในประเทศไทย

ธุวาพร สุวรรณลา[1, 3] และ ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์[1, 2*]

[1]*บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี*
[2]*ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี*
[3]*กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี*

บทคัดย่อ

ผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกมีประมาณร้อยละ 40 ของประชากรโลก *Plasmodium knowlesi* เป็นเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงแสมที่อาศัยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และสามารถติดต่อมาสู่คน ยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งสร้างโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และนิยมนำมาใช้ในการระบุชนิดและศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *cox1* ของเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในประเทศไทย งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *P. knowlesi* จำนวน 40 ตัวอย่างจาก 11 จังหวัดในประเทศไทยมาศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดยมี *cox1* เป็นยีนเป้าหมาย หลังจากนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* มาสร้างต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum Parsimony ในการแบ่งกลุ่ม *P. knowlesi* ในประเทศไทย และวิเคราะห์ร่วมกับประวัติผู้ป่วย ถิ่นที่อยู่อาศัย อาชีพ และความหนาแน่นของเชื้อเพื่อหาความสัมพันธ์กับกลุ่มของเชื้อ ผลการวิจัยสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *P. knowlesi* ได้เป็น 13 คลัสเตอร์ (I-XIII) ได้แก่ Cluster I (8 ไอโซเลท), II (7 ไอโซเลท), III (3 ไอโซเลท), IV (1 ไอโซเลท), V (4 ไอโซเลท), VI (1 ไอโซเลท), VII (3 ไอโซเลท), VIII (1 ไอโซเลท), IX (1 ไอโซเลท), X (3 ไอโซเลท), XI (2 ไอโซเลท), XII (1 ไอโซเลท) และ XIII (5 ไอโซเลท) พบเพศชายติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่าเพศหญิง โดยเป็นเพศชาย 35 คน เพศหญิง 5 คน กลุ่มอายุการติดเชื้อ *P. knowlesi* แบ่งเป็นกลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี 15 คน และมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปีขึ้นไป 25 คน สัญชาติไทย 39 คน สัญชาติพม่า 1 คน ผู้ป่วยที่มีข้อมูลความหนาแน่นของเชื้อจำนวนทั้งหมด 33 คน มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดน้อยกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร จำนวน 26 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร จำนวน 7 คน สรุปผลการจำแนกเชื้อ *P. knowlesi* พบว่ามี 13 คลัสเตอร์ เชื้อในแต่ละคลัสเตอร์มีความใกล้เคียงกันทางด้านพันธุศาสตร์และเชื้อส่วนใหญ่ในพื้นที่ต่างกันนั้นมีลำดับ

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** sdujdow@hotmail.com
รับบทความ: 3 มิถุนายน 2566 แก้ไขบทความ: 1 กรกฎาคม 2566 รับตีพิมพ์บทความ: 3 กรกฎาคม 2566

#in2 66-4.indd 8861 5/3/2567 BE 11:29

นิวคลีโอไทด์ของยีนที่แตกต่างกันออกไป ผลการวิจัยนี้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาทางชีวโมเลกุลเบื้องต้นของเชื้อ *P. knowlesi* ที่แพร่ในแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย ซึ่งมีประโยชน์ต่องานทางด้านสาธารณสุข การวางแผนควบคุมและกำจัดโรคมาลาเรียในประเทศไทย

คำสำคัญ: คลัสเตอร์, *Cox1*, Maximum Parsimony (MP), ต้นไม้สายวิวัฒนาการ, *P. knowlesi*

#in2 66-4.indd 8862 5/3/2567 BE 11:29

บทนำ

Plasmodium knowlesi เป็นเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงแสม (*Macaca fascicularis*) ที่อาศัยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และสามารถติดต่อสู่คนได้โดยมียุงก้นปล่องหลายสายพันธุ์เป็นพาหะนำเชื้อ *P. knowlesi* เป็นเชื้อมาลาเรียที่ติดต่อสู่คนเป็นลำดับที่ 5[1,2] ความรุนแรงของโรคของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* ขึ้นกับหลายปัจจัย และมีอาการแสดง คือ อาการไข้รุนแรง อาการแทรกซ้อน เช่น ไตวาย และเม็ดเลือดแดงแตก อาการและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงเกิดได้เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีระยะ erythrocytic cycle สั้นเพียง 24 ชั่วโมง *P. knowlesi* จะแบ่งตัวในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยและแตกออกเพื่อเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ทุกวัน จึงทำให้ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษามีอาการและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงใกล้เคียงกับการติดเชื้อ *P. falciparum* รายงานการติดเชื้อ *P. knowlesi* ในคนครั้งแรกที่รัฐซาราวัก ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นพบการติดเชื้อในหลายประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศจีน มาเลเซีย เมียนมา เวียดนาม สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และบรูไน พื้นที่ในประเทศไทยที่พบการติดเชื้อ *P. knowlesi* คือ จังหวัดชายแดน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นภูเขาสูง ป่าทึบ และมีแหล่งน้ำลำธารอันเป็นแหล่งแพร่พันธุ์ของยุงก้นปล่อง จังหวัดที่พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* ส่วนใหญ่ ได้แก่ จังหวัดชายแดนไทย-มาเลเซีย ชายแดนไทย-กัมพูชา และชายแดนไทย-เมียนมา รายงานในประเทศไทยพบเชื้อนี้ในลิงที่จังหวัดนราธิวาส สำหรับจังหวัดที่มีรายงานการพบเชื้อชนิดนี้ในคน ได้แก่ ตาก ประจวบคีรีขันธ์ ยะลา นราธิวาส จันทบุรี[3] ระนอง[4] และสระบุรี[5]

Cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox1*) คือยีนที่พบในไมโทคอนเดรียซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดมากกว่าในชนิดเดียวกัน การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้ง่าย เนื่องจากมีการ insertion และการ deletion ของนิวคลีโอไทด์น้อย จึงสามารถนำยีน *cox1* มาใช้ระบุชนิดและจำแนกชนิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด[6-8] ปี ค.ศ. 1989 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ mitochondrial DNA (mtDNA) พบว่ามีความเหมาะสมที่จะเป็น genetic marker สำหรับการศึกษาทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic) เพราะว่า mitochondrial genes มีวิวัฒนาการที่รวดเร็วกว่า nuclear gene นอกจากนี้ mtDNA ไม่ได้มีการรวมตัวกันใหม่ จึงง่ายต่อการสืบทอดทางพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก[9] การศึกษาในประเทศมาเลเซียเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ของ *P. knowlesi* แต่ละไอโซเลท พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของที่มาของเชื้อได้โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่มาจากประเทศมาเลเซีย ในปี ค.ศ. 1960, รัฐซาราวัก บนเกาะบอร์เนียวและประเทศไทย ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้แสดงว่ายีน *cox1* เป็นตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา phylogenetic ของ *P. knowlesi*[6] การศึกษาที่ประเทศสิงคโปร์ได้มีการนำยีน *cox1* มาใช้ในการแยกกลุ่ม *P. knowlesi* โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อจากประเทศสิงคโปร์ มาเลเซีย (รัฐซาราวัก) และไทยโดยใช้การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *cox1* ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในแต่ละพื้นที่ได้[7]

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. knowlesi* ที่ตำแหน่งยีน *cox1* และความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* กับกลุ่มของ *P. knowlesi* ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. knowlesi* ในประเทศไทย โดยแบ่งกลุ่มด้วยต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของยีน *cox1*

และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลผู้ป่วยกับกลุ่ม *P. knowlesi* โดยข้อมูลผู้ป่วยประกอบด้วย เพศ อายุ parasite density ในเลือด ถิ่นที่อยู่อาศัย อาชีพ และเชื้อชาติ ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับกลุ่มของ *P. knowlesi* ที่พบในประเทศไทยและข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในทางระบาดวิทยา

วัสดุและวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง DNA ที่เหลือจากการส่งมาตรวจยืนยันเชื้อ *P. knowlesi* มาวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR ที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค โดย DNA ดังกล่าวสกัดมาจากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง โดยใช้ชุดสกัด Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในคู่มือของชุดน้ำยาแล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยเก็บรวบรวมตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - ตุลาคม พ.ศ. 2564 งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการทำวิจัยในคนของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่หนังสือรับรอง COE No. 014/2564 การรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่หนังสือรับรอง 079/2564 และการขออนุญาตจากผู้อำนวยการกองโรคติดต่อนำโดยแมลงเพื่อขอใช้ DNA ที่เหลือจากการส่งมาตรวจยืนยันเชื้อ *P. knowlesi* ที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง กองโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค เลขที่หนังสือรับรอง สธ0411.5/68

2. การทำปฏิกิริยา PCR ต่อยีน *cox1*

การทำ PCR สำหรับยีน *cox1* ใช้ primer PK COX1F (5'-GACATTACCTGTATTAAC-3') และ PK COX1R (5'-GGTAAGAATGTTAAAACA-3') ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Fong *et al*., 2011[6] โดยยีน *cox1* ที่ใช้เป็น reference sequence ในการออกแบบ primer ดังนี้ โดยมี GenBank accession number แสดงในวงเล็บ *P. knowlesi* mosquito isolate (AY722797), *P. knowlesi* monkey isolate (AB444106), *P. knowlesi* human isolate (AB444108) Sarawak, Borneo, *P. knowlesi* KH45 (EU880446), *P. knowlesi* KH176 (EU880454), *P. knowlesi* KH229 (EU880458), *P. knowlesi* KH381 (EU880465), *P. knowlesi* KH433 (EU880468), *P. knowlesi* LT4 (EU880474), *P. knowlesi* LT48 (EU880485), *P. knowlesi* LT15 (EU880476), *P. knowlesi* LT53 (EU880489), *P. knowlesi* LT57 (EU880498) และ Thailand *P. knowlesi* A1 (AY598141) ตำแหน่งที่ 3,901-4,561 ความยาว 660 bp โดยใช้น้ำยา Alltaq Master mix (Qiagen, Germany) ในการเตรียมปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Alltaq Master mix 5 ไมโครลิตร Primer PK COX1F ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Primer PK COX1R ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Master mix tracer 0.16 ไมโครลิตร Rnase-free water 7.84 ไมโครลิตร DNA 5 ไมโครลิตร และใช้ PCR conditions ดังนี้ Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที Denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ส่วนกรณีที่ทำ PCR เพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) จะเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PCR (Biorad T100 thermal cycler, USA)

3. การแยก DNA ด้วยวิธี Gel electrophoresis

นำ PCR Product ที่ได้มาแยกบน agarose gel โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1%TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้ SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) ในการย้อมแถบ PCR Product แล้วนำไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลเจลโดยใช้เครื่อง Gel documentation system

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* (DNA sequencing)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี dye terminator โดยส่ง PCR product ไปทำ DNA sequencing แล้วนำผล *cox1* sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกันในแต่ละไอโซเลท รวมทั้งเปรียบเทียบกับข้อมูล *cox1* sequence ของเชื้อ *P. knowlesi* ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalW จากโปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2 (https://bioedit.software.informer.com)

5. การสร้าง Phylogenetic tree

สร้าง phylogenetic tree โดยใช้วิธี Maximum Parsimony (MP) จากโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 11 (https://www.megasoftware.net/) ที่ระดับความเชื่อมั่น 1,000 bootstraps

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic)

ผลการวิจัย

ตัวอย่างเชื้อ *P. knowlesi* ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง เก็บจาก 11 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี ระนอง สงขลา พังงา ยะลา สตูล ตราด จันทบุรี ราชบุรี และอุทัยธานี (Fig. 1)

การเพิ่มปริมาณยีน *cox1* โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR

ผลการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* พบ PCR product ขนาดประมาณ 660 bp ดังแสดงใน Fig. 2

นำผล DNA sequencing ของยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* ไปทำ multiple nucleotide alignment โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* ไอโซเลทที่ 1-41 แต่ไม่ได้นำไอโซเลทที่ 27 มาใช้ในการทำ multiple alignment ด้วย เพราะผล sequence ที่ได้ไม่ชัดเจน และ outgroup ลำดับเบสตำแหน่งที่ 1-600 โดยใช้โปรแกรม ClustalW จากโปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2 (https://bioedit.software.informer.com) โดยได้แสดงผลการทำ multiple nucleotide alignment ของตำแหน่งที่ 1-100 ไว้ดังแสดงใน Fig. 3 ซึ่งเห็นได้ว่าแต่ละไอโซเลทของเชื้อ *P. knowlesi* ในคลัสเตอร์เดียวกันมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง

นำผล multiple nucleotide alignment มาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 11 ด้วยวิธี Maximum Parsimony (MP) ในการคำนวณความเชื่อมั่น 1,000 bootstraps ได้ผลดังแสดงใน Fig. 3 สามารถแบ่ง *P. knowlesi* ได้เป็น 13 คลัสเตอร์ (คลัสเตอร์ I-XIII) โดยคลัสเตอร์ I พบ 8 ตัวอย่าง (OQ779218, OQ779214, OQ779198, OQ779207, OQ779229, OQ779225, OQ779210 และ OQ779230) คลัสเตอร์ II พบ 7 ตัวอย่าง (OQ779206, OQ779208, OQ779228, OQ779226, OQ779223, OQ779209 และ OQ779222) คลัสเตอร์ III พบ 3 ตัวอย่าง (OQ779201, OQ779212 และ OQ779213) คลัสเตอร์ IV พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779196) คลัสเตอร์ V พบ 4 ตัวอย่าง (OQ779205, OQ779211, OQ779219 และ OQ779221) คลัสเตอร์ VI พบ

