KKU Res. J. 2014; 19(1) : 150-160
http://resjournal.kku.ac.th

โรคมาลาเรียในสัตว์ปีก: แนวทางการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในไก่และการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคมาลาเรียในมนุษย์

Avian malaria: transmission blocking strategies for the malaria parasite in domestic chicken *Gallus gallus domesticus* and applications for human malaria disease control.

สิทธิพร ภัทรดิลกรัตน์[1]
Sittiporn Pattaradilokrat[1]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330*
**Corresponding author: Sittiporn.P@Chula.ac.th*

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียมีสาเหตุจากเชื้อโปรโตซัวที่เป็นเชื้อปรสิตในสกุลพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) เชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม (*Plasmodium gallinaceum*) เป็นเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในไก่บ้าน (*Gallus gallus domesticus*) การติดเชื้อมาลาเรียในไก่บ้านอาจทำให้เกิดพยาธิสภาพรุนแรงและอาจทำให้ไก่ตาย ซึ่งนำไปสู่ความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในประเทศไทย นอกจากความสำคัญในทางปศุสัตว์ เชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมในไก่มีลักษณะทางชีววิทยาที่คล้ายคลึงกับเชื้อมาลาเรียในมนุษย์หลายประการ จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือวิจัยเพื่อค้นคว้าทดสอบยาและวัคซีนสำหรับเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ บทความวิชาการปริทรรศน์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมในไก่ และให้ความรู้เกี่ยวกับความก้าวหน้าในการพัฒนาวิธีการยับยั้งการระบาดของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีก ตลอดจนอภิปรายถึงการประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเครื่องมือป้องกันการแพร่ระบาด เช่น ยาและวัคซีน ในการควบคุมโรคมาลาเรียในมนุษย์

Abstract

The malaria disease is caused by the parasitic protozoa in the genus *Plasmodium*. Of the malaria parasites infecting birds, *Plasmodium gallinaceum* is the causative agent of the malaria disease in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). Infections with *P. gallinaceum* in domestic chickens may cause severe pathology and death that contributes to substantial economic loss to poultry industry in Thailand. Despite its veterinary significance, *P. gallinaceum* has shared a number of biological characteristics to the human malaria parasites and has therefore served as a research tool for identification of drug targets and vaccine candidates for the human malaria diseases. The goals of this review were to provide an overview of the life cycle of the avian malaria parasite *P. gallinaceum* and the progress toward developing transmission blocking strategies for the avian malaria disease. The applications of the transmission blocking tools such as drugs and vaccines for the human malaria diseases were also discussed.

คำสำคัญ: วัคซีนต้านเชื้อมาลาเรีย โรคมาลาเรียในสัตว์ปีก การรักษาโรคด้วยยา พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม
Keywords: anti-malarial vaccine, avian malaria, chemotherapy, *Plasmodium gallinaceum*

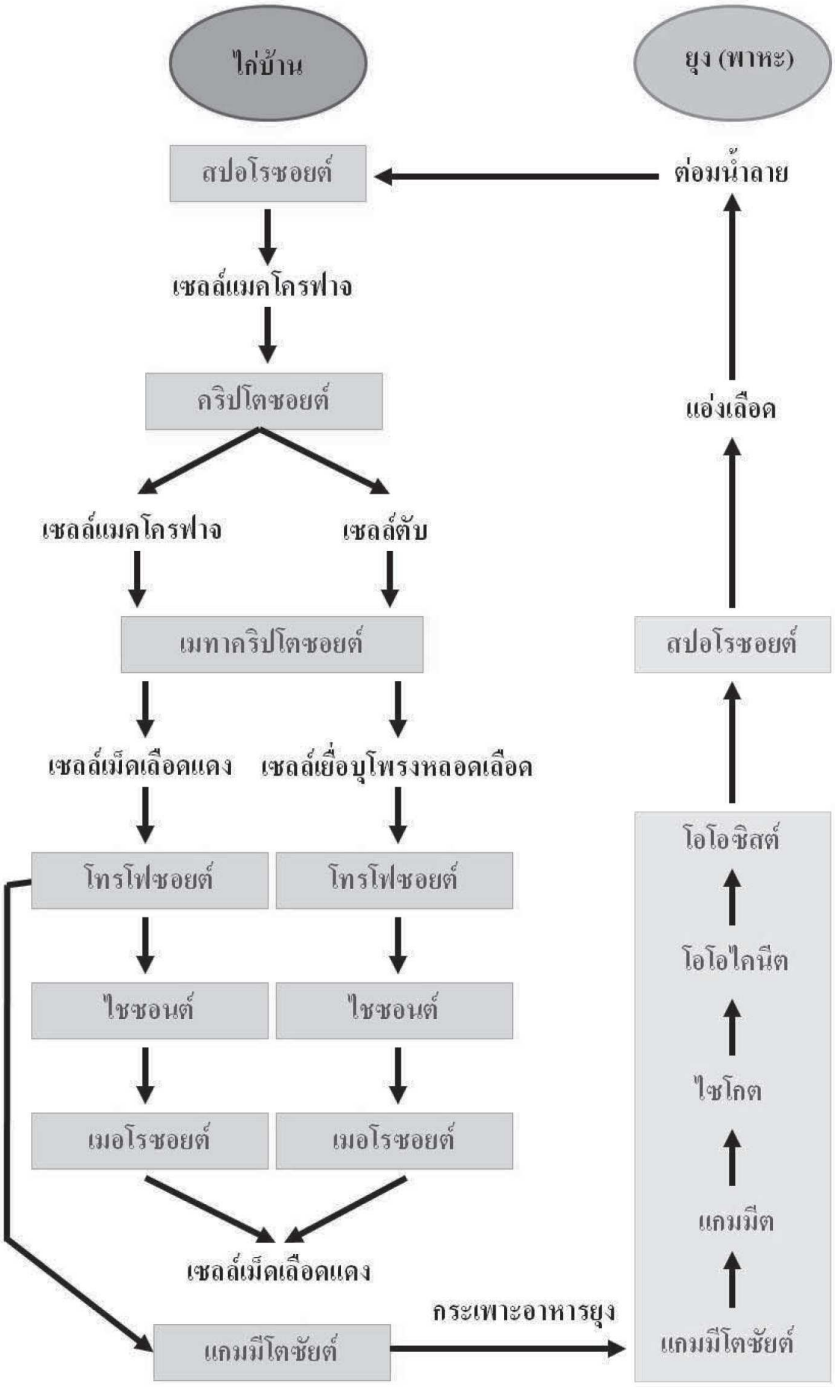
1. บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อร้ายแรงมีสาเหตุจากเชื้อปรสิตในสกุลพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) เชื้อมาลาเรียพบได้ในสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สัตว์ฟันแทะ ลิง และ มนุษย์ โรคมาลาเรียในมนุษย์เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข เนื่องจากเป็นโรคอันตรายที่อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ปัญหาสำคัญในการควบคุมโรคมาลาเรียเกิดจากการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียดื้อยาในหลายพื้นที่ ตลอดจนการไม่มีวัคซีนและการขาดแคลนยาสำหรับป้องกันและรักษาโรค เชื้อมาลาเรียที่เจริญได้ในสัตว์ทดลอง เช่น เชื้อมาลาเรียในหนูไมซ์ (1) เป็นเชื้อมาลาเรียที่ถูกนำมาใช้ในการทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีนหรือยา ก่อนที่จะนำไปทดสอบขั้นต่อไปในมนุษย์ นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกเป็นเชื้อมาลาเรียในสัตว์ทดลองอีกกลุ่มหนึ่งที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในสัตว์ปีกมีจำนวนอย่างน้อย 32 ชนิด (species) (2) ตัวอย่างเชื้อมาลาเรียที่สำคัญได้แก่ เชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม (*Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935) (3) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในไก่บ้าน (*Gallus gallus domesticus*) ยุงที่เป็นพาหะนำโรคมีหลายชนิด เช่น ยุงลาย (*Aedes aegypti*) ยุงรำคาญ (*Culex pipiens*) ยุงลายเสือ (*Mansonia crassipes*) และ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles quadrimaculatus*) (3) เป็นต้น การแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียในไก่พบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย (4) ในประเทศไทยเชื้อพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมเป็นปัญหาต่อการเลี้ยงไก่ชนและการเลี้ยงไก่แบบฟาร์มเปิด ไก่ไข่ที่ติดเชื้อมาลาเรียจะผลิตไข่ลดลง ไข่มักจะบุบ แตกง่าย ส่วนไก่เนื้อที่ได้รับเชื้อมาลาเรียจะตายและมีคุณภาพเนื้อต่ำ ทำให้ขายไม่ได้ราคา ดังนั้นการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียไก่จึงมีผลกระทบทางลบต่อเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ (4) อย่างไรก็ดีเชื้อมาลาเรียไก่พลาสโมเดียม กัลลินาเซียมมีลักษณะทางชีววิทยาที่คล้ายคลึงกับเชื้อมาลาเรียในมนุษย์หลายประการ เช่น ระยะการผสมพันธุ์และการเจริญในยุงพาหะ ดังนั้นงานวิจัยที่ใช้เชื้อมาลาเรียไก่เป็นโมเดลจึงมีประโยชน์สองประการ หนึ่งสามารถนำผลไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการระบาดของโรคมาลาเรียไก่ได้โดยตรง และสองสามารถนำความรู้ที่ได้ไปต่อยอดเพื่อพัฒนาวิธีการป้องกันและกำจัดเชื้อมาลาเรียในมนุษย์

บทความวิชาการปริทรรศน์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในไก่ และ การพัฒนาวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในไก่โดยใช้ยาและวัคซีน ตลอดจนเชื่อมโยงความรู้ที่ได้จากการศึกษาสู่การพัฒนาวิธีป้องกันการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียในมนุษย์

2. วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่

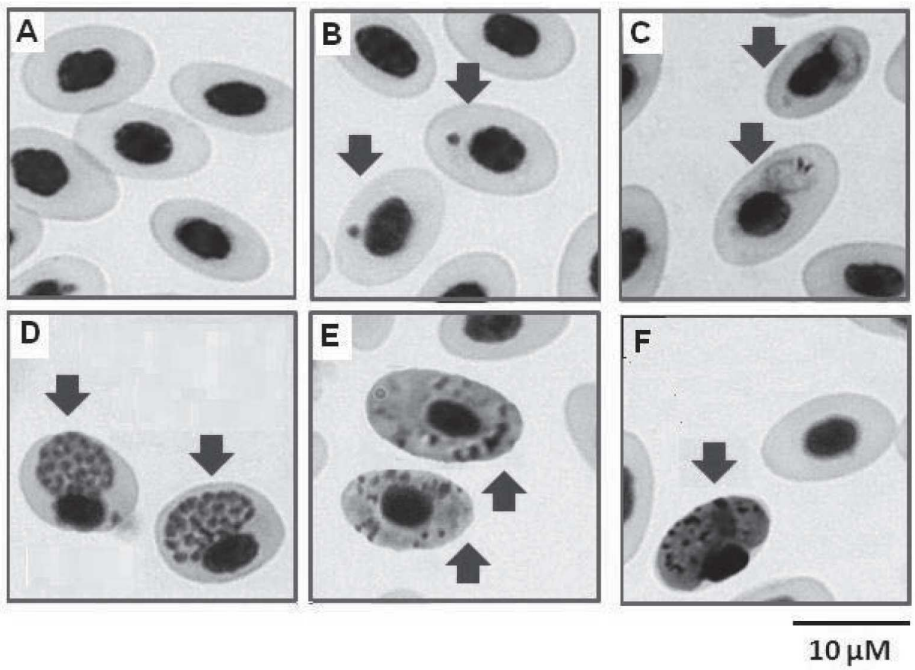
วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่แบ่งออกเป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะในไก่ และระยะในยุงซึ่งทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรค (**รูปที่ 1**) (3, 5) วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในไก่แบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย ได้แก่ ระยะภายนอกเซลล์เม็ดเลือดแดง (exo-erythrocytic stage development) และระยะภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage development) ระยะภายนอกเซลล์เม็ดเลือดแดงเริ่มต้นเมื่อยุงพาหะที่มีเชื้อมาลาเรียระยะสปอโรซอยต์ (sporozoite) ดูดเลือดจากไก่และปล่อยน้ำลายเข้าสู่ผิวหนัง สปอโรซอยต์ในน้ำลายของยุงจะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง เช่น แมคโครฟาจ (macrophage) แล้วเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศแบบเมอโรโกนี (merogony) ได้เป็นเชื้อมาลาเรียระยะคริปโตซอยต์ (cryptozoite) หลังจากนั้น คริปโตซอยต์จะออกจากเซลล์เจ้าบ้าน และกลับเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจอีกครั้ง หรือเข้าสู่กระแสเลือดและเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ และระบบน้ำเหลือง (6) เชื้อคริปโตซอยต์จะแบ่งเซลล์แบบเมอโรโกนีอีกครั้งภายในเซลล์เจ้าบ้าน และสร้างเชื้อมาลาเรียระยะเมทาคริปโตซอยต์ (metacryotozoite) (7, 8) เชื้อมาลาเรียระยะคริปโตซอยต์และระยะเมทาคริปโตซอยต์มีรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกัน แต่เมทาคริปโตซอยต์เป็นเพียงระยะเดียวที่สามารถพัฒนาต่อไปภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง หรือเซลล์เยื่อบุโพรงหลอดเลือด (**รูปที่ 1**) การเจริญในระยะภายนอกเซลล์เม็ดเลือดแดงใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง



รูปที่ 1. วงจรชีวิตเชื้อมาลาเรียไก่ชนิดพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม (*Plasmodium gallinaceum*) ในไก่บ้าน (*Gallus gallus domesticus*) และในยุง ซึ่งเป็นพาหะของโรค เช่น ยุงลาย (*Aedes aegypti*) เป็นต้น

ต่อไปเชื้อมาลาเรียระยะเมทาคริปโตซอยต์จะเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือดและเจริญภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง (**รูปที่ 2**) ระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage development) ประกอบด้วย ระยะโทรโฟซอยต์ (trophozoite) และระยะไชซอนต์ (schizont) เชื้อมาลาเรียทั้งสองระยะอาศัยอยู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในระยะโทรโฟซอยต์ นิวเคลียสของเชื้อมาลาเรียจะมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ เชื้อมาลาเรียจะได้รับสารอาหารต่างๆ เช่น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) จากเซลล์เม็ดเลือดแดง และมีการสร้างเม็ดสีเรียกว่า ฮีโมโซอิน (hemozoin) ต่อมาจะพบการขยายขนาดของไซโทพลาสซึม กิจกรรมสำคัญในระยะโทรโฟซอยต์ได้แก่ การจำลองสารพันธุกรรม (DNA replication) และแบ่งเซลล์แบบไม่อาศัยเพศแบบเมอโรโกนี หลังจากนั้นเชื้อมาลาเรียจะพัฒนาต่อไปเป็นระยะไชซอนต์ การเจริญของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่จะใช้เวลาโดยเฉลี่ยประมาณ 36 ชั่วโมง (3) ซึ่งสั้นกว่าเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ที่ใช้ระยะเวลาตั้งแต่ 48 ถึง 72 ชั่วโมง เมื่อไชซอนต์เจริญเต็มที่ภายในจะประกอบด้วยเชื้อมาลาเรียระยะเมอโรซอยต์จำนวนตั้งแต่ 8 ถึง 36 เซลล์ (3) เมอโรซอยต์จะหลุดออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเคลื่อนที่เข้าไปอาศัยในเซลล์เม็ดเลือดแดงใกล้เคียง และเริ่มการเจริญภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงต่อไป นอกจากนี้ระยะเมทาคริปโตซอยต์สามารถเข้าไปเจริญภายในเซลล์เยื่อบุโพรงหลอดเลือด เปลี่ยนแปลงรูปร่างและแบ่งเซลล์แบบไม่อาศัยเพศเช่นเดียวกับการเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดง

การเจริญของเชื้อมาลาเรียในระยะนี้ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรียในไก่ เช่น อาการใบหน้าและหงอนซีด อุจจาระมีสีเขียว ลำตัวซูบ มีอาการซึม ลดความอยากอาหาร นอกจากนี้ไก่อาจมีไข้และมีอาการสั่นร่วมด้วย หากไก่ที่ได้รับเชื้อมาลาเรียไม่ได้รับการรักษาด้วยวิธีที่เหมาะสม ระดับของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น และส่งผลให้ไก่แสดงอาการของโรคมาลาเรียชนิดรุนแรง และทำให้ไก่ตาย (9) นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียอาจจะเคลื่อนที่ไปยังหลอดเลือดบริเวณสมองทำให้เกิดโรคมาลาเรียขึ้นสมอง และทำให้ไก่ตายในระยะเวลารวดเร็ว (10) นอกจากนี้ระยะการเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความสำคัญเพราะเป็นระยะที่ใช้ในการตรวจยืนยันการเป็นโรคมาลาเรียไก่



รูปที่ 2. เชื้อมาลาเรียในไก่ชนิดพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม (*Plasmodium gallinaceum*) ในระยะการเจริญในเซลล์เม็ดเลือดแดงและระยะสืบพันธุ์ ศึกษาภายใต้จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรแสดงตำแหน่งของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย (A) เซลล์เม็ดเลือดไก่ปกติ (B) ระยะโทรโฟซอยต์ระยะต้น (C) ระยะโทรโฟซอยต์ระยะท้าย (D) ระยะไชซอนต์ (E) แกมมีโตซัยต์เพศผู้ (F) แกมมีโตซัยต์เพศเมีย (รูปต้นฉบับ)

การแพร่พันธุ์ของเชื้อมาลาเรียไปสู่ยุงพาหะเริ่มจากการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดงไปเป็นระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศหรือแกมมีโตซัยต์ (gametocytes) เมื่อยุงดูดเลือดไก่ที่มีแกมมีโตซัยต์เชื้อมาลาเรียจะพัฒนาต่อไปกลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์หรือแกมมีต (gamete) ภายในกระเพาะอาหารของยุง และจะเกิดการปฏิสนธิได้เป็นไซโกต (zygote) ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังการปฏิสนธิไซโกตจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างต่อไปกลายเป็นโอโอไคนีต (ookinete) เคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงและเข้าไปเจริญภายในผนังเยื่อบุกระเพาะอาหาร (basement membrane) หลังจากนั้นเชื้อมาลาเรียจะพัฒนาต่อไปเป็นโอโอซีสต์ (oocyst) เชื้อมาลาเรียภายในโอโอซีสต์จะแบ่งเซลล์แบบสปอโรโกนี (sporogony) ซึ่งประกอบด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส (meiosis) เพื่อลดจำนวนชุดโครโมโซมให้เป็นแบบแฮพลอยด์ (haploid) และการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศได้เป็นสปอโรซอยต์ โอโอซิสต์ใช้เวลา 8 ถึง 10 วันจึงจะเจริญเต็มที่ แล้วจึงปล่อยสปอโรซอยต์เข้าสู่แอ่งเลือดของยุง (hemocoel) สปอโรซอยต์จะเคลื่อนที่ไปตามอวัยวะต่างๆ ภายในยุง เชื้อมาลาเรียที่เคลื่อนที่เข้าสู่ต่อมน้ำลายจะสามารถแพร่พันธุ์เข้าสู่ไก่ต่อไป

3. บทบาทของเชื้อมาลาเรียไก่สู่การพัฒนาวัคซีนยับยั้งการระบาดของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์

เชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมในไก่มีประโยชน์ต่องานวิจัยทางด้านการพัฒนาวัคซีนและยาเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ เนื่องจากเชื้อมาลาเรียไก่และเชื้อมาลาเรียในมนุษย์มีรูปแบบของวงจรชีวิตในยุงคล้ายคลึงกันตั้งแต่การพัฒนาในระยะไซโกตจนถึงระยะสปอโรซอยต์ ข้อดีอีกประการหนึ่งคือเชื้อมาลาเรียไก่สามารถแพร่พันธุ์ไปสู่ยุงพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้รับผลสำเร็จสูง เมื่อนำไก่ที่มีเชื้อมาลาเรียในระยะเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ระดับ (parasitaemia) 10 เปอร์เซนต์ มาให้ยุงลายดูดเลือดพบว่า ยุงลายประมาณ 80 เปอร์เซนต์จะมีการเจริญของเชื้อมาลาเรียไก่ และในยุงลายที่ได้รับเชื้อจะมีจำนวนโอโอซิสต์ภายในกระเพาะอาหารของยุงปริมาณมาก ทำให้นักวิจัยสามารถใช้ศึกษาเปรียบเทียบผลของวัคซีนและยาหลายชนิดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในยุงได้ในระยะเวลาอันสั้น (11) การพัฒนาวัคซีนป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ในปัจจุบัน มีพื้นฐานและองค์ความรู้มาจากการทดลองโดยใช้เชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมในไก่ (**ตารางที่ 1**) จากการศึกษาของ Gwadz ในปี ค.ศ. 1976 (12) พบว่าเมื่อไก่ได้รับวัคซีนผลิตมาจากเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมในระยะเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic stages) ที่ตายโดยผ่านการฉายด้วยรังสีเอ็กซ์ (X-ray) หรือโดยใช้สารฟอร์มาลิน จะกระตุ้นให้ไก่สร้างภูมิคุ้มกันต่อระยะเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นเมื่อไก่เหล่านี้ได้รับเชื้อมาลาเรียไก่อีกครั้งและถูกยุงกัด พบว่าเชื้อมาลาเรียจะไม่สามารถเจริญและแพร่พันธุ์ในยุงพาหะได้ เป็นการยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในไก่ไปสู่ไก่ตัวอื่นๆ ต่อมาจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า การให้วัคซีนที่ผลิตจากแกมมีตสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันและสามารถยับยั้งการระบาดของโรคมาลาเรียเช่นเดียวกับการใช้เชื้อมาลาเรียในระยะเซลล์เม็ดเลือดแดง (13) ความรู้ดังกล่าวจึงนำมาสู่การศึกษาและค้นพบโปรตีนบนผิวที่มีขนาด 230 กิโลดาลตัน (kilo Dalton) หรือ Pg230 ของเชื้อมาลาเรียในไก่ที่จำเป็นต่อการเจริญในยุงพาหะ จากการศึกษาของ Kaushal และคณะในปี ค.ศ. 1980 และ Rener และคณะในปี ค.ศ. 1983 พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) จำเพาะต่อโปรตีน Pg230 มีผลยับยั้งการปฏิสนธิของเชื้อมาลาเรีย (14, 15) ต่อมาจึงนำมาสู่การค้นพบโปรตีนบนผิวของแกมมีต Pfs230 และ Pvs230 ที่ทำหน้าที่คล้ายกันในเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) และพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ (*Plasmodium vivax*) ตามลำดับ ตลอดจนโปรตีนบนผิวอื่นๆ ที่ทำงานร่วมกัน เช่น Pfs45 และ Pfs48 เมื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีนเหล่านี้ด้วยแอนติบอดีพบว่า จะสามารถขัดขวางการเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงได้ (16, 17) ปัจจุบันโปรตีน Pfs230 กำลังอยู่ในระหว่างการทดลองการผลิตให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ทดลองความปลอดภัยกับสัตว์ทดลองและมนุษย์ (18, 19)

ตารางที่ 1 โปรตีนบนผิวในระยะแกมมีตและระยะโอโอไคนีตของเชื้อมาลาเรียไก่พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม (*Plasmodium gallinaceum*) และเชื้อมาลาเรียมนุษย์พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) และพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ (*Plasmodium vivax*) ที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียในนุษย์

ระยะการแสดงออก	โปรตีนในพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม	โปรตีนในพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม	โปรตีนในพลาสโมเดียม ไวแวกซ์
แกมมีต	Pgs230 (14,15)	Pfs230 (16)	Pvs230 (17)
โอโอไคนีต	Pgs25 (20)	Pfs25 (21, 24)	Pvs25 (25)
	Pgs28 (21)	Pfs28 (23)	Pvs28 (25)

เลขในเครื่องหมายวงเล็บแสดงเอกสารอ้างอิง

นอกจากนี้มีการศึกษาโปรตีนบนผิวของเชื้อมาลาเรียในระยะสืบพันธุ์อื่นๆ เช่น ระยะโอโอไคนีต และนำไปสู่การค้นพบโปรตีนที่มีขนาด 25 กิโลดาลตันหรือ Pgs25 และโปรตีนที่มีขนาด 28 กิโลดาลตันหรือ Pgs28 (20, 21) โปรตีนในกลุ่มนี้มีหน้าที่ช่วยยึดโอโอไคนีตเข้ากับผนังของกระเพาะอาหารยุง และช่วยในการเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะยุง ทำให้โอโอไคนีตสามารถพัฒนาต่อไปกลายเป็นโอโอซิสต์ ในการทดลองยับยั้งการทำงานของ Pgs25 และ Pgs28 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (20, 22) พบว่าเชื้อมาลาเรียไก่ไม่สามารถเจริญกลายเป็นโอโอซิสต์ แสดงให้เห็นว่าทั้งโปรตีน Pgs25 และ Pgs28 มีความสำคัญต่อการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในกระเพาะอาหารของยุง ความรู้เหล่านี้จึงเป็นที่มาสู่การศึกษาและค้นพบโปรตีนชนิดเดียวกันในเชื้อมาลาเรียของมนุษย์เช่น Pfs25 และ Pfs28 ในเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (21, 23, 24) และ Pvs25 และ Pvs28 ในพลาสโมเดียมไวแวกซ์ (25) ในปัจจุบันโปรตีน Pfs25 จากเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมได้รับการผลิตและทดสอบเป็นวัคซีนป้องกันการระบาดของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ในขั้น Phase I Clinical Trail (26)

นอกจากนี้โปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรียในกระเพาะอาหารยุง คือ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และเอนไซม์พลาสเมปซิน 4 (plasmepsin 4) ซึ่งหลั่งออกมาในระยะโอโอไคนีต เอนไซม์ไคติเนสมีหน้าที่สลาย ไคติน ส่วนเอนไซม์พลาสเมปซิน 4 ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่ขัดขวางการเคลื่อนที่ของโอโอไคนีตภายในกระเพาะอาหารของยุง (27-29) เมื่อทดลองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้โดยใช้สารเคมีหรือแอนติบอดีพบว่าโอโอไคนีตของเชื้อมาลาเรีย พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุงได้ ความรู้นี้จึงเป็นที่มาของการค้นพบยีนสร้างเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม และพลาสโมเดียม ไวแวกซ์ ในมนุษย์ (30,31) ในขณะนี้โปรตีนจากเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ทั้งสองชนิดอยู่ระหว่างการทดสอบในห้องปฏิบัติการและอาจจะนำใช้ผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ในอนาคต

4. บทบาทของเชื้อมาลาเรียไก่สู่การพัฒนายาป้องกันการระบาดของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์

เนื่องจากแนวโน้มการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียดื้อยาในมนุษย์ในหลายพื้นที่ทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้น (32) จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนายาชนิดใหม่ที่ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ การออกแบบและทดสอบสารต้านมาลาเรียจึงเป็นหัวข้อวิจัยอีกด้านหนึ่งที่มีความสำคัญ เชื้อมาลาเรียในไก่ชนิดพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม สามารถเจริญได้ในสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการ เช่น ไก่บ้าน และยุงลาย จึงสามารถนำมาใช้ประเมินความปลอดภัยและทดสอบ

ประสิทธิภาพของสารต้านโรคมาลาเรียได้ทุกระยะ ก่อนที่จะนำสารต่างๆ ไปทดลองกับมนุษย์ ในปัจจุบันการรักษาโรคมาลาเรียในไก่ในประเทศไทยใช้ยาสองชนิดเหมือนกับการรักษาโรคมาลาเรียในมนุษย์ได้แก่ ยาคลอโรควิน (chloroquine) และยาดอกซีไซคลีน (doxycycline) ยาทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการกำจัดเฉพาะเชื้อมาลาเรียระยะภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง และช่วยยับยั้งความรุนแรงและลดอัตราการตาย แต่ยาเหล่านี้ไม่มีผลกระทบต่อระยะสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย (33) จึงทำให้ไก่ที่ได้รับการรักษายังคงเป็นแหล่งแพร่เชื้อมาลาเรียสู่ไก่ตัวอื่นๆ ดังนั้นการพัฒนายาต้านมาลาเรียที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงและการสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในยุงจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการรักษาและควบคุมโรคในระยะสั้นและระยะยาว

วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารเคมีในการยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อมาลาเรียในไก่ (*in vivo* chemical screening for transmission blocking activities) แบ่งได้เป็น 2 วิธี วิธีแรกเป็นการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของระยะสืบพันธุ์ในไก่ เริ่มต้นด้วยการฉีดเชื้อมาลาเรียในระยะเซลล์เม็ดเลือดแดงเข้าทางหลอดเลือด (intravenous injection) บริเวณปีกหรือลำคอของไก่ ที่มีอายุระหว่าง 2 ถึง 4 สัปดาห์ รอจนกระทั่งเชื้อมาลาเรียเพิ่มระดับในกระแสเลือดขึ้นจนถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (หมายถึง จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียไก่ 10 เซลล์ต่อ จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 100 เซลล์) จึงนำไก่ติดเชื้อแบ่งออกเป็นกลุ่มๆ นำไปรักษาด้วยสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ กัน หรือให้ตัวทำละลาย (ซึ่งใช้เป็นกลุ่มทดลองควบคุม) โดยวิธีการฉีดหรือวิธีการกิน หลังจากนั้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงให้สารทดสอบเพียงครั้งเดียวโดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารสูงสุดที่ไก่ยังคงปลอดภัย (maximum tolerance dose) (34) หรืออาจจะให้สารทดสอบต่อเนื่อง จำนวน 5 ถึง 7 ครั้งที่ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับยารักษามาลาเรียไก่ที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของไก่ (สำหรับยาคลอโรควิน) หรือระดับใกล้เคียง (11, 33) แล้วจึงนำไก่ทั้งสองกลุ่มมาตรวจวัดปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด หลังจากที่ไก่ได้รับการรักษาจึงนำไก่ไปให้ยุงลาย (*Aedes aegypti*) เพศเมียดูดเลือด นำยุงลายที่ได้รับเลือดจากไก่ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 ถึง 10 วัน เพื่อที่จะนับจำนวนยุงลายที่ติดเชื้อและจำนวนโอโอซิสต์ในกระเพาะอาหารของยุง คณะวิจัยของผู้เขียนได้พัฒนาเทคนิคนี้และนำไปใช้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของยาอาร์ติซูเนต (artesunate) (11) พบว่า เมื่อไก่ที่ติดเชื้อพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม ได้รับยาอาร์ติซูเนตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของไก่ โดยการฉีดเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อน่องเป็นเวลา ต่อเนื่อง 7 วัน วันละหนึ่งครั้ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดและระยะแกมมีโตซัยต์ได้ทั้งหมด และเมื่อนำไก่ที่ได้รับการรักษาจนครบกำหนดไปให้ยุงลายดูดเลือด ก็พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ยาอาร์ติซูเนตมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียภายในเซลล์เลือดแดงและระยะสืบพันธุ์ และอาจจะนำมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคมาลาเรียในไก่ในอนาคต ในปัจจุบันยาอาร์ติซูเนตถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยร่วมกับยาต้านมาลาเรียชนิดอื่นๆ เช่น เมโฟลควิน (mefloquine) (35, 36) นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้เชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมในไก่ ช่วยให้นักวิจัยทราบว่ามีสารเคมีอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น สารไอโซนิโคตินิคแอซิคไฮดราไซด์ (isonicotinic acid hydrazide) ไตรเมโทรพริม (trimethoprim) และ ซัลฟาควิโนซาลิน (sulphaquinoxaline) (37-39) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียภายในยุงลาย สารเคมีเหล่านี้อาจจะนำไปใช้ทดสอบและประยุกต์ใช้เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาและป้องกันโรคมาลาเรียในอนาคต

นอกจากนี้ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในยุงลายเป็นวิธีการป้องกันการระบาดของโรคมาลาเรียอีกวิธีหนึ่งในการทดสอบ ยุงลายจะถูกนำไปเลี้ยงโดยใช้สารละลายซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ หรือสารละลายซูโครสผสมกับสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นอดอาหารเป็นเวลาอีก 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำยุงลายที่ได้รับสารทดสอบไปดูดเลือดไก่ที่ติดเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม กัลลินาเซียม ยุงที่ดูดเลือดไก่ที่ติดเชื้อมาลาเรียแล้ว จะถูกนำไปเลี้ยงต่ออีก 8 ถึง 10 วัน เพื่อนำไปนับจำนวนยุงที่ติดเชื้อ และจำนวนโอโอซิตส์ในกระเพาะอาหาร Gerberg และคณะในปี ค.ศ. 1971 (40-42) ได้ใช้วิธีดังกล่าวในการทดสอบสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าหนึ่งแสนชนิดในเชื้อมาลาเรียในไก่ เนื่องจากในการทดลองนี้ไก่ไม่จำเป็นต้องได้รับยาหรือสารทดสอบโดยตรง

แต่ใช้เพียงเลือดไก่ที่ติดเชื้อมาลาเรียเท่านั้น ดังนั้นเลือดจากไก่ทดลองตัวหนึ่งจะสามารถนำไปทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีต่างๆ ได้เป็นจำนวนมาก ทำให้เป็นการประหยัดต้นทุนในการวิจัยอีกทางหนึ่ง วิธีนี้ต่อมาถูกนำไปดัดแปลงและใช้ทดสอบกับเชื้อมาลาเรียระยะแกมีโตซัยต์ของมนุษย์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ทำให้นักวิจัยทราบว่ายาทำให้นักวิจัยทราบว่ายาไพริเมทธามีน (pyrimethamine) และไซโคลกัวนิล (cycloguanil) เป็นยาต้านมาลาเรียที่ใช้รักษาโรคในมนุษย์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะของเชื้อมาลาเรียในมนุษย์ได้ (43)

5. บทสรุป

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันงานวิจัยต่างๆ ได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า เชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม กัลลินาเซียมในไก่เป็นเชื้อที่มีความสำคัญ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือเพื่อสนับสนุนงานวิจัยทางการแพทย์ เพื่อการค้นคว้าพัฒนาและทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัคซีนและยา นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมกัลลินาเซียมยังมีความสำคัญทางการเกษตรและทางปศุสัตว์ส่งผลเสียต่อเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในประเทศไทย โรคมาลาเรียไก่โดยเฉพาะในประเทศไทยยังคงได้รับความสนใจอยู่น้อย และยังคงมีปัญหาการไม่มีวัคซีนและยาในการรักษาและป้องกันโรคดังนั้นการสนับสนุนด้านทุนวิจัยเกี่ยวกับโรคมาลาเรียไก่จะเป็นประโยชน์มากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่และในทางการแพทย์และสาธารณสุข

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทวี สายวิชัย (คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อมาลาเรียไก่ และขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2556 และทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สัญญาเลขที่ MRG5680134) ตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) กับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

7. เอกสารอ้างอิง

1. Pattaradilokrat S. Malaria in Mice: Models to the Discovery of Novel Anti-Malaria Drugs in Humans. KKU Science Journal. 2013;41(3): 532-41. Thai
2. Van Riper C, III, Atkinson CT, Seed TM. Avian Malaria. Parasitic Protozoa 7. 2nd ed. New York, N.Y: Academic Press; 1994. p. 71-138
3. Garnham PCC. XIX Gallinaceous Species of Haemomoeba: *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium griffithsi*. Malaria Parasites and other Haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1966. p. 588-625.
4. National Institute of Animal Health. Malaria Diseases in Broilers and Egg-Laying Chickens. Bangkok: National Institute of Animal Health; 1999. 53 p. Thai.
5. Valkiunas G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. New York: CRC Press; 2004. 932 p.
6. Frevert U, Spath GF, Yee H. Exoerythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in the White Leghorn chicken. Int J Parasitol. 2008;38(6): 655-72.
7. McGhee RB. Pre-erythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in avian embryos. J Infect Dis. 1949;84: 105-10.
8. Huff CG. Studies on the exoerythrocytic stage of *Plasmodium gallianceum* during the “Transitional phase”. Exp Parasitol. 1952;1: 332-405.
9. Williams RB. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. Avian Pathol. 2005;34(1): 29-47.

10. Macchi Bde M, Quaresma JA, Herculano AM, Crespo-Lopez ME, DaMatta RA, do Nascimento JL. Pathogenic action of *Plasmodium gallinaceum* in chickens: brain histology and nitric oxide production by blood monocyte-derived macrophages. Vet Parasitol. 2010;172(1-2): 16-22.
11. Kumnuan R, Pattaradilokrat S, Chumpolbanchorn K, Pimnon S, Narkpinit S, Harnyuttanakorn P, et al. *In vivo* transmission blocking activities of artesunate on the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. Vet Parasitol. 2013;197(3-4): 447-54.
12. Gwadz RW. Successful immunization against the sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. Science. 1976;193(4258): 1150-1.
13. Carter R, Chen DH. Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. Nature. 1976;263(5572):57-60.
14. Rener J, Carter R, Rosenberg Y, Miller LH. Anti-gamete monoclonal antibodies synergistically block transmission of malaria by preventing fertilization in the mosquito. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980: 6797-9.
15. Kaushal DC, Carter R, Rener J, Grotendorst CA, Miller LH, Howard RJ. Monoclonal antibodies against surface determinants on gametes of *Plasmodium gallinaceum* block transmission of malaria parasites to mosquitoes. J Immunol. 1983;131(5): 2557-62.
16. Quakyi IA, Carter R, Rener J, Kumar N, Good MF, Miller LH. The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. J Immunol. 1987;139(12): 4213-7.
17. Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, et al. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate.Vaccine. 2012;30(10): 1807-12.
18. Farrance CE, Rhee A, Jones RM, Musiychuk K, Shamloul M, Sharma S, et al. A plant-produced Pfs230 vaccine candidate blocks transmission of *Plasmodium falciparum*. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(8): 1351-7.
19. Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Muratova O, MacDonald NJ, Sattabongkot J, et al. N-terminal prodomain of Pfs230 synthesized using a cell-free system is sufficient to induce complement-dependent malaria transmission-blocking activity. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(8): 1343-50.
20. Kaslow DC, Syin C, McCutchan TF, Miller LH. Comparison of the primary structure of the 25 kDa ookinete surface antigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium gallinaceum* reveal six conserved regions. Mol Biochem Parasitol. 1989;33(3): 283-7.
21. Duffy PE, Pimenta P, Kaslow DC. Pgs28 belongs to a family of epidermal growth factor-like antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. J Exp Med. 1993;177(2): 505-10.
22. Grotendorst CA, Kumar N, Carter R, Kaushal DC. A surface protein expressed during the transformation of zygotes of *Plasmodium gallinaceum* is a target of transmission-blocking antibodies. Infect Immu. 1984;45(3): 775-7.
23. Vermeulen AN, Ponnudurai T, Beckers PJ, Verhave JP, Smits MA, Meuwissen JH. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. J. Exp. Med. 1985;162(5):1460-76.
24. Duffy PE, Kaslow DC. A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as *falciparum* malaria transmission-blocking vaccines. Infect Immu. 1997;65(3): 1109-13.

25. Hisaeda H, Stowers AW, Tsuboi T, Collins WE, Sattabongkot JS, Suwanabun N, et al. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. Infect Immu. 2000;68(12): 6618-23.
26. Heppner DG. The malaria vaccine--status quo 2013. Travel Med Infect Dis. 2013;11(1): 2-7.
27. Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(9): 4266-70.
28. Li F, Patra KP, Yowell CA, Dame JB, Chin K, Vinetz JM. Apical surface expression of aspartic protease Plasmepsin 4, a potential transmission-blocking target of the *Plasmodium* ookinete. J Bio Chem. 2010;285(11): 8076-83.
29. Vinetz JM, Valenzuela JG, Specht CA, Aravind L, Langer RC, Ribeiro JM, et al. Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. J Bio Chem. 2000;275(14): 10331-41.
30. Li F, Patra KP, Vinetz JM. An anti-Chitinase malaria transmission-blocking single-chain antibody as an effector molecule for creating a *Plasmodium falciparum*-refractory mosquito. J Infect Dis. 2005;192(5): 878-87.
31. Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. Parasitol Int. 2009;58(3): 243-8.
32. Na-Bangchang K, Karbwarg J. Emerging artemisinin resistance in the border areas of Thailand. Expert Rev Clin Pharmacol. 2013;6(3): 307-22.
33. Sohsuebngarm D. Susceptibility of chicken at different ages infected with *Plasmodium gallinaceum* and treated with artesunate, chloroquine, doxycycline, promaquine and artesunate-primaquine [MSc thesis]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2001. Thai
34. Gwadz RW, Koontz LC, Miller LH, Davidson DE, Jr. *Plasmodium gallinaceum*: avian screen for drugs with radical curative properties. Exp Parasitol. 1983;55(2): 188-96.
35. Tangpukdee N, Krudsood S, Srivilairit S, Phophak N, Chonsawat P, Yanpanich W, et al. Gametocyte clearance in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria after artesunate-mefloquine treatment in Thailand. The Korean J Parasitol. 2008;46(2): 65-70.
36. Sowunmi A, Nkogho OO, Okuboyejo TM, Gbotosho GO, Happi CT, Adewoye EO. Effects of mefloquine and artesunate mefloquine on the emergence, clearance and sex ratio of *Plasmodium falciparum* gametocytes in malarious children. Malaria J. 2009; 8: 297.
37. Williams RB. The efficacy of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline against *Plasmodium gallinaceum* malaria in the domesticated fowl *Gallus gallus*. Vet Parasitol. 2005;129(3-4): 193-207.
38. Arai M, Alavi YI, Mendoza J, Billker O, Sinden RE. Isonicotinic acid hydrazide: an anti-tuberculosis drug inhibits malarial transmission in the mosquito gut. Exp Parasitol. 2004;106(1-2): 30-6.
39. Silva-Neto MA, Atella GC, Shahabuddin M. Inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase blocks morphological differentiation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes to ookinetes. J Biol Chem. 2002;277(16): 14085-91.

40. Gerberg EJ, Kutz FW. A large-scale artificial feeding technique for infecting mosquitoes and its application to screening antimalarial chemicals. J Med Entomol. 1971;8(5): 610-2.
41. Gerberg EJ. Evaluation of antimalarial compounds in mosquito test systems. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1971;65(3): 358-63.
42. Gerberg EJ, Richard LT, Poole JB. Standardized feeding of *Aedes aedgypti* (L.) mosquitoes on *Plasmodium gallinaceum*, Brumpt-infected chick for mass screening of antimalarial drugs. Mosq News. 1966;26: 359–63.
43. Teklehaimanot A, Nguyen-Dinh P, Collins WE, Barber AM, Campbell CC. Evaluation of sporontocidal compounds using *Plasmodium falciparum* gametocytes produced *in vitro*. Am J Trop Med Hyg 1985;34(3): 429-34.