



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ต่อความไวของยาต้านมาลาเรีย
artemether และ lumefantrine (coartemether) ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

The effect of *pfmdr1* mutation on *in vitro* artemether/ lumefantrine (coartemether)
sensitivity in *Plasmodium falciparum*

โดย พันโท รองศาสตราจารย์ มหิรุทธ มุ่งถิ่น และคณะ

มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ต่อความไวของยาต้านมาลาเรีย
artemether และ lumefantrine (coartemether) ในเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม

The effect of *pfmdr1* mutation on *in vitro* artemether/ lumefantrine (coartemether)
sensitivity in *Plasmodium falciparum*

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. พ.ท. รศ. มหิรุทธ มุ่งถิ่น

ภาควิชาปรสิตวิทยา

วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

2. ศ ดร.เกศรา ณ บางช้าง

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

เนื่องจาก coartemether เป็นยาผสมระหว่าง artemether และ lumefantrine ซึ่งอยู่ในกลุ่ม endoperoxides และ acrylaminoalcohols ตามลำดับ ทางคณะผู้วิจัยต้องการศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ต่อการตอบสนองต่อยาทั้งสองนี้ เนื่องจากพบว่าความไวของยาในกลุ่ม endoperoxides และ acrylaminoalcohols ตัวอื่น มีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* จากการศึกษาโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยบริเวณชายแดนประเทศไทยพม่าและชายแดนไทยกัมพูชา พบว่าเชื้อที่มียีน *pfmdr1* ชนิด Wild type มีค่า artemether IC50 และ lumefantrine IC50 สูงกว่าเชื้อที่มียีน *pfmdr1* ชนิด K1 mutation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียยังแสดงการดื้อข้ามระหว่างยาทั้งสองนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการพิจารณายีนนี้มาใช้อาจทำให้มีการเลือกเชื้อที่มียีน *pfmdr1* ชนิด Wild type ได้ในธรรมชาติ

Abstract

Coartemether is the combination of endoperoxide i.e. artemether and acrylaminoalcohol i.e. lumefantrine. Recent studies showed that both sensitivities to endoperoxides and acrylaminoalcohols in *Plasmodium falciparum* were modulated by the polymorphisms of *pfmdr1* gene. Using parasites isolated from the patients in the multidrug-resistant areas i.e. Thai/Myanmar and Thai/Cambodia borders, our study also showed those parasites containing wild-type *pfmdr1* gene exhibited more resistant than those with K1-type mutation. We also found the cross resistance between the sensitivity to artemether and lumefantrine in these isolates. Since *pfmdr1* gene can mediate the sensitivity to both drugs so it is likely that these combinations may select for parasites containing wild-type *pfmdr1* gene.

สรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ต่อความไวของยา
ต้านมาลาเรีย artemether และ lumefantrine (coartemether) ในเชื้อ
มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม
- (ภาษาอังกฤษ) The effect of *pfmdr1* mutation on *in vitro* artemether/ lumefantrine
(coartemether) sensitivity in *Plasmodium falciparum*

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
พ.ท. มัทธิรุท มุ่งถิ่น
รองศาสตราจารย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า
315 ถนนราชวิถี ราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
โทรศัพท์ & โทรสาร 02-3547761
e-mail : mathirut@pmk.ac.th

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย ปรสิตวิทยา/เภสัชวิทยา
4. งบประมาณทั้งโครงการ 480,000 บาท
5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี
6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วนเพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง

✓ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขสำหรับประเทศไทย โดยเฉพาะมาลาเรียฟัลซิพารัม ซึ่งมี
ปัญหาการดื้อยา Coartemether เป็นยาที่มีส่วนประกอบของ artemether 20 mg และ lumefantrine 120
mg ซึ่งผลิตเพื่อที่จะนำมาใช้ในการรักษามาลาเรียที่เกิดจาก *P. falciparum* ชนิดดื้อยานี้ การศึกษาการ
ดื้อยาในกลุ่ม quinoline aminoalcohol ในระดับอนุพันธุกรรม พบว่ามีความสัมพันธ์กับยีน *pfmdr1* มัก
พบว่าลักษณะของยีนที่เป็น wild type จะดื้อต่อยา mefloquine, halofantrine และ quinine มากกว่าเชื้อที่
มีลักษณะยีนที่กลายพันธุ์ (Mungthin et al., 1999; Reed et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การกลาย

พันธุ์ของ *pfmdr1* ยังมีผลต่อความไวของกลุ่มอนุพันธุ์ของยา artemisinin (Reed et al., 2000; Duraisingh et al., 2000a) อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบผลขัดแย้ง coartemether คือ ยาที่เป็นส่วนประกอบของ artemether อนุพันธุ์ของ artemisinin และ lumefantrine ซึ่ง lumefantrine เป็นยาในกลุ่ม quinoline ซึ่งมีโมเลกุลโครงสร้างคล้ายกับ halofantrine ดังนั้นการตอบสนองต่อยาทั้งสองนี้ในเชื้อ *P. falciparum* อาจขึ้นอยู่กับกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* เช่นเดียวกับยาในกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานความสัมพัทธ์ที่แน่ชัด

8. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ต่อการตอบสนองต่อยา artemether และ lumefantrine (coartemether) ในเชื้อ *Plasmodium falciparum*

9. ระเบียบวิธีวิจัย

เชื้อ *P. falciparum* ประมาณ 50 สายพันธุ์ จะถูกนำมาใช้ในการทดลองนี้ โดยใช้วิธีที่เหมาะสม (Trager and Jensen, 1976) เพื่อนำมาทดสอบการตอบสนองต่อยาโดยใช้วิธีของ Desjardins et al. (1979) ซึ่งจะเป็นการวัด hypoxanthine uptake ของเชื้อในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มียาในความเข้มข้นที่ต่างกัน เปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา ยาจะถูกเตรียมใน 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 หลังจากนั้นจะเก็บเชื้อใส่แผ่นกรอง ทิ้งไว้ให้แห้งและวัดระดับ hypoxanthine ด้วย scintillation counter และนำมาคำนวณหา IC₅₀ (ความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 50%) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ GRAFIT[®] ค่า IC₅₀ ของเชื้อที่ตอบสนองต่อยานี้จะเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* จะทำโดยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์แบบ K1-type (N86Y) จาก Wild type ผลที่ได้จากการศึกษาทางพันธุกรรมนี้จะนำไปเปรียบเทียบกับผลการตอบสนองของเชื้อต่อยา โดยใช้ Chi-square หรือ Fisher Exact's test

10. ผลวิจัย

เชื้อ *P. falciparum* 54 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองถูกนำมาแยก DNA ในขณะที่เชื้ออยู่ในระยะ trophozoite โดยใช้ Chelex[®] การศึกษาแยกสายพันธุ์ (DNA fingerprinting) ของเชื้อสามารถทำได้โดยเทคนิค multiplex PCR โดยนำ DNA ที่แยกได้จากเชื้อมา amplified โดย PCR ซึ่งจะใช้ primer คู่ที่ encode ยีน MSA-1, MSA-2 และ CSP พบว่าเชื้อทั้ง 54 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน

การศึกษาการกลายพันธุ์ของ *pfmdr1* gene ทำโดยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reactions-Restriction Fragment Length Polymorphism) ซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์แบบ K1-type (N86Y) โดยใช้ primer ยีน *pfmdr1* PCR product ที่ได้จะถูกนำไปย่อยโดย restriction endonuclease ซึ่งจะถูกนำไปแยกด้วย 2% agarose gel และตรวจด้วย UV Transillumination หลังจากการย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งสามารถตรวจพบลักษณะของยีน *pfmdr1* ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางแสดงลักษณะของยีน *pfmdr1* จากการศึกษายีน *P. falciparum* 54 สายพันธุ์

	<i>pfmdr1</i>	
	Wild type	K1 type
จำนวน (%)	44 (81.5)	10 (18.5)

