

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนพัฒนานักวิจัย
เสนอต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ชื่อโครงการ การศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์ยุงพาหะมาลาเรียในประเทศไทย
 ที่สามารถต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียและ
 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย
*Studies on genetic selection of Thai malaria vectors refractory
to malarial parasites and enzymes associated with refractoriness*

ชื่อหัวหน้าโครงการ	ดร.ปรัชญา สมบูรณ์ (เมธีวิจัย รุ่น 1) Dr. Pradya Somboon
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ที่ทำงาน	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์	053 945342-5 โทรสาร 053 217144
ลายเซ็น	

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (The Thailand Research Fund) ที่ให้เงินสนับสนุนโครงการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นายแพทย์สมศักดิ์ ประจักษ์วงศ์ ผู้อำนวยการสำนักงานควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 2 จ.เชียงใหม่ และคุณวรรณภา สุวรรณเกิด หัวหน้าฝ่ายกีฏวิทยา ที่ให้การสนับสนุนในการหาสายพันธุ์ยุง

การจำแนกชนิดยุง *Anopheles dirus complex* โดยคูโครโมโซมจะไม่สำเร็จถ้าขาดการแนะนำของ รศ.เวช ชูโชติ และผศ. ดร.อังกริยา จิตต์ภักดี

ขอขอบคุณ ศ.นพ.โชติ ชีตรานนท์ อธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ศ.นพ.กำพล กลั่นกลิ่น คณบดีคณะแพทยศาสตร์, รศ.เกตุรัตน์ สุขวังก์ หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยาและเจ้าหน้าที่ทุกคนที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.ดร.ปรัชญา สมบูรณ์
ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผู้ร่วมวิจัย ดร.ละอียด ประพันธ์คารา
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Fax (053) 221 849

บทคัดย่อ

ยุงก้นปล่องหลายชนิดแม้จะเป็นพาหะของเชื้อมาลาเรีย แต่ผลจากการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการ ก็สามารถสร้างบางสายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านหรือยอมรับเชื้อมาลาเรียได้น้อยลง อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับกลไกที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวยังมีอยู่จำกัด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยุงก้นปล่องที่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียจากยุงพาหะมาลาเรียในประเทศไทย ได้แก่ *Anopheles dirus* species A, D, *An. minimus* species A และ *An. sawadwongporni* โดยใช้เชื้อมาลาเรียของหนู *Plasmodium yoelii nigeriensis* เป็นรูปแบบ และให้ทราบลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ความสามารถในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ตลอดจนเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในกระเพาะยุงซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

การคัดเลือกสายพันธุ์เริ่มต้นจากการให้ยุงตัวเมียที่ผสมพันธุ์แล้วกินเลือดหนูที่ติดเชื้อมาลาเรีย จากนั้นแยกยุงที่กินเลือดเต็มที่แล้วเดี่ยว ๆ ในถ้วยที่มีน้ำจางไว้ แล้วจึงผ่าดูกระเพาะยุงว่าตัวไหนมี oocyst หรือไม่มี ไข่ที่มาจากยุงที่ติดเชื้อจะถูกนำมารวมกันแล้วเลี้ยงจนเป็นตัวยุงเพื่อทำการคัดเลือกลงไปในฐานะเป็นสายพันธุ์ยอมรับ ทำนองเดียวกันกับไข่ที่มาจากยุงที่ไม่ติดเชื้อจะเป็นสายพันธุ์ที่ต่อต้าน การคัดเลือกลำดับไปซ้ำแล้วซ้ำอีกจนกว่าจะได้สายพันธุ์ที่มีการยอมรับและต่อต้านเต็มที่ ผลการคัดเลือกสามารถได้สายพันธุ์ยุง *An. dirus* species A ที่ต่อต้านและยอมรับเชื้อ 100% หลังจากการคัดเลือกแบบกลุ่ม 17 รุ่นและตามด้วยแบบเดี่ยว 1-2 รุ่น ส่วนการคัดเลือกยุงชนิดอื่นไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากมีการติดเชื้อ 100% ใน *An. minimus* species A และ *An. sawadwongporni* และไม่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราการติดเชื้อใน *An. dirus* species D เอนไซม์ aminopeptidase หรือ trypsin ในกระเพาะยุง *An. dirus* species A สายพันธุ์ที่ต่อต้านมีระดับไม่สูงกว่าในสายพันธุ์ที่ยอมรับ แสดงถึงการมีบทบาทน้อยมากต่อกลไกการต่อต้าน ลักษณะการต่อต้านเชื้อมาลาเรียที่สำคัญ คือ การยับยั้งการเจริญของ oocyst ที่ผนังกระเพาะยุง หลังจากที่ถูก ookinete ไข่เข้าไป การทำ cross และ back-cross ระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมการต่อต้านเป็นแบบเด่นไม่สมบูรณ์และซับซ้อน แม้ว่าสายพันธุ์นี้สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียของหนูได้สมบูรณ์ แต่ยังมีการยอมรับเชื้อมาลาเรียของคน *P. falciparum* และ *P. vivax* แสดงถึงกลไกการต่อต้านที่มีความจำเพาะ แม้กระนั้นก็ตามสายพันธุ์ดังกล่าวก็ยังนับว่ามีประโยชน์และสะดวก สำหรับเป็นรูปแบบหนึ่งต่อการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างยุงก้นปล่องกับเชื้อมาลาเรียที่สลับซับซ้อนนี้

ABSTRACT

Although several *Anopheles* species are vectors of malarial parasites, selections in laboratory have produced some malaria refractory strains. However, knowledge on mechanism conferring the susceptibility is still limited. The objectives of this study were to select a malaria refractory strain from the Thai malaria vectors, *Anopheles dirus* species A, D, *An. minimus* species A and *An. sawadwongporni*, by using the rodent malaria *Plasmodium yoelii nigeriensis* as a model, and then determine genetic basic for refractoriness, ability of inhibiting human malaria parasites, including protease enzyme activities in the midgut of mosquito which may play a role for refractoriness.

Selection began by allowing inseminated female mosquitoes to take blood from infected mice and the fully fed females were kept individually in small cups containing water until oviposition. The females were then dissected for checking oocyst infection. Eggs of those with oocyst infection were pooled and reared to adults for further selection as a susceptible line and eggs of those without oocyst as a refractory line. Selection was repeatedly performed until a fully susceptible line and a fully refractory line have been established. The selection succeeded in obtaining a 100% susceptible line and a 100% refractory line of only *An. dirus* species A, after a mass selection of 17 generations followed by 1-2 generations of individual selection. Selection of the other species failed to produce a refractory line as a result of 100% susceptibility in *An. minimus* species A and *An. sawadwongporni*, and no progress of change of infection rate in *An. dirus* species D. In the midgut of refractory females of *An. dirus* species A, neither aminopeptidase nor trypsin activity is higher than that in the susceptible females, suggesting that these two enzymes play little role in refractory mechanism. The most important refractory mechanism appeared to be the inhibition of growth of young oocysts on the stomach wall, after the penetration of ookinetes. Cross and back-cross experiments revealed that refractoriness to *P. y. nigeriensis* is intermediate dominance with a complex mode of inheritance. Although the selected line is fully refractory to the rodent malaria studied, it is still susceptible to human malaria parasites, *P. falciparum* and *P. vivax*, indicating that the mechanism is specific. Nevertheless, this refractory line is considered useful and convenient as a model for study of the complexity of malaria-mosquito relationship.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คณะผู้วิจัย	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
ระเบียบวิธีวิจัยและอุปกรณ์	5
ผลการศึกษา	8
การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรีย	8
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพื้นฐานของสายพันธุ์ยุงที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย	13
การติดเชื้อมาลาเรียของคนของยุงที่คัดต่อ <i>P. y. nigeriensis</i>	13
ระดับเอนไซม์ในกระเพาะอาหารของยุง	16
วิจารณ์ผล	17
เอกสารอ้างอิง	22
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย	25

สารบัญภาพ

รูปที่

หน้า

1. อัตราการติดเชื้อมาลาเรีย *P. yoelii nigeriensis* ใน refractory line และ susceptible line ของขง *An. dirus* species A (จ.แพร่) ที่มี oocyst ปกติ ตั้งแต่ 1 cyst ขึ้นไป
2. ระดับเอนไซม์ aminopeptidase (a) และ trypsin (b) ในกระเพาะอาหารของ refractory line และ susceptible line

10

16

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงรายละเอียดการคัดเลือกสายพันธุ์ยุง <i>An. dirus</i> species A (จ.แพร่)	11
2. แสดงรายละเอียดการคัดเลือกสายพันธุ์ยุง <i>An. dirus</i> species D (จ. ตาก)	12
3. อัตราการติดเชื้อระยะ oocyst และความหนาแน่นของ oocyst ที่ได้จาก :	
A) reciprocal cross ระหว่าง F_{23} susceptible line (S) และ F_{23} refractory line (R);	
B) F_2 ของ crosses; และ C) back-cross กับสายพันธุ์พ่อแม่	14

บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium* spp.) ซึ่งมีมากกว่า 100 ชนิดในโลกนี้ สามารถเจริญเติบโตในยุงได้คติน้อยแตกต่างกันไป ทั้งยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) ยุงรำคาญ (*Culex*) และยุงลาย (*Aedes*) (Garnham, 1966) การที่ยุงชนิดหนึ่งหรือสายพันธุ์หนึ่งสามารถยอมรับ (susceptible) เชื้อมาลาเรียได้นั้น เป็นความเหมาะสมของปัจจัยในตัวยุงที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียนั้น ๆ ในบรรดา ยุงเหล่านี้ยุงก้นปล่องเป็นยุงที่มีการยอมรับเชื้อมาลาเรียได้แทบทุกชนิด ในขณะที่ยุงรำคาญและยุงลายยอมให้เชื้อมาลาเรียบางชนิดเท่านั้นที่เจริญเติบโต (เช่น *P. gallinaceum*) อย่างไรก็ตามยุงก้นปล่องซึ่งมีหลายร้อยชนิดและมากด้วยสายพันธุ์ในแต่ละชนิดในโลกนี้ ก็คาดว่าจะมีความสามารถในการยอมรับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดหรือสายพันธุ์ต่าง ๆ เท่ากัน (Warren & Collins, 1981) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดลักษณะเช่นนี้คือ พันธุกรรมของยุงและ พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียแต่ละสายพันธุ์ Huff (1929, 1931) เป็นคนแรกที่พบว่า การยอมรับของยุง *Cx. pipiens* ต่อเชื้อ *P. cathemerium* สามารถเปลี่ยนให้ดีขึ้นหรือเลวลงได้เนื่องด้วยการคัดเลือกสายพันธุ์ ความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ยุงชนิดต่าง ๆ ในเวลาต่อมาในห้องปฏิบัติการ ทั้งที่ คือหรือต่อต้าน (refractory) และยอมรับเชื้อมาลาเรียมากขึ้น เป็นหลักฐานยืนยันที่สนับสนุนว่า ลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าวมีอยู่จริง (Macdonald, 1967; Wakelin, 1978; Curtis, 1979)

ตัวอย่างของยุงก้นปล่องที่มีผู้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต่อต้านหรือยอมรับเชื้อมาลาเรียทดลองมี ดังนี้

เชื้อมาลาเรีย

ยุงก้นปล่อง

P. berghei

An. atroparvus (van der Kaay & Boorsma, 1977)

P. berghei *

An. gambiae (Al-Mashhadani et al., 1980)

P. yoelii nigeriensis

An. gambiae (Graves & Curtis, 1982)

P. cynomolgi

An. gambiae (Collins et al., 1986)

P. falciparum

An. stephensi (Feldmann & Ponnudurai, 1989)

P. gallinaceum *

An. gambiae (Vernick et al., 1995)

จากการศึกษาเหล่านี้ยังพบว่ายุงบางสายพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรียชนิดหนึ่ง อาจต่อต้านเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นได้เช่นกัน (cross-refractoriness) ดังเช่น Al-Mashhadani & Davidson (1976) พบว่า สายพันธุ์ยุง *An. gambiae* ที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรียในหนู (*P. berghei*) ยังสามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียของหนูชนิดอื่นหรือแม้แต่ *P. falciparum* เช่นเดียวกับ Collins et al. (1986) ที่รายงานว่าสายพันธุ์ยุง *An. gambiae* ที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรียของลิง (*P. cynomolgi*) ยังสามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียหลายชนิดรวมทั้ง *P. vivax* และ *P. falciparum* บางสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม Graves &

Curtis (1982) พบว่า สายพันธุ์ยุง *An. gambiae* ที่มีการยอมรับเชื้อของหนู *P. y. nigeriensis* ลดลง ยิ่งกว่าระดับการยอมรับต่อ *P. falciparum* อยู่เหมือนเดิม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าขบวนการต่อต้าน เชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดแตกต่างกัน หรือมียีนที่ควบคุมการต่อต้านอยู่ในระดับต่ำ

ด้วยลักษณะดังกล่าวข้างต้น ทำให้เกิดแนวคิดกว่าสี่สิบปีมาแล้ว ในการหาวิธีควบคุมการระบาดของมาลาเรีย โดยการเปลี่ยนยุงกันปล่องที่เป็นพาหะในธรรมชาติ ให้กลายเป็นยุงที่มีความสามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรีย แนวความคิดดังกล่าวจะเป็นเรื่องเพ้อฝันในอดีต แต่จากความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ยุงกันปล่องบางชนิดที่เป็นพาหะแต่คือต่อเชื้อมาลาเรีย ประกอบกับความก้าวหน้าทางอนุชีววิทยา (molecular biology) และพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในปัจจุบัน เท่ากับจุดประกายความหวังที่มีอยู่อย่างเลือนลางให้มีช่องทางขึ้นมาบ้าง แต่จะสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับความรู้พื้นฐานด้านชีวภาพของยุงพาหะ นับตั้งแต่ชีววิทยาระดับโมเลกุลจนถึงระดับประชากรยุง (Baimai, 1994) และขณะนี้ก็มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มที่กำลังศึกษาเพื่อให้ทราบถึงกลไกและยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว โดยเฉพาะในยุง *An. gambiae* ซึ่งเป็นพาหะสำคัญในแอฟริกา โดยหวังว่าจะสามารถถ่ายทอดขึ้นไปสู่ประชากรของยุงทางใดทางหนึ่งด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม (Aldhous, 1993)

อย่างไรก็ตามไม่เพียงแต่ความรู้เกี่ยวกับยีนที่ควบคุมหรือเกี่ยวข้องกับขบวนการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย และการถ่ายทอดยีนดังกล่าวไปสู่ยุงเป้าหมายซึ่งมีความสำคัญต้องศึกษา ยังมีความจำเป็นที่ต้องเข้าใจถึงขบวนการต่อต้านและต้องทราบว่ามียีนดังกล่าวอยู่ในยุงชนิดใดบ้าง เพื่อที่จะสามารถเป็นแนวทางว่ามียุงพาหะชนิดใดที่เหมาะสมที่จะเป็นเป้าหมายในการควบคุมโดยวิธีการนี้ การศึกษาเพื่อให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์ยุงพาหะที่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรีย และทราบกลไกที่ทำให้เกิดการต่อต้าน จึงนับว่าเป็นก้าวแรกที่มีความสำคัญต่อการศึกษานี้ต่อไป

ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีถึงขบวนการต่อต้านเชื้อมาลาเรียในยุง จากการศึกษาที่ผ่านมาพอสรุปได้ว่า สามารถเกิดขึ้นได้จากสิ่งต่อไปนี้

1. ยุงที่ไม่ใช่โฮสต์ปกติของเชื้อมาลาเรีย เช่น *Ae. aegypti* เมื่อกินเลือดหนูที่มีเชื้อ *P. y. nigeriensis* จะไม่มีการผสมพันธุ์ของเซลล์เพศ จึงไม่มีการสร้าง ookinete (Somboon, P. unpublished observation)

2. มีเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนบางชนิดในกระเพาะอาหารของยุงทำลายหรือทำให้ zygotes หรือ ookinetes ของเชื้อมาลาเรียไม่สามารถไชผ่านไปที่เซลล์ผนังกระเพาะยุงได้ Gass (1977) และ Gass & Yeates (1979) แสดงให้เห็นว่า trypsin ในหลอดทดลองหรือในกระเพาะยุง *Ae. aegypti* สามารถทำลาย ookinete ของ *P. gallinaceum* ได้ เช่นเดียวกับ Feldmann et al. (1990) ที่พบว่าในสายพันธุ์ยุง *An. stephensi* ที่ถูกคัดเลือกให้ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ระดับเอนไซม์ aminopeptidase จะสูงกว่าในสายพันธุ์ที่ยอมรับ ในขณะที่ระดับ trypsin ไม่มีความแตกต่าง

3. peritrophic matrix (membrane) (PM) ที่สร้างมาจากเซลล์บุกระเพาะอาหารของยุง หลังจากกินเลือดแล้วไม่กี่ชั่วโมง สามารถเป็นตัวขัดขวางแต่เพียงบางส่วนไม่ให้ ookinetes ไขผ่าน ออกไปสู่เซลล์ที่กระเพาะยุงได้ โดยเฉพาะใน *Ae. aegypti* เมื่อได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* แต่ใน *An. stephensi* เชื่อดังกล่าวไม่มีผลต่อการสกัดกั้นเชื้อ *P. berghei* (Billingsley & Rudin, 1992)

อีกบทบาทหนึ่งของ PM คือ การห่อหุ้มก้อนเลือดที่มีเชื้อมาลาเรียให้นานขึ้น จนอาจถูก เอนไซม์ย่อยโปรตีนจากยุง (Gass, 1977) หรือ ส่วนประกอบในซีรัมทำลาย (Grotendorst *et al.*, 1986)

4. มีการสร้าง melanin มาห่อหุ้ม (encapsulation) ookinetes หรือ oocysts ที่ฝังตัวอยู่ที่ กระเพาะอาหารยุง ทำให้เชื้อมาลาเรียตาย เช่น ใน *An. gambiae* (Collins *et al.*, 1986) โดยที่การสร้าง melanin นั้น มีเอนไซม์ phenoloxidase มาเกี่ยวข้อง ซึ่งเกิดมาจาก prophenoloxidase ที่มีอยู่ ทั้งในเนื้อเยื่อและ haemolymph ของแมลง เชื่อกันว่าการกระตุ้น prophenoloxidase ไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการสร้าง melanin แต่ยังเป็นการตรวจจับสิ่งแปลกปลอมของระบบภูมิคุ้มกัน (cellular และ humoral immune systems) และก่อให้เกิดสารต่าง ๆ เช่น opsonins สำหรับการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ (Gotz, 1986; Ratcliffe, 1986)

5. มีการทำลายเชื้อระยะ ookinete ขณะที่ไขอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ผนังกระเพาะยุง เช่น ในยุง *An. atroparvus* สายพันธุ์ที่คือคือ *P. berghei* (Sluiters *et al.*, 1986) และในยุง *An. gambiae* สายพันธุ์ที่คือคือ *P. gallinaceum* (Vernick *et al.*, 1995)

6. เชื้อมาลาเรียระยะ sporozoite ถึงแม้จะเจริญและออกมาจาก oocysts ได้ก็ตาม ไม่สามารถเข้าไปสู่ต่อมน้ำลาย (Rosenberg, 1985)

ในประเทศไทยมียุงก้นปล่องพาหะมาลาเรียที่สำคัญได้แก่ *Anopheles dirus*, *An. minimus* และ *An. maculatus* (Ketrangsee *et al.*, 1991) ยุงเหล่านี้พบว่ามีความสามารถในการยอมรับเชื้อ มาลาเรียได้ดีทั้งของคอน ลิงและหนู (Wilkinson *et al.*, 1972; Rongsriyam *et al.*, 1989; Sattabonkkot *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1991, Somboon, P., unpublished observation) และยังไม่ปรากฏว่าได้มีการศึกษาว่ามี malaria-refractory genes อยู่ในกลุ่มประชากรยุงพาหะเหล่านี้หรือไม่ ซึ่งแตกต่างกับยุงก้นปล่องบางชนิดที่ไม่ถือว่าเป็นพาหะในประเทศไทย เช่น *An. barbirostris* และ *An. sinensis* พบว่ามีกรยอมรับเชื้อ *P. vivax* แต่คือคือ *P. falciparum* (Somboon *et al.*, 1994) แม้ว่าจะไม่ทราบว่าจะทำไมยุงทั้งสองชนิดนี้ ต่อต้านเชื้อมาลาเรียชนิดหนึ่งแต่ยอมรับอีกชนิดหนึ่ง แต่เท่ากับชี้ให้เห็นว่าน่าจะมี *P. falciparum*-refractory genes อยู่ในประชากรของยุงทั้งสองชนิดนี้ในระดับสูงมาก

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาว่ามี malaria-refractory genes อยู่ในประชากรของยุงก้นปล่องพาหะมาลาเรียของประเทศไทย กลุ่ม *Anopheles dirus*, *An. minimus* และ *An. maculatus* หรือไม่ จากวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการโดยใช้มาลาเรียของหนู *P. y. nigeriensis* เป็นรูปแบบ
2. เพื่อศึกษาถึงลักษณะประจำตัวของการต่อต้านเชื้อมาลาเรียในสายพันธุ์เหล่านี้ โดย
 - 2.1 ศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมพื้นฐานของการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย
 - 2.2 ศึกษาถึงระดับความสามารถในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียชนิดหรือสายพันธุ์อื่น ๆ
3. เพื่อศึกษาถึงเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกระเพาะยุงที่อาจเกี่ยวข้องกับขบวนการต่อต้านเชื้อมาลาเรียในสายพันธุ์ที่คัดเลือกขึ้นมา

ระเบียบวิธีวิจัยและอุปกรณ์

การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

สายพันธุ์ยุง

ยุงที่นำมาศึกษามี 2 ประเภทคือ 1) ยุงที่เลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงยุงมานานหลายปี ได้แก่ *An. dirus* species A จาก จ.แพร่ และ *An. minimus* species A จาก จ.แพร่และเชียงใหม่ 2) ยุงที่ถูกจับมาเลี้ยงใหม่ ๆ ได้แก่ *An. minimus* species A จาก จ.แพร่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอนและตาก *An. dirus* species D จาก จ.ตาก และ *An. sawadwongporni* (= *An. maculatus* species A) จาก จ.แพร่ และแม่ฮ่องสอน การจับยุงทำโดยใช้คนหรือวัว ควายเป็นเหยื่อล่อ นำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงยุง ภาควิชาปรสิตวิทยา ที่มีอุณหภูมิ 25-27°C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-80% แสงสว่าง 14 ชั่วโมง การตรวจทราบชนิดยุง *An. dirus* complex ทำโดยการคูโครโมโซมจากต่อมน้ำลายของลูกน้ำระยะที่ 4 (Baimai et al., 1984) และ จากอัมชะของยุงตัวผู้ (Choochote et al., 1992)

เชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียที่นำมาศึกษาคือ *P. yoelii nigeriensis* ซึ่งเป็นของหนูและได้มาจาก London School of Hygiene and Tropical Medicine ประเทศอังกฤษ เหตุผลที่ใช้มาลาเรียในหนูมาศึกษาแทนการใช้มาลาเรียในคน เช่น *P. falciparum* เนื่องจากว่ามีความสะดวกในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะการผลิต gametocytes ซึ่งถ้าหากใช้ *P. falciparum* จะต้องมีสายพันธุ์และมีระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่ดี ซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากกว่ามาก อีกทั้งการเพาะเลี้ยงให้ได้ gametocytes ที่แก่สมบูรณ์อย่างสม่ำเสมอเป็นสิ่งที่ควบคุมได้ยาก นอกจากนี้แม้ว่าจะใช้มาลาเรียในหนูมาศึกษา ก็หวังว่าจะทำให้ได้สายพันธุ์ที่คัดต่อมาลาเรียในคนด้วย เพราะเคยมีรายงานว่าสายพันธุ์ยุงที่คัดต่อมาลาเรียของหนู ยังสามารถคัดต่อมาลาเรียในคนได้เช่นกัน

เชื้อมาลาเรียนี้สามารถเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว การทำให้หนู (mice) ติดเชื้อทำได้โดยการนำเลือดจากปลายหางหนูที่มีเชื้อ 1-2 หยด ผสมกับน้ำเกลือ 0.85% ประมาณ 0.2 มล. แล้วฉีดเข้าทางหน้าท้อง เชื้อมาลาเรียชนิดนี้เป็นชนิดที่รุนแรงสำหรับหนูและมักทำให้หนูตายภายใน 7-15 วัน ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ฉีดเข้าไป หนูที่ได้รับเชื้อ 3-4 วัน จะเป็นช่วงที่มี infective gametocytes เหมาะสำหรับการทดลอง

วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ยุงที่คัดต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

ทำโดยการให้ยุงตัวเมียอายุประมาณ 5-7 วัน ที่ได้รับการบังคับผสมพันธุ์ด้วยมือ กินเลือดหนูที่มีเชื้อมาลาเรีย จากนั้นเลี้ยงยุงไว้ 4-5 วัน ด้วยน้ำตาล 2% จึงนำไปแยกไว้เดี่ยว ๆ ในถ้วยขนาดประมาณ 100 ลบ.ซม. ที่มีกระดาษกรองบุอยู่ข้างในและมีน้ำเล็กน้อย เพื่อให้ยุงวางไข่ เมื่อยุงไข่แล้วจึงผ่าดูกระเพาะอาหาร เพื่อตรวจนับจำนวน oocysts จะทำให้ทราบว่ายุงตัวใดที่ไม่มีการติด

เชื้อหรือติดเชื้อมากน้อยเพียงใด ไช้ที่มาจากพวกที่ไม่ติดเชื้อจะถูกรวมแล้วแยกไปเลี้ยงเป็น refractory line และพวกที่ติดเชื้อ แยกเลี้ยงเป็น susceptible line (คัดเอาเฉพาะที่มี oocyst เกิน 10) นำไปเลี้ยงจนได้เป็นตัวขุ่นแล้วนำไปให้กินเลือดหนูที่มีเชื้อมาลาเรียอีก โดยให้ขุ่นทั้งสองพวกกินเลือดจากหนูตัวเดียวกันและในเวลาใกล้เคียงกัน เพื่อสามารถเปรียบเทียบกันได้ ทำวนเวียนซ้ำอยู่อย่างนี้หลาย ๆ รุ่น ในแต่ละรุ่นจะบันทึกอัตราการติดเชื้อ (oocyst rate) และจำนวน oocysts จนกว่าจะได้สายพันธุ์ขุ่นที่มีระดับการต่อต้านหรือการยอมรับเชื้อมาลาเรียสูงสุด

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพื้นฐานของสายพันธุ์ขุ่นที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

1. เพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม โดยการนำตัวโม่งของแต่ละสายพันธุ์ที่แยกเพศแล้วมาเลี้ยงจนเป็นตัวขุ่น แล้วทำการผสมข้ามสายพันธุ์ทั้งสอง (cross) ด้วยการบังคับผสมพันธุ์ด้วยมือจำนวน 5 คู่ ให้กินเลือดแล้วเก็บไขมาเลี้ยงจนเป็นตัวขุ่น จากนั้นให้กินเลือดหนูที่มีเชื้อเพื่อวัดอัตราการติดเชื้อระยะ oocyst ขุ่นลูกผสมนี้จะถูกผสมกลับด้วยสายพันธุ์พ่อแม่ (back-cross) แล้วนำลูกที่ได้มาทดสอบกับเชื้อมาลาเรียอีกครั้งหนึ่ง

2. ทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยนำสายพันธุ์ที่มีการต่อต้านเชื้อมาลาเรียในหนูสูง ให้กินเลือดผู้ป่วยในภาคเหนือ ผ่านทาง artificial membrane feeding โดยใช้แผ่น Parafilm® แล้วเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อระยะ oocyst กับสายพันธุ์ที่ยอมรับเชื้อมาลาเรีย

การตรวจวัดเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร

เนื่องจากในขุ่น refractory line ไม่พบ oocyst ที่เจริญเติบโต (ดูผลการวิจัย) ทำให้คาดว่าอาจเป็นเพราะเอนไซม์ในกระเพาะขุ่นจึงทำการวัด activity ของเอนไซม์หลักที่ย่อยโปรตีน ได้แก่ aminopeptidase และ trypsin ทำตามวิธีของ Billingsley & Hecker (1991) โดยดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้

นำขุ่นตัวเมียแต่ละสายพันธุ์ที่มีอายุประมาณ 4-5 วัน กินเลือดคนที่แขน แล้วเก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 25-26° ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% ให้น้ำตาล 2% จากนั้นผ่าเก็บกระเพาะอาหารที่มีเลือดอยู่ จำนวน 4 ตัว ณ ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 40, 46 และ 52 หลังจากกินเลือด ไว้ในน้ำเกลือ 0.85 % 0.5 มล. ที่ 4° ซ ในหลอด microcentrifuge จำนวน 2 หลอด โดยใส่หลอดละ 2 ตัว กระเพาะขุ่นจะถูกบดให้แตกแล้วเก็บไว้ใน -20° ซ จนครบจึงนำมาหาเอนไซม์โดยเอาไปปั่นที่ 10,000 g 10 นาที แล้วเก็บของเหลวข้างบนมาตรวจหาปริมาณเอนไซม์

การตรวจหา aminopeptidase activity: นำ 1.5 มล. 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0 ที่ 26 °ซ) และ 40 ไมโครลิตร 0.16 M leucine *p*-nitroanilide (LpNA)(Sigma) ใน dimethyl sulphoxide (DMSO) มาผสมกันที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15 นาที แล้วเติม midgut homogenate จำนวน 25 ไมโครลิตร (duplicate) ทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 มล. 30% acetic acid นำไปวัดค่า absorbance ที่ 410 nm

การตรวจหา trypsin activity: ทำวิธีคล้ายกับการตรวจหา aminopeptidase เพียงแต่ใช้ substrate คือ benzoyl-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA) (Sigma) (40 มก./มล. DMSO)

ผลการศึกษา

การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *An. dirus* species A จาก จ.แพร่

จากจำนวนยุงแม่พันธุ์เริ่มต้นที่กินเลือด 78 ตัว มี 47 ตัว ที่ให้ไข่ โดยมี 39 ตัว ที่มีการติดเชื้อระยะ oocyst และ 8 ตัว ที่ไม่ติดเชื้อ อัตราการติดเชื้อ (จำนวนที่ติดเชื้อระยะ oocyst/จำนวนที่ผ่า) *P. y. nigeriensis* คิดเป็น 83.0% จำนวน oocyst มีตั้งแต่ 1 ถึง 250 (มากกว่า 200 คิดเป็น 250 เนื่องจากจำนวน oocyst ที่มากกว่านี้ไม่สามารถนับได้อย่างถูกต้อง) เฉลี่ย 48.2 อัตราการติดเชื้อในรุ่นต่อ ๆ มาของ susceptible line และ refractory line แสดงไว้ในรูปที่ 1 และรายละเอียดในการคัดเลือกจนถึงรุ่น F_{23} แสดงไว้ในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์นี้สามารถทำการคัดเลือกให้มีระดับความไวเพิ่มขึ้นหรือลดลงต่อเชื้อมาลาเรียอย่างค่อยเป็นค่อยไป ทั้งอัตราการติดเชื้อและจำนวนเฉลี่ยของ oocyst อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่าการคัดเลือกแบบกลุ่มนี้ ยังคงมียุงบางส่วนใน susceptible line ที่ไม่ติดเชื้ออยู่ ทำนองเดียวกันกับ refractory line ที่ยังมีบางส่วนมีการติดเชื้อระยะ oocyst อยู่ จนมาถึงรุ่น F_{17} จึงได้ทำการคัดเลือกแบบเดี่ยว (isofemale) ทั้งสองสายพันธุ์เพื่อคัดเอา colony ที่ต้องการออกจาก colony ที่มีทั้งยอมรับและคือ การทำเช่นนี้พบว่ามีบาง colony ที่อ่อนแอและไม่สามารถเลี้ยงต่อไปได้ แต่บาง colony ก็มีความแข็งแรงกว่า ปรากฏว่าอัตราการติดเชื้อใน susceptible line สูงขึ้นจนถึง 100% ตั้งแต่รุ่น F_{18} และเมื่อเลี้ยงติดต่อกัน 9 รุ่นโดยไม่ผ่านการกินเลือดหนูก็น่าจะมีการติดเชื้อที่สูงอยู่ระหว่าง 98-100% โดยมีจำนวน oocyst เฉลี่ยสูงมากกว่า 150 สำหรับ refractory line ในรุ่น F_{19} อัตราการติดเชื้อเหลือ 0% จนถึงรุ่น F_{25} ซึ่งในรุ่นนี้เกิด inbreeding depression ทำให้สายพันธุ์มีความอ่อนแอ ลูกน้ำเจริญช้า มีอัตราตายสูง และตัวเมียไม่ยอมวางไข่ จึงต้องทำการคัดเลือกขึ้นมาอีกจากลูกผสมที่ได้จากการทำ cross กับ susceptible line โดยคัดเลือกแบบกลุ่มและแบบเดี่ยวผสมกัน พบว่าสามารถได้ refractory line ที่มีอัตราการติดเชื้อ 0% หลังจากนั้นเพียง 7 รุ่น

ลักษณะการต่อต้านเชื้อมาลาเรียของหนูที่พบสามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

(1) ใน refractory line ookinetes สามารถเจริญได้ดีพอ ๆ กับใน susceptible line แต่เมื่อทำการผ่าดูกระเพาะยุงหลังจากกินเลือดแล้ว 5-7 วัน ด้วยน้ำเกลือ 0.85% แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (400x) จะไม่พบ oocyst ที่กระเพาะอาหารของยุง แต่จากการนำเอากระเพาะอาหารยุงที่กินเลือด 24 ชั่วโมง มาตัดบาง 4 ไมโครเมตร (tissue section) แล้วย้อมด้วย hematoxylin & eosin พบ ookinete ที่กำลังกลายเป็น oocyst ขนาดเล็กประมาณ 3-5 ไมโครเมตร ที่ผนังกระเพาะยุงส่วนใหญ่อยู่ในเซลล์ (basement membrane) บางส่วนอยู่ระหว่างเซลล์และ basal lamina ซึ่งแสดง

ให้เห็นว่าการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย *P. y. nigeriensis* ไม่น่าจะเกิดขึ้นในช่องว่าง (lumen) ของกระเพาะอาหารของยุง แต่ น่าจะเกิดขึ้นเมื่อ ookinete ไขผ่านเซลล์ของกระเพาะยุง

(2) ใน susceptible line หลังจากกินเลือดแล้ว 5-7 วัน นอกจากจะมี oocysts เจริญตามปกติแล้ว มักมี oocyst จำนวนหนึ่งที่ไม่เจริญเติบโต คล้ายกับที่เกิดขึ้นใน refractory line ยุงบางตัวมี melanization เกิดขึ้น ซึ่งสามารถพบได้ตั้งแต่ยุงกินเลือดที่มีเชื้อ 2-3 วัน โดยอาจแทรกอยู่ใน oocyst บางส่วนหรือหุ้มทั้งหมด มีขนาดเล็กตั้งแต่เห็นเป็นจุดสีน้ำตาลภายใต้กำลังขยาย (400x) จนถึงใหญ่พอ ๆ กับขนาด oocyst ปกติที่อยู่บนกระเพาะเดียวกัน สัดส่วนระหว่าง oocyst ปกติกับ melanized oocysts ไม่แน่นอน ความพยายามในการคัดเลือกสายพันธุ์ยุงที่มีเฉพาะ melanized oocysts ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากมักมี oocyst ปกติปนมาด้วยเสมอ บาง isofemale ให้ไข่ที่ไม่ฟักเป็นตัวหรือลูกน้ำมีอัตราการตายสูง หรือบางครั้งในรุ่นถัดไปกลับให้ oocyst แบบปกติ

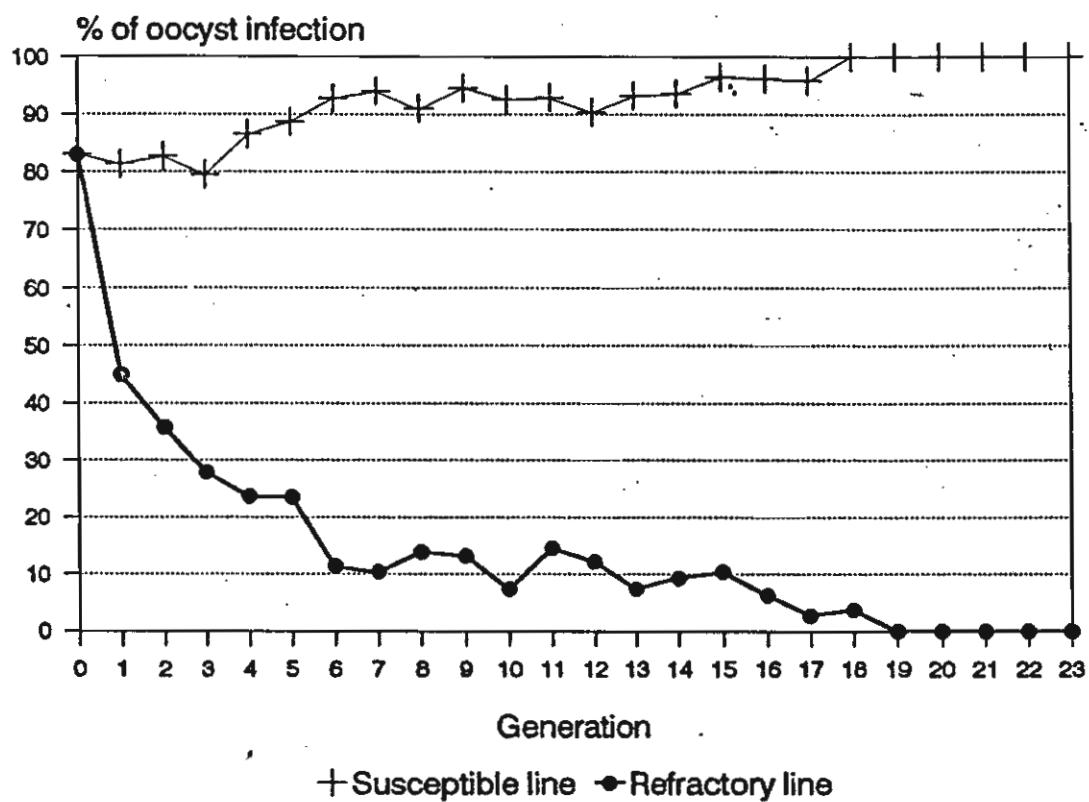
ใน refractory line นาน ๆ ครั้งจะพบยุงบางตัวมี melanized oocysts จำนวนมาก คล้ายกับเกิดใน susceptible line แต่ขนาดไม่ใหญ่ (ประมาณ 10-20 ไมโครเมตร) ลูกที่เกิดขึ้นจากยุงตัวที่มี melanized oocysts จำนวนมากนี้ ส่วนมากไม่มี melanization ทำให้การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะการต่อต้านเช่นนี้ไม่ประสบความสำเร็จ

3. ใน susceptible line oocyst ส่วนใหญ่จะเจริญเป็นปกติ แต่ oocyst บางตัวกลับเจริญช้า บางตัวมีขนาดใกล้เคียงกับปกติแต่ลักษณะภายในฝ่อเป็นเม็ดเล็ก ๆ (degeneration) อย่างไรก็ตามไม่เคยพบลักษณะเช่นนี้เพียงอย่างเดียวโดยไม่มี oocyst ปกติ

เป็นที่น่าสังเกตว่ายุงทั้งสองสายพันธุ์แม้ได้กินเลือดหนูเต็มที่มีส่วนหนึ่งที่รังไข่กลับไม่เจริญเติบโต เหมือนกับไม่เคยกินเลือดมาก่อน แต่ยังคงสามารถตรวจพบ oocysts จำนวนมากใน susceptible line บางตัวแม้ได้รับการผสมพันธุ์และมีไข่เต็มท้องก็ไม่ยอมวางไข่

การคัดเลือกสายพันธุ์ยุง *An. dirus* species D จาก จ.ตาก

ยุง *An. dirus* D ที่จับได้ 13 ตัว มีเพียง 7 ตัวที่วางไข่ จึงทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน แต่ยุงชนิดนี้มีนิสัยไม่ชอบเลือดหนูและกินเลือดไม่เต็มที่ อีกทั้งอัตราการวางไข่ในถ้วยเดียว ๆ ก่อนข้างดำ ทำให้จำนวนยุงที่ศึกษาในแต่ละรุ่นมีไม่มากนัก อัตราการติดเชื้อรวมจากแม่พันธุ์รุ่น F_4 ถึง F_8 ที่กินเลือดเต็มทีและกินเลือดบางส่วน เท่ากับ 44.4% (24/54) จำนวน oocyst เฉลี่ย 16.7 (1-150) ในแต่ละรุ่นที่มียุงไม่ติดเชื้อและติดเชื่อนำมาแยกคัดเลือกลด แต่จำนวนที่กินเลือดในแต่ละรุ่นมีน้อย ผลรวมอัตราการติดเชื้อในรุ่น F_1 ที่มาจากยุงที่ติดเชื้อเท่ากับ 55.5% (10/18) จำนวน oocyst เฉลี่ย 26.0 (1-95) และผลรวมอัตราการติดเชื้อในรุ่น F_1 ที่มาจากยุงที่ไม่ติดเชื้อเท่ากับ 70.0% จำนวน oocyst เฉลี่ย 22.6 (1-69) เมื่อทำการคัดเลือกลดไปอีก 2 รุ่น (ตารางที่ 2) ไม่พบแนวโน้มว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราการติดเชื้อที่ต่ำลงหรือสูงขึ้น ในขั้นสุดท้ายปัญหาที่พบคือยุงส่วนใหญ่ไม่ยอมกินเลือดหนู ไม่ยอมวางไข่และตายค่อนข้างเร็ว การศึกษาในยุงชนิดนี้จึงสิ้นสุดลง



รูปที่ 1. อัตราการติดเชื้อมาลาเรีย *P. yoelii nigeriensis* ใน refractory line และ susceptible line ของยุง *An. dirus* species A (จ.แพรว) ที่มี oocyst ปกติตั้งแต่ 1 cyst ขึ้นไป

ตารางที่ 1. แสดงรายละเอียดการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *An. dirus* species A (จ.แพร่)

	No. exam.	Oocyst rate (%)	Average (range)		No. exam.	Oocyst rate (%)	Average (range)
F ₀	47	83.0	48.2(1-250)				
susceptible line				refractory line			
F ₁	32	81.2	32.4(1-73)	F ₁	78	44.9	11.5(1-75)
F ₂	29	82.8	31.1(1-140)	F ₂	140	35.7	25.6(1-180)
F ₃	34	79.4	21.6(1-124)	F ₃	54	27.8	5.4(1-13)
F ₄	22	86.4	29.3(1-141)	F ₄	89	23.6	24.0(1-110)
F ₅	35	88.6	72.6(1-250)	F ₅	111	23.4	21.2(1-180)
F ₆	41	92.7	18.1(1-102)	F ₆	53	11.3	1.7(1-3)
F ₇	33	93.3	112.5(1-250)	F ₇	29	10.3	6.3(1-14)
F ₈	33	90.9	29.9(1-180)	F ₈	65	13.8	5.9(1-23)
F ₉	70	94.5	72.2(1-250)	F ₉	129	13.2	9.9(1-63)
F ₁₀	53	92.5	100.0(3-250)	F ₁₀	41	7.3	31.3(1-92)
F ₁₁	14	92.8	28.7(1-100)	F ₁₁	62	14.5	3.9(1-13)
F ₁₂	31	90.3	133.7(13-250)	F ₁₂	49	12.2	52.8(1-160)
F ₁₃	29	93.1	43.3(1-150)	F ₁₃	41	7.3	3.0(1-6)
F ₁₄	31	93.5	120.4(1-250)	F ₁₄	43	9.3	3.5(1-9)
F ₁₅	28	96.4	54.4(1-180)	F ₁₅	45	10.9	2.4(1-6)
F ₁₆	26	96.2	48.4(6-250)	F ₁₆	65	6.2	2.0(1-3)
F ₁₇	24	95.8	54.9(1-250)	F ₁₇	38	2.7	14(14)
F ₁₈	23	100	211.7(14-250)	F ₁₈	56	3.7	2.5(2-3)
F ₁₉	24	100	193.2(9-250)	F ₁₉	58	0	
F ₂₀	14	100	103.1(3-250)	F ₂₀	29	0	
F ₂₁	22	100	210.6(15-250)	F ₂₁	35	0	
F ₂₂	27	100	135.7(1-250)	F ₂₂	51	0	
F ₂₃	24	100	151.7(1-250)	F ₂₃	46	0	

ตารางที่ 2. แสดงรายละเอียดการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *An. dirus* species D (จ. ตาก)

	No. exam.	Oocyst rate (%)	Average (range)		No. exam.	Oocyst rate (%)	Average (range)
F ₀	54	44.4	16.7 (1-150)				
	susceptible line				refractory line		
F ₁	18	55.5	26.0(1-95)	F ₁	20	70.0	22.6(1-69)
F ₂	16	43.7	10.2(1-26)	F ₂	13	46.2	11.3(1-22)
F ₃	12	58.3	12.5(1-32)	F ₃	10	60.0	12.8(1-52)

การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *An. minimus*

ผลจากการทดลองให้ยุง *An. minimus* species A จาก จ.แพร่ และ จ.เชียงใหม่ ที่เลี้ยงไว้ในห้องทดลอง และยุงที่จับมาใหม่จาก จ.แพร่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และตาก กินเลือดหนูที่มีเชื้อพบว่ายุงทุกสายพันธุ์มีปัญหาเล็กน้อยในการกินเลือด มีอัตราการติดเชื้อในรุ่นแม่พันธุ์ 100% ยกเว้นสายพันธุ์ในห้องทดลองจาก จ.แพร่มี 1 ตัวใน 30 ตัว (3.3%) ที่ไม่ติดเชื้อ แต่ในรุ่นถัดไปพบว่ามีอัตราการติดเชื้อ 100% การคัดเลือกสายพันธุ์จึงสิ้นสุดลง เนื่องจากยุงชนิดนี้มีการยอมรับเชื้อมาลาเรียของหนูได้ดี

จำนวนหนาแน่นเฉลี่ยของ oocyst ใน *An. minimus* ไม่สามารถเปรียบเทียบโดยตรงกับ *An. dirus* species A เมื่อเริ่มทำการคัดเลือกได้ เนื่องจากหนูที่ติดเชื้อแต่ละตัว ให้จำนวน oocyst ในยุงได้แตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปทุกสายพันธุ์จะมีจำนวน oocyst เฉลี่ยเกิน 50 มีไม่กี่ตัวที่มี oocyst 1 ตัว และจำนวน oocyst สูงสุดที่พบคือ 194

การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *An. sawadwongpomi*

ยุงจากจ.แม่ฮ่องสอน แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงแม่พันธุ์ได้จำนวนมาก แต่จำนวนยุงที่ชอบกินเลือดหนูถีบจักรมีไม่มากนัก หรือกินเลือดไม่เต็มทีก็เลิกกิน บางตัวแม้ว่าได้กินเลือดหนูเต็มที่แล้วรังไข่ไม่เจริญ ส่วนมากไม่ยอมวางไข่ในถ้วยสำหรับวางไข่เดี่ยว ๆ นอกจากนี้ยุงตัวเมียยังมีอัตราตายสูงทำให้จำนวนยุงที่ผ่านแต่ละวันมีไม่มากนัก อัตราการติดเชื้อของยุงจาก จ.แม่ฮ่องสอน ที่กินเลือดเต็มหนูเต็มทีและกินบางส่วน เท่ากับ 77.8% (14/18) จำนวน oocyst อยู่ระหว่าง 1-120 (เฉลี่ย 20.1) แต่ไข่ที่ได้จากยุงที่ไม่ติดเชื้อมีจำนวนน้อยและไม่ฟักเป็นตัว ดังนั้นในรุ่น F₂ จึงคัดเลือกเอาเฉพาะยุงที่กินเลือดเต็มเต็มที่มาศึกษา พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ 100% (14/14) แม้ว่าจำนวน oocyst จะต่ำมาก (1-21, เฉลี่ย 5.1) เมื่อเทียบกับ *An. dirus* species A สายพันธุ์ยอมรับ (1-250, เฉลี่ย 112.5) ที่กินเลือดหนูตัวเดียวกันและเวลาใกล้เคียงกัน

ยุงที่จับจาก จ.แพร่ นำมาเลี้ยงจนถึงรุ่น F_2 พบว่ามีปัญหาในการเลี้ยงและไม่ชอบกินเลือดหนูเช่นเดียวกับยุงจาก จ. แม่ฮ่องสอน ในกลุ่มยุงที่กินเลือดเต็มที่ มีอัตราการติดเชื้อ 100% (16/16) จำนวน oocyst 1-27 (เฉลี่ย 6.5) การคัดเลือกสายพันธุ์จึงสิ้นสุดลงเนื่องจากไม่มียุงที่ไม่ติดเชื้อ

เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการคัดเลือกสายพันธุ์โดยใช้เชื้อมาลาเรียของคนแทนเชื้อมาลาเรียของหนู ได้นำ *An. dirus* species A (แพร่) มาให้กินเลือดที่มี *P. vivax* ปรากฏว่าทั้ง stock colony (n=44) และ F_{13} refractory line (n=19) มี oocyst rate 100% เช่นเดียวกับ *An. minimus* stock colony (n=52) จากเชียงใหม่ และ *An. sawadwongporni* จากแม่ฮ่องสอน (n=21)

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมพื้นฐานของสายพันธุ์ยุงที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย

การทำ reciprocal cross ระหว่าง refractory line (F_{23}) กับ susceptible line (F_{23}) พบว่ารุ่นผสม F_1 มี อัตราการติดเชื้อ (oocyst rate) และ ความหนาแน่นของ oocyst ลดลง เมื่อเทียบกับ susceptible line แต่ไม่พบความแตกต่างในการ cross ด้วยตัวผู้หรือตัวเมีย (ตารางที่ 3 A) เมื่อเลี้ยงให้ได้รุ่นถัดไปก็พบว่ายังคงมีอัตราการติดเชื้อ (oocyst rate) พอ ๆ กับรุ่นก่อน (ตารางที่ 3 B) เมื่อนำรุ่นผสม F_1 ทำ back-cross กับ susceptible line (ตารางที่ 3 C) ไม่ว่าจะเป็นตัวผู้หรือตัวเมียจะมีอัตราการติดเชื้อสูงขึ้น แต่ยังคงต่ำกว่า susceptible line อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของ oocyst มีพอ ๆ กัน และเมื่อนำรุ่นผสม F_1 ทำ back-cross กับ refractory line ทั้งอัตราการติดเชื้อและจำนวนหนาแน่นเฉลี่ยลดลง

การติดเชื้อมาลาเรียของคนของยุงที่คือต่อ *P. y. nigeriensis*

ในการทดลองที่ 1 (ตารางที่ 4) ที่ให้ refractory line และ susceptible line กินเลือดคนที่ติดเชื้อ *P. vivax* จาก จ. แม่ฮ่องสอน ที่มีจำนวนเชื้อหนาแน่นน้อย พบว่ามีอัตราการติดเชื้อและจำนวนหนาแน่นของ oocyst พอ ๆ กัน ส่วนตัวที่ไม่ติดเชื้อได้เลี้ยงต่อไปอีกรุ่นแล้วทดลองกับเชื้อ *P. vivax* อีกครั้งหนึ่ง พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ 100% ในการทดลองที่ 2 ที่ จำนวนเชื้อ *P. vivax* มีหนาแน่นมากขึ้น พบว่ามีการติดเชื้อ 100% ทั้งสองสายพันธุ์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 ซึ่งให้กินเลือดผู้ป่วยจาก จ. เชียงใหม่ ที่มี *P. falciparum* พบว่าอัตราการติดเชื้อและความหนาแน่นของ oocyst ของทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3. อัตราการติดเชื้อระยะ oocyst และความหนาแน่นของ oocyst ที่ได้จาก : A) reciprocal cross ระหว่าง F₂₃ susceptible line (S) และ F₂₃ refractory line (R); B) F₂ ของ crosses; และ C) back-cross กับสายพันธุ์พ่อแม่

A)

Parent	No. examined	oocyst rate ^a	oocyst density ^b (Median)	oocyst range
female(R) x male(S) F ₁	78	38.5 n.s.	4.0 n.s.	1-76
female(S) x male(R) F ₁	124	44.6 n.s.	8.0 n.s.	1-106
female(S) x male(S) F ₂₆	44	97.8***	180.0***	2-250

^a $\chi^2 = 45.49$, d.f. = 2, *** $P < 0.00001$; ^b Kruskal-Wallis H = 63.64, *** $P < 0.00001$

n.s. = not significantly different, $P > 0.05$

B)

Parent	No. examined	oocyst rate ^a	oocyst density ^b (Median)	oocyst range
female(R) x male(S)F ₁ F ₂	83	43.3 n.s.	30.5 n.s.	1-250
female(S) x male(R)F ₁ F ₂	68	48.5 n.s.	8.0 n.s.	1-250
female(S) x male(S) F ₂₇	43	97.7***	61.0***	1-250

^a $\chi^2 = 37.35$, d.f. = 2, *** $P < 0.00001$; ^b Kruskal-Wallis H = 18.21, *** $P < 0.0001$

n.s. = not significantly different, $P > 0.05$

C)

Parent	No. examined	oocyst rate ^a	oocyst density ^b (Median)	oocyst range
male(RS) ^c x female(S)(F ₂₄) F ₁	40	77.5 ก	56.0 n.s.	1-250
female(RS) ^c x male(S)(F ₂₄) F ₁	44	72.7 ก	17.5 n.s.	1-250
female(RS) ^d x male(S)(F ₂₄) F ₁	49	71.4 ก	29.0 n.s.	1-190
female(RS) ^d x male(R)(F ₂₄) F ₁	39	10.3 ข	5.0 *	2-28
female(S) x male(S) F ₂₈	17	100 ก	68.0 n.s.	1-250

^a $\chi^2 = 63.39$, d.f. = 4, $P < 0.00001$; อักษรเหมือนกันแสดงถึงไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

^b Kruskal-Wallis H = 9.81, * $P = 0.0437$; n.s. = not significantly different, $P > 0.05$

^c เกิดจาก male(R) x female(S); ^d เกิดจาก male(S) x female(R)

ตารางที่ 4. อัตราการติดเชื้อมาลาเรียของคนของยุง *An. dirus* ที่คือ (R) หรือยอมรับ (S) เชื้อ

P. y. nigeriensis

การทดลองที่ 1

สายพันธุ์	<i>P. vivax</i>			
	No. examined	oocyst rate	oocyst density ^a (Median)	oocyst range
F16 (R)	41	90.2	3.0	1-9
F17 (S)	48	87.5	4.0	1-11

^a Mann-Whitney U test = 885.5, $P = 0.2831$

การทดลองที่ 2

สายพันธุ์	<i>P. vivax</i>			
	No. examined	oocyst rate	oocyst density ^a (Median)	oocyst range
F17 (R)	26	100	23.0	11-55
F19 (S)	34	100	31.0	8-67

^a Mann-Whitney U test = 506.0, $P = 0.3432$

การทดลองที่ 3

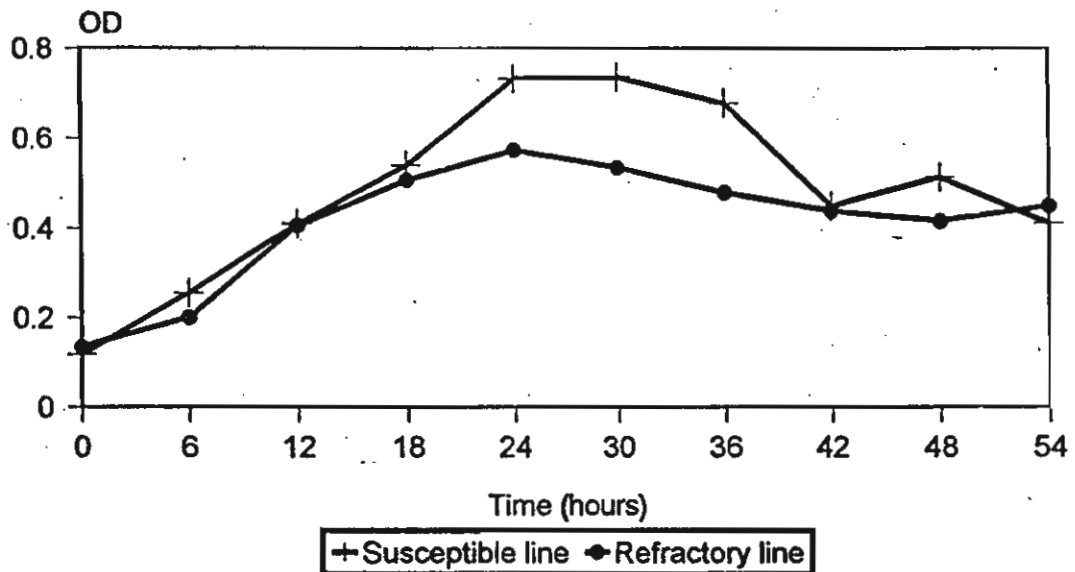
สายพันธุ์	<i>P. falciparum</i>			
	No. examined	oocyst rate	oocyst density ^a (Median)	oocyst range
F23 (R)	22	100	48.0	15-91
F23 (S)	19	100	29.0	12-99

^a Mann-Whitney U test = 274.0, $P = 0.0915$

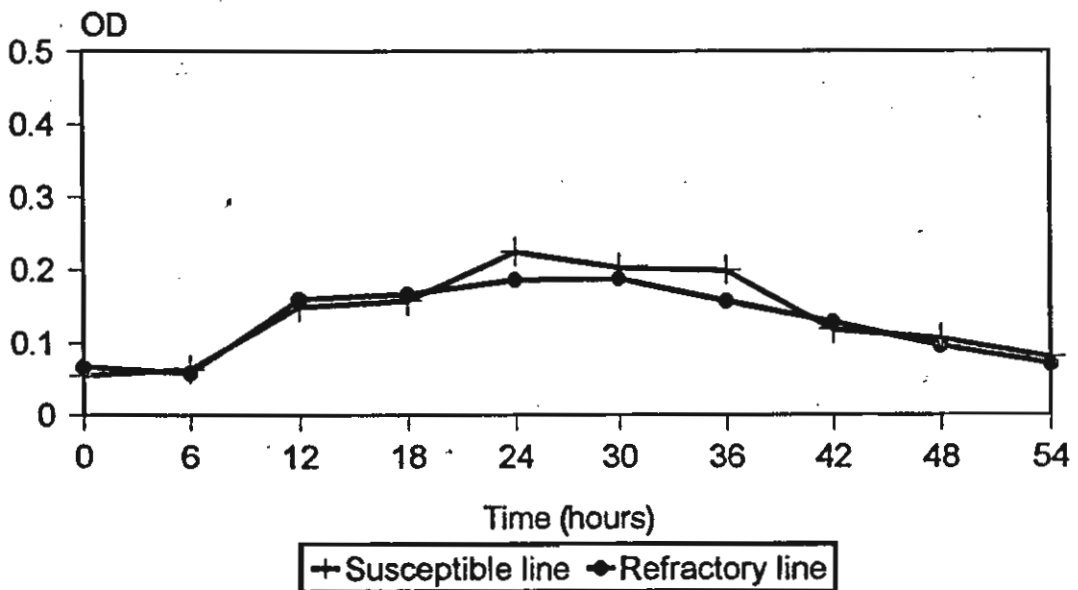
ระดับเอนไซม์ในกระเพาะอาหารของยุง

เอนไซม์ aminopeptidase ในกระเพาะอาหารของ susceptible line มี activity สูงกว่า refractory line ในช่วงเวลาที่ 24-36 ชั่วโมง หลังจากกินเลือด (รูปที่ 2a) แต่สำหรับ trypsin พบว่า ใน refractory line มี activity พอดี ๆ กับ susceptible line (รูปที่ 2b)

a) Aminopeptidase



b) Trypsin



รูปที่ 2. ระดับเอนไซม์ aminopeptidase (a) และ trypsin (b) ในกระเพาะอาหารของ refractory line และ susceptible line

วิจารณ์ผล

เชื้อมาลาเรียของหนูชนิด *P. y. nigeriensis* มีแหล่งกำเนิดในทวีปแอฟริกา (Killick-Kendrick, 1973) แม้จะไม่ทราบชนิดของยุงที่เป็นพาหะในธรรมชาติ เชื้อชนิดนี้เจริญได้ในยุงก้นปล่องหลายชนิดทั้งที่อยู่ในทวีปแอฟริกาและเอเชีย ด้วยระดับการยอมรับที่แตกต่างกัน (Killick-Kendrick, 1978; Graves & Curtis, 1982; Wing et al., 1985; Ichimora et al., 1989) เช่นเดียวกับยุงพาหะมาลาเรียของคน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของยุง และสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย (Curtis & Graves, 1983)

สำหรับยุงพาหะมาลาเรียในประเทศไทย *An. minimus* species A ซึ่งมีอัตราการติดเชื้อ 100% และมีจำนวน oocyst สูงในทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา จึงอาจสรุปได้ว่าเป็นยุงที่มีการยอมรับเชื้อมาลาเรียของหนูชนิดนี้ได้ดีกว่ายุงพาหะชนิดอื่น และมีปัญหาน้อยในการกินเลือดหนู แม้ว่าจะเริ่มเอามาเลี้ยงใหม่ ๆ ยุง *An. sawadwongporni* ปกติชอบกินเลือดสัตว์พวกวัว ควายและคน จึงอาจไม่คุ้นกับการกินเลือดหนู ตัวที่กินเลือดบางส่วนจึงอาจจะไม่ติดเชื้อ เนื่องจากจำนวนเซลล์เพศของเชื้อมาลาเรียที่ได้รับมีน้อยกว่าตัวที่กินเลือดเต็มตัวซึ่งสามารถติดเชื้อได้ 100% แม้ว่าจำนวน oocyst จะต่ำ จึงถือว่าการยอมรับเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ได้ดีเป็นอันดับรองลงมา แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการทดลองกับหนู มีบ่อยครั้งที่ตัวที่กินเต็มตัวอาจไม่สามารถสร้างไข่ให้เจริญได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของแต่ละตัวในสายพันธุ์ (intraspecific variation) และโปรตีนในเลือดหนูปกติจะต่ำกว่าเลือดคนหรือสัตว์ใหญ่ (Clements, 1992) สำหรับ *An. dirus* species A ที่นำมาศึกษาครั้งนี้เป็นยุงที่เลี้ยงไว้นานแล้วทำให้ไม่มีปัญหาในการกินเลือดหนู อัตราการติดเชื้อที่ประมาณ 80% ก่อนเริ่มทำการคัดเลือก และมีหลายตัวที่มี oocyst เพียง 1 ตัว จึงถูกจัดอันดับไว้รองลงมา บางตัวแม้จะกินเลือดหนูเต็มตัวก็ไม่สามารถสร้างไข่ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเหตุผลเดียวกันข้างต้น ยุงชนิดนี้คงจะมีการยอมรับเชื้อชนิดนี้ได้ดีกว่า species D ประมาณ 15% สำหรับยุงชนิดหลังนี้มีปัญหาในการกินเลือดหนูมาก อาจเนื่องมาจากว่าเป็นยุงที่เพิ่งนำมาเลี้ยงใหม่ ๆ และโดยนิสัยในธรรมชาติชอบกัดกินเลือดคน นอกจากนี้จำนวนที่เริ่มนำมาเลี้ยงมีไม่ถึง 10 ตัว ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย

วิธีการให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์ยุงที่มีการยอมรับหรือคือเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น (โดยดูจาก oocyst rate และ oocyst density) ประการแรกสายพันธุ์ยุงนั้นต้องมีบางส่วนที่ไม่ติดเชื้อเมื่อเริ่มทำการคัดเลือก ซึ่งสามารถทำได้โดยการคัดเลือกแบบกลุ่ม (mass selection) หรือ แบบเดี่ยว (isofemale) การคัดเลือกแบบกลุ่มทำให้ยุงมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterogeneity) และมีความแข็งแรงไม่เกิดปัญหา inbreeding depression เหมือนกับการคัดเลือกแบบเดี่ยว แต่การคัดเลือกแบบกลุ่มซึ่งนอกจากจะใช้เวลานานหลายรุ่น และมักไม่ได้สายพันธุ์ที่คือเชื้อมาลาเรีย 100% ยก

ตัวอย่างเช่น Ward (1963) ทำการคัดเลือกยุง *Ae. aegypti* 26 รุ่น ได้สายพันธุ์ที่ 98% มีจำนวน oocyst ของ *P. gallinaceum* เท่ากับ 10 หรือน้อยกว่า เช่นเดียวกับ van der Kaay & Boorsma (1977) คัดเลือก ยุง *An. atroparvus* ด้วยวิธีแบบกลุ่มหลังจาก 18 รุ่น สามารถได้สายพันธุ์ที่ยอมรับ เชื้อมาลาเรีย *P. berghei* 100% แต่สายพันธุ์ที่คัดต่อเชื้อยังคงมีอัตราการยอมรับอยู่ประมาณ 5% จากเดิมก่อนการคัดเลือกประมาณ 40% การคัดเลือกแบบแยกเดี่ยวอาจได้สายพันธุ์ที่มีการยอมรับ หรือคัดต่อมาลาเรียได้เร็วขึ้น เช่น Al-Mashhadani *et al.* (1980) คัดเลือกแบบแยกเดี่ยวสายพันธุ์ยุง *An. gambiae* ที่คัดต่อ *P. berghei* ได้สูงสุด 100% เมื่อคัดเลือกเพียง 8-9 รุ่น Feldmann & Ponnudurai (1989) ใช้การคัดเลือกแบบกลุ่มตามด้วยแบบเดี่ยว ทำให้ได้สายพันธุ์ยุง *An. stephensi* ที่คัดต่อ *P. falciparum* แต่ไม่ถึง 100% เช่นเดียวกับ Thathy *et al.* (1994) ที่ใช้การแยกแบบเดี่ยว ในยุง *Ae. aegypti* กับเชื้อ *P. gallinaceum* ได้ระดับการต่อต้านสูงสุดประมาณ 90% อย่างไรก็ตาม Collins *et al.* (1984) ใช้ทั้งสองวิธีสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ยุง *An. gambiae* ที่คัดต่อเชื้อ มาลาเรียของลิง *P. cynomolgi* ได้สมบูรณ์

การศึกษาครั้งนี้ใช้การคัดเลือกแบบกลุ่มตามด้วยแบบเดี่ยว จากรุ่น F_{17} ก็ได้สายพันธุ์ที่มีการยอมรับหรือต่อต้านเชื้อมาลาเรีย *P. y. nigeriensis* ที่สมบูรณ์เมื่อคัดเลือกต่อไปอีกเพียง 1-2 รุ่น ปัญหาสำคัญจากการคัดเลือกแบบเดี่ยว คือ ความอ่อนแอทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นใน refractory line แต่ไม่เกิดใน susceptible line ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าใน susceptible line มีอาจความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า เพราะสายพันธุ์ดั้งเดิมมีจำนวนเกือบ 50 ตัว และเกิดจากการรวม isofemale หลายตัวที่มีจำนวน oocyst ตั้งแต่ 10 ขึ้นไปจนถึง 250 ในขณะที่ refractory line มาจากสายพันธุ์ดั้งเดิมไม่ถึง 10 ตัว และท้ายสุดมาจาก isofemale ไม่กี่ตัวซึ่งล้วนแล้วแต่ไม่มี oocyst อย่างไรก็ตาม ยังไม่อาจตัดสาเหตุอื่นออกจากความอ่อนแอทางพันธุกรรมได้ โดยเฉพาะความเกี่ยวข้องกันของยีน ที่คัดต่อเชื้อมาลาเรียกับความสามารถในการเจริญพันธุ์ ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องศึกษาต่อไป ปัญหาความอ่อนแอทางพันธุกรรมของยุงระหว่างการคัดเลือกพันธุ์แบบเดี่ยวก็เคยมีรายงาน เช่น Feldmann & Ponnudurai (1989) ในยุง *An. stephensi*

ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ยุงกันปล่อง *An. dirus* species A ที่สามารถต่อต้านและยอมรับเชื้อมาลาเรียของหนู *P. y. nigeriensis* เกิดจากการที่สายพันธุ์แม่มีบางส่วนที่ไม่ติดเชื้อและมีจำนวนไม่น้อยที่มีการติดเชื้อต่ำ (1 oocyst) แสดงถึงความแตกต่างทางหน่วยพันธุกรรมบางอย่าง (heterogeneity) ที่มีมาตั้งแต่กำเนิด ซึ่งคล้ายกับความสำเร็จส่วนใหญ่ ในการคัดเลือกยุงชนิดอื่นที่มีอัตราการติดเชื้อเริ่มต้นที่ทำการคัดเลือก 40-60% (Huff, 1930; Al-Mashadani, 1974; van der Kaay & Boorsma, 1977) อย่างไรก็ตาม Feldmann & Ponnudurai (1989) สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ยุง *An. stephensi* ที่คัดต่อ *P. falciparum* ได้เกือบ 100% โดยที่แม่พันธุ์เริ่มต้นมีการติดเชื้อมาก่อนข้างสูง ซึ่งแสดงถึงว่าการที่ยุงชนิดใดชนิดหนึ่งมีการยอมรับเชื้อได้สูง ไม่ได้หมายความว่าจะไม่สามารถทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่คัดต่อเชือนั้นได้เสมอไป แต่คงเป็น

ไปได้ยากสำหรับยุงที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรีย 100% ดังเช่น *An. minimus* species A และ *An. sawadwongporni*

ในอดีตไม่เคยมีผู้ใดสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ยุงก้นปล่องที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรียของหนู *P. y. nigeriensis* ได้ 100% Graves & Curtis (1982) พบว่าสายพันธุ์ยุง *An. gambiae* ที่คัดเลือกขึ้นมา มีอัตราการติดเชื้อ *P. y. nigeriensis* ต่ำสุดเพียง 26.5% ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีการยอมรับเชื้อสูงสุด 98.8% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าสายพันธุ์ทั้งสองเป็นการคัดเลือกแบบกลุ่มและใช้เวลาไม่นานพอ จึงถือได้ว่าการศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่ได้สายพันธุ์ยุงที่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ได้สมบูรณ์

สายพันธุ์ยุงชนิดต่าง ๆ ที่มีการคัดเลือกเพื่อสามารถต่อต้านหรือยอมรับเชื้อมาลาเรียเพิ่มขึ้น ส่วนมากสามารถคงลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าวไว้ได้ โดยไม่ต้องมีการคัดเลือกอีก เช่น 13 รุ่น ใน *Ac. aegypti* กับเชื้อ *P. gallinaceum* (Ward, 1963) และ 40 รุ่น ใน *An. gambiae* กับเชื้อ *P. cynomolgi* (Collins et al., 1986) เช่นเดียวกับ *An. dirus* species A ใน susceptible line จากการศึกษากครั้งนี้ ซึ่งเท่าที่ผ่านไประยะ 9 รุ่น โดยไม่มีการคัดเลือก ก็ยังคงมีอัตราการติดเชื้อ 98-100% สำหรับใน refractory line เกิด inbreeding depression เสียก่อนที่จะได้ศึกษา แต่จากการที่มีอัตราการติดเชื้อ 0% ติดต่อกัน 7 รุ่น ก็เสมือนกับไม่มีการคัดเลือก เนื่องจากไข่ที่ออกมาแต่ละรุ่นก็ถูกนำมาเลี้ยงต่อแทบจะทั้งหมด

การต่อต้านเชื้อมาลาเรียแบบที่ไม่พบการเจริญของ oocyst ที่ผนังกระเพาะยุงหรือพบน้อยลง เป็นลักษณะที่พบในการศึกษาอื่น ๆ ส่วนใหญ่ (เช่น Ward, 1963; Al-Mashhadani et al., 1980; Feldmann & Ponnudurai, 1989) ซึ่งคล้ายกับที่พบในสายพันธุ์ยุง *An. dirus* species A แต่สาเหตุสำคัญคงไม่ใช่เป็นเพราะว่า ookinete ถูกทำลายตั้งแต่อยู่ในกระเพาะอาหารด้วยเอนไซม์ trypsin ตามที่รายงานโดย Gass (1977) และ Gass & Yeates (1979) หรือเป็นเพราะเอนไซม์ aminopeptidase ในกระเพาะอาหารสูง (Feldmann et al., 1990) เพราะเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ใน refractory line ไม่ได้สูงกว่า susceptible line แต่อย่างใด (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบบทบาทของ aminopeptidase ที่สูงขึ้นใน susceptible line สำหรับการตรวจพบ oocyst ขนาดเล็ก 3-5 ไมโครเมตร (โดย tissue section) ที่ผนังกระเพาะยุงแสดงว่า ookinete สามารถเดินทางผ่าน peritrophic matrix ได้เช่นเดียวกับ susceptible line แต่การทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของ oocyst น่าจะเกิดขึ้นเมื่อเข้าไปที่ผนังกระเพาะยุง (ookinete ของ *P. y. nigeriensis* ส่วนใหญ่ไขเข้าเซลล์, intracellular) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sluiters et al. (1986) ในยุง *An. atroparvus* ที่ต่อต้านเชื้อ *P. berghei* และ Vernick et al. (1995) ในยุง *An. gambiae* ที่ต่อต้าน *P. gallinaceum* สำหรับอะไรเป็นสาเหตุทำให้ ookinete หรือ oocyst อ่อน หายุดการเจริญเติบโตยังไม่มีรายงานการศึกษา แต่อาจมีความเป็นไปได้ 2 แนวทาง คือ 1) เซลล์ของกระเพาะยุงในสายพันธุ์ที่ดื้อมีความแตกต่างบางอย่างกับสายพันธุ์ยอมรับ นอกเหนือจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์

aminopeptidase ที่ต่างกัน (รูปที่ 2) และ 2) มีสารยับยั้งบางอย่างที่อยู่ในเซลล์หรือใน haemolymph ผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มกระเพาะ เช่น lectin หรือ agglutinin

Collins et al. (1986) รายงานอีกรูปแบบหนึ่งของการต่อต้านเชื้อมาลาเรียที่ผนังกระเพาะ ขุม ใน *An. gambiae* ที่คือต่อเชื้อ *P. cynomolgi* โดยที่เมื่อ ookinete เข้าไปอยู่ในเซลล์หรือช่องว่าง ระหว่าง เซลล์ กับ basal lamina ของกระเพาะ จะมีการสร้าง melanin มาหุ้มเชื้อ (encapsulation) ลักษณะดังกล่าวก็สามารถพบได้ในขุม *An. dirus* species A บางตัวที่กินเชื้อมาลาเรียของหนู แต่ การที่ไม่สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะต่อต้านแบบนี้อาจเป็นเพราะว่า ยีนที่ควบคุมมี ลักษณะค่อนข้าง recessive trait (Collins et al., 1986)

การศึกษาทางพันธุศาสตร์โดยการทำการผสม (cross) ระหว่างสายพันธุ์ที่คือกับยอมรับเชื้อ มาลาเรีย (ตารางที่ 3) พบว่าลูกผสม F_1 มีอัตราการติดเชื้อประมาณ 50% และจำนวน oocyst ก็ลดลง และเมื่อนำสายพันธุ์ยอมรับเดิมกลับมาผสมอีกที (back-cross) ก็ได้ลักษณะการยอมรับมากขึ้น แต่จะเป็นทางตรงข้ามเมื่อเอาสายพันธุ์ที่คือมาผสม ลักษณะกึ่งกลาง (intermediate) เช่นนี้ แสดงว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านหรือยอมรับเชื้อมาลาเรียของหนูเป็นแบบเด่นไม่สมบูรณ์ (incomplete dominance) และจากจำนวน oocyst ที่มีตั้งแต่ 1 ถึง 250 น่าจะแสดงถึงมียีนมากกว่า 1 ที่เกี่ยวข้อง โดยคาดว่าอยู่บน autosome มากกว่า sex chromosome เพราะไม่ว่าจะใช้เพศผู้หรือเพศเมียผสมกัน อย่างไรก็ได้ผลเหมือนกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาส่วนใหญ่ที่ผ่านมา (เช่น Kilama & Craig, 1969; Vernick et al., 1989; Thathy et al., 1994) แต่ Al-Mashhadani et al. (1980) พบว่าอาจมี ปัจจัยทางเพศมาเกี่ยวข้องด้วย

ระดับการยอมรับเชื้อมาลาเรียของขุม อาจถูกควบคุมโดยปัจจัยที่เกิดจากยีนเดี่ยว (Huff, 1931; Ward, 1963; Vernick et al., 1995) หรือเกี่ยวข้องกับยีนหลายตัว (เช่น Al-Mashhadani et al., 1980; Collins et al., 1986; Vernick & Collins, 1989; Vernick et al., 1989; Thathy et al., 1994) โดยที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้าน อาจมีคุณสมบัติแตกต่างกัน คือ 1) แสดงลักษณะ เด่น (dominance) เช่น สายพันธุ์ขุม *An. gambiae* ที่คือต่อ *P. gallinaceum* (Vernick et al., 1995) 2) แสดงลักษณะด้อย (recessive) เช่น สายพันธุ์ขุม *An. gambiae* ที่คือต่อ *P. cynomolgi* (Collins et al., 1986) และ 3) แสดงลักษณะเด่นไม่สมบูรณ์ (incomplete dominance) ซึ่งคล้ายกับผลของ การศึกษาครั้งนี้ เช่น สายพันธุ์ขุม *An. gambiae* ที่ต่อต้านเชื้อ *P. y. nigeriensis* (Graves & Curtis, 1982) ในสายพันธุ์ขุม *An. atroparvus* (van der Kaay & Boorsma, 1977) หรือ *An. gambiae* (Al-Mashhadani et al., 1980) ที่ต่อต้านเชื้อ *P. berghei* ซึ่งเป็นมาลาเรียของหนูที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียง มากกับ *P. y. nigeriensis*

สายพันธุ์ *An. dirus* species A ที่ต่อต้านและยอมรับเชื้อมาลาเรียของหนูที่ใช้ศึกษา มีการ ขอมรับเชื้อมาลาเรียของคน *P. falciparum* และ *P. vivax* ได้ดีพอ ๆ กัน แสดงถึงว่ากลไกการ ต่อต้านเชื้อมาลาเรียของหนูในขุมชนิดนี้มีความจำเพาะสูง โดยที่ไม่ครอบคลุมไปถึงเชื้อมาลาเรีย

ของคน แต่อาจสามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียของหนูชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน เช่น *P. berghei* หรือ *P. y. yoelii* ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป ความจำเพาะของการต่อต้านเช่นนี้คล้ายกับการศึกษาของ Graves & Curtis (1982) ที่คัดเลือกสายพันธุ์ *An. gambiae* ที่มีการยอมรับเชื้อ *P. y. nigeriensis* ลดลง แต่มีการยอมรับ *P. falciparum* เหมือนเดิม แตกต่างจากที่ Al-Mashhadani & Davidson (1976) ที่รายงานว่าสายพันธุ์ *An. gambiae* ที่ต่อต้าน *P. berghei* มีการยอมรับ *P. falciparum* ลดลง และ Collins et al. (1986) ที่พบว่าสายพันธุ์สูง *An. gambiae* ที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรียของลิง *P. cynomolgi* สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียของลิงชนิดอื่น รวมทั้งของหนู ของนก และของคน โดยเฉพาะ *P. vivax* แต่สำหรับ *P. ovale* และ *P. falciparum* 3 ใน 6 isolates ยังสามารถเจริญได้ดี ดังนั้นอาจสรุปได้ว่านอกจากการยอมรับเชื้อมาลาเรียจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยุงแล้ว ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียอีกด้วย แสดงถึงความสลับซับซ้อนของความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อมาลาเรียและยุงกันป่อง เท่ากับเพิ่มความยากลำบากในการคิดหาวิธีเปลี่ยนยุงพาหะไม่ให้มีการยอมรับเชื้อมาลาเรีย เว้นเสียแต่จะสามารถไขความลับของกลไกการต่อต้านในรูปแบบต่าง ๆ ให้กระจ่าง ซึ่งคงต้องอาศัยเวลาและความพยายามจากนักวิจัยหลาย ๆ ด้าน

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงไม่ได้หมายความว่า ยุงพาหะมาลาเรียในประเทศไทย จะไม่มีหน่วยพันธุกรรมที่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียของคน จนกว่าจะได้คัดเลือกโดยใช้เชื้อมาลาเรียของคน โดยเฉพาะชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ คือ *P. falciparum* แต่คงต้องมีระบบการเพาะเลี้ยงที่ดีและสายพันธุ์ที่ดี ซึ่งไม่ใช่เรื่องที่ย่างยาก ดังเห็นได้จากการศึกษาเพียงแห่งเดียว ในยุง *An. stephensi* ของ Feldmann & Ponnudurai (1989) ที่สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงสูงถึง 95% อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานว่าได้มีการทดสอบการต่อต้านกับเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์หรือชนิดอื่นของคน อีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การศึกษากลไกที่ยุงกันป่องบางชนิด (เช่น *An. sinensis* หรือ *An. barbirostris*) สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะ *P. falciparum* ได้โดยไม่ต้องคัดเลือก (Somboon et al., 1994) ซึ่งอาจนำไปสู่อีกรูปแบบหนึ่งของกลไกการต่อต้าน

แม้ว่าก่อนข้างจะคาดหวังสำหรับสายพันธุ์ยุง *An. dirus* species A ที่สามารถต่อต้านเชื้อ *P. y. nigeriensis* แต่ไม่สามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียของคน ยังเห็นว่าสายพันธุ์นี้มีประโยชน์และสะดวก สำหรับเป็นรูปแบบหนึ่งของการศึกษาถึงกลไกการต่อต้านเชื้อมาลาเรียที่ซับซ้อนนี้ ซึ่งได้รับความสนใจจาก Dr. Cathy Walton, Leeds University ประเทศอังกฤษ ผู้ซึ่งได้พัฒนาเทคนิค PCR สำหรับศึกษายุง *An. dirus* complex จากการได้พบปะหารือกันเมื่อไม่นานมานี้ ได้ตกลงที่จะร่วมมือกันศึกษาต่อไปถึงความแตกต่างในระดับยีนระหว่างสองสายพันธุ์นี้ จึงได้รวมเข้าไปในโครงการการศึกษา population genetic ของยุง *An. dirus* complex โดยได้ขอการสนับสนุนทุนวิจัยจาก The Wellcome Trust สำหรับปี 2541-2543

เอกสารอ้างอิง

- Aldhous, P. 1993. Malaria: focus on mosquito genes. *Science* 261: 546-548.
- Al-Mashhadani, H.M. & Davidson, G. 1976. A study of the genetics of the susceptibility of *Anopheles gambiae* A to malaria infection. *Heredity* 37: 457.
- Al-Mashhadani, H.M., Davidson, G. & Curtis, C.F. 1980. A genetic study of the susceptibility of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium berghei*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 585-594.
- Baimai, V. 1984. Cytogenetic studies of some species complexes of *Anopheles* in Thailand and southeast Asia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 15: 536-546.
- Baimai, V. 1994. Evolution of malaria vectors. The 4th Conference on Malaria Research in Thailand, Chiangrai, 8-10 February.
- Billingsley, P.F. & Hecker, H. 1991. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase and α -glucosidase in the midgut. *Journal of Medical Entomology* 28: 865-871.
- Billingsley, P.F. & Rudin, W. 1992. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *Journal of Parasitology* 78: 430-440.
- Choochote, W., Rongsriyam, Y., Tookyang, B., Pakdicharoen, A. & Likitvong, K. 1992. A technique for chromosome preparation in adult mosquitoes. *Mosquito-Borne Diseases Bulletin* 9: 20-22.
- Clements, A.N. 1992. *The Biology of Mosquitoes*, Vol. I: Development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London, 509 pp.
- Collins, F.H., Sakai, R.K., Vernick, K.D., Paskewitz, S., Seeley, D.C., Miller, L.H., Collins, W.E., Campbell, C.C. & Gwadz, R.W. 1986. Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 234: 607-610.
- Curtis, C.F. 1979. Translocations, hybrid sterility, and the introduction into pest populations of genes favourable to man. In "Genetics in Relation to Insect Management", M.A.Hoy and J.J.Jr McKelvey, eds., pp 19-30. Bellagio, Italy: Rockefeller Foundation Symposium.
- Curtis, C.F. & Graves, P.M. 1983. Genetic variation in the ability of insects to transmit Filariae, Trypanosomes and malarial parasites. *Current Topics in Vector Research* 1: 31-62.
- Feldmann, A.M., Billingsley, P.F. & Savelkoul, E. 1990. Bloodmeal digestion by strains of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) of differing susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Medical and Veterinary Entomology* 3: 41-52.
- Feldmann, A.M. & Ponnudurai, T. 1989. Selection of *Anopheles stephensi* for refractoriness and susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Medical and Veterinary Entomology* 3: 41-52.
- Garnham, P.C.C. 1966. *Malaria Parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1114 pp.
- Gass, R.F. 1977. Influences of blood digestion on the development of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) in the midgut of *Aedes aegypti* (L.). *Acta Tropica* 34: 127-140.
- Gass, R.F. & Yeates, R.A. 1979. In vitro damage of cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinase from susceptible *Aedes aegypti*. *Acta Tropica* 36: 243-252.
- Gotz, P. 1986. Mechanisms of encapsulation in dipteran hosts. *Symposium of Zoological Society of London* 56: 1-19.1

- Graves, P.M. & Curtis, C.F. 1982. Susceptibility of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *Plasmodium falciparum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76: 633-639.
- Grotendorst, C.A., Carter, R., Rosenberg, R. & Koontz, L. 1986. Complement effects on the infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* mosquitoes. I. Resistance of zygotes to the alternative pathway of complement *Journal of Immunology* 136: 4270-4274.
- Huff, C.G. 1929. The effects of selection upon susceptibility to bird malaria in *Culex pipiens* Linn. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 23: 427-442.
- Huff, C.G. 1930. Individual immunity and susceptibility of *Culex pipiens* to various species of bird malaria as studied by means of double infections feedings. *American Journal of Hygiene* 12: 424-441.
- Huff, C.G. 1931. The inheritance of natural immunity to *Plasmodium cathemerium* in two species of *Culex*. *Journal of Preventive Medicine* 5: 249-259.
- Ichimora, K., Kurihara, T., Arakawa, R., Kamimura, K. & Nakamura, M. 1989. Susceptibility of *Anopheles omori* to *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *Plasmodium falciparum*. *Japanese Journal of Sanitation and Zoology* 40: 341-343.
- Ketrangsee, S., Suvannadabba, S., Thimasarn, K., Prasittisuk, C. & Rooney, W. 1991. Malaria situation in Thailand with special reference to forest related malaria. In "Forest Malaria in Southeast Asia. Proceedings of an Informal Consulative Meeting, WHO/MRC, V.P. Sharma & A.V. Kondrashin, eds., New Delhi.
- Kilama, W.L. & Craig, Jr.G.B. 1969. Monofactorial inheritance of susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 63: 419-432.
- Killick-Kendrick, R. 1973. Parasitic protozoa of the blood of rodents I. The life-cycle and zoogeography of *Plasmodium berghei nigeriensis* subsp. nov. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 67: 261-277.
- Killick-Kendrick, R. 1978. Taxonomy, zoogeography and evolution. In "Rodent Malaria" (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds), pp 1-52. Academic Press, London.
- Klein, T.A., Harrison, B.A., Dixon, S.V. & Burge, J.R. 1991. Comparative susceptibility of Southeast Asian *Anopheles* mosquitoes to the simian malaria parasite *Plasmodium cynomolgi*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7: 481-487.
- Macdonald, W.W. 1967. The influence of genetic and other factors on vector susceptibility to parasites. In *Genetics of Insect Vectors of Disease*, eds J.W. Wright & R. Pal, Chapter 19, pp 567-584, Amsterdam: Elsevier.
- Ratcliffe, N.A. 1986. Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. *Symposium of Zoological Society of London* 56: 21-43.
- Rongsriyam, Y., Tipparatana, K., Pukdicharoen, A., Asvanich, A., Leemingsawat, S. & Surathin, K. 1989. Insecticide and vector potential of *Anopheles maculatus* group and their bionomic significance. *Third Conference on Malaria Research, Thailand*, 18-20 October, p. 177-178.
- Rosenberg, R. 1985. Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary glands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 687-691.
- Sattabonkhot, J., Maneechai, N. & Rosenberg, R. 1994. Gametocyte density and infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. The 4th Conference on Malaria Research in Thailand, Chiangrai, 8-10 February.
- Sluiters, J.F., Visser, P.E. & van der Kaay, H.J. 1986. The establishment of *Plasmodium berghei* in mosquitoes of a refractory and susceptible line of *Anopheles atroparvus*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 72: 313-322.

- Somboon, P., Suwonkerd, W. & Lines, J.D. (1994). Susceptibility of Thai zoophilic anophelines and suspected malaria vectors to local strains of human malaria parasites. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 25: 766-770.
- Thathy, V., Severson, D.W. & Christensen, B.M. 1994. Reinterpretation of the genetics of susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. *Journal of Parasitology* 80: 705-712.
- van der Kaay, H.J. & Boorsma, L. 1977. A susceptible and refractive strain of *Anopheles atroparvus* to infection with *Plasmodium berghei*. *Acta Leidensiae* 45: 13-19.
- Vernick, K.D., Collins, F.H. & Gwadz, R.W. 1989. A general system of resistance to malaria infection in *Anopheles gambiae* controlled by two main genetic loci. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 585-592.
- Vernick, K.D., Fujioka, H., Seeley, D.C., Tandler, B., Aikawa, M. & Miller, L.H. 1995. *Plasmodium gallinaceum*: A refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Experimental Parasitology* 80: 583-595.
- Wakelin, D. 1978. Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection. *Advance in Parasitology* 16: 219-308.
- Ward, R.A. 1963. Genetic aspects of the susceptibility of mosquitoes to malarial infection. *Experimental Parasitology* 13: 328-341.
- Warren, M. & Collins, W.E. 1981. Vector-parasite interactions and the epidemiology of malaria. *Parasitological Topics*, ed. E.U. Canning, pp. 266-274. London Society for Protozoology.
- Wilkinson, R.N., Gould, D.J. & Boonyakanist, A. 1972. Comparative susceptibility of *Anopheles balabacensis* and *Anopheles minimus* to naturally occurring *Plasmodium cynomolgi* in central Thailand. *Proceeding of Helminthological Society of Washington* 39: 423-427.
- Wing, S.R., Young, M.D., Mitchell, S.E. & Seawright, J.A. 1985. Comparative susceptibilities of *Anopheles quadrimaculatus* mutants to *Plasmodium yoelii*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1: 511-513.

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นายปรัชญา สมบูรณ์
2. ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
3. สถานที่ทำงาน ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ 053 945342-5 โทรสาร 053 217144
e-mail: mdpri001@chiangmai.ac.th
4. การศึกษา
 - พ.ศ. 2523 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - พ.ศ. 2527 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อายุรศาสตร์เขตร้อน)
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
 - พ.ศ. 2536 Ph.D. (Medical Entomology)
London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK.