บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งแผนการทดลอง ออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

3.1.1 ไก่ทดลองที่ใช้ การเลี้ยง การจัดการ และการแบ่งกลุ่ม

3.1.2 เชื้อมาลาเรียไก่ที่ใช้ การเตรียมเชื้อ การตรวจเลือดเพื่อหาเชื้อ และการประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด

3.1.3 การทดลอง แบ่งเป็น 3 หัวข้อเรื่อง

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ในการรักษาโรคมาลาเรียไก่

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* หลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 16 เท่าของขนาด MED

การทดลองที่ 3 ศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum*

3.1.4 การวิเคราะห์และประเมินผลของการทดลอง

3.2 วิธีการ

3.2.1 ไก่ทดลองที่ใช้ การเลี้ยง การจัดการ และการแบ่งกลุ่ม

3.2.1.1 ไก่ทดลองที่ใช้ ไก่ไข่ปลอดเชื้อ เพศผู้ พันธุ์ Babcock B380 จำนวนรวมทั้งสิ้น 490 ตัว มีการเลี้ยงและการจัดการ ตามข้อ 3.2.1.2

3.2.1.2 การเลี้ยงและการจัดการ นำลูกไก่ อายุ 1 วัน จากโรงฟักที่ปลอดเชื้อ นำมาเลี้ยงขังกรง ป้องกันไม่ให้ยุงกัดด้วยการใช้มุ้งคลุมกรงและเก็บไว้ในห้องที่กรุด้วยมุ้งลวด ให้ไก่กินอาหารและน้ำเต็มที่โดยไม่จำกัดปริมาณ ทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล และกัมโบโรตามโปรแกรมมาตรฐาน (จิโรจ, 2544) และตลอดการทดลองทำการเลี้ยงไว้ที่ห้องสัตว์ทดลองชั้น 8 ตึก 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไก่ที่เลี้ยงไว้ เมื่ออายุ 2-3 สัปดาห์ นำมาแบ่งกลุ่มเพื่อใช้ตามลักษณะงานและ/หรือการทดลอง ตามข้อ 3.2.1.3

3.2.1.3 การแบ่งกลุ่ม ไก่ที่เลี้ยงไว้ในข้อ 3.2.1.2 นำมาแบ่งกลุ่มตามลักษณะงานที่ทำการศึกษาทดลอง ดังนี้

ก. ไก่ปลอดเชื้อ อายุ 2-3 สัปดาห์ จำนวนทั้งสิ้น 150 ตัว ใช้ตลอดโครงการสำหรับการผ่านเชื้ออย่างต่อเนื่อง

ข. ไก่ปลอดเชื้อ อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 220 ตัว ใช้สำหรับการทดลองที่ 1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ต่อการติดเชื้อ *Plasmodium gallinaceum* ตามข้อ 3.3.1

ค. ไก่ปลอดเชื้อ อายุ 2-4 สัปดาห์ จำนวนทั้งสิ้น 120 ตัว ใช้สำหรับการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาสภาวะของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องตามข้อ 3.3.2 และใช้สำหรับการทดลองที่ 3 เพื่อศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ไม่ได้รับยาและได้รับยา pyrimethamine ตามข้อ 3.3.3

3.2.2 เชื้อมาลาเรียไก่ที่ใช้ในการทดลอง การเพาะเลี้ยงเชื้อต่อเนื่อง การเตรียมเชื้อเพื่อการทดลอง การตรวจเลือดเพื่อหาเชื้อ และการประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด

3.2.2.1 เชื้อมาลาเรียไก่ที่ใช้ในการทดลอง คือ *Plasmodium gallinaceum* ที่เก็บจาก 3 แหล่งที่มา (isolate) ได้แก่

ก. *P. gallinaceum* isolate MNTH2543 ที่มาคือ เลือดของไก่ไข่ที่ติดเชื้อมาลาเรียจากเขตมีนบุรี กทม. ที่ทำการผ่านเชื้อเข้าในไก่ไข่เพศผู้และเลี้ยงไว้ต่อเนื่อง ในหน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำมาใช้ในการผ่านเชื้อต่อเนื่อง (ตามข้อ 3.2.2.2) และใช้เพื่อการทดลองในข้อ 3.3.1 ถึง 3.3.3