การทดสอบการตอบสนองต่อยาพบว่าเชื้อที่มี K1-type *pfmdr1* มีค่าเฉลี่ยของ artemether IC50 เท่ากับ 1.85 ± 0.7 nM เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มี Wild-type *pfmdr1* พบค่าเฉลี่ยของ artemether IC50 เท่ากับ 3.9 ± 2.1 nM ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$) ในขณะที่เชื้อที่มี K1-type *pfmdr1* มีค่าเฉลี่ยของ lumefantrine IC50 เท่ากับ 40.6 ± 19.8 nM เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มี Wild-type *pfmdr1* พบค่าเฉลี่ยของ lumefantrine IC50 เท่ากับ 149.9 ± 102 nM ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการกลายพันธุ์บนยีน *pfmdr1* มีผลต่อความไวของยา artemether และ lumefantrine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขสำหรับประเทศไทย โดยเฉพาะมาลาเรียฟัลซิพารัมเป็นปัญหาสำคัญที่สุดเนื่องจากสามารถก่อให้เกิดอาการรุนแรงจนเสียชีวิตได้ เช่น มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมในประเทศไทยได้พัฒนาจนสามารถลดการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียได้หลายชนิดทั้งในกลุ่ม quinolines และ antifolates ภาวะการดื้อยานี้ทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชา (อ.บ่อไร่ จ.ตราด) และชายแดนไทย-พม่า (อ.แม่สอด จ.ตาก) เนื่องจากปัญหาในการดื้อยาในประเทศไทยได้มีการนำยาในกลุ่มใหม่คือ กลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin เช่น artemether และ artesunate ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษามาลาเรียฟัลซิพารัมเป็นที่น่าพอใจ ปัญหาของการให้การรักษาด้วยยาในกลุ่มนี้ตัวเดียว คือพบการกลับเป็นซ้ำ (recrudescence) ได้สูง โดยเฉพาะในรายที่มีอาการรุนแรงและในผู้ป่วยที่มีเชื้อในเลือดสูง อย่างไรก็ตามการกลับเป็นซ้ำ (recrudescence) นี้ไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ แต่อาจเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของยาที่อยู่ในกระแสเลือดในช่วงเวลาที่ไม่นานนัก ดังนั้นในปัจจุบันจึงใช้กลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin ร่วมกับยาในกลุ่มที่มีค่าครึ่งชีวิตยาว เช่น mefloquine เป็นต้น และยังเป็นเหตุผลของการผลิตยาตัวใหม่ coartemether ซึ่งมีส่วนประกอบรวมระหว่าง artemether 20 mg และ lumefantrine 120 mg

สาเหตุของการดื้อยาสวนหนึ่งเกิดจากการดื้อข้ามระหว่างยา ตัวอย่างเช่น ในประเทศไทยเมื่อนำ mefloquine มาใช้ พบว่าการตอบสนองของเชื้อต่อยานี้ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาอันสั้น เนื่องจาก mefloquine มีการดื้อข้ามกับ quinine และในช่วงที่นำ mefloquine มาใช้ในช่วงที่ *P. falciparum* มีการตอบสนองต่อ quinine ลดลง (Suebsaeng et al., 1986) ดังนั้นการศึกษาการดื้อข้ามระหว่างยาจะเป็นข้อมูลเพื่อนำมาพิจารณาการใช้ยาในการรักษามาลาเรียชนิดดื้อยา การดื้อข้ามระหว่างยาก็พบในยาที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น quinoline aminoalcohol (mefloquine และ halofantrine) อย่างไรก็ตามใน *P. falciparum* พบการดื้อข้ามระหว่างยาที่มีโครงสร้างแตกต่างกันได้ เช่น ยาในกลุ่ม quinoline aminoalcohol และกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin (Basco and Le Bras, 1992; Gay et al., 1997; Pradine et al., 1998)

การศึกษาการดื้อยาในกลุ่ม quinoline aminoalcohol ในระดับอนุพันธุกรรม พบว่ามีความสัมพันธ์กับยีน *pfmdr1* มักพบว่าลักษณะของยีนที่เป็น wild type จะดื้อต่อยา mefloquine, halofantrine และ quinine มากกว่าเชื้อที่มีลักษณะยีนที่กลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากลายพันธุ์ของ *pfmdr1* ยังมีผลต่อความไวของยาในกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin กล่าวคือ ในเชื้อ *P. falciparum* ที่มียีน *pfmdr1* ชนิด wild type จะมีความไวต่อยาในกลุ่มนี้ต่ำกว่าชนิดกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่

พบผลขัดแย้ง (Reed et al., 2000; Duraisingh et al., 2000a; Duraisingh et al., 2000b; Basco and Ringwald, 2002) coartemether คือ ยาที่เป็นส่วนประกอบของ artemether อนุพันธ์ของ artemisinin และ lumefantrine ยาในกลุ่ม quinoline ซึ่งมีโมเลกุลโครงสร้างคล้ายกับ halofantrine ดังนั้นการตอบสนองต่อยาทั้งสองนี้ในเชื้อ *P. falciparum* อาจขึ้นอยู่กับกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* เช่นเดียวกับยาในกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ที่แน่ชัด

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ต่อการตอบสนองต่อยา artemether และ lumefantrine (coartemether) ในเชื้อ *Plasmodium falciparum*

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Coartemether เป็นยาที่มีส่วนประกอบของ artemether 20 mg และ lumefantrine 120 mg ซึ่งผลิตมาเพื่อนำใช้ในการรักษามาลาเรียที่เกิดจาก *P. falciparum* ชนิดดื้อยา ในพื้นที่ที่มีเชื้อดื้อยาเช่น ประเทศไทย การรักษาด้วย Coartemether ขนาด artemether 480 mg และ lumefantrine 2880 mg แบ่งให้ 6 ครั้ง ให้ผลการรักษาหายขาด 96-98% (van Vugt et al., 1999; van Vugt et al., 2000; Lefevre et al., 2001) ดังนั้น coartemether จึงอาจใช้เป็นยาเลือกในการรักษามาลาเรียที่เกิดจาก *P. falciparum* ชนิดดื้อยาได้

Lumefantrine เป็น quinoline กลุ่ม aryl amino alcohol ที่มีโครงสร้างคล้าย halofantrine ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นมาโดย Academy of Military Medical Sciences ปักกิ่ง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ยามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในกระแสเลือดระยะที่ไม่ใช้เพศได้อย่างมีประสิทธิภาพ เชื่อว่ากลไกออกฤทธิ์น่าจะเหมือนกับยาในกลุ่ม quinoline ตัวอื่นคือ ยับยั้ง heme polymerization (WHO, 1990) ในขณะที่ artemether เป็นอนุพันธ์ของ artemisinin สารที่สกัดได้จาก *Artemisia annua* กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด ยาจะออกฤทธิ์หลังจากถูกกระตุ้นโดยเหล็ก ทำให้เกิดสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียที่เฉพาะเจาะจง ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *P. falciparum* ในกระแสเลือดระยะที่ไม่ใช้เพศได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว แต่มักพบว่ามี recrudescence ได้สูงเมื่อใช้ในการรักษา เนื่องจากเป็นยาที่มีค่าครึ่งชีวิตสั้น ดังนั้นมักใช้ร่วมกับยาที่มีค่าครึ่งชีวิตยาว เช่น mefloquine ซึ่งก็เป็นเหตุผลในการผลิตยา coartemether ขึ้น

ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานยืนยันพบการดื้อกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin ในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ในเชื้อที่มีการตอบสนองต่อยา mefloquine และ halfantrine ลดลงจะพบว่า

การตอบสนองต่อกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin ลดลงด้วย (Basco and Le Bras, 1992; Gay et al., 1997; Pradine et al., 1998) ซึ่งลักษณะที่พบนี้อาจเป็นลักษณะของ multidrug resistance ที่พบในเชื้อ *P. falciparum* การศึกษาความไวของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรีย ประเทศ Gambia เมื่อควบคุมจำนวนของเชื้อที่ใช้ในการทดลองแล้ว Duraisingh และคณะ พบว่ามีการดื้อข้ามระหว่างยา dihydroartemisinin, mefloquine, halofantrine และ quinine

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาถึงลักษณะ multidrug resistance ในเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งจะมีการดื้อข้าม (cross resistance) ระหว่าง mefloquine, halofantrine และ quinine กลไกการดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ในระดับอนุชีวพบว่าขึ้นอยู่กับยีน *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) จะมีความสัมพันธ์กับการลดลงของการตอบสนองต่อยา mefloquine, halofantrine และ quinine หลังจากนั้นได้มีการทดสอบเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก็พบความสัมพันธ์นี้เช่นกัน (Wilson et al., 1993) ถึงแม้ว่าการศึกษาในประเทศไทยโดย Price และคณะ พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่แสดงการดื้อต่อ mefloquine, halofantrine และ quinine ส่วนหนึ่งเท่านั้นที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* ความสัมพันธ์นี้ได้มีการยืนยันโดยการทดลองทำให้เชื้อดื้อต่อ mefloquine (*In vitro* selection for mefloquine resistance) พบว่าเชื้อเหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* มากขึ้น (Cowman et al., 1994; Peel et al., 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรีย ประเทศไทย ทั้งที่ทำโดย Price และคณะ และ Chaiyaroj และคณะ พบเชื้อที่ดื้อต่อยา mefloquine บางสายพันธุ์มียีน *pfmdr1* ชุดเดียว 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) ยีน *pfmdr1* เป็นยีนที่ highly conserved (Foote et al., 1990; Wilson et al., 1993) ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* เท่าที่พบในปัจจุบันมีเพียง 2 ลักษณะ คือ K1-type ซึ่งพบในทวีปเอเชียและแอฟริกา และ 7G8-type ซึ่งพบในทวีป