1 ตัวอย่าง (OQ779203) คลัสเตอร์ VII พบ 3 ตัวอย่าง (OQ779193, OQ779215 และ OQ779217) คลัสเตอร์ VIII พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779200) คลัสเตอร์ IX พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779199) คลัสเตอร์ X พบ 3 ตัวอย่าง (OQ779194, OQ779197 และ OQ779216) คลัสเตอร์ XI พบ 2 ตัวอย่าง (OQ779191 และ OQ779192) คลัสเตอร์ XII พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779224) คลัสเตอร์ XIII พบ 5 ตัวอย่าง (OQ779195, OQ779202, OQ779204, OQ779220 และ OQ779223) โดย *P. knowlesi* แต่ละคลัสเตอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันแต่แตกต่างจากนอกกลุ่ม คือ เชื้อ *P. fragile, P. vivax, P. cynomolgi, P. inui, P. fieldi* และ *P. coatneyi*

จากการศึกษาข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* พบเพศชายติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่าเพศหญิง โดยแยกเป็นเพศชาย จำนวน 35 คน เพศหญิง จำนวน 5 คน คิดเป็นร้อยละ 87.5 และ 12.5 ตามลำดับ คลัสเตอร์ที่พบในเพศชาย ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII ส่วนคลัสเตอร์ที่พบในเพศหญิง ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, VII, XI และ XIII คลัสเตอร์ที่พบร่วมกันในเพศชายและหญิง คือ คลัสเตอร I, II, III, VII, XI และ XIII กรณีแบ่งกลุ่มอายุที่มีการติดเชื้อ *P. knowlesi* เป็นกลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี และกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี กลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี มีจำนวน 15 คน (ร้อยละ 37.5) โดยมีช่วงอายุตั้งแต่ 19-38 ปี มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 32 ปี และอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี มีจำนวน 25 คน (ร้อยละ 62.5) โดยมีช่วงอายุตั้งแต่ 40-78 ปี มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 52 ปี คลัสเตอร์ที่พบในกลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, IV, V, VI และ VII กลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII และ XIII คลัสเตอร์ที่พบทั้งสองกลุ่มร่วมกัน ได้แก่ I, II, III, V, VI และ VII กรณีแบ่งตามสัญชาติ จะแบ่งเป็นผู้ป่วยสัญชาติไทย 39 คน (ร้อยละ 97.5) โดยคลัสเตอร์ที่พบในผู้ป่วยสัญชาติไทย ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII และสัญชาติพม่า 1 คน (ร้อยละ 2.5) คลัสเตอร์ที่พบในผู้ป่วยสัญชาติพม่า ได้แก่ คลัสเตอร์ IV

ในการศึกษาครั้งนี้ มีผู้ป่วยที่มีข้อมูลความหนาแน่นของเชื้อ จำนวน 33 คนจากผู้ป่วยทั้งหมด 40 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อน้อยกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตรจำนวน 26 คน (ร้อยละ 78.8) มีช่วงความหนาแน่นของเชื้อ 512-8,557 ต่อไมโครลิตรของเลือด มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 4,166 ต่อไมโครลิตรของเลือด อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII และ XIII และพบกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร จำนวน 7 คน (ร้อยละ 21.2) โดยมีช่วงความหนาแน่นของเชื้อในเลือดตั้งแต่ 10,000-98,716 ต่อไมโครลิตร มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 11,804 ต่อไมโครลิตร อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, V และ XIII อยู่ในคลัสเตอร์ร่วมกัน ได้แก่ I, II, V และ XIII ดังแสดงใน Table 1.

จากการศึกษาแหล่งที่มาของเชื้อ *P. knowlesi* พบว่ามาจาก 11 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา (n = 10) คิดเป็นร้อยละ 25 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, VII, X และ XI จังหวัดชุมพร (n = 9) คิดเป็นร้อยละ 22.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, V, VII, VIII และ XIII จังหวัดตราด (n = 7) คิดเป็นร้อยละ 17.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, IV, IX และ XIII จังหวัดระนอง (n = 5) คิดเป็นร้อยละ 12.5 พบ

ผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, VII, X, XII และ XIII จังหวัดพังงา (n = 3) คิดเป็นร้อยละ 7.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I และ II จังหวัดยะลา (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ III จังหวัดสตูล (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ XI จังหวัดสุราษฎร์ธานี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ VI จังหวัดจันทบุรี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ II จังหวัดอุทัยธานี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ V และจังหวัดราชบุรี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I ดังแสดงใน Table 2. และ Fig. 1

ผู้ป่วยประกอบอาชีพทำสวนยางเป็นส่วนใหญ่ (n = 21) คิดเป็นร้อยละ 52.5 และติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, IV, VII, IX, X, XI และ XIII อาชีพทำสวนผลไม้ (n = 8) คิดเป็นร้อยละ 20.0 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, V, VII, VIII และ XIII อาชีพรับจ้าง (n = 4) คิดเป็นร้อยละ 10.0 อยู่ในคลัสเตอร์ I, II และ XII อาชีพทหาร/ตำรวจ (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ V อาชีพพระ/สามเณร (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ V อาชีพทำไร่อื่นๆ (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ X และอาชีพอื่นๆ (n = 4) คิดเป็นร้อยละ 10.0 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I และ VI ดังแสดงใน Table 3.

ผลการทำ phylogenetic tree ของเชื้อ *P. knowlesi* โดยใช้ยีน *cox1* เป็นยีนเป้าหมายเทียบกับข้อมูลจาก GenBank (Fig. 3) พบว่า *cox1* จากการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับ Accession number KT900795.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 และ KT900794.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 และเมื่อนำมาเทียบกับตัวอย่างจากการศึกษาของ Fong และคณะ ในปี ค.ศ. 2010[6] ได้แก่ PkUMMC1, PkUMMC5, PkUMMC9 และยีน *cox1* ที่ใช้เป็น reference sequence คือ *P. knowlesi* mosquito isolate (GenBank accession number AY722797), *P. knowlesi* monkey isolate (AB444106), *P. knowlesi* human isolate (AB444108), *P. knowlesi* KH45 (EU880446), *P. knowlesi* KH176 (EU880454), *P. knowlesi* KH229 (EU880458), *P. knowlesi* KH381 (EU880465), *P. knowlesi* KH433 (EU880468), *P. knowlesi* LT4 (EU880474), *P. knowlesi* LT48 (EU880485), *P. knowlesi* LT15 (EU880476), *P. knowlesi* LT53 (EU880489), *P. knowlesi* LT57 (EU880498) และ *P. knowlesi* A1, Thailand (AY598141) รวมทั้ง Accession number KT900795.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 และ KT900794.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 ซึ่งจัดกลุ่มได้ 12 คลัสเตอร์ คือ คลัสเตอร์ I-XII โดยคลัสเตอร์ I-II คือคลัสเตอร์ที่พบใหม่ในประเทศไทยซึ่งมาจากภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออกของประเทศไทย คลัสเตอร์ III เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสงขลาและสตูล ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Fong จากเชื้อ

P. knowlesi บริเวณเพนนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย[6] คลัสเตอร์ IV เป็นเชื้อ *P. knowlesi* ที่มาจากรัฐซาราวัก บริเวณเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย คลัสเตอร์ V และ VI เป็นเชื้อ *P. knowlesi* ที่พบบริเวณเพนนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย คลัสเตอร์ VII-X คือคลัสเตอร์ที่พบในประเทศไทย โดยคลัสเตอร์ที่ VII-X เป็นคลัสเตอร์ที่พบใหม่ในประเทศไทยในงานวิจัยนี้ และคลัสเตอร์ XII มาจากภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ ชุมพร ระนอง และภาคตะวันออก ได้แก่ ตราด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับบริเวณเพนนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย ดังแสดงใน Fig. 5

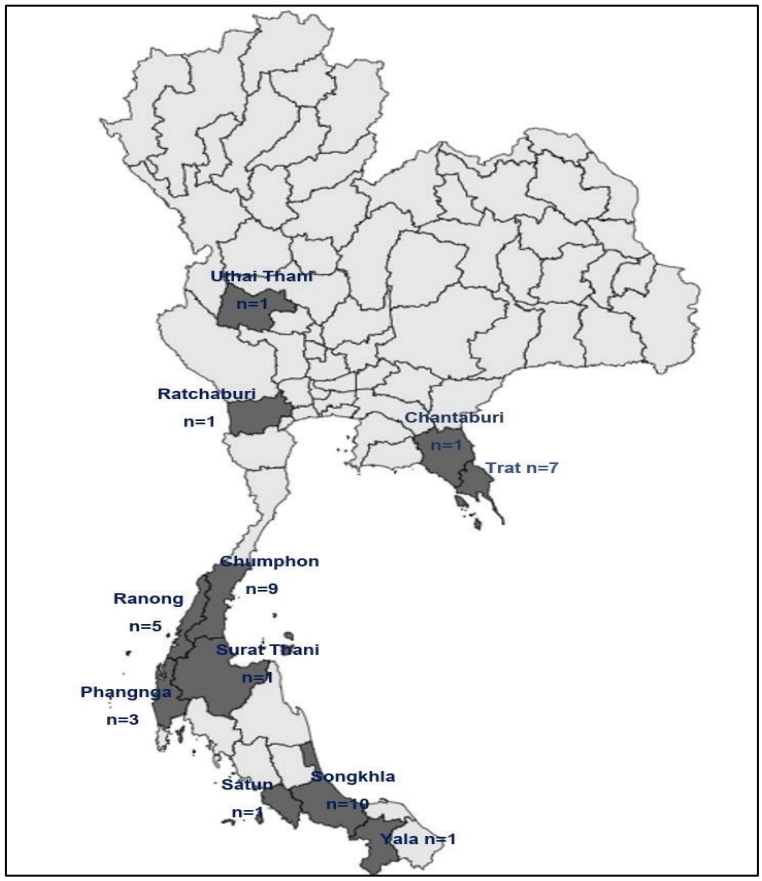


Fig. 1 The collection sites of *P. knowlesi*.

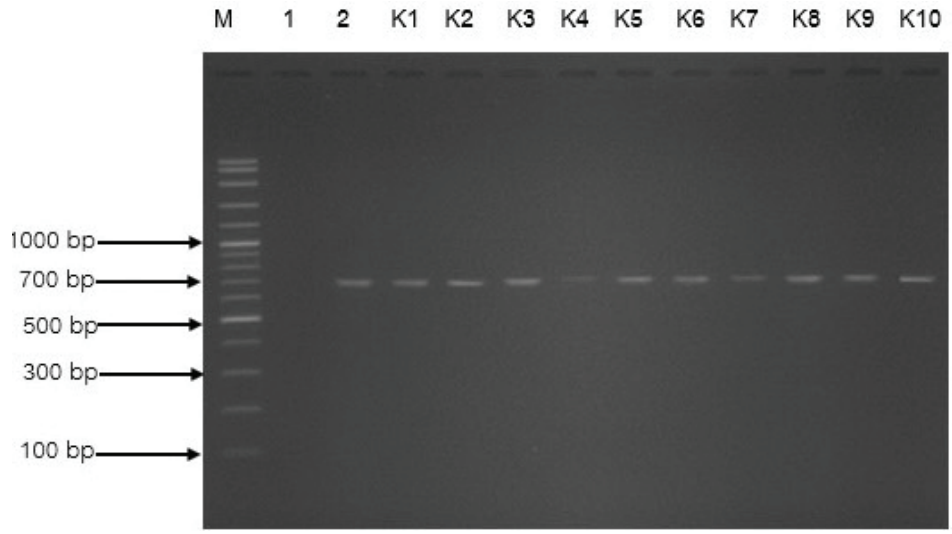


Fig. 2 PCR results of *cox1* gene of *P. knowlesi* in agarose gel electrophoresis. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: Negative control; Lane 2: Positive control; Lane K1-K10: Patient isolates PK1-PK10.

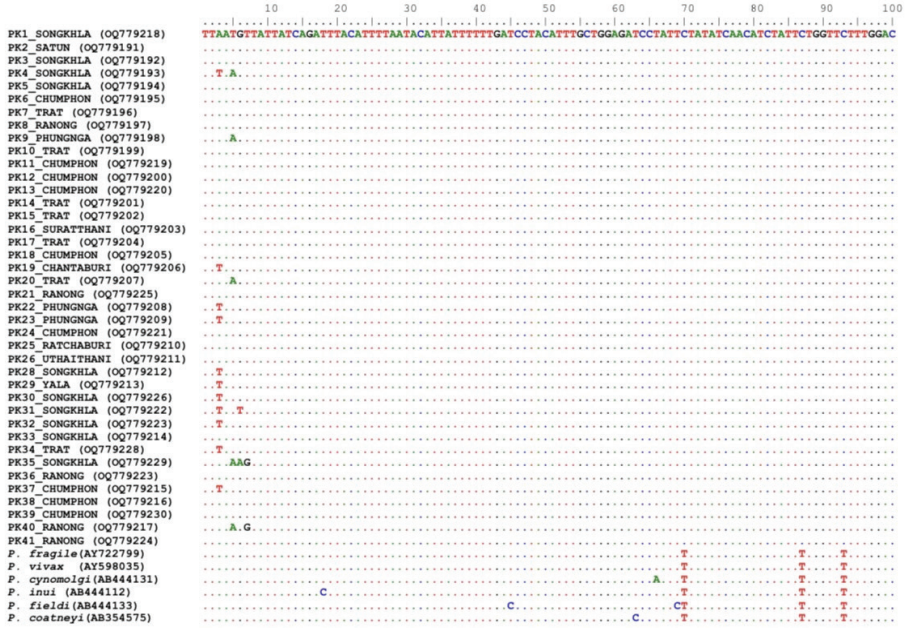


Fig. 3 The results of multiple nucleotides alignment of *cox1* sequences of *P. knowlesi* using the ClustalW program from BioEdit program isolate 1-41 with outgroup base position 1-100 using the ClustalW program from BioEdit program ClustalW version 7.2 (https://bioedit.software.informer.com). Conserved nucleotides sequences are shown as a dot. GenBank accession numbers were shown in parenthesis.

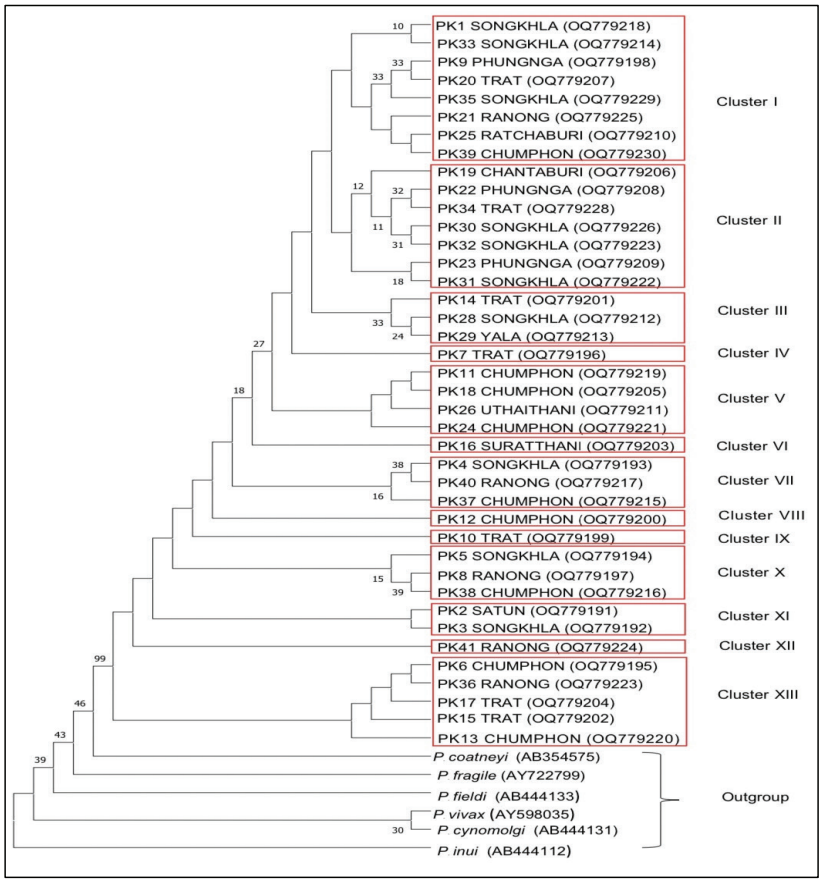


Fig. 4 The phylogenetic tree of *cox1* gene of *P. knowlesi*. The *P. knowlesi* isolates can be divided into 13 clusters by Maximum Parsimony (MP) method using MEGA 11 program (1,000 bootstraps) (http://www.megasoftware.net/bugs.php.) GenBank accession numbers were shown in parenthesis as following PK1 (OQ779218), PK2 (OQ779191), PK3 (OQ779192), PK4 (OQ779193), PK5 (OQ779194), PK6 (OQ779195) PK7 (OQ779196), PK8 (OQ779197), PK9 (OQ779198), PK10 (OQ779199), PK11 (OQ779219), PK12 (OQ779200), PK13 (OQ779220), PK14 (OQ779201), PK15 (OQ779202), PK16 (OQ779203), PK17 (OQ779204), PK18 (OQ779205), PK19 (OQ779206), PK20 (OQ779207), PK21 (OQ779225), PK22 (OQ779208), PK23 (OQ779209), PK24 (OQ779221), PK25 (OQ779210), PK26 (OQ779211), PK28 (OQ779212), PK29 (OQ779213), PK30 (OQ779226), PK31 (OQ779222), PK32 (OQ779223), PK33 (OQ779214), PK34 (OQ779228), PK35 (OQ779229), PK36 (OQ779223), PK37 (OQ779215), PK38 (OQ779216), PK39 (OQ779230), PK40 (OQ779217) and PK41 (OQ779224). Outgroup consist of *P. coatneyi* (AB354575), *P. fragile* (AY722799), *P. fieldi* (AB444133), *P. vivax* (AY598035), *P. cynomolgi* (AB444131) and *P. inui* (AB444112).

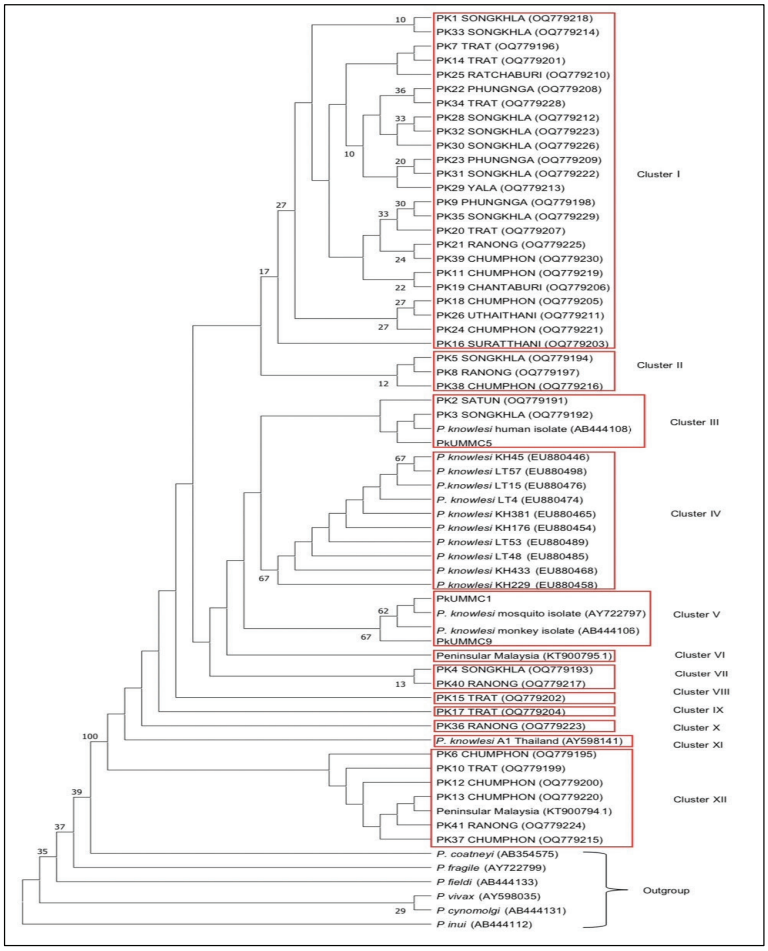


Fig. 5 The phylogenetic tree of *cox1* genes of *P. knowlesi* in this study and *cox1* genes of *P. knowlesi* in GenBank database from Peninsular, Malaysia (PkUMMC1, PkUMMC5, PkUMMC9, *P. knowlesi* mosquito isolate (AY722797), *P. knowlesi* monkey isolate (AB444106), *P. knowlesi* human isolate (AB444108) Sarawak, Borneo, *P. knowlesi* KH45 (EU880446), *P. knowlesi* KH176 (EU880454), *P. knowlesi* KH229 (EU880458), *P. knowlesi* KH381 (EU880465), *P. knowlesi* KH433 (EU880468), *P. knowlesi* LT4 (EU880474), *P. knowlesi* LT48 (EU880485), *P. knowlesi* LT15 (EU880476), *P. knowlesi* LT53 (EU880489), *P. knowlesi* LT57 (EU880498) and Thailand *P. knowlesi* A1 (AY598141). The *P. knowlesi* isolates can be divided into 12 clusters when compared with GenBank accession number from Peninsular Malaysia, Sarawak, Borneo, and Thailand with outgroup. Outgroup consist of *P. coatneyi* (AB354575), *P. fragile* (AY722799), *P. fieldi* (AB444133), *P. vivax* (AY598035), *P. cynomolgi* (AB444131) and *P. inui* (AB444112) by Maximum Parsimony (MP) method using MEGA 11 program (1,000 bootstraps) (http://www.megasoftware.net/bugs.php).

Table 1 Cluster of *P. knowlesi* and patients' data (gender, age group, nationality, and parasite density).

Variable	n (%)	Cluster
Gender		
Male	35 (87.5)	I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII
Female	5 (12.5)	I, II, III, VII, XI, XIII
Age group (years)		
< 40	15 (37.5)	I, II, III, IV, V, VI, VII
≥ 40	25 (62.5)	I, II, III, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XIII
Nationality		
Thai	39 (97.5)	I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII
Burmese	1 (2.5)	IV
Parasite density/1 µl of blood		
<10,000	26 (78.8)	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XIII
≥10,000	7 (21.2)	I, II, V, XIII

Table 2 Cluster of *P. knowlesi* and patients' residential area.

Cluster	Residential area (Province)	n (%)
I, II, III, VII, X, XI	Songkhla	10 (25.0)
I, V, VII, VIII, XIII	Chumphon	9 (22.5)
I, II, III, IV, IX, XIII	Trat	7 (17.5)
I, VII, X, XII, XIII	Ranong	5 (12.5)
I, II	Phangnga	3 (7.5)
III	Yala	1 (2.5)
XI	Satun	1 (2.5)
VI	Surat Thani	1 (2.5)
II	Chanthaburi	1 (2.5)
V	Uthai Thani	1 (2.5)
I	Ratchaburi	1 (2.5)

Table 3 Cluster of *P. knowlesi* and patients' occupations.

Cluster	Occupations	n (%)
I, II, III, IV, VII, IX, X, XI, XIII	Rubber plantations	21 (52.5)
I, II, V, VII, VIII, XIII	Orchards	8 (20.0)
I, II, XII	Employed	4 (10.0)
V	Soldiers/Police	1 (2.5)
V	Monks/Novices	1 (2.5)
X	Other farming	1 (2.5)
I, VI	Other	4 (10.0)

วิจารณ์

สรุปผลการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อ *P. knowlesi* ได้ 13 คลัสเตอร์และพบว่าไอโซเลท ซึ่งอยู่ในคลัสเตอร์ที่แบ่งตาม phylogenetic tree ของแต่ละพื้นที่ของเชื้อ *P. knowlesi* มาจาก 11 จังหวัดในประเทศไทย คลัสเตอร์ I (8 ไอโซเลท) แต่ละไอโซเลทเป็นยีนที่มีแหล่งที่มาจากหลายจังหวัดในภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออกของประเทศไทย คลัสเตอร์ II (7 ไอโซเลท) III (3 ไอโซเลท) และ XIII (5 ไอโซเลท) เป็นยีนที่มีแหล่งที่มาจากคนละจังหวัดในภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย คลัสเตอร์ V (4 ไอโซเลท) เป็นยีนที่มีแหล่งที่มาจากคนละจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งเมื่อศึกษาจากประวัติการเดินทางของผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยในคลัสเตอร์ V มีการเดินทางไปที่จังหวัดชุมพรและกลับมาที่จังหวัดอุทัยธานี ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีการได้รับเชื้อ *P. knowlesi* ที่จังหวัดชุมพรและมาตรวจพบเชื้อที่โรงพยาบาลในจังหวัดอุทัยธานี จึงทำให้ยีนมีความคล้ายคลึงกันมากและจัดอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน คลัสเตอร์ VII (3 ไอโซเลท) X (3 ไอโซเลท) และ XI (2 ไอโซเลท) เป็นยีนที่มีความใกล้เคียงกันมากและมีการระบาดจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่งที่มีบริเวณติดต่อกันทางภาคใต้ของประเทศไทย คลัสเตอร์ IV, VI และ XII (1 ไอโซเลท) เป็นยีนที่พบเพียงจังหวัดเดียว

การศึกษาครั้งนี้พบเพศชายติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่าเพศหญิง เนื่องจากในการศึกษาที่ผ่านมา เพศชายมีอาชีพหรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่ามากกว่าเพศหญิงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศไทยของยุทธศิลป์ และคณะ ในปี ค.ศ. 2015[9] การจำแนกกลุ่มตามอายุผู้ป่วยจำแนกเป็นกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี ติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่ากลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของยุทธศิลป์ และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 พบว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 45 ปี มีความเสี่ยงติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าอายุน้อยกว่า 45 ปี เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มอายุนี้มีอาชีพหรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่าซึ่งมีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อมาลาเรีย[9] ในการศึกษานี้พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* เป็นผู้ป่วยสัญชาติไทย 39 คน ติดเชื้อ *P. knowlesi*

มากกว่าสัญชาติพม่าซึ่งมี 1 คน ซึ่งไม่สามารถนำมาหานัยสำคัญทางสถิติระหว่างเชื้อชาติกับความหนาแน่นของเชื้อ (parasite density) ได้ สาเหตุเนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีความแตกต่างกันมาก เช่นเดียวกับการศึกษาในประเทศไทยของฉวีพจน์ กำจร และ พิชัยณรงค์ ในปี ค.ศ. 2004 เรื่องการติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากรอพยพตามแนวชายแดนไทย-เมียนมา ซึ่งผลการศึกษาพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาส่วนใหญ่เป็นชาวไทยใหญ่และชาวเมียนมาโดยพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเนื่องจากจำนวนคนในกลุ่มตัวอย่างแตกต่างกันมาก[10] การศึกษาปัจจัยทางอาชีพพบว่าตัวอย่างที่ใช้ศึกษาประกอบกิจกรรมต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องเข้าไปในป่าเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ ทำสวนยาง (n = 21) ทำสวนผลไม้ (n = 8) อาชีพทหาร/ตำรวจ (n = 1) อาชีพพระ/สามเณร (n = 1) อาชีพทำไร่อื่น ๆ (n = 1) ซึ่งกิจกรรมส่วนใหญ่พบว่าเป็นปัจจัยที่ทำให้มีความเสี่ยงติดเชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Srichuen และ Pongsiri ในประเทศไทย ซึ่งพบว่าผู้ที่ติดเชื้อไข้มาลาเรียส่วนใหญ่ประกอบอาชีพที่ต้องนอนพักค้างคืนหรือเข้าไปในป่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไข้มาลาเรีย[11, 12] การหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของผู้ป่วยกับความหนาแน่นของเชื้อ มีผู้ป่วยที่มีข้อมูลความหนาแน่นของเชื้อ จำนวนทั้งหมด 33 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดน้อยกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร (n = 26) และพบกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร (n = 7) ซึ่งอยู่ในคลัสเตอร์ I, II, V และ XIII

ผลการทำ phylogenetic tree ของเชื้อ *P. knowlesi* โดยใช้ยีน *cox1* เป็นยีนเป้าหมายเทียบกับข้อมูลจาก GenBank พบว่า *cox1* จากการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับ Accession number KT900795.1 Peninsular Malaysia และ KT900794.1 Peninsular Malaysia และเมื่อนำมาเทียบกับตัวอย่างจากการศึกษาของ Fong และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 จัดกลุ่มได้ 12 คลัสเตอร์ พบคลัสเตอร์ใหม่ในประเทศไทยซึ่งมาจากภาคใต้ภาคกลาง และภาคตะวันออกของประเทศไทย คลัสเตอร์ III เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสงขลาและจังหวัดสตูลมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *P. knowlesi* ในบริเวณเพนนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย[6] สำหรับคลัสเตอร์ I, II และ VII-X คือคลัสเตอร์ที่พบใหม่ในประเทศไทย และคลัสเตอร์ XII ตัวอย่างจากภาคใต้ในประเทศไทยคือ จังหวัดชุมพร ระนอง และภาคตะวันออกคือ จังหวัดตราด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับบริเวณเพนนินซูล่ามาเลเซีย (KT900794.1 Peninsular Malaysia) ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ในแต่ละคลัสเตอร์มีความใกล้เคียงกันมากทางด้านพันธุศาสตร์ และบางคลัสเตอร์มีลักษณะคล้ายคลึงกับยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* ที่มาจากประเทศมาเลเซีย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ในประเทศไทยที่พบเชื้อ *P. knowlesi* ในทางภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยเฉพาะชายแดนไทย-มาเลเซีย[3, 13-16]

ในการวิจัยนี้ พบเชื้อ *P. knowlesi* บางไอโซเลท มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ใกล้เคียงกับ *P. knowlesi* ที่มาจากประเทศมาเลเซีย และสอดคล้องกับการศึกษาของ Fong และคณะ ซึ่งรายงานว่า ยีน *cox1* เหมาะสมสำหรับที่จะนำมาศึกษา phylogenetic ของเชื้อ *P. knowlesi* และสามารถแยกความแตกต่างของที่มาของเชื้อ *P. knowlesi* ในแต่ละพื้นที่ได้[6] เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Loh และคณะ ที่ได้มีการนำยีน *cox1* มาใช้ในการแบ่งกลุ่มของ *P. knowlesi* โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ประเทศสิงคโปร์ รัฐซาราวัก ประเทศมาเลเซีย และประเทศไทยโดยใช้การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *cox1*[7]

สำหรับงานวิจัยนี้ พบแหล่งที่มาของเชื้อ *P. knowlesi* มาจากภาคใต้เป็นส่วนใหญ่ (n = 25) ได้แก่ จังหวัดชุมพร พังงา ยะลา สตูล ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี มากกว่าจังหวัดทางภาคอื่น ๆ ในประเทศไทย (n = 8) ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ตราด ราชบุรี และอุทัยธานี ซึ่งจังหวัดสตูล สงขลา ยะลา นราธิวาส เป็นจังหวัดชายแดนไทย-มาเลเซีย พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sugaram และคณะ ในปี ค.ศ. 2021 ที่พบการติดเชื้อ *P. knowlesi* ในผู้ป่วยที่เดินทางกลับจากประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบรายงานการติดเชื้อ *P. knowlesi* ส่วนใหญ่ในบริเวณเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซียและการเกิดคลัสเตอร์ *P. knowlesi* น่าจะเกิดมาจากการติดต่อจากลิงแสมสู่คนและยุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค[15] และการติดเชื้อ *P. knowlesi* อาจเกิดจากการอพยพโยกย้ายถิ่นฐานของคน การเดินทางหรือโยกย้ายถิ่นฐานของคนสามารถนำเชื้อ *P. knowlesi* จากแหล่งหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่งได้ สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ในหลายคลัสเตอร์ที่มีเชื้อ *P. knowlesi* มาจากผู้ป่วยคนละจังหวัดกัน โดยงานวิจัยนี้ยังขาดข้อมูลการเดินทางหรือการเคลื่อนย้ายที่อยู่ของผู้ป่วย ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของที่มาของเชื้อ *P. knowlesi* ในแต่ละพื้นที่ได้อย่างชัดเจน ยกเว้นคลัสเตอร์ V ที่ผู้ป่วยสามรายอยู่ในจังหวัดชุมพร ส่วนอีกหนึ่งรายอยู่ในจังหวัดอุทัยธานี แต่มีประวัติเคยเดินทางไปจังหวัดชุมพร ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อในคลัสเตอร์นี้มาจากจังหวัดชุมพรทั้งหมด จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ใกล้เคียงกัน

จากผลการศึกษานี้ ควรมีการเฝ้าระวังกลุ่มเสี่ยงคือประชากรไทยเพศชายอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี โดยเฉพาะในจังหวัด 11 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ สงขลา ชุมพร ระนอง พังงา ยะลา สตูล สุราษฎร์ธานี ตราด จันทบุรี อุทัยธานี และราชบุรี ที่มีอาชีพหรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่า ได้แก่ อาชีพทำสวนยาง ทำสวนผลไม้ ทหาร/ตำรวจ พระ/สามเณร และทำไร่อื่น ๆ ซึ่งได้มีการเข้าป่าแล้วอาจขาดการป้องกันตัวเองที่ถูกต้อง ดังนั้นควรจัดกิจกรรมให้ความรู้เรื่องการป้องกันไม่ให้ติดเชื้อมาลาเรีย เมื่อมีความจำเป็นในการเข้าไปสู่พื้นที่เสี่ยงควรใช้อุปกรณ์ป้องกันตนเอง เช่น ยากันยุง การใส่เสื้อผ้าให้มิดชิด เพื่อนำไปสู่การลดอัตราป่วยจากโรคมาลาเรียต่อไป กลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร ควรได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที เนื่องจากค่าความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร จะส่งผลทำให้เกิดภาวะโลหิตจางรุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Phillips และคณะ ในขณะที่มี parasitemia มากกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางรุนแรงซึ่งมักพบได้บ่อยในผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอาการรุนแรง[17]

ในการศึกษาเพิ่มเติมต้องเก็บตัวอย่างเชื้อ *P. knowlesi* จากหลาย ๆ บริเวณและกำหนดข้อมูลของผู้ป่วยที่จะทำการบันทึกเพื่อนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับคลัสเตอร์ของเชื้อ *P. knowlesi* ที่แบ่งโดย phylogenetic tree และควรกำหนดการเก็บตัวอย่างระหว่างเพศชายและเพศหญิงให้เท่ากันเพื่อประโยชน์ในทางสถิติต่อไป ซึ่งข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือการใช้ตัวอย่างที่เหลือจากงานประจำของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. knowlesi* ทำให้ไม่สามารถกำหนดเกณฑ์ในการเลือกผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* เช่น เพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ทำให้นำมาคำนวณทางสถิติไม่ได้ รวมทั้งยังขาดข้อมูลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ เช่น การตรวจ complete blood count การตรวจทางเคมีคลินิก อาการของผู้ป่วย ความหนาแน่นของเชื้อ จึงไม่สามารถหาความสัมพันธ์ว่าเชื้อคลัสเตอร์ใดมีความสัมพันธ์ในการทำให้เกิดอาการรุนแรงแก่ผู้ป่วยมากกว่าเชื้อคลัสเตอร์อื่น

สรุป

ผลการทำ phylogenetic tree ของยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* ร่วมกับข้อมูลของผู้ป่วยมีประโยชน์ต่องานทางด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมากโดยเฉพาะทางด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการวางแผนควบคุมกำจัดโรคมาลาเรียในประเทศไทยและการระบาดของเชื้อจากแหล่งหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่งได้ และควรมีการเฝ้าระวังกลุ่มเสี่ยงคือประชากรไทยเพศชายอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี โดยเฉพาะในจังหวัด 11 จังหวัดในประเทศไทย ในกลุ่มผู้ที่มีอาชีพ หรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่า ได้แก่ อาชีพทำสวนยาง ทำสวนผลไม้ ทหาร/ตำรวจ พระ/สามเณร และทำไร่ เป็นต้น รวมถึงจัดกิจกรรมให้ความรู้เรื่องการป้องกันและเฝ้าระวังไม่ให้ติดเชื้อมาลาเรียที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยประเภททุนวิจัยทั่วไป กองทุนวิจัยคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2565 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้อำนวยการกองโรคติดต่อนำโดยแมลง หัวหน้าศูนย์และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค ซึ่งได้อนุญาตให้ใช้ตัวอย่างที่เหลือจากงานประจำมาทำวิจัย และให้ใช้สถานที่ห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุลในครั้งนี้ และประสานงานในการช่วยเก็บตัวอย่างทำวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งข้อมูลของผู้ป่วย รวมทั้งภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และขอขอบคุณ คุณณัฐวุฒิ พรมดา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาด้านการใช้สถิติในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Italy: World Health Organization; 2012.
2. World Health Organization. Management of severe malaria: a practical handbook. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2012.
3. Putaporntip C, Hongsrimuang T, Seethamchai S, *et al*. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. J Infect Dis 2009; 199: 1143-50.
4. Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. Malar J 2012; 11: 36.
5. Lertprom R, Kanchanasuwan J, Ketkaew J, *et al*. The first *Plasmodium knowlesi*, Saraburi Province. June 2017. WESR Wkly Epidemiol Surv Rep 2017; 48: 801-8.
6. Fong MY, Lau YL, Chin LC, Al-Mekhlafi AM. Sequence analysis on the mitochondrial *cox1* gene of recent clinical isolates of *Plasmodium knowlesi* in Klang valley, peninsular Malaysia. Trop Biomed 2011; 28: 457-63.
7. Loh JP, Gao QH, Lee VJ, Tetteh K, Drakeley C. Utility of *cox1* phylogenetics to differentiate between locally acquired and imported *Plasmodium knowlesi* infections in Singapore. Singapore Med J 2016; 57: 686.

8. De JA, Kadir KA, Mohamad DS, *et al*. New vectors in northern Sarawak, Malaysian Borneo, for the zoonotic malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Parasit Vectors 2020; 13: 472.
9. Kumbancha Y, Jirapornku C, Tungsrithong N. Factors in association with malaria infection in Phu Phan district, Sakon Nakhon province, Thailand. KKU Journal for Public Health Research 2015; 8: 57-64.
10. Chaveepojkamjorn W, Pichainarong N. Malaria infection among the migrant population along the Thai-myanmar border area. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004; 35: 48-52.
11. Pongsiri K. Factors related to malaria infection among people in border communities in Mae Sariang district, Mae Hong Son province. Dis Control J 2021; 47: 678-86.
12. Srichuen R. Risk factors of malaria infection in Thai-Myanmar border Ranong Province, Thailand (dissertation). Khon Kaen: Khon Kaen University; 2005. 125 p.
13. Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. Malar J 2012; 11: 36.
14. Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, *et al*. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques, Thailand. Emerg Infect Dis 2011; 17: 1799.
15. Sugaram R, Boondej P, Srisutham S, *et al*. Genetic population of *Plasmodium knowlesi* during pre-malaria elimination in Thailand. Malaria J 2021; 20: 1-8.
16. Ngernna S, Rachaphaew N, Thammapalo S, Prikchoo P, Kaewnah O, Manopwisedjaroen K. Case report: case series of human *Plasmodium knowlesi* infection on the Southern border of Thailand. Am J Trop Med Hyg 2019; 101: 1397-401.
17. Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, *et al*. The importance of anemia in cerebral and uncomplicated *falciparum* malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. Q J Med 1986; 58: 305-23.