ข. *P. gallinaceum* isolate BYTH2546 ที่มาคือ เลือดของไก่พื้นเมืองที่ติดเชื้อมาลาเรียจาก อ. บางใหญ่ จ. นนทบุรี เก็บเลือดติดเชื้อที่ผ่านเข้าในไก่ไข่เพศผู้ 1 ครั้ง (ไม่ได้เลี้ยงไว้ต่อเนื่อง) และนำมาใช้เพื่อการทดลองในข้อ 3.3.3

ค. *P. gallinaceum* isolate PCTH2543 ที่มาคือ เลือดของไก่พ่อแม่พันธุ์ 3 สาย เลือดที่ติดเชื้อมาลาเรีย จากเลือดไก่ติดเชื้อมาลาเรียจาก จ. ปราจีนบุรี เก็บเลือดติดเชื้อที่ผ่านเข้าในไก่ไข่เพศผู้ 1 ครั้ง (ไม่ได้เลี้ยงไว้ต่อเนื่อง) และนำมาใช้เพื่อการทดลองในข้อ 3.3.3

3.2.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อต่อเนื่อง และ การเตรียมเชื้อเพื่อการทดลอง

ก. การเพาะเลี้ยงเชื้อต่อเนื่อง ทำการการผ่านเชื้อโดยใช้เลือดไก่ที่มีเชื้อ *P. gallinaceum* isolate MNTH2543 จากข้อ 3.2.2.1-ก และมีระดับเชื้อในกระแสเลือดอย่างน้อย 50 % ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอของไก่ปลอดเชื้อจำนวน 10 ตัว ปริมาตร 0.2 มล./ตัว ตรวจเลือดหาเชื้อและประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือดทุก 2 วัน เมื่อไก่ตัวใดตัวหนึ่งมีระดับเชื้อสูงกว่า 50% นำมาผ่านเข้าไก่ปลอดเชื้อรุ่นใหม่อีก 10 ตัว ตามวิธีเดิมทุกครั้งอย่างต่อเนื่อง และ

ทำเช่นนี้เรื่อยไป (พัชรี, 2545) และผ่านเชื้อเข้ายุงลาย *Aedes aegypti* Liverpool strain ทุก 6 เดือน เพื่อให้ความรุนแรงและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อคงที่ (Garnham, 1966) ทำเช่นนี้อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดทุกการทดลอง

ข. การเตรียมเชื้อเพื่อการทดลอง นำเลือดไก่ที่มีเชื้อ *P. gallinaceum* เก็บรวมกัน โดยใส่ในหลอดที่มี heparin 50 I.U. ต่อเลือด 1 มล. ปรับระดับเชื้อให้เป็น 5 x 10^4 ต่อเลือด 1 มล. เพื่อนำไปใช้ในการทดลองที่ 1 และปรับระดับเชื้อให้เป็น 5 x 10^6 ต่อเลือด 1 มล. เพื่อนำไปใช้ในการทดลองที่ 2 ตามข้อ 3.3.1 และ 3.3.2

3.2.2.3 การเตรียมฟิล์มเลือดบางย้อมสี การตรวจหาเชื้อ การประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด และการคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในเลือด

ก. การเตรียมฟิล์มเลือดบางย้อมสี ตามวิธีของ ทวี (2542) โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ปีกทุก 2 วัน นำมาทำฟิล์มเลือดบาง fix ด้วย absolute methanol ย้อมสียิมซ่า 10% นาน 30-40 นาที

ข. การตรวจหาเชื้อ ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสีแล้ว นำมาตรวจหาเชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างขนาดกำลังขยายวัตถุ 100 เท่า นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* และจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อ รวมทั้งสิ้น 1,000 เซลล์ ต่อ เลือด 1 ตัวอย่าง ตามวิธีของ ทวี (2542)

ค. การประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด คำนวณหาระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) โดยประเมินเป็นอัตราร้อยละ ตามวิธีของ ทวี (2542) ดังนี้

$$\text{ระดับเชื้อในกระแสเลือด} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ตรวจพบเชื้อ คูณด้วย 100}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ตรวจนับทั้งหมด (1,000)}}$$

3.2.2.4 การคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในเลือด

คำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ ต่อเลือดปริมาตร 1 มล. ตามวิธีของ ทวี (2542) นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (total red cell count) ตามวิธีของ กนกนาถ (2525)

3.3 การทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ในการรักษาโรคมาลาเรียไก่ (ประยุกต์จากวิธีของ Rollo, 1951)

3.3.1.1 การแบ่งกลุ่มไก่ทดลอง ไก่ปลอดเชื้อจากข้อ 3.2.1.3-ข จำนวน 220 ตัว แบ่งออกเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ดังนี้ (รูปที่ 3.1)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ และ ไม่ได้ให้ยา

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* แต่ไม่ได้ให้ยา

กลุ่มที่ 3 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 0.04 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 0.1 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 0.2 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 6 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 0.5 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 7 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 1.0 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 8 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 2.5 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 9 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 5.0 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 10 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

กลุ่มที่ 11 กลุ่มรักษาได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* และให้ยา pyrimethamine ขนาด 10.0 มก.กก.$^{-1}$ ป้อนให้กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน

ไก่กลุ่มที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
จำนวนตัว	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
ปริมาณเชื้อ (เซลล์)	0	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4
ขนาดยา* (มก./กก.)	0	0	0.04	0.1	0.2	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0

* เริ่มให้ยาเมื่อตรวจพบ parasitemia 1-10% ในไก่ที่ฉีดเชื้อ

รูปที่ 3.1 การแบ่งกลุ่มไก่ทดลองจำนวน 11 กลุ่ม ปริมาณเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ไก่ได้รับ และ ขนาดยาที่ใช้

3.3.1.2 การฉีดเชื้อ ไก่กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ทุกตัวได้รับเลือดไก่ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 0.2 มล. ไก่กลุ่มที่ 2-11 ทุกตัวได้รับเลือดไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* 5 x 10^4 infected rbc ต่อไก่ 1 ตัว โดยใช้เชื้อที่เตรียมในข้อ 3.2.2.2-ข ฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่ปีก

3.3.1.3 การตรวจระดับเชื้อในกระแสเลือดก่อนและหลังการให้ยา หลังจากฉีดเชื้อเจาะเลือด ทำ ฟิล์มเลือดบาง ย้อมสี ตรวจหาเชื้อ และประเมินระดับเชื้อในไก่ทุกตัว ทุกกลุ่ม ทุกวัน ตามวิธีในข้อ 3.2.2.3 และ 3.2.2.4 เมื่อระดับเชื้อขึ้นสูง 1-10% เริ่มทำการทดลองให้ยารักษาไก่ในกลุ่มที่ 3-11 ทุกตัวพร้อมกัน โดยใช้ยาตามขนาดข้อ 3.3.1.1 และหลังการให้ยา ทำการตรวจหาเชื้อ ตามวิธีเช่นเดิมทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลานาน 15 วัน (0-14 DPT)

3.3.1.4 การวัดผล ประเมินประสิทธิภาพของยาต่อเชื้อมาลาเรีย ดังนี้

3.3.1.4.1 อัตราการตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด

3.3.1.4.2 อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia)

3.3.1.4.3 minimum effective dose (MED) หมายถึง ปริมาณยาขนาดต่ำสุดที่มีผลต่อระดับเชื้อในกระแสเลือดอย่างเห็นได้ชัด

3.3.1.4.4 อัตราการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรียระยะไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดง (schizont)

3.3.1.4.5 อัตราการตายของไก่หลังการให้ยา pyrimethamine

3.3.1.5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าต่างๆที่ได้จากการวัดผล ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเชื้อในกระแสเลือดโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Duncan's multiple range test ศึกษาอัตราการตรวจพบ schizont ที่พบในกระแสเลือด และศึกษาเปรียบเทียบอัตราการตายของไก่ทดลองทุกกลุ่ม ตั้งแต่วันที่เริ่มให้ยา (0 DPT) จนสิ้นสุดการทดลอง (14 DPT)

และประเมินประสิทธิภาพของยาโดยวิเคราะห์หา effective dose (ED) ที่ทำให้เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในกระแสเลือดตาย 50% และ 90% (ED50 & ED90) ใช้โปรแกรม SPSS, JMP และ excel

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* หลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2, 4, 6, 8 และ 16 เท่าของขนาด MED (ประยุกต์จากวิธีของ Greenberg and Bond, 1954)

ไก่จากข้อ 3.2.1.3-ค จำนวนทั้งสิ้น 120 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มละ 5 ตัว ทำให้ติดเชื้อโดยใช้ *P. gallinaceum* 5 x 10^6 infected rbc ฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่ปีก และนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* หลังจากที่ได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องและให้ขนาดที่เพิ่มสูงเป็น 2 เท่าขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 16 เท่าของ minimum effective dose (MED) โดยให้ไก่ที่ได้รับเชื้อกินยาขนาดเดียวกัน 2 รุ่นต่อเนื่อง และเพิ่มยาเป็น 2 เท่าในไก่ที่ติดเชื้อรุ่นถัดไป ขนาดเริ่มต้นของยาที่ใช้คือ 7.5 มก.กก.$^{-1}$ ซึ่งเป็นขนาดของยาจากผลการทดลองที่ 1 ข้อ 3.3.1.1 ที่มีผลทำให้ระดับเชื้อในกระแสเลือดลดลงอย่างเห็นได้ชัด (MED) การทดลองยาในไก่แต่ละรุ่นใช้ไก่ 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อแต่ไม่ได้ให้ยากิน กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ได้รับเชื้อพร้อมทั้งให้ยากินในขณะเดียวกัน

3.3.2.1 กลุ่มควบคุม เลือดไก่ที่มีระดับเชื้อ *P. gallinaceum* สูงกว่า 50% ที่เพาะเลี้ยงไว้ในไก่อย่างต่อเนื่อง และไม่เคยได้รับยารักษาการติดเชื้อ นำเชื้อปริมาณ 5 x 10^6 infected rbc ต่อไก่ 1 ตัว ฉีดเข้าไก่กลุ่มควบคุมทุกตัว จำนวน 5 ตัว ต่อ ครั้ง ไม่ได้รับยาตลอดการทดลอง เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อหาระดับเชื้อในกระแสเลือดตามวิธีในข้อ 3.2.2.3-3.2.2.4 และศึกษาระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ทุกวัน นาน 14 วัน ก่อนสิ้นสุดแต่ละการทดลอง เก็บเลือดนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อศึกษายีน *dhfr-ts* ตามการทดลองที่ 3 ข้อ 3.3.3

