บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

โปรโตซัวสกุล *พลาสโมเดียม (Plasmodium)* เป็นปรสิตเซลล์เดียวที่มีชื่อสามัญเรียกว่า เชื้อมาลาเรีย (malarial parasite) จัดอยู่ในไฟลัม Apicomplexa มีองค์ประกอบหลักภายในเซลล์ที่สำคัญที่สุดอยู่ทางส่วนหน้าของเชื้อ เรียกว่า apical complex ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยๆ คือ conoid, polar ring, rhoptry, microneme และ microtubule เว้นแต่บางระยะของเชื้อจะไม่มีส่วนของ conoid (Aikawa, 1971) การเพิ่มจำนวนของเชื้อเกิดขึ้นได้ทั้งแบบที่อาศัยเพศและแบบที่ไม่อาศัยเพศ วงชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อ แบ่งเป็น 2 ช่วง (phase) คือ ช่วงที่เชื้อมีการเจริญอยู่ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและช่วงที่มีการเจริญอยู่ในยุงนำโรค การเจริญเติบโตของเชื้อในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังประกอบด้วยกระบวนการสร้าง merozoite ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเซลล์ตับหรือเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และในเซลล์เม็ดเลือดแดง และกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นการเจริญเติบโตแบบอาศัยเพศ (gametogony) โดยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gametocyte) และเพศเมีย (female gametocyte) จะแยกจากกัน สำหรับกระบวนการผสมพันธุ์แบบมีเพศของเชื้อเกิดขึ้นได้ครั้งเดียวในยุง เชื้อที่ผสมพันธุ์แล้ว (zygote) สามารถเคลื่อนที่ได้ เข้าไปฝังตัวและแบ่งตัวอยู่ในเซลล์ของกระเพาะยุง จนกระทั่งกลายเป็นระยะ sporozoite จึงออกมานอกเซลล์ เป็นระยะติดโรคอยู่ในน้ำลายของยุง และถ่ายทอดจากไปยังสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Levine *et al.,* 1980)

2.1 การจำแนกชั้นของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียสกุล *พลาสโมเดียม* (*Plasmodium*) เป็นปรสิตสัตว์เซลล์เดียว (Protozoa) ที่จัดอยู่ในคิงดอม Protista ไฟลัม Apicomplexa การจำแนกชั้นตามหลักทางอนุกรมวิธานที่ศึกษาจากลักษณะรูปร่างของเชื้อสกุลนี้ แบ่งได้ คือ (Levine *et al.,* 1980 ; Levine, 1985)

Kingdom Protista
Subkingdom Protozoa
Phylum Apicomplexa
Class Sporozoa
Subclass Coccidia
Order Eucoccidiida
Suborder Haemosporina
Family Plasmodiidae
Genus *Plasmodium*

2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย

การจำแนกเชื้อมาลาเรียในคนและสัตว์สามารถศึกษาได้หลายรูปแบบ วิธีที่นิยมได้แก่ การจำแนกชนิดของเชื้อทางสัณฐานวิทยา (morphology) (Garnham,1966) และวิธีการจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุล (Waters *et al.*, 1991) ปัจจุบันวิธีทั่วไปที่ใช้กันแพร่หลายทั่วโลก คือ การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา ขึ้นกับลักษณะของเชื้อที่สังเกตพบในแต่ละระยะ เช่น ขนาด รูปร่าง และลักษณะของเชื้อระยะ schizont ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง จำนวน merozoite ที่อยู่ภายใน 1 schizont ลักษณะการกระจายของเม็ดสีมาลาเรีย (malarial pigment) รูปร่างลักษณะและขนาดของเชื้อระยะ gametocytes และความจำเพาะของเชื้อที่อาศัยอยู่ในโฮสต์ที่มีกระดูกสันหลัง (Garnham, 1966 ; Soulsby, 1982 ; Levine, 1985 ; Laird, 1998) ในปี ค.ศ.1966 Garnham ได้จำแนกเชื้อมาลาเรียสกุล *พลาสโมเดียม* จากสัณฐานวิทยา โดยแบ่งออกเป็น 9 สกุลย่อย (subgenera) คือ *Plasmodium, Vinckeia, Laverania, Haemamoeba, Giovannolaia, Novyella, Huffia, Sauramoeba* และ *Carinai* ที่ประกอบด้วยเชื้อมาลาเรียชนิดต่างๆ จำนวนมากกว่า 90 ชนิด เชื้อมาลาเรียที่พบในคนมี 2 สกุลย่อย คือ *Plasmodium* และ *Laverania* และแบ่งเป็น 4 ชนิด คือ *P. falciparum, P. vivax, P. malariae* และ *P. ovale* ส่วนในสัตว์ปีกมี 4 สกุลย่อย คือ *Haemamoeba, Giovannolaia, Novyella* และ *Huffia* และทั้งหมดแบ่งเป็น 41 ชนิด (Levine, 1985) จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีกในประเทศไทย ได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อในนกต่างๆจำนวน 40 ชนิด โดยพบเชื้อมาลาเรียรวมทั้งสิ้น 10 ชนิด คือ *P. relictum, P. mutatinum, P. giovannolai, P. fallax, P. circumflexum, P. polare, P. dissanaikei , P. vaughani, P. nucleophilum* และ *P. rouxi* (Laird, 1998) สำหรับ *P. gallinaceum* มีรายงานครั้งแรกในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 เป็นต้นมา เชื้อชนิดนี้ก่อโรคสูงโดยเฉพาะในไก่เลี้ยงในฟาร์มระบบเปิด ปัจจุบันถือเป็นโรคที่มีการระบาดอย่างแพร่หลายและรุนแรงทั้งในไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่พันธุ์ ทั่วประเทศ ที่ก่อให้เกิดปัญหาความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ค่อนข้างสูง (ทัศนีย์และคณะ, 2538 ; ชัยศิริ และคณะ, 2539 ; ทวี, 2542 ; ดำเนิน, 2544)

โดยทั่วไป การจำแนกชนิดของเชื้อมักศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทางปรสิตวิทยา นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้เกิดความสับสนได้ค่อนข้างง่าย ดังนั้นการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่วินิจฉัยเชื้อได้ถูกต้องแม่นยำ และมีความไวสูง ปัจจุบันจึงมีผู้นิยมใช้วิธีนี้มากขึ้นเรื่อยๆ โดยการใช้ลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่ต้องการศึกษานำมาเปรียบเทียบกันเช่น cytochrome b (Susan *et al.*, 1989) และที่นิยมมากคือ Ribosomal RNA ตัวอย่างเช่น small subunit ribosomal RNA (18sRNA) เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มและหาความสัมพันธ์ด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Waters *et al.*, 1991 ; Escalante and Ayala, 1994 ; ทวี และคณะ, 2543)

2.3 สัณฐานวิทยาของเชื้อมาลาเรียไก่ *P. gallinaceum*

เชื้อมาลาเรียทุกชนิดเป็นปรสิตที่ต้องอาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ แต่มีความแตกต่างกันในรายละเอียดที่เกี่ยวกับลักษณะรูปร่างและขนาดของเชื้อ ชนิดของเซลล์ที่เชื้อเข้าไปเจริญเติบโต และรูปแบบของเชื้อระยะต่างๆ (Peters, 1970) โดยทั่วไปลักษณะของเชื้อมาลาเรีย *P. gallinaceum* ขณะที่มีการพัฒนา เจริญเติบโตและแบ่งตัวอยู่ภายในตัวไก่นั้น แบ่งออกได้กว้างๆ เป็น 3 ระยะ คือ ระยะแรก เชื้อมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวอยู่ในเซลล์บริเวณผิวหนังที่ถูกยุงกัด (Primary exoerythrocytic stage) ระยะที่สอง เชื้อมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวอยู่ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของเนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย (Secondary exoerythrocytic stage) และระยะที่สาม เชื้อมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวอยู่ในเม็ดเลือดแดง (Erythrocytic stage)

ลักษณะรูปร่างของเชื้อในช่วงเริ่มต้นหลังจากที่ยุงปล่อยเชื้อเข้าไป เชื้อระยะ sporozoite จากยุงที่เข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมของ macrophage และ fibroblast ของผิวหนังบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับตำแหน่งที่ยุงดูดเลือด มีการเจริญเติบโตและนิวเคลียสแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบไม่มีเพศกลายเป็นเชื้อระยะ schizont และเชื้อที่เจริญเต็มที่อยู่ภายใน schizont เรียกว่า cryptozoites หรือ cryptozoitic merozoits มีจำนวน 100-200 ตัว และ cryptozoites ที่แตกออกจากเซลล์เดิม เมื่อเข้าสู่เซลล์ใหม่ที่อยู่ใกล้เคียงมีการเจริญเติบโตเป็นระยะ schizont รอบที่ 2 เชื้อซึ่งเจริญเต็มที่ที่อยู่ภายในเรียกว่า metacryptozoitic merozoits เป็นจำนวนมากมาย schizont และ cryptozoites ที่ได้จากการแบ่งตัวทั้ง 2 ครั้งมีขนาดเล็กมาก ตรวจพบได้ค่อนข้างยากมาก (Garnham, 1966) สำหรับในช่วงที่สอง เชื้อระยะ metacryptozoitic merozoits ที่มีการกระจายไปทั่วร่างกาย จะเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (endothelial cells) ของอวัยวะภายในทั่วร่างกาย เช่น ตับ ม้าม ปอด สมอง กล้ามเนื้อ เป็นต้น มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวแบบไม่มีเพศ พัฒนาเป็นเชื้อระยะ schizont มีลักษณะรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน ภายในประกอบด้วยเชื้อระยะ merozoits ขนาดประมาณ 0.45 ไมครอน ลักษณะรูปร่างรี ตรงกลางทึบ โดยทั่วไปเชื้อระยะ schizont และ merozoits ที่อยู่ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสามารถตรวจพบได้ง่ายเมื่อศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Garnham, 1966 ; Laird, 1998)

ในช่วงที่ 3 เชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง มีรูปร่างลักษณะหลายรูปแบบ ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเชื้อที่แบ่งเป็นแบบไม่มีเพศและแบบมีเพศ (Garnham, 1966) เชื้อที่มีการเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศ ได้แก่ ระยะ trophozoite, schizonts และ merozoits สำหรับ trophozoite เป็นระยะเริ่มต้นหลังจากเชื้อระยะ merozoits เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง มีขนาดเล็กประมาณ 1 ไมครอน รูปร่างรี เมื่อศึกษาจากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า พบว่านิวเคลียสของเชื้อติดสีม่วงแดง นิวเคลียสมักมีขนาดเล็กอยู่บริเวณขอบของไซโตพลาสซึม และไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าจาง ตรงกลางมีลักษณะทึบ ไม่มีลักษณะของวงแหวน แตกต่างจากลักษณะของเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น ตำแหน่งที่พบเชื้อระยะนี้ คือ บริเวณที่ชิดกับนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงทางด้านข้าง ด้านหัว หรืออาจเป็นด้านท้าย (Garnham, 1966 ; Laird, 1998) เชื้อระยะ trophozoite ที่เจริญเติบ

โตขึ้น ขนาดขยายมากขึ้นกว่าเดิม รูปร่างลักษณะไม่แน่นอน คล้ายอมีบา (amoeboid shape) จึงมักเรียกตามลักษณะที่เห็นว่า amoeboid trophozoite ในระยะนี้เริ่มสังเกตพบเม็ดสีของมาลาเรีย (malarial pigment) สีเหลืองทองปนน้ำตาลเข้ม จำนวน 4-5 เม็ด ซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อมาลาเรีย ส่วนระยะ schizont เป็นระยะที่เจริญมาจาก amoeboid trophozoite เมื่อมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตเต็มที่ มีขนาดประมาณ 8 ไมครอน ลักษณะเด่นของเชื้อระยะนี้คือ malarial pigment มีสีเหลืองทองปนน้ำตาลเข้มเกือบดำ พบอยู่เป็นกระจุกตรงกลาง และมี merozoites ขนาด 1 ไมครอน รูปร่างลักษณะรี ไซโตพลาสซึมติดฟ้า สีนิวเคลียสติดสีแดงเข้ม จำนวน 16-20 ตัว กระจายอยู่โดยรอบ (Garnham, 1966) และบางครั้งอาจพบ schizont ที่มี merozoites ตั้งแต่ 8-30 ตัว (Soulsby, 1982)

สำหรับเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่มีการเจริญเติบโตแบบมีเพศอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง มี 2 ลักษณะ คือ trophozoite และ gametocyte เชื้อระยะ trophozoite ขณะแรกเริ่มมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่กล่าวข้างต้น เมื่อมีการพัฒนาเต็มที่กลายเป็นเชื้อแบบมีเพศหรือ gametocyte มีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ คือ เชื้อเพศผู้ (microgametocyte) และ เชื้อเพศเมีย (macrogametocyte) โดยรูปร่างและขนาดของเชื้อทั้ง 2 เพศคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ขนาด 8-9 ไมครอน รูปร่างค่อนข้างกลม หรือรี มักโอบล้อม nucleus ของเม็ดเลือดแดงไก่ และบางครั้งเชื้ออาจเบียด nucleus ของเม็ดเลือดแดงทำให้ตำแหน่งผิดไปจากปกติ ส่วนลักษณะที่แตกต่างกัน คือ เชื้อเพศผู้ มีไซโตพลาสซึมติดสีชมพูปนฟ้าจางๆ นิวเคลียสมักกระจายไปทั่ว สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน ติดสีชมพู และเม็ดสี malarial pigment ที่กระจายอยู่โดยทั่ว มีสีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม ขนาดแตกต่างกันหลายๆขนาด ส่วนเชื้อเพศเมียมีไซโตพลาสซึมติดสีฟ้าอมเทาเข้ม นิวเคลียสมักรวมตัวเป็นกระจุก malarial pigment กระจายอยู่โดยทั่ว และแต่ละเม็ดมีขนาดใกล้เคียงกัน

2.4 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่ชนิด *P. gallinaceum*

โดยทั่วไปวงชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในไก่คล้ายคลึงกับที่พบในคนและสัตว์อื่น กล่าวคือ ต้องการโฮสต์ 2 ชนิด ได้แก่ โฮสต์ซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง และยุงซึ่งเป็นโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (รูปที่ 2.1) สำหรับโฮสต์ที่มีกระดูกสันหลังที่เคยมีรายงานว่าพบเชื้อมาลาเรีย คือ คน ไพรเมท สัตว์แทะ สัตว์เลื้อยคลาน และ สัตว์ปีก (Garnham, 1966) ส่วนโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง คือ ยุง นั้น พบว่ายุงที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียมาสู่คนที่สำคัญได้แก่ ยุงก้นปล่อง *(Anopheles spp.)* (Knell, 1991) และยุงที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียมาสู่สัตว์ปีกมีหลายสกุลได้แก่ ยุงบ้านหรือยุงรำคาญ *(Culex spp.)* ยุงลาย *(Aedes spp.)* ยุงก้นปล่อง *(Anopheles spp.)* และยุงเสือ *(Mansonia spp.)* เป็นต้น (Huff, 1965 ; Garnham, 1966 ; สุวรรณี และคณะ, 2543b)

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกเป็นช่วงที่เชื้ออาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดง(exo-erythrocytic phase) และช่วงที่ 2 เป็นช่วงที่เชื้ออาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic

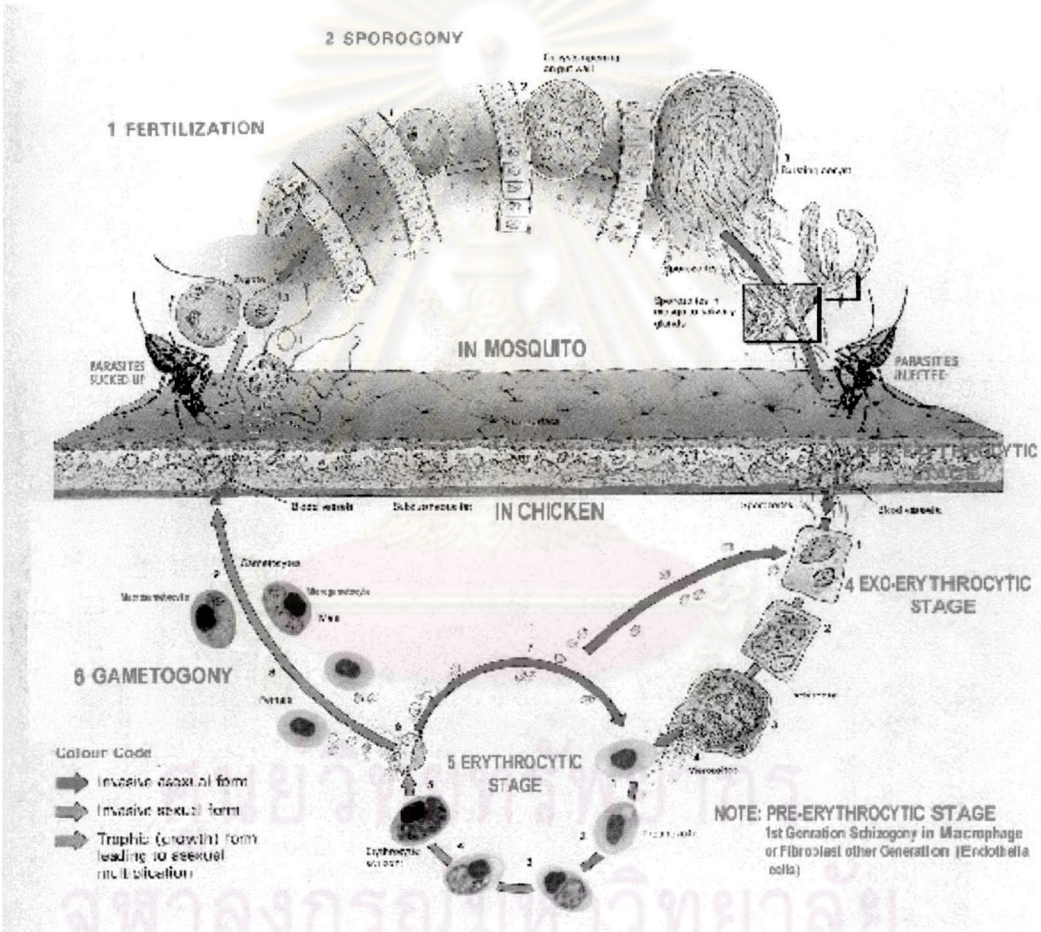
phase) โดยช่วงที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น เชื้อมีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวเป็นแบบไม่มีเพศ มีรูปแบบของการพัฒนาที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. gallinaceum* เรียกว่า Type II – gallinaceum (Peters, 1970) แบ่งได้เป็น 2 ระยะ (stage) คือ ระยะเริ่มต้น เชื้ออาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ที่บริเวณผิวหนังนอกเซลล์เม็ดเลือดแดง (Primary exo-erythrocytic stage) และระยะรอง เชื้ออาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของเนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย (secondary exo-erythrocytic stage) ในช่วงที่เชื้ออาศัยอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocytic stage) การพัฒนาของเชื้อ *P. gallinaceum* มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ทั้งแบบไม่มีเพศและแบบมีเพศ ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อในยุงที่เป็นพาหะมีการเจริญเติบโตเพียงระยะเดียว คือ Sporogony (Garnham, 1966 ; McGhee, 1988)

ก. การเจริญเติบโตของ *P. gallinaceum* ในไก่

เริ่มต้นจากยุงปล่อยเชื้อระยะ sporozoites ที่ปนมากับน้ำลายในขณะที่ดูดเลือดไก่ เชื้อจะเข้าไปอาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของ macrophage และ fibroblast ของผิวหนังในบริเวณที่ยุงกัดและดูดเลือด โดยครั้งแรกมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวแบบไม่มีเพศเป็นระยะ schizont ซึ่งภายในประกอบด้วย cryptozoites จำนวน 100-200 ตัว ใช้เวลา 36 ชั่วโมง และ cryptozoites ที่แตกออกมาจะเข้าสู่แมคโครฟาจและไฟโบรบลาสเซลล์ใหม่เป็นครั้งที่ 2 เจริญเติบโตและแบ่งตัวแบบไม่มีเพศเป็นระยะ schizont อีกครั้ง ซึ่งขณะเจริญเต็มที่ ภายในประกอบด้วยเชื้อระยะ metacryptozoites จำนวนเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิม และเมื่อแตกกระจายออกไปทั่วร่างกาย จะเข้าไปอาศัยและแบ่งตัวแบบไม่มีเพศอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ประเภท fixed reticuloendothelial cells โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของอวัยวะภายใน เช่น ตับ ม้าม สมอง กล้ามเนื้อ และอื่นๆ พัฒนาเป็นระยะ schizonts และ merozoites ตามลำดับ หลังจากนั้น merozoites ที่ออกมา ส่วนหนึ่งจะเข้าไปอยู่ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเจริญเติบโตและพัฒนาเป็น merozoites ได้เช่นเดิมต่อๆไปอีก มีเพียงบางส่วนของ merozoites ที่จะเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง (Garnham, 1966)

ระยะแรกเริ่มที่ merozoites เข้าไปในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ เชื้อมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นระยะ trophozoite และต่อมาเจริญเติบโตเป็น amoeboid trophozoite ซึ่งในระยะนี้เชื้อมีการสร้าง aspartic และ cysteine enzyme เพื่อย่อยสลายฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงให้กลายเป็นโกลบิน (globin) และ ฮีม (heme) โดยโกลบินเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเชื้อมาลาเรีย ขณะที่ฮีมซึ่งเป็นส่วนที่มีความเป็นพิษต่อเชื้อสูงนั้นจะถูกทำลายด้วยขบวนการ polymerization ทำให้เกิดผลึกของ hemozoin หรือ malarial pigment จำนวนหนึ่ง สะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของเชื้อ (Sullivan *et al.*, 1996 ; Tripathi and Tekwani, 1999) จากนั้นเชื้อจึงมีการแบ่งตัวแบบไม่มีเพศเป็นระยะ schizont และเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ (mature schizont) ภายในจะประกอบด้วย merozoite จำนวน 8-30 merozoite (Soulsby, 1982) และตรงกลางมีกระจุกของ malarial

pigment การพัฒนาของเชื้อมาลาเรียไก่ตั้งแต่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงจนกระทั่งเจริญเติบโตเป็นระยะ merozoite อย่างสม บูรณ์ใช้เวลาเพียง 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเม็ดเลือดแดงจะแตกออก เชื้อระยะ merozoite กระจายออกไปตามกระแสเลือด และเข้าสู่เซลล์ใหม่ต่อไป โดย merozoite บางส่วนอาจกลับเข้าสู่ endothelial cell และอีกส่วนหนึ่งอาจย้อนเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศเช่นเดิม แต่มีเพียงจำนวนเล็กน้อยบางส่วนเท่านั้นที่เมื่อเข้าไปในเม็ดเลือดแดงแล้วจะมีการเจริญเติบโตแบบมีเพศ (gametogony) และเป็นระยะสุดท้ายของเชื้อที่สามารถอยู่ในเม็ดเลือดแดง ซึ่งในระยะนี้ merozoite จำนวน 1 ตัว สามารถเจริญเติบโตไปเป็น 1 macrogametocyte หรือ 1 microgametocyte เท่านั้น



รูปที่ 2.1 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่ *P. gallinaceum* (Knell, 1991 ; ทวี, 2543 ดัดแปลงบางส่วนของรูปจาก Knell, 1991)

ข. การเจริญเติบโตของเชื้อ *P. gallinaceum* ในยุง

เมื่อยุงนำโรคดูดเลือดไก่ที่มีเชื้อมาลาเรียระยะที่มีเพศเข้าไป ภายในระยะเวลา 10-15 นาที เชื้อที่อยู่ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของยุงจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดย macrogametocyte 1 ตัว

สามารถพัฒนาไปเป็น macrogamete 1 ตัว เท่านั้น ในขณะที่ microgametocyte 1 ตัว มีการพัฒนาไปเป็น microgamete รูปแส้ จำนวน 8 ตัว และแต่ละตัวสามารถเข้าไปผสมพันธุ์กับ macrogamete 1 ตัว ภายหลังการผสมพันธุ์ zygote ที่เกิดขึ้นสามารถเคลื่อนที่ได้ จึงเรียกว่า ookinete โดยเคลื่อนที่ผ่านผนังด้านในของกระเพาะอาหารยุง ออกไปฝังตัวอยู่ในเซลล์บุผนังด้านนอก เจริญเติบโตเป็น oocyst และมีการแบ่งตัวแบบ sporogony เมื่อ oocyst เจริญเติบโตเต็มที่ภายในจะประกอบด้วย sporozoites จำนวนมาก และหลังจากแตกออก เชื้อระยะ sporozoites ซึ่งเป็นระยะติดโรคมีการกระจายไปทั่ว และเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำลายเป็นส่วนใหญ่ เมื่อยุงไปดูดเลือดไก่ เชื้อระยะ sporozoites ที่อยู่ในน้ำลายจะถูกปล่อยออกไปสู่ไก่ และมีการเจริญเติบโตดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นต่อไป (Garnham, 1966 ; Soulsby, 1982)

อาการทางคลินิก

ไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* อาการที่ปรากฏมีความผันแปรสูง ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ แสดงอาการเล็กน้อย และเรื้อรัง มีอัตราการตายต่ำ จนถึงแสดงอาการเฉียบพลัน รุนแรง และมีอัตราการตายสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และขนาดของไก่ และ strain ของเชื้อ (Greenberg and Trembley, 1953 ; Garnham, 1966) ไก่พื้นเมืองมักเป็นโรคอย่างอ่อน ไก่สายพันธุ์จากต่างประเทศมีความไวต่อโรคสูง ไก่ที่ป่วยมักมีอุณหภูมิร่างกายไม่แน่นอน อาจสูงขึ้นกว่าปกติและลดต่ำลงเป็นช่วงๆ มีภาวะเลือดจาง และอัตราการตายอาจสูงถึง 80% (Soulsby, 1982 ; Levine, 1985) ในรายที่ติดเชื้อมาลาเรียและเป็นโรคแบบเฉียบพลันมักจะตายก่อนที่จะปรากฏอาการชัดเจน บางรายอาจพบภาวะโลหิตจางเกิดขึ้นอย่างรุนแรง และเกิดสภาพของการขาดออกซิเจนเกิดขึ้น (Kemp, 1978) อัตราการตายอาจสูงถึง 90% นอกจากนี้บางรายแสดงอาการชักซึ่งอาจเกิดจากมีเชื้อจำนวนมากเจริญเติบโตและแบ่งตัวอยู่ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดฝอยที่สมอง เป็นสาเหตุทำให้เส้นเลือดถูกอุดตัน ขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง จนกระทั่งระบบประสาทส่วนกลางมีการทำงานผิดปกติ (Garnham, 1966 ; Springer, 1997) ไก่ที่เป็นโรคแบบเรื้อรังส่วนมากมีอุจจาระสีเขียว หน้าและหงอนซีด ซูบผอม ซึม ไม่กินอาหาร บางครั้งอาจเป็นอัมพาตและชักก่อนตาย จากรายงานการศึกษาในประเทศไทย อาการทางคลินิกที่พบในไก่เนื้อ ได้แก่ อุจจาระเขียว ซึม กินอาหารลดลง เบื่ออาหาร ขาไม่มีแรง หายใจผิดปกติ เลือดจางรุนแรง ท้องมาน บางตัวบวมน้ำใต้ผิวหนัง และตาย อัตราการป่วย 24.91% อัตราการตาย 29.22% (ทัศนีย์ และคณะ, 2538 ; ชัยศิริ และคณะ, 2539) ไก่ไข่ที่ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมีอัตราการไข่ลดลง ขนาดไข่เล็กลง หงอนซีด อุจจาระเขียว กินอาหารลดลง ตัวร้อน ขาไม่มีแรง อัตราการตายเพิ่มขึ้น (ปิยนุช, 2542)

อัตราการตายของไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ผันแปรตามขนาดและอายุ (Garnham, 1966) ลูกไก่ขนาดเล็กน้ำหนักต่ำกว่า 250 กรัม อัตราการตายสูง 100% ไก่ที่มีน้ำหนัก 300-350 กรัม อัตราการตาย 87% ในขณะที่ไก่ใหญ่น้ำหนักตัว 1,000 กรัม อัตราการตายเพียง 45% ไก่อายุน้อยมีอัตราการติดโรคและอัตราการตายสูงกว่าไก่ที่มีขนาดใหญ่หรือไก่ที่โตเต็มวัย นอกจากนี้ไก่ที่อายุมากเมื่อมีการ

ติดเชื้อตามธรรมชาติหรือจากการทดลอง การก่อโรคมักไม่รุนแรง ไม่แสดงอาการป่วยหรือตาย ไก่มักมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง เชื้อสามารถแฝงตัวอยู่ในระดับต่ำๆได้เป็นเวลานานหลายปี

นอกจากอายุของไก่แล้ว สายพันธุ์ของไก่เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อความไวในการติดโรค โดยปกติไก่ป่าซึ่งเป็นโฮสต์ธรรมชาติมักมีความทนทานต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ได้ค่อนข้างสูง ในขณะที่ไก่เลี้ยงมีความไวต่อเชื้อสูง สัตว์มีโอกาสป่วยเป็นโรคค่อนข้างสูงและรุนแรง โดยเฉพาะในทวีปเอเชียพบว่าการระบาดของโรคในไก่เลี้ยงเกิดขึ้นได้ง่ายและอัตราการตายสูง (Levine, 1985) ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคบางฟาร์มไก่ไข่ที่มีอายุ 5 เดือน มีอัตราการตายสูงถึง 20% (ปิยนุช, 2541) วินัย และคณะ (2542) พบว่าไก่เนื้อพันธุ์สยาม-ญี่ปุ่น ตั้งแต่ อายุ 1 - 18 เดือน ที่เลี้ยงในฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดขอนแก่น อัตราการติดเชื้อ 65% และตาย 18% สำหรับไก่ไข่ที่ติดเชื้อนั้น อัตราการไข่ลดลง 10-30% ไข่มีขนาดเล็ก เปลือกบาง บุบและแตกง่าย ไก่กินอาหารน้อยลง 21% โลหิตจาง (หงอนซีด) 56% อุจจาระมีสีเขียว 53% หน้าบวม 13% ตัวร้อนผิดปกติ 10% ขาไม่มีแรง 8% และมีการตายสูงผิดปกติ

ดำเนิน (2544) ได้ทดลองฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่เนื้อพันธุ์ Cobb Vantress คละเพศ อายุ 10 20 และ 30 วัน พบว่าอัตราการติดเชื้อ 22%, 16% และ 34% ตามลำดับ และอัตราการตาย 20%, 12% และ 18% ตามลำดับ ไก่ที่ได้รับเชื้อปริมาณมาก 1.0 x 10^5 infected rbc เกิดภาวะโลหิตจาง 40-60% และค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความผันแปรสูง ไก่ที่ตายทุกตัวพบว่าก่อนตายมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นอยู่ระหว่าง 15.0-24.0% พัชรี (2545) ใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าหลอดเลือดดำไก่เนื้อพันธุ์ Arbor Acres คละเพศ อายุ 10 วัน พบอัตราการติดเชื้อสูง 100% และอัตราการตาย 73.33% ไก่ที่ได้รับเชื้อ 1 x 10^6 infected rbc มีอัตราการติดเชื้อ 100% และตาย 90% ภาวะโลหิตจาง 22.83% ปิยะนันท์ (2542) ทดลองใช้เชื้อ *P. gallinaceum* 5 x 10^4 infected rbc ฉีดเข้าใต้ผิวหนังไก่ไข่เพศผู้อายุ 2 สัปดาห์ พบว่าไก่มีอัตราการติดโรค 100% และตาย 66.67% เริ่มตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ในวันที่ 4 และระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงสุดในวันที่ 14 ของการทดลอง ไก่ที่ได้รับเชื้อแสดงอาการซึม 100% อุจจาระมีสีเขียว 67% และ เลือดจาง 100% ในขณะที่ สุวรรณี และคณะ (2543a) ทดลองใช้เชื้อ 1 – 6 x 10^5 infected rbc ฉีดเข้าเส้นเลือดไก่ไข่เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าไก่ที่ได้รับเชื้อปริมาณมากตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้เร็วกว่าไก่ที่ได้รับเชื้อปริมาณต่ำกว่า ไก่ที่รับเชื้อ 1 infected rbc อัตราการติดเชื้อ 33.33% ไก่ที่ได้รับเชื้อมากขึ้นมีอัตราการติดเชื้อสูงและตายสูงขึ้น ผันแปรตามปริมาณเชื้อที่ได้รับและระดับเชื้อในกระแสเลือด เช่นเดียวกับการเกิดภาวะโลหิตจางของไก่ทดลอง

Greenberg และ Trembley (1953) ได้รายงานว่าเชื้อมาลาเรียไก่ *P. gallinaceum* มี 2 strain คือ strain ที่รุนแรง และ strain ที่อ่อนแรง ไก่ที่ติดเชื้อ strain ที่รุนแรง สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ฉับพลัน ไก่อาจจะตายขณะที่ระดับเชื้อขึ้นสูงหรือลดต่ำ หรืออาจตายในขณะที่เชื้อเจริญเติบโตอยู่ใน endothelial cell ก็ได้ สำหรับไก่ที่ได้รับเชื้อ strain ที่อ่อนแรง ระดับเชื้อปรากฏในกระแสเลือดค่อนข้างต่ำมาก และการเจริญเติบโตของเชื้อใน endothelial cell รอบที่ 2 เกิดขึ้นน้อยหรืออาจไม่

เกิดขึ้น โดยไก่ที่ติดเชื้อมีอัตรารอดสูงถึง 80 % และอัตราการติดเชื้อขึ้นอยู่กับอายุของไก่และปริมาณของเชื้อที่ไก่ได้รับ นอกจากนี้ สัตว์ปีกที่ได้รับการฉีดเชื้อระยะต่างๆในเลือดมีความไวต่อเชื้อสูงกว่าการติดเชื้อระยะ sporozoits จากยุงขณะที่ดูดเลือด และไก่เพศเมียพบเชื้อในกระแสเลือดสูงกว่าเพศผู้ (Levine, 1985)

2.6 พยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยา

ไก่ป่วยที่ตายด้วยโรคมาลาเรีย ซากมีลักษณะแห้งน้ำ ซีดจาง รอยโรคที่ปรากฏชัด คือ อวัยวะภายในต่างๆมักมีเลือดหรือน้ำคั่ง ตับและม้ามขนาดใหญ่และมีสีเข้มดำคล้ำเนื่องจากการสะสมของเม็ดสีของมาลาเรียจำนวนมาก ม้ามอาจมีขนาดใหญ่มากขึ้นกว่าเดิมถึง 20 เท่า อาจมีของเหลวคั่งอยู่ในถุงเยื่อหุ้มหัวใจ ไก่ที่รอดชีวิตภายหลังการติดเชื้อ ต่อมน้ำเหลืองมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีน้ำคั่ง (McGhee, 1988) สอดคล้องกับรายงานของปิยนันท์ (2542) ที่ศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของไก่ไข่อายุ 2 สัปดาห์ ในวันที่ 16 หลังจากที่ได้รับเชื้อปริมาณ 5 x 10^4 infected rbc ฉีดเข้าใต้หนัง พบว่าม้ามและตับมีสีดำคล้ำ 100% ม้ามขยายใหญ่ 100% ถุงหุ้มหัวใจมีของเหลวคั่ง 100% และไตบวมน้ำ 66.67% ทัศนีย์ และคณะ (2539) รายงานลักษณะรอยโรคของไก่เนื้อในฟาร์มแห่งหนึ่งที่ป่วยและตายด้วยโรคมาลาเรียมีตับและม้ามขยายใหญ่ สมองมีเลือดคั่ง เช่นเดียวกับ วินัย และคณะ (2542) พบว่าตับและม้ามมีขนาดใหญ่ เลือดคั่งที่สมอง และมีจุดเลือดออกที่กล้ามเนื้อหน้าอกของซากไก่บางตัว

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เนื้อตับมีลักษณะของ centrilobular degeneration และ hemosiderosis ส่วนในม้ามเกิด hyperplasia ที่บริเวณ red pulp และมี hemosiderosis และเส้นเลือดฝอยที่สมองบางแห่งพบว่าถูกอุดตันด้วยเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (ทัศนีย์ และคณะ, 2539) ในขณะที่ปิยะนันท์ (2542) รายงานว่าไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* 5 x 10^4 infected rbc โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เนื้อเยื่อบริเวณตับและม้าม พบมี malarial pigment กระจายอยู่ทั่วอวัยวะต่างๆ และพบเชื้อระยะ exoerythrocytic schizonts เป็นจำนวนมากอยู่ภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของม้าม ตับ ปอด ไต และสมอง

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในไก่ มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. gallinaceum* 2 ระยะ คือ ระยะที่เจริญอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง และระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดในเซลล์เยื่อบุเส้นเลือดฝอยที่ไปเลี้ยงสมอง ไก่ที่มีภาวะโลหิตจางมักเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดแดงถูกทำลายเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีผลมาจากการแบ่งตัวและขยายจำนวนของเชื้อที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อเซลล์แตกออก เชื้อระยะ merozoite ที่ออกมาจะเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่อย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อถูกทำลายโดยตรงเป็นจำนวนมากและต่อเนื่อง เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติที่ไม่ได้ติดเชื้อบางส่วนจะมีความเปราะบาง แตกง่ายและแตกเร็ว อายุสั้นกว่าปกติ (Swann and Kreier 1973) นอกจากนี้กลไกที่สำคัญมากอีกประการหนึ่ง คือ ภาวะที่เกิดขึ้นจากระบบภูมิคุ้มโรคของตัวสัตว์ที่มีต่อเชื้อมาลาเรียซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอม เป็นผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติถูกเซลล์เม็ดเลือดขาวทำลายโดย

การจับกินด้วยกระบวนการ phagocytosis (Garnham, 1966) โดยทั่วไป ความรุนแรงของภาวะโลหิตจางของไก่ที่ติดเชื้อมักขึ้นกับอัตราการติดเชื้อในเซลล์เม็ดเลือดแดง และในกรณีที่ค่าของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ต่ำกว่า 20% สัตว์ป่วยมีโอกาสตายสูง (Van Riper *et al.*, 1994 ; Springer, 1997) นอกเหนือจากภาวะโลหิตจางที่เกิดขึ้นแล้ว พยาธิสภาพที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ระยะ exoerythrocytic schizonts ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เจริญและแบ่งตัวอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเป็นจำนวนมาก อาจทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดฝอยที่ไปหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อสมอง จึงปรากฏอาการอัมพาตเฉียบพลัน สมองมีลักษณะบวมน้ำ เลือดคั่ง มีจุดเลือดออกเล็กๆ และอาจมีเนื้อตายเกิดขึ้น (McGhee, 1988 ; Van Riper *et al.*, 1994 ; Springer, 1997)

2.7 การตรวจวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย ในเบื้องต้นสามารถศึกษาได้จากประวัติและอาการทางคลินิกร่วมกับการตรวจวินิจฉัยยืนยันทางห้องปฏิบัติการ ในประเทศไทยการวินิจฉัยโรคมาลาเรียไก่ในภาคสนามมักศึกษาจากประวัติการเกิดโรคในฟาร์ม แหล่งการระบาดของโรค การมียุงชุกชุม ร่วมกับศึกษาอาการทางคลินิกที่เป็นลักษณะเด่นของโรค คือ อุจจาระเขียว หน้าและหงอนซีด เลือดจาง ไก่ไข่มีอัตราการไข่ลด และขนาดไข่เล็กกว่าปกติ (ปิยนุช, 2542) นอกจากนี้ไก่ที่ตายเมื่อผ่าซากพบม้ามมีสีดำและขนาดใหญ่กว่าปกติ (ปิยนันท์, 2542) สำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ มีหลายวิธี อาทิเช่น การตรวจหาเชื้อโดยตรงด้วยวิธีทางปรสิตวิทยา (Makler *et al.*, 1998) การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา (Todorovic *et al.*, 1968 ; พัชรี, 2545) การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (Waters *et al.*, 1991 ; ทวี และคณะ, 2543) เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยเพื่อหาเชื้อโดยตรงด้วยวิธีทางปรสิตวิทยานั้น เป็นการศึกษาจากรูปร่างลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ตรวจหาเชื้อระยะที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงจากฟิล์มเลือดบางย้อมสี (ทัศนีย์ และคณะ, 2539 ; ปิยนุช และทัศนีย์, 2541 ; ปิยนันท์, 2542 ; ทวี, 2542 ; สุวรรณี และคณะ, 2543a) และตรวจหาเชื้อระยะไม่มีเพศในเนื้อเยื่อต่างๆจากชิ้นเนื้อที่ตัดและย้อมสีด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา สำหรับการตรวจหาเชื้อระยะที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงจากฟิล์มเลือดที่ย้อมด้วยสี Romanowsky เช่น สี Giemsa และ Wright-Giemsa นั้น เหมาะสมต่อการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ เป็นมาตรฐานที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรีย และใช้เป็นบรรทัดฐานในการวัดผลอัตราการติดเชื้อและระดับเชื้อที่ปรากฏในกระแสเลือด (Makler *et al.*, 1998, ทัศนีย์ และคณะ, 2539 ; ปิยนุช และทัศนีย์, 2541 ; ปิยนันท์, 2542 ; ทวี, 2542 ; สุวรรณี และคณะ, 2543a) รวมทั้งการประเมินประสิทธิภาพของยา (Makler *et al.*, 1998 ; ปิยนุช และคณะ, 2542a,b; ดำเนิน 2544) ส่วนการตรวจหาเชื้อระยะไม่มีเพศในเนื้อเยื่อต่างๆ จากชิ้นเนื้อด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา เป็นการตรวจหา malarial pigment และเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญอยู่ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดตามอวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ตับ ม้าม ปอด และสมอง วิธีนี้มักวินิจฉัยในกรณีที่สัตว์ตายเท่านั้น โดยผ่าซาก ตัดชิ้น

เนื้อของอวัยวะต่างๆ นำมาย้อมสี Haematoxylin และ Eosin ตามขั้นตอนมาตรฐาน และศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (Garnham, 1966 ; ปิยนันท์, 2542 ; คำเนิน, 2544)

การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา เป็นการศึกษาภาวะภูมิคุ้มกันโรค โดยตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อการติดเชื้อมาลาเรีย วิธีทดสอบที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ Immunofluorescence assay (IFA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Western blot analysis เป็นต้น (Todorovic *et al.*, 1968 ; Soni and Cox, 1975 ; Voller *et al.* 1975 ; Hollingdale and Kilejian, 1979 ; พัชรี, 2545) มีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคมาลาเรียในไก่ และประยุกต์ใช้เพื่อการเฝ้าระวังโรคได้

สำหรับการตรวจทางอณูชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ สามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียที่มีจำนวนน้อยมากๆได้ดี มักนิยมใช้ในการศึกษาจำแนกชนิดและศึกษา phylogeny ของเชื้อมาลาเรียชนิดต่างๆ (Hang *et al.,* 1995) ตรวจสอบหาสารพันธุกรรมบางประเภท เช่น cytochrome b และ small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) ด้วยเทคนิค PCR, nested PCR และ PCR-RFLP เป็นต้น (Waters *et al.*, 1991 ; ทวี และคณะ, 2543 ; Navia *et al.,* 2003) จนถึงปัจจุบันมีรายงานการจำแนกชนิดจากสารพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกเพียง 3 ชนิด คือ *P. gallinaceum, P. lophurae* และ *P. juxtanucleare* (Waters *et al.,* 1991, ทวี, 2542) Waters และคณะ (1991) ใช้ยีน SSUrRNA หาความสัมพันธ์ของเชื้อ *P. falciparum*ในคน กับเชื้อมาลาเรียที่พบในโฮสต์ชนิดอื่น คือ เชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก (*P. gallinaceum* และ *P. lophurae*) เชื้อมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ (*P. berghei*) เชื้อมาลาเรียในลิง *simian* (*P. fragile*) เชื้อมาลาเรียชนิดอื่นที่พบในคน (*P. vivax*) และเชื้อปรสิตที่ต่างสกุลกับเชื้อมาลาเรีย พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. falciparum* มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. gallinaceum* ในสัตว์ปีก และ *P. berghei* ในสัตว์ฟันแทะมากกว่าเชื้อชนิดอื่น ทวี (2542) ใช้ยีน SSUrRNA หาความสัมพันธ์ของเชื้อมาลาเรียไก่ที่พบในประเทศไทยจำนวน 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้กับยีนที่มีรหัสการสร้าง SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียที่พบในสัตว์ปีก 3 ชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับเบสที่ได้มีความเหมือนกันกับยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรีย *P. gallinaceum* ถึง 100% และ มีความเหมือนกันกับยีน SSUrRNA ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. lophurae* และ *P. relictum* 56.2% และ 58.0% ตามลำดับ นอกจากนี้ได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีน dihydrofolate reductase – thymidylate synthase (*dhfr-ts*) ของเชื้อมาลาเรียบางชนิดโดยเฉพาะ *P. falciparum* เพื่อวินิจฉัยภาวะการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อต่อยา pyrimethamine (Cowman *et al.,* 1988 ; Peterson *et al.,* 1988 ; Foote and Cowman, 1994 ; Navia *et al.,* 2003) สำหรับยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* นั้นได้มีการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ดีเอ็นเอคู่สายประกอบด้วยลำดับเบสทั้งหมดรวม 2091 เบส ถอดและแปลรหัสได้ peptide ของกรดอะมิโนที่มีความยาวทั้งหมด 589 กรดอะมิโน ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *P. falciparum* ในคนมากกว่าเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นๆ (Peterson, 2001)

2.8 การควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรียไก่

เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตที่มีอากาศร้อนชื้น การเกษตรกรรมหลักเป็นการเพาะปลูกทำนา และเลี้ยงสัตว์ จึงมีพื้นที่ที่มีน้ำขังอยู่ทั่วไปในแหล่งที่เลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะฟาร์มเลี้ยงไก่ที่สร้างโรงเรือนอยู่บนบ่อปลา หรือบริเวณโดยรอบของเล้ามีน้ำขังตลอดปี กลายเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงที่ดี การควบคุมป้องกันโรคมาลาเรียไก่โดยการควบคุมปริมาณยุงจึงทำได้ค่อนข้างยาก การควบคุมปริมาณยุงโดยใช้กับดักยุง อุปกรณ์ไล่ยุงด้วยไฟฟ้า การเผาหญ้าและเศษใบไม้เพื่อไล่ยุง การปลูกแนวสมุนไพรเช่นตะไคร้หอมกันยุงรอบๆบริเวณฟาร์ม การใช้ยาฆ่าแมลงฉีดพ่นภายในและรอบๆบริเวณฟาร์มที่มียุงชุกชุม อาจทำให้ปริมาณยุงนำโรคลดลงชั่วคราวเท่านั้น สำหรับการควบคุมป้องกันยุงที่ดีที่สุด คือ การใช้มุ้งปิดคลุมทั้งโรงเรือน และการเลี้ยงไก่ในโรงเรือนระบบปิด (Levine, 1985 ; มนัสนันท์ และคณะ, 2545) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ยาต้านมาลาเรียร่วมกับการใช้มุ้งปิดคลุมโรงเรือนในฟาร์มไก่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย สามารถป้องกันยุงและลดการติดเชื้อใหม่ได้ พบว่าไก่มีอัตราการป่วยและอัตราการตายน้อยลง และอัตราการตรวจพบเชื้อลดลงจนถึงตรวจไม่พบเชื้อ (มนัสนันท์ และคณะ, 2544 ; มนัสนันท์ และคณะ, 2545) การควบคุมการระบาดของโรคมาลาเรียและลิวโคไซโตซูนในไก่พื้นเมืองโดยใช้ยาต้านมาลาเรีย 3 ชนิด คือ ยา sulphamonomethoxine 200 มก.กก.$^{-1}$ 3 วัน ยา chloroquine 20 มก.กก.$^{-1}$ 4 วัน และยา primaquine 5 มก.กก.$^{-1}$ 1 วัน ร่วมกับการเลี้ยงไก่ในโรงเรือนที่กางมุ้ง ปรากฏว่าอัตราการตรวจพบเชื้อทั้ง 2 ชนิดลดลง แตกต่างจากไก่ที่ไม่ได้รับยาหรือไม่ได้ใช้มุ้งคลุม โรงเรือน (มนัสนันท์ และคณะ 2544) เช่นเดียวกันกับการควบคุมโรคในไก่เนื้อโดยใช้โรงเรือนที่กางมุ้งร่วมกับการให้ยาต้านมาลาเรีย 2 ชนิด คือ ยา chloroquine ร่วมกับยา primaquine พบว่าได้ผลดี ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดของไก่ แตกต่างจากไก่ที่เลี้ยงในโรงเรือนที่ไม่มีมุ้งคลุมและไม่ได้รับยาต้านมาลาเรียที่ยังคงตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด (มนัสนันท์ และคณะ 2545) นอกจากนี้สำหรับฟาร์มที่เคยมีประวัติการระบาดของโรค มีการแนะนำให้เฝ้าระวังโรคโดยการตรวจเลือดไก่และสังเกตอาการเป็นระยะโดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนขณะที่มียุงชุกชุม เพื่อว่าจะหาทางป้องกันและรักษาโรคมาลาเรียให้เกิดความสูญเสียน้อยที่สุด (ปิยนุช และ ทัศนีย์, 2541)

2.9 ยาต้านเชื้อมาลาเรีย

ยาที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียหรือยาต้านเชื้อมาลาเรียได้มีการค้นพบมาช้านาน โดยเริ่มจากการนำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ในคน ซึ่งแพทย์จากกลุ่มประเทศทางยุโรปและอเมริกาได้ใช้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีอยู่ตามธรรมชาติ คือ เปลือกของต้น Cinchona (Jesuit bark ; Cinchona officinalis) และปัจจุบันได้มีการผลิตหรือสังเคราะห์เป็นยาสำเร็จรูปที่มีชื่อว่า quinine ส่วนในประเทศจีนได้ใช้สารสกัดสมุนไพรจากต้น Qinghaosu (*Artemisia annua*) ซึ่งค้นพบและมีการใช้มากว่าร้อยปีแล้วเช่นกัน จากนั้นเป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน เป็นเวลาเกือบ 2 ทศวรรษ ได้มีผู้คิดค้น พัฒนา และสังเคราะห์ยาต้านมาลาเรียชนิดสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพดี

หลายๆชนิดได้เป็นผลสำเร็จ (Kinghorn and Balandrin, 1993) ยาที่รู้จักกันดีตามลำดับและนิยมใช้ทั่วโลก ได้แก่ quinine, mepacrine, chloroquine, proguanil, primaquine, pyrimethamine, sulfadoxine, mefloquine และ artimisinin เป็นต้น (Peter,1984 ; Bruce-Chwatt *et al.*, 1986)

ยาต้านมาลาเรียที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้รักษาโรคมาลาเรียมีหลายขนานและหลายรูปแบบ สามารถแบ่งประเภทได้ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี และ การออกฤทธิ์ต่อระยะของเชื้อ ยาต้านมาลาเรียที่แบ่งตามโครงสร้างทางเคมี 6 กลุ่ม (class) (ตารางที่ 2.1) ได้แก่ กลุ่ม 4–aminoquinoline เช่น chloroquine กลุ่ม arylaminoalcohols เช่น quinidine, quinine, mefloquine กลุ่ม phenanthrene methanol เช่น halofathrine กลุ่ม artimisinin เช่น artimisinin, artemether, artesunate กลุ่ม antimetabolites เช่น proguanil, pyrimethamine, sulfadoxine, sulfalene, dapsone กลุ่ม antibiotics เช่น tetracycline, doxycycline, minocycline และ กลุ่ม 8–aminoquinoline เช่น primaquine (WHO, 1995) สำหรับยาที่แบ่งประเภทตามสรรพคุณหรือการออกฤทธิ์ที่มีผลต่อระยะของเชื้อมาลาเรีย แบ่งได้เป็น 4 ประเภท (ตารางที่ 2.1) คือ ประเภทที่ 1 ยาออกฤทธิ์ต่อเชื้อระยะ schizont ที่อยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆนอกเซลล์เม็ดเลือดแดง (tissue schizonticide) ได้แก่ primaquine ประเภทที่ 2 ยาออกฤทธิ์ต่อเชื้อระยะ schizont ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (blood schizonticide) ได้แก่ quinine, chloroquine, artemisinin, mefloquine และ pyrimethamine ประเภทที่ 3 ยาออกฤทธิ์ต่อเชื้อระยะมีเพศ (gametocyte) ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (gametocide) ได้แก่ primaquine และประเภทที่ 4 ยาออกฤทธิ์ต่อเชื้อระยะ sporogony (sporonticide) ได้แก่ proguanil และ pyrimethamine (Catchpool, 1984 ; Goldsmith, 1998) ยาบางชนิด เช่น primaquine มีสรรพคุณในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียได้มากกว่า 1 ระยะคือ เชื้อระยะมีเพศที่อยู่ในกระแสเลือดและระยะไม่มีเพศที่อยู่ในเนื้อเยื่อ (Catchpool, 1984) และยาบางชนิด เช่น halofantrine ออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียบางชนิดเท่านั้นคือ *P. falciparum* (กรองทอง, 2542) โดยทั่วไปไม่ว่าในคนหรือสัตว์ การรักษาโรคมาลาเรียอาจใช้ยาเพียงชนิดเดียวหรือใช้ยามากกว่า 1 ชนิดร่วมกันก็ได้ สำหรับยาต้านมาลาเรียที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในคน คือ chloroquine, quinine, primaquine และ artemisinin (Goldsmith, 1995)

chloroquine เป็นยาสังเคราะห์กลุ่ม 4-aminoquinolines derivative ถูกดูดซึมผ่านลำไส้ได้ดี มีค่าครึ่งชีวิต 3-5 วัน ออกฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียระยะ schizont ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง ยานี้มีผลต่อ malarial pigment และการใช้ hemoglobin โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aspartic protease และ cysteine protease ของเชื้อ *P. falciparum* (Goldsmith, 1998 ; Krogstad and De, 1998)

primaquine เป็นยาสังเคราะห์กลุ่ม 8-aminoquinolines derivative ถูกดูดซึมทางลำไส้ได้ดี มีค่าครึ่งชีวิต 3-6 ชั่วโมง ยานี้สามารถกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆได้ดี (Goldsmith, 1995) ออกฤทธิ์ต่อระยะ schizont ของเชื้อ *P.ovale* และ *P. vivax* ที่อยู่ในตับ (WHO, 1995) และสามารถออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อระยะ gametocyte โดยการรบกวนขบวนการ electron transport ของเชื้อ (Goldsmith, 1998)

นอกจากนี้บางรายงานกล่าวว่า primaquine ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อระยะ sporogony ได้ด้วย (Gwadz *et al.*, 1983)

ตารางที่ 2.1 ยาต้านเชื้อมาลาเรียที่มีแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี และ การออกฤทธิ์ต่อระยะของเชื้อ (ดัดแปลงจาก : WHO,1995 ; Goldsmith, 1998 ; Krogstad and De, 1998)

กลุ่มเคมีของยาต้านเชื้อมาลาเรีย		การออกฤทธิ์ต่อระยะของเชื้อมาลาเรีย			กลไกของยา
ชั้น (Class)	ยา (Drug)	Blood schizonticide	Tissue schizonticide	Sporonticide	
4 – aminoquinoline	Chloroquine	++	0	0	มีผลต่อ food vacuole, malarial pigment และ aspartic และ cysteine protease
8 – aminoquinoline	Primaquine	0	+	+	มีผลต่อ electron transport
Arylaminoalcohols	Quinidine	++	0	0	ยังไม่ทราบ
	Quinine	++	0	0	ยับยั้งการแยกสายของดีเอ็นเอสายคู่
	Mefloquine	++	0	0	ยังไม่ทราบ
Phenanthrene methanol	Halofantrine	++	0	0	ยังไม่ทราบ
Artemisinin and it derivatives	Artemisinin	++	0	0	ยังไม่ทราบ
	Artemether	++	0	0	ยังไม่ทราบ
	Artesunate	++	0	0	ยังไม่ทราบ
Antimetabolites	Proguanil	+	+	+	ยับยั้ง Dihydrofolate reductase
	Pyrimethamine	+	0	+	ยับยั้ง Dihydrofolate reductase
	Tetracycline	+	+	0	ยับยั้ง protein synthesis
	Doxycycline	+	+	0	ยับยั้ง protein synthesis

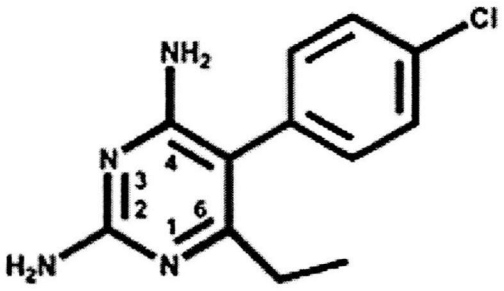
quinine เป็น alkaloid ได้จากเปลือกของต้นซิงโคนา ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ได้แต่มีราคาแพง มีลักษณะเป็นผลึก ไม่ละลายน้ำ ออกฤทธิ์ไปทำลายเชื้อ *P. falciparum* ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในเลือด มีค่าครึ่งชีวิต 10 ชั่วโมง อาจเป็นพิษต่อโปรโตพลาซึม (Bruce-Chwatt, 1986 ; คณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยา, 2532)

halofantrine เป็นยาที่คิดค้นขึ้นมาใหม่สามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในกระแสเลือด ยานี้ละลายในน้ำมัน หากกินยาพร้อมอาหารประเภทไขมันจะถูกดูดซึมได้รวดเร็วมาก มีเฉพาะชนิดกิน (กรองทอง, 2542)

artesunate เป็น derivative ของ artemisinin ที่สกัดจากพืชสมุนไพร Qinghaosu เป็น sesquiterpene lactone endoperoxides ลักษณะเป็นผง ละลายน้ำได้ดี หลังจากกินเข้าไปจะถูกดูดซึมและเข้าไปในกระแสเลือด และเปลี่ยนเป็น dihydroartemisinin ที่ตับ ออกฤทธิ์ไปทำลายเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ระยะ schizont ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีและรวดเร็ว และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* รุนแรงและมีไข้สูง อาการจะดีขึ้นภายใน 16-25 ชั่วโมง (Goldsmith, 1995) ยา artesunate สามารถนำมาใช้ร่วมกับ mefloquine ขนาดปกติได้ และมักแนะนำให้ใช้กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในแหล่งที่มีการดื้อต่อยา chloroquine, quinine, mefloquine และยาร่วมระหว่าง pyrimethamine และ sulfadoxine

doxycycline เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม oxytetracycline ถูกดูดซึมผ่านทางลำไส้ได้ดี ละลายในไขมันได้ ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) ในคนมักแนะนำให้ใช้เฉพาะราย และใช้ในแง่ของ prophylaxis เท่านั้น เช่น ใช้ป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียซ้ำ ในรายที่เชื้อ *P. falciparum* มีการดื้อต่อยาที่ใช้รักษาหลายๆชนิด (multipledrug-resistant falciparum malaria) และในกรณีที่แพ้ยา mefloquine หรือเชื้อมาลาเรียดื้อต่อยา mefloquine เท่านั้น (WHO, 1995)

pyrimethamine มีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.2 เป็นยากลุ่ม diaminopyrimidine ที่ร่างกายดูดซึมได้ช้า มีค่าครึ่งชีวิต 85 ชั่วโมง ออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *P. falciparum* ระยะ schizont ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง และเชื้อระยะ sporogony ที่อยู่ในยุงนำโรค (Goldsmith, 1998) pyrimethamine ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) ที่มีบทบาทในขบวนการสังเคราะห์ folate โดยยา pyrimethamine จะไปจับกับ binding site ของเอนไซม์ DHFR-TS ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ การสังเคราะห์โฟเลทหยุดชะงักไป มีการสร้าง pyrimidine และ methionine ลดลง glycine เปลี่ยนไปเป็น serine ได้น้อยกว่าปกติ เกิดการสกัดกั้นการสังเคราะห์ nucleic acid (Foote and Cowman, 1994) เชื้อมาลาเรียจะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ หรือมีการรวมกันของ spindle fibers มีการยับยั้งการแบ่งตัวของนิวเคลียสในระยะ metaphase หรือ anaphase ทำให้การแบ่งตัวของเชื้อในระยะ schizogony ไม่สำเร็จสมบูรณ์ จึงทำให้เชื้อมาลาเรียตายในที่สุด (Catchpool, 1984 ; Foote and Cowman, 1994)



Pyrimethamine

รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของยา pyrimethamine (Bruce-Chwatt *et al.,* 1986)

2.9 การใช้ยารักษาโรคมาลาเรียในคน

โรคมาลาเรียในคนได้มีการค้นพบมาช้านาน การรักษาโรคในระยะแรกเริ่มได้ใช้สารสกัดเปลือกของต้น Cinchona (*Jesuit bark* ; *Cinchona officinalis*) มีผู้สามารถสังเคราะห์ชนิดสำเร็จรูปขึ้นได้ คือ ยา quinine ในปี ค.ศ. 1820 และในเวลาใกล้เคียงกันกับการใช้สารสกัดจากเปลือกของต้น Cinchona ก็ได้มีการใช้สารสกัดจากต้น Qinghaosu (*Artemisia annua*) ซึ่งปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ชนิดสำเร็จรูปขึ้นได้ คือยา artesunate สำหรับยา quinine ได้มีการนำมารักษาโรคมาลาเรียในคนได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจเรื่อยมาจนกระทั่งถึงปี 1950 มีการดื้อยา และมียาที่ผลิตได้ใหม่ที่มีสรรพคุณดีกว่า คือ chloroquine ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 เป็นต้นมาหลังจากมีการค้นพบยา chloroquine ว่ามีประสิทธิภาพดีต่อการรักษาโรคมาลาเรียชนิดต่างๆที่พบในคน จึงมีการนำมาใช้แพร่หลายจนกระทั่งถึงปี 1960 เริ่มมีรายงานว่าเชื้อชนิด *P. falciparum* เกิดดื้อต่อยานี้ขึ้น และในปี ค.ศ. 1972 ได้มีรายงานว่าเชื้อ *P. falciparum* เกิดการดื้อต่อยา chloroquine ขึ้นในประเทศไทยเช่นกัน (Thaithong and Beale, 1992) ต่อมาได้มีการใช้ยาร่วมระหว่าง pyrimethamine และ sulfadoxine นำมาใช้รักษาโรคมาลาเรียในคน ปรากฏว่าให้ผลดีต่อการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. falciparum* (Chin and Intraprrasert, 1973 ; Chin and Rattanarithikul, 1973 ; Chin *et al.,* 1973) และในปี ค.ศ. 1981 มีรายงานว่าเชื้อมาลาเรียในคนชนิด *P. falciparum* เกิดการดื้อต่อยาดังกล่าว (Pinichpongse *et al.,* 1982) จึงได้นำยาร่วม 3 ชนิดคือ pyrimethamine, sulfadoxine และ mefloquine ซึ่งแม้ว่ายาให้ผลดีต่อการรักษา แต่เชื้อมักเกิดการดื้อยาได้ค่อนข้างเร็ว ยานี้จึงหมดความนิยมไป ปัจจุบันการรักษาโรคมาลาเรียในคนมักใช้ยา artesunate หรือ ยาร่วมระหว่าง artesunate และmefloquine มีประสิทธิภาพดีในการรักษาโรคมาลาเรียได้สูงถึง 81% หรือ ยา artemether ผสมกับ lumefantrine มีประสิทธิภาพดีในการรักษาโรคมาลาเรียได้ 86-93% (กรองทอง, 2542)

2.10 การใช้ยารักษาโรคมาลาเรียในสัตว์

โดยทั่วไปการค้นพบยาแต่ละชนิดที่ใช้รักษามาลาเรียในคนนั้น การทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาจำเป็นต้องมีกระบวนการทดลองที่เป็นขั้นตอนในสัตว์ก่อนเป็นส่วนใหญ่ สัตว์ชนิดที่มักใช้เพื่อการทดลอง ได้แก่ หนู ลิง และไก่ เป็นต้น (Garnham, 1980 ; McGhee, 1988 ; Jense and Waters, 1995) Peter (1973) รายงานการใช้หนูทดลองที่ติดเชื้อ *P. berghei* ทดสอบประสิทธิภาพยาร่วมระหว่าง pyrimethamine และ sulfadoxine พบว่าให้ผลสูงต่อเชื้อระยะไม่มีเพศที่อยู่ในกระแสเลือด มีรายงานการรักษาลิง *Saimiri sciucus* และ *Aotus trivergatus* ที่ติดเชื้อ *P. vivax* พบว่าเมื่อใช้ยา chloroquine ขนาด 25 มก.กก.$^{-1}$ ตรวจไม่พบเชื้อในลิงภายใน 3 วัน ส่วนลิงที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 1 มก.กก.$^{-1}$ ตรวจไม่พบเชื้อภายใน 4-6 วัน (Rossan *et al.,* 1975) นอกจากนั้นในการทดลองใช้ลิง *Aotus trivergatus* ที่ติดเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* สายพันธุ์ต่างๆ ทดสอบประสิทธิภาพยา chloroquine, quinine และ pyrimethamine ปรากฏว่า เชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* สายพันธุ์ต่างๆดื้อต่อยาทั้ง 3 ชนิดในอัตราที่แตกต่างกัน (Schmidt, 1978)

2.11 การรักษาโรคมาลาเรียในไก่และสัตว์ปีกอื่น

การทดลองรักษาโรคมาลาเรียในไก่นั้นได้มีการประยุกต์มาจากยาที่ใช้ได้ผลในการรักษาโรคมาลาเรียในคน (Kazim *et al.,* 1979 ; ทัศนีย์ และคณะ, 2538 ; ปิยนุช และคณะ, 2542a ; ปิยนุช และคณะ, 2542b ; วินัย และคณะ, 2542 ; ดำเนิน, 2544) การรักษาโรคมาลาเรียในสัตว์ปีก Swann และ Kreier (1973) ทดลองรักษาไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* โดยการฉีดเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปริมาณ 2.5 x 10^6 และใช้ chloroquine ขนาด 3 มก.กก.$^{-1}$ quinacrine ขนาด 16.5 มก. กก.$^{-1}$ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 3 วัน ปรากฏผลไม่ชัดเจน Stoskopf และ Breier (1979) ทำการรักษานกเพ็นกวินที่ติดเชื้อ *P. relictum* และ *P. elongatum* และแสดงอาการทางคลินิกของโรคมาลาเรีย โดยใช้ primaquine ขนาด 0.3 มก.กก.$^{-1}$ ให้กินวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 3 วัน และใช้ chloroquine ขนาด 10 มก.กก.$^{-1}$ ครั้งแรก ตามด้วยขนาด 5 มก กก$^{-1}$ ในชั่วโมงที่ 6, 18 และ 24 ปรากฏว่าเชื้อในกระแสเลือดลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบ ยกเว้นนกบางตัวที่ยังตรวจพบเชื้อได้บ้าง ขณะที่ Kazim และคณะ (1979) ทดลองใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิด คือ doxycycline, demeclocycline, minocycline, tetracycline. oxytetracycline, chloramphenical, erythromycin และ gentamicin ในไก่ไข่อายุ 1-2 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 35-50 กรัม ที่มีการติดเชื้อ *P. gallinaceum* โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ผลปรากฏว่ายา doxycycline ขนาด 50 มก.กก.$^{-1}$ ทำให้ไก่มีการติดเชื้อลดลงหลังจากให้ยาต่อเนื่องเป็นเวลา 7-8 วัน และไก่ที่ติดเชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 18 วัน ในขณะที่ยา demeclocycline, tetracycline และ oxytetracycline ให้ผลดีเมื่อใช้ในขนาด 200 มก.กก.$^{-1}$ ส่วนยา chloramphenicol, erythromycin และ gentamycin ไม่ทำให้การติดเชื้อลดลง

ในประเทศไทย มีหลายรายงานที่ทำการรักษาโรคมาลาเรียในไก่ในภาคสนาม (ทัศนีย์ และคณะ, 2538 ; ปิยนุช และคณะ, 2542a ; ปิยนุช และคณะ, 2542b ; วินัย และคณะ, 2542) ขณะที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียในไก่เนื้อเป็นครั้งแรกนั้น ทัศนีย์ และคณะ (2538) ทำการรักษาโรคด้วยยา 2 ชนิด คือ chloroquine ร่วมกับ sulfamonomethoxine โดยใช้ chloroquine ผสมน้ำให้กินทุกเช้า วันละ 1 ครั้ง 3 วัน ติดต่อกัน ในวันแรกให้กินในขนาด 10 มก.กก.$^{-1}$ วันที่ 2 และ 3 ให้กินในขนาด 5 มก.กก.$^{-1}$ สำหรับยา sulfamonomethoxine ผสมน้ำให้กินทุกช่วงบ่าย วันละ 1 ครั้ง 5 วัน ติดต่อกัน โดยวันที่1 และ 2 ให้กินในขนาด 200 มก.กก.$^{-1}$ ในวันที่ 3-5 ให้กินในขนาด 100 มก.กก.$^{-1}$ ปิยนุช และคณะ (2542a) ใช้ยา chloroquine ร่วมกับ doxycycline รักษาไก่เนื้ออายุ 49 วันที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรีย โดยใช้ยา chloroquine ขนาด 30 มก.กก.$^{-1}$ ผสมน้ำให้กินติดต่อกันนาน 6 วัน และยา doxycycline ขนาด 10 มก.กก.$^{-1}$ ผสมน้ำให้กินติดต่อกัน 4 วัน และยาขนาด 50 มก.กก.$^{-1}$ อีก 4 วันติดต่อกัน ปรากฏว่าเชื้อในกระแสเลือดลดลงใน 3-4 วันหลังให้ยารักษา และไก่แสดงอาการดีขึ้น ขณะที่วินัย และคณะ (2542) ใช้ยา chloroquine ผสมน้ำป้อนปาก รักษาไก่เนื้อที่ป่วย โดยในวันแรกใช้ขนาด 20 มก.กก.$^{-1}$ และให้ติดต่อกันอีก 3 วัน ในขนาด 10 มก.กก.$^{-1}$ พบว่าอัตราการติดเชื้อลดลงและเริ่มตรวจไม่พบเชื้อในสัปดาห์ที่ 2 หลังการให้ยาครั้งแรก

สำหรับการรักษาโรคมาลาเรียในไก่ไข่นั้น ปิยนุช และคณะ (2542b) ได้ใช้ยา chloroquine ผสมน้ำให้กิน ขนาด 10 มก.กก.$^{-1}$ ติดต่อกัน 5 วัน และหลังจากหยุดยาไปนาน 1 สัปดาห์ ให้ซ้ำอีกครั้งนาน 5 วัน ติดต่อกัน ปรากฏว่าไก่ไข่ อายุ 12 สัปดาห์ ที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรีย มีอาการดีขึ้น อัตราการตายลดลง อัตราการไข่เพิ่มขึ้น และเปลือกไข่หนาขึ้น เชื้อในกระแสเลือดลดลงในระดับหนึ่ง แต่ไม่สามารถกำจัดให้หมดไปจากกระแสเลือดได้

จากการศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าหลอดเลือดแดงของไก่เนื้ออายุ 23 วัน และเมื่อตรวจพบเชื้อระยะ schizonts และ gametocytes ในกระแสเลือด ดำเนิน (2544) ได้ทำการรักษาด้วยยา 5 ชนิด คือ artesunate, chloroquine, doxycycline, primaquine และ artesunateร่วมกับ primaquine ในขนาด 10, 10, 50, 0.5 และ 10+50 มก.กก.$^{-1}$ ต่อวัน ตามลำดับ โดยป้อนปากให้กินวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน นาน 5 วัน ผลปรากฏว่ายา chloroquine และ doxycyclinne มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการรักษาการติดเชื้อระยะ asexual blood stages แต่ไม่มียาชนิดใดที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการทำลายเชื้อระยะ gametocytes และ exo-erythrocytic schizonts ที่อยู่ในตับ และม้าม

2.12 การใช้ยา pyrimethamine ในการรักษาโรคมาลาเรียในสัตว์ปีก

pyrimethamine เป็นยาต้านเชื้อมาลาเรียอีกชนิดหนึ่งที่ได้เริ่มนำมาใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียในคนตั้งแต่ปี ค.ศ. 1951 และมีผู้นิยมนำมาใช้รักษาโรคมาลาเรียหลายชนิดทั้งในคนและในสัตว์ ในประเทศไทยได้มีผู้นำยาชนิดนี้เข้ามาใช้เพื่อการรักษาโรคมาลาเรียในคน ในระหว่างปี พ.ศ. 2515 - 2528 (Thaithong and Beale, 1992 ; กรองทอง, 2542) มีหลายรายงานกล่าวว่าให้ผลดีต่อการ

รักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ภายหลังจากให้ยาร่วม 3 ชนิด คือ quinine, tetracycline และ pyrimethamine และหายจากโรคมาลาเรียสูง 66.7% (Chin and Intraprasert, 1973) นอกจากนี้ การทดลองใช้ยา sulphamethoxine-pyrimethamine รักษาคนที่ติดเชื้อ *P. falciparum* พบว่ามีอัตราการหายป่วยจากโรคมาลาเรียสูง 91.2% (Chin and Rattanarithikul, 1973) ซึ่งสอดคล้องกับบางรายงานที่ให้ยา sulphromethoxine-pyrimethamine รักษาคนที่ติดเชื้อ *P. falciparum* และมีอัตราการหายป่วยจากโรคมาลาเรียสูง 91% (Chin *et al.,* 1973) ต่อมาภายหลังในปี ค.ศ. 1981 มีรายงานว่าเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในประเทศไทยเกิดภาวะดื้อต่อยาร่วมระหว่าง pyrimethamine และ sulfadoxine (Thaithong and Beale, 1981 ; Pinichpongse *et al.,* 1982)

นอกจากการใช้ยา pyrimethamine ในการรักษาโรคมาลาเรียในคนแล้วได้มีผู้นำยานี้ไปใช้รักษาการติดเชื้อมาลาเรียในสัตว์เช่นกัน อาทิ การใช้ยา pyrimethamine ในลิงที่ติดเชื้อ *P. vivax* หรือยาร่วมระหว่าง pyrimethamine และ sulfonamide ในหนูทดลองที่ติดเชื้อ *P. berghei* ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับการใช้ยา pyrimethamine ในสัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* นั้น การทดลองส่วนใหญ่มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการติดเชื้อมาลาเรียในคน โดยเฉพาะการใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาประสิทธิภาพยา และภาวะการดื้อยา (Garnham, 1980 ; McGhee, 1988 ; Jense and Waters, 1995) Gwadz และคณะ (1983) รายงานว่า ยา pyrimethamine และ primaquine มีประสิทธิภาพดีต่อการยับยั้งการพัฒนาของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ sporogony ในยุง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Terzian และคณะ (1968) ที่กล่าวว่า ยา proguanil, cycloguanil และ pyrimethamine มีผลต่อเชื้อ *P. vivax* ระยะ sporogony โดยออกฤทธิ์ต่อเชื้อระยะ oocyst โดยตรง (oocysticidal effect) ในประเทศไทย พรหมพร และคณะ (2543) ได้ทดลองรักษาลูกไก่ไข่เพศผู้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย โดยใช้ doxycycline ร่วมกับ pyrimethamine ขนาด 1 กรัมต่อน้ำ 2 ลิตร ละลายน้ำให้กิน 3 วันพบว่าอัตราการตายของไก่ในกลุ่มที่ให้ยาไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม และระดับเชื้อในกระแสเลือดทั้งก่อนและหลังการรักษาได้ผลไม่ชัดเจน จึงประเมินประสิทธิภาพของยาได้ยาก และยังไม่มีรายงานอื่นใดเกี่ยวกับผลดีหรือผลเสียเกี่ยวกับการนำ pyrimethamine มาใช้ในการควบคุมหรือรักษาโรคมาลาเรียไก่ เพื่อลดปัญหาความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดจากการป่วยและตายของทั้งไก่เนื้อและไก่ไข่ นอกจากนี้โรคมาลาเรียไก่ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. gallinaceum* เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างแพร่หลายเฉพาะในประเทศไทย ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ความไวของเชื้อต่อยา และลักษณะทางพันธุกรรมของ *dhfr-ts gene* ของเชื้อว่ามีภาวะการดื้อต่อยาชนิดนี้บ้างหรือไม่

2.13 ปัญหาการการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในคนและสัตว์

การใช้ยาเพื่อรักษาคนหรือสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรียนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็น อย่างไรก็ตามการใช้ยาบางชนิดอย่างต่อเนื่องอาจทำให้เชื้อมาลาเรียเกิดการกลายพันธุ์ และมีภาวะที่ดื้อต่อยาได้ง่าย และ

บางครั้งอาจไปเร่งทำให้เชื้อเกิดภาวะดื้อต่อยาชนิดอื่นได้ด้วย (Foote and Cowman, 1994) จนกระทั่งเกิดปัญหาในการควบคุม ป้องกัน และรักษาโรค ดังที่ปรากฏในหลายๆแหล่งที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียในคนอย่างแพร่หลาย เริ่มจากการดื้อต่อยา chloroquine ที่เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกของโลกที่ประเทศเวเนซุเอลา ในปี ค.ศ. 1960 พบว่าเชื้อมาลาเรียในคน *P. falciparum* เกิดภาวะดื้อยาทำให้คนป่วยที่ได้รับการรักษายังตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด (Marberti, 1960) เช่นเดียวกับในประเทศโคลัมเบียที่พบเชื้อ *P. falciparum* ดื้อต่อยา chloroquine (Moore and Lanier, 1961) ต่อมาในปี ค.ศ. 1962 มีรายงานครั้งแรกในประเทศไทย พบว่าเชื้อ *P. falciparum* ดื้อต่อยา chloroquine (Harinasuta *et al.,* 1962) สำหรับยา pyrimethamine นั้นมีรายงานการดื้อต่อยาของเชื้อ *P. falciparum* ในคน เป็นครั้งแรกที่ประเทศแกมเบียเมื่อปี ค.ศ. 1962 (Peter, 1984) และในประเทศไทยได้พบการดื้อต่อยาดังกล่าวของเชื้อ *P. falciparum* เมื่อปี ค.ศ. 1981 (Thaithong and Beale, 1981 ; Pinichpongse *et al.,* 1982) และหลังจากนั้นก็มีรายงานการดื้อยา sulfadoxine-pyrimethamine ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* อย่างกว้างขวาง (กรองทอง, 2542)

สำหรับกลไกต่างๆที่ทำให้เชื้อมาลาเรียเกิดดื้อต่อยาดังกล่าวนั้น ส่วนใหญ่ยังไม่ทราบแน่ชัด แม้ว่าจะมีการศึกษาค้นคว้าอย่างต่อเนื่องก็ตาม ยกเว้นการที่เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยา pyrimethamine ที่มีการศึกษาค้นคว้าได้เป็นผลสำเร็จ โดยพบว่าการดื้อต่อยา pyrimethamine ของเชื้อมาลาเรียในคน เกิดขึ้นได้ 3 ประการ คือ เชื้อมีการกลายพันธุ์ (mutation) พันธุกรรมของเชื้อมีกระบวนการถอดและแปลรหัส (transcription, translation) มากขึ้นกว่าปกติ และเชื้ออาจมีการเพิ่มจำนวน (amplification) ของยีน *dhfr-ts* มากขึ้นกว่าเดิม (Foote and Cowman, 1994) สำหรับสาเหตุที่สำคัญที่สุดในการดื้อต่อยา pyrimethamine นั้น มักเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย ในการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ที่กลายพันธุ์ไป พบว่ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR มีกรดอะมิโนบางตำแหน่งแตกต่างไปจากปกติ และเป็นเหตุให้เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยา (Peterson *et al.,* 1988 ; Foote and Cowman, 1994) ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากการควบคุมของยีนที่ผิดปกติเหล่านี้จะไม่สามารถถูกจับโดย pyrimethamine เอนไซม์ที่ผิดปกตินี้จึงสามารถเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ folate ได้ โดยทั่วไปสิ่งกระตุ้นที่ทำให้เชื้อ *P. falciparum* มีการ กลายพันธุ์ได้ง่าย มักเนื่องมาจากการใช้ยารักษาโรคมาลาเรียโดยการให้ยา pyrimethamine ซ้ำแล้วซ้ำอีกหลายๆครั้ง หรือการให้ยา trimethoprim ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ DHFR ของเชื้อ *P. falciparum* แบบอ่อนๆ (Petersen, 1987 ; Sibley *et al.,* 2001) และในการรักษาผู้ป่วยซึ่งติดเชื้อ *P. falciparum* ที่กลายพันธุ์นั้นจะต้องเพิ่มขนาดยาสูงขึ้นถึง 100 เท่าจึงจะกำจัดเชื้อได้ (Cowman *et al.,* 1988 ; Peterson *et al.,* 1988) ส่วนเชื้อ *P. vivax* ที่กลายพันธุ์ไปนั้นเกิดภาวะดื้อต่อยา pyrimethamine มากกว่า wild-type ประมาณ 4,000 เท่า (de Pecoulas *et al.,* 1998 ; Leartsakulpanich *et al.,* 2002)

สำหรับไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ได้มีรายงานว่ายา pyrimethamine ขนาดแนะนำที่ต่ำที่สุดที่ใช้รักษาโรคมาลาเรียไก่ และทำให้เชื้อตาย (minimum effective dose) คือ 0.03 - 0.04 มก.กก.$^{-1}$

(Falco, 1951; Rollo, 1951) ในการทดลองผ่านเชื้อ *P. gallinaceum* เข้าไปในไก่พร้อมกับให้ยา pyrimethamine ขนาดที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อตาย จากนั้นพักการให้ยา 3 วัน แล้วให้ยาใหม่ ค่อยๆ เพิ่มขนาดยาสูงขึ้น และผ่านเชื้อต่อๆไป โดยทำการทดลองเช่นเดิมต่อเนื่องนาน 6 เดือน ผลปรากฏว่าเชื้อมีการดื้อต่อยาสูงถึง 64 เท่า (Greenberg & bond, 1954) และมีรายงานการศึกษาภาวะการดื้อต่อยา pyrimethamine ของเชื้อ *P. gallinaceum* โดยใช้ยาในขนาดเริ่มต้น 1 มก.กก.$^{-1}$ ซึ่งเป็นขนาดยาที่ไม่ทำให้เชื้อตายทั้งหมด จากนั้นจึงผ่านเชื้อที่รอดตายเข้าไปในไก่ตัวใหม่ และให้ยาหลังจากตรวจพบเชื้อ โดยเพิ่มขนาดยาขึ้นเรื่อยๆจาก 1 มก.กก.$^{-1}$ จนถึง 15 มก.กก.$^{-1}$ พบว่าหลังจากผ่านเชื้อและให้ยาต่อเนื่อง 13 ครั้ง เชื้อ เกิดภาวะดื้อต่อยาได้ (Singh *et al.*,1952)

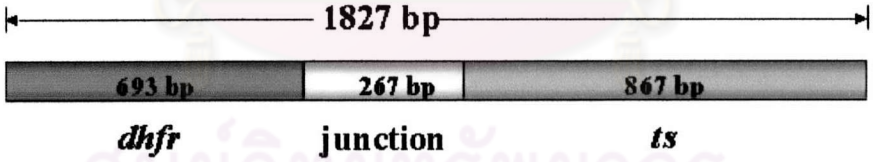
2.14 การศึกษายีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส –ไทมิไดเลทซินเทส (*dhfr-ts*) ของเชื้อมาลาเรีย

โดยทั่วไป folate เป็นสารประกอบที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งโปรโตซัวทุกชนิด มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของเซลล์ ในขณะที่มีการเจริญเติบโตและมีการแบ่งตัวของเซลล์ การสังเคราะห์ folate ส่วนใหญ่มักอาศัยปฏิกริยาเร่งจากเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR ; EC 1.5.1.3) และเอนไซม์ Thymidylate synthase (TS ; E.C. 2.1.1.45) ซึ่งการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวถูกควบคุมโดยยีนที่แตกต่างกัน คือ ยีน *dhfr* และ *ts* ตามลำดับ แต่ในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรโตซัว ยีน *dhfr* และ *ts* มีการเชื่อมต่อกันด้วย junction ที่ประกอบด้วย peptide ของกรดอะมิโนจำนวนหนึ่ง เช่นเดียวกันกับเอนไซม์ DHFR-TS (Bzik *et al.*, 1987 ; Garrett *et al.*, 1984) ตามปกติยีน *dhfr-ts* มีเพียงชุดเดียวอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 (Cowman *et al.*, 1988) การสังเคราะห์ folate นั้น เอนไซม์ Thymidylate synthase จะทำปฏิกริยาเร่งให้ dUMP ไปเป็น dTMP และปฏิกิริยานี้จะทำให้ N^5-N^{10}-methylenetetrahydrofolate เปลี่ยนเป็น dihydrofolate จากนั้นเอนไซม์ dihydrofolate reductase เร่งปฏิกริยาของ NADPH ไปเป็น $NADP^+$ และเปลี่ยน dihydrofolate ให้เป็น tetrahydrofolate (Cowman, 1998)

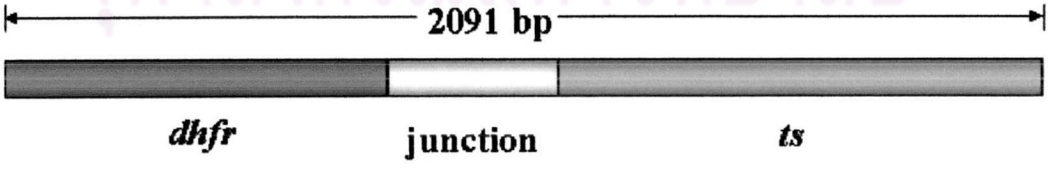
ปัจจุบันยาต้านเชื้อมาลาเรียที่ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียอย่างชัดเจนมีเพียง 3 ชนิด คือ ยากลุ่ม sulfonamides ยา pyrimethamine และ proguanil โดยยาในกลุ่ม sulfonamides มีกลไกการออกฤทธิ์ไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ dihydropteroate synthase (DHPS) ของเชื้อ ในการสังเคราะห์ tetrahydrofolate cofactors จาก p-amino benzoic acid (PABA) เป็นสาเหตุทำให้วงจรในการสังเคราะห์ folate ลดลง ส่วนยา pyrimethamine และ ยา proguanil นั้นมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ไปยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ของเชื้อมาลาเรีย ในการสังเคราะห์ tetrahydrofolate จาก dihydrofolate โดยยา pyrimethamine ไปจับกับเอนไซม์ dihydrofolate reductase ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำหน้าที่ต่อไปได้ จึงเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ folate เช่นเดียวกับยากลุ่ม sulfonamides การสังเคราะห์ purine และ pyrimidine หมดไป เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ glycine และ methionine ทำให้เชื้อมาลาเรียตายในที่สุด (Cowman, 1998)

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่ายีน *dhfr-ts* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR ส่วนประกอบ แบ่งเป็น 3 ส่วน คือยีน *dhfr* และ *ts* และ junction ซึ่งเป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างยีนทั้ง 2 (รูปที่ 2.3) สำหรับยีน *dhfr-ts* ของเชื้อมาลาเรียชนิดที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางมากที่สุด คือ *P. falciparum* ในคน โดยมีลำดับเบสของคู่สายดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 1827 คู่ (Cowman *et al.*, 1988) สามารถถอดและแปลรหัสได้ peptide ของกรดอะมิโนทั้งสิ้นรวม 608 กรดอะมิโน ประกอบด้วยส่วนของ *dhfr* ที่มีลำดับเบสยาว 693 คู่ และ ปลายด้านคาร์บอกซีลซึ่งเป็นส่วนของ *ts* มีลำดับเบสยาว 867 คู่สาย และ junction มีลำดับเบสยาว 267 คู่ (Bzik *et al.*, 1987 ; Sirawaraporn *et al.*, 1990) ในปี ค.ศ. 2001 ได้มีรายงานการศึกษายีน *dhfr-ts* ของ *P. gallinaceum* เป็นครั้งแรก พบว่าประกอบด้วยลำดับเบสทั้งหมด 2091 คู่ ถอดและแปลรหัสได้ peptide ของกรดอะมิโนที่มีความยาวทั้งหมด 589 กรดอะมิโน แต่ยังไม่ทราบความยาวแต่ละส่วนของลำดับเบสของยีน *dhfr, ts* และ junction (รูปที่ 2.3) และส่วนประกอบของยีน *dhfr-ts* ของ *P. gallinaceum* ที่ศึกษานั้นมีความใกล้เคียงกับ *P. falciparum* มากกว่าเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น (Peterson, 2001) สำหรับยีน *dhfr-ts* ของเชื้อมาลาเรียชนิดอื่นที่มีรายงานคือ *P. vivax* ในคน ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสทั้งหมด 1872 คู่ ถอดและแปลรหัสได้ peptide ของกรดอะมิโนที่มีความยาวทั้งหมด 623 กรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนในส่วนประกอบของ *dhfr* มีความยาว 237 กรดอะมิโน *ts* มีความยาว 286 กรดอะมิโน และ junction มีความยาว 100 กรดอะมิโน (de Pecoulas *et al.*, 1998)

ก.



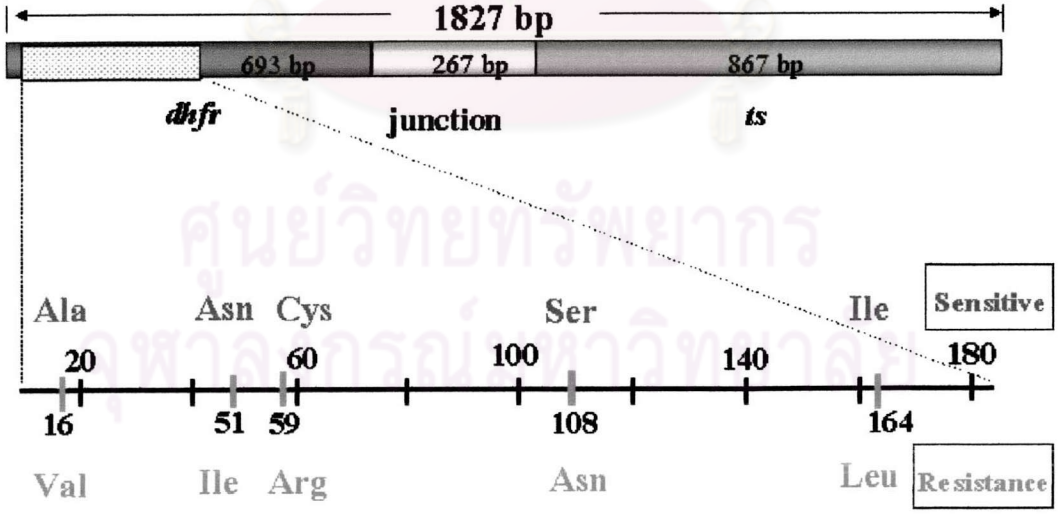
ข.



รูปที่ 2.3 ไดอะแกรมแสดงส่วนประกอบหลักของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* (ก., ดัดแปลงจาก Cowman *et al.*, 1988) และ *P. gallinaceum* (ข., ดัดแปลงจาก Peterson, 2001)

ในการกลายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียจากการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ที่พบว่ายีนซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ DHFR มีกรดอะมิโนบางตำแหน่งแตกต่างไปจากปกติ และเป็นเหตุให้เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยานั้น กรดอะมิโนตำแหน่งที่สำคัญที่สุดที่มีการเปลี่ยนแปลง คือ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 108 มีการเปลี่ยนแปลงจาก serine ไปเป็น asparagine (รูปที่ 2.4) ส่วนกรด อะมิโนตำแหน่งอื่นที่อาจพบในการกลายพันธุ์ของเชื้อ ได้แก่ ตำแหน่งที่ 16, 51, 59 และ 164 (Cowman *et al.,* 1988 ; Peterson *et al.,* 1988 ; Peterson *et al.,* 1990 ; Foote and Cowman, 1994 ; Cowman, 1998) สำหรับเชื้อ *P.vivax* ที่กลายพันธุ์ไปจะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในหลายตำแน่งได้แก่ ตำแหน่งที่ 33, 57, 58, 61, 117 และ 173 (de Pecoulas *et al.,* 1998 ; Leartsakulpanich *et al.,* 2002)

สำหรับยา proguanil มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับยา pyrimethamine โดยมีผลต่อการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ DHFR เมื่อเชื้อ *P. falciparum* ที่ได้รับยา proguanil เป็นระยะเวลาหนึ่ง มักเกิดการดื้อต่อยา proguanil มักเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *dhfr-ts* โดยมีความผิดปกติของกรดอะมิโนตำแหน่งที่สำคัญ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 108 เปลี่ยนแปลงจาก serine ไปเป็น asparagine และตำแหน่งที่ 16 เปลี่ยนแปลงจาก alanine ไปเป็น valine ส่วนตำแหน่งอื่นๆที่อาจพบการกลายพันธุ์ได้ด้วย คือ ตำแหน่งที่ 51 และ 59 นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา proguanil อาจจะมีการดื้อยาข้ามต่อยา pyrimethamine ได้เช่นกัน ส่วนเชื้อ *P. falciparum* ที่เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม sulfonamides พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *dhps* โดยมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนหลายตำแหน่ง เช่น 436, 437, 540, 581 และ 613 เป็นต้น (Cowman, 1998 ; Sibley *et al.,* 2001)



รูปที่ 2.4 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*