อเมริกาใต้ (Foote et al., 1990) โดยการกลายพันธุ์แบบ K1-type จะมีการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ที่ตำแหน่ง 86 จาก Asn เป็น Tyr ในขณะที่การกลายพันธุ์แบบ 7G8-type จะมีการเปลี่ยนแปลงของ amino acid 4 ตำแหน่งร่วมกัน คือ 184 (Tyr เป็น Phe), 1034 (Ser เป็น Cys), 1042 (Asn เป็น Asp) และ 1246 (Asp เป็น Tyr) การพบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ในประเทศไทยพบเฉพาะแบบ K1-type ซึ่งถูกยืนยันโดยการศึกษาของ Chaiyaroj และคณะ และ Mungthin และคณะ ถึงแม้ว่าเชื้อสายพันธุ์ไทยบางสายพันธุ์จะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 184, 1034, 1042 และ 1246 แต่ก็พบในอัตราส่วนที่ต่ำมากและไม่เคยพบร่วมกัน (Wilson et al., 1993; Price et al., 1999; Lopes et al., 2002) ซึ่งเป็นลักษณะของการกลายพันธุ์แบบ 7G8-type นอกจากนี้การกลายพันธุ์เฉพาะจุดทั้ง 4 จุดนี้ไม่เคยพบว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยาในเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย (Price et al., 1999; Lopes et al., 2002)

การทดลองโดยใช้ระบบ Transfection ในเชื้อ *P. falciparum* พบว่าเมื่อมีการถ่ายถอดยีน *pfmdr1* ชนิด wild type จะทำให้เชื้อดื้อต่อ mefloquine, halofantrine และ quinine มากขึ้น (Reed et al., 2000) นอกจากยีนในกลุ่มนี้แล้วเชื้อยังมีการลดลงต่อการตอบสนองต่อ artemisinin ด้วย ดังนั้นเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจากเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและเชื้อที่ทดสอบในห้องทดลองแล้ว เชื่อว่ายีน *pfmdr1* นอกจากจะมีผลในการกำหนดการตอบสนองต่อยาในกลุ่ม quinoline แล้ว น่าจะมีผลต่อการตอบสนองต่อยาในกลุ่ม artemisinin ด้วย การทดลองในเชื้อที่ได้จากการทำ genetic cross ระหว่าง HB3 และ 3D7 พบว่าการกลายพันธุ์ของ amino acid ที่ตำแหน่ง 184 บนยีน *pfmdr1* มีผลต่อการตอบสนองต่อกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin (Duraisingh et al., 2000a) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรีย ประเทศแอมบีย ไม่พบความสัมพันธ์นี้ แต่พบว่าในเชื้อที่มีการตอบสนองไวต่อกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin กว่า จะพบการกลายพันธุ์ของ amino acid ที่ตำแหน่ง 86 บนยีน *pfmdr1* (Duraisingh et al., 2000b) นอกจากนี้การศึกษาเชื้อที่แยกได้จากคนไข้มาลาเรียประเทศแอมบอรูน พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ไม่มีผลต่อความไวของเชื้อต่อกลุ่มอนุพันธ์ของยา artemisinin (Basco and Ringwald, 2002)

การศึกษาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของ amino acid บนยีน *pfmdr1* และยา artemether และ lumefantrine ยังอยู่ในวงจำกัดและยังไม่แน่ชัด การศึกษาเชื้อจากพื้นที่ต่างๆจะเป็นหลักฐานในการยืนยันความสัมพันธ์เหล่านี้

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. เชื้อ *P. falciparum* ที่นำมาศึกษา

เชื้อ *P. falciparum* ประมาณ 50 สายพันธุ์ ที่เก็บอยู่ในถังไนโตรเจนเหลว ภาควิชาปรสิตวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า เชื้อเหล่านี้แยกได้จากผู้ป่วยมาลาเรีย ช่วงปี พ.ศ. 2541-2545

2. การเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ *P. falciparum* จะถูกเลี้ยงใน sterile flask ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Trager and Jensen, 1976) ในเม็ดเลือดแดง (O^+) ที่ถูกเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อ complete medium (RPMI1640, 10% AB serum, 2.5% ของ 1M HEPES, 0.1% ของ 10 มก./มล. Gentamicin solution) ภายใต้ 93% N_2 , 3% O_2 , 4% CO_2 และอุณหภูมิ 37°C

ปริมาณเชื้อจะถูกตรวจโดยการย้อมด้วย Giemsa ทุกวัน โดยจะเจือจางเชื้อให้ได้ประมาณ 1-2% parasitemia ยกเว้นในกรณีที่ต้องการเชื้อในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่านี้ เชื้อที่เหลือใช้จะถูกเก็บในถังไนโตรเจนเหลว โดยจะผสมเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อใน cryoprotectant (glycerol/sorbitol in normal saline) ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อต้องการใช้เชื้อเหล่านี้สามารถเอาออกมาใช้ได้โดย การปั่นร่วมกับ 3.5% NaCl และล้างด้วย RPMI และเลี้ยงในสภาวะที่กล่าวข้างต้น

3. การทดสอบการตอบสนองต่อยา

การตอบสนองต่อยาโดยใช้วิธีของ Desjardins *et al.* (1979) ซึ่งจะเป็นการวัด hypoxanthine uptake ของเชื้อในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มียาในความเข้มข้นที่ต่างกัน เปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา ยาจะถูกเตรียมใน ethanol, methanol หรือ DMSO ในความเข้มข้น 10^{-2} M และจะถูกเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วย complete medium

เชื้อที่ใช้จะถูกเจือจางให้ได้ 1% parasitemia และใส่รวมกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่มียาและไม่มียา และเลี้ยงภายใต้ 93% N_2 , 3% O_2 , 4% CO_2 และอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ titrated hypoxanthine และทิ้งไว้ภายใต้สภาวะเดิม 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเก็บเชื้อใส่แผ่นกรอง ทิ้งไว้ให้แห้ง และวัดระดับ hypoxanthine ด้วย scintillation counter

ค่าที่วัดได้ในเชื้อที่อยู่ในน้ำเลี้ยงที่มียา จะถูกเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับเชื้อที่อยู่ในน้ำเลี้ยงที่ไม่มียา ซึ่งจะสามารถเอามาคำนวณเป็น IC_{50} (ความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 50%) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ GRAFIT[®] ค่า IC_{50} ของเชื้อที่ตอบสนองต่อยานี้จะเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

4. การศึกษาทางพันธุกรรมของเชื้อ โดย Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1 DNA extraction

เชื้อที่เลี้ยงในหลอดทดลองจะถูกนำมาแยก DNA ในขณะที่เชื้ออยู่ในระยะ trophozoite โดยใช้ Chelex[®] 100 5% resin ในน้ำกลั่น โดยจะถูก incubate ที่ 56°C นาน 20 นาที ตามด้วยที่ 100°C นาน 8 นาที

4.2 การศึกษาแยกสายพันธุ์ (DNA fingerprinting) ของเชื้อสามารถทำได้โดยเทคนิค multiplex PCR โดยนำ DNA ที่แยกได้จากเชื้อมา amplified โดย PCR ซึ่งจะใช้ primer คู่ที่ encode ยีน MSA-1, MSA-2 และ CSP โดยเตรียมสารตั้งต้นจำนวน 100 μ l ประกอบด้วย primer 50 pmol, dNTPs 200 mM, genomic DNA 100-200 ng, 2 mM $MgCl_2$, 2.5 U Taq polymerase, 1X reaction buffer นำไป amplified ที่ 94°C นาน 1 นาที 47°C นาน 2 นาที และ 74°C นาน 3 นาที จำนวน 30 รอบ PCR product ที่ได้จะถูกนำไปแยกด้วย 2% agarose gel จากนั้นจะถูกย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจด้วย UV Transillumination

4.3 การศึกษาการกลายพันธุ์ของ *pfmdr1* gene จะทำโดยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reactions-Restriction Fragment Length Polymorphism) ซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์แบบ K1-type (N86Y) โดยใช้ primer ที่ encode ยีน *pfmdr1* โดยเตรียมสารตั้งต้นจำนวน 50 μ l ประกอบด้วย primer 0.5 pmol, dNTPs 200 mM, genomic DNA 500 ng, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.25 U Taq polymerase, 1X reaction buffer นำไป amplified ที่ 95°C นาน 1 นาที 56°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ PCR product ที่ได้จะถูกนำไปย่อยโดย restriction endonuclease *AflIII* และ *ApoI* ซึ่งจะถูกนำไปแยกด้วย 2% agarose gel และตรวจด้วย UV Transillumination หลังจากการย้อมด้วย ethidium bromide ผลที่ได้จากการศึกษาทางพันธุกรรมนี้จะนำไปเปรียบเทียบกับผลการตอบสนองของเชื้อต่อยา

5. การแปลผล

ค่าการตอบสนองของเชื้อต่อยา ที่นำมารายงานจะเป็นค่า mean $\pm$ standard deviation ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง และสามารถทดสอบความแตกต่างได้โดยการใช้ Mann-Whitney U test จากโปรแกรม SPSS[®] ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อยาและการกลายพันธุ์ของยีนจะทดสอบโดยใช้ chi-square หรือ Fisher Exact test

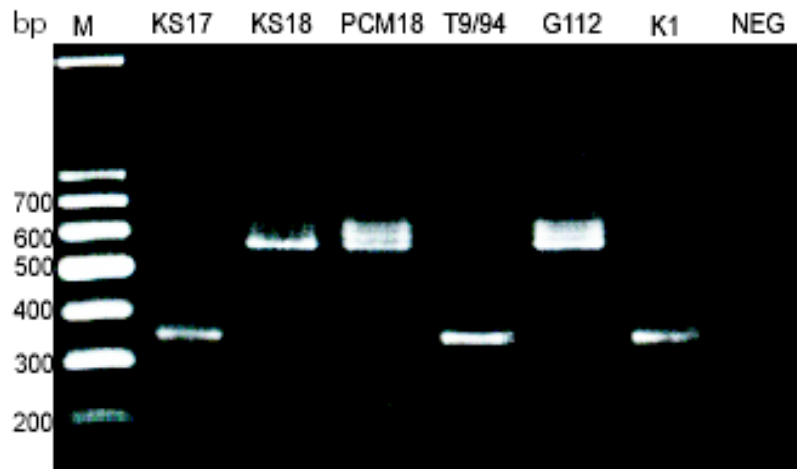
เชื้อ *P. falciparum* 54 สายพันธุ์ถูกนำมาเลี้ยงเพื่อทดสอบการตอบสนองต่อยาทั้งสองในหลอดทดลอง และนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของ *pfmdr1* gene การกลายพันธุ์ของยีนนี้จะทำโดยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์แบบ K1-type (N86Y) ออกจาก Wild-type *pfmdr1*

ผลการวิจัย

1. ลักษณะสายพันธุ์ของเชื้อ

ผลการดำเนินการวิจัยพบว่าเชื้อ *P. falciparum* 54 สายพันธุ์ มีเชื้อที่มี K1-type *pfmdr1* อยู่ 10 สายพันธุ์คิดเป็น 18.5% และพบเชื้อที่มี Wild-type *pfmdr1* อยู่ 44 สายพันธุ์คิดเป็น 81.5% รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างของ PCR-RFLP ที่ใช้ตรวจสอบแยก *pfmdr1* ชนิด wild type และ K1 mutation การตรวจสอบแยกสายพันธุ์โดยวิธี Multiplex PCR พบว่าเชื้อทั้ง 54 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

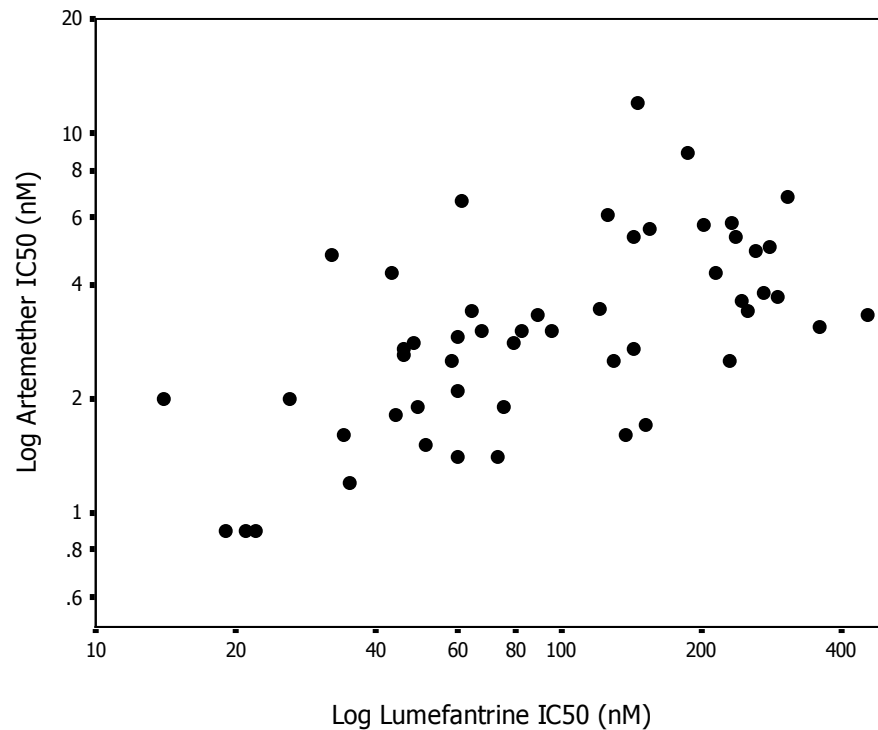
รูปที่ 1 ตัวอย่างของ PCR-RFLP เพื่อตรวจแยก *pfmdr1* ชนิด wild type และ K1 mutation (KS18, PCM8 และ G112 มี *pfmdr1* ชนิด wild type ส่วน KS17, T9/94 และ K1 มี *pfmdr1* ชนิด K1 mutation)



2. การทดสอบการตอบสนองต่อยาในหลอดทดลอง

ตารางที่ 1 เป็นตารางแสดงผลการทดสอบการตอบสนองต่อยา artemether และ lumefantrine ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของผลจากการทดสอบ 3 ครั้ง การทดสอบการตอบสนองต่อยา artemether เสร็จสิ้น 54 สายพันธุ์ พบว่าค่า IC₅₀ อยู่ระหว่าง 0.9-12 nM ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 3.5 nM การทดสอบการตอบสนองต่อยา lumefantrine เสร็จสิ้น 52 สายพันธุ์ พบว่าค่า IC₅₀ อยู่ระหว่าง 14-453 nM ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 128.9 nM พบว่ายาทั้งสองมีการดื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.003$) โดยมีค่า $r^2 = 0.399$ (รูปที่ 2)

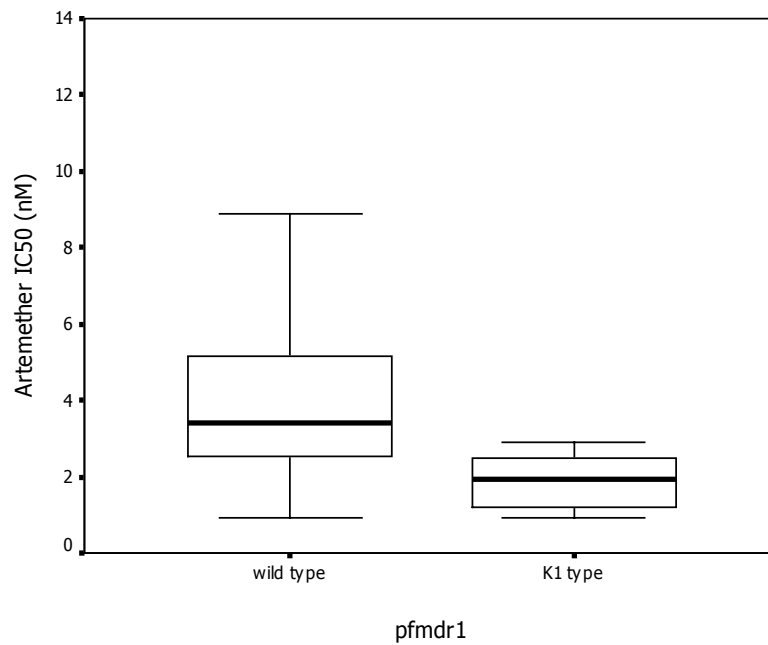
รูปที่ 2 Cross resistance ต่อยา artemether และ lumefantrine ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟลชีปาร์ม



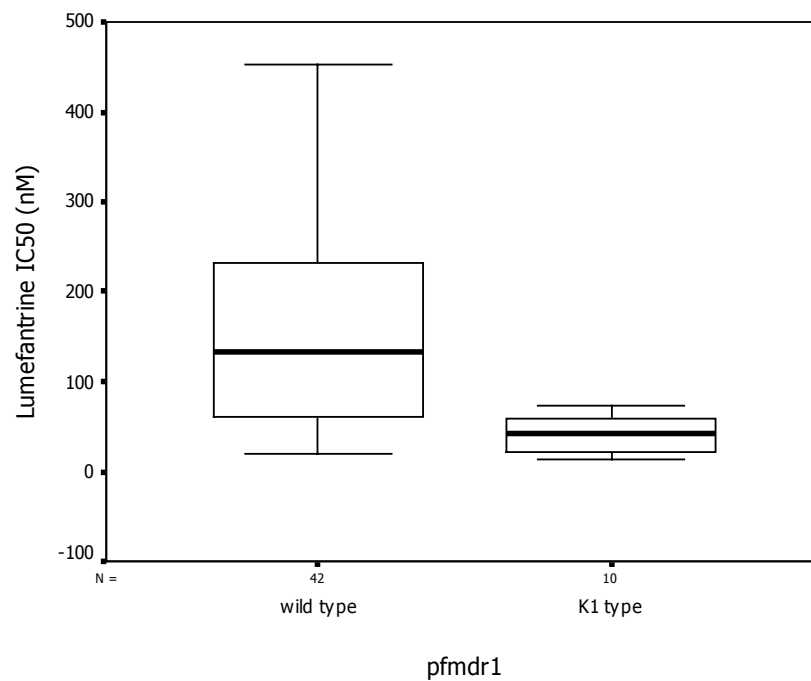
3. ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อยาและยีน *pfmdr1*

การทดสอบการตอบสนองต่อยา artemether เสร็จสิ้นแล้ว 54 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อที่มี K1-type *pfmdr1* อยู่ 10 สายพันธุ์ และเชื้อที่มี Wild-type *pfmdr1* 44 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่มี K1-type *pfmdr1* มีค่าเฉลี่ยของ artemether IC50 เท่ากับ 1.85 ± 0.7 nM เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มี Wild-type *pfmdr1* พบค่าเฉลี่ยของ artemether IC50 เท่ากับ 3.9 ± 2.1 nM ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$) การทดสอบการตอบสนองต่อยา lumefantrine เสร็จสิ้นแล้ว 52 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อที่มี K1-type *pfmdr1* อยู่ 10 สายพันธุ์ และเชื้อที่มี Wild-type *pfmdr1* 42 สายพันธุ์ ในขณะที่เชื้อที่มี K1-type *pfmdr1* มีค่าเฉลี่ยของ lumefantrine IC50 เท่ากับ 40.6 ± 19 nM เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มี Wild-type *pfmdr1* พบค่าเฉลี่ยของ lumefantrine IC50 เท่ากับ 149.9 ± 102 nM ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการกลายพันธุ์บนยีน *pfmdr1* มีผลต่อความไวของยา artemether และ lumefantrine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รูปที่ 3 และ 4 แสดงการเปรียบเทียบของการตอบสนองต่อยาในเชื้อที่มียีน *pfmdr1* ต่างกัน

รูปที่ 3 การเปรียบเทียบการตอบสนองต่อยา artemether ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟลชีปาร์มกลุ่มที่มียีน *pfmdr1* ชนิด wild type และ K1 mutation



รูปที่ 4 การเปรียบเทียบการตอบสนองต่อยา lumefantrine ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟลชีปาร์มกลุ่มที่มียีน *pfmdr1* ชนิด wild type และ K1 mutation



เอกสารอ้างอิง

- Basco, L.K., Le Bras, J. In vitro activity of halofantrine and its relationship to other standard antimalarial drugs against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **47**: 521-527 (1992).
- Basco, L.K., Ringwald, P. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. X. Evaluation of PFMDR1 mutations as genetic markers for resistance to amino alcohols and artemisinin derivatives. *Am J Trop Med Hyg* **66**: 667-671 (2002).
- Chaiyaroj, S.C., *et al.* Analysis of mefloquine resistance and amplification of *pfmdr1* in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **61**: 780-783 (1999).
- Cowman, A.F., *et al.* 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 USA* **91**: 1143-1147 (1994).
- Desjardins, R.E., *et al.* Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**: 710-718 (1979).
- Duraisingh, M.T., *et al.* Inoculum effect leads to overestimation of *in vitro* resistance for artemisinin derivatives and standard antimalarials: a Gambian field study. *Parasitology* **119**: 435-440 (1999).
- Duraisingh, M.T., *et al.* Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **36**: 955-961 (2000a).
- Duraisingh, M.T., *et al.* 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* **108**: 13-23 (2000b).
- Foote, S.J., *et al.* Several alleles of the multidrug resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **345**: 255-258 (1990).
- Gay, F., *et al.* In vitro response of *Plasmodium falciparum* to atovaquone and correlation with other antimalarials: comparison between African and Asian strains. *Am J Trop Med Hyg* **56**: 315-317.

- Lefèvre, G., *et al.* A clinical and pharmacokinetic trial of six doses of artemether-lumefantrine for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **64**:247-256 (2001).
- Lim, A.S.Y., *et al.* *Plasmodium falciparum*: amplification and overexpression of *pfmdr1* is not necessary for increased mefloquine resistance. *Exp. Parasitol.* **83**: 295-303 (1996).
- Lopes D., *et al.* Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria J* **1** (2002).
- Mungthin, M., *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of recently adopted isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **60**: 649-674 (1999).
- Peel, S.A., *et al.* A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (*pfmdr*) of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg* **51**: 648-658 (1994).
- Pradines, B., *et al.* *In vitro* activity of artemether against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial drugs. *Am J Trop Med Hyg* **58**: 354-357 (1998).
- Price, R.N., *et al.* The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agent Chemother* **43**: 2943-2949 (1999).
- Reed, M.B., *et al.* Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **403**: 906-909 (2000).
- Ritchie, G.Y., *et al.* *In vitro* selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of Pgh1. *Mol Biochem Parasitol* **83**: 35-46 (1996).
- Suebsaeng, L., *et al.* Sensitivity to quinine and mefloquine of *Plasmodium falciparum* in Thailand. *Bull WHO* **64**: 759-765 (1986).
- Trager, W. and Jensen, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**: 673-675 (1976).
- van Vugt, M., *et al.* Efficacy of six doses of artemether-lumefantrine (benflumetol) in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **60**: 936-942 (1999).
- van Vugt, M., *et al.* Artemether-lumefantrine for the treatment of multidrug-resistant *Plasmodium*

falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**: 545-548 (2000).

Wilson, C.M., *et al.* Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistance *Plasmodium falciparum*. *Science* **244**: 1184-1186 (1989).

Wilson, C.M., *et al.* Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* **57**: 151-160 (1993).

The influence of pfmdr1 mutation on in vitro sensitivity of artemether and
lumefantrine in Thai isolates of *Plasmodium falciparum*

Mathirut Mungthin, Kesara Na-Bangchang, Patrick G. Bray and Stephen A. Ward

Department of Parasitology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand;

Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani, Thailand;

Division of Molecular and Biochemical Parasitology, The Liverpool School of Tropical
Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, United Kingdom

Abstract

Coartemether is the combination of endoperoxide i.e. artemether and acrylaminoalcohol i.e. lumefantrine. Recent studies showed that both sensitivities to endoperoxides and acrylaminoalcohols in *Plasmodium falciparum* were modulated by the polymorphisms of *pfmdr1* gene. Using parasites isolated from the patients in the multidrug-resistant areas i.e. Thai/Myanmar and Thai/Cambodia borders, our study also showed those parasites containing wild-type *pfmdr1* gene exhibited more resistant than those with K1-type mutation. We also found the cross resistance between the sensitivity to artemether and lumefantrine in these isolates. Since *pfmdr1* gene can mediate the sensitivity to both drugs so it is likely that these combinations may select for parasites containing wild-type *pfmdr1* gene.

Drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria is a major obstacle to the effective treatment and control of this potentially life-threatening pathogen. This situation is at its most serious in Southeast Asia, particularly along the borders of Thai-Myanmar and Thai-Cambodia.¹ Resistance to quinolines including chloroquine (CQ) and mefloquine (MQ) was well documented in *P. falciparum* isolates from Thailand.²⁻⁴ In overcome this problem, artemisinin-based combination treatments (ACTs) have been introduced for the treatment of falciparum malaria in Thailand. Artesunate (AS) or artemether (AM) in combination with MQ still gives an acceptable cure rate even in the highly multidrug-resistant areas of Thailand.⁵⁻⁷ Artemether-lumefantrine (LF) (Coartem[®]) is the only fixed-dose formulation ACT on the WHO essential drug list.⁸ Recent studies from Thailand showed that the six-dose regimen of AM-LF has cure rates of more than 96% for the treatment of falciparum malaria.⁹ Thus this ACT could be included in the combination of choice.

Resistance to quinoline based antimalarials has been the focus of many biochemical and molecular investigations. With respect to the 4-aminoquinoline chloroquine (CQ), resistance is characterised phenotypically by reduced drug accumulation¹⁰⁻¹³ which is partially reversible by verapamil and other so called resistance reversers.¹⁴⁻¹⁵ It has indicated that *pfcrt*, a gene encoding a 424-amino-acid, digestive vacuole transmembrane protein plays a crucial role on CQ resistance.¹⁶ A point mutation on *pfcrt* that results in replacement of lysine by threonine in the protein product, at codon 76, within this 3.1-kb gene is linked to CQ resistance in isolates collected worldwide.¹⁶⁻¹⁸ Transformation of CQ-sensitive isolates with T76-mutant *pfcrt* consistently produced CQ-resistant clones and insertion of wild-type *pfcrt* caused increased sensitivity in

resistant strains.¹⁶ Despite the results from these studies, there is compelling evidence that a second gene, *pfmdr1*, may also contribute to CQ resistance. The observation that verapamil could partially reverse CQ resistance prompted the search for MDR homologues in the malaria parasite.¹⁹⁻²⁰ This resulted in the identification of *pfmdr1* on chromosome 5. A study by Reed et al. (2000) using transfection technique has definitively confirmed its involvement in high-level CQ resistance.²¹

In contrast to CQ, the role of *pfmdr1* on mefloquine (MQ) and halofantrine (HF) resistance is well linked with evidences of amplification and sequence polymorphisms.²¹⁻²⁹ The K1-type mutation of *pfmdr1* showed a single amino acid polymorphism at codon 86, which results in the substitution of asparagine for tyrosine (N86Y). The 7G8 type mutation contains four amino acid polymorphisms; tyrosine for phenylalanine at codon 184 (Y184F), serine for cysteine at codon 1034 (S1034C), asparagine for aspartic acid at codon 1042 (N1042D) and aspartic acid for tyrosine at codon 1246 (D1246Y).³⁰ These two mutations are distributed in different geographical areas. The K1-type mutation has been found in Asian and African isolates while the 7G8-type mutation is thought to be exclusive to South American isolates. Using an allelic exchange strategy Reed et al. (2000) demonstrated that removal of specific polymorphisms in *pfmdr1* and replacement with wild-type sequence resulted in a decrease in sensitivity of MQ and HF.²¹ Replacement of wild-type with mutant sequence also showed reduced MQ and HF resistance.

In this study, we investigated the influence of the mutation in *pfmdr1* on the in vitro sensitivity of Thai isolates of *P. falciparum* to both AM and LF which is structurally unrelated and related, respectively to MQ.

Materials and Methods

***P. falciparum* strains and cultivation.** Fifty four isolates of *P. falciparum* included 3 standard laboratory isolates i.e. K1, T994 and G112 and 51 newly adapted Thai isolates which obtained from malarial patients presenting for treatment from the Thai-Myanmar and Thai-Cambodia border in 2002-2004. Parasites were maintained in continuous cultures using a modification of the method of Jensen and Trager.³¹ Parasites were cultured in human erythrocytes (O⁺) and incubated at 37°C in narrow necked culture flasks containing medium (RPMI 1640 with 23 mM NaHCO₃, 25 mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid) and 10% human AB serum. Cultures were maintained under an atmosphere of 90% N₂, 5% O₂ and 5% CO₂.

***In vitro* sensitivity assays.** Sensitivity to AM and LF of *P. falciparum* were determined by measurement of [³H]hypoxanthine incorporation into parasite nucleic acids as previously described.³² Drug IC₅₀ (i.e. concentration of drug which inhibits parasite growth by 50%) was determined from the log dose/response relationship as fitted by GRAFIT (Erithacus Software, Kent, England). Each value represents the mean and standard deviation of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by Mann Whitney U test.

Genomic DNA extraction. Parasite DNA was extracted using Chelex-resin method.³³ A high parasitaemia pellet of *P. falciparum* cultures at the trophozoite stage was lysed by incubation in 1.5 volumes of 0.15% saponin in RPMI at 37°C for 20 min. The parasites were then washed in PBS (10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl). Parasite genomic DNA was extracted by adding 200 µl of the 5% chelex resin (Bio-Rad, U.S.A.) and incubated in a boiling water bath for 8 min. Chelex was subsequently

separated by centrifugation. The supernatant containing the DNA was then collected in a new microcentrifuge tube. Five microliters of DNA preparation was used for 25 µl PCR reaction.

DNA fingerprinting. Genomic variation between parasite strains was determined by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method using primer pairs specific for three independent genes, MSA-1, MSA-2 and CSP. The oligonucleotide primer sequences and the methodology were previously described by Wooden, *et al.* (1992).³³ The products of PCR were separated by 2% agarose gel electrophoresis and visualised by UV transillumination.

Mutations in the *pfmdr1* gene. Nested PCR and restriction endonuclease digestion method developed by Djimde *et al.* (2000) was used to determine the intra-allelic variation of the *pfmdr1* gene.³⁴ The variation allows discrimination between the wild-type and K1-type (N86Y).

Primer sequences used for the amplification of the *pfmdr1* gene were as follows: first amplification, MDR1 5'-ATGGGTAAAGAGCAGAAAGA-3' and MDR2 5'-AACGCAAGTAATACATAAAGTCA-3'; nested amplification, MDR3 5'-TGGTAACCTCAGTATCAAAGAA-3' and MDR4 5'-ATAAACCTAAAAAGGAACTGG-3'. All primary PCRs included K1 DNA as a positive control for the resistant genotype and G112 DNA (Gift from malaria research unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand) as a positive control for the sensitive genotype. Distilled water was used as negative control. In all secondary PCRs, two negative controls were used: the amplicon of the negative control for the first PCR and distilled water. The PCR reactions were carried out in 25 µl volumes consisting of 2 mM MgCl₂;

200 μ M each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP (Promega, U.S.A.); 20 mM Tris-HCl; 100mM KCl; 0.1 mM EDTA; 1mM DTT; 50% glycerol; 0.5% TweenTM; 0.5% NonidetTM P-40; 25 pmol of each primer; 2 U of *Taq* DNA Polymerase (Promega, U.S.A.); and 5 μ l of template DNA. The reactions were subsequently run in the PCR machine (MJ Research PTC-200, U.S.A.) using the following cycling conditions: 94°C for 45s (cycle 1, 2min 30s), 47°C for 1 min and 62°C for 3 min (cycle 37, 10 min) for 37 cycles. The resultant PCR amplicon was digested with one unit of *AflIII* at 37°C over night. For the detection of the K1-type mutation, the enzyme cut the *pfmdr1*-Y86 (mutation) but not the *pfmdr1*-N86 (wild-type).

Results

Molecular characterisation of the isolates. The DNA fingerprinting study of all isolates indicated that these isolates were genetically unrelated (data not shown). Fifty four isolates were analysed for the K1 mutation in *pfmdr1* gene. Of these 10 isolates (18.5%) contained the K1 type mutation while 44 isolates (81.5%) contained the wild type sequence. Figure 1 showed the K1 type mutation detected by PCR-RFLP technique.

Biochemical characterisation of the isolates. All and 52 isolates were tested for sensitivity to AM and LF, respectively. The correlation between the IC₅₀s of AM and LF was significant ($p = 0.003$) with the r^2 value of 0.399. The AM IC₅₀s of these Thai isolates ranged between 0.9-8.9 nM. While the Gambian isolate, G112 showed rather high IC₅₀ compared to Thai isolates with the IC₅₀ of 12 nM. The LF IC₅₀s of these isolates ranged between 14-453 nM. The mean and standard deviation of the AM and LU IC₅₀ were 3.5 ± 2.1 nM and 128.9 ± 101.9 nM, respectively.

Figure 1 shows the association between the polymorphisms and the sensitivity to AM and LF. Among the isolates with the K1 type mutation, the mean AM and LF IC₅₀ was 1.8 ± 0.7 and 40.6 ± 19.8 nM, respectively. While wild type isolates showed the mean AM and LF IC₅₀ at 3.9 ± 2.1 and 149.9 ± 102 nM, respectively. The isolates containing the K1 type mutation were significantly more sensitive to AM and LF ($P < 0.001$) compared to those contained wild type *pfmdr1* gene.

Discussion

In recent years many studies have investigated drug sensitivity patterns in *P. falciparum* isolates from various origins and biochemical and molecular observations have been used to explain these patterns. In the present study we have restricted our analysis to freshly collected and geographically restricted parasites from the Thai/Myanmar and Thai/Cambodia border. The data in the present study show that those isolates carrying the K1 mutation display greater sensitivity to both AM and LF than the those isolates carrying the wild type gene. Using a small number of laboratory isolates, Duraisingh et al. (2000) also showed association between increased sensitivity to the arylaminoalcohols, i.e. MQ, HF and LF and to the endoperoxides, i.e. artemisinin, artemether and arteflene and the presence of the K1 mutation.³⁵ Indirect evidence that supports the role of *pfmdr1* gene was from artemether-lumefantrine clinical trial for the treatment of falciparum malaria in Africa.³⁶ It has been shown that an in vivo selection of *P. falciparum* containing wild type *pfmdr1* after exposure to the drug. DNA fingerprinting of these isolates showed that these selected wild-type *pfmdr1* parasites were the reinfecting not recrudescence parasites. Similar to other arylaminoalcohol such as MQ, LF has long half life so sub-therapeutic blood level might cause the selection of more resistant parasites. This information suggests that wild-type *pfmdr1* parasites which exhibit more resistant comparing to K1-type *pfmdr1* parasites were selected when the remaining drug concentration of LF was too low.

A genetic cross study using HB3 and 3D7 clone indicated that amino acid polymorphisms at codon 1042, one of those found in 7G8-type mutations determined the sensitivity to AM and LF.³⁵ A more recent study also emphasized this association. The

strong association between *in vitro* resistance to MQ and LF and polymorphism at codon 1042 was shown in the parasite isolates collected from the patients in the multidrug-resistant area, Thai/Myanmar border.²⁹ These evidences have indicated that polymorphisms in the *pfmdr1* gene are an important determinant of susceptibility to both AM and LF.

Other molecular mechanism that may determine AM and LF sensitivity is *pfmdr1* copy number. Analysis of laboratory and field parasite isolates demonstrated a strong association of *pfmdr1* gene amplification and arylaminoalcohols, MQ and HF resistance.^{22, 27, 29} *In vitro* drug pressure experiment demonstrated the association between MQ resistance and the amplification of *pfmdr1* gene.²³⁻²⁴ Although some reports contradicted this link^{25, 26}, recent studies both *in vitro* and *in vivo* also confirm this finding.^{27, 29} It has been demonstrated that an increased *pfmdr1* gene copy number was significantly associated with higher IC50s for LF and artemisinin derivatives, i.e. artesunate and dihydroartemisinin in the parasite isolates from Thai/Myanmar border.²⁹ Taken together, it appears that the possession of a wild-type *pfmdr1* sequence and amplified gene copy number is strongly associated with resistance to both arylaminoalcohols and endoperoxides. Cross resistance has been observed *in vitro* between these two structurally unrelated antimalarial drug groups.²⁹ We also found the cross resistance between AM and LF. These results suggest the true multidrug resistant phenotype of P-glycoprotein homolog 1 (Pgh1), a protein encoded by *pfmdr1* gene.

The combination of endoperoxides and arylaminoalcohols such as AS and MQ or AM and LF have been suggested for the treatment of falciparum malaria especially in multidrug resistance areas. The idea behind this combination is that the artemisinin

derivatives can effectively reduce parasite load while acrylaminoalcohols, the longer half-life drugs could clear the remaining parasites. Thus the combination would be very effective and also impede the development of resistance. However *pfmdr1* gene can mediate the sensitivity to both drug groups so it is likely that these combinations may select for mdr-like mechanisms.

The evidence of the association between *pfmdr1* gene and acrylaminoalcohols and endoperoxides were mostly from the studies in the same geographical areas, i.e. Southeast Asia where these combinations have been introduced. Before *pfmdr1* gene could be used as molecular markers in molecular epidemiological studies, studies from other endemic areas are needed.

Acknowledgments

This study was financially supported by The Thailand Research Fund (MRG4680014).

References

1. Wernsdorfer WH, Payne D. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Pharmacol Therap 1991; 50: 95-121.
2. Harinasuta T, Migasen S, Bunnag D. Chloroquine resistance in Thailand. UNESCO 1st Regional Symp. on Sci. knowledge of Trop. Parasites, University of Singapore, 1962; 143-153.
3. Mockenhaupt FP. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today 1995; 11:248-53.
4. White NJ. Antimalarial drug resistance. J Clin Invest 2004; 113:1084-92.
5. Bunnag D, Kanda T, Karbwang J, Thimasarn K, Pungpak S, Harinasuta T. Artemether-mefloquine combination in multidrug resistant falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995; 89:213-215.
6. Nosten F, van Vugt M, Price R, Luxemburger C, Thway KL, Brockman A, McGready R, ter Kuile F, Looareesuwan S, White NJ. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of Plasmodium falciparum malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. Lancet 2000; 356:297-302.
7. Ashley EA, Krudsood S, Phaiphun L, Srivilairit S, McGready R, Leowattana W, Hutagalung R, Wilairatana P, Brockman A, Looareesuwan S, Nosten F, White NJ. Randomized, controlled dose-optimization studies of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria in Thailand. J Infect Dis 2004; 190:1773-1782.
8. WHO. 12th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines Meeting . April 15-19 2001.

9. Omari AA, Gamble C, Garner P. Artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria: a systemic review. *Trop Med Intl Health* 2004; 9:192-199.
10. Fitch CD. Chloroquine resistance in malaria: a deficiency of chloroquine binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64: 1181-1187.
11. Verdier F, Le Bras J, Clavier F, Hatin I, Blayo M. Chloroquine uptake by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes during in vitro culture and its relationship to chloroquine resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:561-564.
12. Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AMJ, Martin SK, Milhous WK, Schlesinger PH. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* 1987; 235:1283-1285.
13. Bray PG, Howells RE, Ritchie GY, Ward SA. Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 1992; 44:1317-1324.
14. Martin RK, Oduola AMJ, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 1987; 235:899-901.
15. Bray PG, Ward SA. A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Therap* 1998; 77: 1-28.
16. Fidock DA, Nomura T, Tally AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TM. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000; 6:861-871.

17. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance. J Infect Dis 2001; 183:1535-1538.
18. Basco LK, Ringwald P. Analysis of the key *pfcr* point mutation and in vivo response to chloroquine in Yaounde', Cameroon. J Infect Dis 2001; 183:1828-1831.
19. Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. Cell 1989; 57:921-930.
20. 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; 244:1184-1186.
21. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. Nature 2000; 403:906-909.
22. Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DJ, Milhous WK, Wirth DF. Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. Mol Biochem Parasitol 1993; 57:151-160.
23. Cowman AF, Galatis D, Thompson J K. 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 USA 1994; 91:1143-1147.
24. 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 (*pfmdr*) of *Plasmodium falciparum* in vitro. Am J Trop Med Hyg 1994; 51:648-658.

25. 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; 60:469-474.
26. Chaiyaroj SC, Buranakiti A, Angkasekwinai P, Looareesuwan 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; 61:780-783.
27. 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 Agent Chemother* 1999; 43:2943-2949.
28. Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, Kawamoto F, Miller RS, Meshnick SR. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agent Chemother* 2003; 47:2418-2423.
29. Anderson TJC, Nair S, Qin H, Singlam S, Brockman A, Paiphun L, Nosten F. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*pfcrt*) and multidrug resistance gene (*pfmdr*) associated with antimalarial drug resistance. *Antimicrobial Agent Chemother* 2005; 49:2180-2188.
30. 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; 345:255-258.
31. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193:673-5.

32. Desjardins RE, Canfield J, Haynes D, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16:710-718.
33. Wooden J, Gould EE, Paull AT, Sibley CH, *Plasmodium falciparum*: A simple polymerase chain reaction method for differentiating strains. *Exp Parasitol* 1992; 75: 207-212.
34. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* 2001; 344:257-63.
35. 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* 2000; 36:955-961.
36. Sisowath C, Strömberg J, Mårtensson A, Msellem M, Obondo C, Björkman, Gil JP. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *J Infect Dis* 2005; 191:1014-1017.

Figure 1 Detection of K1-type mutation of *pfmdr1* using PCR-RFLP

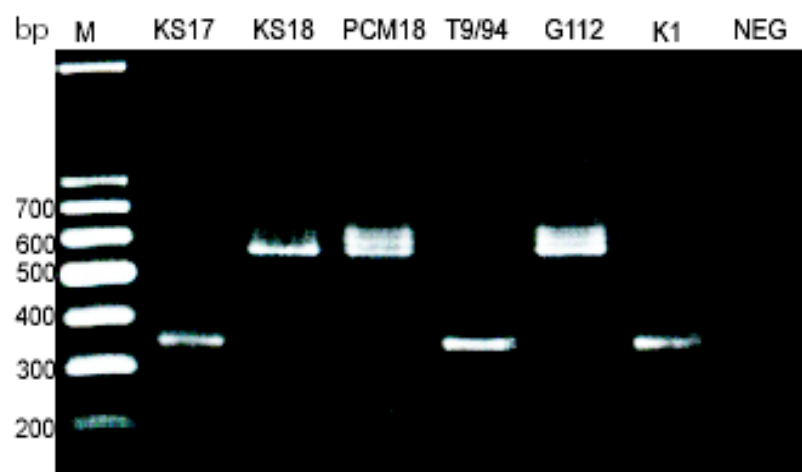


Figure 2 Box plot showing the association between *pfmdr1* polymorphisms *and in vitro* artemether sensitivity

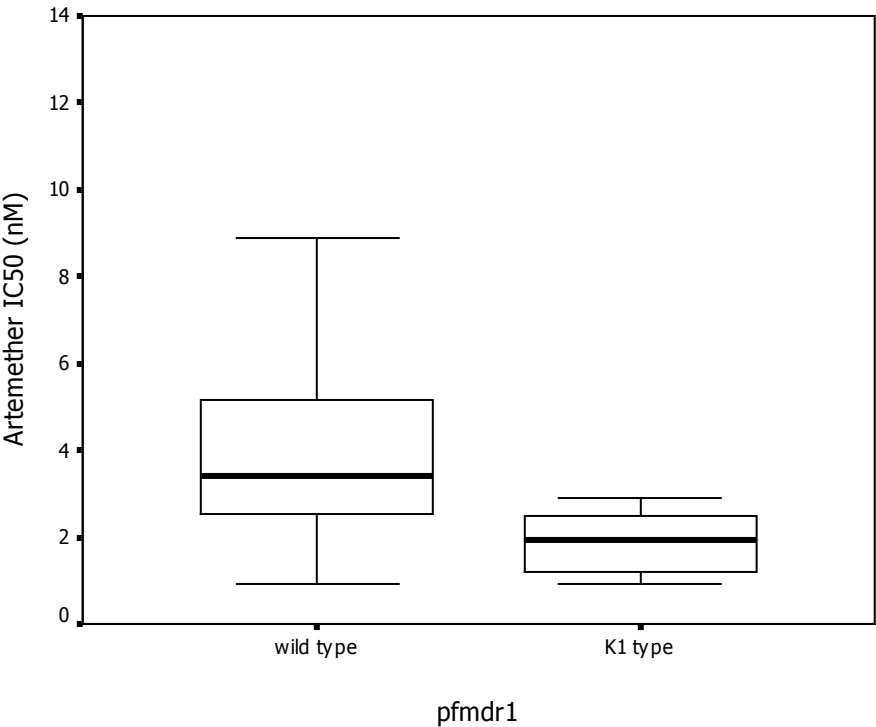
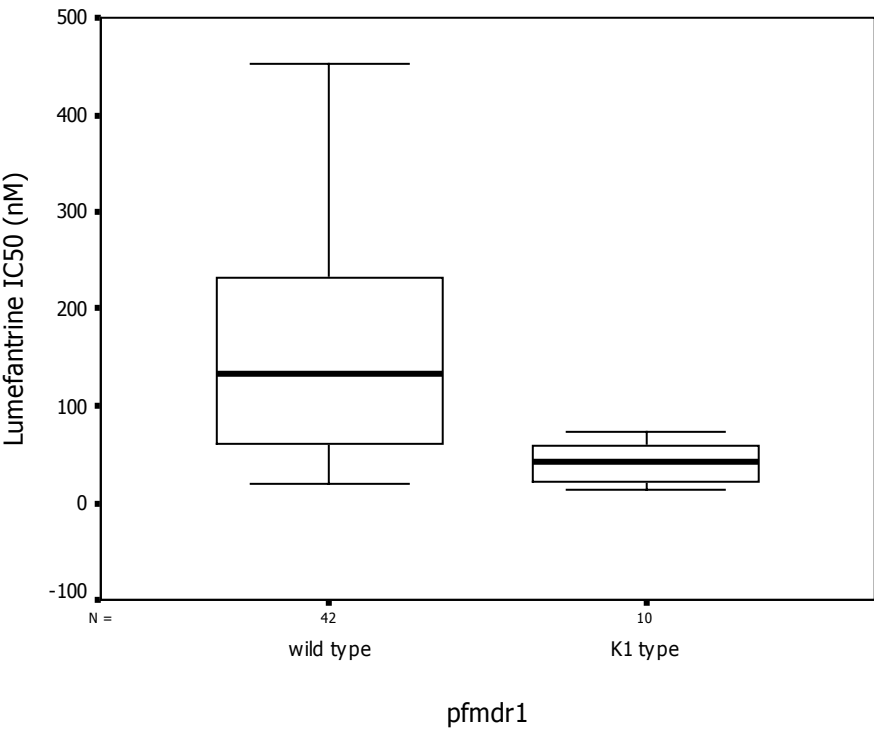


Figure 3 Box plot showing the association between *pfmdr1* polymorphisms *and in vitro* lumefantrine sensitivity



ตารางผลการตอบสนองต่อยาและลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *pfmdr1*

สายพันธุ์	Artemether IC50 (nM)	Lumefantrine IC50 (nM)	<i>pfmdr1</i>
J008	0.9	19	Wild type
RN42	1.4	60	Wild type
BC033	1.5	51	Wild type
BC2	1.6	137	Wild type
RN32	1.6	34	Wild type
RN1	1.7	152	Wild type
PCM9	1.8	44	Wild type
PCM12	1.9	75	Wild type
BC039	2.1	60	Wild type
BC038	2.5	228	Wild type
RN28	2.5	129	Wild type
BC032	2.6	46	Wild type
J004	2.7	46	Wild type
PCM5	2.7	143	Wild type
BC037	2.8	79	Wild type
BC8	3	67	Wild type
PCM17	3	82	Wild type
RN35	3	95	Wild type
PCM6	3.1	356	Wild type
BC031	3.3	453	Wild type
RN14	3.3	89	Wild type
J002	3.4	250	Wild type
PCM2	3.4	64	Wild type
BC12	3.46	120	Wild type
RN13	3.6	242	Wild type
BC030	3.7	290	Wild type

KS47	3.7	.	Wild type
KS33	3.8	270	Wild type
PCM3	4.3	214	Wild type
RN30	4.3	43	Wild type
J010	4.8	32	Wild type
J009	4.9	261	Wild type
BC036	5	279	Wild type
BC029	5.3	142	Wild type
J001	5.3	237	Wild type
BC027	5.6	154	Wild type
PCM16	5.7	201	Wild type
RN19	5.8	232	Wild type
RN33	6.1	125	Wild type
J007	6.6	61	Wild type
J012	6.8	305	Wild type
KS21	6.9	.	Wild type
KS29	8.9	187	Wild type
G112	12	145	Wild type
RN3	0.9	21	K1 mutation
T994	0.9	22	K1 mutation
BC1	1.2	35	K1 mutation
KS17	1.4	73	K1 mutation
TM5	1.9	49	K1 mutation
BC11	2	14	K1 mutation
PCM8	2	26	K1 mutation
M12	2.5	58	K1 mutation
K1	2.8	48	K1 mutation
TM6	2.9	60	K1 mutation