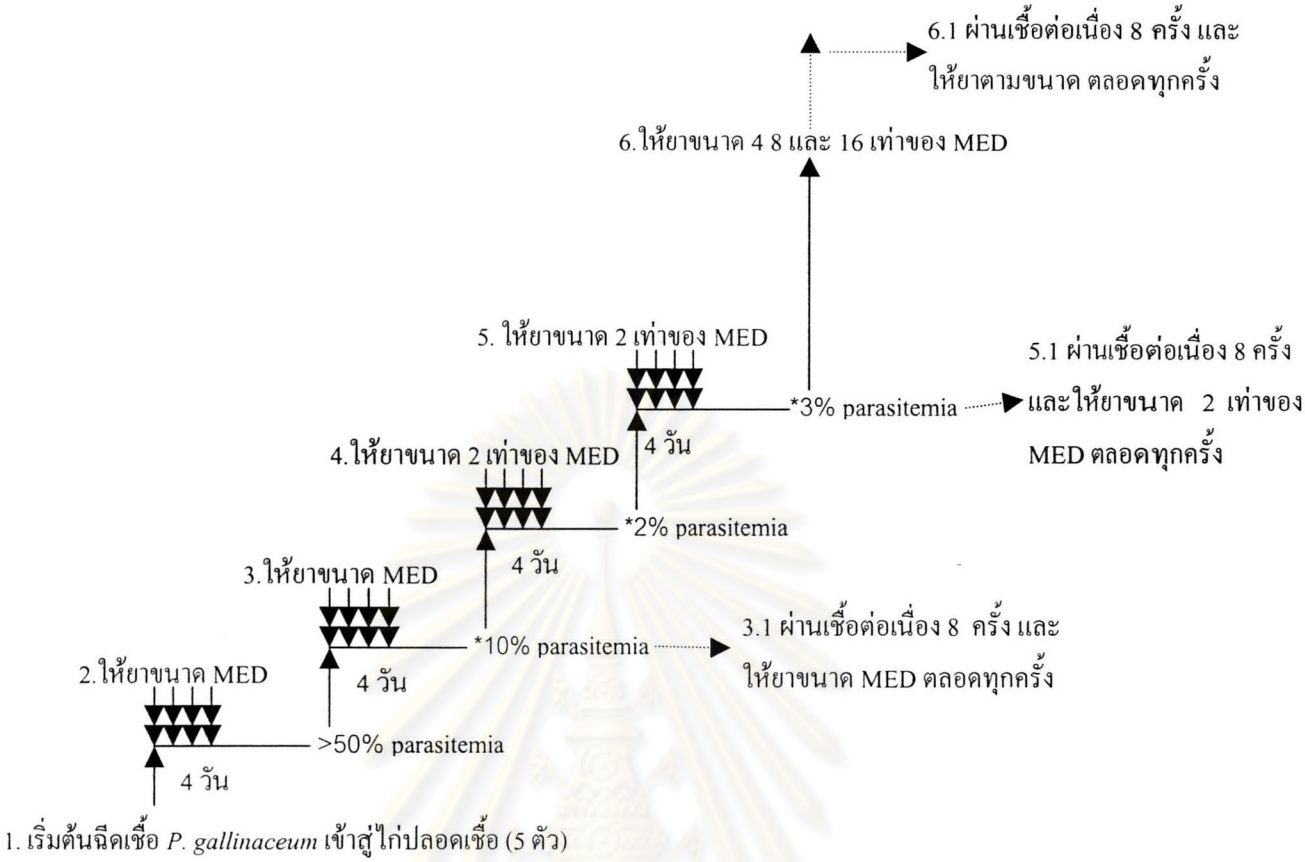
3.3.2.2 กลุ่มที่ให้ยา pyrimethamine เริ่มต้นจากการใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ที่เพาะเลี้ยงไว้ในไก่อย่างต่อเนื่องและไม่เคยได้รับยารักษาการติดเชื้อ นำมาฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 5 x 10^6 infected rbc ต่อไก่ 1 ตัวเช่นเดียวกับไก่กลุ่มควบคุม โดยใช้ไก่ทดลอง 5 ตัว และให้ยาในขนาด MED ต่อเนื่องกัน เป็นเวลานาน 4 วัน และทำตามวิธีการในข้อ 3.3.2.2.1 ศึกษาระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ทุกวัน นาน 14 วัน จากนั้นดำเนินการให้ยาต่อเนื่องในขนาดเดิมซ้ำอีกครั้ง ก่อนที่จะเพิ่มยาในขนาดที่สูงขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 16 เท่าของ MED ขนาดละ 2 ครั้ง ดังขั้นตอนในรูปที่ 3.2

3.3.2.2.1 ศึกษาระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ที่ได้รับยา pyrimethamine ต่อเนื่องในขนาด MED

ก. การฉีดเชื้อ เลือดไก่ที่ติดเชื้อ *P. gallinaceum* และไม่เคยได้รับยา เตรียมตามข้อ 3.2.2.2 นำมาฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่ปีกของไก่ 1 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ใช้ปริมาณเชื้อ 5 x 10^6 infected rbc ต่อไก่ 1 ตัว (รูปที่ 3.2 ขั้นตอนที่ 1)

ข. การทดลองให้ยาครั้งที่ 1 ภายหลังการฉีดเชื้อ ไก่แต่ละตัวได้รับยา pyrimethamine ทันที โดยใช้ขนาด minimum effective dose ตามข้อ 3.3.1.4.3 ป้อนให้ไก่กินวันละ 2 ครั้ง ติดต่อกันนาน 4 วัน (รูปที่ 3.2 ขั้นตอนที่ 2)

ค. การตรวจหาและประเมินระดับเชื้อ นำเลือดไก่ทุกตัวมาตรวจหาเชื้อและประเมินระดับเชื้อทุกวัน ตามวิธีในข้อ 3.2.2.3 -3.2.2.4



ไก่ชุดควบคุม รุ่นละ 5 ตัว : ฉีดเชื้ออย่างต่อเนื่อง 10 รุ่นโดยใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ที่ไม่เคยได้รับยา

รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการให้ยา pyrimethamine ขนาดต่างๆ ต่อเนื่องกัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด และแต่ละขั้นตอนใช้ไก่ทดลองครั้งละ 5 ตัว และเก็บตัวอย่างเลือดขณะที่ parasitemia สูงสุด ในวันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อ*

ง. การทดลองให้ยาครั้งที่ 2 เมื่อตรวจพบว่าไก่กลุ่มแรก ตัวใดตัวหนึ่งใน 5 ตัวมีระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (~ 7 วัน หลังฉีดเชื้อ) จึงนำไปฉีดเข้าไก่ที่ปลอดเชื้อกลุ่มใหม่ (กลุ่มที่ 2) จำนวน 5 ตัว โดยใช้เชื้อปริมาณเท่าเดิม และวิธีการเช่นเดิม (รูปที่ 3.1 ขั้นตอนที่ 3) และภายหลังการฉีดเชื้อ ให้ยา pyrimethamine ในขนาด minimum effective dose เช่นเดิม พร้อมทั้งตรวจหาและประเมินระดับเชื้อด้วยวิธีการเดิม ภายหลังการฉีดเชื้อและให้ยาครั้งนี้ เมื่อตรวจพบว่าไก่ตัวใดตัวหนึ่งในกลุ่มมีระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เจาะเลือดที่ติดเชื้อและแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

เลือดส่วนที่หนึ่ง นำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องอย่างน้อย 8 ครั้ง โดย ผ่านเชื้อเข้าสู่ไก่ จำนวน 5 ตัวต่อครั้ง พร้อมทั้งให้ยา pyrimethamine ขนาดเดิมทุกครั้ง (รูปที่ 3.1 ขั้นตอนที่ 3.1) จึงจะนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *P. gallinaceum* เพื่อศึกษายีน *dhfr-ts* ตามการทดลองที่ 3 ข้อ 3.3.3

เลือดส่วนที่ 2 นำไปฉีดเข้าไก่ปลอดเชื้อกลุ่มใหม่อีก 5 ตัว เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ได้รับยา pyrimethamine ในขนาด 2 4 8 และ 16 เท่าของ minimum effective dose ตามลำดับ (รูปที่ 3.2 ขั้นตอนที่ 4 5 และ ต่อๆไป) ดังข้อ 3.3.2.2.2

3.3.2.2.2 ศึกษาระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ที่ได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด ที่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าของขนาด MED ขึ้นไป (ตั้งแต่ 2 , 4 , 8 และ16 เท่าของMED)

การทดลองแต่ละขั้นตอน ดำเนินการตามวิธีเช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 3.3.2.1 ดังรูปที่ 3.2 ขั้นตอนที่ 5 และขั้นตอนต่อๆไปเป็นลำดับ เชื้อที่ได้จากการทดสอบด้วยยา pyrimethamine แต่ละขนาด และที่ผ่านเชื้อต่อเนื่องไปอย่างน้อย 10 ครั้ง นำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อศึกษายีน *dhfr-ts* ตามการทดลองที่ 3 ข้อ 3.3.3

3.3.2.3 วิเคราะห์และประเมินผล โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ของไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับยาและได้รับยา pyrimethamine ต่อเนื่อง โดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Duncan's multiple range test และศึกษาความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดของไก่ที่ได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่อง โดยใช้โปรแกรม JMP version 5.1

3.3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum*

3.3.3.1 การออกแบบและการสังเคราะห์ไพรเมอร์

ในการทดลองครั้งนี้ได้มีการออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ดังนี้

ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ไพรเมอร์คู่นี้ออกแบบขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนคู่สายดีเอ็นเอเฉพาะตำแหน่งที่มักเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *dhfr-ts* ที่อยู่ในช่วงของลำดับเบสตั้งแต่ 321 ถึง 590 ดังไดอะแกรมที่แสดงในรูปที่ 3.3 ซึ่งใกล้เคียงกับตำแหน่งกรดอะมิโน serine-108-asparagine ของเชื้อ *P. falciparum* ออกแบบโดยวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของ *dhfr-ts* gene จากเชื้อมาลาเรีย 2 ชนิด ที่ศึกษาจาก GenBank คือ *P. gallinaceum* ที่มีลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ขนาด 2,091 เบส และ *P. falciparum* ที่มีลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ขนาด 1,827 เบส โดยใช้โปรแกรม Clustal-w ออกแบบได้ไพรเมอร์ ที่มีลักษณะดังนี้

Forward primer 5'-GGA AAA GTA ACC CAT TAG ACA TGA A-3' ความยาว 25 เบส อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, T_m) มีค่าเท่ากับ 68 °C

Reverse primer 5'-TCT TCT TTT TTT AAT GAT CTT GAT AAT-3' ความยาว 27 เบส อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, T_m) มีค่าเท่ากับ 64 °C

ผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะได้รับ คือ ประมาณ 269 คู่เบส

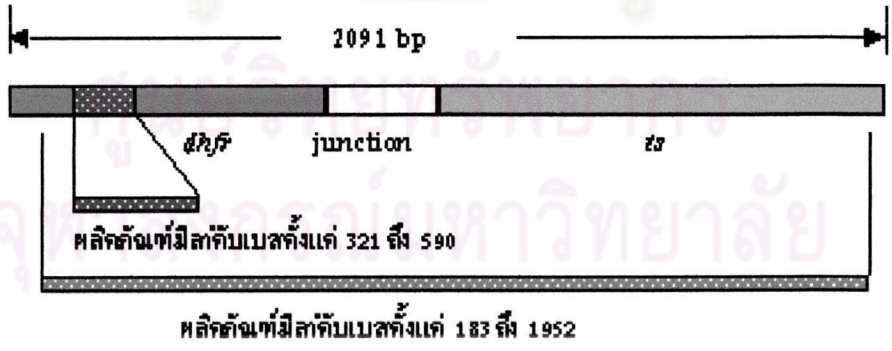
ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ไพรเมอร์คู่นี้ออกแบบขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตลอดทั้งคู่สายของยีน *dhfr-ts* ที่มีช่วงของลำดับเบสตั้งแต่ 183 ถึง 1952 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จะครอบคลุมส่วนของยีน *dhfr-ts* ทั้งหมด ออกแบบโดยวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของ *dhfr-ts* gene ที่ได้จาก GenBank โดยศึกษาจากเชื้อมาลาเรียที่พบว่ามีการกลายพันธุ์สูงสุด คือ *P. falciparum* และลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ยังไม่ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีการกลายพันธุ์ ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม DNASIS ที่มีลักษณะดังนี้

Forward primer 5'-ATG AAT GAA ATA TCT GAT ATT TTT GAT ATA CAC GC-3' ความยาว 35 เบส อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, T_m) มีค่าเท่ากับ 66.5 °C

Reverse primer 5'-TTA TGC AGC CAT ATC CAT AGA AAT TTT ATC-3' ความยาว 30 เบส อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, T_m) มีค่าเท่ากับ66.1 °C

ผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะได้รับ คือ ประมาณ 1,770 เบส

การสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ผลิตขึ้นโดยหน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ราชเทวี กรุงเทพมหานคร



รูปที่ 3.3 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ 1 และ คู่ที่ 2

3.3.3.2 ศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ไอโซเลท MNTH2543 ที่ไม่ได้รับยา และได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 4 8 และ 16 เท่าของขนาด MED

นำเลือดไก่จากการทดลองในข้อ 3.3.2.1 – 3.3.2.4 ที่มีการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในเม็ดเลือดแดง ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา และกลุ่มที่ได้รับยา pyrimrthamine ดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

ก. การแยกเชื้อมาลาเรียไก่

เลือดทุกตัวอย่างที่เก็บจากไก่ในข้อ 3.3.2.1 – 3.3.2.4 นำมาแยกเชื้อ *P. gallinaceum* ออกจากเม็ดเลือดแดง ตามวิธีของ ทวี (2543) โดยปั่นล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS (pH 7.4) ที่เย็น ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกด้วยวิธี freezing-thawing ปั่นล้างซ้ำเช่นเดิม แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวและนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงออกด้วย PBS (pH 7.4) อุณหภูมิห้อง และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วของแรงเหวี่ยง 5000 ถึง 13,000 รอบต่อนาที และนำตะกอนที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายไปสกัดดีเอ็นเอ

ข. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทุกตัวอย่าง กระทำตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยใช้ lysis buffer (0.2 M NaOH ใน 10% SDS) 500 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K 20 ไมโครลิตร เติมลงในตะกอนเชื้อมาลาเรีย เขย่าให้เข้ากัน ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง และนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/chloroform extraction เติมสารละลาย TE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในตะกอนดีเอ็นเอ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความเข้มข้น และตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ gel electrophoresis ก่อนที่จะนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

ค. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียไก่ที่สกัดได้ทุกตัวอย่าง นำมาเพิ่มจำนวนคู่สายดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยใส่สารละลายต่างๆที่ใช้ลงไปในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มล. ปริมาตรรวม 25 µl (ดัดแปลงจาก Peterson, 2001) ตามสัดส่วนความเข้มข้น ดังนี้

<u>1ค. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1</u>

(เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะที่ที่มักเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *dhfr-ts* ใกล้เคียงกับตำแหน่ง Serine-108-Asparagine)

	ความเข้มข้นต่อปฏิกิริยาการทดลอง
Forward primer 1	0.2 µM
Reverse primer 1	0.2 µM
dNTPs	200 µM

Taq DNA Polymerase	2.5 unit/25 µl
10x buffer	1x
$MgCl_2$	1.5 µM
DNA template	2.5 µl

นำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบ โดยใส่ในเครื่อง Thermal cycler ที่สภาวะของ denateration annealing และ extension ดังนี้

	Denaturation	94 °C	5 นาที
รอบที่ 1-35			
	Denaturation	94 °C	30 วินาที
	Annealing	50 °C	30 วินาที
	Extension	72 °C	1 นาที
และ			
	Extension	72 °C	10 นาที

2ค. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2

(เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอให้ครอบคลุมตลอดคู่สายของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *P. gallinaceum* ทั้งหมดทุกส่วน)

โดยใช้ความเข้มข้นต่อปฏิกิริยาการทดลองในสัดส่วนเช่นเดียวกัน เว้นแต่ ไพรเมอร์ที่ใช้นั้น เป็น ไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Forward primer และ Reverse primer 2) นำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจำนวน 30 รอบ โดยใส่เครื่อง Thermal cycler ที่สภาวะของ denateration annealing และ extension ดังนี้

	Denaturation	95 °C	5 นาที
รอบที่ 1-30			
	Denaturation	95 °C	30 วินาที
	Annealing	50-60 °C	35 วินาที
	Extension	72 °C	2 นาที 30 วินาที
และ			
	Extension	72 °C	10 นาที

ง. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR โดยการใช้ gel electrophoresis ด้วย 1-2% agarose gel ใน 1X TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ศึกษาและสังเกตแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator ถ่ายรูปด้วยกล้องโพลารอยด์

จ. การทำให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (Qiagen) ตามวิธีมาตรฐานของผู้ผลิต QIAquick™ Spin Handbook

ฉ. การหาลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อ *P. gallinaceum* (direct sequencing from PCR product)

ส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว นำไปหาลำดับเบสโดยเครื่องมือ automated DNA sequencer ที่หน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ถนนพระราม 6 พญาไท ราชเทวี กรุงเทพมหานคร

ช. การวิเคราะห์และประเมินผล ใช้โปรแกรม BioEdit ในการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* (multiple DNA alignments) กับลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* จากเชื้อมาลาเรีย *P. gallinaceum* และ *P. falciparum* หาความสัมพันธ์ของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่

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

เลือดไก่ที่ติดเชื้อมาลาเรีย จำนวน 3 isolates คือ MNTH2543 BYTH2546 และPCTH2543 จากข้อ 3.2.2.1 นำมาศึกษายีน *dhfr-ts* ตามขั้นตอนและวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.3.3.2 ลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ นำมาเปรียบเทียบกันทั้ง 3 isolates และ เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน*dhfr-ts* จากเชื้อมาลาเรียไก่ที่ศึกษาจาก GenBank (multiple DNA alignments) โดยใช้โปรแกรม BioEdit

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย