T 160476

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

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของยาไพริเมทามีนต่อการติดเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* และผลของยาไพริเมทามีนต่อยีนไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส-ไทมิไดเลทซินเทสของเชื้อ *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.$^{-1}$ มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (minimum effective dose, MED) อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดลดลงอย่างเห็นได้ชัดตลอดการทดลอง แต่ยาไม่สามารถกำจัดเชื้อให้หมดไปจากกระแสเลือดได้

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเชื้อ *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 ไก่ที่ติดเชื้อไอโซเลท MNTH2543 ให้ยาไพริเมทามีน 7.5 มก กก.$^{-1}$ ติดต่อกันนาน 4 วัน ต่อรุ่น ทำการทดลองเช่นเดิมต่อเนื่องในไก่ 10 รุ่น ปรากฏว่า ยาไม่สามารถกำจัดให้เชื้อหมดไป แต่อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในเลือดลดลงเป็นลำดับอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อและไม่ได้รับยา ส่วนการให้ยาไพริเมทามีน 15 และ 30 มก กก.$^{-1}$ ได้ทำการทดลองในไก่ที่ติดเชื้อจำนวน 3 และ 1 รุ่นตามลำดับ พบว่าไก่กลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับยาไพริเมทามีน 15 มก กก.$^{-1}$ อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในเลือดต่ำมากแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากไก่กลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อและไม่ได้ให้ยา การใช้ยาขนาด 15 และ 30 มก กก.$^{-1}$ มีผลข้างเคียงสูงทำให้ไก่ตายในที่สุด

การศึกษายีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* 3 ไอโซเลท คือ MNTH2543, BYTH2546 และ PCTH2543 ในไก่ติดเชื้อที่ไม่เคยได้รับยา และเชื้อไอโซเลท MNTH2543 ในไก่ที่ติดเชื้อและให้ยาไพริเมทามีน ในขนาด 1, 2 และ 4 เท่าของ MED ตามการทดลองข้างต้น ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ด้วยเทคนิคที่เกิดจากปฏิกริยาลูกโซ่โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่ที่ 1 ออกแบบให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 321 ถึง 590 และคู่ที่ 2 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วงลำดับเบสที่ 183 ถึง 1952 และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ผลปรากฏว่า การใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ในปฏิกริยาดังกล่าว ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 269 เบส เท่ากันทุกตัวอย่าง กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 109 ของ ยีน *dhfr-ts* ของเชื้อที่ไม่เคยได้รับยาไอโซเลท MNTH2543 และ BYTH2546 และ เชื้อไอโซเลท 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 มียีนที่ดื้อต่อยาไพริเมทามีน สำหรับการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ในปฏิกริยาลูกโซ่เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *dhfr-ts* ของเชื้อ *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1770 เบส โดยตรวจพบได้จากตัวอย่างเชื้อไอโซเลท MNTH2543 ที่ไม่เคยได้รับยาเท่านั้น สำหรับตัวอย่างอื่นๆยังตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ

##4375569631 : MAJOR PATHOBIOLOGY

TE160476

KEY WORD : *PLASMODIUM GALLINACEUM* / PYRIMETHAMINE / DRUG RESISTANCE / *DHFR-TS* GENE

SURASIT AUNPROMMA : EFFECTS OF PYRIMETHAMINE ON *PLASMODIUM GALLINACEUM* INFECTION AND ON DIHYDROFOLATE REDUCTASE – THYMIDYLATE 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).