

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ในการรักษาโรคมลาเรียไก่

4.1.1 ผลของยา pyrimethamine ต่ออัตราการติดเชื้อในกระแสนเลือด

การศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ต่ออัตราการติดเชื้อก่อนและหลังการให้ยารักษาในไก่ไข่มุข 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ไก่กลุ่มที่ 3-11 ซึ่งติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine ในขนาด 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มก.กก.⁻¹ ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ไก่กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา และไก่กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปรากฏว่า ไก่กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยาไม่พบการติดเชื้อตลอดการทดลอง ขณะที่ไก่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา และไก่กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา pyrimethamine ทุกกลุ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าไม่มีอัตราการติดเชื้อ *P. gallinaceum* 100% ยกเว้นไก่ทดลองในกลุ่มที่ 10 ที่ได้รับยาขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ ตรวจพบเชื้อ 90.9% (ตารางที่ 4.1)

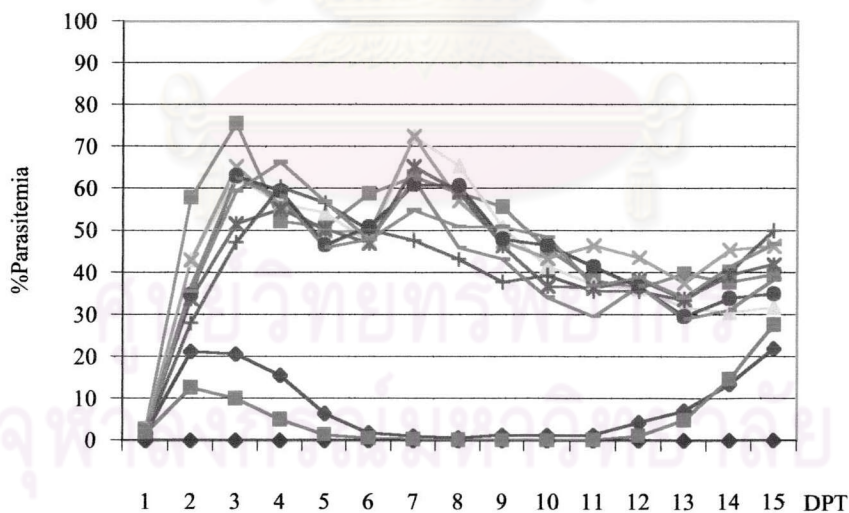
ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ไข่มุข อายุ 21 วัน จำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ก่อนและหลังการรักษาด้วยยา pyrimethamine ติดต่อกันนาน 5 วัน

กลุ่มที่	ยา pyrimethamine ที่ใช้ ขนาดต่างๆ (มก.กก. ⁻¹)	ไก่ติดเชื้อในวันสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)	
		ไก่ที่ติดเชื้อ/ไก่ทั้งหมด	%
1	Negative control	0/20	0
2	Positive control	2/2	100
3	0.04	9/9	100
4	0.1	9/9	100
5	0.2	10/10	100
6	0.5	10/10	100
7	1.0	11/11	100
8	2.5	12/12	100
9	5.0	10/10	100
10	7.5	10/11	90.9
11	10.0	5/5	100

4.1.2 ผลของยา pyrimethamine ต่อระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia)

การศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ต่อเชื้อมาลาเรียไก่งวงจากการเปลี่ยนแปลงของระดับเชื้อในกระแสเลือดที่พบในไก่ไข่เพศผู้ก่อนและหลังการให้ยารักษา

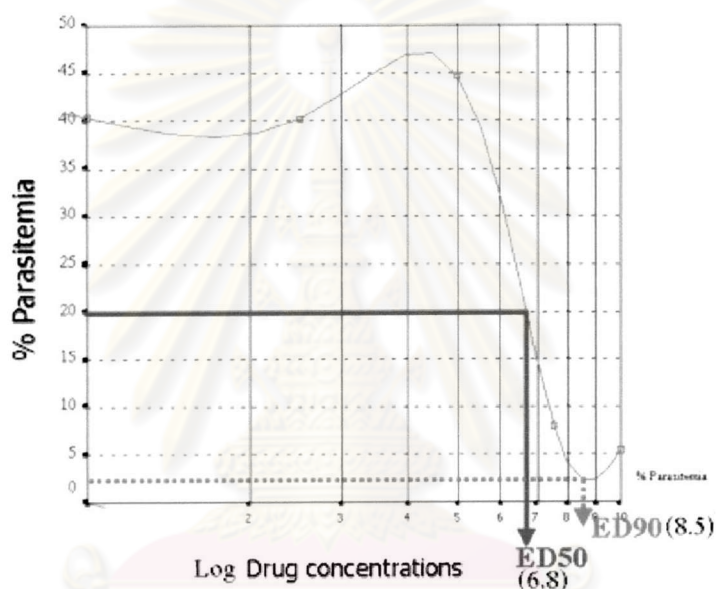
ไก่กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดตลอดการทดลอง ส่วนไก่กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา และไก่กลุ่มที่ 3-9 ซึ่งติดเชื้อและได้รับการรักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก.กก.⁻¹ ตามลำดับก่อนให้ยา (วันที่ 0) ระดับเชื้อในกระแสเลือดที่ตรวจพบมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 1.41% ถึง 2.81% ในวันที่ 1 และ 2 ของการให้ยา พบว่าระดับเชื้อขึ้นสูงมีค่าเฉลี่ย 75.6% ต่อมาในวันที่ 3 4 และ 5 ระดับเชื้อลดลงเล็กน้อย และกลับสูงขึ้นอีกในวันที่ 6 และต่อจากนั้นระดับเชื้อค่อยๆ ลดต่ำลงอยู่ในช่วง 29.5 ถึง 65.36% ไก่เลี้ยงกันตลอดการทดลอง แตกต่างจากไก่ทดลองกลุ่มที่ 10-11 ซึ่งติดเชื้อและได้รับการรักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 7.5 และ 10.0 มก.กก.⁻¹ ระดับเชื้อในกระแสเลือดมีค่าเฉลี่ยลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดการทดลอง (ตารางที่ ผ 1 และรูปที่ 4.1) เว้นแต่ไก่กลุ่มที่ 11 ที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 10.0 มก.กก.⁻¹ มีอัตราการตายสูงกว่าไก่กลุ่มที่ 10 ที่ได้รับยาขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ ถึง 30% (รูปที่ 4.4) ดังนั้น ขนาดยาที่ต่ำสุดที่มีผลต่อระดับเชื้อในกระแสเลือด (MED) ทำให้เชื้อ *P. gallinaceum* ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และไก่มีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อแต่ไม่ได้รับยาอย่างเห็นได้ชัด



รูปที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อ *P.gallinaceum* ในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ จำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ที่รักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10.0 มก.กก.⁻¹ ติดต่อกัน นาน 5 วัน และติดตามผลต่อเนื่องกันทุกวันนาน 15 วัน

4.1.3 ขนาดของยา pyrimethamine ที่ทำให้เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในกระแสเลือด ตาย 50% และ 90% (ED50 และ ED90)

ผลจากการคำนวณหาค่า ED50 และ ED90 ของยา pyrimethamine ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ทำให้ระดับเชื้อในกระแสเลือดลดลง 50% และ 90% เมื่อประเมินจากอัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่ทดลองกลุ่มต่างๆตั้งแต่เริ่มให้ยาจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (DPT 0-14) ปรากฏว่า ED50 และ ED90 ของยา pyrimethamine ต่อเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง มีค่าความเข้มข้นที่ระดับ 6.8 และ 8.5 มก. กก.⁻¹ โดยทำให้ระดับเชื้อในกระแสเลือดลดลง 50% และ 90% ตามลำดับ (รูปที่ 4.2)



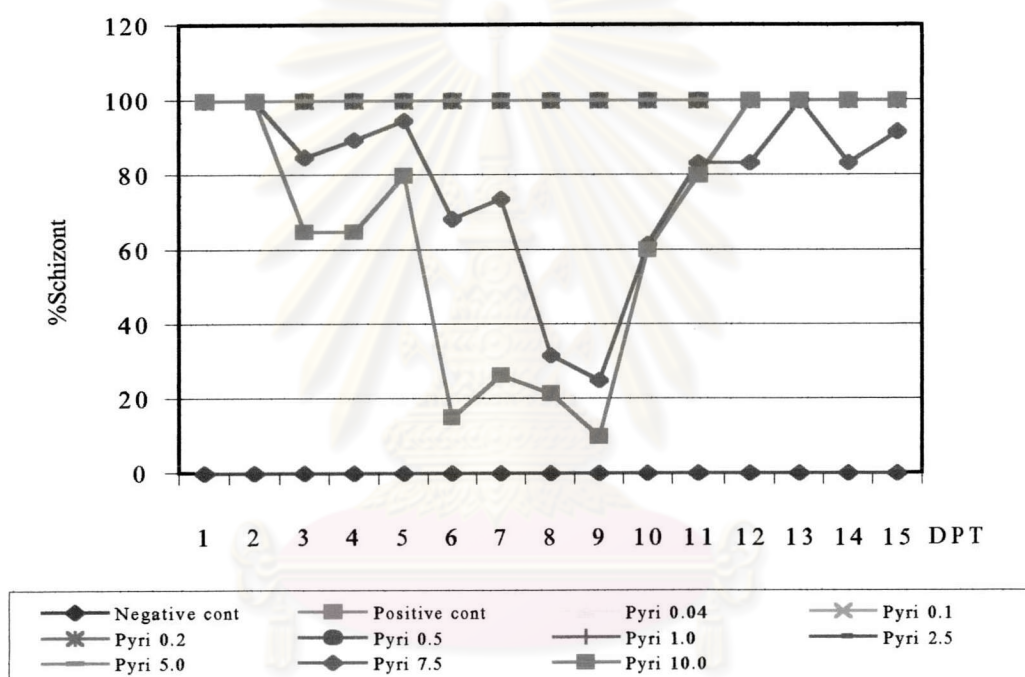
รูปที่ 4.2 log drug concentrations แสดง ED50 และ ED90 ของยา pyrimethamine ประเมินจากอัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด(% parasitemia) ในไก่ไข่มุขผู้ จำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ที่รักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10.0 มก.กก.⁻¹ ติดต่อกัน นาน 5 วัน และติดตามผลต่อเนื่องกันทุกวันนาน 15 วัน

4.1.4 ผลของยา pyrimethamine ต่อเชื้อระยะ schizont ในกระแสเลือด

ผลของยาด้านมาลาเรีย pyrimethamine ที่ศึกษาจากอัตราการตรวจพบเชื้อ *P.gallinaceum* ระยะ schizont ที่อยู่ในกระแสเลือด ก่อนและหลังให้ยารักษา ปรากฏว่าไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา ไม่พบเชื้อระยะใดอยู่ในกระแสเลือดตลอดการทดลอง ขณะที่ไก่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อและไม่ได้รับยา และกลุ่มที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ซึ่งเป็นไก่ติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยยา pyrimethamine ในขนาด 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มก.กก.⁻¹ ตามลำดับ ตรวจพบ

เชื้อระยะ schizont ในกระแสเลือดในไก่ทุกตัว (100%) ทุกวัน ตลอดการทดลอง (ตารางที่ ผ 2 และรูปที่ 4.3) และพบได้เป็นจำนวนมากใกล้เคียงกัน

สำหรับไก่ติดเชื้อมาที่ 10-11 ที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 และ 10.0 มก.กก.⁻¹ ปรากฏว่า schizont ที่อยู่ในกระแสเลือดมีจำนวนลดน้อยลงตั้งแต่วันที่ 2-10 DPT ของการทดลอง โดยไก่ทดลองกลุ่มที่ 10 ที่ได้รับยาขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ อัตราการตรวจพบ schizont ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 7 และ 8 คิดเป็น 31.6 และ 25 % ตามลำดับ สำหรับไก่ทดลองกลุ่มที่ 11 ที่ได้รับยาขนาด 10.0 มก.กก.⁻¹ อัตราการตรวจพบ schizont ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่ 5 ถึง 8 คิดเป็น 15, 26.3, 21.4 และ 10 % ตามลำดับ (ตารางที่ ผ 2 และรูปที่ 4.3)

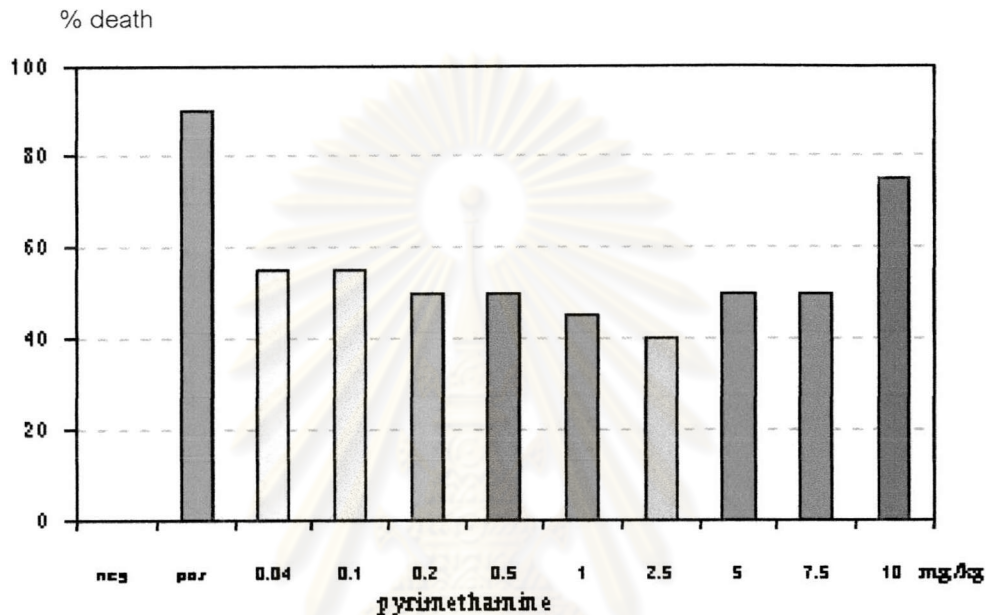


รูปที่ 4.3 อัตราร้อยละของไก่ที่ตรวจพบเชื้อ *P.gallinaceum* ระยะ schizont ในกระแสเลือดของไก่ไข่เพศผู้จำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ที่รักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10.0 มก.กก.⁻¹ ติดต่อกันนาน 5 วัน และติดตามผลต่อเนื่องกันทุกวันนาน 15 วัน

4.1.5 อัตราการตายของไก่ที่ติดเชื้อมาเรียหลังการรักษาด้วยยา pyrimethamine

ผลการประเมินจากอัตราการตายของไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* หลังการรักษาด้วยยา pyrimethamine ในไก่ทดลองจำนวน 11 กลุ่ม ที่ติดเชื้อ ปรากฏว่า ไก่ควบคุมกลุ่มที่ 1 ซึ่งไม่ติดเชื้อ และไม่ได้รับยาไม่มีไก่ตาย (อัตราการตาย = 0%) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) กับไก่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับการรักษามีอัตราการตายสูงสุดถึง 90 % (ตารางที่ ผ 3 และรูป

ที่ 4.4) ส่วนไก่ที่ติดเชื้อและทำการรักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 และ 7.5 มก.กก.⁻¹ ตามลำดับ มีอัตราการตายต่ำกว่าไก่ควบคุมกลุ่มที่ 2 ที่ติดเชื้อและไม่ได้รับการรักษา ($P \leq 0.05$) แต่อัตราการตายสูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 1 ที่ไม่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา สำหรับไก่กลุ่มที่ 11 ซึ่งได้รับการรักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 10.0 มก.กก.⁻¹ อัตราการตายสูงถึง 75 % ซึ่งไม่แตกต่างกับการตายของไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อและไม่ได้รับยา



รูปที่ 4.4 อัตราการตายของไก่ไข่มุขในไก่ไข่มุขจำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ที่รักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10.0 มก.กก.⁻¹ ติดต่อกัน นาน 5 วัน และติดตามผลต่อเนื่องกันทุกวัน นาน 15 วัน

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* หลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 เท่าของขนาด MED

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่อง ในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มสูงเป็น 2 เท่าขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ 2, 4, 8 จนถึง 16 เท่าขนาด MED โดยให้ไก่ที่ได้รับเชื้อกินยาขนาดเดียวกัน 2 รุ่นต่อเนื่อง และเพิ่มยาเป็น 2 เท่าในไก่ที่ติดเชื้อรุ่นถัดๆ ไป โดยขนาดเริ่มต้นที่ให้ คือ 7.5 มก.กก.⁻¹ ซึ่งเป็นขนาดของยาในการทดลองที่ 1 ข้อ 4.1.3 ที่มีผลทำให้ระดับเชื้อในกระแสเลือดลดลงอย่างเห็นได้ชัด (MED, minimum effective dose) การทดลองยาในไก่แต่ละรุ่นใช้ไก่ 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อแต่ไม่ได้ให้ยา กิน กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ได้รับเชื้อพร้อมทั้งให้ยา กินในขณะเดียวกัน ผลที่ได้ปรากฏดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.2

4.2.1 ผลของยา pyrimethamine ขนาด MED ครั้งที่ 1 และ 2 ต่อระดับเชื้อในกระแสเลือด

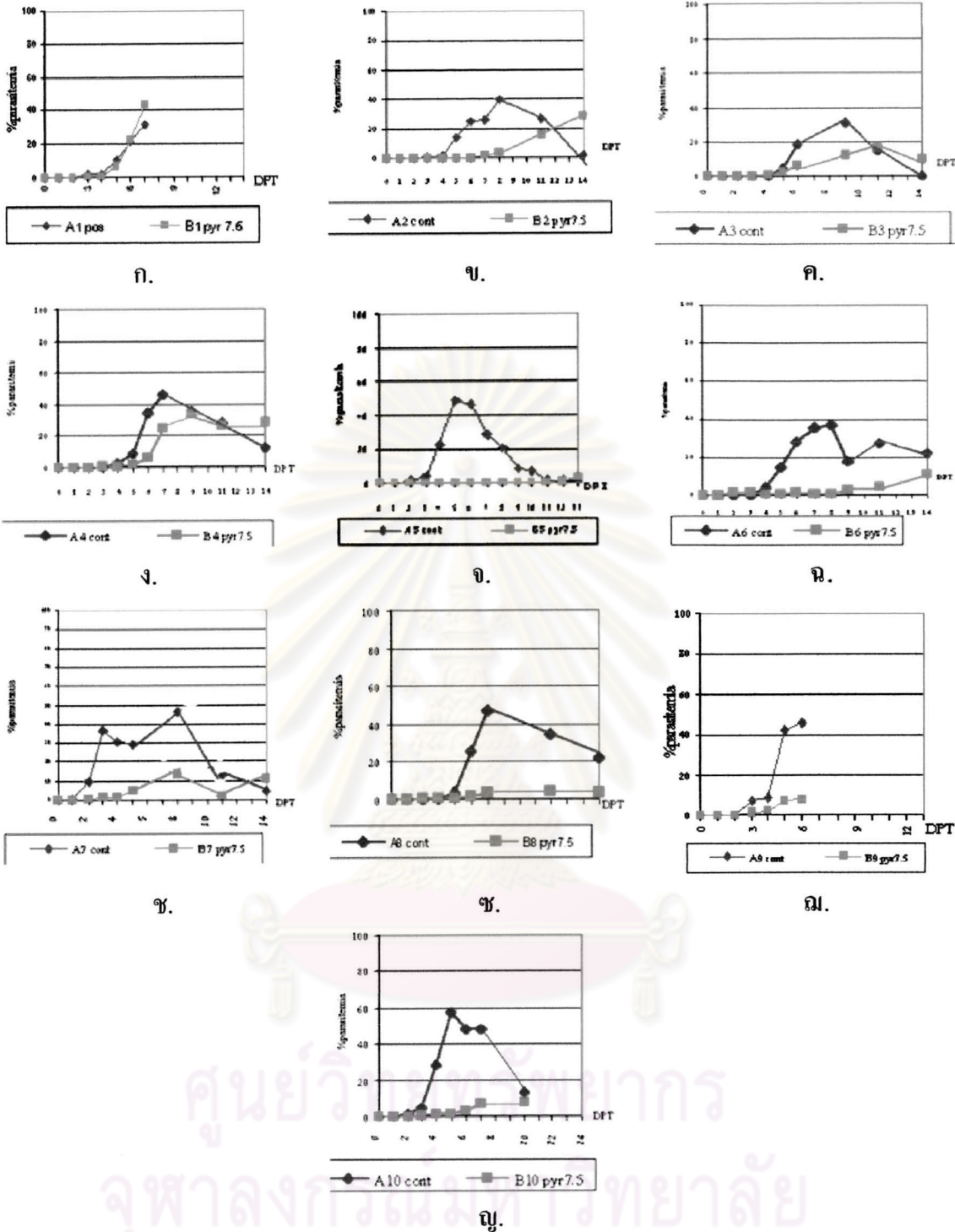
จากการทดลองให้ยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ ในครั้งแรก ในไก่ไข่ อายุ 3 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าตั้งแต่วันที่ 2-7 หลังการให้ยารักษา (DPT) ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A1) ไม่แตกต่างกับไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยา (B1) (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.5ก) โดยระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่ม A1 มีค่าเฉลี่ยระหว่าง $0.22 \pm 0.13\%$ ถึง $31.8 \pm 21.3\%$ ส่วนไก่กลุ่ม B1 ที่ติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine มีค่าเฉลี่ยระหว่าง $0.23 \pm 0.09\%$ ถึง $43.4 \pm 23.3\%$

ผลการให้ยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ เป็นครั้งที่ 2 ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 3 สัปดาห์ ปรากฏว่าตั้งแต่วันที่ 2-8 DPT ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่ควบคุมกลุ่มที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A2) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยา (B2) ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.5ข) โดยระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่ม A2 มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.04 ± 0.05 ถึง $40.3 \pm 10.0\%$ หลังจากนั้นในวันที่ 11 และ 14 DPT ลดลงเหลือ $27.5 \pm 34.6\%$ และ $1.6 \pm 0.6\%$ ตามลำดับ ส่วนไก่กลุ่ม B2 ที่ได้รับเชื้อต่อเนื่องมาจาก B1 และได้รับยา pyrimethamine 7.5 มก.กก.⁻¹ ในวันที่ 2-8 DPT ระดับเชื้อในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $0.04 \pm 0.05\%$ ถึง $3.6 \pm 3.9\%$ จากนั้นระดับเชื้อในกระแสเลือดในวันที่ 11 และ 14 DPT เพิ่มขึ้นเป็น $16.2 \pm 11.9\%$ และ $28.7 \pm 48.7\%$ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-3 สัปดาห์ กลุ่มละ 5 ตัว ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก. กก.⁻¹ ครั้งที่ 1 และ 2 ครั้งละ 4 วันติดต่อกัน และติดตามผลนาน 7-14 วัน

MED ครั้งที่	กลุ่ม	การทดลอง	0dpt	1dpt	2dpt	3dpt	4dpt	5dpt	6dpt	7dpt	8dpt	11dpt	14dpt
1	A1 (ควบคุม)	Positive control	0	0	0.22 ± 0.13	2.05 ± 3.1	2.62 ± 4.3	10.5 ± 17.7	21.7 ± 15.6	31.8 ± 21.3			
	B1 (ให้ยา)	Pyrimeth 7.5 mg/kg	0	0	0.23 ± 0.09	0.86 ± 0.6	1.06 ± 1.1	6.7 ± 7.2	22.7 ± 19.1	43.4 ± 23.3			
2	A2 (ควบคุม)	Positive control	0	0	0.04 ± 0.05	0.9 ± 1.3	1.88 ± 2.5	14.1 ± 18.4	24.8 ± 22.6 ^b	25.7 ± 15.4 ^b	40.3 ± 10.0 ^b	27.5 ± 34.6	1.6 ± 0.6
	B2 (ให้ยา)	Pyrimeth 7.5 mg/kg	0	0	0.04 ± 0.05	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.1 ± 0.07 ^a	1.5 ± 1.9 ^a	3.58 ± 3.9 ^a	16.2 ± 11.9	28.7 ± 48.7

($p < 0.05$)



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้อายุ 2-4 สัปดาห์ในกลุ่มควบคุม (A1-A10) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และไม่ได้รับยา pyrimethamine กลุ่มทดลอง (B1-B10) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ นาน 4 วัน ติดต่อกัน และให้ยาในไก่ที่ติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น แต่ละรุ่นติดตามผลนาน 7-14 วัน หลังจากให้ยา pyrimethamine ขนาด MED อย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น (ก-ญ = ไก่รุ่นที่ 1-10)

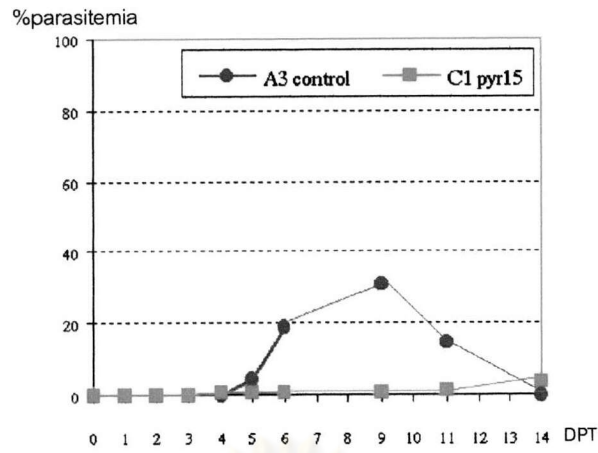
4.2.2 ผลของยา pyrimethamine ขนาด 2 เท่าของ MED (2X MED) ครั้งที่ 1 และ 2 ต่อระดับเชื้อในกระแสเลือด

ผลการให้ยา pyrimethamine ขนาด 15 มก.กก.⁻¹ ในครั้งที่ 1 ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-3 สัปดาห์ ปรากฏว่าตั้งแต่วันที่ 2-8 DPT ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A3) แตกต่างกับไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยา (C1) ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.6 ก) ซึ่งไก่กลุ่ม C1 นี้ได้รับการฉีดเชื้อต่อเนื่องจากเลือดของไก่กลุ่ม B2 โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่ม C1 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยระหว่าง $0.04 \pm 0.05\%$ ถึง $0.6 \pm 0.6\%$ หลังจากนั้นในวันที่ 11 และ 14 DPT เพิ่มขึ้นเป็น $1.35 \pm 0.2\%$ และ $3.5 \pm 1.4\%$ ตามลำดับ ส่วนไก่กลุ่ม C 2 ที่ได้รับเชื้อต่อเนื่องมาจาก C1 และได้รับยา pyrimethamine 15 มก.กก.⁻¹ เช่นเดียวกันนั้น มีค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดแตกต่างจากไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A4) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.6ข) ในวันที่ 2-9 DPT ระดับเชื้อในกระแสเลือดไก่กลุ่ม C 2 เพิ่มขึ้นระหว่าง $0.24 \pm 0.17\%$ ถึง $1.2 \pm 1.19\%$ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $0.04 \pm 0.05\%$ ถึง $3.6 \pm 3.9\%$ และระดับเชื้อในกระแสเลือดในวันที่ 11 และ 14 DPT เพิ่มขึ้นเป็น $1.9 \pm 0.6\%$ และ $28.9 \pm 24.9\%$ ตามลำดับ

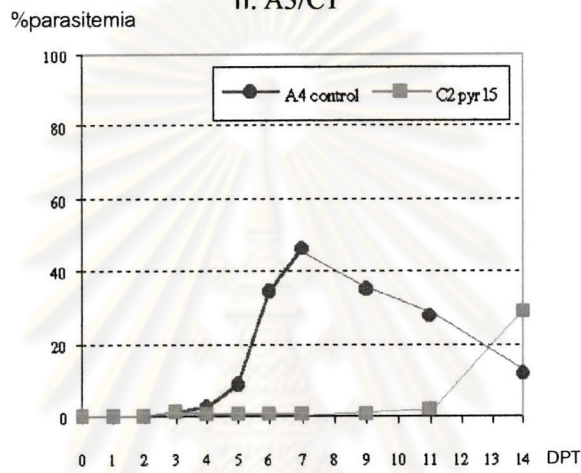
ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มละ 5 ตัว ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ขนาด 15 มก. กก.⁻¹ ครั้งที่ 1 และ 2 ครั้งละ 4 วันติดต่อกัน และติดตามผลนาน 7-14 วัน

2X MED ครั้งที่	กลุ่ม	การทดลอง	0dpt	1dpt	2dpt	3dpt	4dpt	5dpt	6dpt	7dpt	9dpt	11dpt	14dpt
1	A3 (ควบคุม)	Positive control	0	0	0	0.07 ± 0.09	0.3 ± 0.3	4.4 ± 7.1	18.9 ± 17.8	-	31.3 ± 17.0	14.6 ± 18.6	0.3 ± 0.28
	C1 (ให้ยา)	Pyr 15 mg/kg	0	0	0.04 ± 0.05	0.14 ± 0.1	0.48 ± 0.7	0.6 ± 1.3	0.7 ± 0.9	-	0.6 ± 0.6	1.35 ± 0.2	3.5 ± 1.4
2	A4 (ควบคุม)	Positive control	0	0	0.08 ± 0.04	1.04 ± 1.68	2.66 ± 4.1	8.8 ± 7.1 ^b	34.7 ± 18.4 ^b	46.3 ± 12.5 ^c	35	28	12
	C2 (ให้ยา)	Pyr 15 mg/kg	0	0	0.24 ± 0.17	1.2 ± 1.19	0.34 ± 0.32	0.72 ± 1.3 ^a	0.74 ± 1.3 ^a	0.74 ± 1.3 ^a	0.9 ± 0.8	1.9 ± 0.6	28.9 ± 24.9

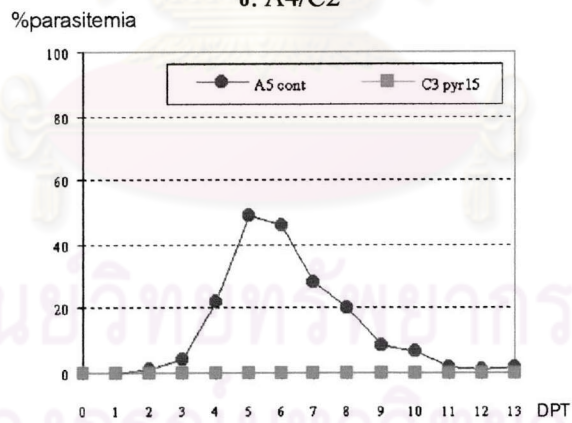
($p < 0.05$)



ก. A3/C1



ข. A4/C2



ค. A5/C3

รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่มุขเพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุม (A3-A5) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และไม่ได้รับยา pyrimethamine และกลุ่มทดลอง (C1-C3) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 15 มก. กก.⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกันและติดตามผลนาน 7-14 วัน หลังจากให้ยา รุ่นที่ 1-3

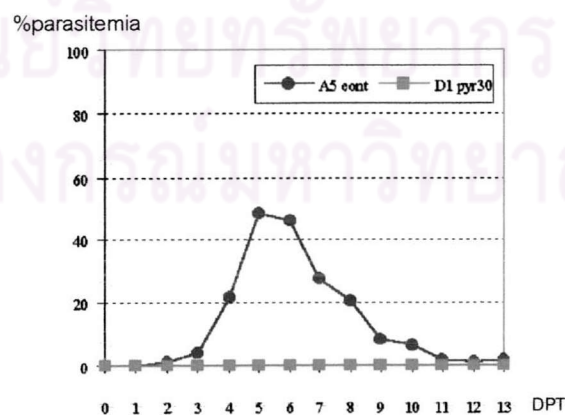
4.2.3 ผลของยา pyrimethamine ขนาด 4 เท่าของ MED (4X MED) ครั้งที่ 1 ต่อระดับเชื้อในกระแสเลือด

ผลการให้ยา pyrimethamine ขนาด 30 มก.กก.⁻¹ ในครั้งที่ 1 ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-3 สัปดาห์ ปรากฏว่า ในวันที่ 2-5 DPT ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A5) ขึ้นสูงระหว่าง 1.36 ± 1.1 ถึง $48.8 \pm 3.4\%$ หลังจากนั้นในวันที่ 9 และ 13 DPT ระดับเชื้อลดต่ำลงเหลือ $8.5 \pm 3.5\%$ และ $1.8 \pm 1.7\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.7) ส่วนไก่กลุ่ม D1 ที่ได้รับเชื้อต่อเนื่องมาจาก C2 ที่ได้รับยาขนาด 15 มก.กก.⁻¹ เป็นครั้งที่ 2 แล้วนั้น พบว่าเชื้อในกระแสเลือดมีระดับต่ำ โดยในวันที่ 2-6 ของการทดลอง ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้ออยู่ระหว่าง $0.02 \pm 0.04\%$ ถึง $0.12 \pm 0.08\%$ ซึ่งแตกต่างจากไก่กลุ่ม A5 ที่เป็นกลุ่มควบคุมมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังจากนั้นตั้งแต่วันที่ 7-9 DPT ตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือด และในวันที่ 10 DPT ไก่ทดลองทุกตัวในกลุ่ม D1 ได้ตายลงทั้งหมด จึงยุติการศึกษาทดลองการให้ยา pyrimethamine ขนาดต่อไป

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 21 วัน กลุ่มละ 5 ตัว ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ขนาด 30 มก. กก.⁻¹ ครั้งที่ 1 นาน 4 วัน ติดต่อกัน และติดตามผลนาน 10 วัน

4X MED ครั้งที่	กลุ่ม	การทดลอง	หลังให้ยารักษา (วัน, dpt)													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	A5 (ควบคุม)	Positive control	0	0	1.36 ± 1.1^b	4.1 ± 3.4^b	21.8 ± 9.5^b	48.8 ± 3.4^b	46.2 ± 7.5^b	28 ± 7.2^b	20.5 ± 14.8^b	8.5 ± 3.5	6.5 ± 2.1	1.9 ± 1.5	1.25 ± 1.1	1.8 ± 1.7
	D1 (ให้ยา)	Pyr 30 mg/kg	0	0	0.12 ± 0.08^a	0.04 ± 0.05^a	0.02 ± 0.04^a	0	0.02 ± 0.04^a	0	0	0	ไก่ตายหมด	ไก่ตายหมด	ไก่ตายหมด	ไก่ตายหมด

($p < 0.05$)



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุม (A5) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และไม่ได้รับยา pyrimethamine และกลุ่มทดลอง (D1) ที่ได้รับเชื้อ และได้รับยาขนาด 30 มก. กก.⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกันและติดตามผลนาน 7-14 วัน หลังให้ยา รุ่นที่ 1

4.2.4 ศึกษาระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด หลังจากได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าของขนาด MED ขึ้นไป

4.2.4.1 ระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด หลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด MED อย่างต่อเนื่องในไก่ 10 รุ่น

ผลของการผ่านเชื้อ *P. gallinaceum* จากไก่กลุ่มทดลองที่เชื้อเคยได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ มาแล้ว 2 รุ่น (B1 และ B2) ในข้อ 4.2.1 โดยใช้เชื้อปริมาณ 5×10^6 infected rbc ต่อไก่ 1 ตัว ฉีดเข้าทางเส้นเลือดของไก่ไขเพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ ติดต่อกัน 10 รุ่น และแต่ละรุ่นให้ยา ในขนาดเดิมตั้งแต่เริ่ม ได้รับเชื้อติดต่อกันนาน 4 วัน ส่วนไก่กลุ่มควบคุมนั้นใช้เชื้อที่ไม่เคยได้รับยามา โดยตลอด ปรากฏว่า สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดของไก่ทั้ง 2 กลุ่มได้ตลอดการทดลอง ไก่กลุ่มควบคุม (A1-A10) เริ่มตรวจพบเชื้อในวันที่ 1-2 DPT ทุกกลุ่มมีอัตราการติดเชื้อ 100 % และค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่แต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.5 โดยระดับเชื้อ ที่พบในกลุ่ม A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 และ A10 มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดถึงสูงสุดตั้งแต่ 0.22 ± 0.13 ถึง 31.8 ± 21.3 , 0.04 ± 0.05 ถึง 40.3 ± 10.0 , 0.07 ± 0.09 ถึง 31.3 ± 17.0 , 0.08 ± 0.04 ถึง 46.3 ± 12.5 , 1.25 ± 1.1 ถึง 48.8 ± 3.4 , 0.16 ± 0.3 ถึง 36.7 ± 9.9 , 0.92 ± 0.7 ถึง 46.7 ± 16 , 0.1 ± 0.02 ถึง 46.5 ± 31.5 , 0.12 ± 0.08 ถึง 45.8 ± 5.1 และ 1.44 ± 1.05 ถึง 57.4 ± 17.8 ตามลำดับ ไก่กลุ่มทดลอง (B1-B10) เริ่มตรวจพบเชื้อในวันที่ 1-2 DPT ทุกกลุ่มมีอัตราการติดเชื้อ 100 % และค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่แต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 โดยระดับเชื้อที่พบในกลุ่ม B1, B2, B43, B4, B5, B6, B7, B8, B9 และ B10 มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดถึงสูงสุดตั้งแต่ 0.23 ± 0.09 ถึง 43.4 ± 23.3 , 0.02 ± 0.04 ถึง 28.7 ± 48.7 , 0.04 ± 0.05 ถึง 16.1 ± 19.7 , 0.08 ± 0.04 ถึง 33.7 ± 8.0 , 0.01 ± 0.02 ถึง 3.4 ± 2.9 , 0.46 ± 0.46 ถึง 11.3 ± 5.7 , 0.06 ± 0.05 ถึง 46.7 ± 16 , 0.1 ± 0.02 ถึง 46.5 ± 31.5 , 0.12 ± 0.08 ถึง 7.9 ± 20.7 และ 0.36 ± 0.08 ถึง 7.9 ± 13.1 ตามลำดับ เริ่มมีความแปรปรวน เชื้อมีระดับเพิ่มขึ้นและลดลงในบางช่วงเวลาของการทดลอง และบางช่วงมีความแตกต่างกับไก่กลุ่มควบคุมที่ผ่านเชื้อและไม่เคยได้ รับยาอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี พ.ศ 2543

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด ของไก่ไขเพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ ในกลุ่มควบคุม (A1-A10) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และไม่ได้รับยา pyrimethamine และกลุ่มทดลอง (B1-B10) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกัน และให้ยาในไก่ที่ติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น แต่ละรุ่นติดตามผลนาน 7-14 วัน หลังจากให้ยา pyrimethamine ในขนาด MED อย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น ผลปรากฏว่าเชื้อในกระแสเลือดของ ไก่กลุ่มควบคุมมีระดับสูงกว่าเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับยา ยกเว้นในรุ่นแรกที่เชื้อ ในกระแสเลือดของไก่กลุ่ม A1 (กลุ่มควบคุม) และของไก่กลุ่ม B1 (กลุ่มทดลอง) มีระดับสูงใกล้เคียง กันและรูปแบบของระดับเชื้อไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.5) เชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่มทดลอง B5-

B10 มีระดับต่ำมาก และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อในกระแสดเลือดของไก่กลุ่มควบคุม A5-A10 (รูปที่ 4.5 ฉ-ญ) สำหรับเชื้อในกระแสดเลือดของไก่กลุ่มทดลอง B2-B4 นั้น หลังจากหยุดให้ยาไปเพียง 2 วัน ถึง 3 วันระดับเชื้อมีแนวโน้มสูงขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.5 ข-ง)

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสดเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุม (A1-A10) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และไม่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกัน และให้ยาในไก่ที่ติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น แต่ละรุ่นติดตามผลนาน 7-14 วัน

MED ครั้งที่	กลุ่ม ควบคุม	หลังให้ยารักษา (วัน. dpt)														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	A1	0	0	0.22± 0.13	2.05± 3.1	2.62± 4.3	10.5 ±17.7	21.7± 15.6	31.8± 21.3							
2	A2	0	0	0.04± 0.05	0.9 ± 1.3	1.88± 2.5	14.1± 18.4	24.8± 22.6 ^b	25.7± 15.4 ^b	40.3± 10.0 ^b			27.5 ± 34.6			1.6 ± 0.6
3	A3	0	0	0	0.07± 0.09	0.3± 0.3	4.4± 7.1	18.9± 17.8			31.3± 17.0		14.6± 18.6			0.3± 0.28
4	A4	0	0	0.08± 0.04	1.04± 1.68	2.66± 4.1	8.8± 7.1 ^b	34.7± 18.4 ^b	46.3± 12.5 ^c		35		28			12
5	A5	0	0	1.36± 1.1 ^b	4.1± 3.4 ^b	21.8± 9.5 ^b	48.8± 3.4 ^b	46.2± 7.5 ^b	28± 7.2 ^b	20.5± 14.8 ^b	8.5± 3.5	6.5± 2.1	1.9± 1.5	1.25± 1.1	1.8± 1.7	
6	A6	0	0	0.16± 0.3	0.3± 0.39	4.42± 6.5	14.4± 13.8	27.8± 11.9 ^b	35± 8.5 ^b	36.7± 9.9 ^b	18± 6.0 ^b		27± 18.4			22± 17.7
7	A7	0	0.9 2± 0.7	10.02 ±7.5 ^b	36.8± 27.2 ^b	31.2± 17.7 ^b	29.6± 10.6 ^b			46.7± 16			1.27± 1.1 ^b			4.6± 4.8
8	A8	0	0	0.1± 0.02	0.92± 0.7	3.7± 2.2 ^b	26.0± 10.1 ^b	46.5± 31.5 ^b				34.4± 28.3			22.5± 18.9	
9	A9	0	0	0.12± 0.08	7.4± 2.9 ^b	9.0± 1.9 ^b	42.0± 5.6 ^b	45.8± 5.1 ^b								
10	A10	0	0	1.44± 1.05	5.1± 4.7 ^b	28.3± 10.8 ^b	57.4± 17.8 ^b	48.3± 11.7 ^b	47.7± 19.4 ^b			13.0± 7.1				

(p<0.05)

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มทดลอง (B1-B10) ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก. กก.⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกัน และให้ยาในไก่ที่ติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น แต่ละรุ่นติดตามผลนาน 7-14 วัน

ครั้งที่	กลุ่มที่ได้รับยา MED	หลังให้ยารักษา (วัน. dpt)														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	B1	0	0	0.2 3± 0.0 9	0.86± 0.6	1.06± 1.1	6.7 ± 7.2	22.7± 19.1	43.4± 23.3							
2	B2	0	0	0.0 4± 0.0 5	0.02± 0.04	0.02± 0.04	0.02± 0.04	0.1 ±0.07 a	1.5 ± 1.9 ^a	3.58± 3.9 ^a			16.2 ± 11.9			28.7 ± 48.7
3	B3	0	0	0.04 ± 0.05	0.3 ± 0.4	1.1 ± 1.63	2.68 ± 3.1	6.0 ±1 1.2				12.7 ± 10.4			16.1 ± 19.7	10
4	B4	0	0	0.0 8± 0.0 4	0.54± 0.57	0.74± 0.8	1.4± 1.1 ^a	6.5± 6.3 ^a	25.0± 10.4 ^b			33.7± 8.0			26.7± 7.6	28.7± 20.7
5	B5	0	0	0.2 6± 0.2 a	0.26± 0.18 ^a	0.2± 0.12 ^a	0.2± 0.17 ^a	0.16± 0.1 ^a	0.1± 0.12 ^a	0.04± 0.04 ^a	0.01± 0.02	0.08± 0.14	0.2± 0.3	0.4± 0.5	3.4± 2.9	
6	B6	0	0	1.4 6± 1.1	1.5± 1.3	0.96± 0.7	0.9± 0.6	1.12± 0.8 ^a	0.46± 0.46 ^a	0.9± 1.8 ^a	2.7± 3.1 ^a			4.5± 3.7		11.3± 5.7
7	B7	0	0.0 6± 0.0 5	0.4 ± 0.4 a	1.3± 1.1 ^a	1.8± 1.7 ^a	4.9± 7.6 ^a				13.3± 17.9			2.2± 1.8 ^a		11.3± 17.9
8	B8	0	0	0.8 ± 0.8	1.2± 1.1	1.2± 1.4 ^a	1.4± 1.5 ^a	1.8± 1.7 ^a					4.1± 3.7			3.4± 18.0
9	B9	0	0	0.3 7± 0.3 4	1.1± 0.9 ^a	1.9± 4.4 ^a	7.3± 18.8 ^a	7.9± 20.7 ^a								
10	B10	0	0	0.3 6± 0.0 8	0.53± 0.6 ^a	1.7± 1.8 ^a	1.9± 2.8 ^a	3.4± 4.1 ^a	6.9± 7.8 ^a							7.9± 13.1

(p<0.05)

4.2.4.2 ระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด หลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 2 เท่าของMED (2X MED) อย่างต่อเนื่องในไก่ (3 รุ่น)

ผลของการผ่านเชื้อ *P. gallinaceum* จากไก่กลุ่มทดลองที่เชื้อเคยได้รับยา pyrimethamine ขนาด 15 มก.กก.⁻¹ มาแล้ว 2 รุ่น (C1 และ C2) ในข้อ 4.2.2 ได้ใช้เชื้อปริมาณ 5×10^6 infected rbc ต่อไก่ 1 ตัว ฉีดเข้าทางเส้นเลือดของไก่ไขเพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ ต่อเนื่องกัน โดยให้ยาในขนาดเดิมตั้งแต่เริ่มได้รับเชื้อ ติดต่อกันนาน 4 วัน ส่วนไก่กลุ่มควบคุมนั้นใช้เชื้อที่ไม่เคยได้รับยามาโดยตลอด ปรากฏว่า ไก่ทดลองรุ่นที่ 3 (C3) ซึ่งได้รับเชื้อและได้รับยานั้น สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดในระดับที่ต่ำมาก ระหว่าง $0.02 \pm 0.04\%$ ถึง $0.07 \pm 0.04\%$ ในวันที่ 2-4 DPT และหลังจากนั้นตรวจไม่พบเชื้อจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งเป็นการยุติการทดลองยา pyrimethamine ขนาด 15 มก.กก.⁻¹ ตั้งแต่นั้นมา สำหรับไก่กลุ่มควบคุม (A5) ตรวจพบเชื้อมีค่าเฉลี่ยได้ในระดับ 1.36 ± 1.1 ถึง 48.8 ± 3.4 (ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6)

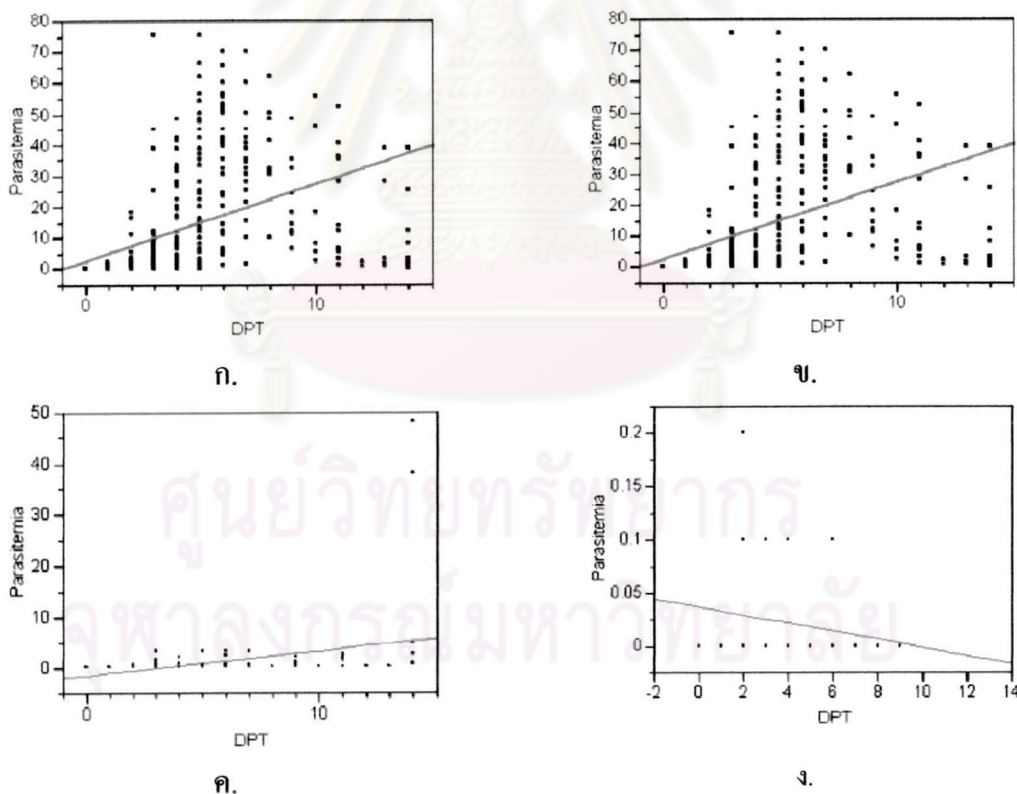
ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไขเพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มละ 5 ตัว ที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ในขนาด 15 มก. กก.⁻¹ ครั้งที่ 1, 2 และ 3 ครั้งละ 4 วันติดต่อกัน และติดตามผลนาน 7-14 วัน

2X MED ครั้งที่	กลุ่ม	การทดลอง	0 dpt	1 dpt	2 dpt	3 dpt	4 dpt	5 dpt	6 dpt	7 dpt	8 dpt	9 dpt	10 dpt	11 dpt	12 dpt	13 dpt	14 dpt
1	A3	Positive control	0	0	0	0.07±0.09	0.3±0.3	4.4±7.1	18.9±17.8	-		31.3±17.0		14.6±18.6			0.3±0.28
	C1	Pyr 15 mg/kg	0	0	0.04±0.05	0.14±0.1	0.48±0.7	0.6±1.3	0.7±0.9	-		0.6±0.6		1.35±0.2			3.5±1.4
2	A4	Positive control	0	0	0.08±0.04	1.04±1.68	2.66±4.1	8.8±7.1 ^b	34.7±18.4 ^b	46.3±12.5 ^c		35		28			12
	C2	Pyr 15 mg/kg	0	0	0.24±0.17	1.2±1.19	0.34±0.32	0.72±1.3 ^a	0.74±1.3 ^a	0.74±1.3 ^a		0.9±0.8		1.9±0.6			28.9±24.9
3	A5	Positive control	0	0	1.36±1.1 ^b	4.1±3.4 ^b	21.8±9.5 ^b	48.8±3.4 ^b	46.2±7.5 ^b	28±7.2 ^b	20.5±14.8 ^b	8.5±3.5	6.5±2.1	1.9±1.5	1.2±1.1	1.8±1.7	
	C3	Pyr 15 mg/kg	0	0	0.07±0.04 ^a	0.02±0.04 ^a	0.02±0.04 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(p<0.05)

4.2.7 ความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่ที่ได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่อง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่ โดยใช้โปรแกรม JMP plot graph ของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่มที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยารักษา 10 รุ่น ได้ผลดังรูปที่ 4.8 ก ปรากฏว่า ระดับเชื้อในกระแสเลือดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5, 15 และ 30 มก กก.⁻¹ อย่างต่อเนื่อง โดยพบว่า ระดับเชื้อในกระแสเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับยาในขนาด 7.5 และ 15 มก กก.⁻¹ มีความสัมพันธ์ที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน (รูปที่ 4.8ข และ 4.8ค) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่กลุ่มดังกล่าวมีการเพิ่มสูงขึ้นคล้ายคลึงกัน เว้นแต่ระดับของเชื้อเท่านั้นที่แตกต่างกัน โดยไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยารักษาด้วยยา pyrimethamine ต่อเนื่องมีระดับเชื้อต่ำกว่าตามลำดับและเป็นสัดส่วนกับปริมาณยาที่ได้รับ ในขณะที่ระดับเชื้อในกระแสเลือดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับยาในขนาด 30 มก.กก.⁻¹ มีความสัมพันธ์ที่เป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม (รูปที่ 4.8ง) ซึ่งให้เห็นว่าไก่ที่ติดเชื้อและได้รับยาในขนาดดังกล่าวมีความไม่สมดุล อาจทำให้เกิดปัญหาข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ได้



รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดระหว่างไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยารักษาและ ไก่กลุ่มทดลองที่ติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine

(ก) ไม่ได้รับยา (ข) ได้รับยา 7.5 มก กก.⁻¹ (ค) ได้รับยา 15 มก กก.⁻¹ (ง) ได้รับยา 30 มก กก.⁻¹

4.3 การทดลองที่ 3 ศึกษา ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum*

4.3.1 ศึกษา ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลต MNTH2543 ที่ไม่ได้รับยา และได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 16 เท่าของขนาด MED

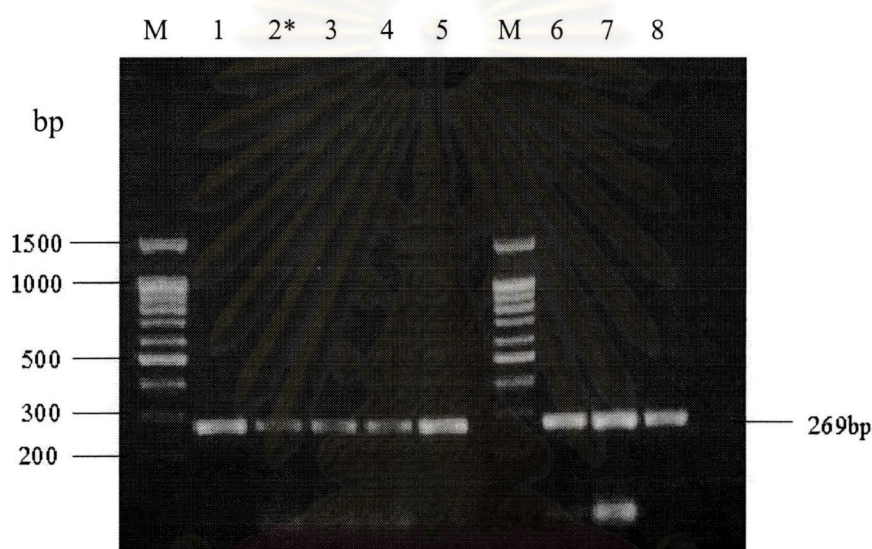
ผลจากการศึกษา ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลตกลุ่มทดลองที่ติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine ต่อเนื่อง 2 ขนาด คือ ขนาด MED (7.5 มก.กก.⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกัน) 10 รุ่น (B1-B10) และ 2 X MED (15 มก.กก.⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกัน) โดยในไอโซเลตกลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยาต่อเนื่องขนาด MED นั้น ได้เลือกเก็บเลือดติดเชื้อจากไอโซเลตที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 (B2, B4, B6, B8 และ B10) ส่วนไอโซเลตกลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยาต่อเนื่องขนาด 2X MED ได้เลือกเก็บเลือดติดเชื้อได้ครั้งเดียว คือ จากไอโซเลตที่ 2 (C2) เท่านั้น สำหรับไอโซเลตควบคุมกลุ่มที่ติดเชื้อต่อเนื่องแต่ไม่เคยได้รับยา (A1-A10) ได้เลือกเก็บเลือดจากไอโซเลตที่ 2, 6 และ 10 (A2, A6, A10)

4.3.1.1 ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1

ปรากฏว่า ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลต MNTH2543 ที่เตรียมจากเลือดทุกตัวอย่างทั้งจากไอโซเลตควบคุมกลุ่มที่ติดเชื้อต่อเนื่องแต่ไม่เคยได้รับยา และไอโซเลตกลุ่มที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ได้รับยาต่อเนื่องขนาด MED จากไอโซเลตที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 (B2, B4, B6, B8 และ B10) และ ที่ได้รับยาขนาด 2X MED จากไอโซเลตที่ 2 (C2) 1 ตัวอย่าง น้ำหนักโมเลกุลของแถบดีเอ็นเอมีขนาดใกล้เคียงกันที่ 269 เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.9) และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen) แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิค PCR ซ้ำ ผลที่ได้ครั้งนี้พบว่าคล้ายคลึงกันกับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ในครั้งแรก โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความชัดเจนมากกว่าเดิม และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 269 เบส เช่นกัน (รูปที่ 4.10)

สำหรับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของ เชื้อ *P. gallinaceum* จำนวน 7 ตัวอย่าง คือ เชื้อ ไอโซเลต MNTH2543 ที่ไม่เคยได้รับยา (A10) และ ที่เคยได้รับยา B2, B4, B6, B8, B10 และ C2 ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยใช้ ABI PRISM Dye Terminate Cycle Sequencing Ready Reaction kit ทำการแปลผลจาก four-color electropherogram (รูปที่ ๘6 และ 9 ถึง 14) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการ alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit ปรากฏว่า ลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของตัวอย่าง เชื้อ *P. gallinaceum* A10, B2, B4, B6, B8, B10 และ C2 สามารถวิเคราะห์จำนวนและลำดับเบสของกรดอะมิโนได้ดังรูปที่ 4.11 ความยาวของเบสทั้งหมด 240 เบส ที่ตำแหน่งเบสตั้งแต่ 360 ถึง 600 ลำดับเบสส่วนต้นและส่วนปลายมีความแปรปรวน สำหรับลำดับเบสที่อ่านผลได้ชัดเจนอยู่ที่ตำแหน่งตั้งแต่ 401 ถึง 560 (159 เบส) ตำแหน่งที่ลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ทุกตัวอย่างมีความเหมือนกันเกือบ 100% ตั้งแต่เบสที่ 463 ถึง 538 (75 เบส) ยกเว้นเพียง

1 ตำแหน่งของตัวอย่าง B10 ที่มีเบสเป็น A (adenine) ขณะที่ตัวอย่างอื่นๆมีเบสเป็น T (thymine) และทุกตัวอย่างดังกล่าวตั้งแต่เบสที่ 471 ถึง 538 (67 เบส) เมื่อเทียบกับลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อสกุล *Plasmodium* บางชนิด จากฐานข้อมูลที่ได้ของ Genbank พบว่ามีความเหมือนกันเกือบ 100% กับลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr, accession no. AY033582) *P. falciparum* (pfdhfr (S), pyrimethamine sensitive, isolate 3D7 : Cowman *et al.*, 1988) และ *P. falciparum* (pfdhfr (R), pyrimethamine resistance, accession no. J03772) ยกเว้นลำดับเบสตำแหน่งที่ 508 ของเชื้อที่ทดลองทุกตัวอย่าง และ *P. falciparum* (pfdhfr S) ที่มีเบสเป็น A (adenine) แตกต่างจาก pgdhfr และ pfdhfr (S) ที่มีเบสเป็น G (guanine)



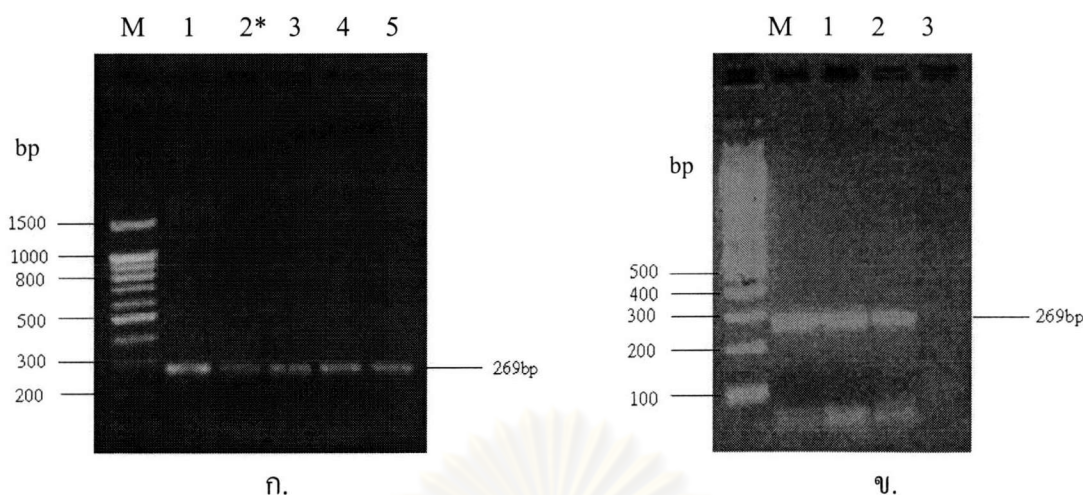
รูปที่ 4.9 ผลึกพันซ์ดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ในตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A10) และตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อ และหลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 2, 4, 6, 8 และ 10 ครั้ง (กลุ่มทดลอง B2, B4, B6, B8 และ B10) และหลังจากที่ได้รับยา ขนาด 15 มก.กก.⁻¹ 2 ครั้ง (กลุ่มทดลอง C2) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 2% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (โปรแกรมที่ 1)

แถบที่ M = DNA Marker (1.5 kb + 100 bp ladder)

แถบที่ 1-8 = ตัวอย่างเชื้อ *P.gallinaceum* : 1 = A10 3 = B2 4 = B4 5 = B6

6 = B8 7 = B10 8 = C2

*หมายเหตุ แถบที่ 2 = เชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท BYTH2546 ไม่ใช้ในการทดลองนี้



รูปที่ 4.10 ผลผลิตพีซีดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen) ของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อและหลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 2, 4, 6, 8 และ 10 ครั้ง (กลุ่ม B8 และ B10) และหลังจากที่ได้รับยาขนาด 15 มก.กก.⁻¹ 2 ครั้ง (กลุ่ม C2) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 2% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (ไฟรเมอร์คูที่ 1)

แถบที่ M = DNA Marker (1.5 kb + 100 bp ladder)

ก. แถบที่ 1-5 = ตัวอย่างเชื้อ *P.gallinaceum* : 1ก = A10 3ก = B2 4ก = B4 5ก = B6

ข. แถบที่ 1-3 = ตัวอย่างเชื้อ *P.gallinaceum* : 1ข = B8 2ข = B10 3ข = C2

*หมายเหตุ แถบที่ 2ก = เชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท BYTH2546 ไม่ใช้ในการทดลองนี้

ในการจัดเรียงและเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 กลุ่ม A10 ที่ไม่เคยได้รับยา และกลุ่ม B2, B4, B6, B8, B10 และ C2 ที่เคยได้รับยา เพื่อตรวจสอบหาชนิดของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงและแตกต่างกันที่ตำแหน่งตั้งแต่ช่วง 74 ถึง 126 พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันมากเกือบ 100% คือ ช่วงตำแหน่งที่ 99 ถึง 120 ยกเว้นตำแหน่งที่ 120 ของตัวอย่าง B10 ที่แตกต่างไปเป็น F (phenyl alanine) ในขณะที่กรดอะมิโนของตัวอย่างอื่นๆเป็น L (leucine) และเมื่อนำมาเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr) ในฐานข้อมูลที่ได้จาก Genbank พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนทุกตำแหน่งมีความเหมือนกัน ยกเว้นกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 109 มีความแตกต่างกัน โดยที่ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ทุกตัวอย่างของการทดลอง มีกรดอะมิโนเป็นชนิด asparagine (N) ขณะที่กรดอะมิโนของ pgdhfr เป็น serine (S) ผลการเทียบเคียงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 99 ถึง 119 ของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* จากการทดลองทุกกลุ่มกับเชื้อ *P. falciparum* ในคน ที่มีความไวต่อยา pyrimethamine (pfdhfr S) และเชื้อที่ดื้อต่อยา (pfdhfr R) จากฐานข้อมูลใน Genbank ปรากฏว่า ทุกตำแหน่งของกรดอะมิโนของเชื้อทุกตัวอย่างจากการทดลองครั้งนี้มีความเหมือนกับ ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. falciparum*

(pfdhfr R) 100% และมีความแตกต่างกับเชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr S) เพียง 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 109 ของ *P. gallinaceum* ทุกตัวอย่างซึ่งเป็น asparagine (N) ขณะที่ตำแหน่ง 108 ของ pfdhfr S กรดอะมิโนของยีน *dhfr-ts* เป็น serine (S) ซึ่งถือเป็นตำแหน่งที่สำคัญของเชื้อที่ดื้อต่อยา pyrimethamine (รูปที่ 4.12)

	365	375	385	395	405	415
pgdhfr	TAACAACATA	TGTTAATGAA	TCAAAATATA	AAAAATTTAA	ATATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (A10)TATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (B2)AAATTTAA	ATATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (B4)TATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (B6)AA	AAAAATTACC	ATATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (B8)AAAAATTTAA	ATATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (B10)TATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (C2)TATAAAAAGA	GAGAAATATT
pfdhfr (S)	GTGCAGTTAC	AACATATGTG	AATGAATCAA	AATATGAAAA	ATTGAAATAT	AAGAGATGTA
pfdhfr (R)	GTGCAGTTAC	AACATATGTG	AATGAATCAA	AATATGAAAA	ATTGAAATAT	AAGAGATGTA

	425	435	445	455	465	475
pgdhfr	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	TCAACTATCA	AATAACTTAC
pg (A10)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (B2)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (B4)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (B6)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (B8)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (B10)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (C2)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pfdhfr (S)	AATATTTAAA	CAAAGAACT	GTGGATAATG	TAAATGATAT	GCCTAATTCT	AAAAAATTAC
pfdhfr (R)	AATATTTAAA	CAAAGAACT	GTGGATAATG	TAAATGATAT	GCCTAATTCT	AAAAAATTAC

	485	495	505	515	525	535
pgdhfr	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAGCT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCGT
pg (A10)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAACT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (B2)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAACT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (B4)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAACT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (B6)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAACT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (B8)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAACT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (B10)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAACT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (C2)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACTAACT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pfdhfr (S)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACAAGCT	GGGAAAGCAT	TCCAAAAAAA	TTTAAACCTT
pfdhfr (R)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACAAGCT	GGGAAAGCAT	TCCAAAAAAA	TTTAAACCTT

	545	555	565	575	585	595
pgdhfr	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	GTATTATCAA	GATCATTTAA	AAAAGAAGAC	ATAAAGGAG
pg (A10)	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (B2)	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (B4)	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (B6)	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (B8)	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (B10)	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (C2)	TAGTAAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pfdhfr (S)	TAAGCAATAG	GATAAATGTT	ATATTGTCTA	GAACCTTAAA	AAAAGAAGAT	TTTGATGAAG
pfdhfr (R)	TAAGCAATAG	GATAAATGTT	ATATTGTCTA	GAACCTTAAA	AAAAGAAGAT	TTTGATGAAG

รูปที่ 4.11 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* MNTH2543 ที่ไม่ได้รับยา และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 2, 4, 6, 8, 10 (กลุ่ม B2, B4, B6, B8, B10) และที่ได้รับยาขนาด 15 มก.กก.⁻¹ (กลุ่ม C2) และเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อกับฐานข้อมูลที่ได้จาก Genbank เชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr, accession no. AY033582) เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (S), pyrimethamine sensitive, isolate 3D7) และ เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (R), pyrimethamine resistance, J03772) ตัวอักษรสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบกัน

	80	90	100	110	120	
pgdhfr	YKREKYL	EKTKDTKCLE	SIIQLSNNLQ	NVVVMGRTSW	ESIPERFRPL	VNRINV 126
pg (A10)	YKREKYL	EKTKDTKCLE	SIIQLSNNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINV 126
pg (B2)	YKREKYL	EKTKDTKCLE	SIIQLSNNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINV 126
pg (B4)	YKREKYL	EKTKDTKCLE	SIIQLSNNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINV 126
pg (B6)	YKREKYL	QNTNDTKCLE	SIIQLSNNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINV 126
pg (B8)	YKREKYL	ENTKDTKCLE	SIIQLSNNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINV 126
pg (B10)	YKAEKYL	ENTKDTMCLE	SIILLSNLIQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPF	ICRICV 126
pg (C2)	YKREKYL	ENTKYTKCLE	SIIQLSNNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINV 126
pfdhfr (S)	LKYKRCK	YLNKETVDNV	NDMDNSKKLQ	NVVVMGRTSW	ESIPKKFKPL	SNRINV 125
pfdhfr (R)	LKYKRCK	YLNKETVDNV	NDMDNSKKLQ	NVVVMGRTNW	ESIPKKFKPL	SNRINV 125

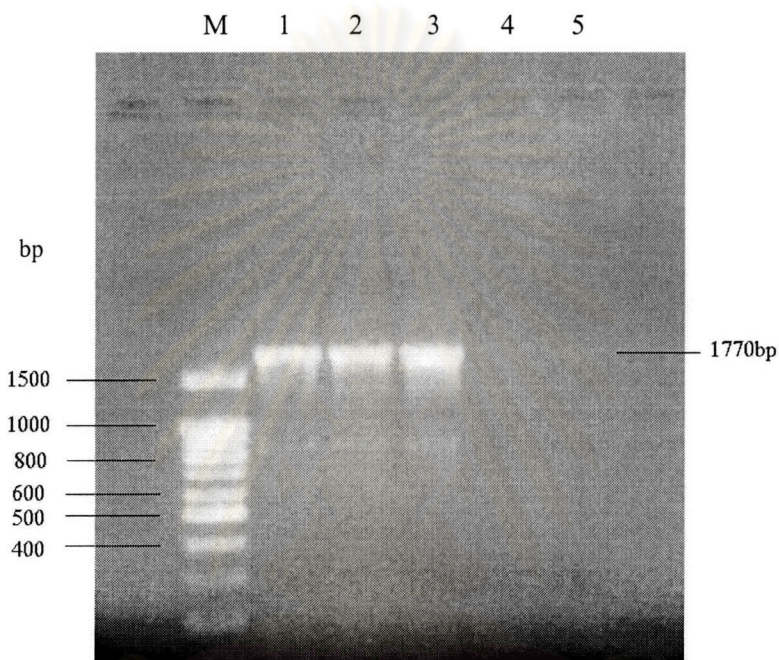


รูปที่ 4.12 กรด อะมิโนเปรียบเทียบระหว่างยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* MNTH2543 ที่ไม่ได้รับยา และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 2, 4, 6, 8, 10 (กลุ่ม B2, B4, B6, B8, B10) และ ที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 15 มก.กก.⁻¹ (กลุ่ม C2) และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อกับฐานข้อมูลที่ได้ จาก Genbank เชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr, accession no. AY033582) เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (S), pyrimethamine sensitive, isolate 3D7 : Cowman *et al.*, 1988) และ เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (R), pyrimethamine resistance, accession no. J03772) กรอบสี่เหลี่ยมและตัวอักษรสีแดง (ครี) แสดงส่วนของ ลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบกัน

4.3.1.2 ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *P. gallinaceum* โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ที่มีลำดับเบสอยู่ในช่วง ตั้งแต่ 183 ถึง 1952 พบว่า ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH 2543 ที่เตรียมจากตัวอย่างเลือดของไก่ควบคุมกลุ่มที่ฉีดเชื้อต่อเนื่องแต่ไม่เคยได้รับยาเท่านั้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1770 เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.13, 4.14 และ 4.15) และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen) แล้ว เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ ยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิค PCR ซ้ำ ผลที่ได้ครั้งนี้พบว่าคล้ายคลึงกับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ในครั้งแรก โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความชัดเจนมากกว่าเดิม และน้ำหนักโมเลกุลของแถบดีเอ็นเออยู่ที่ประมาณ 1770 เบสเช่นกัน (รูปที่ 4.16) ซึ่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนั้น นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยใช้ ABI PRISM Dye Terminate Cycle Sequencing Ready Reaction kit และแปลผลจาก four-color electropherogram 3 ซ้ำ ปรากฏว่า ลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไม่เด่นชัดเพียงพอ ในการนำไปวิเคราะห์ได้ทุกซ้ำ

ผลการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTN2543 ในไก่ทดลองที่ติดเชื้อมาก่อนที่เข้ารับยาต่อเนื่องจากขนาด MED จากไก่อุ่นที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 (B2, B4, B6, B8 และ B10) และ ที่ได้รับยาขนาด 2X MED จากไก่อุ่นที่ 2 (C2) รวม 7 ตัว อย่าง ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอแม้แต่ตัวอย่างเดียว (รูปที่ 4.13 และ 4.14) แม้ว่าได้พยายามทำซ้ำหลายๆครั้ง และมีการปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆของการทดลองแล้วก็ตาม



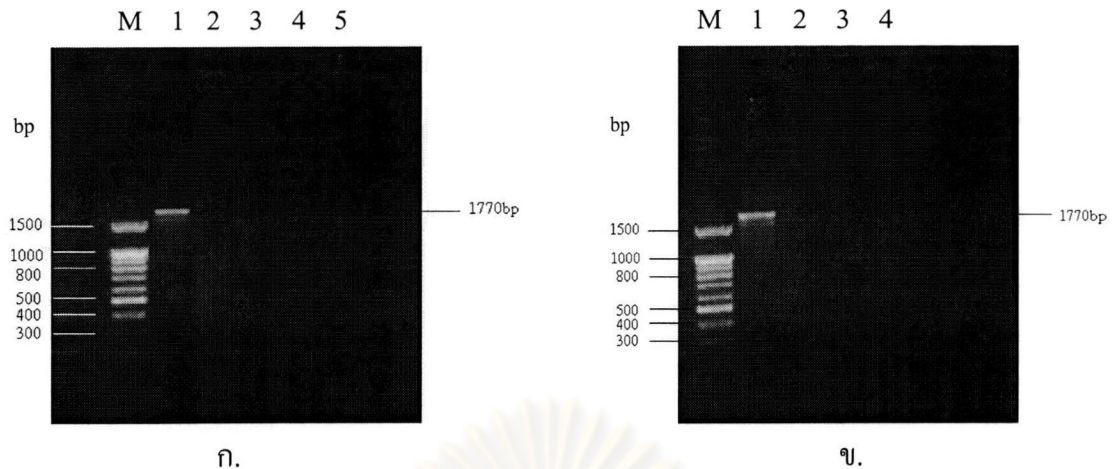
รูปที่ 4.13 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท MNTN2543 ในตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อมาแต่ไม่ได้รับยา(A2, A6, A10) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (ไพรเมอร์คู่ที่ 2 : annealing temperature 60 °C)

แถบที่ M = DNA Marker (1.5 kb + 100 bp ladder)

แถบที่ 1-5 = ตัวอย่างเชื้อ *P.gallinaceum* : 1 = A2 2 = A6 3 = A10

4 และ 5 = MNTN(A19)*

*หมายเหตุ แถบที่ 4 และ 5 ไม่ใช้ในการทดลองนี้



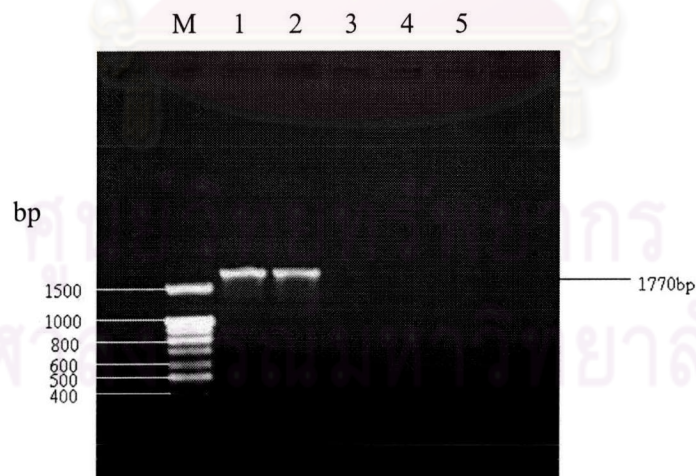
รูปที่ 4.14 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ในตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A10) และตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อ และหลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 2, 4, 6, 8 และ 10 ครั้ง (กลุ่มทดลอง B2, B4, B6, B8 และ B10 และหลังจากที่ได้รับยา ขนาด 15 มก.กก.⁻¹ 2 ครั้ง (กลุ่มทดลอง C2) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (โปรแกรมที่ 2 : annealing temprature 55 °C)

แถบที่ M = DNA Marker (1.5 kb + 100 bp ladder)

ก. แถบที่ 1-5 = ตัวอย่างเชื้อ *P.gallinaceum* : 1ก = A 10 3ก = B2 4ก = B4 5ก = B6

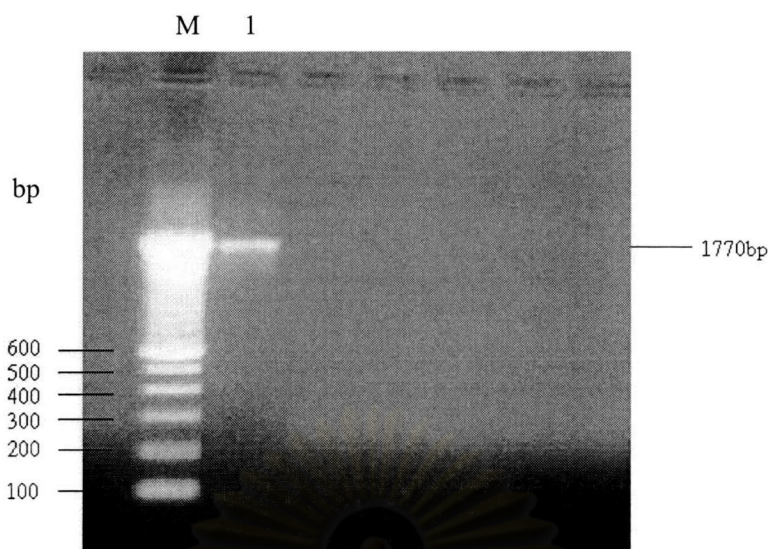
ข. แถบที่ 1-3 = ตัวอย่างเชื้อ *P.gallinaceum* : 1ข = B8 2ข = B10 3ข = C2

*หมายเหตุ แถบที่ 2ก = เชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท BYTH2546 ไม่ใช้ในการทดลองนี้



รูปที่ 4.15 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา (A2, A10) และตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อและหลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 6, 8 และ 10 ครั้ง (กลุ่มทดลอง B6, B8 และ B10) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (โปรแกรมที่ 2 : annealing temprature 50 °C)

แถบที่ M = DNA Marker (1.5 kb + 100 bp ladder) 1 = A2 2 = A10 3 = B6 4 = B8 5 = B10



รูปที่ 4.16 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen) ของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อ *P.gallinaceum* ไอโซเลท MNT2543 ตัวอย่างเลือดไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่เคยได้รับยา pyrimethamine โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (ไพรเมอร์คู่ที่ 2 annealing temperature 55°C)

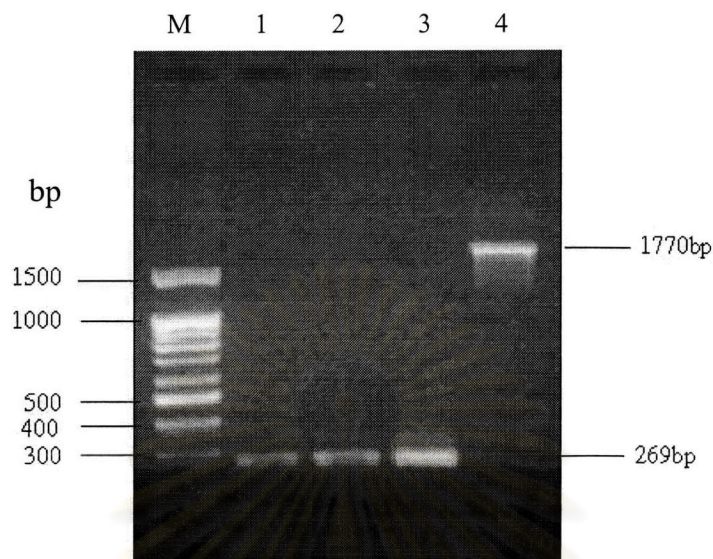
แถบที่ M = DNA Marker (1.5 kb + 100 bp ladder) แถบที่ 1 = A10

3.3.3.3 ศึกษา ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ที่ติดเชื้อจาก 3 แหล่งที่มา

ผลจากการศึกษา ยีน *dhfr-ts* ของไก่เชื้อมาลาเรีย *P. gallinaceum* ที่ไม่เคยได้รับยา pyrimethamine จำนวน 3 ไอโซเลท คือ MNT2543, BYTH2546 และ PCTH2543 โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ปรากฏว่า ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 269 เบส ใกล้เคียงกัน จากตัวอย่างเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.17) และ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen) แล้ว เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิค PCR ซ้ำ ผลที่ได้ครั้งนี้พบว่าคล้ายคลึงกับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ในครั้งแรก โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความชัดเจนมากกว่าเดิม และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 269 เบสเช่นกัน (รูปที่ 4.10)

ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *P. gallinaceum* ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ปรากฏว่าตรวจพบแถบดีเอ็นเอได้เฉพาะตัวอย่างเลือดที่เตรียมจากเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNT2543 เท่านั้น ส่วนตัวอย่างเชื้อไอโซเลท BYTH2546 และ PCTH2543 ไม่เคยตรวจพบแถบดีเอ็นเอแม้ว่าได้พยายามทำซ้ำหลายๆครั้ง และปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆของการทดลองแล้วก็ตาม สำหรับแถบดีเอ็นเอของเชื้อไอโซเลท MNT2543 ที่ปรากฏนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1770 เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.13, 4.14 และ 4.15) และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ

ให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen) แล้ว เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิค PCR ซ้ำ ผลที่ได้ยังคงเดิมเช่นกัน



รูปที่ 4.17 เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อ *P.gallinaceum* 3 ไอโซเลท MNTH2543, BYTH2543 และ PCTH2543 ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโฆ่ของเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 และ 2 และใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1.5% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที

แถบที่ M = DNA Marker (1.5 kb + 100 bp ladder)

แถบที่ 1-3 = ตัวอย่างเชื้อ *P.gallinaceum* (ไพรเมอร์คู่ที่ 1 annealing temperature 50°C):

1 = MNTH2543 2 = BYTH2543 3 = PCTH2543

แถบที่ 4 ตัวอย่างเชื้อ *P. gallinaceum* MNTH2543 (ไพรเมอร์คู่ที่ 2 annealing temperature 55°C)

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยใช้ ABI PRISM Dye Terminate Cycle Sequencing Ready Reaction kit ทำการแปลผลจาก four-color electropherogram (รูปที่ ผ6 ถึง ผ8) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการ alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit ปรากฏว่า สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* จาก *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543, BYTH2546 และ PCTH2543 ได้ดังรูปที่ 4.18 ตำแหน่งเบสตั้งแต่ 360 ถึง 600 (240 เบส) ลำดับเบสส่วนต้นและส่วนปลายมีความแปรปรวน สำหรับเบสของทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีความเหมือนมากที่สุดคือ ตั้งแต่เบสที่ 402 ถึง 572 (170 เบส) โดยเชื้อไอโซเลท PCTH2543 มีส่วนที่แตกต่างจากไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 เพียง 6 ตำแหน่ง คือ ที่เบส 420, 481, 508, 539, 561 และ 556 เท่านั้น แต่เบสที่ตำแหน่ง 508, 539 และ 561 ของไอโซเลท PCTH2543 มีความเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum* จากฐานข้อมูลของ Genbank (pgdhfr) สำหรับช่วงของลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีความเหมือนกันกับในฐานข้อมูลของ Genbank ของเชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr)

เชื้อ *P. falciparum* pfdhfr (S) และ เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr R) คือ ลำดับเบสตั้งแต่ 482 ถึง 524 (42 เบส) ยกเว้นตำแหน่งที่ 508 ของเชื้อที่มีความแตกต่างกัน โดยไอโซเลท PCTH2543, pgdhfr และ pfdhfr (S) มีเบสเป็น guanine (G) ขณะที่ไอโซเลท MNTH2543, BYTH2546 และ pfdhfr (R) เป็น adenine (A)

	365	375	385	395	405	415
pgdhfr	TAACAACATA	TGTTAATGAA	TCAAAATATA	AAAAATTAAA	ATATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (MNTH)TATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (BYTH)TATAAAAAGA	GAGAAATATT
pg (PCTH)TATAAAAAGA	GAGAAATATC
pfdhfr (S)	GTGCAGTTAC	AACATATGTG	AATGAATCAA	AATATGAAAA	ATTGAAATAT	AAGAGATGTA
pfdhfr (R)	GTGCAGTTAC	AACATATGTG	AATGAATCAA	AATATGAAAA	ATTGAAATAT	AAGAGATGTA

	425	435	445	455	465	475
pgdhfr	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	TCAACTATCA	AATAACTTAC
pg (MNTH)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (BYTH)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pg (PCTH)	TAGAAAAAAC	AAAGGATACA	AAGTGTTTAG	AGAGTATAAT	ACAACTATCA	AATAACTTAC
pfdhfr (S)	AATATTTAAA	CAAAGAACT	GTGGATAATG	TAAATGATAT	GCCTAATTCT	AAAAAATTAC
pfdhfr (R)	AATATTTAAA	CAAAGAACT	GTGGATAATG	TAAATGATAT	GCCTAATTCT	AAAAAATTAC

	485	495	505	515	525	535
pgdhfr	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAAGTAGCT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCGT
pg (MNTH)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAAGTAGCT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (BYTH)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAAGTAGCT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCAT
pg (PCTH)	GAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAAGTAGCT	GGGAAAGTAT	TCCAGAACGA	TTTAGGCCGT
pfdhfr (S)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACAAGCT	GGGAAAGCAT	TCCAAAAAAA	TTTAAACCTT
pfdhfr (R)	AAAATGTTGT	AGTTATGGGA	AGAACAAGCT	GGGAAAGCAT	TCCAAAAAAA	TTTAAACCTT

	545	555	565	575	585	595
pgdhfr	TAGTTAATAG	AATAAATGTT	GTATTATCAA	GATCATTTAA	AAAAGAAGAC	ATAAAAGGAG
pg (MNTH)	TAGTTAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (BYTH)	TAGTTAATAG	AATAAATGTT	ATATTATCAA	GATCATTTAA
pg (PCTH)	TAGTTAATAG	AATAAATGTT	GTATTATCAA	GA.....
pfdhfr (S)	TAAGCAATAG	GATAAATGTT	ATATTGTCTA	GAACCTTAAA	AAAAGAAGAT	TTTGATGAAG
pfdhfr (R)	TAAGCAATAG	GATAAATGTT	ATATTGTCTA	GAACCTTAAA	AAAAGAAGAT	TTTGATGAAG

รูปที่ 4.18 ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ไม่ได้รับยา จำนวน 3 ไอโซเลท คือ MNTH2543 BYTH2546 และ PCTH2543 และเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อกับฐานข้อมูลที่ได้จาก Genbank เชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr, accession no. AY033582) เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (S), pyrimethamine sensitive, isolate 3D7 : Cowman *et al.*, 1988) และ เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (R), pyrimethamine resistance, accession no. J03772) ตัวอักษรสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบกัน

จากการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. gallinaceum*, pgdhfr เชื้อ *P. falciparum*, pfdhfr (S) และ pfdhfr (R) จากฐานข้อมูลของ Genbank ที่ตำแหน่งตั้งแต่ช่วง 77 ถึง 129 (รูปที่ 4.19) ผลปรากฏว่า ลำดับของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันมากที่สุด คือ ช่วงตำแหน่งที่ 101 ถึง 114 ยกเว้นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 109 ของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* และตำแหน่งที่ 108 ของ *P. falciparum* โดยที่ยีนของเชื้อไอโซเลท MNTH2543, BYTH2546 และ pfdhfr

(R) มีกรดอะมิโนเป็น asparagine (N) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดและตำแหน่งที่สำคัญของเชื้อที่คือต่อยา pyrimethamine ส่วนเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท PCTH2543, pgdhfr และ *P. falciparum*, pfdhfr (S) มีกรดอะมิโนเป็น serine (S) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดและตำแหน่งที่ถือว่าเย็น dhfr-ts ของเชื้อ มีความไวต่อยา

	80	90	100	110	120				
pgdhfr	EKYL	EKTKD	TKCLE	SIIQLS	NNLQ	NVVVMGRTSW	ESIPERFRPL	VNRINVVLS	129
pg (MNTH)	EKYL	EKTKD	TKCLE	SIIQLS	NNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINVILS	129
pg (BYTH)	EKYL	EKTKD	TKCLE	SIIQLS	NNLQ	NVVVMGRTNW	ESIPERFRPL	VNRINVILS	129
pg (PCTH)	EKYL	EKTKD	TKCLE	SIIQLS	NNLR	NVVVMGRTSW	ESIPERFRPL	VNRISVVLS	129
pfdhfr (S)	KRCK	YLNKK	ETVDN	VNDMD	NSKLQ	NVVVMGRTSW	ESIPKKFKPL	SNRINVILS	128
pfdhfr (R)	KRCK	YLNKK	ETVDN	VNDMD	NSKLQ	NVVVMGRTNW	ESIPKKFKPL	SNRINVILS	128

รูปที่ 4.19 ลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบเปรียบเทียบระหว่างยีน dhfr-ts ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ไม่ได้รับยา จำนวน 3 ไอโซเลท คือ MNTH2543 BYTH2546 และ PCTH2543 และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อกับฐานข้อมูลที่ได้จาก Genbank เชื้อ *P. gallinaceum* (pgdhfr, accession no. AY033582) เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (S), pyrimethamine sensitive, isolate 3D7 : Cowman *et al.*, 1988) และ เชื้อ *P. falciparum* (pfdhfr (R), pyrimethamine resistance, accession no. J03772) ตัวอักษรสีแดงแสดงส่วนของลำดับเบสที่อยู่ในช่วงเปรียบเทียบกัน

4.3.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน dhfr-ts ของเชื้อ

P. gallinaceum ด้วยเทคนิค PCR จากไพรเมอร์ 2 คู่

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเทคนิค PCR ของไพรเมอร์คู่ที่ 1 ซึ่งลำดับเบสของยีน dhfr-ts จากเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ได้ทำนายไว้ คือ ที่ตำแหน่ง ตั้งแต่ 321 ถึง 590 โดยคาดว่ามีส่วนโมเลกุลอยู่ในช่วงดังกล่าว และผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอของยีน dhfr-ts จากเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ตัวอย่างเลือดไก่ซึ่งคิดเชื้อที่ไม่ได้รับยา และได้รับยา มีน้ำหนักโมเลกุล 269 เบส และ ไม่แตกต่างจากเชื้อไอโซเลท BYTH2546 และ PCTH2543 และลำดับเบส ของยีน dhfr-ts ของ เชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543, BYTH2546 และ PCTH2543 มีความเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum* จากฐานข้อมูลของ Genbank (pgdhfr) คิดเป็น 97.5% เท่ากัน และมีความเหมือนกับ เชื้อ *P. falciparum*, pfdhfr (S) 66.2%, 66.2% และ 65.6% ตามลำดับ

ส่วนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากจากไพรเมอร์คู่ที่ 2 ซึ่งลำดับเบสของยีน dhfr-ts จากเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ได้ทำนายไว้ คือ ที่ตำแหน่ง ตั้งแต่ 183 ถึง 1952 โดยคาดว่ามีส่วนโมเลกุลอยู่ในช่วงดังกล่าว การทดลองครั้งนี้ตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีน dhfr-ts จากเชื้อ *P. gallinaceum* เพียงไอโซเลทเดียว คือ MNTH2543 จากตัวอย่างเลือดไก่ซึ่งคิดเชื้อกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา โดยแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบมีน้ำหนักโมเลกุล 1,770 เบส