บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

ระดับการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงดีดีทีและเพอร์เมทรินใน *Ae. aegypti*

ในการดื้อต่อดีดีทีพบว่าค่า RR ของ RddtSper และ RddtRper เมื่อเทียบกับ SddtSper เท่ากับ 1.9 และ 2.03 ตามลำดับ ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการดื้อต่อเพอร์เมทริน RR ของ RddtSper และ RddtRper เท่ากับ 1.09 และ 2.03 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกัน 1.86 เท่าเท่านั้น ที่แตกต่างกันน้อยเนื่องจากทั้งสองสายพันธุ์มาจากแหล่งเดียวกัน และผ่านการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ซึ่งในสภาวะธรรมชาติความเข้มข้นของสารพิษมีน้อย และกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่มักมีการเปลี่ยนแปลงแบบค่อยเป็นค่อยไป ซึ่งแตกต่างจากการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการซึ่งกลุ่มประชากรมีขนาดเล็ก และปริมาณสารพิษที่แมลงได้รับนั้นมีความเข้มข้นสูง (Collaghan et al.,1990) Fox (1973) ทดลองในยุง *Ae. aegypti* มีการดื้อต่อ malathion พบว่ามีระดับ RR (malathion) เท่ากับ 12.40 และทำการศึกษาโดยทำ selection pressure ในระยะลูกน้ำโดยใช้ fenitrothion พบว่าค่า RR (fenitrothion) สูงถึง 37.50 ซึ่งสูงกว่าในการทดลองนี้มาก แต่ไม่มีรายงานที่ทำในดีดีทีและเพอร์เมทริน นอกจากนี้ยังมีรายงานการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงในยุง *Ae. aegypti* ในประเทศแถบคาริบเบียนซึ่งดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต Rawling and Ou Hing Wan (1995) และ Georghiou et al. (1987) พบว่าถ้าจับในห้องที่มีค่า RR(temephos) ไม่เกิน 10.8 เท่า แต่ถ้าทำการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการเมื่อเพิ่มระดับ temephos แก่ยุงมีค่า RR (temephos) สูงถึง 104.3 เท่า

กลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงที่ศึกษา

เอนไซม์ไซโตโครม พี450 ที่ทำการศึกษาทำเฉพาะระยะลูกน้ำ พบว่าสายพันธุ์ RddtSper และ RddtRper มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ SddtSper อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ RddtSper และ RddtRper สูงกว่า suceptible strain 3.5 และ 4 เท่าตามลำดับ กระบวนการเมตาโบลิซึมโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเป็นกลไกหลักที่พบในการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงทุกกลุ่ม ยกเว้น chlorinated cyclodienes (Rough and Tabashnik, 1990) แต่ Zerba (1986) และ Hassall (1990) รายงานว่าเอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตและไพรีทรอยด์ ซึ่งส่วนใหญ่มีการศึกษากลไกนี้โดยใช้ตัว inhibitor ของเอนไซม์นี้ เช่น piperonyl butoxide (Prasittisuk and Busvine, 1977) แต่วิธีอาจผิดพลาดควรมีการตรวจด้วยวิธีชีวเคมีอื่นๆ เช่น วิธีการวัดคุณสมบัติทางการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิค carbonmonoxide

inhibit enzyme spectral characteristic (Omura and Sato, 1964) และวิธีการใช้สับสเตรทที่จำเพาะต่อหน้าที่ของเอนไซม์ oxidase เช่น O-dealkylation ใช้ 7-methoxy coumarin, 7-ethoxycoumarin หรือ methoxyresorufin (Patil, 1990) มีรายงานการศึกษาโดยสองวิธีหลังน้อยมากในยุง เนื่องจากเทคนิคเหล่านี้ต้องใช้ ปริมาณแมลงมากเพื่อนำไมโครโซมมาใช้ และเอนไซม์ไซโตโครม พี450 ที่แยกได้ไม่ค่อยทนต่อสิ่งแวดล้อม (Rough and Tabashinik, 1990) Brogdon et al., (1997) ได้ประยุกต์เทคนิคการวัดปริมาณ heme peroxidase activity เพื่อหาปริมาณ oxidase ที่เพิ่มขึ้นในยุงแต่ละตัวได้ โดยใช้ cytochrome c เป็น internal standard ซึ่งมีใช้กันแพร่หลายและราคาถูก

ส่วนค่า GSTs specific activity ของแต่ละสายพันธุ์ตั้งแต่ระยะลูกน้ำจนถึงตัวเต็มวัย จะเห็นว่าเอนไซม์ GSTs ระยะลูกน้ำมีค่าแอคติวิตี้สูงและสูงสุดในระยะตัวโม่ง *Ae. aegypti* นั้นเพิ่มขึ้นตามช่วงอายุตั้งแต่ช่วงการเจริญเติบโตจนถึงตัวเต็มวัยและแก่ ซึ่งวัดจากปริมาณ activityของ GSTs เมื่อใช้ DCNB (1,2-dichloro-4-nitrobenzene) และ CDNB (1-chloro-3,4, dinitrobenzene) เป็นสับสเตรทตัวที่สองซึ่งให้ผลเหมือนกัน แอคติวิตี้ของ GSTs สูงสุดในระยะเมตามอร์ฟอร์ซิสและลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยและคงที่ ส่วน transferase activity จะลดลงเมื่อมีอายุมากตั้งแต่ 33-45 วัน ในขณะที่ปริมาณกลูตาไธโอนจะลดลงในเมื่ออายุ 15 –33 วัน และสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตี้ของเอนไซม์นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณกลูตาไธโอน และเอนไซม์ GSTs จาก *An. dirus* (species B) มีขนาด 25.0 ± 0.26 Kda สามารถทำปฏิกิริยา dehydrochlorination ในหลอดทดลอง และมีลำดับกรดอมิโนเหมือนกับ GSTs ใน *Ae. aegypti* ถูกยับยั้งโดย ethacrynic acid (Prapanthadara et al., 1997) ในการทดลองนี้ปริมาณ DDTase มีแอคติวิตี้สูงในตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน โดยเฉพาะเพศเมีย และเกิดผลิตภัณฑ์ DDE วัดได้ 4.4 nmol/mg protein นอกจากนี้ยัง cloning GSTs จาก *An.gambiae* (ZANDS) พบว่ามีลำดับ cDNA เหมือนกัน 80.2 % และลำดับกรดอมิโนเหมือนกัน 82.3% (Prapanthadara et al., 1997) และ recombinant จากยุงก้นปล่อง *An. dirus* และ *An. gambiae* สามารถมีปฏิกิริยาได้อย่างดีกับสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีน , ออร์แกโนฟอสเฟต และ ไพรีทรอยด์ (prapanthadara et al., 1998) ระดับเอนไซม์ DDTase มีปริมาณลดลงเมื่อยุงมีอายุมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทำ bioassay ซึ่งยุงอายุ 7 และ 14 วัน มีอัตราตายเท่ากับ 2 และ 5 % เมื่อทดสอบกับดีดีที เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Line and Nassor (1991) Herrath and Jayawardena (1988) แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของการดื้อดีดีทีใน *An. culicifacies* และ *An. subpictus* เนื่องจากมีการใช้สารเคมีฆ่าแมลงดีดีทีเพื่อป้องกันโรคมาเลเรียกันมากในประเทศศรีลังกา ค.ศ 1975-1980 มีระดับ DDT dehydrochlorinase สูงขึ้นและเป็น family เดียวกับ GSTs แต่ Lee and Chang (1995) รายงานว่ายุง *Ae. aegypti* ใน

ประเทศมาเลเซียที่ดื้อต่อดีดีทีนั้นไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ GSTs การสลายดีดีทีมี 3 pathway หลักคือ (1) ปฏิกิริยา dehydrochlorination สลาย DDT ให้เป็น DDE ซึ่งไม่เป็นพิษ (2) reductive dechlorination เปลี่ยนเป็น DDD หรือ (3) ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเปลี่ยนเป็น dicofol (Hassall,1990) มีรายงานการดื้อสารเคมีฆ่าแมลงดีดีทีในยุงก้นปล่องมีสาเหตุสำคัญมาจากการเพิ่มเมตาโบไลซ์ (metabolized) ดีดีทีได้เร็วขึ้น มีรายงานการศึกษาใน *An. gambiae* ชนิดดื้อต่อดีดีที พบว่ามี DDT dehydrochlorination activity สูงกว่าในยุงที่ไม่ดื้อถึง 6 เท่า (Prapanthadara et al., 1993) ส่วนใหญ่การดื้อต่อดีดีทีในยุงลาย *Ae. aegypti* มักเกิดร่วมกับสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ Chadwick et al. (1977) และ Prasittisuk and Busvine (1977)ได้ศึกษาการทำงานของ oxidase, esterase และ dehydrochlorinase โดยใช้ตัวเสริมฤทธิ์ Plapp (1976) พบว่าการดื้อข้ามระหว่างดีดีทีและไพรีธินใน *Cx. tarsalis* นั้น เกิดจากถูกควบคุมโดยยีนตัวเดียวกัน Chadwick et al., (1984) ทำการศึกษาการดื้อข้ามระหว่างไพรีทอยด์กับดีดีทีใน *Ae. aegypti* โดยทำการคัดเลือกดีดีทีหรือเพอร์เมทธินในยุงตัวเมียพบว่าการดื้อต่อดีดีทีเป็นกลไกแบบ dehydrochlorination และ kdr gene resistance ไม่พบการเพิ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการ oxidation และ hydrolysis เลย Mc Donald and Wood(1979) สรุปไว้ 3 ปัจจัยที่ทำให้ลูกน้ำ *Ae. aegypti* ดื้อต่อดีดีที คือ 1) เพิ่มเมตาโบลิซึมในการสลาย DDT ให้เป็น *p,p´* DDE 2) เพิ่มระดับความทนต่อปริมาณ DDT ในร่างกายที่ไม่ถูกเมตาโบไลซ์ และ 3) ลดปริมาณ DDT และ *p,p´* DDE จากการทดลองนี้พบระดับ carboxylesterase activity สูง ในระยะลูกน้ำและตัวโม่งและมีค่าแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่าง susceptible strain อย่างมีนัยสำคัญ แต่ระยะตัวเต็มวัยที่อายุต่างๆนั้นไม่มีความแตกต่าง ระดับแอคติวิตี้ในระยะลูกน้ำและระยะตัวโม่งมีค่าสูงในขณะที่เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยเริ่มลดลงและคงที่จนถึงระยะตัวเต็มวัยอายุ 14 วัน

ระดับเอนไซม์ carboxylesterase มีค่าสูงขึ้น Plapp (1984) พบว่ามีแมลงหลายชนิดที่มีระดับเอนไซม์ esterase ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารเคมีฆ่าแมลงในระดับสูง สามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น substrate hydrolysis และวิธี polyacrylamide gel eletrophoresis หรืออาจใช้ตัวเสริมฤทธิ์ซึ่งแมลงที่ดื้อก็สามารถสกัดกั้นได้ มีการศึกษากันในยุง *Ae. aegypti* พบว่ามีกลไก metabolic detoxication โดยมีระดับเอนไซม์ esterase สูงขึ้น คือ Est-4 และ Est-6 (Marvdavshti, 1985) และในยุง *Ae. aegypti* ที่ดื้อต่อ malathion ในประเทศ Puer Rico มี Est-6 ชัดเจนเมื่อดูความหนาของแบนจากเครื่อง densitometric scanning (Field et al., 1984) ส่วนยุง *Ae. aegypti* ซึ่งดื้อต่อ temephos จาก Tortora, Britis Virgin Island มีกลไกแบบ esterase แต่ไม่มีกลไกแบบ alterd acetylcholinesterase (Wirth and Georghiou, 1996) แต่ยุงที่ดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในประเทศเวเนซูเอลา มีกลไกแบบ non - specific

esterase และ oxidase แต่ยุงกลุ่มที่ดื้อต่อไพรีทรอยด์กลับไม่พบกลไกเหล่านี้ อาจมีกลไกอื่น เช่น เปลี่ยนแปลง target site insensitivity (kdr) (Mazzari and Georghiou, 1995) ต่างจากยุงรำคาญ เช่น *Cx. tritaeniorhynchus* สายพันธุ์ Toyatoma พบกลไกการกำจัดสารเคมีฆ่าแมลงโดยอาศัยเอนไซม์ carboxylesterase ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี Thin-layer agar gel electrophoresis (TAGE) Severini et al. (1993) ศึกษาในยุงที่ดื้อสารเคมีฆ่าแมลง กลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตแต่ละตัวโดยวิธี starch หรือ acrylamide gel electrophoresis มีการสร้างเอนไซม์ esterase มากขึ้น และแยกลักษณะ esterase ออกเป็น 4 reference strain คือ esteraseA1, A2-B2, A4-B4 และ A5-B5 และ esterase C2 พบใหม่มีแอคติวิตี้กับ napthyl α-napthyl acetate สูง (Severini et al., 1997) ต่อมาได้สรุปวิวัฒนาการการเกิด resistance gene ในยุง *Cx.. pipiens* L. complex ที่ศึกษากันมาทั่วโลก พบว่าการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงออร์แกโนฟอสเฟตนั้น อยู่บน major resistance allele มี 3 loci สอง loci แรกคือ Est-2 (esterase B) และ Est-3 (esterase A) ซึ่งเป็นรหัสในการกำจัด carboxylester hydrolase ทำให้ยีนที่ดื้อนั้นสร้างเอนไซม์ esterase มากขึ้น esterase A มี 5 locus และesterase B มี 4 locus การสร้างเอนไซม์ esterase มากขึ้นเป็นผลมาจากขบวนการ gene amplification หรือ gene regulation ส่วน loci ที่ 3 คือ Ace ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ acetylcholinesterase (insecticidal target) และมีการศึกษาใน *Cx.. quinquefasciatus* เป็นแบบ inherited semi – dominant มีระดับ esterase สูง นอกจากนี้ยุงลาย *Ae. aegypti* ไม่มีกลไกการดื้อแบบ เส้นประสาทหมดความไว (nerve sensitivity) เนื่องจากสารเคมีฆ่าแมลงคาร์บาเมต ในการทดลองนี้ใช้ bendiocarb สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้เกือบหมด ซึ่ง Ffrench-constant and Bonning (1989) เป็นผู้รายงานวิธี Rapid microtitre plate test ในการหากลไก altered acetylcholinesterase ซึ่งปรับปรุงจากวิธีหาค่า specific activity ของ Ellman ' s method โดยการหา % inhibition ต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ซึ่งเปรียบเทียบอัตราเร็วของเอนไซม์ AchE ระหว่างปฏิกิริยาที่มีกับไม่มีสารเคมีฆ่าแมลงซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้ง และอ่านแบบจลน์ศาสตร์โดย microtitre plate reader สามารถแยกได้ถึงระดับจีโนไทป์และให้ผลดีกว่าการอ่านแบบ end point ซึ่งถ้าเป็น susceptible strain เอนไซม์จะมีเปอร์เซนต์ uninhibit AchE activity สูงกว่า resistance strain ได้ทดลองทำใน *An. albimanus, An. nigerinus* และ *Cx. pipiens* วิธีนี้สามารถใช้ในห้องที่และห้องปฏิบัติการ จากการศึกษานี้พบว่ายุงทั้งสามสายพันธุ์มีค่าเฉลี่ย % inhibition ต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต (ในที่นี้ใช้ bendiocarb) สูงตั้งแต่ 80 % ขึ้นไป ไม่มีความแตกต่างระหว่างระยะ (stage) อายุ และเพศของยุง ไม่มีรายงานการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ acetylcholinesterase ใน *Ae. aegypti* แต่มีรายงานในยุงก้นปล่อง *An. albimanus* ว่ามีกลไก altered acetylcholinesterase ซึ่งใช้ paraoxon และ propoxur

เป็นตัวยับยั้ง กลไกนี้เกิดเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลง active site ของเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ทำหน้าที่จับกับสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต Ayad and Georghiou (1975) และ Penilla et al., (1997) ได้ศึกษาในยุงก้นปล่อง *An. albimanus* ประเทศเม็กซิโกก็พบกลไกนี้เช่นกันและสรุปว่า AchE resistance gene ไม่มี sex-linked นอกจากนี้ Cordon-Rosales et al., (1990) ได้ประยุกต์วิธีการนี้เพื่อนำไปใช้งานนอกห้องปฏิบัติการ เรียกว่า WHO propoxur - resistance bioassay (WHO test) เพื่อนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต โดยวิธีทาง photometric method เพื่อหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยวัดปริมาณความเข้มของสารสีเหลืองที่เกิดขึ้น ในยุงที่เป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเคมีฆ่าแมลงจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสับสเตรท acetylthiocholine iodide (ASCHI) และถูกยับยั้งเกือบหมด ซึ่งเอนไซม์นี้จะไฮโดรไลซ์ ASCHI เกิดสารผลิตภัณฑ์คือ thiochlorine เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร DTNB จะได้สีเหลือง แต่ในยุงที่ดื้อจะไม่ถูกยับยั้ง (Brogdon et al., 1998) การศึกษาเกี่ยวกับกลไกนี้มักทำในยุงรำคาญ (*Culex*) เช่น *Cx. quinquefasciatus* ประเทศศรีลังกา พบว่าไม่มีกลไก altered acetylcholinesterase (Peiris and Hemingway, 1990) เหมือนกับ *Cx. quinquefasciatus* Say ประเทศซาอุดิอาราเบีย (Hemingway et al., 1990) แต่ใน *Cx. pipiens* ประเทศอิตาลีพบว่ามีกลไก altered acetylcholinesterase เนื่องจากมีการใช้สารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตประเภท chlorprifos กันมาก มีการทำ bioassay ในปี 1985 พบว่ามีการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตสูง (Villani and Hemingway, 1987) Wirth and Georghiou (1996) ก็พบกลไก altered AchE ใน *Cx. .pipiens* ที่มีอยู่ในประเทศไซปรัส