# บทที่ 5

# สรุปผลการทดลอง วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ต่อเชื้อ *P. gallinaceum* วัดผลจากอัตราการติดเชื้อ อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด อัตราการตรวจพบเชื้อระยะ schizont ในเม็ดเลือดแดง และอัตราการตายของไก่ทดลอง โดยใช้ไก่ไข่เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 220 ตัว แบ่งเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัวเท่ากัน ไก่ควบคุมกลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา และกลุ่มที่ได้รับเชื้อแต่ไม่ได้รับยาตามลำดับ ไก่ทดลองกลุ่มที่ 3-11 ซึ่งติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ในขนาด 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มก.กก.$^{-1}$ ตามลำดับ ปรากฏว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.$^{-1}$ มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยไก่กลุ่มที่ 10 ที่ได้รับการให้ยารักษาด้วยขนาดดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับไก่ควบคุมกลุ่มที่ได้รับเชื้อแต่ไม่ได้รับยา มีอัตราการติดเชื้อต่ำที่สุดคิดเป็น 90.9% อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดลดลงเหลือ 50% และ 90 % (LD50 และ LD90) ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 10 หลังให้ยาครั้งแรก อัตราการตรวจพบเชื้อระยะ schizont ในเม็ดเลือดแดง ลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 10 หลังจากให้ยาวันแรก และลดลงต่ำที่สุดเหลือเพียง 25% ในวันที่ 8 หลังการให้ยา และค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นจนถึง 100%ในวันที่ 14 และ ไก่ทดลองมีอัตราการตายลดลง30% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 10.0 มก.กก.$^{-1}$ ที่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ยังคงมีอัตราการติดเชื้อคิดเป็น 100% และไก่ตาย 75% แม้ว่าระดับเชื้อลดต่ำที่สุดหลังจากที่ได้รับยาจนตลอดการทดลอง สำหรับไก่กลุ่มอื่นที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 0.04 ถึง 5.0 มก.กก.$^{-1}$ นั้น มีอัตราการติดเชื้ออัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดสูง 62.15 ถึง 72.47% และอัตราการตรวจพบเชื้อระยะ schizont ในเม็ดเลือดแดง 100% ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา ส่วนอัตราการตายของไก่ทดลองที่ได้รับยาขนาด 0.04 ถึง 5.0 มก.กก.$^{-1}$นั้น อยู่ระหว่าง 40 ถึง 55 % มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยาที่มีอัตราการตายสูงถึง 90 % ($P \leq 0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.$^{-1}$มีประสิทธิภาพดีที่สุดสามารถใช้เป็นยาขนาดต่ำสุดที่ทำให้เชื้อมาลาเรียไก่ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือดลดลงอย่างเห็นได้ชัด (MED, minimum effective dose) และ อัตราการตรวจพบ schizont ลดต่ำลงมากโดยไม่มีผลกระทบหรือฤทธิ์ข้างเคียงต่อตัวไก่ ส่วนยา pyrimethamine ขนาด ที่ทำให้เชื้อ *P. gallinaceum* ลดลงหรือตายได้ 50% (ED50, 50% effective dose) พบว่า ค่าที่คำนวณได้ คือ ยาขนาด 6.8 มก.กก.$^{-1}$

5.1.2 การศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* หลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 4 8 และ 10 เท่าของขนาด MED เริ่มจากศึกษาในไก่กลุ่มควบคุมควบคู่กับไก่กลุ่มทดลอง ไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ จำนวน 10 รุ่น รุ่นละ 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ $10^6$ infected rbc ต่อไก่ 1 ตัว และในกลุ่มทดลองได้ให้ยา pyrimethamine ขนาด MED ติดต่อกันนาน 4 วัน อย่างต่อเนื่องพร้อมๆกับการฉีดเชื้อเข้าหลอดเลือดในไก่ทุกรุ่น ปรากฏว่าในกลุ่มควบคุมทุกรุ่นที่ไม่ได้ให้ยามีค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดต่ำ 0.92% และขึ้นสูงเป็นลำดับตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป โดยขึ้นสูงสุด 57.4%ในวันที่ 5 ของการศึกษา สำหรับไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด MED รุ่นแรกนั้นค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อมีรูปแบบคล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับยาขนาด MED ตั้งแต่รุ่นที่ 2 เป็นต้นไป อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดต่ำลงเป็นลำดับ คิดเป็น 5.17, 6.11, 13.7, , 0.45, 2.58, 4.4, 1.98, 3.7 .และ 3.2% ในรุ่นที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 2 และ 4 เท่าของ MED คือ 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมนั้น ปรากฏว่าศึกษาในไก่ได้เพียง 3 และ 1 รุ่นตามลำดับ เท่านั้น โดยไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine ขนาด 15 มก .กก.$^{-1}$ จำนวน 3 รุ่น มีรูปแบบของระดับเชื้อในกระแสเลือดคล้ายคลึงกับที่พบในไก่ที่ได้รับยาขนาด MED โดย ระดับเชื้อค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นและขึ้นสูงสุดในอัตราเฉลี่ยค่อนข้างต่ำคิดเป็น 1.35, 0.9 และ 0.02% ในรุ่นที่1, 2 และ 3 ตามลำดับ และไก่รุ่นที่ 3 เริ่มตรวจไม่พบเชื้อตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป ไก่ทั้ง 3 รุ่นมีอัตราการตาย 60, 40และ 100% ตามลำดับ ในขณะที่ไก่ติดเชื้อที่ได้รับยาขนาด 30 มก.กก .$^{-1}$เชื้อปรากฏอยู่เพียงช่วงสั้นในวันที่ 2-6 ของการทดลองเท่านั้น และเชื้อที่ปรากฏมีระดับต่ำมากอยู่ระหว่าง 0.02 ถึง 0.12% นอกจากนี้ไก่เริ่มมีการตายมากผิดปกติตั้งแต่วันที่ 8-9 และมีอัตราการตาย 100%ในวันที่ 10

การหาความสัมพันธ์ของระดับเชื้อของไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา กลุ่มทดลองให้ยาขนาด 1, 2 และ 4 เท่าของ MED ปรากฏว่า ระดับเชื้อของไก่ กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา กลุ่มทดลองที่ติดเชื้อและได้รับยาขนาด 1 และ 2 เท่าของ MED มีความสัมพันธ์ที่เป็นสัดส่วนกัน โดยกลุ่มที่ไม่ได้รับยา เชื้อมีระดับสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงเป็น 4 และ 15 เท่าของไก่กลุ่มทดลองที่ติดเชื้อและได้รับยาขนาด 1 และ 2 เท่าตามลำดับ ในขณะที่ระดับเชื้อของไก่กลุ่มทดลองที่ติดเชื้อและได้รับยาขนาด 4 เท่าของ MED ไม่มีความสัมพันธ์กับไก่กลุ่มใดเลย

ผลการทดลองที่ 2 นี้สรุปได้ว่าขนาดของยาที่เหมาะสมต่อการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรียไก่ *P. gallinaceum* ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในกระแสเลือด รวมทั้งการศึกษาภาวะดื้อต่อยา pyrimethamine ของเชื้อชนิดนี้ นั้น น่าจะเป็นขนาด 7.5 มก.กก.$^{-1}$ มากที่สุด สำหรับยา pyrimethamine ขนาดที่สูงกว่า MED มีผลต่อระดับเชื้อและอัตราการตายของไก่ ทำให้เชื้อตายมากแต่ไก่มีอัตราการตายสูงเช่นกัน ส่วนยาขนาดที่ต่ำกว่า MED มีผลต่อระดับเชื้อค่อนข้างน้อย ระดับเชื้อที่พบมีค่าเฉลี่ยสูงใกล้เคียงกับในไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับยา

5.1.3 การศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ที่ไม่ได้รับยาและได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 16 เท่าของขนาด MED โดยเก็บตัวอย่างเลือดไก่และสกัดดีเอ็นเอจากไก่ 4 กลุ่มตัวอย่าง คือ กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยาซึ่งผ่านเข้าไก่ควบคุม รุ่นที่ 2, 6 และ 10 (A2, A6, A10) กลุ่มทดลองที่ติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine ขนาด MED (7.5 มก.กก.$^{-1}$) จากไก่รุ่นที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 (กลุ่มB2, B4, B6, B8 และ B10) กลุ่มทดลองที่ได้รับยาขนาด 2เท่าของ MED (15 มก.กก.$^{-1}$) จากไก่รุ่นที่ 2 (C2) ตามลำดับ ทำการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* โดยใช้ ไพรเมอร์ 2คู่ คือ ไพรเมอร์คู่ที่ 1 forward (25 เบส) 5'-GGA AAA GTA ACC CAT TAG ACA TGA A-3และ reverse (27 เบส) 5'-TCT TCT TTT TTT AAT GAT CTT GAT AAT-3' ซึ่งมีช่วงลำดับเบสตั้งแต่ 321 ถึง 590 และไพรเมอร์คู่ที่ 2 forward (35 เบส) 5'-ATG AAT GAA ATA TCT GAT ATT TTT GAT ATA CAC GC-3' และ reverse (30 เบส) 5'-TTA TGC AGC CAT ATC CAT AGA AAT TTT ATC-3' ซึ่งมี ช่วงลำดับเบสตั้งแต่ 183 ถึง 1952 ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ในสภาวะอุณหภูมิ denaturation ที่ 94 °C annealing ที่ 50 °C และ extension ที่ 72 °C จำนวน 35 รอบ นั้น ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum*ไอโซเลท MNTH 2543 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ทุกตัวอย่างทั้งจากไก่กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 269 เบส

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BioEdit ปรากฏว่า ลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 จำนวน 7 กลุ่ม คือ A10, B2, B4, B6, B8, B10และ C2 พบว่า ยีนของเชื้อ ลำดับเบสตั้งแต่ 463 ถึง 538 (75 เบส) ทุกตัวอย่างมีความเหมือนกันเกือบ 100% ยกเว้นกลุ่ม B10 เบสในตำแหน่งที่ 477 เป็น adenine ( A) ขณะที่กลุ่มอื่นๆมีเบสเป็น thymine (T) การศึกษายีนของเชื้อ ลำดับเบสตั้งแต่ 471 ถึง 538 (67 เบส) มีความเหมือนกันเกือบ 100% กับเชื้อ *Plasmodium* 3 ชนิดจากฐานข้อมูลของ Genbank คือ *P. gallinaceum* (pgdhfr), *P. falciparum* (pfdhfr (S), pyrimethamine sensitive) และ *P. falciparum* (pfdhfr (R), pyrimethamine resistance)ยกเว้นลำดับเบสตำแหน่งที่ 508 ของเชื้อจากการทดลองทุกตัวอย่าง และ *P. falciparum* (pfdhfr S)ที่มีเบสเป็น adenine (A) แตกต่างจาก pgdhfr และ pfdhfr (S) ที่มีเบสเป็น guanine (G)

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 99 ถึง 120 พบว่า ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ทุกกลุ่มการทดลอง A10, B2, B4, B6, B8, B10และ C2 มีความเหมือนกันเกือบ ทั้งหมด ยกเว้นตำแหน่งที่ 120 ของตัวอย่าง B10 ที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่นโดยมีกรดอะมิโนเป็น phenylalanine (F) แทนที่จะเป็น leucine (L) เช่นเดียวกับตัวอย่างในกลุ่มอื่น และลำดับของกรดอะมิโนทุกตำแหน่งมีความเหมือนกันกับเชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr) จากฐานข้อมูลของ Genbankยกเว้นตำแหน่งที่ 109 มีความแตกต่างกัน โดยที่ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อจากการทดลองทุกตัวอย่างมีกรดอะมิโนเป็นชนิด asparagine (N) แต่เชื้อ pgdhfr มีกรดอะมิโน เป็น serine (S) ในการเทียบเคียงกับกรดอะ

มิโนของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. falciparum* ในคน ที่มีความไวต่อยา pyrimethamine (pfdhfr S) และเชื้อที่ดื้อต่อยา (pfdhfr R) จากฐานข้อมูลใน Genbank พบว่า กรดอะมิโนของยีนของเชื้อจากการทดลอง มีความเหมือนกับยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr R) ทุกตำแหน่ง และมีความแตกต่างกับเชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr S) ตำแหน่งเดียว โดยที่ยีนของ *P. gallinaceum* ตำแหน่งที่ 109 เป็น asparagine (N) แต่ยีนของ pfdhfr Sตำแหน่งที่ 108 เป็น serine (S) ซึ่งในการศึกษาภาวะดื้อต่อยา pyrimethamine ของเชื้อมาลาเรียชนิดต่างๆนั้นถือว่าเป็นตำแหน่งที่มีบทบาทสำคัญที่สุดตำแหน่งหนึ่ง

5.1.4 ผล การศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อมาลาเรียไก่ *P. gallinaceum* ที่ไม่เคยได้รับยา pyrimethamine จำนวน 3 ไอโซเลท คือ MNTH2543, BYTH2546 และ PCTH2543 โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ปรากฏว่า ผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบ แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 269 เบส ใกล้เคียงกันทั้ง 3 ไอโซเลท เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และในปฏิกริยาลูกโซ่ที่ใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ได้ตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1770 เบส เฉพาะของเชื้อไอโซเลท MNTH 2543 เท่านั้น ส่วนเชื้อไอโซเลท BYTH2546 และ PCTH2543 ตลอดการทดลองตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอเลย

สำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 269 เบส ของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า ตำแหน่งเบสที่ 402 ถึง 572 (170เบส) เชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 มีลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* เหมือนกัน 100% ส่วนเชื้อไอโซเลท PCTH2543 แตกต่างจากไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 ถึง 6 ตำแหน่ง คือ ที่เบส 420, 481, 508, 539, 561และ 556 สำหรับเบสของยีนทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีความเหมือนมากที่สุด คือ ที่เบสตั้งแต่ 482 ถึง 5 24 (46 เบส) ซึ่งเชื้อไอโซเลท PCTH2543 แตกต่างจากไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 เพียง 1 ตำแหน่ง คือ ที่เบส 508 และการเปรียบเทียบลำดับเบสในช่วงดังกล่าวกับเชื้อมาลาเรีย 3 ชนิด จากฐานข้อมูลของ Genbank พบว่ายีนของเชื้อไอโซเลท PCTH2543 มีความเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท pgdhfr และ เชื้อ *P. falciparum* ไอโซเลท pfdhfr (S) ที่มีความไวต่อยา pyrimethamine ขณะที่ยีนของเชื้อไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 มีความเหมือนกับ เชื้อ *P. falciparum* ไอโซเลท pfdhfr (R) ที่ดื้อต่อยา pyrimethamine โดยตำแหน่งที่เบสแตกต่างกัน คือ ตำแหน่งที่ 508 ซึ่งไอโซเลท PCTH2543, pgdhfr และ pfdhfr (S) มีเบสเป็น guanine (G) ขณะที่ไอโซเลท MNTH2543 BYTH2546 และ pfdhfr (R) เป็น adenine (A)

ในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ทั้ง 3 ไอโซเลทกับเชื้อ *P. gallinaceum,* pgdhfr เชื้อ *P. falciparum,* pfdhfr (S) และ pfdhfr (R)จากฐานข้อมูลของ Genbank พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันมากที่สุด คือ ช่วงตำแหน่งที่ 101 ถึง 114 ยกเว้นตำแหน่งที่ 109/108 เท่านั้นที่กรดอะมิโนมีความแตกต่างกัน โดยยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 ที่ตำแหน่ง 109 และ เชื้อ *P. falciparum* ไอโซเลท pfdhfr (R) ที่ดื้อต่อยา pyrimethamine ที่ตำแหน่ง 108 มีกรดอะมิโนเป็น asparagine (N) ส่วนเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท PCTH2543 และเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท pgdhfr ที่มีความไว

ต่อยา pyrimethamine กับเชื้อ *P. falciparum* ไอโซเลท pfdhfr (S) ที่มีความไวต่อยา pyrimethamine มีกรดอะมิโนเป็น serine (S)

การศึกษานี้จึงอาจสรุปได้ว่า *P. gallinaceum* ที่พบในประเทศไทยมีทั้งไอโซเลทที่มีพันธุกรรมที่ดื้อต่อยา pyrimethamine และ ไอโซเลทที่มีพันธุกรรมที่ไวต่อยา pyrimethamine โดยขึ้นกับแหล่งที่นำตัวอย่างมาทำการศึกษา

**5.2 วิจารณ์ผลการทดลอง**

จากผลการทดลองที่ 1 ที่ศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ที่มีการเพาะเลี้ยงโดยการผ่านเชื้อเข้าไปในไก่อย่างต่อเนื่อง และผ่านเข้าเข้าสู่ยุงลายทุกๆ 6 เดือน มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 (สุวรรณี และคณะ 2545) และไม่เคยมีประวัติว่ามีการใช้ยารักษาชนิดใดมาก่อนนั้น เป็นเชื้อที่มีความดื้อต่อยา pyrimethamine สูงมาก ต้องใช้ยาในขนาดที่สูงถึง 7.5 มก.กก.$^{-1}$ (Minimum effective dose, MED) จึงจะ สามารถยับยั้งเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในกระแสเลือดได้อย่างชัดเจน และไม่มียา pyrimethamine ขนาดใดที่ให้ผลสูงพอที่สามารถกำจัดเชื้อนี้ให้หมดไปจากกระแสเลือดได้เป็นผลสำเร็จโดยไม่เป็นพิษและทำอันตรายต่อตัวไก่ ยาในขนาด 0.04 ถึง 5.0 มก.กก.$^{-1}$ ไม่สามารถทำให้ระดับเชื้อลดต่ำลงได้เลย รูปแบบและค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดยังคงขึ้นสูงคล้ายคลึงกับที่พบในไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อ ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Rollo (1951) ที่กล่าวว่า MED ของยา pyrimethamine ต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ที่แนะนำให้ใช้ คือ ให้กินในขนาด 0.04 มก.กก.$^{-1}$ เช่นเดียวกับ Falco (1951)ที่แนะนำให้ใช้ขนาด 0.03 มก.กก .$^{-1}$ ดังนั้นผลของการทดลองครั้งนี้ที่พบว่า MED ของยา pyrimethamine ต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 คือ 7.5 มก.กก.$^{-1}$ นั้น สูงกว่ารายงานของ Rollo (1951) ถึง 187.5 เท่า และสูงกว่ารายงานของ Falco (1951) ถึง 250เท่า ซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัย อาทิ ผลิตภัณฑ์ยาที่แตกต่างกันเพศ พันธุ์และอายุของไก่ที่ใช้ทดลอง (Levine, 1985) และที่สำคัญที่สุดอาจเกิดจากการใช้ยารักษาโรคอื่นๆที่มีผลกระทบทางอ้อมได้ ซึ่งจะเห็นได้จากการทดลองที่ 2 และ 3 อย่างเด่นชัด ที่ได้ศึกษาลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ซึ่งยีนนี้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดได้ว่าเชื้อที่นำมาใช้อยู่ในภาวะใด ดื้อต่อยาหรือไวต่อยา เชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลทไม่เคยมีประวัติการใช้ยาจากแหล่งต่างๆที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล ขนาดความยาวของเบส และลำดับเบสของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆของยีน *dhfr-ts* และจากเชื้อไอโซเลท MNTH2543 ที่ไม่ได้รับยาและที่ได้รับยาต่อเนื่องในขนาด MED และสูงกว่า นั้น ผลที่วิเคราะห์สามารถให้ข้อสรุปได้ว่าเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 มียีน *dhfr-ts* ที่ดื้อต่อยา pyrimethamine ที่ตำแหน่ง 109/108 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิด *P. falciparum* ที่ดื้อต่อยาในคน ซึ่งยีนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งยวด เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่า ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อมาลาเรียนั้นทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอนไซม์ DHFR ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ ซึ่งใน

กรณีที่เชื้อมีความไวต่อยา pyrimethamine นั้น ยาจะไปจับที่ binding site ของเอนไซม์ dihydrofolate reductase ของเชื้อมาลาเรีย แล้วทำให้เชื้อไม่สามารถสร้าง folate cofactors (tetrahydrofolate$_5$ pool) ดังนั้นการสังเคราะห์ purine และ pyrimidine จึงไม่เกิดขึ้น ทำให้เชื้อตายไปในที่สุด

โดยทั่วไป เชื้อมาลาเรียเกิดภาวะดื้อต่อยา pyrimethamine เนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น เชื้อมีการกลายพันธุ์ พันธุกรรมของเชื้อมีกระบวนการถอดและแปลรหัสที่ผิดไปจากปกติ หรือเชื้ออาจมีการเพิ่มจำนวนยีน *dhfr-ts* มากขึ้นกว่าเดิม (Foote and Cowman, 1994) สาเหตุที่สำคัญที่สุดในการดื้อต่อยามักเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย จากการศึกษาเชื้อ *P. falciparum* ที่กลายพันธุ์ พบว่ายีน *dhfr-ts* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ dihydrofolate reductase มีกรดอะมิโนบางตำแหน่งแตกต่างไปจากปกติ และเป็นเหตุให้เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยา (Peterson *et al.,* 1988 ; Foote and Cowman, 1994) ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากยีนที่ผิดปกติเหล่านี้จะไม่สามารถถูกจับโดย pyrimethamine เอนไซม์ที่ผิดปกติจึงสามารถเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ folate ได้ การกลายพันธุ์ของยีน *dhfr-ts* ที่ดื้อต่อยา pyrimethamine มักมี การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 108 จาก serine ไปเป็น asparagine ซึ่งเป็นตำแหน่ง ที่สำคัญที่สุด ส่วนกรดอะมิโนตำแหน่งอื่นที่อาจพบในการกลายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย 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) โดยพบว่าถ้าต้องการรักษาคนที่ป่วยด้วยโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งมีการกลายพันธุ์นั้น จำเป็น ต้องเพิ่มขนาดยาสูงขึ้นกว่าเดิมถึง 100 เท่า จึงจะกำจัดเชื้อได้ (Cowman *et al.,* 1988 ; Peterson *et al.,* 1988) สำหรับสาเหตุที่เชื้อ *P. falciparum* มีการกลายพันธุ์อาจเกิดจากการได้รับยา pyrimethamine ซ้ำหลายๆครั้ง หรือได้รับยา trimethoprim ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ DHFR ของเชื้อ *P. falciparum* ได้ส่วนหนึ่ง (Petersen, 1987 ; Sibley *et al.,* 2001) ส่วน กรณีที่ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P.vivax* กลายพันธุ์ กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงหลายตำแหน่ง เช่น ที่ 33, 57, 58, 61, 117 และ 173 และเชื้อ *P.vivax* ที่กลายพันธุ์จะดื้อต่อยา pyrimethamine มากกว่าปกติถึง 4,000 เท่า (de Pecoulas *et al.,* 1998 ; Leartsakulpanich *et al.,* 2002) ได้มีการ ทดลองให้ยา pyrimethamine ขนาดต่างๆในไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* เริ่มจากการให้ยาในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งเป็นขนาดยาที่ไม่ทำให้เชื้อตายทั้งหมด จากนั้นผ่านเชื้อและเพิ่มขนาดยาขึ้นเรื่อยๆจากขนาด 1 มก.กก.-1จนถึง 15 มก.กก.$^{-1}$ พบว่าหลังจากผ่านเชื้อและให้ยาต่อเนื่อง 13 ครั้ง เชื้อจึงเกิดภาวะดื้อต่อยาได้ (Singh *et al.,*1952) Greenberg และ bond (1954) ทดลองใช้ยา pyrimethamine ในไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ขณะมีการผ่านเชื้อแต่ละครั้งได้ให้ยาในขนาด MED และพักการให้ยา 3 วัน แล้วให้ยาเพิ่มในขนาดที่สูงขึ้นทีละน้อยๆ หลังจากทดลองเช่นนี้ต่อเนื่องนาน 6 เดือน ผลปรากฏว่าเชื้อมีการดื้อต่อยาสูงถึง 64 เท่า จึงคาดว่าเชื้อ *P. gallinaceum* อาจเกิดภาวะดื้อต่อยาได้ในรูปแบบคล้ายคลึงกัน

การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียด้วยไพรเมอร์คู่ที่ 1 มีช่วงลำดับเบสตั้งแต่ 321 ถึง 590 มีการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่งที่ตรงกับตำแหน่งมักเกิดการกลายพันธุ์ของ

เชื้อ *P. falciparum* ตำแหน่งที่ 108 เนื่องจากการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *P. falciparum* ต่อยา pyrimethamine ที่ผ่านมา มัก ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ ซึ่งบางรายงานได้ตรวจสอบพบว่าเชื้อ *P. falciparum*ที่ดื้อยามีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 จาก serineไปเป็น asparagine ได้สูงถึง 98% (Bwijo *et al.*, 2003 ; Kyabayinze *et al.*, 2003) และการเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *P. falciparum* อาจมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่ง (single mutation) 2 ตำแหน่ง (double mutation) หรือมากกว่าก็ได้ แต่โดยทั่วไปมักมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 ร่วมด้วยทุกครั้ง สำหรับเชื้อ *P. falciparum* ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 1 ตำแหน่งที่ 108 จาก serineไปเป็น asparagine มีอัตราการดื้อยาระดับปานกลาง (Cowman, 1998) ส่วนเชื้อ *P. falciparum* ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหลายตำแหน่ง เช่น 108 ร่วมกับ 59, 108 ร่วมกับ 51, 108 ร่วมกับ 51 และ 59 มักมีมีอัตราการดื้อยาระดับสูง (Cowman, 1998 ; Kofoed *et al.*, 2003 ; Khalil *et al.*, 2003)นอกจากนี้มีรายงานว่า เชื้อ *P. falciparum* เกิดดื้อต่อยา pyrimethamine ร่วมกับยา sulfadoxine โดยพบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของยีน *dhfr-ts* ในตำแหน่งที่ 108 ร่วมกับ 51 และ 59 และกรดอะมิโนของยีน *dhps* เปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ 437 พบได้ 15% (Kofoed *et al.*, 2003)

การศึกษาครั้งนี้พบว่า การวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอของ *dhfr-ts* จากเชื้อ 3 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง คือ BYTH2546, PCTH2543, MNTH2543 (A10) ที่ไม่ได้รับยา และ MNTH2543ที่ได้รับยา (B2, B4, B6, B8, B10 และ C2) พบว่าทุกตัวอย่างมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 269 เบส และมีตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 109 เป็น asparagine เหมือนกัน 8 ตัวอย่าง โดยมีลำดับเบสเหมือนกับเชื้อ *P. falciparum* ที่ดื้อต่อยา pyrimethamine ในตำแหน่งกรดอะมิโน 108 คือ asparagine (AAC) สอดคล้องกับกับรายงานของ Cowman และคณะ (1988) แต่มีความแตกต่างกับลำดับกรดอะมิโนของ *dhfr-ts* จากเชื้อ *P. gallinaceum*ไอโซเลท PCTH2543 และเชื้อ *P. gallinaceum* จากฐานข้อมูลใน GenBank ที่เป็น serine (AGC) ซึ่ งเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความไวต่อยา pyrimethamine (Peterson, 2001)

เนื่องจากผู้นิพนธ์ไม่ได้ทำการศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ตั้งแต่เริ่มต้นของการทดลองศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ดังนั้นในการศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ทั้งก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 10 เท่าของขนาด MED เนื่องจากไม่คาดว่าก่อนนำมาทำการทดลอง เชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 อาจอยู่ในภาวะที่ดื้อต่อยา pyrimethamine แล้ว ทำให้ตรวจไม่พบ point mutation ที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการทดลองในขณะที่ให้ยาซ้ำ ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ของตัวอย่างเชื้อทั้งก่อนและหลังให้ยาจึงมีลำดับเบสของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 109 เป็น asparagine สำหรับเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท BYTH2546 ที่ได้จากไก่พื้นเมือง อ. บางใหญ่ จ. นนทบุรี ไม่ทราบประวัติการได้รับยา pyrimethamine นั้น เมื่อนำมาเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอ พบว่าลำดับเบสของกรดอะมิโน

ตำแหน่งที่ 109 เป็น asparagine เช่นเดียวกันกับเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 อาจเป็นไปได้ที่เชื้อ *P. gallinaceum* ทั้ง 2 ไอโซเลทในประเทศไทยมียีน *dhfr-ts* ที่ดื้อต่อยา pyrimethamine อยู่แล้ว โดยไม่ได้สัมผัสยามาก่อน การกลายพันธุ์ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 นั้นอาจเกิดจากสาเหตุอื่นก็ได้ โดยเฉพาะการได้รับยา trimethoprim ซึ่งจะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ของเชื้อมาลาเรียได้เช่นกัน (Petersen, 1987 ; Sibley *et al.*, 2001) สำหรับยา trimethoprim ได้มีการนำมาผสมกับยากลุ่ม sulfonamides ใช้ในการรักษาโรคสัตว์หลายชนิดรวมทั้งไก่ด้วย ทำให้เชื้อ *P. gallinaceum* มีโอกาสได้รับยา trimethoprim หลายๆครั้งโดยไม่จงใจของเกษตรกรก็ได้ ส่วนเชื้อไอโซเลท PCTH2543 ที่เก็บตัวอย่างเชื้อจากไก่พันธุ์ ของศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์ จ. ปราจีนบุรี และแช่เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสนั้นมีลำดับเบสตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 109 เป็น serine เช่นเดียวกับเชื้อมาลาเรียที่มีความไวต่อยา pyrimethamine ที่มีรายงานใน GenBank จึงอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อมาลาเรียไอโซเลทนี้มีความไวต่อยา pyrimethamine เนื่องจากไก่ที่ติดเชื้อเป็นไก่พันธุ์ที่ไม่เคยได้รับยาและอยู่ห่างไกลจากฟาร์มไก่อื่นๆ ดังนั้นการศึกษา ในอนาคตจึงควรมีการตรวจสอบการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียที่ยีน *dhfr-ts* เป็นอันดับต้น ก่อนที่จะนำไปศึกษาในแง่มุมอื่น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบการดื้อยา การเฝ้าระวังสถานการณ์การดื้อยา และนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียไก่ต่อไป

การเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียด้วยไพรเมอร์คู่ที่ 2 มีช่วงลำดับเบสตั้งแต่ 183 ถึง 1952 นั้นสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เพียงตัวอย่างเดียว คือ MNTH2543 ในไก่ที่มีการผ่านเชื้อต่อเนื่องแต่ไม่ได้รับยา pyrimethamine การศึกษาครั้งนี้ได้พยายามทดลองโดยใช้อุณหภูมิ annealing หลายระดับคือ 50, 55 และ 60 °C พบว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล มากถึง 1770 เบส และการวิเคราะห์หาลำดับเบสปรากฏผลไม่ชัดเจนเพียงพอที่จะนำมาเรียงลำดับหรือเปรียบเทียบกันได้ กล่าวได้ว่าการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียด้วยไพรเมอร์คู่ที่ 2 นั้นไม่ประสบความสำเร็จ ควรหาทางแก้ไขในการศึกษาในคราวต่อไปโดยออกแบบไพรเมอร์ให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวมากกว่าการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียด้วยไพรเมอร์คู่ที่ 1 แต่สั้นกว่าไพรเมอร์คู่ที่ 2 เพื่อว่าจะได้ครอบคลุมลำดับเบสของกรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆที่ไวหรือดื้อต่อการเปลี่ยนแปลงของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ได้ทั้งหมด

**ข้อเสนอแนะ**

ในการทดลองศึกษาเกี่ยวกับเรื่องมาลาเรียควรมีการวางแผนอย่างดี ทั้งการเตรียมการดูแลสัตว์ การศึกษาเกี่ยวกับตัวเชื้อ และยุง พาหะ เพื่อให้เชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและความรุนแรง ในระยะแรกของการทดลองย่อย ผู้นิพนธ์ได้ประสบกับอุปสรรคและปัญหาหลายครั้งทั้งในแง่ของการวางแผน การดำเนินงาน การเลี้ยงการจัดการเกี่ยวกับ ไก่ที่ใช้ทดลองแต่ละรุ่น ยุง และเชื้อ

มาลาเรีย ดังนั้นผู้ประสงค์ที่จะศึกษาทดลองเรื่องมาลาเรียไก่ควรเตรียมตัวและศึกษาถึงปัจจัยและผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นให้มากพอสมควร ข้อที่เสนอแนะมีดังต่อไปนี้

1. ควรมีการวางแผน ออกแบบการเก็บข้อมูล และทำการทดลองล่วงหน้าก่อนนำเสนอโครงร่าง เพื่อให้การทดลองมีข้อบกพร่องน้อยที่สุด และได้ข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ตรงเป้าหมาย
2. ควรมีการตรวจสอบเชื้อ *P. gallinaceum*ที่มีอยู่ในประเทศไทย เพื่อให้ทราบว่ามีไอโซเลทใดที่มีความไว หรือดื้อต่อยา pyrimethamine ก่อนจะนำไปใช้ในการทดลองอื่นต่อไป
3. ควรมีการใช้เชื้อมาลาเรียไอโซเลทที่มีความไวต่อยา pyrimethamine มาทดลองการศึกษาประสิทธิภาพของยา การทดลองจึงจะประสบความสำเร็จ
4. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่หลายๆ ประเภท
5. การทดลองให้เชื้อ *P. gallinaceum* ดื้อต่อยา pyrimethamine นั้นควรใช้ไก่ที่มีอายุเดียวกันทุกครั้ง
6. ควรมีการศึกษาเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลทต่างๆที่มีในประเทศไทย โดยการตรวจสอบหาตำแหน่งที่อาจมีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่นโดยการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ที่มีขนาดเหมาะสมด้วยเทคนิค PCR หรือ RFLP และควรทำ cloning ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเชื้อ *P. gallinaceum*ที่มีในประเทศไทย ก่อนนำไปหาลำดับเบส เพื่อให้ผลการทดลองมีความจำเพาะมากที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย