

ผลของยาไพริเมทามีนต่อการติดเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* และ ยีน *โดไฮโดรโฟเลทรีค* เตท-
ไทม์โคเลทซินเทส



นายสุรสิทธิ์ อ้วนพรมมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4564-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF PYRIMETHAMINE ON *PLASMODIUM GALLINACEUM* INFECTION AND ON DIHYDROFOLATE
REDUCTASE – THYMIDYLATE SYNTHASE (*DHFR-TS*) GENE



Mr. Surasit Aunpromma

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Veterinary Pathobiology

Department of Pathology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2003


ISBN 974-17-4564-8

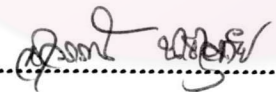
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของยาไพริเมทามีนต่อการคิดเชื้อ พลาส โมเดียม กัลลินาเซียม
และ ยีน ไคไฮโคร โฟเลทรีคักเทส-โทมิโคเลทซินเทส
โดย นายสุรสิทธิ์ อ้วนพรมมา
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง คร. สุวรรณิ นิธิอุทัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ คร. พงษ์ หาดูยทธนากร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง คร. นารีรัตน์ วิเศษกุล

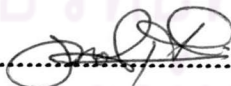
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

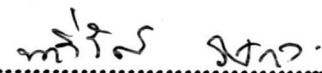

..... คณะบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ คร. วรรณศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ คร. เล็ก อัสวพลังชัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง คร. สุวรรณิ นิธิอุทัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ คร. พงษ์ หาดูยทธนากร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง คร. นารีรัตน์ วิเศษกุล)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ คร. โกสม จันทรศิริ)

สุรสิทธิ์ อ้วนพรมมา : ผลของยาไพริเมทาไมนต่อการติดเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* และ ยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส-ไทมิดีเลทซินเทส [EFFECTS OF PYRIMETHAMINE ON *PLASMODIUM GALLINACEUM* INFECTION AND ON DIHYDROFOLATE REDUCTASE – THYMIDYLATE SYNTHASE (*DHFR-TS*) GENE] อ.ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร. สุวรรณิ นิธิอุทัย อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร : อ.สพ.ญ.ดร. นาริรัตน์ วิเศษกุล ; 111 หน้า, ISBN 974-17-4564-8

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของยาไพริเมทาไมนต่อการติดเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* และผลของยาไพริเมทาไมนต่อยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส-ไทมิดีเลทซินเทสของเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* ในไก่ไข่เพศผู้อายุ 3-4 สัปดาห์ ในการศึกษาประสิทธิภาพของยา ใช้ไก่ จำนวน 220 ตัว แบ่งเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว กลุ่มที่ 1 ไก่ควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา กลุ่มที่ 2 ไก่ควบคุมที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับยา กลุ่มที่ 3-11 ไก่ติดเชื้อและได้รับยา 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 ผลปรากฏว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก กก.⁻¹ มีประสิทธิภาพสูงสุด (minimum effective dose, MED) อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดลดลงอย่างเห็นได้ชัดลดการทดลอง แต่ยาไม่สามารถกำจัดเชื้อให้หมดไปจากกระแสเลือดได้

การศึกษการเปลี่ยนแปลงของระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด หลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 4 เท่าของขนาด MED ใช้ไก่ จำนวน 120 ตัว แบ่งใช้เป็นรุ่นๆ รุ่นละ 10 ตัว 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว กลุ่มที่ 1 ไก่ควบคุมที่ติดเชื้อและไม่ให้ยา กลุ่มที่ 2 ไก่ที่ติดเชื้อ ไอโซเลท MNTH2543 ให้ยาไพริเมทาไมน 7.5 มก กก.⁻¹ ติดต่อกันนาน 4 วัน ต่อรุ่น ทำการทดลองเช่นเดิมต่อเนื่องในไก่ 10 รุ่น ปรากฏว่า ยาไม่สามารถกำจัดให้เชื้อหมดไป แต่อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในเลือดลดลงเป็นลำดับอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อและไม่ได้รับยา ส่วนการให้ยาไพริเมทาไมน 15 และ 30 มก กก.⁻¹ ได้ทำการทดลองในไก่ที่ติดเชื้อจำนวน 3 และ 1 รุ่นตามลำดับ พบว่า ไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยาไพริเมทาไมน 15 มก กก.⁻¹ อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในเลือดต่ำมากแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จาก ไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อและไม่ให้ยา การใช้ขนาด 15 และ 30 มก กก.⁻¹ มีผลข้างเคียงสูงทำให้ไก่ตายในที่สุด

การศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* 3 ไอโซเลท คือ MNTH2543, BYTH2546 และ PCTH2543 ในไก่ติดเชื้อที่ไม่เคยได้รับยา และเชื้อ ไอโซเลท MNTH2543 ในไก่ที่ติดเชื้อและให้ยาไพริเมทาไมน ในขนาด 1, 2 และ 4 เท่าของ MED ตามการทดลองข้างต้น ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิคที่เกิดจากปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่ที่ 1 ออกแบบให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 321 ถึง 590 และคู่ที่ 2 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 183 ถึง 1952 และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ปรากฏว่า การใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ในปฏิกิริยาดังกล่าว ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 269 เบส เท่ากันทุกตัวอย่าง กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 109 ของ ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อที่ไม่เคยได้รับยาไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 และ เชื้อ ไอโซเลท MNTH2543 ที่ได้รับยาขนาด MED และ 2X MED มีลำดับเบสเป็น asparagine (AAC) แตกต่างกับกรดอะมิโนของเชื้อ ไอโซเลท PCTH2543 และเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* จากฐานข้อมูลของ GenBank (accession no. AY 033582) ที่มีลำดับเบสเป็น serine (AGC) จากผลที่ได้จึงคาดว่าเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* MNTH2543 และ BYTH2546 มียีนที่คือต่อยาไพริเมทาไมน สำหรับการให้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ในปฏิกิริยาถูกลูกโซ่เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1770 เบส โดยตรวจพบได้จากตัวอย่างเชื้อ ไอโซเลท MNTH2543 ที่ไม่เคยได้รับยาเท่านั้น สำหรับตัวอย่างอื่นๆยังตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ

ภาควิชาพยาธิวิทยา

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....


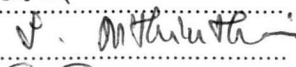
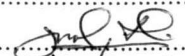
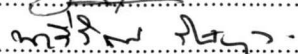
##4375569631 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEY WORD : *PLASMODIUM GALLINACEUM* / PYRIMETHAMINE / DRUG RESISTANCE / *DHFR-TS* GENE
 SURASIT AUNPROMMA : EFFECTS OF PYRIMETHAMINE ON *PLASMODIUM GALLINACEUM*
 INFECTION AND ON DIHYDROFOLATE REDUCTASE – THYMYDLATE SYNTHASE (*DHFR-TS*)
 GENE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUWANNEE NITHIUTHAI, D.V.M., Ph.D. THESIS
 COADVISORS : PONGCHAI HARNYUTTANAKORN, B.Sc. , Ph.D., NAREERAT VISESHAKUL,
 D.V.M., Ph.D. 111 pp. ISBN 974-17-4564-8

The aim of this study is to determine the efficacy of pyrimethamine on *Plasmodium gallinaceum* and the effect of this drug on the parasitic enzyme dihydrofolate reductase – thymidylate synthase. Two hundred and twenty 3-4 weeks old chicken were divided into 11 groups of 20 animals. There were two control groups, one was the untreated non-infected animal and the other was the untreated but infected animal. There were 9 experimental groups with the pyrimethamine treatment at various doses; 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg kg⁻¹. Results indicated that the minimum effective dose (MED) of 7.5 mg kg⁻¹ pyrimethamine was able to diminish percentages of parasitemia at an asexual blood stage of *P. gallinaceum*. On the other hand, a low level of parasitemia was still detected.

The following attempt was to determine the level of parasitemia of *P. gallinaceum* MNTH2543 after pyrimethamine treatment at the repeating dosages of MED (7.5 mg.kg⁻¹), 2 times MED (15 mg.kg⁻¹) and 4 times MED (30 mg.kg⁻¹). One hundred and twenty animals were used in this attempt. There were 2 groups of 5 animals were for the control; one was the untreated but infected control group and the other was the treated and infected animal with 7.5 mg kg⁻¹ of pyrimethamine. Animals were given the drug for 4 consecutive days then they were transferred to 10 passages. For the treatment of 15 mg.kg⁻¹ they were passaged upto 3 times. There was only one passage at the dose of 30 mg kg⁻¹. Average percentages of parasitemia when treated with 7.5 mg kg⁻¹ appeared to be significantly lower than the control group (p<0.05) but parasitemia was not completely eliminated. At the dose of 15 mg kg⁻¹, the parasitemia of the treated animals were also significantly lower than the control group (p<0.05). All chicken of the third passage treated with 15 mg kg⁻¹ and 30 mg kg⁻¹ pyrimethamine died presumably due to the toxic effect of a high dose pyrimethamine.

The final attempt was to characterize the *dhfr-ts* gene of 3 pyrimethamine untreated *P. gallinaceum*; MNTH2543, BYTH2546 and PCTH2543 and one treated isolate, MNTH2543 (MED, 2X MED and 4X MED). Two different pairs of PCR primers were used to amplify the gene at position 321 – 590 bp given a PCR product of 269 bp and the second pair of the PCR primer was to amplify the gene at position 183 – 1952 bp and given a product of 1770 bp. Amino acid position 109 of MNTH2543 (untreated), BYTH2546 (untreated), and MNTH2543 (treated) was detected as asparagine (AAC). In contrast, amino acid 109 of PCTH2543 was serine (AGC) when compared to the amino acid sequence of *P. gallinaceum*, (Genbank accession no. AY 033582). Thus, 2 isolates of *P. gallinaceum*; MNTH2543, BYTH2546 were presumed to carry the resistant gene of *dhfr-ts* prior to the experiment. The PCR product of 1770 bp was successfully established from the *P. gallinaceum* MNTH2543 (pyrimethamine untreated isolate).

Department	Pathology	Student's signature..... 
Field of study	Pathobiology	Advisor's signature..... 
Academic year	2003	Co-advisor's signature..... 
		Co-advisor's signature..... 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของ รศ. สพ.ญ. ดร. สุวรรณิ นิธิอุทัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ. ดร. พงษ์ หาดยูทธรนากร และ อ. สพ.ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้แนวความคิด คำแนะนำ ตลอดจนชี้แนะแนวทางและแก้ไขข้อบกพร่องทำให้งานเสร็จสมบูรณ์เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ. ดร. มานพ ม่วงใหญ่ และ ผศ. ดร. สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา ที่ได้ให้ความรู้ทางวิชาการในสาขาวิชาปรสิตวิทยา รวมทั้งให้ข้อคิดและกำลังใจตลอดการเรียนในหลักสูตรปริญญาโทระดับบัณฑิต ขอขอบคุณบุคลากรและเจ้าหน้าที่ที่หน่วยปรสิตวิทยา คุณสุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ ที่ได้ให้คำแนะนำในห้องปฏิบัติการ คุณจุฑามาศ คอนทอง ที่ช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง คุณทุเรียน แก้วทอง คุณวินัย จันทร์หอม สำหรับความช่วยเหลือในห้องสัตว์ทดลองตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณ รศ. น.สพ. ดร. จิโรจน์ ศศิปริยจันทร์ สำหรับความอนุเคราะห์สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบพระคุณ ผศ. อัจฉรา ธวัชสิน สำหรับคำแนะนำการใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณ อ.น.สพ. ดร. สนธยา เดียวศิริทรัพย์ ที่ช่วยเหลือด้านวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขอขอบคุณ น.สพ. ดำเนิน เสาะสืบงาม สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการ การเลี้ยงไก่และการศึกษาการวิเคราะห์ข้อมูล คุณพัชรี ทรงประโคน ที่ช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการ น.สพ. กาญจน์ เชื้อศิริ สำหรับคำแนะนำการใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล และคุณชาญชัย ทะไกรราช ที่ช่วยเหลือในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 ทุนอุดหนุนการวิจัยหรือค้นคว้าเพื่อทำวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2545 และทุนจากโครงการวิจัยโรคมะเร็งไก่อและโรคปรสิตเขตร้อนในประเทศไทย หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ขอขอบคุณภรรยาและบุตรที่เป็นกำลังใจตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
มูลเหตุจูงใจ.....	2
วัตถุประสงค์.....	3
สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
การจำแนกชั้นของเชื้อมาลาเรีย.....	4
การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรีย.....	5
สัณฐานวิทยาของเชื้อมาลาเรียไก่ <i>P. gallinaceum</i>	6
วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่ <i>P. gallinaceum</i>	7
อาการทางคลินิก.....	10
พยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยา.....	12
การตรวจวินิจฉัย.....	13
การควบคุมและป้องกัน โรคมาลาเรียไก่.....	15
ยาด้านเชื้อมาลาเรีย.....	15
การรักษาโรคมาลาเรียในคน.....	19
การรักษาโรคมาลาเรียในสัตว์.....	20
การใช้ยารักษาโรคมาลาเรียในสัตว์และสัตว์ปีก.....	20
การใช้ยา pyrimethamine รักษาโรคมาลาเรียในสัตว์ปีก.....	21
ปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียในคนและในสัตว์.....	24
การศึกษาเอ็นไอไคไฮโดรโฟเลทรีดักเตส-ไทมิดิเลทซินเทสของเชื้อมาลาเรีย.....	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	28
วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
วิธีการ.....	28
การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ในการรักษา โรคมาลาเรียได้.....	29
การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> หลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่ม ขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 16 เท่าของขนาด MED	31
การทดลองที่ 3 ศึกษา ยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i>	34
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	39
การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของยา pyrimethamine ในการรักษา โรคมาลาเรียได้.....	39
การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> หลังการให้ยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่องในขนาด MED และขนาดที่เพิ่ม ขึ้นเป็น 2, 4, 8 และ 16 เท่าของขนาด MED	43
การทดลองที่ 3 ศึกษา ยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i>	54
บทที่ 5 วิจารณ์ สรุปลผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	65
รายการอ้างอิง.....	74
ภาคผนวก.....	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	111

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่ <i>P. gallinaceum</i>9
2.2	โครงสร้างทางเคมีของยา pyrimethamine.....19
2.3	แสดงส่วนประกอบหลักของยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และ <i>P. falciparum</i>25
2.4	แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. falciparum</i>26
3.1	การแบ่งกลุ่มไก่ทดลองจำนวน 11 กลุ่ม ปริมาณเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ที่ไก่ได้รับ และ ขนาดยาที่ใช้.....30
3.2	แสดงการให้ยา pyrimethamine ขนาดต่างๆ ต่อเนื่อง เพื่อให้เชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ค่อยๆ.....33
3.3	แสดงส่วนที่มีการออกแบบไพโรเมอรัของยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i>35
4.1	ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ในกระแสเลือดในไก่ไข่มุขจำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ก่อนและหลังการรักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10 มก.กก. ⁻¹ ติดต่อกันนาน 5 วัน และติดตามผลต่อเนื่องกันทุกวันนาน 15 วัน.....40
4.2	log drug concentrations แสดง ED50 และ ED90 ของยา pyrimethamine ประเมินจาก อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด(% parasitemia) ในไก่ไข่มุขจำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ที่รักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10.0 มก.กก. ⁻¹ ติดต่อกัน นาน 5 วัน และ ติดตามผลต่อเนื่องกันทุกวันนาน 15 วัน.....41
4.3	อัตราร้อยละของของไก่ที่ตรวจพบเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ระยะ schizont ที่อยู่ในกระแสเลือด ของไก่ไข่มุขที่ติดเชื้อ ก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04 – 10 มก.กก. ⁻¹ ติดต่อกันนาน 5 วัน และติดตามผลต่อเนื่องกันทุกวันนาน 15 วัน.....42
4.4	อัตราการตายของไก่ไข่มุขจำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และให้การรักษาด้วยยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10 มก.กก. ⁻¹ ติดต่อกัน นาน 5 วัน และติดตามผลต่อเนื่องกัน ทุกวันนาน 15 วัน.....43
4.5	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่มุขอายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุม (A1-A10) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และไม่ได้รับยา pyrimethamine กลุ่มทดลอง (B1-B10) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> 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 (ก-ญ = รุ่นที่ 1-10).....45

สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุม (A3-A5) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และไม่ได้รับยา pyrimethamine และกลุ่มทดลอง (C1-C3) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 15 มก.กก. ⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกันและติดตามผลนาน 7-14 วัน หลังจากให้ยา รุ่นที่ 1-347
4.7	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุม (A5) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และไม่ได้รับยา และกลุ่มทดลอง (D1) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 30 มก. กก. ⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกันและติดตามผลนาน 13 วัน หลังจากให้ยา รุ่นที่ 1....48
4.8	แสดงความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดระหว่างไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยารักษาและไก่กลุ่มทดลองที่ติดเชื้อและได้รับยา pyrimethamine53
4.9	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน <i>dhfr-ts</i> จากเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ไอโซเลท MNTH2543 ในตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา(A 10) และตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อและหลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก. ⁻¹ 2 4 6 8 และ 10 ครั้ง (กลุ่มทดลอง B2, B4, B6, B8 และB10 และหลังจากที่ได้รับยา ขนาด 15 มก.กก. ⁻¹ 2 ครั้ง (กลุ่มทดลอง C2) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 2% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (ไพรเมอร์คู่ที่ 1).....55
4.10	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen)ของยีน <i>dhfr-ts</i> จากเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ไอโซเลท MNTH2543 ตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อและหลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก. ⁻¹ 2 4 6 8 และ 10 ครั้ง (กลุ่มB8 และB10) และหลังจากที่ได้รับยา ขนาด 15 มก.กก. ⁻¹ 2 ครั้ง (กลุ่ม C2) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 2% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (ไพรเมอร์คู่ที่ 1)56
4.11	ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> MNTH2543 ที่ไม่ได้รับยา และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก. ⁻¹ 2 4 6 8 10 (กลุ่มB2, B4, B6, B8, B10) และ ที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 15 มก.กก. ⁻¹ (กลุ่ม C2) และเปรียบเทียบลำดับเบสกับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> (pgdhfr) (accession no. AY033582) เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine sensitive, isolate 3D7) และ เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine resistance, accession no. J03772) ของข้อมูลจาก Genbank.....57

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
4.12	<p>กรดอะมิโนเปรียบเทียบระหว่างยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> MNTN2543 ที่ไม่ได้รับยา และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 2 4 6 8 10 (กลุ่มB2, B4,B6, B8, B10) และ ที่ได้รับยา pyrimethamine ขนาด 15 มก.กก.⁻¹ (กลุ่ม C2) และ เปรียบเทียบกรดอะมิโนกับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> (pgdhfr) (accession no.AY033582) เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine sensitive) และ เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine resistance) ของข้อมูลจาก Genbank.....</p>	58
4.13	<p>ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน <i>dhfr-ts</i> จากเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ไอโซเลท MNTN2543 ในตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา(A2, A6, A10) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (โปรแกรมรูนูที่ 2: annealing temprature 60 °C).....</p>	59
4.14	<p>ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน <i>dhfr-ts</i> จากเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ไอโซเลท MNTN2543 ในตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา(A10) และตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อและ หลังจากได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก.กก.⁻¹ 2, 4, 6, 8 และ 10 ครั้ง (กลุ่มทดลอง B2, B4, B6, B8 และ B10) และหลังจากที่ได้รับยาขนาด 15 มก.กก.⁻¹ 2 ครั้ง (กลุ่มทดลอง C2) โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (โปรแกรมรูนูที่ 2: annealing temprature 55 °C).....</p>	60
4.15	<p>ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน <i>dhfr-ts</i> จากเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ไอโซเลท MNTN2543 ในตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อแต่ไม่ได้รับยา(A 2, A10) และตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อและ หลังจากได้รับยา 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 (โปรแกรมรูนูที่ 2: annealing temprature 50 °C).....</p>	60
4.16	<p>ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (Qiagen)ของยีน <i>dhfr-ts</i> จากเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ไอโซเลท MNTN2543 ตัวอย่างเลือดไก่ที่ติดเชื้อที่ไม่เคยได้รับยา pyrimethamine โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที (โปรแกรมรูนูที่ 2 annealing temprature 55 °C).....</p>	61

สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.17	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีน <i>dhfr-ts</i> จากเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ที่ได้จากปฏิกิริยา ลูกโซ่ ด้วยเทคนิค PCR ของไพรเมอร์ที่ 1 และ 2 ของยีน <i>dhfr-ts</i> โดยใช้ electrophoresis ใน agarose gel 1.5% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที62
4.18	ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ที่ไม่ได้รับยา จำนวน 3 ไอโซเลท คือ MNTH2543 BYTH2546 และ PCTH2543 และเปรียบเทียบลำดับเบส กับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> (<i>pgdhfr</i>) (accession no. AY033582) เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine sensitive, isolate 3D7) และ เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine resistance, accession no. J03772) ของข้อมูลจาก Genbank63
4.19	ลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบเปรียบเทียบระหว่างยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ที่ไม่ได้รับยา จำนวน 3 ไอโซเลท คือ MNTH2543 BYTH2546 และ PCTH2543 และ เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของ เชื้อ <i>P. gallinaceum</i> (<i>pgdhfr</i>) (accession no. AY033582) เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine sensitive) และ เชื้อ <i>P. falciparum</i> (pyrimethamine resistance) ของข้อมูลจาก Genbank64

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1	ยาด้านเชื้อมาลาเรียที่มีแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี18
4.1	แสดงอัตราการติดเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 21 วัน จำนวน 11 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว ก่อนและหลังการรักษาด้วยยา pyrimethamine ติดต่อกันนาน 5 วัน.....39
4.2	ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-3 สัปดาห์ กลุ่มละ 5 ตัวที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ในขนาด 7.5 มก. กก. ⁻¹ ครั้งที่ 1 และ 2 ครั้งละ 4 วันติดต่อกัน และติดตามผลนาน 7-14 วัน.....44
4.3	ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มละ 5 ตัวที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ในขนาด 15 มก. กก. ⁻¹ ครั้งที่ 1 และ 2 ครั้งละ 4 วันติดต่อกัน และติดตามผลนาน 7-14 วัน.....46
4.4	ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 21 วันกลุ่มละ 5 ตัวที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ในขนาด 30 มก. กก. ⁻¹ ครั้งที่ 1 นาน 4 วันติดต่อกัน และติดตามผลนาน 10 วัน.....48
4.5	ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุม (A1-A10) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และไม่ได้รับยา pyrimethamine อย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น แต่ละรุ่นติดตามผลนาน 7-14 วัน.....50
4.6	ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มทดลอง (B1-B10) ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> และได้รับยา pyrimethamine ขนาด 7.5 มก. กก. ⁻¹ นาน 4 วันติดต่อกัน และให้ยาในไก่ที่ติดเชื้ออย่างต่อเนื่อง 10 รุ่น แต่ละรุ่นติดตามผลนาน 7-14 วัน.....51
4.7	ค่าเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด (%parasitemia) ในไก่ไข่เพศผู้ อายุ 2-4 สัปดาห์ กลุ่มละ 5 ตัว ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ก่อนและหลังการให้ยา pyrimethamine ใน ขนาด 15 มก. กก. ⁻¹ ครั้งที่ 1 2 และ 3 ครั้งละ 4 วันติดต่อกันและนาน 7-14 วัน.....52

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
ก. วัสดุและอุปกรณ์.....	84
ข. การเตรียมน้ำยาเคมีและสียที่ใช้ในการย้อมเม็ดเลือด.....	86
ค. วิธีนับและคำนวณหาจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้ในเลือด.....	89
ง. การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>dhfr-ts</i> ของเชื้อมาลาเรีย 5 ชนิด.....	90
จ. ตารางในภาคผนวก.....	94
ฉ. ภาพในภาคผนวก.....	99



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพในภาคผนวก

หน้า

ผ 1 แสดงตำแหน่งที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดของตาราง hemocytometer89

ผ 2 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อมาลาเรียชนิดต่างๆ ที่มีใน GenBank
คือ *P. falciparum* , *P. vivax* , *P. gallinaceum*, *P. chabuadi* และ *P. berghei*90

ผ 3 ED50 และ ED90 ของยา pyrimethamine ประเมินจากอัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแส
เลือดตั้งแต่เริ่มให้ยาจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (DPT 0-14) (ใช้โปรแกรมSPSS).....99

ผ4 ED50 ของยา pyrimethamine ประเมินจากอัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือด
ตั้งแต่เริ่มให้ยาจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (DPT 0-14) โดยการใช้โปรแกรม JMP.....100

ผ5 ED50 ที่ประเมินจากค่าเฉลี่ยระดับเชื้อ *P.gallinaceum* ในกระแสเลือด (% parasitemia) ใน
ไก่ไข่เพศผู้ ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 12 หลังการให้ยา pyrimethamine ขนาด 0.04–10 มก.กก.⁻¹101

ผ6 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ไอโซเลท MNTH2543 (ไม่ได้รับยา pyrimethamine) โดยใช้ forward primer 102

ผ 7 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ไอโซเลท BYTH2546 (ไม่ได้รับยา pyrimethamine)โดยใช้ forward primer 103

ผ 8 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ไอโซเลท PC2543 (ไม่ได้รับยา pyrimethamine)โดยใช้ forward primer 104

ผ 9 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ตัวอย่าง B2 (ได้รับยา pyrimethamine 7.5 มก.กก.⁻¹ 2 ครั้ง) โดยใช้ forward primer 105

ผ 10 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ตัวอย่าง B4 (ได้รับยา pyrimethamine 7.5 มก.กก.⁻¹ 4 ครั้ง) โดยใช้ forward primer 106

ผ 11 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ตัวอย่าง B6 (ได้รับยา pyrimethamine 7.5 มก.กก.⁻¹ 6 ครั้ง) โดยใช้ forward primer 107

ผ 12 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ตัวอย่าง B8 (ได้รับยา pyrimethamine 7.5 มก.กก.⁻¹ 8 ครั้ง) โดยใช้ forward primer 108

ผ 13 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ตัวอย่าง B10 (ได้รับยา pyrimethamine 7.5 มก.กก.⁻¹ 10 ครั้ง) โดยใช้ forward primer 109

ผ 14 Four-color electropherogram จากการตรวจหาลำดับเบสของเชื้อ *P. gallinaceum*
ตัวอย่าง C2 (ได้รับยา pyrimethamine 15 มก.กก.⁻¹ 2 ครั้ง) โดยใช้ forward primer 110

สารบัญตารางในภาคผนวก

ตาราง	หน้า
ผ1 ค่าเฉลี่ยของ %parasitemia ในไก่ไข่เพศผู้ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ก่อนและหลังการรักษาด้วยยา pyrimethamine ในขนาดต่างๆ (มก. กก. ⁻¹) นาน 5 วัน และติดตามผลนาน 14 วัน.....	94
ผ 2 อัตราร้อยละของการตรวจพบเชื้อ <i>P.gallinaceum</i> ระยะ schizont ที่อยู่ในกระแสเลือดของไก่ไข่เพศผู้ ก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยยา pyrimethamine ในขนาดต่างๆ (มก. กก. ⁻¹).....	96
ผ 3 อัตราการตายของไก่ไข่เพศผู้ที่ได้รับเชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ก่อนและหลังการรักษาด้วยยา pyrimethamine ในขนาดต่างๆ.....	98



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
มก.กก. ⁻¹	: มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
bp	: basepair
BYTH2546	: เชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ไอโซเลทที่เก็บจาก อ. บางใหญ่ ในปี 2546
<i>dhfr-ts</i>	: dihydrofolate reductase-thymidylate synthase
DPT	: Day post treatment
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
IFA	: Immunofluorescence assay
Infected rbc	: infected red blood cells
kb	: Kilobase
MED	: minimum effective dose
mg kg. ⁻¹	: milligram per kilogram
MNTH2543	: เชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ไอโซเลทที่เก็บจาก เขตมีนบุรี ในปี 2543
PBS	: Phosphate buffer saline
PCV	: Pack cell volume
PCTH2543	: เชื้อ <i>P. gallinaceum</i> ไอโซเลทที่เก็บจาก จ. ปราจีนบุรี
PCR	: Polymerase chain reaction
SDS	: Sodium dodecyl sulfite
SSUrRNA	: Small subunit ribosomal RNA
TE	: Tris-HCL+EDTA
TBE	: Tris+Boric acid+EDTA
UI	: ไมโครลิตร
UV	: แสงอัลตราไวโอเลต