การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไก่ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและการเก็บถนอมเชื้อแช่แข็ง

นาย ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-574-4

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i 19236797 17 มี.ค. 2544

IN VITRO CULTIVATION AND CRYOPRESERVATION OF BLOOD STAGES OF MALARIAL PARASITE OF POULTRY

Mr. Piyanan Taweethavonsawat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pathobiology

Department of Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-334-574-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไก่ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและการเก็บถนอมเชื้อแช่แข็ง
โดย	นายปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์
ภาควิชา	พยาธิวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.สพ.ญ.ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.น.สพ.ดร. มานพ ม่วงใหญ่
	รศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.เล็ก อัศวพลังชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. มานพ ม่วงใหญ่)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(ศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์ : การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไก่ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและการเก็บถนอมเชื้อแช่แข็ง (In *vitro* cultivation and cryopreservation of blood stages of malarial parasite of poultry) อ. ที่ปรึกษา: รศ.สพ.ญ.ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.น.สพ.ดร. มานพ ม่วงใหญ่, รศ.น.สพ.ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ , 92 หน้า. ISBN 974-334-574-4

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทดลองหาวิธีการและน้ำยาเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่ไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดงของไก่ในห้องทดลอง และเพื่อศึกษาวิธีการเก็บและถนอมเชื้อ *P.gallinaceum* ที่อุณหภูมิ- 196 °ซ การศึกษาในครั้งนี้แบ่งเป็น 5 การทดลองคือ

การทดลองที่หนึ่ง ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อ *P.gallinaceum* ที่พบในเลือดไก่ซึ่งมี 4 ระยะ คือ trophozoite, schizont, merozoite และ gametocyte จากแผ่นฟิล์มเลือดบางย้อมสีอิมซ่า

การทดลองที่สอง ศึกษาระดับการติดเชื้อในกระแสเลือด อัตราการติดโรค และการก่อโรค ที่ทำการฉีดเชื้อ *P.gallinaceum* โดยมีปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจำนวน 5×10^4 เซลล์ เข้าใต้ผิวหนังลูกไก่ไข่เพศผู้อายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว ผลการศึกษาพบว่า เชื้อเริ่มปรากฏในกระแสเลือดในวันที่ 4 และพบมีระดับสูงสุดในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ ไก่มีอัตราการติดโรค ร้อยละ 100 และอัตราการตาย ร้อยละ 66.67 อาการทางคลินิกปรากฏชัดเจนในวันที่ 13 ได้แก่ ซึม ขี้เขียว เลือดจาง ร้อยละ 100, 67 และ 100 ตามลำดับ ผลการผ่าซากในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16 ปรากฏรอยโรคชัดเจนในวันที่ 16 ตับมีสีดำคล้ำ ม้ามขยายใหญ่และมีสีดำคล้ำ ถุงหุ้มหัวใจมีของเหลว และไตบวมน้ำ ลักษณะเด่นทางจุลพยาธิวิทยา คือ malarial pigment จำนวนมากที่ตับ และม้าม แต่พบประปรายที่ สมอง หัวใจและ ไต

การทดลองที่สาม เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของไก่ ในถาดเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ HEPES และโซเดียมไบคาร์บอเนต ในปริมาณของซีรั่มไก่ที่แตกต่างกัน และบ่ม (incubate) ในสภาวะบรรยากาศที่แตกต่างกันของ CO_2:O_2:N_2 ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงของเชื้อ *P.gallinaceum* ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร

การทดลองที่สี่ ศึกษาการเก็บถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 196 °ซ ด้วยวิธี 2-step cooling method โดยน้ำยาถนอมเชื้อ 3 ชนิด คือ glycerol-sorbitol, glycerol-lactate buffer และpolyvinyl pyrolidone เป็นระยะเวลา 1 และ 3 เดือน ผลการศึกษาพบว่า glycerol-lactate buffer มีความเหมาะสมมากกว่าอย่างอื่นในการใช้เก็บถนอมเชื้อ *P.gallinaceum* โดยมีอัตราการติดโรคในไก่สูงถึงร้อยละ 100 และ 60 ตามลำดับ เมื่อทดสอบโดยการฉีดเลือดเข้าไก่

การทดลองที่ห้า ศึกษาเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ของเชื้อ *P.gallinaceum* ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงไก่ที่มีปริมาณเชื้อต่างๆกัน โดยวัดค่า OD ที่ 650 nm ผลปรากฏว่าระดับของ เอนไซม์ LDH มีความสัมพันธ์ที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเชื้อ โดยที่ค่าเอนไซม์จะแปรผันตามปริมาณเชื้อในเม็ดเลือดแดง

ภาควิชา พยาธิวิทยา
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยา
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4075557831: MAJOR Pathobiology

KEYWORDS: cultivation/ cryopreservation/ malarial parasite/ poultry

PIYANAN TAWEETHAVONSAWAT : *In vitro* cultivation and cryopreservation of blood stages of malarial parasite of poultry. THESIS ADVISER : ASSOC.PROF.SUWANNEE NITHIUTHAI, Ph.D. THESIS COADVISER : ASSOC.PROF. MANOP MUANGYAI, DR.MED.VET; ASSOC.PROF. JIROJ SASIPREYAJAN, Ph.D. 92 pp. ISBN 974-334-574-4.

The purposes of this study are to find the method and media that appropriate for the in *vitro* cultivation of asexual erythrocytic stages of *Plasmodium gallinaceum* and to find the method and cryoprotectant for the cryopreservation of infected red blood cells at -196°C. The study consists of five experiments: Experiment I, morphology of *P. gallinaceum* was studied by Giemsa stained thin blood smears. Four stages of *Plasmodium gallinaceum* were found in the blood of chicken: trophozoite, schizont, merozoite and gametocyte.

Experiment II, % parasitemia, infectivity rate and pathological findings of experimental infected chicken were studied. Thirty 2- week-old male chickens were injected with 5 x 10^4 *P. gallinaceum* subcutaneously. Early detection of parasitemia was on day 4 and peak of parasitemia was evident on day 14 after infection. As determined on day 16 after infection, there were 100% infectivity rate and 67% mortality rate. The clinical signs of infected chickens on day 13 were depression, greenish feces and anemia with the percentage of 100, 67 and 100 respectively. Postmortem of infected animals was performed on day 0, 4, 8, 12 and 16 after infection. Darkness of liver, spleenomegaly, hydropericardium and kidney swelling were seen on day 16 after infection by gross lesion. The abundant of malarial pigment in liver and spleen were the typical character of histopathological lesion, but scattered in brain, heart and kidney.

Experiment III, *In vitro* cultivation of asexual blood stages of *P. gallinaceum* was performed in 24-well plates, various proportions of culture RPMI 1640 (supplemented with HEPES, bicarbonate buffer) mixed up with chick serum, incubate under the various condition of gaseous mixture, CO_2:O_2:N_2 at 37 °C for 7 days. However, the result was unsatisfied.

Experiment IV, 3 cryoprotectants, glycerol-sorbitol, glycerol-lactate buffer and polyvinyl pyrolidone were used for cryopreservation of *P. gallinaceum* infected red blood cell at -196 °C by 2-step cooling method. After 1 and 3 months the cryopreserved blood were evaluated for the survival rate by injection into chicken. The results revealed that glycerol-lactate buffer was the most appropriate cryoprotectant with the infectivity rate of 100% and 60% after 1 and 3 months preservation respectively.

Experiment V, lactate dehydrogenase (LDH) of *P. gallinaceum* in red blood cells was performed. Various levels of infected red blood cells were assayed for LDH at OD 650 nm. The results showed a direct correlation of LDH levels and % parasitemia.

ภาควิชา พยาธิวิทยา
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยา
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. มานพ ม่วงใหญ่ และ รองศาสตราจารย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัยมาด้วยดีตลอด บุคคลากรในหน่วยปรสิตทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านงานวิจัยเป็นอย่างดีมาตลอด

ขอขอบคุณ นายเทียมพบ ก้านเหลือง และนางสาวขนิษฐา ชันวิจิตร ที่ให้คำแนะนำในด้านการวิเคราะห์และคำนวณด้านสถิติ นางสาวสัจนา พัฒนาศักดิ์ ช่วยเหลือในด้านการทำรูปเล่ม และการศึกษาวิจัยในครั้งนี้บางส่วนได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ บิดา- มารดา และ พี่ๆ ซึ่งให้ความรัก และความห่วงใยตลอดจนช่วยสนับสนุนด้านการเงิน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ญ
บทที่
1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ 3
1.3 สมมติฐาน 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
2 ทบทวนวรรณกรรม 4
2.1 เชื้อมาลาเรีย 4
2.2 รูปร่างลักษณะของเชื้อมาลาเรียไก่ 6
2.3 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่ 7
2.3.1 การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในไก่ 9
ก. ระยะการเจริญเติบโตนอกเม็ดเลือดแดง 9
ข. ระยะการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง 9
2.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในยุง 10
2.4 ระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย 10
2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องทดลอง 12
2.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดง 12
2.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง 12

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

2.6 การเก็บเชื้อแช่แข็ง 15

2.7 การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย 17

2.7.1 การทำฟิล์มเลือดหนาและเลือดบาง 17

2.7.2 การตรวจหาลำดับของกรดนิวคลีโอไทด์ 17

2.7.3 การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *พลาสโมเดียม* 17

3 ระเบียบวิธีวิจัย 20

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการแบ่งกลุ่ม 20

3.2 การเตรียมเชื้อมาลาเรียไก่ 21

3.2.1 เชื้อมาลาเรียไก่ที่ใช้ 21

3.2.2 การผ่านเชื้อ 21

3.2.3 การเตรียมฟิล์มเลือดบางและการย้อมสี 21

3.2.4 การตรวจหาและประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด 22

3.3 การทดลองที่1

ศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงไก่ 22

3.4 การทดลองที่ 2

ศึกษาระดับของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ตรวจพบในกระแสเลือด

อัตราการติดโรค และการก่อโรค 22

3.5 การทดลองที่ 3

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในหลอดทดลอง (*In vitro*) 23

3.5.1 การเตรียมน้ำยาและซีรั่มสำหรับการเพาะเลี้ยง 23

3.5.1.1 การเตรียมเลือดไก่สำหรับการเพาะเลี้ยง 24

3.5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง

เชื้อ *P. gallinaceum* 24

3.6 การทดลองที่ 4

การถนอมและการเก็บเชื้อ *P. gallinaceum* แช่แข็งที่อุณหภูมิ –196 °ซ ... 26

3.6.1 น้ำยาถนอมเชื้อ 26

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

3.6.2 การเตรียมและการเก็บเชื้อ *P. gallinaceum* 28

3.6.3 การทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีการฉีดเข้าตัวสัตว์ 28

3.7 การทดลองที่ 5

การศึกษาระดับเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง 29

3.7.1 สารละลายที่ใช้ 29

3.7.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดไก่เพื่อตรวจวัดระดับ LDH 30

3.7.2.1 การวัดระดับของ LDH 31

3.7.2.2 การวิเคราะห์และประเมินค่า LDH ที่ระดับเชื้อ *P. gallinaceum* แตกต่างกัน 31

4. ผลการทดลอง 32

4.1 ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* 32

4.2 ผลการศึกษาอัตราการติดโรค ระดับของเชื้อในกระแสเลือด และการก่อโรค 39

4.3 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในห้องทดลอง 49

4.4 ผลการเก็บและถนอมเชื้อเพื่อการแช่เข็งที่อุณหภูมิ –196 ^{0} ซ 51

4.5 ผลการศึกษาเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P. gallinaceum* 59

5. วิจารณ์และข้อเสนอแนะ 61

6. สรุป 73

รายการอ้างอิง 74

ภาคผนวก 83

ประวัติผู้วิจัย 92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกเชื้อ *พลาสโมเดียม* ชนิดต่างๆ ที่พบในโฮสต์ที่มีกระดูกสันหลัง	4
2	ระดับเชื้อในกระแสเลือด (%Parasitemia) อัตราการติดเชื้อ (infectivity rate) และอัตราการตายของไก่เนื้ออายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว ก่อน และหลังการฉีดเชื้อ *P.gallinaceum* ปริมาณ $5x10^4$ ฉีดเข้าผิวหนังในวันที่ 0-16	40
3	ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และพิสัยของอุณหภูมิร่างกาย และ PCV (%) และอาการทางคลินิก ในกลุ่มไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อ *P.gallinaceum* ปริมาณ $5x10^4$ ฉีดเข้าใต้ผิวหนังในวันที่ 0-16	41
4	รอยโรคที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าที่ ตับ ม้าม หัวใจ สมอง และไต ของไก่กลุ่มทดลองภายหลังจากได้รับเชื้อ *P.gallinaceum* ในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16	42
5	เปรียบเทียบขนาดความกว้าง และความยาวของม้าม (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของไก่ อายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัว ในกลุ่มควบคุม และ 30 ตัว ในกลุ่มทดลอง ที่ได้รับเชื้อ *P.gallinaceum* ปริมาณ $5x10^4$ ฉีดเข้าใต้ผิวหนังในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16	43
6	รอยโรคทางจุลพยาธิสภาพที่ปรากฏใน ตับ ม้าม หัวใจ สมอง และไต ของไก่ทดลอง ภายหลังการฉีดเชื้อใต้ผิวหนังในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16	48
7	ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.gallinaceum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีสัดส่วนของ RPMI และซีรั่มไก่แตกต่างกัน ในบรรยากาศของ CO_2, Candle jar (CJ) และ Trigas (TG) ที่ 37 °ซ ติดต่อกันนาน 3 วัน	50
8	สภาพของเม็ดเลือดแดง และเชื้อ *P.gallinaceum* จากแผ่นเลือดบางย้อมสียิมซ่า ภายหลังการเก็บถนอมเชื้อไว้ในน้ำยา 3 สูตร คือ glycerol-sorbitol (GS), glycerol-lactate buffer (GLB) และ polyvinyl pyrolidone (PVP) และเก็บแช่แข็งที่ –196 ^{0} ซ นาน 1 และ 3 เดือน	55
9	จำนวนและอัตราไก่ที่ติดเชื้อ *P.gallinaceum* ที่เก็บถนอมเชื้อแช่แข็งในน้ำยา 3 สูตร คือ glycerol-sorbitol (GS), glycerol-lactate buffer (GLB) และ polyvinyl pyrolidone (PVP) เป็นระยะเวลา 1 และ 3 เดือน ตามลำดับ	55
10	ค่าเฉลี่ยและพิสัยของเอนไซม์ LDH ของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติในกลุ่มควบคุม และเม็ดเลือดที่มีเชื้อ *P.gallinaceum* ในระดับ 1-30% ในกลุ่มทดลอง	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ไดอะแกรมลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P.gallinaceum* ระยะ young trophozoites (ก), late trophozoites (ข), schizont (ค), macrogametocyte (ง) และ microgametocyte (จ)	7
2	วงชีวิตของ *Plasmodium gallinaceum*	8
3	แหล่งที่พบการระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย ปี 2540-41	11
4	วิธีการตรวจวัดระดับเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P.falciparum*	19
5ก.	trophozoites ระยะเริ่มต้น ของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากแผ่นฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	33
5ข.	trophozoites รูปร่างคล้ายอมีบา ของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	34
6ก.	ระยะ schizonts ที่มี 2 นิวเคลียสของ เชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	34
6ข.	ระยะ schizonts ที่มี 4 นิวเคลียส ของ เชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลาสมของ เม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	35
6ค.	ระยะ schizonts ซึ่งเจริญเต็ม (> 20 นิวเคลียส) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลสมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	35
6ง.	ระยะ schizonts ของ เชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ ซึ่งเจริญเต็มที่มีเม็ดสีของมาลาเรียรวมกันเป็นกลุ่มตรงกลาง และ merozoites กระจายอยู่โดยรอบ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	36
6จ.	merozoites ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่อยู่เป็นอิสระนอกเม็ดเลือดแดง จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
7ก.	เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ macrogametocytes ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	37
7ข.	เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ microgametocytes ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่าขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	37
7ค.	เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ microgametocytes ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	38
7ง.	เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ microgametocytes ในไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงไก่ เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างผิดปกติ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	38
8	สีและขนาดของตับและม้ามของไก่กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ในวันที่ 16	44
9	ของเหลวที่คั่งอยู่ภายในถุงหุ้มหัวใจ ของไก่กลุ่มทดลอง หลังจากได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ในวันที่ 16	44
10	ลักษณะของไตที่บวมน้ำของไก่กลุ่มทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ในวันที่ 16	45
11	schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยของตับของไก่ทดลองหลังได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	45
12	schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* และเม็ดสี ที่อยู่ภายใน Kupffer's cell ของตับของไก่ทดลอง หลังได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	46
13	schizonts ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอย และเม็ดสี ที่อยู่ภายใน macrophage พบกระจายทั่วไปในม้ามของไก่ทดลอง หลังได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	46
14	เม็ดสี ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยของหัวใจของไก่ทดลองหลังได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	47
15	schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยที่สมองของไก่ทดลองหลังได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	47
16	schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยที่ไตของไก่ทดลองหลังจากได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ภายหลังจากเก็บแช่แข็งไว้ในน้ำยา ถนอมเชื้อ glycerol-sorbitol (GS) ก. นาน 1 เดือน ข. นาน 3 เดือน	52
18	ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ภายหลังจากเก็บแช่แข็งไว้ในน้ำยา ถนอมเชื้อ glycerol-lactate buffer (GLB) ก.นาน 1 เดือน ข.นาน 3 เดือน	53
19	ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ภายหลังจากเก็บแช่แข็งไว้ในน้ำยาถนอมเชื้อ polyvinyl pyrolidone (PVP) ก.นาน 1 เดือน ข.นาน 3 เดือน	54
20	อัตราการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่กลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัว ได้รับเชื้อที่ผ่านเข้าตัวสัตว์ทดลอง และในไก่กลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว และได้รับเชื้อที่ถนอมด้วย cryoprotectants 3 ชนิด และเก็บไว้ที่ -196 ° ซ นาน 1 และ 3 เดือน (ก.) Glycerol sorbitol (GS), (ข.) Glycerol- lactate buffer (GLB) และ(ค.) Polyvinyl pyrolidone (PVP)	56
21	เปรียบเทียบ อัตราการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ทดลอง ที่ได้รับเชื้อซึ่งเก็บถนอมด้วย cryoprotectants 3 สูตร GS, GLB และ PVP ที่เก็บถนอมไว้ (ก) นาน 1 เดือน (ข) นาน 3 เดือน	58
22	ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ LDH และระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในเลือดไก่ (%) ที่ OD 650 nm	60

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและปัญหา

โรคมาลาเรียในสัตว์ปีก (Avian Malaria) เกิดจากโปรโตซัวในสกุล *พลาสโมเดียม (Plasmodium)* มีหลายชนิด สามารถแบ่งตามลักษณะของเชื้อระยะมีเพศ (gametocyte) เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก gametocyte มีลักษณะกลมและเบียดนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ให้อยู่ผิดที่ มี 5 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium cathemerium, P. gallinaceum, P. griffithsi, P. juxtanucleare* และ *P. relictum* กลุ่มที่สอง gametocyte มีลักษณะยาวและนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์อยู่ตำแหน่งเดิม มี 9 ชนิด ได้แก่ *P. circumflexum, P. durae, P. elongatum, P. fallax, P. golare, P. hexamerium, P. lophurae, P. rouxi,* และ *P. vaughani* (Soulsby, 1982) ติดต่อโดยอาศัยยุงเป็นแมลงนำโรค ยุงที่สามารถนำโรคได้แก่ ยุงลาย (*Aedes spp.*) ยุงรำคาญ (*Culex spp.*) ยุงก้นปล่อง (*Anopheles spp*) (Huff,1965) การก่อโรคขึ้นกับความไวของโฮสต์ ไก่ที่มีความไวมากอาจมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 80 ในบางพื้นที่ รอยโรคและอาการที่ปรากฏ คือ เลือดจาง (Swann, 1973) อวัยวะต่างๆมักมีสภาพเสื่อมโทรมเกิดขึ้น ตับและม้ามมีขนาดขยายใหญ่ขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ตับพบเนื้อตายชนิด centrilobular necrosis (Soulsby, 1982) ในรายที่เป็นชนิดเฉียบพลันอาจมีอาการไตอักเสบ (Soni and Cox , 1974) สำหรับเชื้อ *P. juxtanucleare* อาจก่อให้เกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) ไก่บางตัวอาจมีอาการทางประสาทเช่น การเกิดอัมพาตซึ่งพบได้ในกรณีที่เชื้อในระยะนอกเม็ดเลือดแดง (exoerythrocytic stage) มีการเจริญและฝังตัวอยู่ในผนังหลอดเลือดฝอยในสมองเป็นจำนวนมาก (Soulsby, 1982)

ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคมาลาเรียที่มีสาเหตุเกิดมาจาก *พลาสโมเดียม กัลลินาเซียม* (*Plasmodium gallinaceum*) เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกในฟาร์มไก่เนื้อ ในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร จังหวัดนครนายก และจังหวัดฉะเชิงเทรา ในระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม 2538 ไก่ที่ป่วยมีอาการทางคลินิกเด่นชัดหน้าและหงอนซีดผิดปกติ ขี้มีสีเขียวหรือขาวปนเขียว ไก่ที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดมีอัตราป่วยร้อยละ 50 - 55 และตายร้อยละ 11 - 20 สร้างความเสียหายให้กับเจ้าของฟาร์มคิดเป็นมูลค่าประมาณ 1 ล้านบาท (ทัศนีย์ และคณะ 2538) นอกจากนั้นโรคมาลาเรียยังเกิดการระบาดต่อเนื่องไปยังไก่ไข่ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก ไก่ไข่ที่แสดงอาการและตรวจพบเชื้อมีอัตราการไข่ลดลงจากเดิม 10 - 30% ไข่มีขนาดเล็กและเปลือกบาง

(ปิยนุช 2541) จากปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นที่ต้องใช้ยาเพื่อการรักษาและควบคุมโรค ซึ่งยาที่นำมาใช้และได้ผลค่อนข้างดีนั้นมีค่อนข้างจำกัด ทัศนีย์ และคณะ (2538) ใช้ยาคลอโรควินผสมน้ำให้ไก่ในระยะแรกของการเป็นโรคทำให้ไก่ตายน้อยลง ต่อมา Prasittirat และคณะ (1997) ได้ศึกษาถึงผลของคลอโรควินต่อการรักษาโรคมาลาเรียในไก่เนื้อโดยให้คลอโรควินผสมน้ำในขนาด 5 มก. ต่อน้ำหนักไก่ 1 กก.ติดต่อกัน 3 วัน หลังจากนั้นทำการให้ยาซ้ำในขนาด 10 มก. ต่อน้ำหนักไก่ 1 กก. ผลการทดลองพบว่าในระยะแรกของการให้ยานาน 3 - 26 วัน เชื้อในกระแสเลือดลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบเลย แต่ในระยะถัดมาในวันที่ 36 ได้ตรวจพบเชื้อในอัตราที่สูงขึ้นอีก แม้ว่าจะไม่สูงเท่าเดิมก็ตาม คลอโรควินที่นำมาใช้ในไก่นั้นเป็นยารักษามาลาเรียที่ให้ผลเฉพาะกับเชื้อระยะไม่มีเพศที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงแต่ไม่ให้ผลกับเชื้อระยะนอกเม็ดเลือดแดง ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อมาลาเรียได้อีกในระยะต่อมา สำหรับการศึกษาในคนพบว่าถ้าใช้คลอโรควินในการรักษาเชื้อ *พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (Plasmodium falciparum)* มีโอกาสที่เชื้อดื้อต่อยาได้ง่าย Trigg (1985) กล่าวว่าภาวะการดื้อยานี้น่าจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยทั่วไปการใช้ยาชนิดใดก็ตามในการรักษาหรือควบคุมโรคมาลาเรียในคนมักมีบรรทัดฐานในการทดสอบยาอย่างเป็นขั้นตอนและแบบแผนที่ดี เริ่มจากการใช้ยารักษาในหลอดทดลอง ต่อมามีการทดลองกับสัตว์ และขั้นสุดท้ายจึงนำมาทดลองใช้ในคน (Bickii *et al.*, 1998) ซึ่งแตกต่างจากการรักษาโรคมาลาเรียในไก่ ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่เหมาะสม การทดสอบอย่างเป็นขั้นตอนยังคงใช้การทดสอบกับตัวสัตว์โดยตรงเท่านั้นทำให้เกิดปัญหาต่อการควบคุมโรค และเกิดการแพร่ระบาดเป็นวงกว้างขึ้นเรื่อย ๆ ยังไม่มีแนวโน้มว่าจะใช้ยาหรือสารเคมีใดที่รักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเพาะเลี้ยงในห้องทดลองจึงน่าจะเป็นประโยชน์สามารถนำมาใช้ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับยาชนิดอื่นๆ ในการรักษาโรคมาลาเรียนอกเหนือจากยาคลอโรควิน โดยใช้ในการทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) เพื่อหาว่ายาตัวใดเหมาะสมและมีผลต่อเชื้อโดยตรง อาทิเช่นการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรีย ภาวะดื้อยาของเชื้อ การศึกษาทางอณูชีวภาพ (Molecular biology) และความแตกต่างของเชื้อชนิดเดียวกันที่ตรวจพบจากแต่ละแหล่ง ซึ่งมีการระบาดของโรคเป็นต้น (Trigg, 1985) ดังนั้นหากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้เป็นผลสำเร็จได้น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการสร้างบรรทัดฐานในการศึกษาวิจัยเชื้อมาลาเรียในไก่ในด้านต่างๆ

การเก็บเชื้อมาลาเรียไก่ให้คงสภาพโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำก็เป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่ง ที่จะเอื้อประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยหลายๆด้าน เนื่องจากปัจจุบันการศึกษาเชื้อชนิดนี้ ต้องอาศัยถ่ายเชื้อผ่านสัตว์อย่างสม่ำเสมอซึ่งต้องใช้ สัตว์ทดลองจำนวนมาก สิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้ Alger และคณะ (1971) พบว่าการถ่ายเชื้อผ่านตัวสัตว์หลายๆครั้งอาจทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมและความรุนแรงของเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นได้ และอาจมีผลกระทบต่อการผลิต gametocyte ผลการค้นคว้าและทดลองจึงอาจคลาดเคลื่อนไปจากความเป็น

จริง การศึกษาทั้งวิธีเพาะเลี้ยงและการเก็บเชื้อแช่แข็งในสภาวะที่เหมาะสม จึงน่าจะเป็นผลดีอย่างยิ่ง

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการและอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในห้องทดลอง

2. เพื่อศึกษาวิธีการเก็บเชื้อและน้ำยาถนอมเชื้อ (Cryoprotectant) *P. gallinaceum* ในไก่ เพื่อการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -196 °ซ

1.3 สมมติฐาน

1.3.1 อาหารเพาะเลี้ยงและสภาวะแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ที่เหมาะสมสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในห้องทดลองได้หรือไม่

1.3.2 *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงสามารถนำมาเก็บถนอมในน้ำยาที่เหมาะสมและแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -196 °ซ ได้เป็นเวลานานเท่าใด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงวิธีการเพาะเลี้ยง อาหารเลี้ยงเชื้อและบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในห้องทดลอง

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ด้วยวิธีที่เหมาะสมได้เป็นผลสำเร็จสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานทดลองด้านอื่นๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพของยาและภาวะการดื้อยาของเชื้อ *P. gallinaceum* และศึกษาเกี่ยวกับอณูชีวภาพของยีนส์ (Molecular genetic)

3. สามารถเก็บถนอมเชื้อ *P. gallinaceum* ไว้ใช้ในการทดลองอื่นๆ ได้เป็นระยะเวลานานโดยไม่ต้องสิ้นเปลืองเวลาและสัตว์ทดลอง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 เชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นโปรโตซัวในสกุล *พลาสโมเดียม* (*Plasmodium*) วงชีวิตและการเจริญเติบโตของเชื้อต้องการโฮสต์ 2 โฮสต์ คือ สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (vertebrate host) ซึ่งเป็นโฮสต์ที่เชื้อมีการเจริญแบบไม่มีเพศ (schizogony)และมีเพศ (gametogony) และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate host) เป็นโฮสต์ที่เชื้อมีการเจริญแบบมีเพศ (sporogony) (Garnham, 1966) เชื้อมาลาเรียหรือ *พลาสโมเดียม* ที่พบในโฮสต์ที่เป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมีหลายชนิด สามารถจำแนกออกเป็น 9 subgenera ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจำแนกเชื้อ *พลาสโมเดียม* ชนิดต่างๆ ที่พบในโฮสต์ที่มีกระดูกสันหลัง (Garnham , 1966)

Subgenera	Approx. No. species	Type species	Vertebrate host	Erythrocytic schizonts	Gametocytes
Plasmodium	26	*malariae*	Primates	Large	Round
Vinckeia	15	*bubalis*	Rodents, Other mammals	Small	Round
Laverania	2	*falciparum*	Primates	Large	Elongate crescentic
Haemamoeba	10	*relictum*	Birds	Large	Round
Giovannolaia	9	*circumflexum*	Birds	Large	Elongate
Novyella	5	*vaughani*	Birds	Small	Elongate Or oval
Huffia	2	*elongatum*	Birds	Large	Elongate
Sauramoeba	15	*agamae*	Saurians	Large	-
Carinai	8	*minasense*	Saurians	Small	-

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การติดโรค เชื้อ *พลาสโมเดียม* อาศัยโฮสต์ซึ่งสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง คือ ยุงเป็นพาหะที่สำคัญ ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดจะอาศัยยุงชนิดที่แตกต่างกัน เช่น *พลาสโมเดียม* ในคน ยุงที่เป็นพาหะนำโรค คือ ยุงใน subfamily anophelinae ได้แก่ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles spp* .) ส่วน *พลาสโมเดียม* ในสัตว์ปีก ยุงที่เป็นพาหะนำโรคคือ ยุงใน subfamily culicinae ได้แก่ ยุงรำคาญ (*Culex spp.*) ยุงลาย (*Aedes spp.*) ยุงเสือ (*Mansonia spp.*) เป็นต้น (Scheibel and Sherman, 1988) เนื่องจากยุงเป็นพาหะที่สำคัญ โรคมาลาเรียจึงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขอย่างมากในประเทศไทย จากรายงานขององค์การอนามัยโลก ในปี 2531 โรคมาลาเรียเป็นสาเหตุการตายเป็นอันดับที่ 6 ของประเทศ จังหวัดที่มีอัตราป่วยสูงสุดได้แก่ ตราด รองลงมาคือ กระบี่ ตาก และจันทบุรี ซึ่งในขณะนี้มีเพียง 10 จังหวัด ที่จัดเป็นเขตปลอดโรคมาลาเรีย คือ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี อยุธยา อ่างทอง สิงห์บุรี สมุทรปราการ สมุทรสงคราม และนครปฐม (จันทน์สุดา และ เจ็ชไคล์ เว็บสเตอร์ 2534) นอกเหนือจากการสูญเสียชีวิตคนแล้ว เชื้อมาลาเรียยังสามารถก่อให้เกิดความเสียหายเกิดขึ้นในสัตว์ได้ สำหรับโรคมาลาเรียที่พบในสัตว์ ได้แก่ ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibian malaria) ยกตัวอย่างคือ *P. bufonis* ในสัตว์เลื้อยคลาน (reptile malaria) คือ *P. minasense* และ สัตว์ปีก (avian malaria) คือ *P. cathmerium* , *P. gallinaceum* , *P. lophulae* และ *P. relictum* เป็นต้น (Smyth, 1976)

สำหรับในประเทศไทยโรคมาลาเรียในสัตว์ มีรายงานความเสียหายเกิดขึ้นเป็นครั้งแรกในไก่เนื้อ ระหว่างเดือน สิงหาคม ถึง ตุลาคม 2538 โดยเชื้อที่ก่อให้เกิดความเสียหายคือ *P. gallinaceum* ไก่ที่ป่วยแสดงอาการ ขี้เหลวมีสีเขียว ซึม เบื่ออาหาร ขาไม่มีแรง เลือดจางอย่างรุนแรง (ทัศนีย์ และคณะ 2538) นอกจากไก่เนื้อแล้วยังพบการระบาดเกิดขึ้นในไก่ไข่ในช่วงต้นปี 2540 ได้สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก เนื่องจากไก่ตายเป็นจำนวนมากโดยไม่ทราบสาเหตุ จนกระทั่งทำการวินิจฉัยจากฟิล์มเลือดบางย้อมสี ได้ตรวจพบเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เป็นสาเหตุ (ปิยนุช 2541)

2.2 รูปร่างลักษณะของเชื้อมาลาเรียไก่

เชื้อมาลาเรียที่พบในไก่มี 2 ระยะ ได้แก่ ระยะที่อยู่นอกเซลล์เม็ดเลือดแดงและระยะที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ระยะที่อยู่นอกเซลล์เม็ดเลือดแดงแบ่งเป็น ระยะ pre-erythrocytic และระยะ exoerythrocytic ระยะ pre-erythrocytic พบได้ในแมคโครฟาจ (macrophage) และไฟโบรบลาส (fibroblast) ของผิวหนังบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับตำแหน่งที่ยุงดูดเลือด merozoites ของเชื้อในระยะนี้มีลักษณะค่อนข้างกลม เมื่อเชื้อมีการเจริญนิวเคลียสจะเริ่มมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและขยายขนาด นิวเคลียสสามารถแบ่งตัวได้ประมาณ 100 นิวเคลียส (McGhee, 1988) และระยะ exoerythrocytic พบได้ใน reticulo-endothelial cell ของตับ ม้าม หรือสมอง (Soulsby, 1982) merozoites มีลักษณะคล้ายคลึงกับ merozoites ในระยะ pre-erythrocytic แต่จะมีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่า (McGhee, 1988)

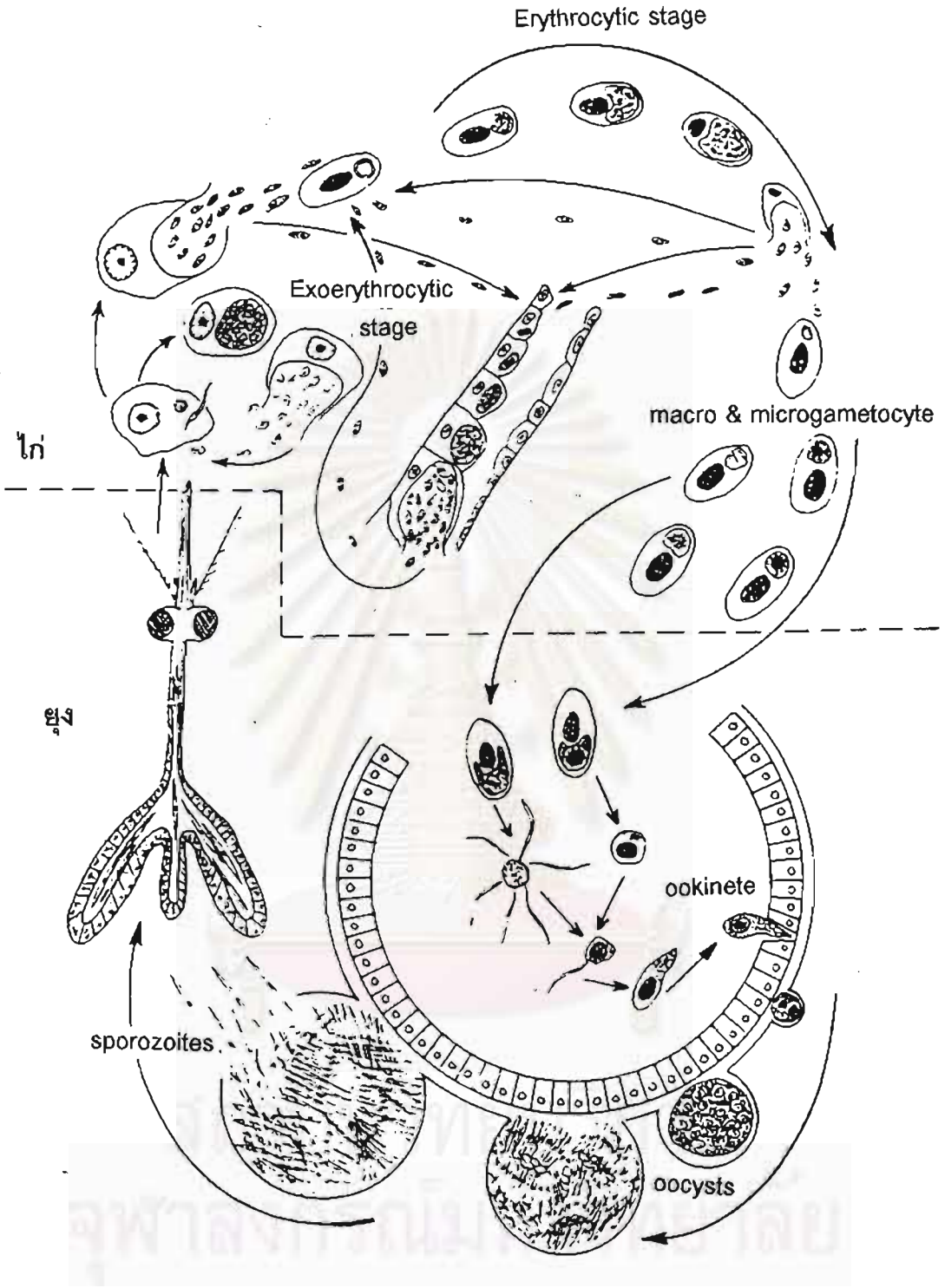
ระยะที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage) เชื้ออาศัยอยู่ในไซโตพลาซึม ลักษณะรูปร่างของเชื้อที่ศึกษาจากฟิลม์เลือดบางย้อมสียิมซ่าแยกได้เป็น 4 ระยะ ระยะที่ 1 trophozoites มีลักษณะค่อนข้างกลมรี มีขนาดเล็ก ไม่มีแวคคิวโอล (vacuole) ขนาดประมาณ 1 ไมครอน ตำแหน่งมักอยู่ด้านบนหรือด้านข้างของนิวเคลียสเม็ดเลือดแดงไก่ ในช่วงเริ่มแรกของการเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงจะยึดติดอยู่กับนิวเคลียส และเมื่อเชื้อกำลังเจริญเติบโตจะมีรูปร่างไม่แน่นอน (ameboid trohozoite) เริ่มพบเม็ดสีสีเหลืองทอง (malarial pigment) ประมาณ 4-5 เม็ด ในกรณีที่ระดับเชื้อในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น อาจพบได้ว่าใน 1 เม็ดเลือดแดง มีหลาย trophozoites ระยะที่ 2 schizonts เป็นระยะที่เชื้อกำลังเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของนิวเคลียส มีขนาด 8 ไมครอน มีเม็ดสีรวมกลุ่มอยู่ตรงกลาง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่จะมี merozoites (ระยะที่ 3) ลักษณะค่อนข้างกลม รูปร่างไม่สมมาตร (asymmetry) (Garnham, 1966) อยู่ภายในมีจำนวนประมาณ 8-30 merozoites (Soulsby, 1982) และระยะที่ 4 gametocytes ประกอบด้วย microgametocyte และ macrogametocyte เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งแยกเพศได้และเป็นระยะที่ติดต่อไปสู่ยุง ลักษณะรูปร่างของ gametocytes ค่อนข้างกลมรี โอบล้อมนิวเคลียสเม็ดเลือดแดงไก่ และ บางครั้งพบว่าเบียดดันนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงทำให้ตำแหน่งของนิวเคลียสผิดที่ไป มีขนาด 8-9 ไมครอน microgametocyte นั้น ไซโตพลาซึมติดสีแดงซีด นิวเคลียสกระจายเดี่ยวๆ มีเม็ดสีจำนวนมาก ขนาดไม่สม่ำเสมอ ส่วน macrogametocyte นั้น ไซโตพลาซึมจะติดสีน้ำเงินเทา นิวเคลียสรวมกลุ่มไม่สม่ำเสมอ มีขนาดเล็กกว่า นิวเคลียสของ microgametocyte มีเม็ดสีค่อนเป็นสีเหลืองทองเข้ม และจำนวนน้อยกว่าเม็ดสีของ micro gametocyte (Garnham, 1966) ดังแสดงในรูปที่ 1

ก. ข. ค. ง. จ.

รูปที่ 1 ไดอะแกรมลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ young trophozoites (ก), late trophozoites (ข), schizont (ค), macrogametocyte (ง) และmicrogametocyte (จ) (Levine, 1985)

2.3 วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียไก่

วงชีวิตของ *P. gallinaceum* มีลักษณะทางชีวภาพคล้ายคลึงกับเชื้อมาลาเรียในคนและสัตว์อื่น กล่าวคือ ต้องอาศัยไก่เป็นโฮสต์ที่มีกระดูกสันหลัง (vertebrate host) และยุงเป็นโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง การเจริญเติบโตและพัฒนาการของเชื้อในไก่ มี 3 ระยะ คือ ระยะที่เจริญอยู่ที่ผิวหนัง (pre-erythrocytic stage) ระยะที่เจริญเติบโตอยู่นอกเม็ดเลือดแดง (exoerythrocytic stage) และระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage) ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อในยุงมีระยะเดียวคือ sporogony ยุงที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียในไก่มีหลายสกุล คือ ยุงลาย ยุงรำคาญ ยุงก้นปล่อง (Huff, 1965) ไดอะแกรมวงชีวิตของ *P. gallinaceum* แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 วงชีวิตของ *Plasmodium.gallinaceum* (Soulsby, 1982)

2.3.1 การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในไก่

ก. ระยะการเจริญเติบโตนอกเม็ดเลือดแดง

เริ่มต้นจากยุงปล่อย sporozoites ซึ่งเป็นระยะติดต่อปนออกมากับน้ำลายในขณะที่ดูดเลือดไก่ sporozoites จะเข้าไปอยู่ในไซโตพลาซึมของแมคโครฟาจ และไฟโบรบลาสของผิวหนังบริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่งที่ยุงกัด และเจริญเป็น schizonts รอบที่ 1 (first generation pre-erythrocytic schizont) (P.E.S.) มีการเจริญเติบโตโดยนิวเคลียสสามารถแบ่งตัวได้เป็น 100 นิวเคลียส ภายใน 36 ชั่วโมง (McGhee, 1988) เมื่อ schizonts เจริญเต็มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ภายในจะประกอบด้วย merozoite ที่เรียกชื่อเฉพาะว่า cryptozoites หลังจาก schizonts แตกออก cryptozoites จะเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ และไฟโบรบลาสใหม่ เจริญเป็น schizonts รอบที่ 2 (second generation pre-erythrocytic schizont) merozoites ที่ได้จากการเจริญเติบโตในครั้งนี้เรียกว่า metacryptozoites เมื่อ metacryptozoites ออกมาจาก schizonts อาจเข้าสู่ endothelial cell หรือ reticulo-endothelial cell ของเส้นเลือดที่ตับ ม้าม หรือสมอง และเจริญเติบโตเป็น schizonts เช่นเดิมอีก หรือ อาจจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (erythrocytic stages) และเจริญเติบโตต่อไป

ข. ระยะการเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง

Metacryptozoites ที่เข้าไปในเม็ดเลือดแดงจะอาศัยอยู่ในไซโตพลาซึมและเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เป็น trophozoites ลักษณะกลมรี มีขนาดเล็ก ไม่มีแวคคิวโอล เชื้อในระยะนี้มี proteolytic enzyme ที่สามารถย่อยสลายฮีโมโกลบินออกเป็น โกลบิน (globin) และ ฮีม (heme) จากนั้นเชื้อ *พลาสโมเดียม* ก็จะอาศัยโกลบินเป็นแหล่งของกรดอะมิโน (Scheibel and Sherman, 1988) และเชื้อจะสลายความเป็นพิษที่เกิดจากฮีมด้วยขบวนการโพลีเมอไรด์เซชั่น (polymerization) ทำให้เกิดสารผลึกที่เรียกว่า hemozoin หรือ malarial pigment สะสมอยู่ในช่องว่างของไซโตพลาซึม (Sullivan *et al.*, 1996) จากนั้นจึงเจริญเป็น schizonts ในเวลา 36 ชั่วโมง แต่ละ schizonts ของ *P.gallinaceum* ที่อยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงประกอบด้วย 8 - 30 merozoites (Levine, 1985) ในกรณีที่มี schizonts เป็นจำนวนมากเจริญเติบโตเต็มที่และแตกออก merozoites ออกมาจากเม็ดเลือดแดงพร้อมกันจำนวนมากจึงเป็นสาเหตุที่ก่อโรคอย่างรุนแรง โดยเฉพาะในคนมักทำให้เกิดอาการไข้ขึ้นสูง สำหรับในไก่อาจจะปรากฏอาการหรือไม่ก็ได้ (Soulsby, 1982) merozoites ที่ออกมานั้นจะกลับเข้าสู่ endothelial cell ของเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะภายในต่างๆ และอีกส่วนหนึ่งจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศ

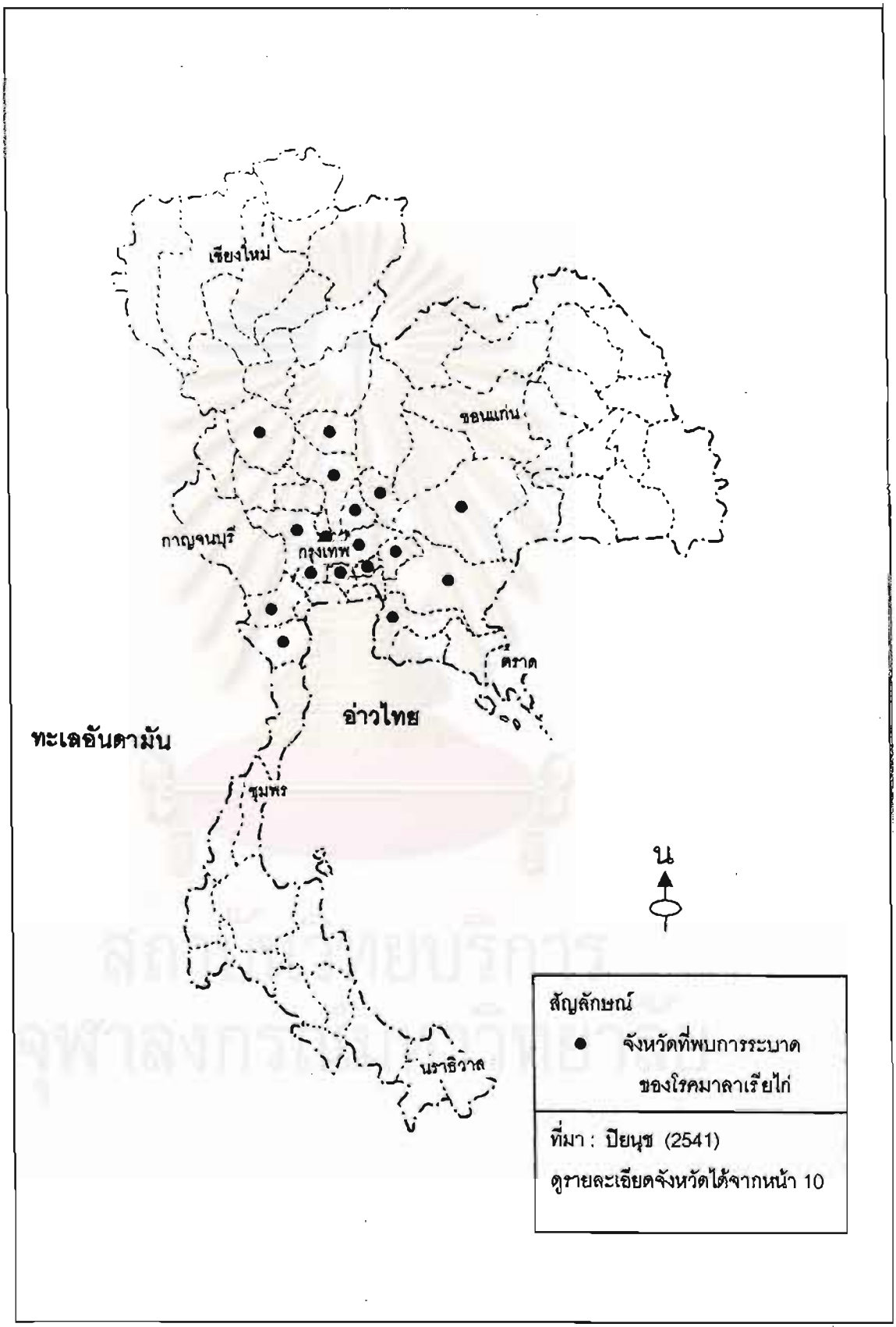
เช่นเดิม และมีบางส่วนเพียงเล็กน้อยที่เมื่อเข้าไปในเซลล์เม็ดเลือดแดง จะเจริญเติบโตเป็นแบบมีเพศ (gametogony) โดยที่ 1 merozoite จะเจริญไปเป็นเชื้อเพียงเพศผู้ (micro gametocytes) 1 ตัว หรือเพศเมีย (macrogametocytes) 1 ตัว เท่านั้น

2.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในยุง

ในขณะยุงดูดเลือดไก่ที่มีเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดก็จะดูดเอาเชื้อเพศผู้และเพศเมียติดเข้าไปด้วย เมื่อเชื้อทั้ง 2 เพศเข้าสู่ยุงที่เป็นพาหะนำโรคแล้ว microgametocytes ก็จะมีการแบ่งตัวเป็น microgamete รูปแส้ (exflagellation) 6 – 8 microgametes เกิดขึ้นภายใน 10 – 15 นาที จากนั้น microgamete แต่ละตัวจะเคลื่อนที่ไปผสมกับ 1 macrogamete ที่เจริญมาจาก macrogametocyte 1 ตัว กลายเป็นไซโกต (zygote) ซึ่งเคลื่อนที่ได้เรียกว่า ookinete แทรกผ่านผนังชั้นในของกระเพาะอาหารส่วนกลางไปฝังตัวอยู่ที่ผนังด้านนอก กลายเป็น oocyst มีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและผลิต sporozoites จำนวนมาก เมื่อ oocyst แตกออก sporozoites จะเคลื่อนที่ไปตามช่องว่าง และอวัยวะอื่นๆทั่วร่างกาย โดยส่วนใหญ่จะไปรวมตัวอยู่ที่ต่อมน้ำลาย เมื่อยุงดูดเลือดไก่ sporozoites ก็จะแพร่เชื้อเข้าสู่โฮสต์ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อและการระบาดในไก่ (Soulsby, 1982)

2.4 การระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย

แหล่งที่พบการระบาดของโรคจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีโรคมาลาเรียเกิดขึ้นในไก่เนื้อที่ เขต 1 จังหวัดกรุงเทพมหานคร พระนครศรีอยุธยา สระบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี นนทบุรี เขต 2 ชลบุรี นครนายก ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา เขต 3 นครราชสีมา เขต 6 นครสวรรค์ กำแพงเพชร พิจิตร และ เขต 7 เพชรบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แหล่งที่พบการระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2540-2541

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องทดลอง

เชื้อมาลาเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองนอกตัวโฮสต์ได้สำเร็จ เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศ 2 ระยะ คือ ระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดง (Beaudoin, 1977) และระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (Trager and Jansen, 1977) เชื้อชนิดอื่นๆสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้เพียงระยะสั้นๆ (short term culture) และบางชนิดทำการเพาะเลี้ยงได้ยาวอย่างต่อเนื่อง (continuous culture) เช่น *P. falciparum*

2.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อในระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดง

เชื้อมาลาเรียในระยะนอกเม็ดเลือดแดง ที่มีรายงานว่าสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ คือ *P. berghei* โดย sporozoites สามารถเข้าไปเจริญในเซลล์ตับ และสมองของตัวอ่อนหนูขาวจนกระทั่งกลายเป็น merozoites (Trigg, 1985) ในปี 1991 Yan และคณะ ทำการเพาะเลี้ยง sporozoites ของ *P. berghei* ใน cell line จาก lung embryonic cell พบว่าประมาณ 72 ชั่วโมง sporozoites สามารถพัฒนาไปเป็นระยะ merozoites ที่สมบูรณ์ได้ Rocha และคณะ (1993) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* พบว่า sporozoites สามารถเจริญได้ในไฟโบรบลาสของไก่เพียง generation เดียวเท่านั้น

2.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียที่มีการศึกษากันมากที่สุด และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง คือ ระยะที่มีการเจริญเติบโตแบบไม่มีเพศอยู่ในเม็ดเลือดแดง มาลาเรียชนิดที่เคยมีรายงานว่าเพาะเลี้ยงได้เป็นผลสำเร็จ คือ *P. berghei, P. cynomolgi, P. fragile, P. inui* และ *P. knowlesi* (Trigg,1985) แต่เชื้อที่ศึกษาเป็นต้นแบบในการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง และนิยมใช้เป็นแบบอย่างในการทดลองต่างๆ ได้แก่ *P.falciparum* ซึ่ง Trager และ Jensen (1977) พัฒนามาจากวิธีการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวของคน และสามารถเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เพื่อการทดสอบภาวะดื้อยาได้นานถึง 4 ปี (Jensen *et al.*,1981) ส่วนเชื้อที่มีการเพาะเลี้ยงได้เป็นระยะเวลาสั้นได้แก่ เชื้อ *P. vivax* ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* สามารถเพาะเลี้ยงได้ 43 วัน (Trigg, 1985) นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. chabaudi* เป็นระยะสั้นๆเพื่อใช้ทดสอบการดื้อยาคลอโรควิน (Sohal and Arnot, 1993)

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียระยะที่ไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดงนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ที่สำคัญ ได้แก่ ส่วนประกอบของน้ำยา หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ภาชนะที่ใช้เลี้ยง และบรรยากาศของการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ชนิดของน้ำยาที่ใช้เลี้ยง ซีรั่ม และเม็ดเลือดแดง เป็นต้น ในช่วงแรกของการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* Trager และ Jensen (1977) ใช้ RPMI 1640 ซึ่งนิยมใช้เพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาว โดยเติม HEPES ลงไป 25 มิลลิโมล ต่อน้ำยา 1 ลิตร สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงชนิดอื่นที่มีการศึกษา ได้แก่ Medium 199 และ Ham's nutrient mixture F-12 โดย Divo และ Jensen ได้ทำการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ RPMI 1640, Medium 199 และ Ham's nutrient mixture F-12 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมใน การเพาะเลี้ยง *P. falciparum* มากที่สุด คือ RPMI 1640 (cited by Trigg, 1985) แม้ว่าการเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปนั้นจำเป็นต้องเปลี่ยนน้ำยาใหม่ทุกวันเชื้อจึงจะมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ แต่ Fairlamb และคณะ (1985) ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ด้วยการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทุก 3 - 4 วัน พบว่า เชื้อเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงได้ดีเช่นกัน และมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเดิม 10 % ไปเป็น 30 %

ซีรั่มที่ผสมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* แบบต่อเนื่อง เดิมนิยมใช้ซีรั่มคนผสมในสัดส่วน 1: 20 (Trigg, 1985) แต่เนื่องจากซีรั่มคนมีราคาสูง และอาจมีปัญหาปนเปื้อนของเชื้อไวรัส ดังนั้น Romos และคณะ (1986) จึงได้ริเริ่มใช้ซีรั่มของม้า ลูกโค และโค ทดแทนซีรั่มคนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* โดยได้ทดลองใช้ในปริมาตรต่างๆ ที่เป็นสัดส่วนกับเม็ดเลือดแดงและอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่า ซีรั่มม้า 10 %สามารถใช้เพาะเลี้ยงแทนซีรั่มคนได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ซีรั่มลูกโค และโค การเก็บซีรั่มควรเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 ° ซ หรือ เก็บแบบแห้งน้ำ (lyophilized) ไม่ควรแช่แข็ง และทำให้ซีรั่มละลายบ่อยๆก่อนนำมาใช้ เนื่องจากจะเป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Trigg, 1985)

เม็ดเลือดแดงเป็นอีกส่วนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *พลาสโมเดียม* ว่าได้ผลหรือไม่ (Trager and Jensen,1977) ได้รายงานว่าเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมควรเป็นเม็ดเลือดแดงที่เก็บนานประมาณ 21-28 วัน จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* พบว่าเชื้อมักเข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่เก็บไว้ประมาณ 21 วันมากกว่าเม็ดเลือดแดงที่เพิ่งเตรียมใหม่เพียง 2-3 วัน แต่ต่อมา Olumide และคณะ (1992) รายงานว่า เม็ดเลือดแดงที่ใช้ควรเก็บไม่นานเกิน 7 วัน เนื่องจาก การทดลองเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* พบว่า เชื้อมักเข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่เตรียมใหม่มากกว่าเม็ดเลือดแดงเก่า

ภาชนะที่เคยมีผู้นำมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียมีหลายแบบ เช่น ขวดรูปคนโท (Flask) (Bertagna,1972) จานแก้วสำหรับเพาะเชื้อ (petridish) (Trager and Jensen, 1977)

ถาดหลุมขนาด 24 หลุม (Bickii *et al.*, 1998) และถาดหลุมขนาด 96 หลุม (Chulay *et al.*, 1983) ลักษณะที่สำคัญของภาชนะที่ใช้เลี้ยง จะต้องมีพื้นผิวแบนเรียบ โดย Trager และ Jensen (1976) ใช้ขวดรูปคนโทในการเพาะเลี้ยง *P. falciparum* อย่างต่อเนื่องได้เป็นผลสำเร็จโดยใช้ 12 % เม็ดเลือดแดงและใช้อัตราการหมุนเวียนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (medium flow) เท่ากับ 2 มล. ต่อชั่วโมง และต่อมายังได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อในจานแก้ว (petridish) เพื่อใช้ทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับยารักษาโรคมาลาเรีย (Trager and Jensen, 1977) ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ถาดหลุมขนาด 24 หลุม และ 96 หลุม ในการเพาะเลี้ยงและทดสอบ เบื้องต้นเกี่ยวกับความไวของเชื้อต่อยาต้านโรคมาลาเรียอย่างแพร่หลาย (กองมาลาเรีย 2540; Bickii *et al.*, 1998) การเลือกใช้ภาชนะมักพิจารณาจากความสะดวกในการเพาะเลี้ยงและง่ายต่อการเก็บเชื้อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการทดสอบยาและอื่นๆ สิ่งสำคัญมากประการหนึ่ง คือ ระดับน้ำยาเลี้ยงเชื้อจะต้องมีระดับสูงประมาณ 3 มิลลิเมตร (Trager and Jensen, 1977)

บรรยากาศในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรีย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. falciparum* คือช่วง 37-38 °ซ (Trager and Jensen, 1976, Basco *et al.*, 1995) นอกจากนี้ภาวะของบรรยากาศที่มี ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และไนโตรเจน ในสัดส่วนที่เหมาะสมมีความสำคัญมาก มีรายงานการเพาะเลี้ยง *P. chabaudi* และ *P. falciparum* โดยใช้ RPMI 1640 ร่วมกับ HEPES 25 มิลลิโมล ที่อุณหภูมิ 37 °ซ พบว่า *P. chabaudi* จำเป็นต้องเลี้ยงในบรรยากาศที่ประกอบด้วยก๊าซผสม 3 ชนิด คือ ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และไนโตรเจน ในอัตราส่วน 1:3:96 ตามลำดับ (Sohal and Arnot, 1993) ส่วน *P. falciparum* สามารถเลี้ยงได้ในหลายภาวะบรรยากาศคือ การเพาะเลี้ยงในภาวะก๊าซผสม 3 ชนิดคือ ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และไนโตรเจน ในอัตราส่วน 3:4:93 % ตามลำดับ (Ponnudurai, 1987) การเลี้ยงในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (Bickii *et al.*, 1998) และการเลี้ยงในบรรยากาศของ candle jar และจุดเทียนไขที่ทำด้วยพาราฟินบริสุทธิ์ เชื้อ *P. falciparum* จะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในขบวนการเผาผลาญพลังงาน ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออยู่ระหว่าง 2-5 % ในกรณีที่ปริมาณสูงกว่านี้ อาจจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยจะมีผลกระทบโดยตรงต่อความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Trigg, 1985)

ปัจจุบันภาวะที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับ การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* อย่างต่อเนื่อง จำเป็นต้องอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI ร่วมกับ ซีรั่มคน 10% ภายในบรรยากาศที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูง 5 % ปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ 2 % และปริมาณของเม็ดเลือดแดง 12 % (Olumide *et al.*, 1992) และขณะเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงมักใช้ RPMI 1640 ร่วมกับ HEPES buffer, $NaHCO_3$ 0.2 % และ 10 %ของซีรั่มคนที่มีกรุ๊ปเลือด AB (Trager and Jensen,

1976) สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไก่ในเม็ดเลือดแดง ยังไม่มีการศึกษาทดลองอย่างจริงจัง ทั้งที่มีความสำคัญอย่างมากในทางสัตวแพทย์

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไก่ในภาวะต่างๆที่เหมาะสมได้เป็นผลสำเร็จสามารถนำไปใช้ศึกษาทดลองเบื้องต้นเกี่ยวกับการศึกษา ประสิทธิภาพของยา ภาวะการดื้อยา และอื่นๆซึ่งเป็นเป้าหมายสำคัญอย่างยิ่งต่อการควบคุมและรักษาโรคมาลาเรียไก่ (Bertagna, 1972)

2.6 การเก็บเชื้อแช่แข็ง

การแช่แข็งเลือด ได้มีรายงานเป็นครั้งแรกในปี 1941 โดย Woodcock และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเก็บเม็ดเลือดแดงของแกะ แช่แข็งไว้ในที่อุณหภูมิต่างกัน คือ –2, -8, -78 และ-196 °ซ โดยทำการเก็บไว้ในน้ำยาที่ทำให้แรงตึงผิวสมดุล (isotonic medium) พบว่าเม็ดเลือดแดงเริ่มแตกที่อุณหภูมิต่ำใกล้ 0 °ซ และจะแตกอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ -8 °ซ แต่เลือดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –196 °ซ สามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 1 เดือน และเม็ดเลือดแดงมีการแตกเล็กน้อย ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาการเก็บเลือดแช่แข็ง Rapatz และLuyet (1970) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเก็บแช่แข็งเม็ดเลือดแดง พบว่าการอยู่รอดของเม็ดเลือดแดงขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเก็บแช่แข็ง ต่อมาได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเก็บแช่แข็งที่สำคัญ คือน้ำยาถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็ง (cryoprotective agent) การเกิดผลึกน้ำแข็ง (formation of crystalline ice) และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่แข็ง (freezing) และทำให้ละลาย (thawing) โดยในการแช่แข็งเม็ดเลือดแดง และการทำให้ละลายใช้เวลาน้อยจะให้ผลที่ดีกว่าการใช้เวลานาน (Thomas and Bell, 1995) การเกิดผลึกน้ำแข็งจะเกิดขึ้นเมื่อมีการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วในขณะที่ยังคงมีน้ำอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งจะกลายเป็นผลึกน้ำแข็งทำให้มีผลกระทบต่อผนังเซลล์ ดังนั้นการใช้น้ำยาถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็ง จะช่วยลดปัญหาการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ สำหรับน้ำยาถนอมเชื้อมาลาเรียเพื่อการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำที่นิยมใช้มีหลายชนิด ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), สารประกอบ polyvinyl pyrolidone (PVP) และกลีเซอรอล ซึ่งมีคุณสมบัติ ในการป้องกันการเสียหายของเซลล์ได้

DMSO เป็นน้ำยาถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ ที่ช่วยในการจำกัดความเข้มข้นของอิเลคโตรไลท์ไม่ให้เพิ่มสูงขึ้นจากขบวนการเกิดผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก DMSO ที่ความเข้มข้นระหว่าง 2 - 5.5 โมล จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อยลง แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่า 6 โมลจะเร่งให้เม็ดเลือดแดงแตกมากขึ้น (Rapetz and Luyet, 1970) นอกจากนี้ DMSO ยังสามารถใช้เป็นสารป้องกันการทำลายเซลล์ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลีเซอรอล และน้ำตาลซูโครส (Pribor and Nara, 1973)

PVP เป็นสารป้องกันการเสียหายของเซลล์ในขณะทำการแช่แข็ง ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด ความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-40 % (Rapetz and Luyet, 1970)

กลีเซอรอล เป็นน้ำยาถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็งที่อุณหภูมิ –196 ° ซ พบว่าถ้าเติมกลีเซอรอลลงไปในเลือดจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ เนื่องจากกลีเซอรอลมีแรงดันออสโมติกสูง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีความตึงผิวที่สมดุล (isotonic) ก่อนที่จะเติมกลีเซอรอลลงไป และกลีเซอรอลที่ใช้ต้องมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่ไม่สูงมากจึงจะไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

การเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำในไนโตรเจนเหลวที่ –196 ° ซ โดยใช้น้ำยาถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็งชนิดที่เหมาะสม มีประโยชน์อย่างมากในการเก็บเชื้อโปรโตซัวชนิดต่างๆหลายชนิด เช่น เชื้อ *ทริปปาโนโซม* (*Trypanosome*) (Martinez-Salva *et.al.*, 1970) และเชื้อ *บาบีเซีย* (*Babesia*) (Canning and Winger,1987) สำหรับเชื้อ *พลาสโมเดียม* ระยะไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดง การเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวมี 2 วิธี วิธีที่ 1 คือการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันที ซึ่งจากการศึกษาของ McColm และ Latter (1986) พบว่าเชื้อ *P. yoelii* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ดีภายหลังจากเก็บด้วยวิธีแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแบบทันที นอกจากนี้ Margos และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการเก็บเชื้อ *P. falciparum* พบว่าในการเก็บเชื้อแช่แข็งด้วยวิธีเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันทีเหมาะสำหรับการเก็บเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงชนิด young trophozoites เท่านั้น แต่สำหรับเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงชนิด late trophozoites และschizont จะถูกทำลายเมื่อทำการเก็บด้วยวิธีการเก็บเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแบบทันที วิธีที่ 2 คือ two step cooling method ซึ่งเป็นวิธีที่ทำการเก็บเชื้อ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ – 20 ° ซ ก่อน จากนั้นจึงนำมาเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บเชื้อในระยะ schizonts และ late trophozoites จากการศึกษาเกี่ยวกับน้ำยาถนอมเพื่อการแช่แข็งหลายชนิด พบว่ากลีเซอรอลเป็นน้ำยาที่นิยมเลือกใช้มากที่สุด (Thomas and Bell, 1995) นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นที่แตกต่างกันของกลีเซอรอล มีผลกระทบต่อความอยู่รอดของเชื้ออย่างมาก (Ponnudurai, 1987)

2.7 การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย

การตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการที่มีการศึกษาค้นคว้าและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และใช้เป็นบรรทัดฐานอยู่ในปัจจุบัน ส่วนใหญ่เป็นวิธีที่ใช้เพื่อวินิจฉัยโรคมาลาเรียในคนซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่

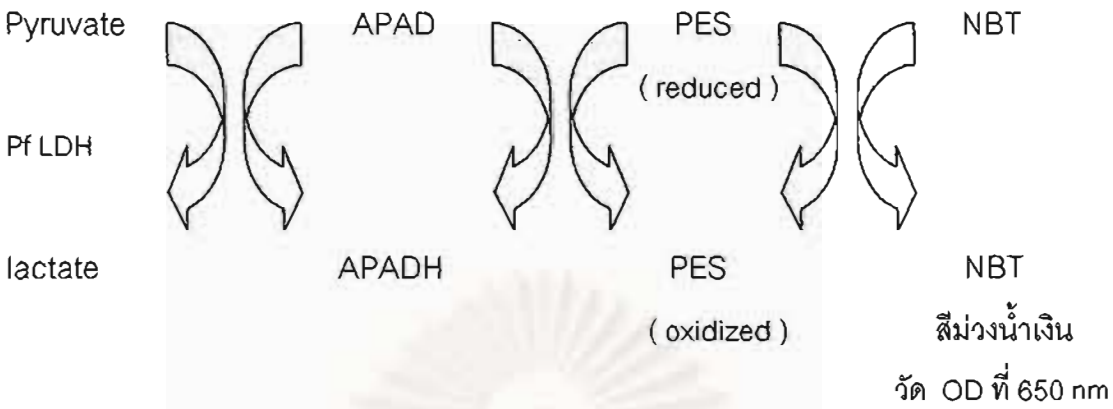
2.7.1 การตรวจวินิจฉัยด้วยการทำแผ่นฟิลม์เลือดหนาและเลือดบาง และย้อมสียิมซ่าเป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐาน มีการพัฒนาเทคนิคมานานกว่า 90 ปี (Makler *et al.*, 1998) สิ่งที่เป็นปัญหาสำหรับวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการเตรียมและตรวจหาเชื้อมาลาเรียนานประมาณ 60 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่าง ผลการตรวจแต่ละครั้งจึงค่อนข้างล่าช้า จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจ กรณีที่ระดับปรสิตในกระแสเลือดน้อยมากอาจจะตรวจไม่พบเชื้อ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มี ข้อดี คือ สามารถตรวจพบเชื้อได้โดยตรง เหมาะสำหรับการศึกษาเป็นเบื้องต้นทางสันฐานวิทยาของเชื้อ *พลาสโมเดียม* ชนิดที่มีลักษณะและรูปร่างแตกต่างอย่างเด่นชัด และนิยมใช้ในการประเมินระดับการติดเชื้อในกระแสเลือด (parasitemia) มาจนกระทั่งถึงทุกวันนี้ แม้ว่าจะมีวิธีอื่น ที่มีผู้พัฒนาเทคนิคให้มีความสะดวกและรวดเร็วขึ้นอีกหลายวิธีแล้วก็ตาม

2.7.2 การตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาลำดับของกรดนิวคลีโอไทด์ ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *พลาสโมเดียม* แต่ละชนิดและแต่ละสเตรน โดยอาศัยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) (Hang *et al.*, 1995) วิธีดังกล่าวมีประโยชน์อย่างมากในกรณีที่ระดับปรสิตในกระแสเลือดต่ำซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้จากการตรวจจากการทำแผ่นฟิลม์เลือดย้อมสีและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยสามารถตรวจหาเชื้อได้ในปริมาณ 5 parasites ต่อ เลือด 1 ไมโครลิตร มีความจำเพาะในการตรวจ 100% (Kawamoto *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีนี้ ต้องอาศัยอุปกรณ์ในการตรวจวัดที่มีราคาแพง ขั้นตอนการตรวจค่อนข้างซับซ้อน และข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ไม่สามารถนำมาประเมินระดับการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ (Makler *et al.*, 1998)

2.7.3 การตรวจหาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *พลาสโมเดียม* เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงมาก สามารถตรวจหาโปรตีนบางชนิดที่เชื้อสร้างขึ้นมาได้ตั้งแต่ในช่วงแรกของการได้รับเชื้อ ใช้ระยะเวลาในการตรวจสั้น สามารถตรวจหาเชื้อได้ในเวลา 5-10 นาที เช่น histidine rich protein 2 (HRP-2) และเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) โดย HRP-2 เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. falciparum* เท่านั้น จึงสามารถนำมาใช้ทดสอบเพื่อวินิจฉัยโรคมาลาเรียชนิดนี้

ได้ แต่มีข้อจำกัดคือ โปรตีน HRP-2 จะคงอยู่ในกระแสเลือดได้เป็นเวลานาน หลังจากที่ผู้ป่วยไม่แสดงอาการทางคลินิก และ หรือตรวจไม่พบเชื้อแล้ว นอกจากนี้อาจเกิด false positive ได้ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นโรค rheumatoid (Makler *et al.*, 1998)

สำหรับการตรวจหาเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเชื้อมาลาเรียทุกชนิด และสามารถพบในเนื้อเยื่อหลายชนิดของโฮสต์ เช่น เม็ดเลือดแดง ตับ และกล้ามเนื้อ (Klenerman and Dickson, 1992) จากการทดลองของ Makler และHinrichs (1993) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ LDH ของเชื้อมาลาเรียและของโฮสต์ได้ Sherman (1961) ได้ทำการศึกษา molecular heterogeneity ของเอนไซม์ LDH ใน *P. lophurae* ซึ่งเป็นเชื้อ *พลาสโมเดียม* ในสัตว์ปีก พบว่าเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีระดับของเอนไซม์ LDH สูงกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ และ LDH ของเชื้อ *พลาสโมเดียม* แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความจำเพาะในการเมตาโบไลท์กลูโคสไปเป็น lactic acid ต่างกัน (Sherman, 1979) ความสำคัญของกระบวนการนี้ คือ ในขณะที่เชื้อ *พลาสโมเดียม* ทำการเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น lactic acid นั้นจะเกิด coenzyme NAD ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการสร้างพลังงาน ATP (Basco *et al.*, 1995) ในการตรวจวัดระดับของเอนไซม์ LDH จากเชื้อ *พลาสโมเดียม* ต้องอาศัยกระบวนการที่เชื้อ *พลาสโมเดียม* เปลี่ยน pyruvate ไปเป็น lactate โดยมี 3-acetylpyridine NAD (APAD) เป็น coenzyme ซึ่งจะมีผลทำให้ N-ethyldibenzopyrazine ethylsulfate salt (PES) เปลี่ยนรูปจาก reduced form ไปเป็น oxidized form การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้สาร Nitroblue tetrazolium (NBT) เกิดสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งสามารถนำไปตรวจวัดค่า OD ได้ที่ 650 nm ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4 วิธีการนี้มีประโยชน์มากสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมาลาเรีย เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว สามารถวัดระดับ LDH ของเชื้อ และประเมินจำนวนเชื้อในเม็ดเลือดแดงได้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูป dipstick ต่อ LDH ของเชื้อมาลาเรียซึ่งมีความจำเพาะสูง เหมาะสำหรับงานวิจัยและงานในภาคสนาม (Makler *et al.*, 1998) และ **ยังสามารถใช้สำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพ**ของยาต้านมาลาเรียได้เป็นอย่างดี ซึ่งอาจนำมาใช้ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในห้องทดลองได้ด้วย



Pf LDH = Lactate Dehydrogenase ของ เชื้อ *P. falciparum*

APAD = 3-Acetyl pyridine adeninedinucleotide , อนุพันธ์ ของ NAD

PES = N-ethyldibenzopyrazine ethylsulfate salt

NBT = Nitroblue tetrazolium

รูปที่ 4 วิธีการตรวจวัดระดับเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P. falciparum*
(ดัดแปลงจาก Makler and Hinrichs, 1993)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 5 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของไก่

การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ตรวจพบในกระแสเลือด อัตราการติดโรค และการก่อโรค

การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในหลอดทดลอง (*In vitro*)

การทดลองที่ 4 การถนอมและการเก็บเชื้อ *P. gallinaceum* แช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 ° ซ

การทดลองที่ 5 ศึกษาเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

แผนการดำเนินงานที่เป็นขั้นตอนมีดังนี้

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการแบ่งกลุ่ม

ไก่ทดลอง

ไก่ที่ใช้ตลอดการทดลอง จำนวนรวม 244 ตัว เป็นลูกไก่ไข่เพศผู้อายุ 1 วัน จำนวน 204 ตัว และลูกไก่เนื้อเพศเมีย อายุ 14 วัน จำนวน 40 ตัว นำมาเลี้ยงชังกรงและคลุมด้วยมุ้งเพื่อป้องกันไม่ให้ยุงกัด ที่อาคารสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับลูกไก่ไข่ให้กินอาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่ไข่ ช่วงอายุไม่เกิน 5 สัปดาห์ แบ่งเป็น

การแบ่งกลุ่ม ไก่ทดลองทั้งหมดแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

3.1.1 ลูกไก่ไข่ อายุ 1 วัน จำนวน 30 ตัว ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิล ในวันแรกที่ออกจากโรงฟัก เลี้ยงไว้เป็นเวลา 14 วัน ก่อนนำมาใช้ในการผ่านเชื้อตลอดการทดลองและศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ ในการทดลองที่ 1

3.1.2 ลูกไก่ไข่ อายุ 1 วัน จำนวน 30 ตัว ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิลในวันแรกที่ออกจากโรงฟัก เลี้ยงไว้เป็นเวลา 30 วัน ก่อนนำมาใช้ในการทดลองที่ 3 สำหรับการเตรียมและการเก็บเชื้อ *P. gallinaceum* เพื่อการแช่แข็ง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 ลูกไก่ไข่ อายุ 1 วัน จำนวน 80 ตัว ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิล ในวันแรกที่ออกจากโรงฟัก เลี้ยงไว้เป็นเวลา 14 วัน ก่อนนำมาใช้ในการทดลองที่ 3 เพื่อทดสอบความอยู่รอดของเชื้อที่ผ่านการเก็บแช่แข็ง

3.1.4 ลูกไก่ไข่ อายุ 1 วัน จำนวน 50 ตัว ในระหว่างที่เลี้ยง ไม่เคยได้รับวัคซีนชนิดใด เลี้ยงไว้นาน 30 วัน ก่อนนำมาใช้เตรียมซีรั่มในการทดลองที่ 4

3.1.5 ลูกไก่ไข่อายุ 1 วัน จำนวน 4 ตัว เคยได้รับวัคซีนนิวคาสเซิลในวันแรกที่ออกจากโรงฟัก เลี้ยงไว้เป็นเวลานาน 14 วัน นำมาใช้ในการทดลองที่ 5 เพื่อศึกษาระดับเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P. gallinaceum*

3.1.6 ลูกไก่เนื้อ อายุ 14 วัน จำนวน 40 ตัว ที่เคยได้รับวัคซีนนิวคาสเซิล ในวันที่ 1 และวัคซีน IBD (Infectious Bursal Disease) ในวันที่10 นำมาใช้ในการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษา อัตราการติดโรค ระดับของเชื้อที่ตรวจพบในกระแสเลือดและการก่อโรค

3.1.7 ลูกไก่ไข่ อายุ 1 วัน จำนวน 10 ตัว ได้รับวัคซีนนิวคาสเซิลในวันแรกที่ออกจากโรงฟัก เลี้ยงไว้เป็นเวลานาน 14 วัน ก่อนนำมาใช้ในการทดลองที่ 4 เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในหลอดทดลอง (*In vitro*)

3.2 การเตรียมเชื้อมาลาเรียไก่

3.2.1 เชื้อมาลาเรียไก่ที่ใช้

เชื้อ *P. gallinaceum* ที่ใช้ตลอดการทดลองเป็น field strain (หนองจอก / 2538) เชื้อที่ได้เก็บมาจากไก่ป่วยที่ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดจากฟาร์มแห่งหนึ่งในเขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร นำมาต่อเชื้อ เมื่อตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงถึง 70% ผ่านเข้าไก่ทดลองที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ในข้อ 3.1.1

3.2.2 การผ่านเชื้อ

ใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 2×10^{6} ฉีดเข้าใต้ผิวหนังที่บริเวณคอของไก่ จำนวน 3 ตัวต่อครั้ง โดยทำการผ่านเชื้อใหม่ทุกครั้ง เมื่อตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูง 70% ทำซ้ำเช่นนี้ทั้งหมดตลอดระยะการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดโครงการ

3.2.3 การเตรียมฟิล์มเลือดบางและการย้อมสี

เจาะเลือดไก่ที่บริเวณเส้นเลือดที่ปีก (Wing vein) โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 G ทำฟิล์มเลือดบางตัวอย่างละ 2 สไลด์ fix ด้วย absolute methanol นาน 2 นาที และย้อมสียิมซ่า (Geimsa) 10 % นาน 30 นาที

3.2.4 การตรวจหาและประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด

ฟิล์มเลือดบางที่เตรียมตาม 3.2.3 นำมาตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างขนาดกำลังขยาย 100 x นับจำนวนเชื้อ ต่อ 1,000 เม็ดเลือดแดงที่ตรวจนับทั้งหมดและประเมินระดับเชื้อในกระแสเลือด (% parasitemia) โดยประยุกต์จากวิธีของ Soni and Cox (1974)

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ตรวจพบเชื้อ X 100}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ตรวจนับทั้งหมด 1,000 เม็ด}}$$

3.3 การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของไก่

ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่าที่เตรียม ในข้อ 3.2.1-3.2.3 นำมาศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับ ขนาด รูปร่าง และลักษณะของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะต่างๆที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของไก่ ได้แก่ trophozoites, schizonts, merozoites และ gametocytes ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างขนาดกำลังขยาย 100 x บันทึกภาพ วัดขนาด และวิเคราะห์ข้อมูล

3.4 การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ตรวจพบในกระแสเลือด อัตราการติดโรค และการก่อโรค

3.4.1 การแบ่งกลุ่มไก่และการฉีดเชื้อ

ลูกไก่เนื้อ จำนวน 40 ตัว จากข้อ 3.1.6 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ จำนวน 10 ตัว ไก่ทุกตัวได้รับน้ำเกลือโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ ปริมาตร 0.2 มล. ต่อตัว

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ จำนวน 30 ตัว ไก่ทุกตัวได้รับเชื้อปริมาณ 5×10^4 ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

ภายหลังการฉีดเชื้อติดตามผลไก่ทดลองทุกตัว ทั้ง 2 กลุ่ม ติดต่อกันเป็นเวลา 16 วันหรือจนกระทั่งไก่ตาย

3.4.2 ศึกษาระดับของเชื้อในกระแสเลือด อัตราการติดโรคและอัตราการตาย

ตรวจหาและประเมินระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด ทุกวันตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2และ 3.2.3 และประเมินอัตราการติดโรคและอัตราการตาย เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3.4.3. การก่อโรค

ศึกษาอาการทางคลินิก รอยโรคที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า และจุลพยาธิสภาพของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม ดังนี้

3.4.3.1 อาการทางคลินิก ทำการตรวจและสังเกตอาการต่างๆ คือ อาการไข้ โดยการวัดอุณหภูมิร่างกายทางทวารหนัก อาการซึม ขี้เขียว และอาการอื่น ๆ ที่อาจปรากฏ ทุกวัน และศึกษาภาวะเลือดจางโดยการวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (PCV) ทุก 2 วัน

3.4.3.2 การศึกษาลักษณะรอยโรค ทำการผ่าชากไก่ กลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ตัว และกลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ตัว ในวันที่ 0 ,4 , 8 , 12 และ 16 หลังฉีดเชื้อตามลำดับ สังเกตและบันทึกรอยโรคที่เห็นด้วยตาเปล่า และศึกษาลักษณะสำคัญของโรคทางจุลพยาธิสภาพโดยทำการตัดชิ้นเนื้อจาก ตับ ม้าม หัวใจ ไต และสมอง เก็บแช่ใน ฟอร์มาลีน 10 % อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการเทคนิคทางจุลพยาธิวิทยาด้วยวิธีมาตรฐาน แผ่นเนื้อที่ตัดขนาดบาง 5 ไมครอน นำไปย้อม H & E ศึกษาทางจุลพยาธิสภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยายวัตถุ 100 X

3.5 การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ในหลอดทดลอง (*In vitro*)

3.5.1 การเตรียมน้ำยาและซีรั่มสำหรับการเพาะเลี้ยง

3.5.1.1. น้ำยา RPMI 1640 (Trager and Jensen, 1976)

RPMI 1640*	10.4	ก.
HEPES**	5.94	ก.
Gentamicin	36	มก.

นำส่วนประกอบ ทั้ง 3 ชนิด มาผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 960 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำมากรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มล. เมื่อจะนำมาใช้เติม 5 % NaH_2CO_3 ปริมาตร 4 มล. ต่อขวด

3.5.1.2. Transporting media

อาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.5.1.1 ที่ยังไม่ผสม 5% NaH_2CO_3 นำมาผสมกับ Heparin ในสัดส่วน (1 มล. / 10 IU)

---

*GIBCO CO.,LTD ** Sigma

3.5.1.3. ซีรั่มไก่

ไก่ไข่จากข้อ 3.1.4 จำนวน 50 ตัว นำมาเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณข้างคอ ใส่ลงในหลอดปั่น 50 มล. ตั้งทิ้งให้เลือดแข็งตัว ปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ดูดแยกซีรั่ม ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดรู 0.22 ไมครอน และนำไปบ่มที่ 56 ° ซ นาน 30 นาที เพื่อทำลายปฏิกิริยาของคอมพลีเมนต์ (complement) เก็บใส่ขวดที่ปิดฝาแน่น และเก็บไว้ที่ตู้เย็น -20 ° ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.5.2 การเตรียมเลือดไก่ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง

3.5.2.1 การเตรียมเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

ใช้เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงในข้อ 3.2.2

โดยทำการเจาะเลือดที่ตรวจพบระดับเชื้อระยะ trophozoites ในกระแสเลือด 1 – 5 % ปริมาตร 5 มล. จากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณข้างคอ ผสมใน transporting media นำมาปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนและชั้นเม็ดเลือดขาวทิ้ง เติมน้ำยา RPMI 1640 (ข้อ 3.5.1.1) ให้มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดเม็ดเลือดขาวออกให้มากที่สุดและเพื่อล้างให้เม็ดเลือดแดงให้ปลอดจาก Heparin ทำฟิล์มเลือดบางย้อมสี ตรวจหาและประเมินระดับเชื้อตามวิธีในข้อ 3.2.3 และ 3.2.4 ปรับระดับเชื้อให้อยู่ในช่วง 1-5 % โดยการเติมเม็ดเลือดแดงปกติในข้อ 3.5.2.2

3.5.2.2 การเตรียมเม็ดเลือดแดงปกติ

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ *P. gallinaceum* ในข้อ 3.5.2.1

3.5.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum*

3.5.3.1. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประกอบด้วยน้ำยา RPMI และ ซีรั่มไก่ในสัดส่วนดังนี้

แบบที่ 1 น้ำยา RPMI 1640 100%

แบบที่ 2 น้ำยา RPMI 1640 90%+ ซีรั่มไก่ 10%

แบบที่ 3 น้ำยา RPMI 1640 75%+ ซีรั่มไก่ 25%

แบบที่ 4 น้ำยา RPMI 1640 50%+ ซีรั่มไก่ 50%

แบบที่ 5 ซีรั่มไก่ 100%

นำอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละแบบ หยดใส่ถาดหลุมชนิดที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 24 หลุม (Nunc®) ปริมาตร 1 มล. ต่อหลุม จำนวน 3 ถาด เติมตะกอนเม็ดเลือดที่มีระดับเชื้อ *P. gallinaceum* 1-5% ตามข้อ 3.6.2 ปริมาตร 50 มคล. ลงในแต่ละหลุม เขย่าเบาๆให้เข้ากัน นำไปเก็บในตู้บ่มที่มีบรรยากาศแตกต่างกัน ตามข้อ 3.6.3.2

3.5.3.2 บรรยากาศที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ

บรรยากาศของตู้บ่มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* มี 3 แบบคือ

แบบที่ 1 บรรยากาศใน ตู้บ่มที่ 37 °ซ และมีก๊าซ CO_2 5 % (CO_2 incubator)

แบบที่ 2 บรรยากาศใน candle jar ที่ 37 °ซ

แบบที่ 3 บรรยากาศในตู้บ่มที่ 37 °ซ และมีส่วนประกอบของก๊าซ O_2: CO_2: N_2 (2:5:93)

เชื้อที่เตรียมไว้ ในถาดที่ 1, 2 และ 3 ตามข้อ 3.5.3.1 นำมาเพาะเลี้ยงที่บรรยากาศที่ 1 , 2 และ 3 ตามลำดับ ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออก และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เช่นเดิมทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน ในแต่ละวัน ดูดตะกอนเลือดเพียงเล็กน้อย นำมาทำฟิล์มเลือดบางและย้อมสียิมซ่า

3.5.3.3 การประเมินอัตราการเจริญเติบโตและความอยู่รอดของเชื้อ *P. gallinaceum*

แผ่นเลือดที่ย้อมด้วยสียิมซ่าทุกตัวอย่า ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะรูปร่างและปริมาณเชื้อ *P. gallinaceum* ในเม็ดเลือดแดงไก่ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ขนาดกำลังขยาย 100 X ประเมินอัตราการเจริญเติบโตและอัตราความอยู่รอดของเชื้อ *P. gallinaceum* และทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance

การเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองซ้ำทุกขั้นตอนตามการทดลองที่ 3 อย่างน้อย 3 ครั้ง จึงสรุปผล

3.6 การทดลองที่ 4 การถนอมและการเก็บเชื้อ *P. gallinaceum* แช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 ° ซ

3.6.1 น้ำยาถนอมเชื้อ (Cryoprotectants)

น้ำยาที่ใช้ในการถนอมเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ใช้ในการศึกษามี 3 สูตร มีส่วนประกอบดังนี้

<u>สูตรที่ 1</u> (Glycerol-sorbitol)

Glycerol	38	ก.
Sorbitol (ใน 0.9% NaCl)	2.9	ก.
NaCl	0.63	ก.

นำมาผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ (Millipore®)* ที่มีขนาดรู (Pore size) 0.22 ไมครอน

<u>สูตรที่ 2</u> (Glycerol-lactate buffer) (Fenwal ®)**

Glycerin USP	57	ก.
Sodium lactate	1.6	ก.
Potassium Chloride USP	30	มก.
Monobasic Sodium Phosphate (monohydrate) USP	51.7	มก.
Dibasic Sodium Phosphate (anhydrous) USP	124.2	มก.

นำมาผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ให้เท่ากับ 6.8 ด้วย Phosphoric acid ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน

---

* Millipore®

** Fenwal ® : Baxter Corporation

สูตรที่ 3 (Poly vinylpyrolidone, PVP)

วิธีเตรียม PVP (Canning and Winger, 1987)

PVP-40*	20	ก.
Puck's saline	100	มล.

นำ PVP-40 จำนวน 20 ก. ผสมใน Puck's saline G ปริมาตร 100 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน

วิธีเตรียมสารละลาย Puck's saline G

$CaCl_2.H_2O$	0.016	ก.
KCl	0.4	ก.
KH_2PO_4	0.15	ก.
$MgSO_4.7H_2O$	0.15	ก.
NaCl	8.0	ก.
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.29	ก.
D-glucose	1.10	ก.
Phenol red	0.005	ก.

ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.2 ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน

3.6.2 การเตรียมและการเก็บเชื้อ *P. gallinaceum* เพื่อการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 °ซ

3.6.2.1 การเตรียมเชื้อ

ลูกไก่ไข่อายุ 30 วัน จำนวน 30 ตัว จากข้อ 3.1.2 ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* 2×10^6 โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังตามวิธีในข้อ 3.2.2

---

* Sigma

3.6.2.2 การเตรียมเลือด

เมื่อระดับเชื้อในกระแสเลือดสูงเฉลี่ย 70% ทำการเจาะเลือดไก่ จากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณข้างคอ (jugular vein) ปริมาตร 15 มล. ใส่ลงในหลอดที่มี heparin เคลือบอยู่ในสัดส่วน 1 มล. / 10 IU เขย่าเบาๆให้เข้ากัน นำมาปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนและชั้นเม็ดเลือดขาวทิ้ง ล้างด้วยน้ำยา RPMI 1640 ปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที และทำซ้ำ 2- 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเม็ดเลือดขาวให้มากที่สุด เม็ดเลือดแดงที่ได้นำมาตรวจนับจำนวนเชื้อและแบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอดเท่าๆกัน เติมน้ำยาถนอมเชื้อสูตรที่ 1, 2 และ 3 ในข้อ 3.5.1 ปริมาตรเท่ากันกับปริมาตรของเม็ดเลือดแดงใส่ลงในตัวอย่างเลือดหลอดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการแกว่งเบา ๆ แบ่งบรรจุใส่ขวด Cryovial (Nunc ®) จำนวน 60 ขวด ขวดละ 0.5 มล. แต่ละขวดมีปริมาณเชื้อประมาณ 2×10^{6} ปิดฝาให้แน่น

3.6.2.3 การเก็บเชื้อแช่แข็ง

แช่แข็งเชื้อที่บรรจุแล้วด้วยวิธี 2-step cooling โดยเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °ซ และ-20 °ซ เป็นเวลา 1 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นนำไปเก็บที่ -196 °ซ ในไนโตรเจนเหลว ทิ้งไว้นาน 1 และ 3 เดือน นำเชื้อกลับมาทดสอบความอยู่รอด (viability) ตามข้อ 3.5.3

3.6.3 การทดสอบความอยู่รอดของ *P. gallinaceum* ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีการฉีดเข้าตัวสัตว์

3.6.3.1 การแบ่งกลุ่ม ไก่ไข่จำนวน 80 ตัว อายุ 2 สัปดาห์ในข้อ 3.1.3 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และB แต่ละกลุ่มใหญ่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 10 ตัว เท่ากัน กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ 2-4 กลุ่มทดลอง (กลุ่ม A และ B ใช้ในการทดลองเก็บเชื้อเป็นเวลานาน 1 และ3 เดือน ตามลำดับ)

3.6.3.2 การทำละลายเชื้อแช่แข็ง

นำเชื้อที่ได้จากการเตรียมตามข้อ 3.6.2.2 สูตรและเก็บแช่แข็งตามข้อ 3.6.2.3 นาน 1 เดือน ทั้ง 3 ตัวอย่าง. ตัวอย่างละ 10 ขวด ทำให้ละลายอย่างรวดเร็วใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

Nunc ®

3.6.3.3 การทดสอบความอยู่รอดของเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง

เชื้อจาก 3.6.2.1 ที่ผ่านการแช่แข็ง 1 และ 3 เดือน นำมาฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอไก่

กลุ่มที่1 กลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อที่ผ่านเข้าตัวสัตว์อย่างต่อเนื่อง ปริมาณ 2 X 10^{6} ต่อไก่ 1 ตัว

กลุ่มที่ 2-4 กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งและมีส่วนผสมของ cryoprotectants คือ glycerol-sorbitol, glycerol-lactate buffer และ polyvinyl pyrolidone ตามลำดับ

ทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดทุกวันติดต่อกันนาน 15 วัน และประเมินอัตราการติดเชื้อและระดับเชื้อในกระแสเลือด ตามวิธีในข้อ 3.2.3 และ 3.2.4

3.7 การทดลองที่ 5 การศึกษาระดับเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

3.7.1 สารละลายที่ใช้

3.7.1.1 สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Acid Citrate Dextrose (ACD)

Tri-sodium citrate	22.0	ก.
Citric acid	8.0	ก.
Dextrose	24.5	ก.

นำส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนมาผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มล. ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำมากรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ ซ ก่อนนำมาใช้เพื่อการทดลอง

3.7.1.2 LDH reagent ปริมาตร 120 มคล.

ส่วนประกอบ

100 mM Tris, pH 9.2	28	มคล.
1 M lactate	14	มคล.
10 mM 3-Acetyl pyridine adeninedinucleotide (APAD)	7	มคล.
0.5% Triton X-100	14	มคล.
0.5 M Ethylene diaminetetra acetate (EDTA),pH 8.0	0.2	มคล.
100 mM Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)	0.5	มคล.
Distilled water	36.3	มคล.
1 mg/ ml Nitroblue tetrazolium (NBT)	10	มคล.
0.1 mg/ ml N-ethyldibenzopyrazine ethylsulfate salt (PES)	10	มคล.

3.7.2 การเตรียมตัวอย่างเลือดไก่เพื่อตรวจวัดระดับ LDH

ลูกไก่ไข่อายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว ในข้อ 3.1.5 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ไก่ทดลอง จำนวน 2 ตัว ใช้ *P. gallinaceum* ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ตามวิธีในข้อ 3.2.2 เจาะเลือดตรวจหาเชื้อและประเมินระดับเชื้อตามวิธีในข้อ 3.2.3 และ 3.2.4 เมื่อตรวจพบระดับเชื้อในกระแสเลือดสูงเฉลี่ย 40 % เจาะจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณข้างคอ ปริมาตร 5 มล. ใส่ในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็ง (ACD) ปริมาตร 0.75 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำมาปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้นพลาสมาและชั้นเม็ดเลือดขาวทิ้ง ล้างด้วยน้ำยา RPMI 1640 (3.5.1.1) ปั่นและทำซ้ำเช่นเดิม 2 ครั้ง ตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ได้นำมาตรวจหาและปรับระดับเชื้อให้เป็น 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 และ 30 % ด้วยการเติมตะกอนเลือดของไก่ปกติในกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 2 จากนั้นปรับค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นให้เป็น 2 % ด้วยน้ำยา RPMI 1640

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม ไก่จำนวน 2 ตัว ไม่ได้รับเชื้อ เจาะเลือด ในขณะเดียวกันกับไก่ที่กลุ่มทดลอง (กลุ่มที่ 1) มีระดับเชื้อในกระแสเลือดสูง 40 % โดยเจาะเลือดจาก jugular vein ปริมาตร 5 มล. ใส่ในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็ง (ACD) ปริมาตร 0.75 มล. เขย่าให้เข้ากัน ล้างและปั่น เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ทำซ้ำ 3 ครั้ง ตะกอนเลือดที่ได้ ใช้ในปรับระดับเชื้อในกลุ่มที่ 1 และใช้เป็นกลุ่มควบคุมการทดลองโดยปรับค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นให้เป็น 2 % เช่นกัน

ตัวอย่างเลือดที่ปรับค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเป็น 2 % ในกลุ่มควบคุม ระดับเชื้อ 0 % และกลุ่มทดลอง ที่มีระดับเชื้อ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 และ30 % นำไปแช่แข็งในที่ -20 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง นำไปใช้ในการตรวจวัดระดับของ LDH ตามข้อ 3.7.3

3.7.3 การวัดระดับของ LDH

ทำตามวิธีของ Goodyer และ Taraschi (1997) ใช้ตัวอย่างเลือดไก่ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ที่เตรียมในข้อ 3.7.2 ลงในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุม ปริมาตร 20 มคล. ต่อ หลุม ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เติม LDH reagent ในข้อ 3.7.1.2 ปริมาตร 120 มคล. ต่อหลุม นำไป incubate ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 5 % กรดอะซิติก ปริมาตร 100 มคล. ต่อหลุม นำไปวัดค่าที่ OD ที่ 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

3.7.4 การวิเคราะห์และประเมินค่า LDH ที่ระดับเชื้อ *P. gallinaceum* แตกต่างกัน

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์และประเมินผล เพื่อหาค่าความเข้มข้นของ LDH ในเลือดที่มีระดับเชื้อตั้งแต่ 0-30%

บทที่ 4

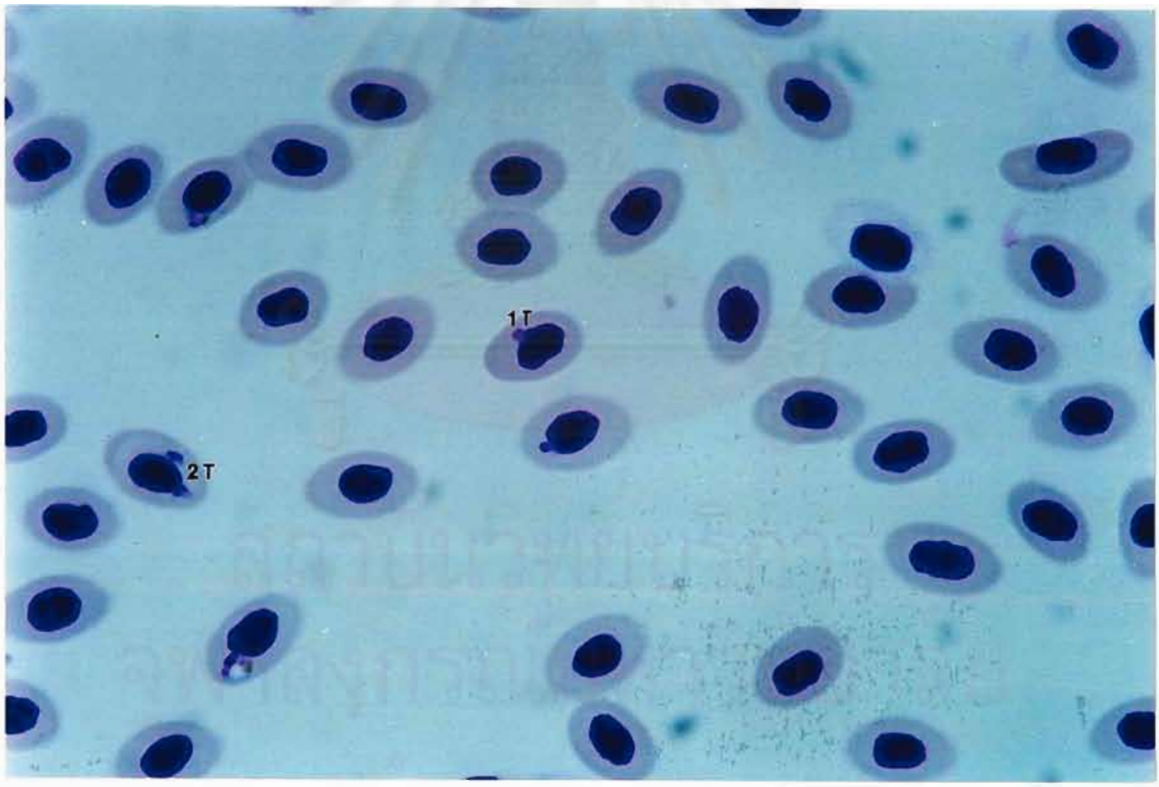
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum*

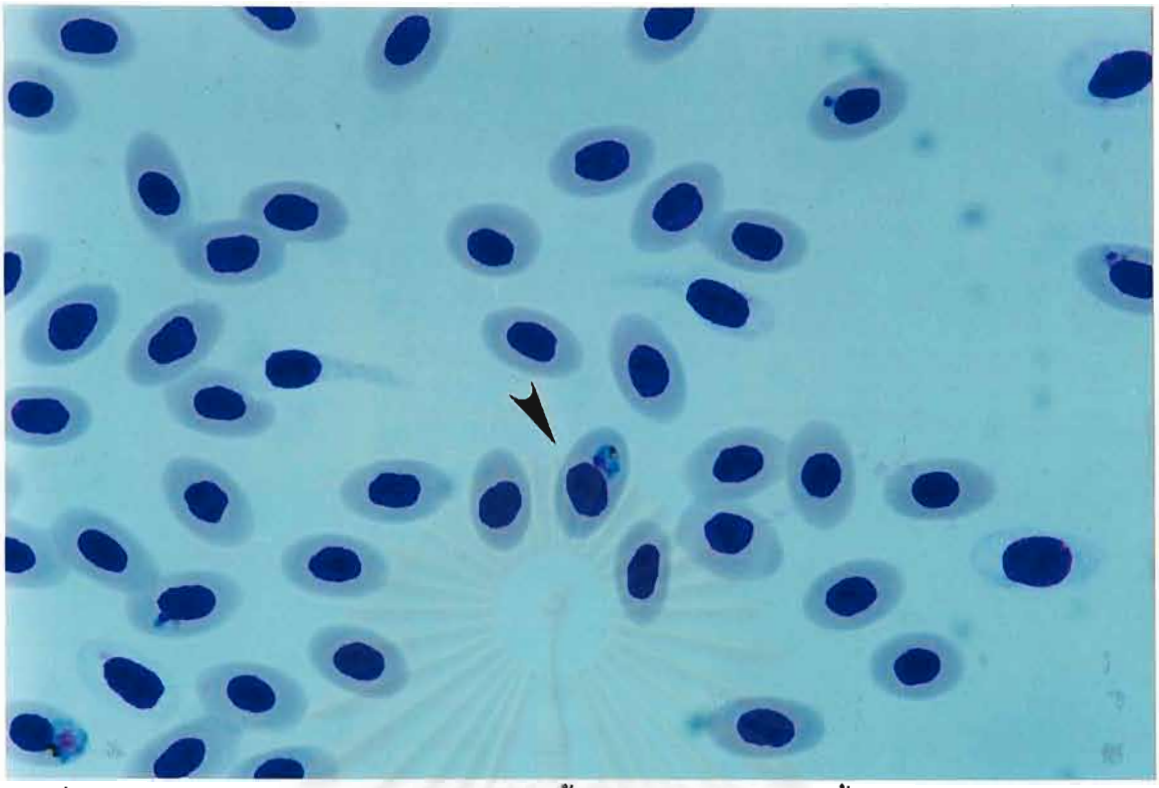
ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* จากฟิลม์เลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ปรากฏว่าตรวจพบเชื้อที่อยู่ในไซโตพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงไก่ ที่สามารถสังเกตได้เด่นชัดมี 4 ระยะ คือ trophozoites, schizonts, merozoites และ gametocytes รูปร่างลักษณะของ trophozoites ระยะเริ่มต้นขณะเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ๆ จะเห็นนิวเคลียสมีขนาดเล็กติดสีม่วงแดง และมีไซโตพลาซึมเป็นวงสีฟ้าทึบ ตรงกลางว่างไม่ติดสี ขนาดเล็ก 0.98-1.97 ไมครอน ขนาดเฉลี่ย 1.24 ไมครอน ตำแหน่งของ trophozoites ที่พบอยู่บริเวณที่ชิดกับนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ (รูปที่ 5ก.) และในวันแรกที่มีการตรวจพบ trophozoites ที่มีลักษณะเช่นนี้ มีระดับเชื้อต่ำกว่า 1% และวันต่อมาพบได้ในระดับสูงขึ้น ในไซโตพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง จะมี trophozoites 1 หรือมากกว่า 1 (รูปที่ 5ก.) ระยะปลายของ trophozoites มีลักษณะรูปร่างคล้ายอมีบา (ameboid form) พบได้มาก กระจายอยู่ทั่วไป มีขนาดตั้งแต่ 3.93-6.88 ไมครอน ขนาดเฉลี่ย 5.16 ไมครอน รูปร่างไม่แน่นอน ผนังเซลล์บาง นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม ติดสีม่วงแดง ไซโตพลาซึมติดสีฟ้าใส และมีเม็ดสีของมาลาเรียสีน้ำตาลเข้มปนเหลือง กระจายหรือรวมกลุ่มกันอยู่เล็กน้อย (รูปที่ 5ข.)

เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่พบมากที่สุด คือ schizonts รูปร่างค่อนข้างกลมหรือเกือบกลมมีขนาดแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 6.83-12.68 ไมครอน ขนาดเฉลี่ย 9.89 ไมครอน ไซโตพลาซึมติดสีฟ้าจาง schizonts ในระยะแรกๆ ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ นิวเคลียส จำนวนหนึ่งกระจายไม่เป็นที่อยู่ภายในไซโตพลาซึมของเชื้อ นิวเคลียสอาจมีเพียง 2, 4 หรือมากกว่า 20 (รูปที่ 6ก.-6ค.) พบเม็ดสีน้ำตาลเข้มปนเหลืองรวมกันเป็นกลุ่ม schizont ในระยะปลายซึ่งเจริญเต็มที่รูปร่างไม่แน่นอนอาจจะค่อนข้างกลมหรือยาวรี มีลักษณะเด่น คือ ภายในมี merozoites จำนวน 16 merozoites แต่ละ merozoites ประกอบด้วยนิวเคลียส ไซโตพลาซึม และผนังห่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ติดสีม่วงแดงเข้ม ไซโตพลาซึมมีปริมาณน้อยติดสีฟ้าเข้ม โดย merozoites กระจายอยู่รอบๆ เม็ดสีของมาลาเรียซึ่งสีน้ำตาลเข้ม รวมตัวกันเป็นกระจุกอยู่ตรงกลาง และบางครั้งเม็ดสีอาจถูก merozoites เบียดทำให้เห็นอยู่ด้านข้าง (รูปที่ 6ง.) merozoites แต่ละตัว มีขนาดประมาณ 0.98 ไมครอน ฟิล์มเลือดบางที่มีระดับเชื้อสูงกว่า 60 % พบ merozoite บางส่วนที่อยู่เป็นอิสระมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ขนาดคงเดิม (รูปที่ 6จ.)

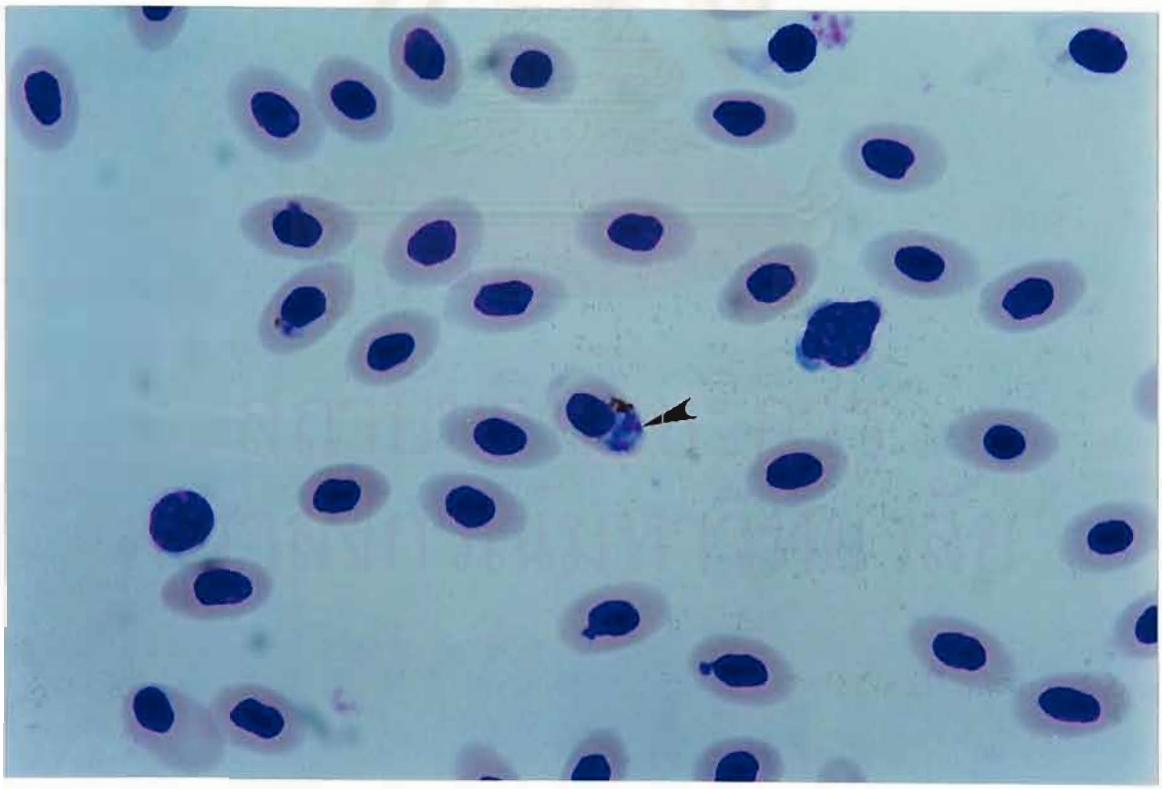
เชื้อระยะสุดท้ายที่พบ คือ gametocytes ประกอบด้วย macrogametocyte และ microgametocyte (รูปที่ 7ก.-7ง.) macrogametocyte มีขนาดยาวตั้งแต่ 7.8-11.8 ไมครอน ขนาดเฉลี่ย 9.8 ไมครอน ลักษณะรูปร่างค่อนข้างรี หัวท้ายมน นิวเคลียสมีรูปกลม ติดสีแดงเข้มอยู่บริเวณตรงกลาง มีการสะสมของเม็ดสีอยู่บริเวณข้างนิวเคลียส ไซโตพลาซึมติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 7ก.) ส่วน microgametocyte มีขนาดยาวตั้งแต่ 9.8-12.8 ไมครอน ขนาดเฉลี่ย 11.8 ไมครอน รูปร่างไม่แน่นอน พบว่าเชื้ออาจจะโอบล้อมนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ (รูปที่ 7ข.) หรือเบียดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ไปชิดข้างใดข้างหนึ่ง (รูปที่ 7ค.และ 7ง.) และบางครั้งพบว่าเชื้อจะเบียดผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างผิดปกติ นิวเคลียสของเชื้อระยะนี้จะมีขนาดใหญ่ติดสีแดงเข้ม ไซโตพลาซึมติดสีม่วงแดง และพบการสะสมของเม็ดสีเม็ดเดี่ยว กระจายอยู่ทั่วไป



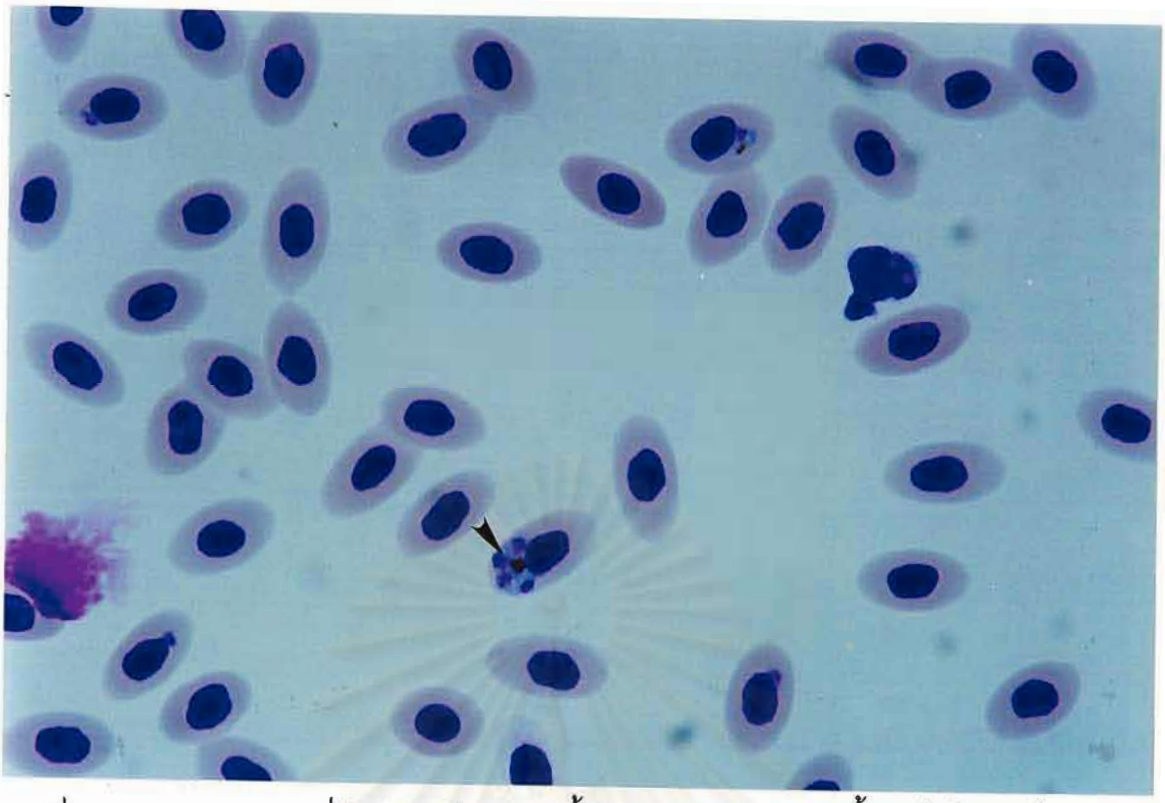
รูปที่ 5ก. trophozoites ระยะเริ่มต้น ของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากแผ่นฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า
1T= trophozoite 1 ตัว, 2T= trophozoite 2 ตัว



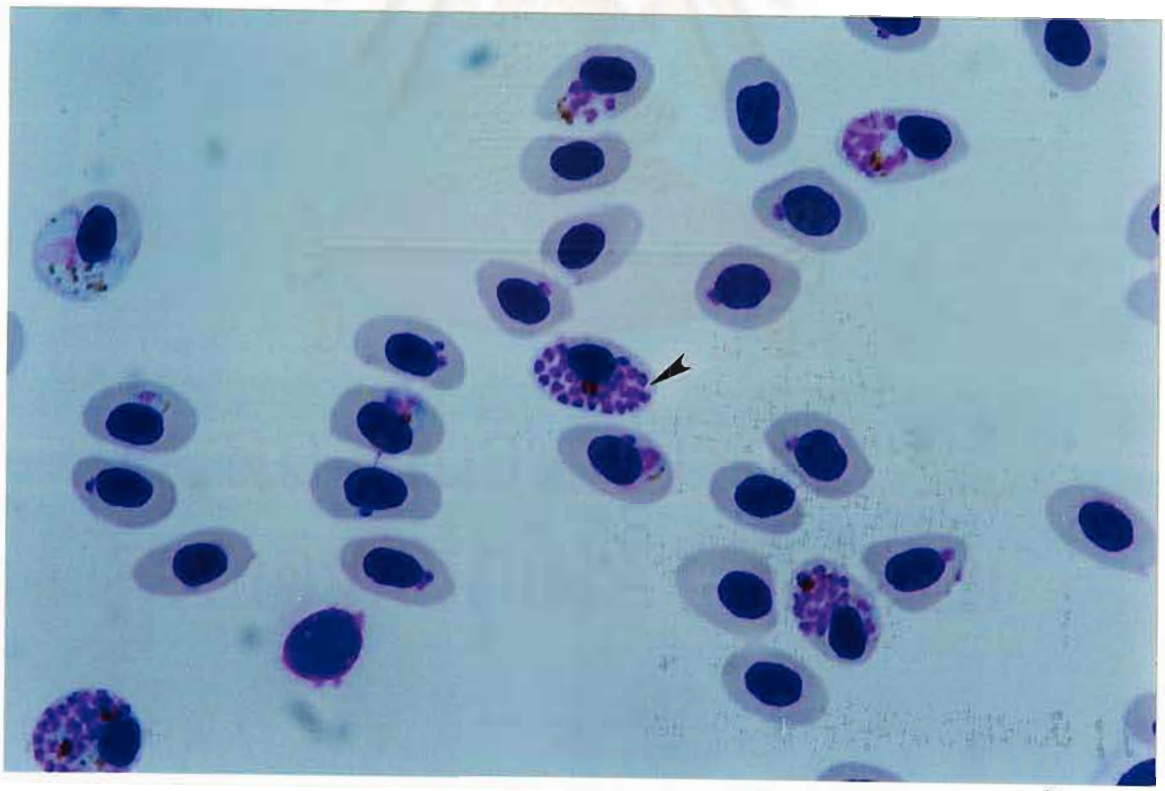
รูปที่ 5ข. trophozoites รูปร่างคล้ายอมีบา ของเชื้อ *P. gallinaceum* (ศรชี้) ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า



รูปที่ 6ก. ระยะ schizonts ที่มี 2 นิวเคลียสของ เชื้อ *P. gallinaceum* (ศรชี้) ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

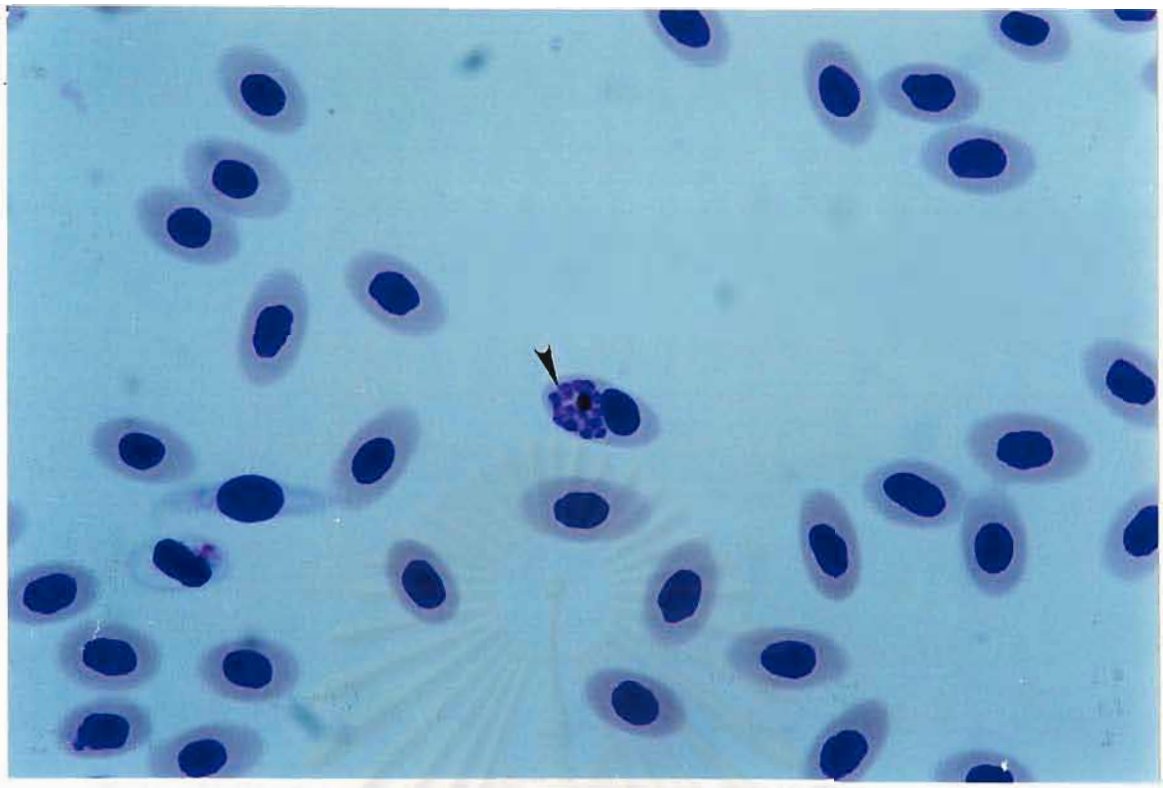


รูปที่ 6ข. ระยะ schizonts ที่มี 4 นิวเคลียส ของ เชื้อ *P. gallinaceum* (ศรชี้) ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

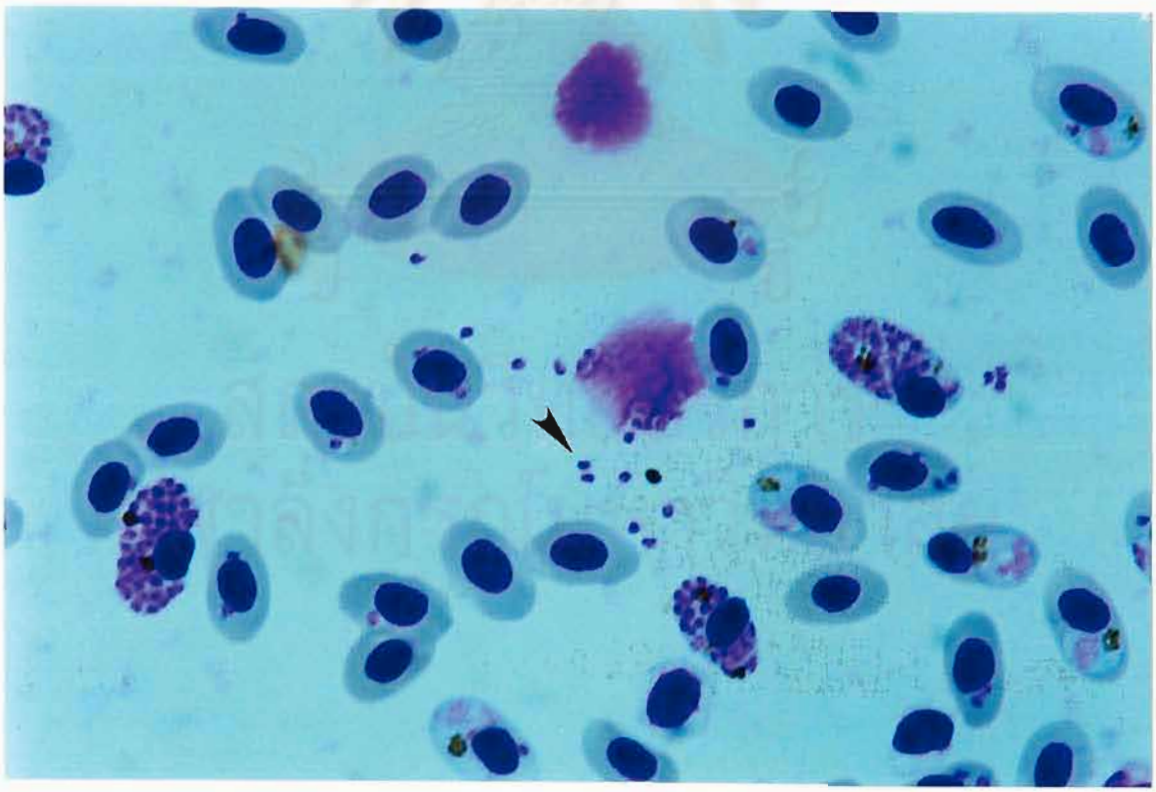


รูปที่ 6ค. ระยะ schizonts ซึ่งเจริญเต็ม (> 20 นิวเคลียส) ของเชื้อ *P. gallinaceum* (ศรชี้) ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

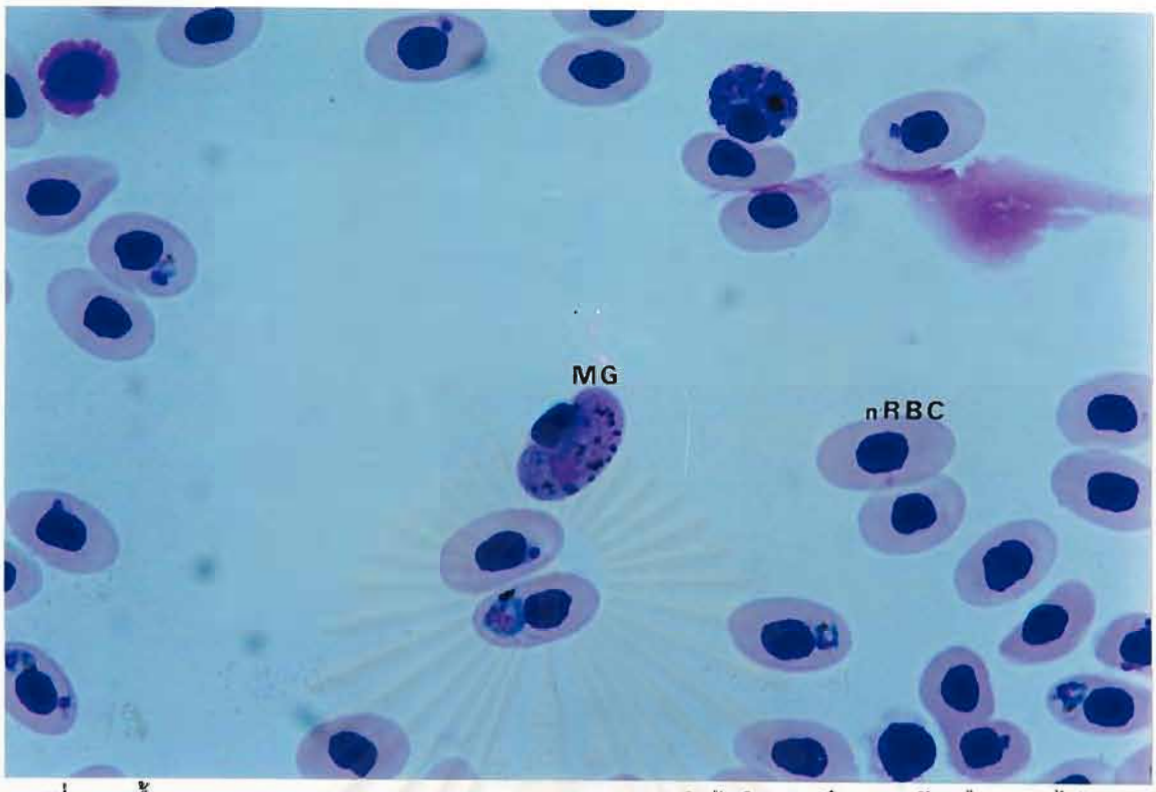
i 19236797



รูปที่ 6ง. ระยะ schizonts ของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ ซึ่งเจริญเต็มที่ มีเม็ดสีของมาลาเรียรวมกันเป็นกลุ่มตรงกลางและmerozoites กระจายอยู่โดยรอบ (ศรชี้) จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

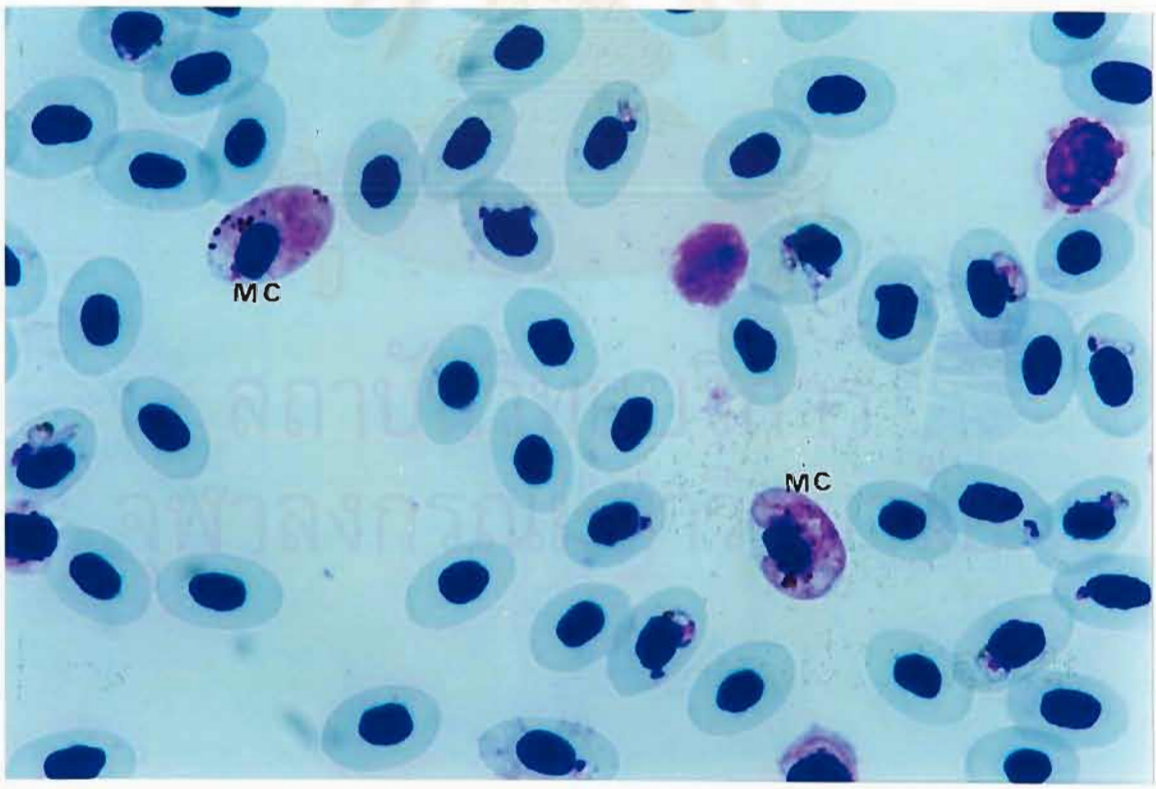


รูปที่ 6จ. merozoites ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่อยู่เป็นอิสระนอกเม็ดเลือดแดง (ศรชี้) จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

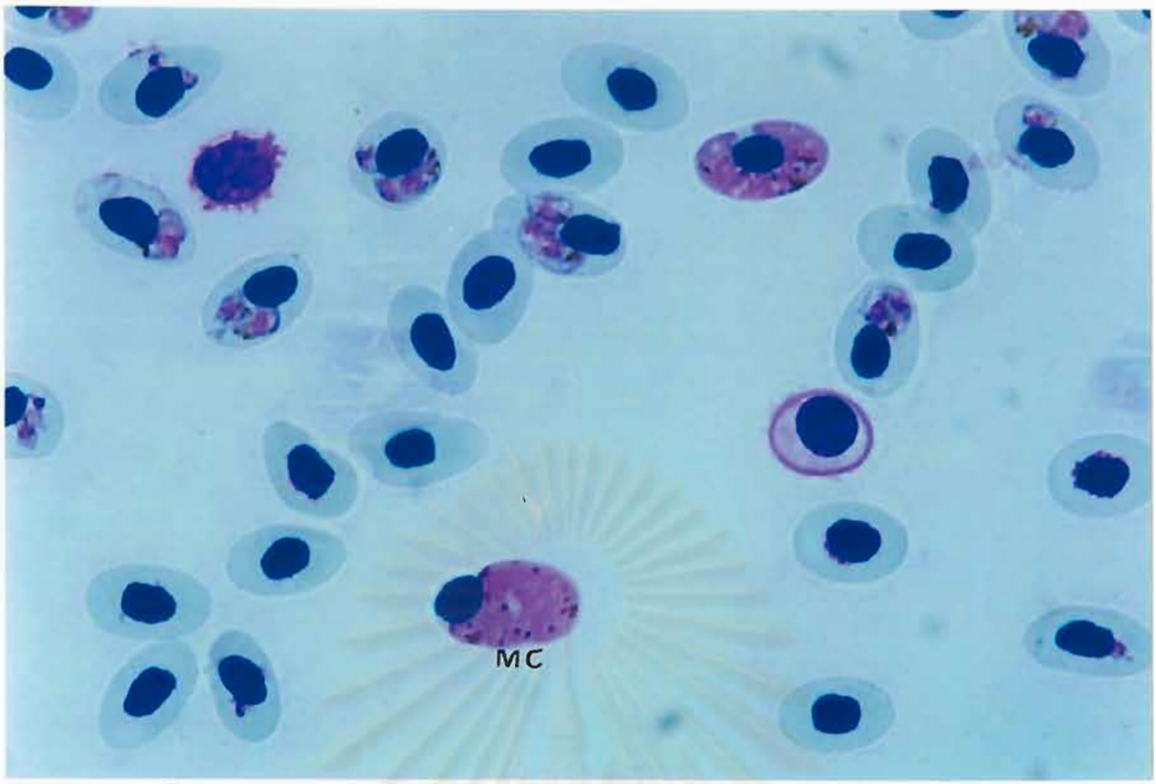


รูปที่ 7ก. เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ macrogametocytes ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

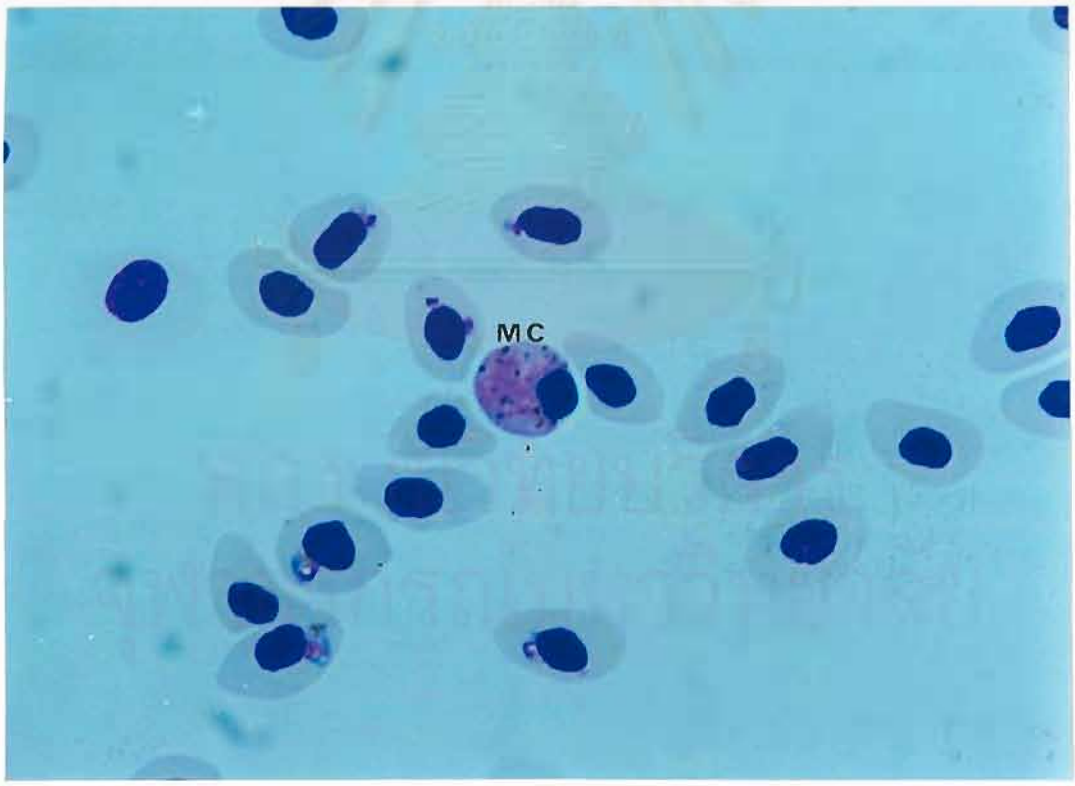
MG = macrogametocytes, nRBC = nucleus ของ Red Blood Cell



รูปที่ 7ข. เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ microgametocytes (MC) ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่าขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า



รูปที่ 7ค. เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ microgametocytes (MC) ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า



รูปที่ 7ง. เชื้อ *P. gallinaceum* ระยะ microgametocytes (MC) ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงไก่ เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างผิดปกติ จากฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

4.2 การศึกษาอัตราการติดโรค ระดับเชื้อในกระแสเลือด และการก่อโรค

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด อัตราการติดโรค และอัตราการตายของไก่เนื้ออายุ 2 สัปดาห์ ที่ได้รับเชื้อฉีดเข้าใต้หนังปริมาณ $5x10^{4}$ ต่อไก่ 1 ตัว พบว่าไก่มีอัตราการติดโรค 100% (30/30 ตัว) โดยเริ่มตรวจพบเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือดเป็นครั้งแรกในวันที่ 4 หลังการฉีด คิดเป็น 12.5% (3/24 ตัว) ระดับเชื้อในกระแสเลือดค่อนข้างต่ำอยู่ระหว่าง 0.001 ถึง 0.002% ในวันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อ อัตราการติดโรคเพิ่มเป็น 61 % และระดับเชื้อในกระแสเลือดอยู่ระหว่าง 0.001 ถึง 0.033% ในวันที่ 9 ไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อมีอัตราการติดโรค 100% ระดับเชื้อในกระแสเลือดอยู่ระหว่าง 0.004-49% จากนั้นในวันต่อๆมาเชื้อในกระแสเลือดมีระดับสูงขึ้นเรื่อยๆในวันที่ 14 อัตราเฉลี่ยของระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูงสุดถึง 81.67% ส่วนในวันที่ 15 และ 16 ระดับเชื้อในกระแสเลือดลดต่ำลงมีค่าเฉลี่ย 76.50 และ 71.50% ตามลำดับ สำหรับระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ปรากฏในกระแสเลือดก่อนไก่ตาย 1 วัน มีระดับสูงตั้งแต่ 71 ถึง 92% ในวันที่ 10 หลังจากที่ได้รับเชื้อไก่เริ่มตายเป็นวันแรก คิดเป็น 8.33% และมีอัตราการตายสูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการทดลองไก่ที่ได้รับเชื้อ มีอัตราการตายสูง 66.67% และระดับเชื้อเฉลี่ยสูง 71.5%

ผลการศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่เนื้อกลุ่มทดลองทั้ง 30 ตัว แสดงในตารางที่ 2 และ 3 อาการทางคลินิกที่ปรากฏในไก่ที่ได้รับเชื้อ ได้แก่ ซึม ขี้เขียว และเลือดจาง คิดเป็น 100, 67 และ 100 % ตามลำดับ อุณหภูมิร่างกายของไก่กลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมที่ตรวจวัดทุกตัวทุกวัน อยู่ในเกณฑ์ปกติ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 40.60–42.39 °ซ และ40.44- 42.5 °ซ ตามลำดับ สำหรับอาการซึมเริ่มปรากฏในไก่กลุ่มทดลองบางตัวในวันที่ 9 คิดเป็น 25% (3/12 ตัว) และมีอาการซึมทุกตัว (100%) ในวันที่ 13 ขณะที่ลักษณะขี้เขียวของไก่กลุ่มทดลองนั้นเริ่มปรากฏตั้งแต่วันที่ 9 คิดเป็น 25 % (3/12 ตัว) และอาการขี้เขียวนี้เด่นชัดขึ้นเรื่อยๆ และพบเป็นอัตราสูงสุด 67% ในวันที่ 12 ลักษณะขี้เขียวของขี้ไก่ในระยะแรกมีสีเขียวปนกับขี้สีน้ำตาลอ่อนปนขาว และในระยะปลาย มักพบขี้มีสีเขียวเข้มลักษณะเหลวมากขึ้น ในขณะเดียวกันไก่กลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัว ไม่พบว่าแสดงอาการใดๆตลอดระยะเวลาการศึกษา

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยระดับเชื้อในกระแสเลือด (%Parasitemia) อัตราการติดเชื้อ (Infectivity rate) และอัตราการตายของไก่เนื้ออายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว ก่อนและหลังการฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 5×10^4 ฉีดเข้าทางผิวหนังในวันที่ 0-16

วันที่ได้รับเชื้อ	ระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในกระแสเลือด (%)		อัตราการติดโรค	อัตราการตาย
	Mean ± S.D.	Range		
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.0002	0.001- 0.002	12.50	0.00
5	0.001	0.001- 0.05	33.33	0.00
6	0.337	0.001- 0.033	61.00	0.00
7	5.947	0.001- 46.00	88.88	0.00
8	9.494	0.001- 69.40	94.00	0.00
9	15.550	0.004- 49.00	100.00	0.00
10	24.047	1.20- 84.00	100.00	8.33
11	48.400	3.00- 90.00	100.00	8.33
12	67.700	20.00- 84.00	100.00	16.67
13	77.250	64.00- 92.00	100.00	16.67
14	81.667	75.00- 89.00	100.00	50.00
15	76.500	73.00- 80.00	100.00	66.67
16	71.500	55.00- 88.00	100.00	66.67

ผลการศึกษาภาวะเลือดจางของไก่ทั้ง 2 กลุ่มโดยการตรวจวัดและประเมินจากค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%Pack cell volume, PCV) พบว่าไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ *P.gallinaceum* มีค่า PCV ต่ำกว่าปกติ (PCV< 24%) ตั้งแต่วันที่ 12 โดย PCV เฉลี่ยมีค่า 20.7 ± 4.52 (14 – 29 %) วันที่ 14 ค่า PCV เฉลี่ย 17.25± 2.21 และวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการทดลองค่า PCV เฉลี่ยเป็น 16.5 ± 0.70 (16-17%) ในขณะที่ค่า PCV เฉลี่ยของไก่กลุ่มควบคุมอยู่ในเกณฑ์ปกติตลอดการทดลอง คือ 31.25 ± 3.40 (28- 36%)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และพิสัย ของอุณหภูมิร่างกาย และ PCV (%) และอาการทางคลินิก ของไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 5×10^4 โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

วันหลังจากได้รับเชื้อ	อุณหภูมิร่างกาย (°ซ)		PCV (%)		ซึม	ขี้เขียว
	Mean ± S.D.	Range	Mean ± S.D.	Range	(%)	(%)
0	40.25 ± 0.40	(39.5 - 40.5)	29.83 ± 1.72	(29- 33)	0	0
1	40.60 ± 0.46	(40.0 – 41.5)	ND	ND	0	0
2	40.97 ± 0.99	(36.5 – 41.7)	28.66 ± 1.99	(26-31)	0	0
3	40.85 ± 0.42	(40.2 – 41.5)	ND	ND	0	0
4	41.31 ± 0.43	(40.5 - 41.7)	27.50 ± 2.37	(23- 34)	0	0
5	41.46 ± 0.32	(41.0 – 42.0)	ND	ND	0	0
6	41.88 ± 0.48	(40.7- 43.0)	24.94 ± 3.42	(20- 31)	0	0
7	41.81 ± 0.40	(41.2 - 42.6)	ND	ND	0	0
8	41.96 ± 0.38	(41.3 – 42.6)	24.27 ±4.46	(17- 34)	0	0
9	42.17 ± 0.45	(41.5 - 43.0)	ND	ND	25.00	25.00
10	42.06 ± 0.35	(41.5 - 42.5)	25.90 ±3.50	(21- 30)	25.00	25.00
11	42.39 ± 0.45	(41.5 - 43.2)	ND	ND	63.63	41.60
12	41.88 ± 0.36	(41.5 - 42.5)	20.7 ± 4.52	(14- 29)	72.72	67.00
13	42.17 ± 0.23	(42.0 - 42.5)	ND	ND	100.00	67.00
14	41.83 ± 0.28	(41.5 - 42.0)	17.25 ± 2.21	(15-20)	100.00	67.00
15	41.60 ± 0.14	(41.5 - 41.7)	ND	ND	100.00	67.00
16	41.50 ± 0.7	(41.0 - 42.0)	16.5 ± 0.70	(16-17)	100.00	67.00

ND = ไม่ได้วัดค่า PCV

ในการผ่าซากเพื่อศึกษารอยโรคที่เกิดจากเชื้อ *P.gallinaceum* ของไก่กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ16 หลังจากได้รับเชื้อ ผลการตรวจหารอยโรคที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าตามอวัยวะภายในที่สำคัญ คือ ม้ามโตและมีสีดำคล้ำ ตับมีสีดำคล้ำ มีของเหลวคั่งอยู่ในถุงหุ้มหัวใจ เยื่อหุ้มสมองมีเลือดคั่ง และ ไตบวมน้ำ ของไก่กลุ่มทดลอง พบว่า ในวันที่ 0 และ 4 หลังจากได้รับเชื้อ ไม่สามารถสังเกตเห็นรอยโรคด้วยตาเปล่า (ตารางที่ 4, 5 และรูปที่ 8) ในวันที่ 8, 12 และ 16 หลังจากฉีดเชื้อ ม้ามมีขนาดโตขึ้น ตับมีขนาดปกติ ในขณะที่สีของตับและม้ามเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ตับเริ่มมีสีคล้ำขึ้นในวันที่ 8 คิดเป็น 16.67% และสีดำเข้มในวันที่ 12 สูงถึง 66.67% (ตารางที่ 4) ม้ามมีสีดำตั้งแต่วันที่ 8 คิดเป็น 66.67% และสีดำคล้ำทุกตัว (100%) ในวันที่ 16 (รูปที่ 8) ม้ามมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ในวันที่ 12และ16 หลังจากได้รับเชื้อ (ตารางที่ 5) สำหรับของเหลวที่คั่งอยู่ในถุงหุ้มหัวใจเริ่มพบในวันที่ 12 หลังจากฉีดเชื้อ

จำนวน คิดเป็น 33.33% (2/6 ตัว) และพบได้ทุกตัว (100%) ในวันที่ 16 (รูปที่ 9) โดยที่หัวใจยังคงมีขนาดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับรอยโรคที่ปรากฏในเยื่อหุ้มสมอง พบว่าเริ่มมีเลือดคั่งในวันที่ 8 (1/6 ตัว) คิดเป็น 16.67% และในวันที่ 12 และ 16 พบมากขึ้นเป็น 33.33% เท่ากัน (2/6 ตัว) ส่วนที่ไตพบว่า เกิดภาวะบวมน้ำ ในวันที่ 12 และ16 คิดเป็น 16.67% (1/ 6 ตัว) และ66.67% (4/ 6 ตัว) ตามลำดับ (รูปที่ 10)

สำหรับไก่กลุ่มควบคุมทุกตัวไม่ปรากฏรอยโรคใดตลอดการทดลอง ขนาดและลักษณะของอวัยวะภายในต่างๆ ที่สังเกตด้วยตาเปล่ามีลักษณะปกติ

ตารางที่ 4 รอยโรคที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าที่ ตับ ม้าม หัวใจ สมอง และไต ของไก่กลุ่มทดลองภายหลังจากได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16

อวัยวะ และรอยโรคที่สำคัญ	วันที่ตรวจพบและเปอร์เซ็นต์ที่พบรอยโรค				
	0	4	8	12	16
1. ตับ สีผิดปกติ(ดำ)	NR	NR	16.67	66.67	100.00
2. ม้าม ขนาดโตขึ้น สีผิดปกติ(ดำ)	NR	NR	66.67	83.33	100.00
3. หัวใจ ถุงหุ้มมีของเหลวคั่ง	NR	NR	NR	33.33	100.00
4. สมอง เลือดคั่ง	NR	NR	16.67	33.33	33.33
5. ไต บวมน้ำ	NR	NR	NR	16.67	66.67

NR (no remarkable lesions) = ไม่พบรอยโรค

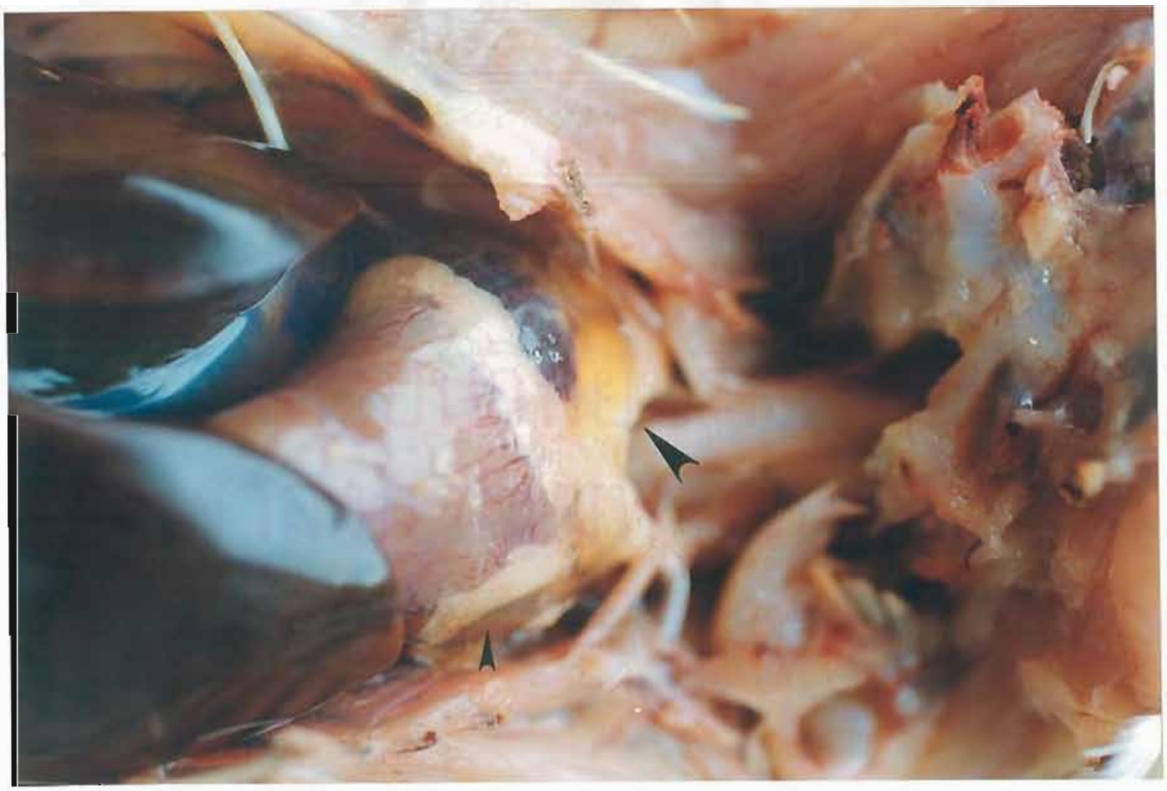
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบขนาดความกว้างและความยาวของม้าม (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของไก่อายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัวในกลุ่มควบคุม และ 30 ตัวในกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ปริมาณ 5×10^4 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16

วันที่ได้รับเชื้อ	ขนาดเฉลี่ย (มม.) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของม้ามของไก่			
	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง	
	ความกว้าง	ความยาว	ความกว้าง	ความยาว
0	9.0 ± 1.41	13.0 ± 2.11	9.0 ± 1.41	13.0 ± 2.1
4	9.0 ± 1.41	11.0 ± 1.41	9.0 ± 1.70	11.8 ± 2.11
8	9.5 ± 0.70	15.0 ± 0	12.0 ± 2.19	17.8 ± 4.49
12	8.5 ± 2.12	15.0 ± 0	17.7 ± 4.23	25.7 ± 5.49
16	11.0 ± 0.81	16.8 ± 1.50	13.2 ± 1.48	19.8 ± 1.78

สำหรับการศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา ในวันที่ 8 หลังการฉีดเชื้อ เริ่มตรวจพบ schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ตับและม้ามของไก่ทดลอง คิดเป็น 33.33% (2/6 ตัว) เท่ากัน โดยเชื้อที่พบมีปริมาณน้อยและประปราย โดยเชื้อที่พบมีปริมาณมากกระจายอยู่ทั่วไป (ตารางที่ 6) และวันต่อมาตรวจพบเป็นจำนวนมากขึ้น จนกระทั่งพบได้สูงสุดถึง 100% ในวันที่ 16 โดยเชื้อที่พบมีปริมาณมากกระจายอยู่ทั่วไป ลักษณะของ schizont ที่พบมีรูปร่างไม่แน่นอน มีหลายขนาด และมี merozoite จำนวนมากเบียดอัดแน่น อยู่ที่ผนังหลอดเลือดฝอย และเส้นเลือดขนาดเล็กของตับเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 11) พบเม็ดสีของมาลาเรียจำนวนมากอยู่ภายใน Kupffer's cell และกระจายทั่วไป (รูปที่ 12) ในม้ามตรวจพบเชื้อระยะ schizont ที่ผนังหลอดเลือดฝอย และมีเม็ดสีของมาลาเรียกระจายอยู่โดยทั่วไป ลักษณะเม็ดสีติดสีน้ำตาลเหลือง เป็นกลุ่มก้อนใหญ่ๆ เต็มไปหมด (รูปที่ 13)

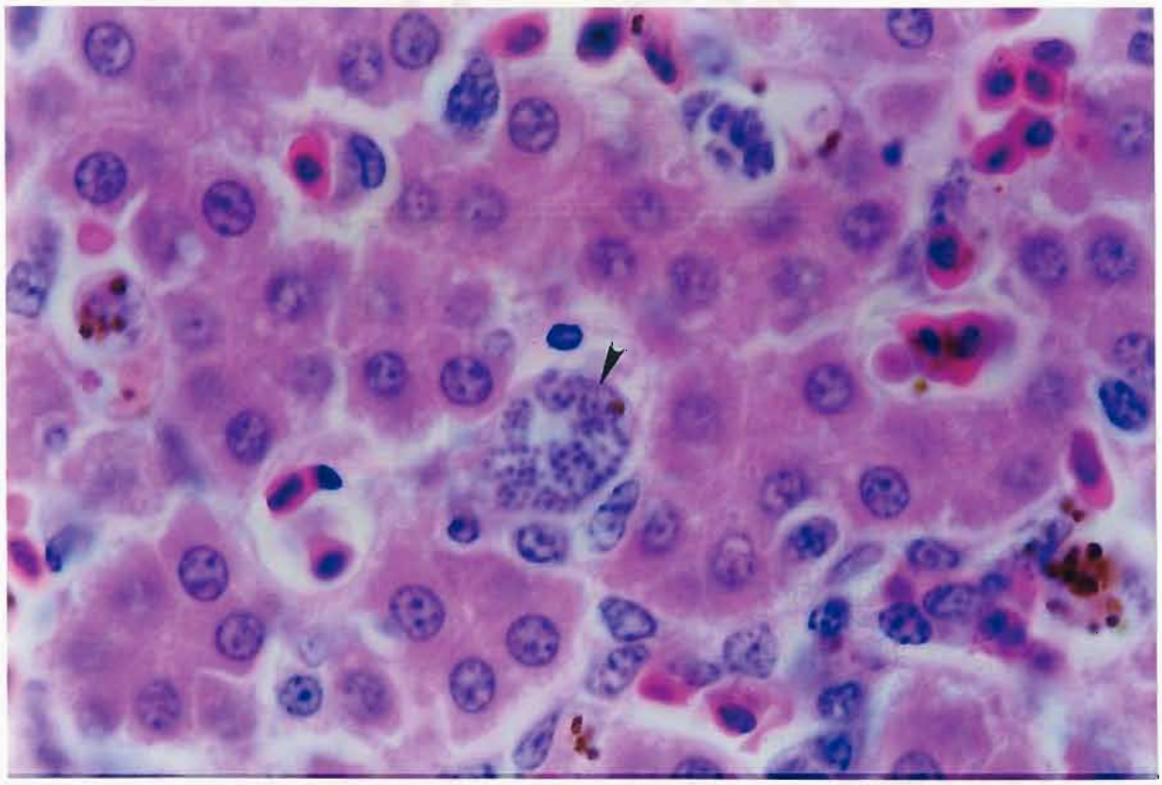
ที่หัวใจเริ่มพบเม็ดสีของมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ *P. gallinaceum* ที่มาเลี้ยงหัวใจในวันที่ 8 ในไก่ คิดเป็น 33.33% (2/6 ตัว) และตรวจพบได้สูงสุดโดยพบในไก่ทดลองทุกตัว (100%) ในวันที่ 12 และ 16 (รูปที่ 14) สมองพบการบวมของ endothelial cell ในหลอดเลือดขนาดเล็ก เริ่มตรวจพบ schizont ที่ผนังหลอดเลือดฝอยเป็นครั้งแรกในวันที่ 8 ในไก่ทดลอง คิดเป็น 16.67% (1/6 ตัว) และตรวจพบสูงสุดในไก่ทดลอง ตัว ในวันที่ 16 คิดเป็น 83.33% (รูปที่ 15) ไตเริ่มตรวจพบ schizont เป็นครั้งแรกในวันที่ 12 ที่ผนังของหลอดเลือดฝอย คิดเป็น 16.67% (1 / 6 ตัว) และตรวจพบสูงสุด ในไก่ทดลอง ในวันที่ 16 คิดเป็น 83.33% (5/6 ตัว)นอกจากนี้พบว่าเซลล์มีลักษณะบวมน้ำขนาดขยายและกระจายอยู่เป็นหย่อมๆ (รูปที่ 16)

รูปที่ 8 สีและขนาดของตับและม้ามของไก่กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ในวันที่ 16

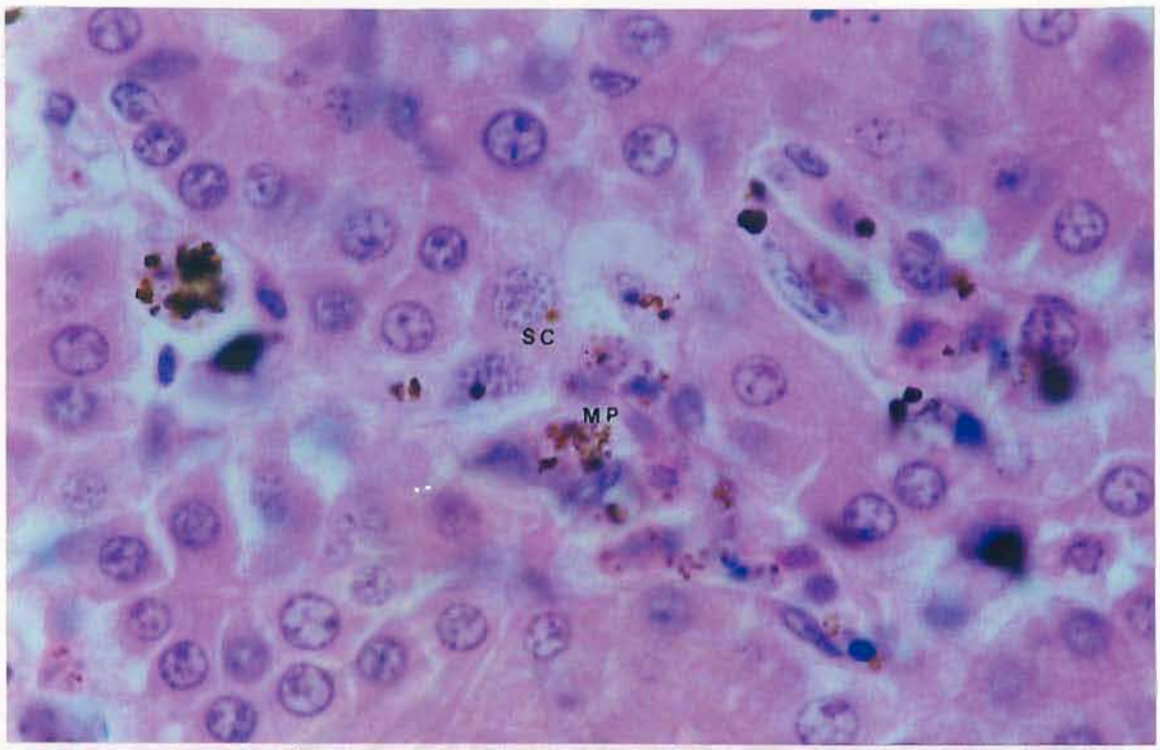


รูปที่ 9 ของเหลวที่คั่งอยู่ภายในถุงหุ้มหัวใจ (ศรชี้) ของไก่กลุ่มทดลอง หลังจากได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ในวันที่ 16

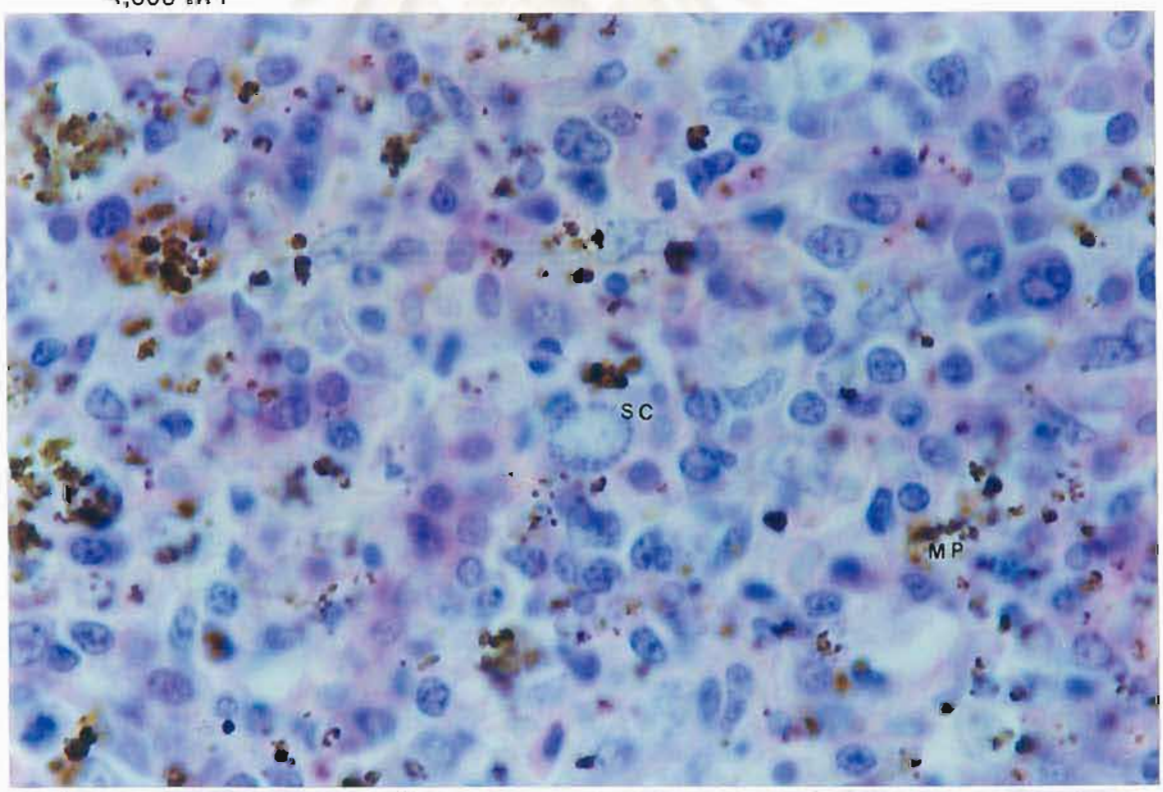
รูปที่ 10 ลักษณะของไตที่บวมน้ำ (ศรชี้)ของไก่กลุ่มทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* ในวันที่ 16



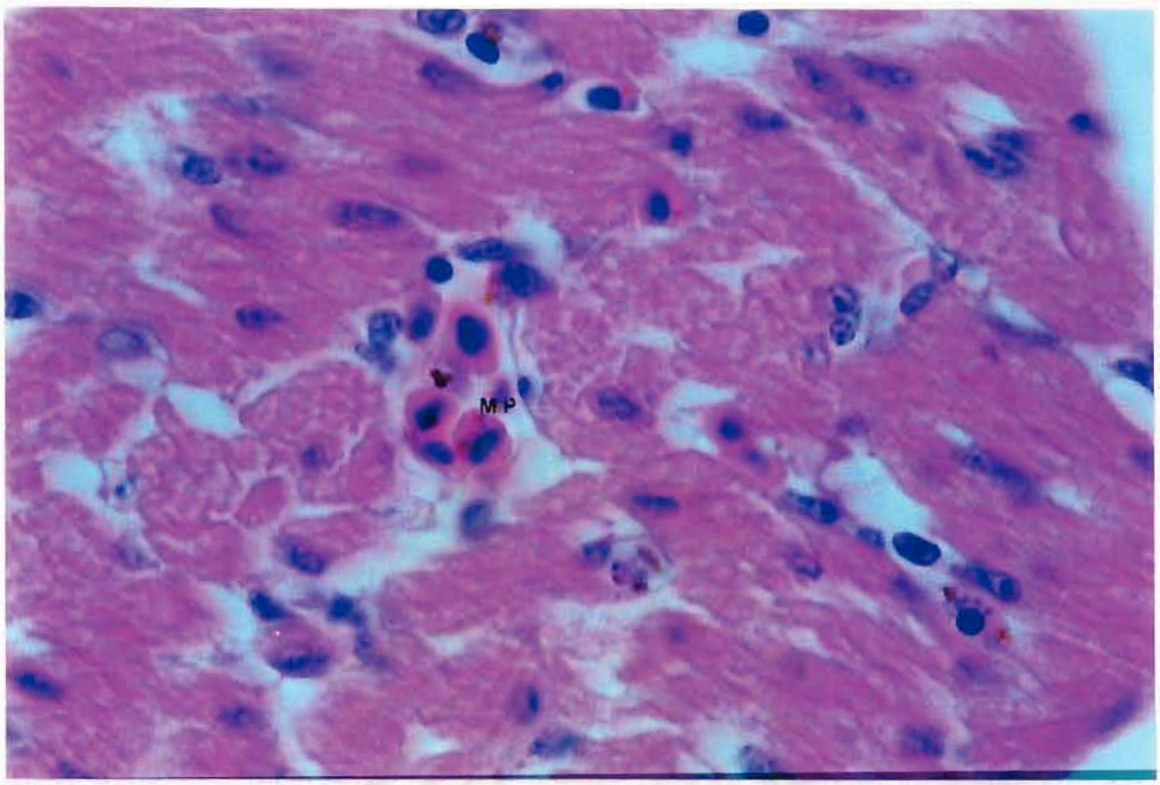
รูปที่ 11 schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* (ศรชี้) ที่ผนังหลอดเลือดฝอยของตับของไก่ทดลองหลังได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า



รูปที่ 12 schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* (SC) และเม็ดสี (MP) ที่อยู่ภายใน Kupffer's cell ของตับของไก่ทดลอง หลังจากได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

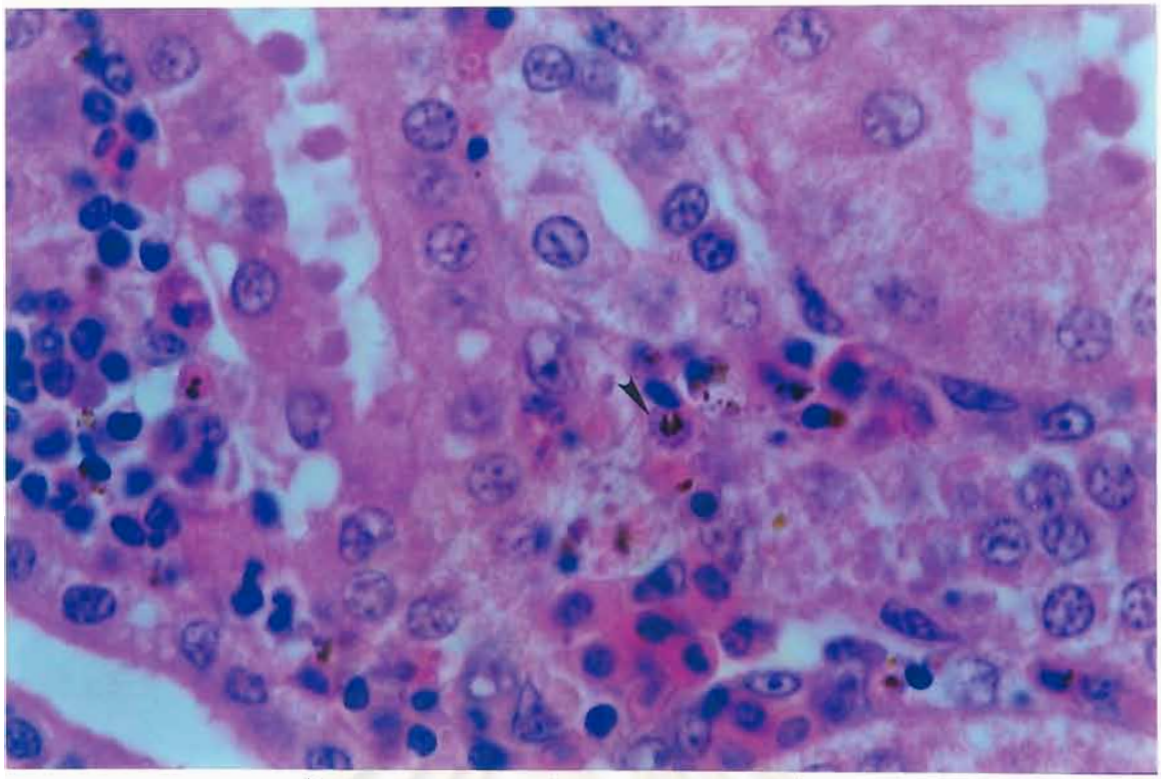


รูปที่ 13 schizonts (SC) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยของม้าม และเม็ดสี (MP) ที่ อยู่ภายใน macrophage พบกระจายทั่วไปในม้ามของไก่ทดลองหลังจากได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า



รูปที่ 14 เม็ดสี (MP) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยของหัวใจของไก่ทดลอง หลังจากได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

รูปที่ 15 schizont (SC) ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยที่สมองของไก่ทดลอง หลังจากได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า



รูปที่ 16 schizont ของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ผนังหลอดเลือดฝอยที่ไตของไก่ทดลองหลังจากได้รับเชื้อ 16 วัน ย้อมด้วยสี H&E ขนาดกำลังขยาย 4,000 เท่า

ตารางที่ 6 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ปรากฏใน ตับ ม้าม หัวใจ สมอง และไต ของไก่กลุ่มทดลองภายหลังการฉีดเชื้อใต้ผิวหนังในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16

อวัยวะ และรอยโรคที่สำคัญ	วันที่ตรวจและเปอร์เซ็นต์ที่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา				
	0	4	8	12	16
1. ตับ					
- schizont	NR	NR	33.33	100.00	100.00
- malarial pigment	NR	NR	33.33	100.00	100.00
2. ม้าม					
- schizont	NR	NR	33.33	100.00	100.00
- malarial pigment	NR	NR	33.33	100.00	100.00
3. หัวใจ					
- malarial pigment	NR	NR	33.33	100.00	100.00
4. สมอง					
- schizont	NR	NR	16.67	33.33	83.33
5. ไต					
- schizont	NR	NR	NR	16.67	83.33

NR (no remarkable lesions) = ไม่พบรอยโรค

4.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P.gallinaceum* ในห้องทดลอง

การทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อระยะที่ไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดงไก่ *P. gallinaceum* ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม ด้วยน้ำยา RPMI1640 ที่มีซีรั่มไก่เป็นอาหารเสริมในสัดส่วนที่แตกต่างกัน จำนวน 5 สูตร ใน 3 บรรยากาศ คือ บรรยากาศที่มี CO_2 5 % บรรยากาศของ candle jar และบรรยากาศที่มี O_2, CO_2, N_2 ในสัดส่วน 2:5:93 เพื่อศึกษาและประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน ติดต่อกัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน ผลปรากฏว่าสามารถประเมินค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA ได้เพียงในระยะ 3 วันแรกเท่านั้น ส่วนในวันที่ 4, 5, 6 และ 7 ของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากสภาพของเม็ดเลือดแดงที่แตก เชื้อไม่มีการเจริญเติบโตและเสื่อมสลายจึงไม่สามารถตรวจนับ และประเมินผลจากแผ่นฟิล์มเลือดบางที่ย้อมสียิมซ่า

บรรยากาศที่ 1 เชื้อ *P. gallinaceum* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในตู้ incubator 37 ^{0}ซ ที่มี 5% CO_2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของเชื้อเป็นดังนี้ ในวันที่ 1 เชื้อที่เลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 7) โดยการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนแปลงของเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และในวันที่ 2 เชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1, 2, 4 และ5 มีการเจริญเติบโตลดลงมากเว้นแต่เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 คือ RPMI + 25% ซีรั่มไก่ เท่านั้นที่เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น สำหรับวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงปรากฏว่าเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เลี้ยงไว้ไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเลยเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของเชื้อในวันที่ 1 และ 2 ($p< 0.05$)

บรรยากาศที่ 2 เชื้อ *P. gallinaceum* ที่เพาะเลี้ยงในบรรยากาศของ candle jar ที่ 37 ^{0}ซ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร พบว่า ในวันที่ 1 เชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 มีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตลดลง เชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 มีค่าเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ส่วนเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 และ 5 ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเชื้อเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มขึ้น ในขณะที่เชื้อที่เพาะเลี้ยงในวันที่ 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตน้อย โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 5 มีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตดีที่สุดในวันแรกเท่านั้น ส่วนเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 3 มีการเจริญเติบโตน้อยมาก

บรรยากาศที่ 3 เชื้อ *P. gallinaceum* ที่เพาะเลี้ยงในตู้ incubator 37 ^{0}ซ ที่มี 2% O_2, 5% CO_2 และ 93% N_2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร พบว่า การเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1- 5 เชื้อมีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ทั้งในวันที่ 1 2 และ 3 โดยที่ในวันที่ 1 เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำยาทุกสูตรมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน ในวันที่ 2 เชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตร ยกเว้น 100% ซีรั่มไก่ มีค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของการ

เจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกัน และในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร ยังมีการเจริญเติบโตสูงใกล้เคียง หรือสูงกว่าวันที่ 1 และ 2 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบภาวะการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 บรรยากาศ ผลปรากฏว่า เชื้อที่เลี้ยงในบรรยากาศที่ 3 นี้มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เพาะเลี้ยงในบรรยากาศและอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร ที่เลี้ยงในบรรยากาศของ candle jar มีค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเชื้อต่ำที่สุด เชื้อที่เพาะเลี้ยงในบรรยากาศของ 2% O_2, 5% CO_2 และ 93% N_2 ที่ 37 ^{o}ซ ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเชื้อสูงสุด ตั้งแต่วันที่ 1-3 สำหรับการเลี้ยงเชื้อในบรรยากาศของ 5% CO_2 ที่ 37 ^{o}ซ นั้น เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรในวันแรก และในวันที่ 2 นั้นเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำยาที่มีเฉพาะ RPMI เท่านั้น

ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงที่ทำให้เชื้อ *P. gallinaceum* ในเม็ดเลือดแดงเจริญเติบโตระยะสั้นได้เป็นเวลา 3 วัน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 3 และ4 ซึ่งมีสัดส่วนของ RPMI ต่อ ซีรั่มไก่ ตั้งแต่ 10: 1-10: 5

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีสัดส่วนของ RPMI และซีรั่มไก่แตกต่างกัน ในบรรยากาศของ CO_2, Candle jar (CJ)และ trigas (TG;2% O_2, 5% CO_2 และ 93% N_2) ที่ 37 ^{o}ซ ติดต่อกันนาน 3 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3		
	CO_2	CJ	TG	CO_2	CJ	TG	CO_2	CJ	TG
RPMI	0.200	-0.165	0.276	-0.065	-0.699	0.223	-0.165	-0.221	0.263
RPMI+10% serum	0.168	-0.065	0.395	0.09	0.211	0.227	-0.047	-0.221	0.305
RPMI+25% serum	0.168	0.02	0.376	0.312	0.138	0.344	0.11	0.079	0.340
RPMI+50% serum	0.340	0.104	0.243	0.068	0.003	0.286	-0.047	-0.393	0.470
100% serum	0.469	0.265	0.386	0.136	-0.164	0.075	-0.365	-0.221	0.213

4.4 การเก็บและถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 °ซ

ผลการเก็บถนอมเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงด้วย cryoprotectants 3 สูตร คือ GS , GLB และPVP แล้วทำการแช่แข็งที่ -196 ° ซ ด้วยวิธี two step cooling method ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานาน 1 และ 3 เดือน เมื่อนำออกมาทำละลาย เพื่อศึกษาสภาพเชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงจากการติดสีและลักษณะรูปร่างของเชื้อ ดังรูปที่ 17, 18, 19 และตารางที่ 8 และศึกษาสภาวะความอยู่รอดของเชื้อโดยการฉีดเข้าไก่ทดลอง ผลปรากฏดังรูปที่ 21, 22 และตารางที่8

ลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อที่เก็บแช่แข็งไว้ในน้ำยา GS นาน 1 และ 3 เดือน เมื่อนำมาทำละลาย พบว่า 82% ของเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (ตารางที่ 8) และเม็ดเลือดแดงที่เหลือเซลล์มีลักษณะบวมน้ำขึ้นเล็กน้อย การติดสีของเม็ดเลือดแดงไม่เปลี่ยนแปลงสำหรับเชื้อ *P. gallinaceum* ที่อยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงมีสภาพปกติทั้งนิวเคลียสและไซโตพลาซึม พบ merozoite จำนวนมากอยู่เป็นอิสระกระจายอยู่ในน้ำเลือด มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน บางเซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลม และบางเซลล์มีลักษณะยาวรีขนาดเล็ก นิวเคลียสติดสีม่วงแดง ไซโตพลาซึมติดสีฟ้าจาง (รูปที่ 17ก. และ ข.)

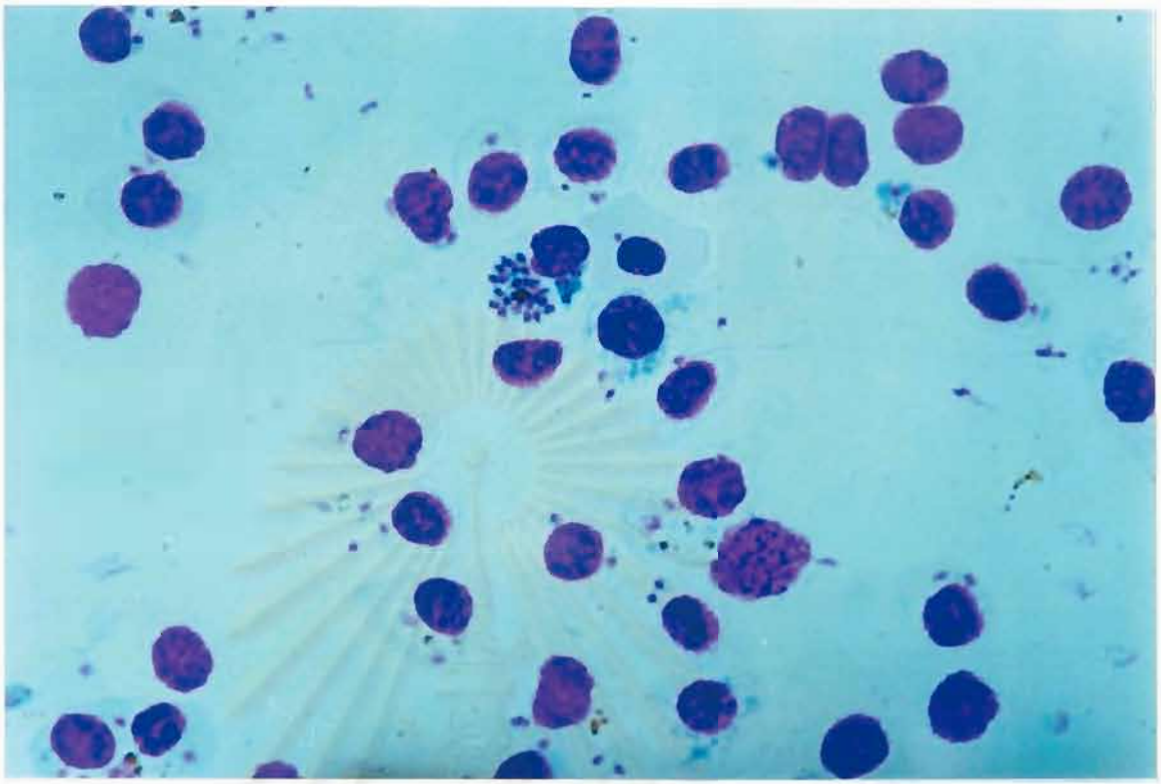
เชื้อ *P. gallinaceum* ดังกล่าว เมื่อนำมาฉีดเข้าไก่ทดลองพบว่า ไก่ที่ได้รับเชื้อซึ่งเก็บถนอมในน้ำยา GS และเก็บแช่แข็งไว้นาน 1 เดือน มีอัตราการติดโรค 20% (2 / 10 ตัว) ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อซึ่งเก็บแช่แข็งไว้นาน 3 เดือน ไม่มีการติดโรคเลย ในขณะที่ไก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อที่ผ่านเข้าสัตว์โดยตรงเป็นระยะๆ มีอัตราการติดโรค 100% (10/10 ตัว) (รูปที่ 20ก.)

ในการศึกษาลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เก็บไว้ในน้ำยา GLB และแช่แข็งที่ –196 °ซ นาน 1 และ 3 เดือน ภายหลังการทำละลาย พบว่ามีเม็ดเลือดแดงแตก 45% และ 55% ตามลำดับ โดยที่ลักษณะรูปร่างและการติดสีของเม็ดเลือดอยู่ในสภาพปกติทั้งนิวเคลียส ไซโตเมมเบรน เชื้อ *P. gallinaceum* ที่อยู่ในไซโตพลาซึม มีลักษณะคล้ายคลึงกัน กับก่อนการเก็บถนอมในน้ำยา GLB และก่อนการแช่แข็งที่ –196 °ซ พบมีเม็ดเลือดแดงแตกจำนวนน้อย เชื้อระยะ merozoite ที่กระจายอยู่นอกเซลล์พบเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 18ก. และ ข. และตารางที่ 8) เมื่อนำเชื้อที่เก็บไว้ 1 และ 3 เดือน นำออกมาทำละลาย แล้วฉีดเข้าไก่ทดลอง ผลปรากฏว่าไก่มีอัตราการติดโรค 100 (10/10 ตัว) และ 60% (6/10 ตัว) ตามลำดับ (รูปที่ 20ข.,ตารางที่ 9)

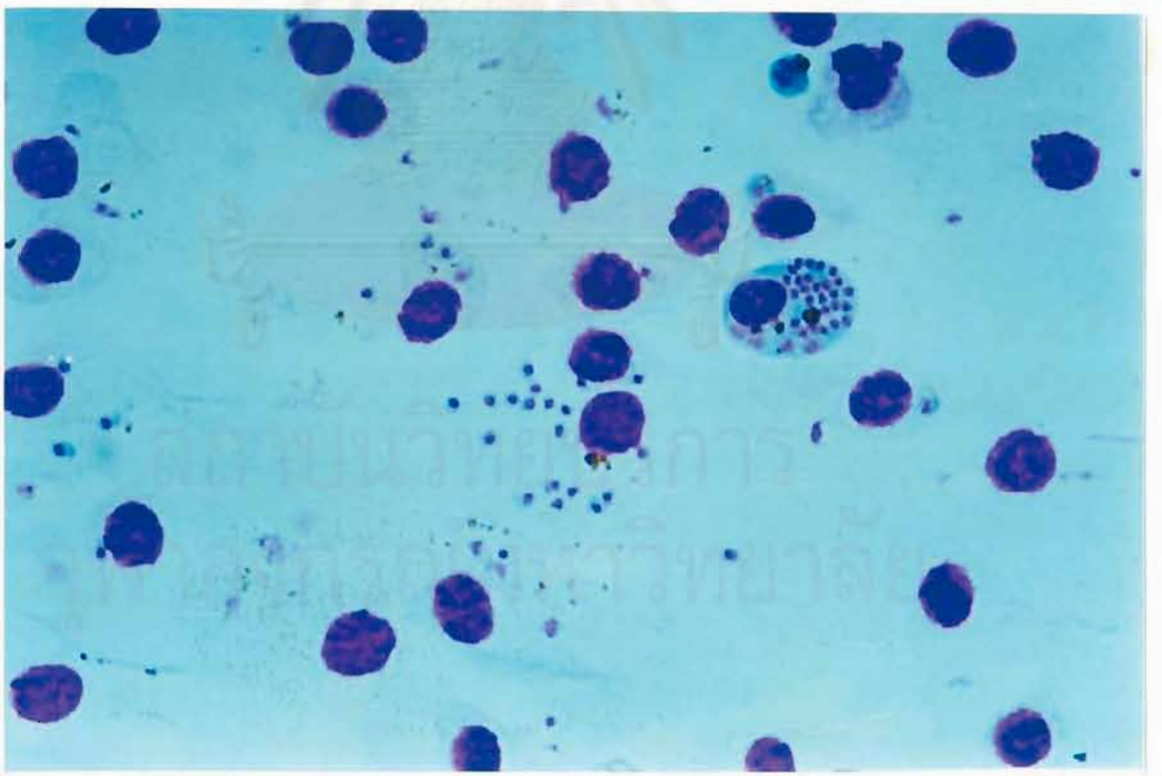
สำหรับรูปร่างลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เก็บไว้ในน้ำยา PVP นาน 1 และ 3 เดือน เมื่อนำมาทำละลายพบว่า 92% และ 98% ของเม็ดเลือดแดงแตก ลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงบิดเบี้ยวผิดปกติไปจากเดิม ไซโตพลาซึมมีขอบเขตไม่ชัดเจน นิวเคลียสติดสีม่วงแดง schizont แตกสลาย merozoites จำนวนมากกระจายอยู่ในน้ำเลือด มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน หรือค่อนข้างกลม ขนาดเล็ก นิวเคลียสติดสีม่วงจาง ไซโตพลาซึมติดสีฟ้าจาง (รูปที่ 19ก.

และ ข. และตารางที่ 8) เมื่อใช้เชื้อที่เก็บไว้ใน PVP นาน 1 และ 3 เดือน นำออกมาทำละลายและฉีดเข้าไก่ทดลอง พบว่า ไม่มีไก่ตัวใดติดเชื้อเลย (รูปที่ 20ค.)

ก.

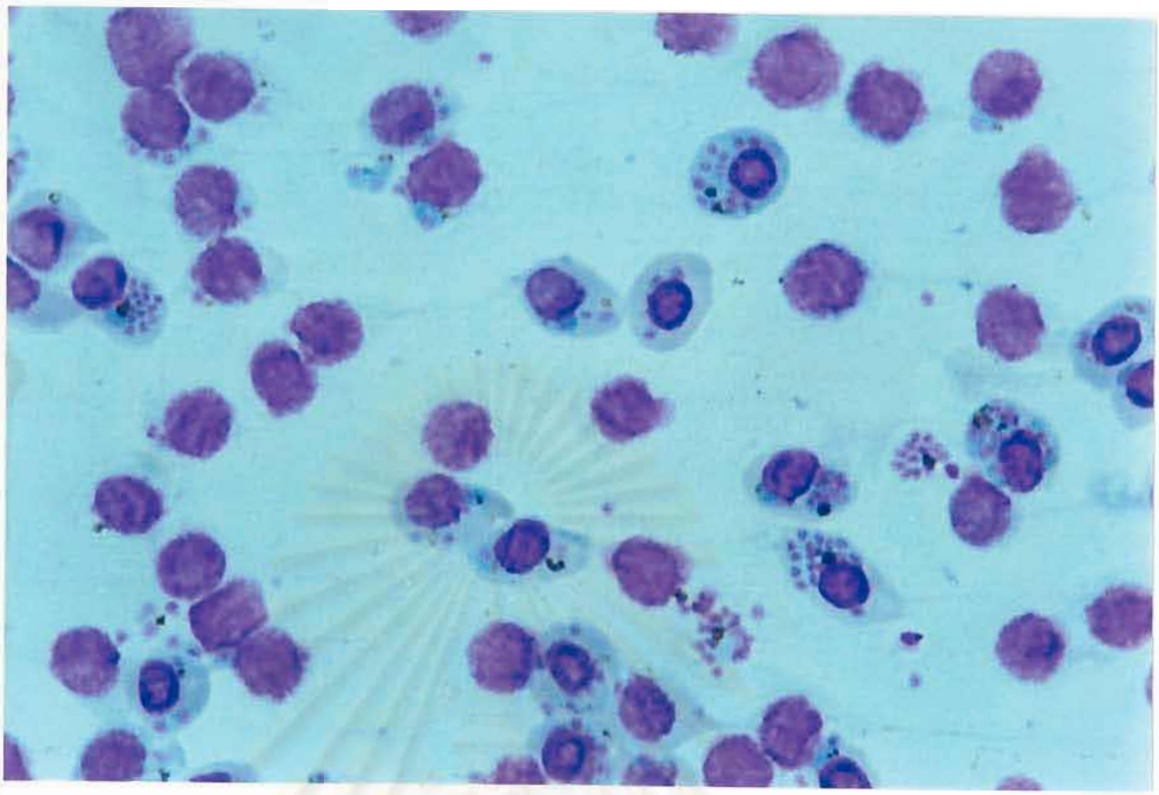


ข.

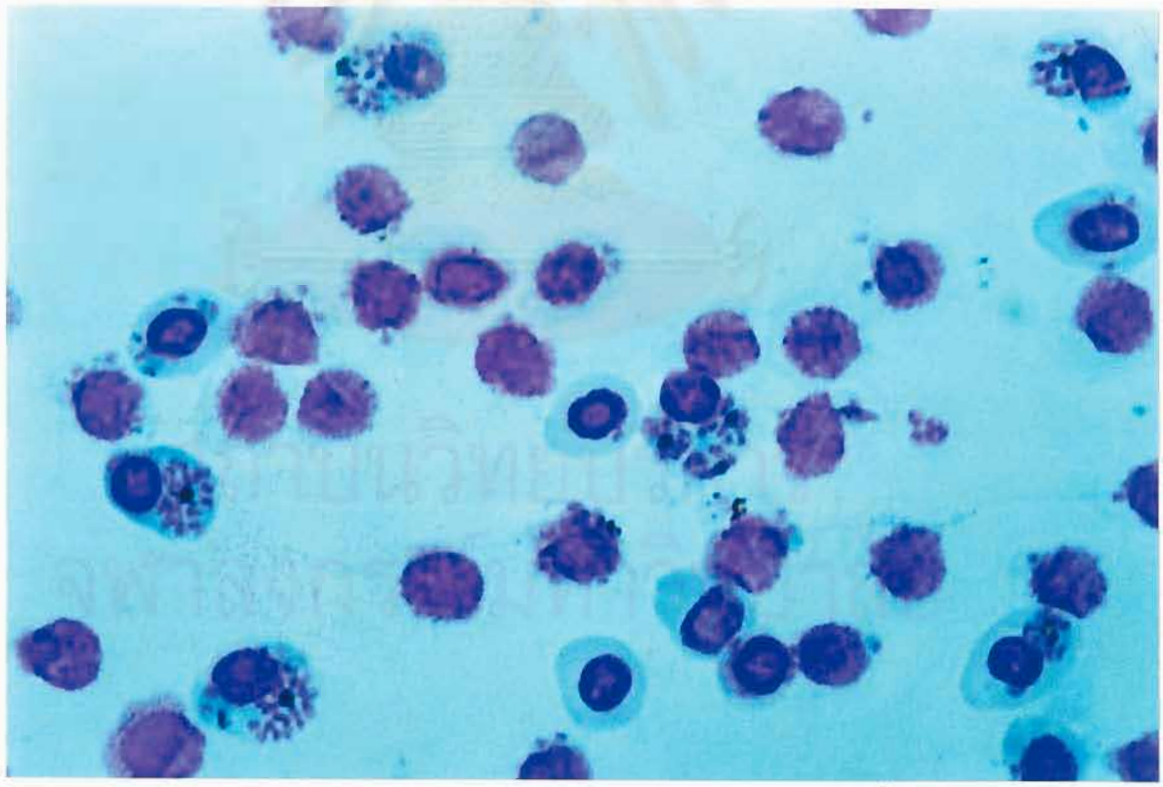


รูปที่ 17 ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ภายหลังจากเก็บแช่แข็งไว้ในน้ำยา ถนอมเชื้อ glycerol- sorbitol (GS) ก.นาน 1 เดือน ข.นาน 3 เดือน

ก.

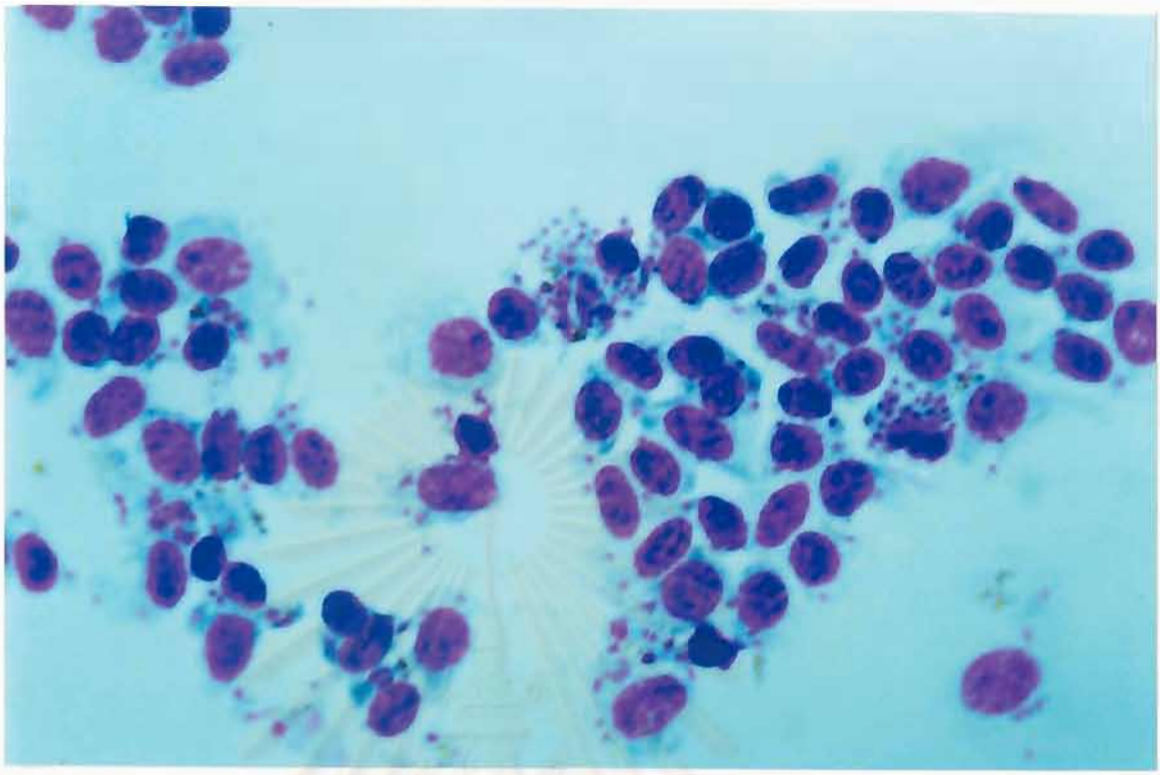


ข.

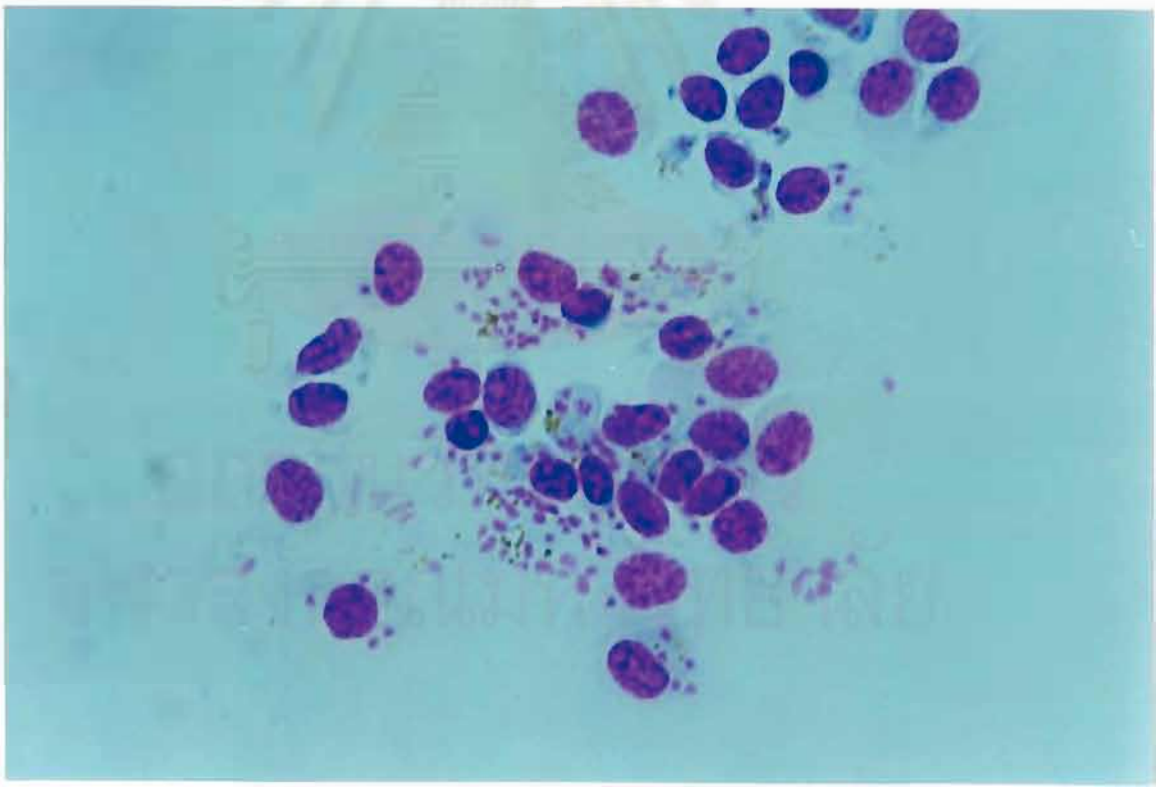


รูปที่ 18 ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ภายหลังจากเก็บแช่แข็งไว้ในน้ำยา ถนอมเชื้อ glycerol-lactate buffer (GLB) ก.นาน 1 เดือน ข.นาน 3 เดือน

ก.



ข.



รูปที่ 19 ฟิล์มเลือดบางที่ย้อมด้วยสียิมซ่า แสดงลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ภายหลังจากเก็บแช่แข็งไว้ในน้ำยาถนอมเชื้อ polyvinyl pyrolidone (PVP) ก.นาน 1 เดือน ข.นาน 3 เดือน

ตารางที่ 8 สภาพของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* จากแผ่นเลือดบางย้อมสียิมซ่า ภายหลังการเก็บถนอมเชื้อไว้ใน cryoprotectants 3 สูตร คือ glycerol-sorbitol (GS), glycerol-lactate buffer (GLB) และ Polyvinyl pyrolidone (PVP) และเก็บแช่แข็งที่ –196 ^{0}ซ นาน 1 และ 3 เดือน

ระยะการเก็บเชื้อในน้ำยาถนอมเชื้อ / ข้อบ่งชี้	GS		GLB		PVP	
	1 เดือน	3 เดือน	1 เดือน	3 เดือน	1 เดือน	3 เดือน
1. %เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis)	82	84	45	55	95	98
2. รูปร่างลักษณะของเม็ดเลือดแดง (ปกติ / ผิดปกติ)	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ไซโตพลาซึมผิดรูปร่าง	ไซโตพลาซึมผิดรูปร่าง
3. การติดสีของนิวเคลียสของ *P. gallinaceum*	ม่วงแดง	ม่วงแดง	ม่วงแดงเข้ม	ม่วงแดงเข้ม	ม่วงแดง	ม่วงแดง
4.การติดสีของไซโตพลาซึมของ *P. gallinaceum*	ฟ้าจาง	ฟ้าจาง	ฟ้า	ฟ้า	ฟ้าจาง	ฟ้าจาง

ตารางที่ 9 จำนวนและอัตราไก่ทดลองที่ติดเชื้อ *P.gallinaceum* ที่เก็บถนอมและแช่แข็งใน cryoprotectants 3 สูตร คือ Glycerol sorbitol (GS), Glycerol- lactate buffer (GLB) และ Polyvinyl pyrolidone (PVP) เป็นระยะเวลา 1 และ 3 เดือน

	Cryoprotectants	ไก่ที่ติดเชื้อหลังจากได้รับเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง			
		1 เดือน		3 เดือน	
		จำนวนตัว	%	จำนวนตัว	%
กลุ่มควบคุม	-	10/10	100	10/10	100
กลุ่มทดลอง	GS	2/10	20	0/10	0
	GLB	10/10	100	6/10	60
	PVP	0	0	0	0

ก.

ข.

ค.

รูปที่ 20 อัตราการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่กลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัว ได้รับเชื้อที่ผ่านเข้าตัวสัตว์ทดลอง และในไก่กลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว และได้รับเชื้อที่ถนอมด้วย cryoprotectants 3 ชนิด และเก็บไว้ที่ -196 ° ซ นาน 1 และ 3เดือน (ก.) Glycerol sorbitol (GS), (ข.) Glycerol- lactate buffer (GLB) และ(ค.) Polyvinyl pyrolidone (PVP)

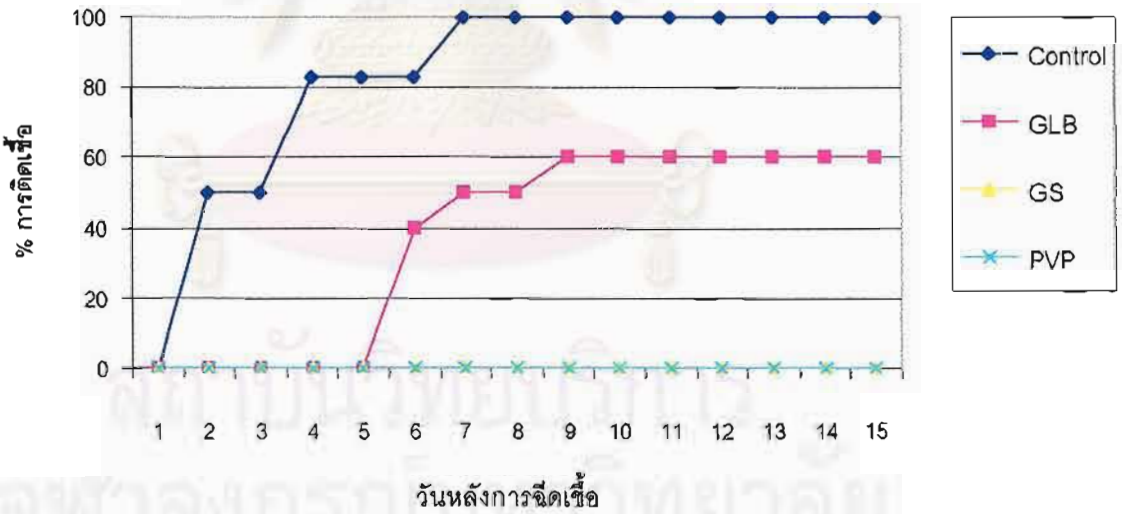
หลังจากเก็บเชื้อ *P. gallinaceum* แช่แข็งใน cryoprotactants 3 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า มีอัตราการอยู่รอด 100% เชื้อซึ่งถนอมไว้ใน GLB ซึ่งประเมินได้จากการที่ไก่ทดลองมีอัตราการติดโรคสูง 100% (10/10 ตัว) โดยเริ่มตรวจพบเพียง 20 % ในวันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อและตรวจพบได้ 100% ในวันที่ 9 ส่วนเชื้อซึ่งถนอมไว้ใน GS มีอัตราการอยู่รอด 20% ซึ่งไก่ที่ได้รับเชื้อมีอัตราการติดโรคเพียง 20% (2/10 ตัว) เชื้อเริ่มตรวจพบได้ 10% ในวันที่ 8 และ 20% ในวันที่ 9 (รูปที่ 21ก.) และเชื้อซึ่งเก็บถนอมไว้ใน PVP มีอัตราการอยู่รอดเป็นศูนย์ ซึ่งไม่มีไก่ที่ติดโรคเลย ภายหลังการเก็บเชื้อเป็นระยะเวลานาน 3 เดือน พบว่า เชื้อซึ่งถนอมไว้ใน GLB มีอัตราการอยู่รอด 60% โดยไก่ที่ได้รับเชื้อมีอัตราการติดโรค 60% (6/10 ตัว) เชื้อเริ่มตรวจพบเชื้อได้ 40% ในวันที่ 6 และ 60% ในวันที่ 9 สำหรับเชื้อซึ่งถนอมไว้ใน GS และ PVP เป็นเวลา 3 เดือนนั้น อัตราการอยู่รอดเป็นศูนย์ ซึ่งพบว่าไม่มีการติดเชื้อในไก่เลย

รูปที่ 21 เปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ที่ได้รับเชื้อแช่แข็งที่เก็บถนอมไว้ใน cryoprotectants 3 สูตร คือ GS, GLB และ PVP และแช่แข็งที่ -196 ° ซ นาน 1 และ 3 เดือน ปรากฏว่า GLB เป็นน้ำยาถนอมเชื้อที่ดีที่สุดสามารถเก็บเชื้อให้คงสภาพมีชีวิตอยู่รอดได้ 100% เป็นเวลา 1 เดือน และ 60% เป็นเวลา 3 เดือน ในขณะที่น้ำยาถนอมเชื้อสูตร PVP ไม่สามารถเก็บถนอมเชื้อ *P. gallinaceum* ได้เลย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.

ข.



รูปที่ 21 เปรียบเทียบ อัตราการติดเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ทดลอง ที่ได้รับเชื้อซึ่งเก็บถนอมด้วย cryoprotectants 3 สูตร GS, GLB และ PVP ที่เก็บถนอมไว้ (ก) นาน 1 เดือน (ข) นาน 3 เดือน

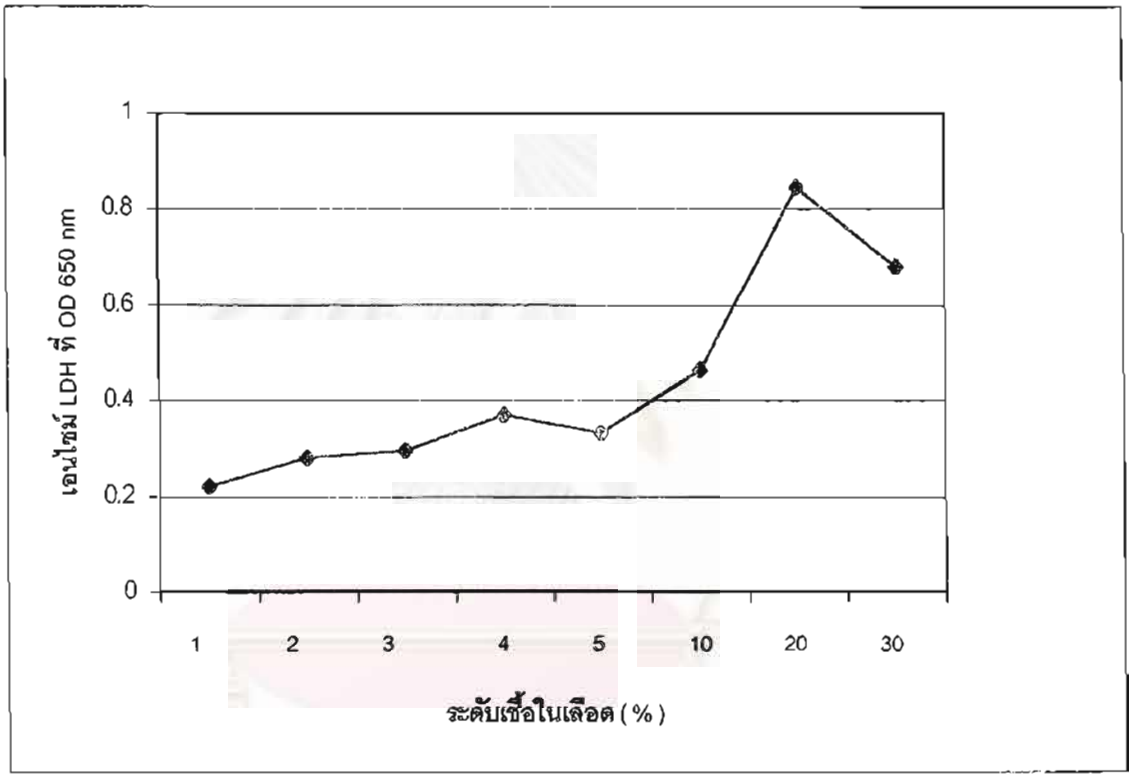
4.5 การศึกษาเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

ตารางที่ 10 ผลการตรวจวัดค่า OD ของเอนไซม์ LDH ของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติในกลุ่มควบคุม และเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ *P. gallinaceum* ในระดับต่างๆของไก่กลุ่มทดลอง ปรากฏว่าเม็ดเลือดแดงของไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ *P. gallinaceum* มีค่า OD ของเอนไซม์ LDH เฉลี่ยเท่ากับ 0.272 ในขณะที่เม็ดเลือดแดงที่มีระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 และ 30 % มีค่า OD ของเอนไซม์ LDH อยู่ในระดับสูง คือ 0.491,0.551, 0.566, 0.642, 0.603, 0.736,1.119 และ0.951 ตามลำดับดังนั้น ระดับ LDH ของเชื้อมีค่า 0.219, 0.279, 0.294, 0.370, 0.331, 0.464, 0.847 และ 0.679 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับ LDH ของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยและพิสัยของเอนไซม์ LDH ของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติในกลุ่มควบคุมและเม็ดเลือดที่มีเชื้อ เชื้อ *P. gallinaceum* ในระดับ 1-30% ในกลุ่มทดลอง โดยวัดค่าที่ OD 650 nm

ระดับเชื้อในเม็ดเลือดแดง (%)	พิสัย	ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน LDH ของ *P. gallinaceum*
0 (กลุ่มควบคุม)	0.258-0.285	0.272±0.01
1	0.442-0.540	0.491±0.06
2	0.441-0.661	0.551±0.15
3	0.554-0.577	0.566±0.02
4	0.615-0.669	0.642±0.04
5	0.552-0.653	0.603±0.07
10	0.651-0.821	0.736±0.12
20	0.966-1.272	1.119±0.21
30	0.862-1.039	0.951±0.12

จากกร๊าฟ (รูปที่ 22) แสดงความสัมพันธ์ของค่าเอนไซม์ LDH และระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ 1-30% แสดงถึงปริมาณของเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P. gallinaceum* มีค่าเป็นสัดส่วนกับปริมาณเชื้อในเม็ดเลือดแดง โดยขณะที่เลือดมีระดับเชื้อต่ำจะมีค่าของเอนไซม์ LDH ต่ำ และเมื่อเลือดมีระดับเชื้อสูงขึ้นค่าเอนไซม์ LDH ก็สูงขึ้นเช่นกัน เป็นเช่นนี้จนกระทั่งเลือดมีระดับเชื้อสูง 20% พบว่า เอนไซม์ LDH มีค่าสูงสุดและต่อมาที่ระดับเชื้อ 30% ค่าเอนไซม์ LDH เริ่มลดต่ำลง แต่ยังคงสูงกว่าระดับเชื้อที่ 10 %



รูปที่ 22 **ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ LDH และระดับเชื้อ *P. gallinaceum* ในเลือดไก่** (%) ที่ OD 650 **nm**

บทที่ 5

วิจารณ์ผลและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของไก่ พบเชื้อระยะต่างๆ 4 ระยะ ที่มีลักษณะแตกต่างกันอย่างเด่นชัด คือ trophozoites schizonts merozoites และ gametocytes ลักษณะ trophozoites ที่พบมี 2 แบบ คือ ระยะแรก มีขนาดเล็กมาก ไม่มีเม็ดสีของมาลาเรีย ไซโตพลาซึมติดสีฟ้าเข้ม นิวเคลียสมีขนาดเล็ก trophozoites ในระยะปลายมีรูปร่างไม่แน่นอน ขนาดโตประมาณ 1-5 เท่า ของระยะแรก นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ มีเม็ดสีของมาลาเรีย ไซโตพลาซึมติดสีฟ้าจาง (รูปที่ 5ข.) ระยะแรกของการติดเชื้อ พบมีเพียง 1 trophozoites อยู่ในไซโตพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่ระดับเชื้อในกระแสเลือดสูง 70% ได้ตรวจพบ 2-3 trophozoites อยู่ภายในเม็ดเลือดแดงเดียวกันเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 5ก.) ซึ่งสองคล้องกับหลายรายงาน (Garnham, 1966; Levine, 1985 และ McGhee, 1988) ในปี 1966 Garnham ศึกษารายละเอียดของเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะไม่มีเพศในเม็ดเลือดแดง พบว่าเชื้อระยะแรกเริ่ม คือ trophozoite มีขนาดเล็ก และไม่มีแวคคิวโอล มักพบอยู่ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดง หรืออาจอยู่ด้านข้างก็ได้ ในระยะแรกเชื้อจะอยู่ติดกับนิวเคลียส เมื่อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจะมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน และมีการสะสมเม็ดสีของมาลาเรีย 4-5 เม็ด เกิดขึ้นที่ส่วนปลายของเชื้อและ Levine (1985) ได้รายงานว่าอาจพบเชื้อได้ถึง 10 trophozoites อยู่ในไซโตพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงเดียว นอกจากนี้ McGhee (1988) กล่าวว่า ระยะ trophozoites ของ *P. gallinaceum* แตกต่างจาก *พลาสโมเดียม* ในคน คือ ไม่พบระยะ ring form

trophozoites ที่มีการเจริญเติบโตมากขึ้น จะเข้าสู่ระยะ schizonts โดยนิวเคลียสแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว บางครั้งจะเห็นแวคคิวโอลอยู่ในไซโตพลาซึม สำหรับ schizonts ที่พบในการศึกษาในครั้งนี้มีขนาดแตกต่างกัน ตั้งแต่ 6.83-12.68 ไมครอน มักพบ 1 schizont ต่อ 1 เม็ดเลือดแดงโดยสังเกตเห็นเม็ดสีของมาลาเรียเพียงกระจุกเดียวตรงกลาง (รูปที่ 6) ในระยะที่ระดับเชื้อในกระแสเลือดขึ้นสูง พบว่าในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงบางเซลล์มี 2 schizonts โดยสังเกตเห็นเม็ดสีมาลาเรีย มี 2 กระจุก (รูปที่ 6ค.) Garnham (1966) รายงานว่า schizonts เป็นระยะที่กำลังมีการเจริญเติบโต นิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงยังคงอยู่ในตำแหน่งเดิมจนกระทั่งเมื่อ schizonts เจริญเต็มที่ก็จะเบียดนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไปข้างใดข้างหนึ่ง และภายใน schizonts ประกอบด้วย merozoites ที่มีขนาดและจำนวนแตกต่างกัน ตั้งแต่ 16-20

merozoites และมีเม็ดสีอยู่ตรงกลาง Levine (1985) รายงานว่าจำนวน merozoites ของ *P. gallinaceum* ใน 1 schizont อาจมีจำนวนสูงสุด 30 merozoites

สำหรับเชื้อระยะ gametocytes ในการศึกษานี้ ได้ตรวจพบว่ามีอยู่ในกระแสเลือดค่อนข้างน้อยไม่เกิน 3% โดยเริ่มพบในวันที่ 5 หลังจากไก่ได้รับเชื้อ และยังคงตรวจพบได้ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำกระทั่งไก่ตาย สัดส่วนของ macrogametocytes และ microgametocytes มีปริมาณใกล้เคียงกัน บางครั้งพบ มี gametocytes ทั้ง 2 เพศอยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงเซลล์เดียวกัน ในขณะที่ Garnham (1966) รายงานว่า สามารถตรวจพบ เชื้อระยะ gametocytes ได้ตั้งแต่ในวันแรก พร้อมกับที่ตรวจพบเชื้อในระยะที่ไม่มีเพศ ลักษณะของ gametocytes โดยในระยะแรกจะเห็นลักษณะเป็น solid body ที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็น microgametocytes หรือ macrogametocytes และบางครั้งไม่สามารถแยกออกจากระยะไม่มีเพศได้ แต่เมื่อเชื้อเริ่มเจริญเติบโตมากขึ้นเริ่มสังเกตเห็นนิวเคลียสมีเพียง 1 นิวเคลียส ซึ่งแตกต่างจากระยะ schizonts ที่มีการแบ่งตัวของนิวเคลียสให้เห็น ลักษณะรูปร่างของ gametocytes ของเชื้อ *P. gallinaceum* จะแปรผันตามตำแหน่งของนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง ถ้าเชื้อเจริญเติบโตได้เร็ว เชื้อจะโอบล้อมนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงทำให้มีลักษณะคล้ายหูโทรศัพท์ แต่สิ่งที่เป็นลักษณะเฉพาะของ gametocytes คือ มีลักษณะกลม หรือ รี ขนาดใหญ่จนกระทั่งดันนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงให้ไปชิดอยู่ขอบเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Levine (1985) ที่กล่าวว่า gametocytes ของ *P. gallinaceum* มีลักษณะกลมสามารถตรวจวินิจฉัยได้จากฟิล์มเลือดบางย้อมสี นิวเคลียสจะถูกดันไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์เม็ดเลือดแดง gametocytes มีขนาด 8-9 ไมครอน ไซโตพลาซึมของ microgametocytes มีสีฟ้าจาง นิวเคลียสกระจาย มีเม็ดสีจำนวนมากขนาดแตกต่างกัน ไซโตพลาซึมของ macrogametocytes มีสีฟ้าเข้มและมีแวคคิวโอลจำนวนมาก นิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอนขนาดเล็กกว่าของ microgametocytes เม็ดสีจะอยู่เป็นกลุ่มก้อน เม็ดโตแต่มีจำนวนน้อย ขนาดใกล้เคียงกัน ปริมาณของ gametocytes ในกระแสเลือดขึ้นๆลงๆ แม้ว่าระดับเชื้อทั่วไปในกระแสเลือดจะคงที่ ในสัตว์ปีกที่อายุมากสัดส่วนของเชื้อระยะมีเพศจะต่ำกว่าเชื้อระยะไม่มีเพศ สามารถพบได้ 1-2 % แต่สัดส่วนนี้จะสูงขึ้นในสัตว์ปีกที่อายุน้อยและเป็นโรคแบบเฉียบพลัน

การศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อมาลาเรียไก่ isolate หนองจอก/2539 ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยครั้งนี้ ยังศึกษาได้ไม่ละเอียดมากนัก อย่างไรก็ตามจากลักษณะรูปร่างที่ทำการบันทึกไว้ร่วมกับการศึกษาทางอนุชีวโมเลกุลของ ทวี (2543) ที่ได้นำเชื้อมาลาเรียไก่จากแหล่งที่มีการระบาดแตกต่างกัน 3 แหล่ง รวมทั้ง isolate ที่ได้จากหนองจอกมาทำการตรวจหาลำดับเบส วิเคราะห์

และประเมินผลพบว่า เชื้อที่มีการระบาดอยู่นี้เป็นเชื้อ *P. gallinaceum* เช่นเดียวกับที่ ทัศนีย์และคณะ (2539) ได้รายงานและสรุปไว้คร่าวๆจากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อที่ตรวจพบเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.2538

ผลการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการติดโรค ระดับเชื้อในกระแสเลือด และความก่อโรค ของเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่เนื้อ อายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว ที่ได้รับเชื้อปริมาณ $5x10^4$ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังไก่ (ตารางที่ 2) ไก่ที่ได้รับเชื้อมีอัตราการติดโรค 100% (30/30 ตัว) ในวันที่ 9 หลังจากได้รับเชื้อ โดยที่เชื้อ *P. gallinaceum* พบได้ในกระแสเลือดเป็นครั้งแรกในวันที่ 4 12.5% (3/24 ตัว) และเชื้อมีระดับที่ค่อนข้างต่ำเพียง 0.001 ถึง 0.002% เชื้อที่พบในกระแสเลือดมีระดับสูงสุดในวันที่ 14 เฉลี่ย 81.67% และระดับเชื้อเริ่มลดลงในวันที่ 15 และ 16 นอกจากนี้ในวันที่ 13 ระดับเชื้อที่ปรากฏในกระแสเลือดของไก่ทดลองจำนวน 1 ตัว ขึ้นสูงมากถึง 92% สำหรับการตายของไก่ทดลอง เริ่มพบได้ ในวันที่ 10 หลังจากที่ได้รับเชื้อ 8.33% (1/12 ตัว) และไก่ตายมากที่สุดในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันที่สิ้นสุดการทดลอง จึงไม่ทราบว่าไก่ตาย 100% หรือไม่และในวันที่เท่าไร

van Riper III *et al.* (1994) รายงานว่าหลังจากที่ไก่ได้รับเชื้อมาลาเรีย การก่อโรคที่เกิดขึ้นมี 3 ระยะ คือ ระยะแรก pre-patent period หรือระยะฟักตัว ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเข้าไปฟักตัวเจริญเติบโต อยู่ใน pre exoerythrocytic stage (PEE) ประมาณ 2-3 วัน และต่อมาคือ patent period เป็นระยะที่เชื้อก่อให้เกิดอันตรายในตัวสัตว์ ในระยะแรกๆจะตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ในระดับต่ำ ก่อนที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนพบได้ในระดับสูงสุด หลังจากเชื้อเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดแล้วในระยะสุดท้าย sub-patent period เชื้อที่ปรากฏในกระแสเลือดจะมีระดับลดลง จนกระทั่งในบางครั้งอาจตรวจไม่พบเชื้อเลยตลอดไป โดยที่สัตว์จะฟื้นตัวและมีอาการปกติ อย่างไรก็ตามในบางครั้งเชื้ออาจปรากฏได้ใหม่ในกระแสเลือดและอาจทำอันตรายต่อสัตว์ได้อีกแม้ว่าจะไม่รุนแรงเท่าเดิมและเชื้อที่ปรากฏตัวในครั้งนี้มีระดับต่ำกว่าครั้งแรกก็ตาม (McGhee, 1988)

ระยะฟักตัวของเชื้อมาลาเรียไก่ใช้เวลานาน 2.7-9 วัน ขึ้นอยู่กับวิธีการติดโรค ถ้าเกิดจากยุงกัดก็จะใช้เวลานานกว่าการติดโรคโดยการฉีดเชื้อเข้าตัวสัตว์ (van Riper III *et al.*,1994) Huff (1952) ได้ทดลองปล่อยให้ยุงที่มี sporozoites ของเชื้อ *P. gallinaceum* กัดไก่ทดลองจำนวนหนึ่ง พบว่า เชื้อเริ่มปรากฏในกระแสเลือดในวันที่ 4 และระดับเชื้อเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 20 เท่า ในวันที่ 8 โดยเมื่อระดับเชื้อในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ประมาณ 35% ไก่จึงเริ่มตาย และจากการศึกษาของ Greenberg และ Trembly (1953) ทดลองใช้ sporozoites ของเชื้อ *P. gallinaceum* นำมาฉีดเข้าไก่ ได้ตรวจพบระดับเชื้อในกระแสเลือดในวันที่ 7 (5/7 ตัว) ไก่เริ่มตาย ในวันที่ 10 และตาย

ทุกตัวในวันที่ 12 Soni and Cox (1974) ศึกษาเชื้อ *P. gallinaceum* ในไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อโดยการฉีดปริมาณ 10^8 และ 10^6 พบว่าเชื้อปริมาณ 10^8 ทำให้เกิดโรคมาลาเรียในไก่แบบเฉียบพลัน ระดับเชื้อในกระแสเลือด สูง 70% ในวันที่ 4 และไก่เริ่มตายในวันที่ 6 ส่วนไก่ที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^6 ตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้ในวันที่ 3 และระดับเชื้อขึ้นสูงสุดในวันที่ 9 ต่อมาเชื้อก็เริ่มลดลง ดังนั้นปริมาณเชื้อที่ไก่ได้รับจึงมีความสำคัญต่อช่วงเวลาของระยะฟักตัว ระดับเชื้อในกระแสเลือด อัตราการป่วยและตายที่เกิดจากโรคมาลาเรีย สำหรับในประเทศไทย การศึกษาที่ผ่านมามีรายงานเฉพาะความเสียหายที่เกิดขึ้นในไก่ โดย ชัยศิริ และคณะ (2539) รายงานการระบาดขึ้นในฟาร์มไก่เนื้ออายุ 24-68 วัน ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ไก่ที่ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมีอัตราการป่วย 24.19% อัตราการตาย 19.22% ต่อมา ปิยนุช (2541) ได้รายงานการเกิดโรคมาลาเรียขึ้นในฟาร์มไก่ไข่เป็นครั้งแรก ซึ่งมีการติดโรคตามธรรมชาติ พบว่าไก่ป่วย มีอัตราการติดโรค 36 % อัตราตาย 20% ดังนั้น การทราบถึงภาวะการติดเชื้อในไก่ทดลองจึงอาจจะนำมาใช้เป็นข้อมูลของโรคนี้ได้

จากผลการทดลองเกี่ยวกับสภาวะการก่อโรคครั้งนี้ นอกเหนือจากระยะฟักตัวของเชื้อ ระดับเชื้อในกระแสเลือด และอัตราการตายแล้ว ยังได้เลือกตัววัดอื่นบางตัวที่คาดว่าสำคัญ เช่น อาการไข้จากการตรวจวัดอุณหภูมิร่างกาย ภาวะเลือดจางจากค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น อาการซึมขี้เขียว รอยโรคที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า และการกระจายของเชื้อที่สังเกตได้ในทางจุลพยาธิวิทยา

อุณหภูมิร่างกายของไก่กลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมที่วัดได้ทุกตัวทุกวัน อยู่ในเกณฑ์ปกติ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 40.6 - 42.5 ^{o}ซ โดยมีค่าที่ผันแปรเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับ Levine (1985) ที่กล่าวว่า อุณหภูมิร่างกายของสัตว์ปีกที่ได้รับเชื้อป่วยมีอุณหภูมิไม่แน่นอนแต่อยู่ในเกณฑ์ปกติ Soni and Cox (1974) ได้ทดลองฉีดเชื้อ *P. gallinaceum* ในปริมาณ $5X10^8$ พบว่า ในระยะ 2-3 วัน ไก่ที่ได้รับเชื้อมีไข้สูงอุณหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ ในวันที่ 4-5 ไก่เริ่มมีอุณหภูมิร่างกายลดต่ำลงกว่าปกติ ซึ่งแตกต่างกับโรคมาลาเรียในคน ที่พบว่า อุณหภูมิร่างกายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเกิดในช่วงเวลาเดียวกับการแตกของเม็ดเลือดแดง (Soulsby,1982)

สำหรับภาวะโลหิตจางของไก่ที่ได้รับเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ไก่ 0.28% (5/18 ตัว) PCV มีค่าต่ำกว่าปกติ (PCV<20%) ในวันที่ 8 และทุกตัวมีค่าต่ำกว่าปกติในวันที่ 14 (ตารางที่ 3) โดยสามารถสังเกตเห็นว่าไก่มีหงอนซีด ซึ่งสอดคล้องกับ ปิยนุช (2541) ที่รายงานว่าไก่ป่วยที่ตรวจพบเชื้อมีค่า PCV ระหว่าง 8-14% โดยมีค่าเฉลี่ย 11.6% สาเหตุของการเกิดภาวะเลือดจาง Soni และ Cox (1975 a) และ Greenwood *et al.* (1978) ศึกษาเกี่ยวกับภาวะเลือดจางของโรคมาลาเรียไก่และรายงานว่าเกิดจาก 2 สาเหตุหลัก คือ เกิดจากเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อถูกทำลายโดย

ตรง โดยเฉพาะเชื้อในระยะ schizogony และการเกิดจากเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจกินเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติเข้าไปด้วย (erythrophagocytosis) โดยที่การทำลายเม็ดเลือดแดงจะแปรผันตามปริมาณเชื้อในกระแสเลือด นอกจากนี้การติดเชื้อเป็นเวลานานก็อาจจะทำให้ไขกระดูกไม่สามารถผลิตเม็ดเลือดแดงทดแทนได้ รวมทั้งเม็ดเลือดแดงมีลักษณะเปราะบางแตกง่ายกว่าปกติ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพในน้ำเลือด (van Riper III *et al.*,1994)

Soulsby (1982) กล่าวว่า ไก่ที่ไวต่อเชื้อ *P. gallinaceum* มีอัตราการตายสูงถึง 80% โดยความรุนแรงและสาเหตุที่ทำให้ไก่ตายมักเกิดจากภาวะเลือดจางอย่างรุนแรง ส่วน Levine (1985) กล่าวถึงโรคนี้ว่า อาการทางคลินิกของไก่ที่ได้รับเชื้อจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ ถ้าเชื้อรุนแรงมากไก่แสดงอาการป่วย เช่น ไม่มีแรง ขนหยอง อุจจาระสีขาว ภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง พยาธิสภาพที่เกิดหลักๆมักเกิดกับระบบหมุนเวียนโลหิต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ภาวะเลือดจางอย่างรุนแรง ค่า PCV < 20% ก่อนตายจะน้ำหนักลดลง ในรายที่เป็นโรคแบบเฉียบพลันมีอาการ คอบิด ขนหยอง และอาการของโรคยังอาจผันแปรตามชนิดของสัตว์ได้ด้วย

ในประเทศไทย ปิยนุช (2541) ได้รายงานอาการสำคัญของไก่ที่ป่วยด้วยโรคมาลาเรียไก่ในฟาร์มไก่ไข่ ได้แก่ ขี้เขียว ซึม ขาไม่มีแรง เลือดจางอย่างรุนแรง ท้องมาน บวมใต้ผิวหนัง และตาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบภาวะเลือดจางตามที่ได้กล่าวมาแล้ว และพบอาการซึมและขี้เขียวได้เช่นกัน (ตารางที่ 3) สำหรับอาการขาไม่มีแรง อัมพาต ท้องมาน หรือบวมน้ำนั้นไม่ปรากฏในไก่ทดลองตัวใด การที่ไก่แสดงอาการขี้สีเขียวเนื่องมาจากมีการทำลายเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นจะไปมีผลต่อ bilirubin ซึ่งจะไปมีผลต่อการเพิ่มของ urobillinogen ในขี้ไก่ (Weathrall and Bruch , 1985)

ในการผ่าซากเพื่อศึกษารอยโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. gallinaceum* ไก่กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ16 หลังจากได้รับเชื้อ รอยโรคที่เห็นได้ด้วยตาเปล่าตามอวัยวะภายในปรากฏอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 12 โดยพบว่า ตับและม้ามมีสีดำคล้ำ และในวันที่ 16 ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการทดลอง พบ ม้ามโต ตับและม้ามมีสีดำคล้ำ ถุงหุ้มหัวใจมีของเหลวคั่ง เยื่อหุ้มสมองมีเลือดคั่ง และไตมีลักษณะบวมน้ำ ซึ่งสองคล้องกับการรายงานของ McGhee (1988) พบว่า ทั้งตับและม้ามมีขนาดใหญ่ สีคล้ำ ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ ม้ามของไก่กลุ่มทดลองมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบม้ามของกลุ่มควบคุม แต่ขนาดของตับไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม van Riper III *et al.*(1994) พบว่าไก่ที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรียอย่างรุนแรงพบว่าจะมีการขยายเพิ่มขึ้นของม้าม 20 เท่า มีลักษณะเปื่อยยุ่ย พบเนื้อตายเกิดขึ้นม้ามมีการขยายใหญ่เนื่องจากมีขบวนการ phagocytosis เพิ่มมากขึ้น

สำหรับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของการศึกษาในครั้งนี้ได้มุ่งเน้นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อในอวัยวะภายในที่สำคัญ โดยเฉพาะ ตับและม้ามพบ schizonts อยู่ที่ผนังหลอดเลือดฝอยและเม็ดสีของมาลาเรียอยู่ภายในแมคโคฟาจ ไต และสมองพบ schizonts อยู่ที่ผนังหลอดเลือดฝอย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rigdon (1945) ทำการศึกษาการติดเชื้อ *P. lophurae* ในเป็ด พบว่า เซลล์ของม้ามมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเช่นเดียวกับ ตับมีแมคโคฟาจ (kupffer cell) ที่เก็บกินเม็ดสี (malarial pigment) เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ Huff (1952) ได้ทำการศึกษาการกระจายของเชื้อ *P. gallinaceum* ในเนื้อเยื่อต่างๆ สามารถพบการกระจายได้ใน ไต หัวใจ ปอด ตับ ม้าม สมอง อัณฑะ ลำไส้ และไธมัส โดยพบได้มากสุดใน ไต หัวใจ ปอด ตับ ม้าม พบได้ปานกลางในสมองและพบได้น้อยที่ อัณฑะ ลำไส้ และไธมัส ทัศนีย์และคณะ (2539) รายงานผลทางจุลพยาธิสภาพของไก่ที่ป่วยเป็นโรคมาลาเรียพบการเสื่อมแบบ centrilobular degeneration ที่ตับ hyperplasia ของ red pulps ที่ม้าม เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออัดแน่นอยู่ในหลอดเลือดฝอยในสมอง และ ภายในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงพบ schizonts อยู่ภายใน Soni และ Cox (1974) รายงานว่าไตอักเสบเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคมาลาเรียไก่โดยได้ทดลองฉีดเชื้อ*P. gallinaceum* เข้าไปและพบว่าเกิด การอักเสบที่ glomerulus mesengial cells เพิ่มขึ้นและมีการขยายใหญ่ของส่วน endothelial cell ของ glomerular tuff

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะไม่มีเพศที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของไก่ที่มีระดับเชื้อ 1-5% ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน ในถาดหลุม ภายใต้สภาวะของอุณหภูมิ 37 ^{0}ซ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของ RPMI 1640 และซีรั่มไก่แตกต่างกัน และในบรรยากาศที่มีสัดส่วนของ O_2, CO_2, N_2 แตกต่างกัน (ตารางที่ 7) โดยประเมินความอยู่รอดของเชื้อจากลักษณะรูปร่างของเชื้อและระดับเชื้อจากแผ่นเลือดบางย้อมสียิมซ่า ผลปรากฏว่ายังไม่สามารถเลี้ยงเชื้อได้เป็นที่น่าพอใจ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะบางประการที่ใช้เลี้ยงอาจไม่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยทั่วไปอุณหภูมิร่างกายของไก่ปกติอยู่ในช่วง 40.5-41.5 ^{0}ซ และมีเกณฑ์เฉลี่ย 41 ^{0}ซ ดังนั้นอุณหภูมิที่ 37 ^{0}ซ จึงอาจทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงและเชื้อ *P. gallinaceum* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ van Riper III *et al.* (1994) กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียในสัตว์ปีกเป็นเรื่องยาก เนื่องจากอาหารที่ต้องการมีความซับซ้อนกว่า และสภาวะแวดล้อมของเม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีกแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงยากที่จะทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง Trager (1987) ได้เพาะเลี้ยง *P. lophurae* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียของสัตว์ปีกอีกชนิดหนึ่ง ที่ 40 ^{0}ซ พบว่า เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้นานหลายสัปดาห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ประกอบด้วย เกลือ สาร

สกัดของเม็ดเลือดแดง โปรแตสเซียมที่มีความเข้มข้นสูง รวมทั้ง กลูโคส ซีรั่ม chick embryo extract, glutathione และcalcium pantothenate โดยคาดว่าสารดังกล่าวมีความสำคัญและจำเป็นมากต่อการอยู่รอดของเชื้อ สำหรับเชื้อ *P. gallinaceum* Hawking (1945) ทดลองเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง พบว่า ที่อุณหภูมิ ที่ 37 °ซ ให้ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 41 °ซ แต่การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้อุณหภูมิที่ 37 °ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *P. falciparum* คือ ช่วง 37- 38 °ซ (Trager and Jensen,1976: Basco *et al.*,1995) จึงอาจเป็นปัจจัยหลักปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การเพาะเลี้ยงไม่เป็นผลสำเร็จ นอกจากนี้ Hawking (1945) พยายามเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* โดยทำการเพาะเลี้ยงในขวดคนโทขนาดเล็ก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประกอบด้วย ซีรั่มไก่ 1 ส่วน ส่วนที่สกัดได้จากเม็ดเลือดแดงอีก 1 ส่วนและอีก 2 ส่วน จาก Trager's solution ซึ่งประกอบด้วย glutathione 2% ผลการทดลองพบว่า เชื้อสามารถคงสภาพอยู่ได้เป็นเวลา 2 วัน สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงในครั้งนี้เพาะเลี้ยงในจานหลุมขนาด 24 หลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. gallinaceum* ที่ประกอบด้วย RPMI และซีรั่มไก่ในสัดส่วน 3: 1 ให้ผลการมีชีวิตรอดเพียง 3 วันเท่านั้น

การเตรียมซีรั่มพบว่ามีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียเช่นกัน Hawking (1945) กล่าวว่าซีรั่มที่เตรียมจากลูกไก่จะให้ผลการเพาะเลี้ยงไม่ดีเท่ากับซีรั่มที่เตรียมจากไก่โต Jansen *et al.* (1979) พบว่า ความเข้มข้นของซีรั่มมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ ปรสิตบางชนิด นอกจากนี้ ซีรั่มที่ใช้เพาะเลี้ยงมาลาเรียของคน Ramos *et al.* 1988 ได้พัฒนาการใช้ ซีรั่มของม้าและวัว ทดแทนการใช้ซีรั่มคนได้ดีในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* โดยเฉพาะซีรั่มของม้า สำหรับซีรั่มวัว เชื้อจะเจริญเติบโตได้น้อยกว่าจึงต้องเติม glucose-peptone เพิ่ม Trager and Jansen ,1977 กล่าวว่าการเปลี่ยนน้ำยาโดยปกติควรเปลี่ยน 1 ครั้งต่อ วัน กรณีที่ระดับเชื้อเพิ่มมากกว่า 5% ควรเปลี่ยน 2-3 ครั้ง ต่อ วัน Osisany *et al.* 1981 แนะนำว่าการเปลี่ยนน้ำยาอาจลดจำนวนลงได้แต่ต้องเพิ่มกลูโคสและใช้ TES buffer แทน Siddigui and Schnell (1973) ใช้บัฟเฟอร์ 4 ชนิด คือ glycylglycine, BES, TES และ HEPES สำหรับเพาะเลี้ยง *P. knowlesi* และ *P. falciparum* จากการศึกษาพบว่าการใช้บัฟเฟอร์สามารถคงสภาพเชื้อได้นาน 12 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงในบัฟเฟอร์ พบว่า TES ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุด ใน 48 ชั่วโมงดีที่สุด และให้ผลสูงกว่า HEPES โดยเชื้อ ระยะ ring จะเจริญไปเป็น mature trophozoite และ schizont

โดยทั่วไปเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง จะเมตาโบไลท์กลูโคสไปเป็น lactic acid สูงกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ เพราะฉะนั้นการรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างจึงจำเป็นอย่างยิ่ง ระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.3-7.5 จำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญในหลอดทดลองโดยทั่วไป ความสำเร็จใน

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ต้องการสารละลายที่ทำให้เกิดความสมดุลในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเชื้อเปลี่ยนแปลงกลูโคสไปเป็น lactate อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ATP เป็นสิ่งที่เชื้อต้องการเมื่ออยู่นอกเซลล์ ถ้าอยู่ในเซลล์ เชื้อจะใช้ ATP ของ เม็ดเลือดแดง ดังนั้น เม็ดเลือดแดง ก็จำเป็นต้องมีพลังงานโดยขบวนการ glycolysis พบว่า เชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง มี glycolysis สูง 25 เท่า การที่จะคุมระดับความเป็นกรด-ด่าง จำเป็นต้องปรับ solubility ของก๊าซในน้ำยา ความลึกของน้ำยา ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (ความหนาของชั้นเซลล์) การศึกษาระยะต้นๆ ที่แสดงถึง เม็ดเลือดแดง ที่เก็บใน ACD(acid citrate dextrose) ที่ 4 °ซ เหมาะต่อการเพาะลี้ยงเชื้อ ของ *P. falciparum*.อย่างต่อเนื่อง เม็ดเลือดแดง แต่เดิมที่เก็บโดยวิธีนี้ใช้ได้ถึง 4 สัปดาห์ Trigg, 1985 รายงานว่า เม็ดเลือดแดง กรุ๊ป ABO ใช้ได้ดีกับ *P. falciparum* ซึ่งเม็ดเลือดแดงของกรุ๊ปเลือดมี receptor ที่จำเป็นต่อ merozoite ในการที่ยอมให้เชื้อเข้าไปอยู่รอดและเจริญเติบโตได้

ส่วนประกอบของก๊าซในบรรยากาศ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ความเข้มข้นของ CO_2 2-5 % และO_2 5-10 % จะไม่มีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ถ้า CO_2 เพิ่มขึ้นจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ เพราะว่า จะมีผลโดยตรงต่อการรักษาระดับความเป็นกรดเป็นด่าง ส่วน O_2 ถ้าเพิ่มขึ้นก็จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งบทบาทของ O_2 ต่อ ขบวนการเมตาโบลิซึมของเชื้อไม่ทราบแน่ชัด (Trigg,1985)

Trager and Jansen (1977) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* ได้เป็นผลสำเร็จโดยใช้ RPMI 1640 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการพัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาว และเสริม HEPES 25 มิลลิโมล ต่อลิตร เป็นอาหารเสริม น้ำยาอื่นๆ คือ Harn's nutrient mixture F12, M 199 ที่มี Eagle's หรือ Hank's salt solution พบว่า RPMI ให้ผลการเพาะเลี้ยงได้ดีกว่า M199 แต่จะดีเท่ากับ Harn's F12 เมื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* (Trager,1987) Trager and Jansen (1977) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. falciparum* อย่างต่อเนื่อง พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ดีต้องใช้ 10% ซีรั่มคน 12% เม็ดเลือดแดง และความลึกของเม็ดเลือดแดงในภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง 2-4 มม. เม็ดเลือดแดง ที่ใช้ต้องเตรียมใหม่ๆเท่าที่ทำได้ โดยทั่วไป เม็ดเลือดแดง ที่เหมาะต่อการเพาะที่เหมาะสมที่สุดต้องอายุไม่เกิน 21-28 วันนอกจากนี้ เชื้อที่มีระดับต่ำต้องทำการเปลี่ยนน้ำยาใหม่บ่อยๆ เขย่าเบาๆ ให้ออกซิเจนปริมาณต่ำๆ เป็นตัวทำให้เชื้ออยู่รอดได้นานขึ้น และระดับ ATP ของเซลล์ต้องอยู่ในช่วงที่เป็นปกติ (Capps and Jensen,1983)

ผลการศึกษาทดลองหา cryoprotectants ที่เหมาะสมต่อการถนอมเชื้อ *P. gallinaceum* เพื่อการแช่แข็งได้เลือกใช้ cryoprotectants 3 สูตร คือ GS, GLB และ PVP สำหรับเลือดที่ใช้มีระดับของ *P. gallinaceum* ในเม็ดเลือด 70% ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่เป็นระยะ late trophozoites และ schizonts เมื่อนำมาแช่แข็งด้วยวิธี 2-step cooling ที่ -196°ซ นาน 1 และ 3 เดือน พบว่า GLB เป็นน้ำยาถนอมเชื้อที่ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดสูงสุด เป็นผลทำให้อัตราการติดเชื้อในไก่สูง 100 และ 60% ภายหลังการเก็บแช่แข็งไว้นาน 1และ 3 เดือน ตามลำดับ GS น้ำยาถนอมเชื้อที่ทำให้เชื้อ *P. gallinaceum* มีชีวิตรอดรองลงมา ในขณะที่ PVP เป็นน้ำยาถนอมเชื้อที่ไม่เหมาะสมต่อ *P. gallinaceum*

น้ำยาสูตร GLB และ GS มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลเป็นหลัก แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลและชนิดของบัฟเฟอร์เท่านั้น โดยที่ GLB มีความเข้มข้นของกลีเซอรอล 57% และเจือจางด้วยบัฟเฟอร์มีส่วนประกอบของ lactate และ phosphate buffer สำหรับ GS มีความเข้มข้นของกลีเซอรอล 28 % และมี sorbitol NaCl เป็นบัฟเฟอร์ จากการทดลองทั้ง GLB และ GS สามารถเก็บถนอมเชื้อ *P. gallinaceum* ได้ แต่ GLB สามารถเก็บถนอมได้นานกว่าซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jeffery (1962) ซึ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บแช่แข็งเชื้อ *P. berghei* และ *P. gallinaceum* ในกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 16.6% ใน phosphate buffer ที่อุณหภูมิต่ำ –20 ^{o}ซ และ-70 ^{o}ซ โดยใช้ 2.5% sodium citrate เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เขาพบว่าเชื้อที่ทำการเก็บในกลีเซอรอล สามารถเก็บแช่แข็งได้เป็นเวลานาน 24 วัน ถึง 281 วันจะมีความอยู่รอดได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ได้ผสมกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อที่เก็บไว้ใน น้ำเกลือปกติ ก็สามารถเก็บแช่แข็งเชื้อได้นาน 281 วัน โดยเชื้อสามารถอยู่รอด 28% เมื่อประเมินด้วยการฉีดเข้าตัวสัตว์และลักษณะรูปร่างของเชื้อจากแผ่นเลือดย้อมสี McColm และLatter (1986) ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บและชนิดของ cryoprotectants ในการเก็บถนอมเชื้อ *P. yoelii* พบว่าในการเก็บถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็ง ชนิด intracellular cryoprotectant เช่น DMSO และ กลีเซอรอลใช้ได้ดีกว่าน้ำยาถนอมเชื้อชนิด extracellular cryoprotectant เช่น Dextran และ PVP ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า PVP ไม่สามารถเก็บถนอมเชื้อ *P. gallinaceum* ได้ แม้ว่า PVP จะใช้ได้ผลดีกับเชื้อบาร์บีเซียหลายชนิดและนิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการวิจัยหลายแห่ง (Canning และ Winger ,1987) Margos *et al.* (1992) ศึกษา cryoprotectants ในการเก็บถนอมเชื้อ *P. falciparum* พบว่า น้ำยา DMSO และกลีเซอรอล มีประสิทธิภาพในการเก็บถนอมเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจาก DMSO ค่อนข้างเป็นอันตรายในขั้นตอนของการเตรียม กลีเซอรอลจึงเป็นที่นิยมใช้มากกว่า จากรายงานของ Gallaher (1974) ที่เก็บเชื้อถนอมเชื้อ *P. berghei* แช่

แข็งที่ –196°ซ โดยใช้ กลีเซอรอล และ DMSO พบว่ากลีเซอรอลให้ผลได้ดีกว่า DMSO โดยกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 15-20% ให้ผลการเก็บถนอมเชื้อได้ดีที่สุด

สำหรับเชื้อ *P. gallinaceum* ที่เก็บแช่แข็งนาน 3 เดือน อัตราความอยู่รอดของเชื้อมาลาเรียลดต่ำลงกว่าเชื้อที่เก็บไว้เพียง 1 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jeffery (1962) ที่รายงานว่าการเก็บถนอมเชื้อ *P. berghei* เป็นเวลานานมากขึ้น viability ลดลงเช่นกัน เก็บไว้ 83-99 วัน ความอยู่รอดของเชื้อเหลือ 70% (18/29 ตัว) และ Garnham (1966) กล่าวถึงการเก็บเป็นระยะเวลานาน บางครั้งอาจมีผลกระทบต่อความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อ ขณะที่ Mazur (1966) กล่าวถึงการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บแช่แข็งในเชื้อชนิดอื่นพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในเรื่องของการเจริญเติบโตของเชื้อไม่ว่าจะเป็นการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้า หรือเร็วกว่าปกติ

ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *P. gallinaceum* และเม็ดเลือดแดงภายหลังจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวที่เก็บไว้ในน้ำยาถนอมเชื้อในการทดลองครั้งนี้พบว่า GLB ทำให้ลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงและเชื้อเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดและมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับก่อนเก็บมากที่สุด จากการศึกษาของ Gallaher (1974) พบว่าภายหลังการแช่แข็งและทำละลาย ไม่สามารถบอกจากลักษณะรูปร่างได้ว่า เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงนั้น และเชื้ออิสระที่แตกออกจะมีความอยู่รอดแตกต่างกัน

การศึกษาในครั้งนี้ได้เก็บเชื้อที่มีระดับปรสิตในกระแสเลือดสูง 70% อาจมีผลกระทบต่อสภาพเม็ดเลือดแดงคือ ผนังเม็ดเลือดแดงอ่อนแอมีโอกาสแตกค่อนข้างสูงภายหลังจากการเก็บถนอมเชื้อแช่แข็งและทำละลาย ดังนั้นสิ่งที่น่าจะทำการศึกษาเพิ่มเติมคือ ทำการศึกษาการเก็บเชื้อระยะไม่มีเพศที่มีระดับเชื้อในกระแสเลือดในปริมาณต่ำและปานกลางเพื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อที่มีปริมาณสูงกว่ามีความทนทานต่อการแช่แข็งแตกต่างกันมากน้อยเพียงไร

ขั้นตอนการนำเชื้อมาเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธี 2-step cooling ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยในขั้นแรกนำเชื้อที่ผสม cryoprotectant มาเก็บที่ –20 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว จนกระทั่งนำมาทดสอบความอยู่รอด Willson *et al.* (1977) ทำการศึกษาการเก็บถนอมเชื้อแช่แข็งเชื้อ *P. knowlesi* ด้วย DMSO ใช้เชื้อระยะ ring, trophozoites, schizonts ด้วยวิธีการเก็บแช่แข็ง 2 วิธี วิธีที่ 1 จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที วิธีที่ 2 นำไปเก็บแช่แข็งที่ –31 °ซ ก่อนที่จะนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว และประเมินความอยู่รอดจาก เปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดงภายหลังจากนำมาทำละลาย อีกหนึ่งวิธีคือ นำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ผลการศึกษาพบว่า optimum freezing ของเม็ดเลือดแดงปกติและเม็ดเลือดแดงที่เชื้ออยู่นั้นไม่สัมพันธ์กัน และพบว่า trophozoites และ schizonts

จำนวนมากเกิด ice crystal ทำให้เซลล์เสียหายภายหลังจากเก็บด้วยวิธีจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ 2 พบว่า เชื้อระยะ trophozoites และschizonts มี เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า สำหรับระยะ ring form การเก็บด้วยวิธีที่ 2 ไม่ได้ช่วยให้ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น จากการเก็บวิธีที่ 1 ซึ่งเชื้อมี เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 25-50% สอดคล้องกับการศึกษาของ McColum and Latter (1986) ที่รายงานว่า การเก็บถนอมเชื้อระยะ late trophozoites และ schizonts ควรเก็บแช่แข็งด้วยวิธี 2-step cooling ส่วน young trophozoites ควรเก็บแช่แข็งด้วยวิธีการจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที Margos *et al.* (1992) ทำการศึกษาวิธีการเก็บถนอมเชื้อ *P. falciparum* แช่แข็งด้วยวิธีจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที กับวิธีการตั้งโปรแกรมลดอุณหภูมิอัตโนมัติซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บเม็ดเลือดขาว พบว่า ระยะ young trophozoites ควรเก็บแช่แข็งด้วยวิธีการจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที ส่วนระยะ late trophozoites และschizonts ควรเก็บแช่แข็งด้วยวิธีการตั้งโปรแกรมลดอุณหภูมิอัตโนมัติ จะให้ผลดีที่สุด

ในการศึกษาค่าเอนไซม์ LDH ของเม็ดเลือดแดงไก่ปกติเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อในเลือดที่ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 และ 30 % ตามลำดับ เพื่อประเมินระดับเชื้อมาลาเรียในเลือดไก่ พบว่า สามารถวัดค่าเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P. gallinaceum* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 10 รูปที่ 22) เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อ *P. gallinaceum* มีระดับเอนไซม์ LDH สูงกว่าเม็ดเลือดแดงปกติเป็นสัดส่วนกันคือ 1.80, 2.02, 2.08, 2.36, 2.22, 2.71, 4.12 และ 3.50 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sherman (1961) ที่พบว่าระดับ LDH ของมาลาเรียในสัตว์ปีก *P. lophurae* มี LDH เป็นสัดส่วนกับปริมาณของเชื้อในเม็ดเลือดแดงสูงประมาณ 3 เท่าของเม็ดเลือดแดงปกติ แสดงให้เห็นว่า LDH ของเชื้อมีความแตกต่างกับ LDH ของเม็ดเลือดแดงปกติ Markler and Hinrichs, 1993 ทำการศึกษา LDH activity ของเชื้อ *P. falciparum* เพื่อประเมินระดับเชื้อในเลือด พบว่าสามารถตรวจวัดหาระดับเชื้อได้ตั้งแต่ 0.02% จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง สามารถหาความสัมพันธ์ของระดับเชื้อในกระแสเลือดและค่าเอนไซม์ LDH ของเชื้อได้ โดยอาศัย 3 acetyl pyruvate NAD (APAD) เป็น coenzyme ในปฏิกิริยาการเปลี่ยน lactate ไปเป็น pyruvate และสอดคล้องกับการศึกษาของ Vander Jagt *et al.* (1990) เกี่ยวกับค่า lactate ของเชื้อ *P. falciparum* ที่พบว่า ปริมาณ lactate ของเชื้อ *P. falciparum* มีระดับสูงกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ 1-3 เท่า นอกจากนี้ Markler and Hinrichs (1993) ได้ทำการเปรียบเทียบ ค่า LDH ในเชื้อ *P. falciparum* และเชื้อ *บาร์บีเซีย* พบว่า สามารถตรวจวัดค่า ของเชื้อ*บาร์บีเซีย* ได้ใน

ระดับต่ำ 0.002-0.003 ที่ระดับปรสิตในกระแสเลือด 3-8% ในขณะที่ค่า LDH ของ *P. falciparum* วัดได้ 4.4-10 ที่ระดับปรสิตในกระแสเลือด 8-13%

ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า เลือดมีระดับเชื้อในเลือดต่ำค่า LDH ที่อ่านได้อยู่ในระดับต่ำ และระดับเชื้อในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นค่า LDH ที่อ่านได้ มีระดับสูงขึ้น ค่าที่วัดได้เพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับเชื้อที่ 20% และเมื่อระดับเชื้อในเลือดสูงเป็น 30% ค่าLDH ที่วัดได้มีระดับต่ำกว่าระดับเชื้อในเลือดที่ 20% เห็นได้ว่า ลักษณะการเพิ่มของเชื้อมีความสัมพันธ์กับระดับเอนไซม์ LDH ซึ่งค่าที่วัดได้เกือบเป็นเส้นตรงยกเว้น ในช่วงที่ระดับเชื้อในเลือดเท่ากับ 30% อาจเกิดเนื่องจากระดับปริมาณของ 3-acetylpyridine NAD (APAD) ที่ใช้วัดไม่เหมาะสมกับระดับเชื้อในเลือดช่วง 30 % เนื่องจากค่าที่วัดได้เป็นค่าที่วัดจากระดับการใช้ APAD ของเชื้อ ดังนั้นปริมาณที่ใช้ในการทดลองอาจจะน้อยไปสำหรับเชื้อที่ใช้วัดได้ เนื่องจากเชื้อมาลาเรียเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น lactate โดยอาศัย APAD เป็น coenzyme ของปฏิกิริยาดังนั้น เชื้อที่มีปริมาณมากย่อมใช้ APAD มาก อาจทำให้ค่าที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง

Basco *et al.* (1995) กล่าวว่าในการตรวจวัดระดับ LDH ระดับเชื้อในเลือดควรมี 1-2% และค่า PCV ประมาณ 1.5% จึงจะทำให้การตรวจวัดได้ผลดีที่สุด Knobloch and Henk (1995) ใช้ LDH ในการ screen เชื้อ *พลาสโมเดียม* ชนิดต่างๆ โดยสังเกตจากค่า LDH ในการตรวจวัดเชิงคุณภาพ นอกจากนี้ Cooke และคณะ (1999) ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *P. falciparum* ด้วยวิธีการตรวจจาก ชุดตรวจ Optimal และ LDH ของเชื้อ ผลการทดลองพบว่า LDH assay ของ *P. falciparum* ให้ผลดีกว่าการตรวจด้วยชุดตรวจ Optimal ซึ่งการตรวจด้วยวิธี LDH จะให้ผลดีถ้ามีระดับเชื้อในกระแสเลือดสูงกว่า 0.01% โดยที่การตรวจด้วยวิธี LDH มี specificity 92% sensitivity 91.3% และสามารถใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรียได้ (Basco *et al.*,1995) จึงควรนำวิธีการตรวจวัดเชื้อมาลาเรียด้วยเอนไซม์ LDH มาทำการศึกษาร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียไก่ในสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสม เพื่อที่สามารถนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองต่อไป

บทที่ 6
สรุป

เชื้อ *P.gallinaceum* อยู่ในไซโตพลาซึมของเม็ดเลือดแดงที่พบได้มี 4 ระยะ คือ trophozoite, schizont, merozoite และgametocyte ลูกไก่อายุ 2 สัปดาห์ที่ได้รับเชื้อ *P.gallinaceum* 5×10^4 เข้าทางใต้ผิวหนังมีอัตราการติดโรค 100 % และอัตราการตาย 66.67 % อาการทางคลินิกเริ่มปรากฏเด่นชัดตั้งแต่วันที่ 13 ได้แก่ ซึม ขี้เขียว เลือดจาง ร้อยละ 100 , 67 , 100 ตามลำดับ ผลการผ่าซาก รอยโรคเริ่มเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 8 และสูงสุดในวันที่ 16 ลักษณะตับมีสีดำคล้ำ ม้ามมีสีดำคล้ำ ขนาดโตกว่าปกติ ถุงหุ้มหัวใจมีน้ำขัง และไตบวมน้ำ ร้อยละ 100 , 100 , 100 และ 66.67 ตามลำดับ ลักษณะเด่นทางจุลพยาธิวิทยา พบ malarial pigment ของ *P.gallinaceum* ร้อยละ 100 ที่ ตับ ม้าม และสมอง และร้อยละ 83.33 ที่หัวใจ และไต schizont ตรวจพบที่ ตับ ม้าม สมอง และไต ร้อยละ 100,100, 83.33 และ 83.33 ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงระยะสั้นของ erythrocytic stage ของ *P.gallinaceum* ในสภาวะต่างๆยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ในการเก็บเชื้อแช่แข็งที่ –196 ^{0}ซ glycerol-lactate buffer เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เก็บถนอมเชื้อ *P.gallinaceum* สำหรับระดับของเอนไซม์ LDH ของเชื้อ *P.gallinaceum* มีความสัมพันธ์ที่เป็นสัดส่วนกับระดับเชื้อในกระแสเลือด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อกระทรวงสาธารณสุข. 2540. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย คู่มือการศึกษาความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยาในหลอดทดลอง หน้า 4-8

จันทน์สุดา วงศ์ศรีชนาลัย และ เอ็ช ไคล์ เว็บสเตอร์. 2534. วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5(1): 63-75

ชัยศิริ มหันตชัยสกุล ปิยนุช ประสิทธิรัตน์ และทัศนีย์ ชมภูจันทร์ 2539 การเกิดโรคมาลาเรียในไก่กระทงและการป้องกันรักษา การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม- 1กุมภาพันธ์ หน้า 429-434

ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ ปิยะนุช ประสิทธิรัตน์ และชัยศิริ มหันตชัยสกุล 2539 การระบาดของโรคมาลาเรียในไก่กระทง จดหมายข่าว สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ปีที่ 4 ฉบับที่ 6 ประจำเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม

ปิยนุช ประสิทธิรัตน์ 2541 มาลาเรียไก่ไข่ เอกสารแจกประกอบการสัมมนาเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ไข่ในหัวข้อเรื่อง มองต่างมุมปัญหาไก่ไข่ อะไรคือสาเหตุให้ผลผลิตตกต่ำ อังคารที่ 10 พฤศจิกายน 2541 ณ ห้องไทปัน โรงแรมโรยัลพลาซ่า จ.ฉะเชิงเทรา หน้า 1-17

ภาษาอังกฤษ

Aikawa,M.1966. The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites, *Plasmodium fallax*, *P.lophurae* and *P.cathemerium*. Am.J.Trop.Med.Hyg. 15 (4) : 449-470.

Alger,N.E., Branton,M., Harant,J. and Silverman,P.H.1971. *Plasmodium berghei* NK65 in the A/J Mouse:Variations in virulence of *P. berghei* Demes. J Protozool 18(4): 598-601.

Beaudoin,R.L.1977. Should Cultivated exoerythrocytic parasites be considered as a source of antigen for a malarial vaccine?. Bull.W.H.O. 55(2-3):373-376.

Basco, L.K., Marquet, F., Makler, M.M. and Bras, J.L. 1995. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* : Lactate Dehydrogenase activity and its application for *In vitro* drug susceptibility assay. Exp.Parasitol 80:260-271.

Bertagna, P.1972. Cultivation techniques for the erythrocytic stages of malarial parasites. Bull.W.H.O. 50:357-373.

Bickii, J., Basco, L.K. and Ringwald,P.1998. Assessment of Three *In vitro* Tests and In *vivo* test for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. J.Clin.Microbiol. 36 : 243-247.

Canning, E.U. and Winger, C.M. 1987. Babesiidae. In : *In vitro* methods for parasite cultivation. edited by Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. Academic press. P.181-199.

Chulay,J.D., Haynes,J.D. and Diggs,C.L. 1983. *Plamodium falciparum*: Assessment of *in Vitro* Growth by [^{3} H]Hypoxanthine Incorporation. Exp. Parasitol. 55 : 138-146.

Cooke, A.H., Chiodini, P.L., Doherty,T., Moody, A.H., Ries,J. and Pinder, M. 1999. Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen Detection Assay (OPTIMAL®) with microscopy for the detection of malarial parasites in human blood samples. Am.J.Trop.Med.Hyg. 60(2) : 173-176.

Diggs,C.L., Aikawa,M. and Haynes,J.D.1977. Ultrastructure and Viability of Cryopreserved *Plasmodium falciparum*. Bull.W.H.O.55: 299-304.

Fairlamb, A.H., Warhurst, D.C. and Peters, W. 1985. An impaired technique for the cultivation of *Plasmodium falciparum in vitro* without daily medium change. Ann.Trop.Med.Parasitol 79(4):379-384.

Gallher, F.S. 1974. Studies on the cryopreservation of malaria. M.Sc. Thesis. Tropical Medicine Mahidol University Bangkok.

Garnham, P.C.C. 1966. Gallinaceous species of Haemamoeba.In: Malarial parasites and other haemosporidia. Blackwell Scientific Publications. P.588-673.

Garnham, P.C.C., Bird,R.G. and Baker,J.R.1960. Electron microscope studies of motile stages of malarial parasites. I . The fine structure of the sporozoites of *Haemamoeba* (=*Plasmodium*) *gallinaceum*. Trans.Roy.Trop.Med.Hyg. 54(3) : 274-278.

Goodyer, I.D and Taraschii,T.F.1997. Research brief *Plasmodium falciparum* : A simple, rapid method for detecting parasite clones in microtiter Plate. Exp. Parasitol 86: 158 -160.

Greenberg, J. and Trembley, H.L. 1953. Infections produced by mixed strains of *Plasmodium gallinaceum* in chicks. J.Parasitol. 39: 336-340.

Greenwood, B.M, Stratton, D. and Williamson, W.A. 1978. A study of the role of immunological factors in the pathogenesis of the anaemia of acute malaria. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 72(4): 378-385.

Hang, V.T., Be, T.V., Tran, P.N., Thanh, L.T., Hien, L.V., Brien, E.O. and Morris, G.E. 1995. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 89:44-47.

Hawking, F.1945. Growth of protozoa in tissue culture. *Plasmodium gallinaceum*, exoerythrocytic forms. Trans. Roy. Soc. Trop. Med.Hyg. 39(3) : 245-263.

Huff, C.G.1952. Studies on the exoerythrocytic stages of *Plasmodium gallinaceum* during the "Transitional Phase" Exp. Parasitol 1:392-405.

Huff, C.G.1965. Susceptibility to mosquitoes to avian malaria. Exp.Parasitol 16:107-132.

Jeffery, G.M. 1962. Survival of trophozoites of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum* in glycerolized whole blood at low temperatures. J.parasitol 48 (4):601.606.

Jensen, J.B. Capps, T.C. and Carlin, J.M.1981. Clinical drug-resistant falciparum malaria acquired from culture parasite.Am.J.Trop.Med.Hyg.30: 523-525.

Jones, T.C., Hunt,R.D. and King, N.W. 1997. Disease due to protozoa. In: veterinary pathology 6th ed. Williams & Wilkins A wavesky company. P. 549-600.

Kawamoto, F., Miyake,H., Kaneko,O., Kimura,M., Dung,N.T., Liu,Q., Zhou,M., Dao,L.D., Kawai,S., Isomura,S. and Wataya,Y. 1996. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. J.Clin.Microbiol. 34: 2287-2289.

Klenerman, P. and Dickson,H.1992. Plasma lactate dehydrogenase estimation in the diagnosis of malaria. Ann.Trop.Med.Parasitol. 86(5): 563-565.

Knobloch, J and Henk, M. 1995. Sceening for malaria by determination of parasite-specific lactate dehydrogenase. Trans. Roy. Soc. Trop. Med.Hyg. 89:269-270.

Levine, N.D.1985. Apicomplexa : *Plasmodium*, *Hasmoproteus*, *Leucocytozoon*. In: Veterinary Protozoology. Iowa State University Press Ames. P.265 - 290.

Makler, M.T.and Hinrichs, D.J.1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. Am.J.Trop.Med.Hyg. 48 (2) :205-210.

Makler, M.T., Palmer, C.J. and Ager,A.L.,1998. A review of practical techniques for diagnosis of malaria. Ann.Trop.Med.Parasitol 92(4) :419-433.

Martinez-Silva, R. Lopez, V.A. and Chiriboga, J. 1970. Preservation of *Trypanosoma cruzi* in Tissue Culture At liquid nitrogen Temperatures. Cryobiology. 6(4):364-367.

Margos, G., Maier, W.A and Seitz, H.M.,1992. Experiments on cryopreservation of *Plasmodium falciparum*. Trop. Med. Parasitol 43:13-16.

McColm, A.A. and Latter, V.S.1986. Comparison of fast (one-step) and interrupted slow cooling methods using a range of intracellular and extracellular cryoprotectants for the freeze-preservation of *Plasmodium yoelii*-infected mouse erythrocytes. Trans. Roy. Soc. Trop. Med.Hyg. 80: 29-33.

McGhee, R.B. 1988. Major animal models in malaria research : Avian . In : Principle & Practical of Malariology. Vol 2. P.1545-1575.

Meyer, H. and Musacchio, O.1965. An electron microscopic study of the final and initial forms of *Plasmodium gallinaceum* in thin sections of infected tissue culture. J. protozool 12 (2) : 193-202.

Miller, L.H., Good, M.F. and Milon, G. 1994. Malaria pathogenesis. Science. 264: 1878-1883.

Olumide, A.M.J., Ogundahunsi, A.T. and Salako, L.A. 1992. Continuous cultivation and drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in a malaria endemic area. J. Protozool. 39 (5) :605-608.

Pasvol,G and Wilson,R.J.M.1982. The interaction of malaria parasites with red blood cells. Br.Med.Bull. 38 (2):133-140.

Ponnudurai, T. 1987. Plasmodiidea ; Erythrocytic Stages. In : *In vitro* methods for parasites cultivation. edited by Taylor, A.E.R. and Baker, J.R. Academic Press. P.153-179.

Prasittirat,P., Nithiuthai,S., Champoochan,T. and Sookruen,A.1997. Stategies control program of avian malaria in broilers. Proceeding of World Assosiation for the Advancement of Veterinary Parasitology 16 th. Sun city-South Africa. 10-15 August. P. 267.

Pribor, D.B. and Nara, A. 1973. The effect of salt or various cryoprotective agents on frog sciatic nerves. Cryobiology. 10 : 33-44.

Ramos, R.I., Hermosura, M.E. and Nakabayashi, T. 1986. Cultivation of *Plasmodium falciparum* using animal serum (Horse, Calf and and Bovine) as human serum substitute. Zbl.Bakt.Hyg. 262:551-558.

Rapatz, G. and Luyet, B. 1970. A Review of Basic Researches on the Cryopreservation of Red Blood Cells. Cryobiology. 6(5):425-481.

Rest, J.R. and Wright , D.H. 1979. Electron microscopy of cerebral malaria in golden hamsters (*Medocricetus auratus*) infected with *Plasmodium berghei*. J.Path. 127: 115-120.

Rigdon, R.H. 1945. A pathological study of the acute lesions produced by *Plasmodium lophurae* in young white pekin duck. Am. J.Trop.Med. (25): 371-377.

Rocha, E.M.M., Hollingdale, M.R., Gwaddz, R. and Knettli, A.U. 1993. Exoerythrocytic development of *Plasmadium gallinaceum* sporozoites in a chicken fibroblast cell line and inhibition of the cell invasion by specific anti-sporozoite monoclonal antibodies. J.Euk.Microbiol 40(1): 64-66.

Scheibel, L.W. and Sherman, I.W. 1988. Plasmodial metabolism and related organellar function during various stages of the life-cycle : proteins, lipids, nucleic acids and vitamins. In: Malaria :Principles and practice of malariology. edited by Wernsdorfer,W.H. and McGregor,Sir I. Vol.1 p.219-253.

Sherman, I.W. 1961. Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*) J.Exp.Med.114: 1049-1062.

Sherman,I.W. 1979. Biochemistry of *Plasmodium* (Malarial parasites). Microbiol.Rev. 43:453-495.

Siddiqui,W.A. and Schnell,J.V.1973. Use of various buffers for *In vitro* cultivation of malarial parasites. J parasitol 59 (3):516-519.

Smyth, J.D. 1976. Sporozoa : Malaria in the animal kingdom. In : Introduction to animal parasitology. 2 nd ed. Halsted Press, a division of John Wiky & Sons, Inc ; New York,: P.118-120.

Sohal,A.K. and Arnot,D.E.,1993. *Plasmodium Chabaudi* : A short-term *in vitro* culture method and its application to chloroquine resistance testing. Exp.Parasitol 76:314-317.

Soni,J.L and Cox,H.W.,1974 a. Pathogenesis of acute avian malaria. I. Immunologic reaction associated with anemia, splenomegaly and nephitis of acute *Plasmodium gallinaceum* . Am.J.Trop.Med.Hyg. 23: 577-585.

Soni,J.L and Cox,H.W.,1974 b. Pathogenesis of Acute Avian Malaria. II Anemia mediated by a cold-active autohemagglutinin from the blood of chicken with acute *Plasmodium gallinaceum* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23: 206-213.

Soulsby, E.J.L. 1982. Suborder Haemosporina. In : Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal. 7th.ed. ELBS. P.692-705.

Sullivan, D.J., Gluzman, I.Y. and goldbers, D.E. 1996. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. Science. 271 : 219-222.

Swan, A.I. 1973. *Plasmadium gallinaceum* : Mechanism of anemia in infected chickens. Exp.Parasitol 33 : 79-88.

Thomas,M.J.G. and Bell,S.H.,1995. Cryopreservation of Human Red Blood Cells.In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. edited by Day,J.G. and McLellan,M.R. Human Press Totowa ,New Jersey.P.235-250.

Trager, W. 1979. *Plasmodium falciparum* in culture : improved continuous flow method. J. protozool 26:125-129.

Trager, W. 1987. The cultivation of *Plasmodium falciparum* : applications in basic and applied research on malaria. Ann.Trop.Med Parasitol 81(5):511-529.

Trager, W. and Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science.193:673-675.

Trager,W and Jensen,J.B.1977. Cultivation of erythrocytic stages. Bull.W.H.O. 55 (2): 363-365.

Trigg, P.I. 1985. Recent advances in malaria parasite cultivation and their application to studies on host-parasite relationships : a review. Bull W. H.O. 63(2):387-398.

Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Campos, N.M. and Baack, B.R. 1990. D-Lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium faciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 42:277-284.

Weatherall, D.J. and Bunch, C. 1985. The blood and blood-forming organs. In: Pathophysiology. 6th ed. edited by Smith, L.H. and Their, S.O. W.B. Saunders company. P.173- 320.

Wilson, R.J.M, Farrant, J. and Walter, C.A.,1977. Preservation of intraerythrocytic forms of malarial parasites by one-step cooling procedures. Bull.W.H.O.55 (2-3) : 309-315.

Yan, H.Y., Yang, B. and Lin, X.L. 1991. *In vitro* cultivation of the erythrocytic stage of *Plasmodium berghei* . Chung Kuo Chi Sheng Chung Hgueh Yu Chi Sheng Chung Ping Tsa Chih. 9 (1):28-30.

ภาคผนวก

ตารางที่ ผ1 ระดับเชื้อในกระแสเลือด (%) ของไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 (หมายเลข 11-34) ในช่วงวันที่ 0-16 หลังฉีดเชื้อ

หมายเลขสัตว์	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8
11	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.001	0.002	1
12	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.002	1
13	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.004	0.019	4
14	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
15	NF	NF	NF	NF	NF	0.002	0.005	4	5.6
16	NF	NF	NF	NF	0.002	0.005	0.033	32	39.6
17	NF	NF	NF	NF	NF	0.001	0.008	5	13.6
18	NF	NF	NF	NF	NF	0.003	0.013	13	15
19	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.001	0.003	1.2
20	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.001	0.015	1.4
21	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.003	0.002
22	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.001	2
23	NF	NF	NF	NF	0.001	0.005	6	46	69.4
24	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.001
25	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.001	0.002	1.5
26	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.005	1.4
27	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0.002	0.002
28	NF	NF	NF	NF	0.001	0.004	0.006	7	14
29	NF	NF	NF	NF	NF	*	*	*	*
30	NF	NF	NF	NF	NF	*	*	*	*
31	NF	NF	NF	NF	NF	*	*	*	*
32	NF	NF	NF	NF	NF	*	*	*	*
33	NF	NF	NF	NF	NF	*	*	*	*
34	NF	NF	NF	NF	NF	*	*	*	*

*= ทำให้ตายอย่างสงบ NF= ตรวจไม่พบเชื้อ

ตารางที่ ผ1 (ต่อ) ระดับเชื้อในกระแสเลือด (%) ของไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 (หมายเลข 11-34) ในช่วงวันที่ 0-16 หลังฉีดเชื้อ

หมายเลขสัตว์	วันที่ 9	วันที่ 10	วันที่ 11	วันที่ 12	วันที่ 13	วันที่ 14	วันที่ 15	วันที่ 16
11	4	21	76	79	64	81	80	88
12	6.4	26	82	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย
13	14	25	83	75	83	89	73	55
14	0.004	1.2	3	20	70	75	ตาย	ตาย
15	27	49	75	75	92	ตาย	ตาย	ตาย
16	49	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย
17	33	84	90	84	*	*	*	*
18	33	62.5	62	43	*	*	*	*
19	1.2	16	56	70	*	*	*	*
20	7	23	67	72	*	*	*	*
21	5	30	72	82	*	*	*	*
22	7	23	60	77	*	*	*	*
23	*	*	*	*	*	*	*	*
24	*	*	*	*	*	*	*	*
25	*	*	*	*	*	*	*	*
26	*	*	*	*	*	*	*	*
27	*	*	*	*	*	*	*	*
28	*	*	*	*	*	*	*	*
29	*	*	*	*	*	*	*	*
30	*	*	*	*	*	*	*	*
31	*	*	*	*	*	*	*	*
32	*	*	*	*	*	*	*	*
33	*	*	*	*	*	*	*	*
34	*	*	*	*	*	*	*	*

*= ทำให้ตายอย่างสงบ

ตารางที่ ผ2 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 (หมายเลข 11-34) ในช่วงวันที่ 2-16 หลังฉีดเชื้อ

หมายเลขสัตว์	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16
11	29	26	22	28	28	18	18	17
12	28	28	28	28	30	ตาย	ตาย	ตาย
13	29	27	27	26	28	23	16	16
14	31	28	25	29	30	27	20	ตาย
15	30	28	23	22	23	20	15	ตาย
16	31	28	23	20	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย
17	28	25	26	24	22	14	*	*
18	29	30	20	22	22	21	*	*
19	28	24	20	20	21	19	*	*
20	29	26	28	23	29	18	*	*
21	31	34	28	27	28	29	*	*
22	28	26	28	34	24	18	*	*
23	27	27	20	20	*	*	*	*
24	31	31	28	20	*	*	*	*
25	25	28	31	30	*	*	*	*
26	26	26	24	21	*	*	*	*
27	27	23	27	26	*	*	*	*
28	28	28	21	17	*	*	*	*
29	26	27	*	*	*	*	*	*
30	32	30	*	*	*	*	*	*
31	31	30	*	*	*	*	*	*
32	29	25	*	*	*	*	*	*
33	30	28	*	*	*	*	*	*
34	25	27	*	*	*	*	*	*

* = ทำให้ตายอย่างสงบ

ตารางที่ ผ3 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของไก่กลุ่มควบคุม (หมายเลข 1-10) ในช่วงวันที่ 2-16

หมายเลขสัตว์กลุ่มควบคุม	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16
1	25	33	27	28	*	*	*	*
2	29	26	*	*	*	*	*	*
3	28	28	26	28	32	29	30	30
4	26	28	27	27	28	31	28	28
5	29	24	29	28	31	31	30	31
6	25	31	25	25	*	*	*	*
7	29	27	29	26	32	30	*	*
8	26	28	28	28	31	32	32	36
9	26	30	24	21	28	27	*	*
10	28	25	*	*	*	*	*	*

* = ทำให้ตายอย่างสงบ

ตารางที่ ผ4 อุณหภูมิ (^{0} ซ) ของไก่ในกลุ่มทดลองในกลุ่มที่ 2 (หมายเลข 11-34) ในช่วงวันที่ 0-16 หลังฉีดเชื้อ

หมายเลขสัตว์	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8
11	40	40.5	40.7	41	40.5	41.5	42	41.2	41.6
12	40.5	40.5	36.5	40.7	41	41	42	41.5	42
13	39.5	40.5	40.8	41.5	41.5	41.7	40.7	41.5	41.7
14	40.5	40	40.8	40.5	42	41.5	42	41.5	41.6
15	40.5	41.2	40.8	41.2	41.5	41.2	41	41.6	42.5
16	40.5	40.5	41.2	40.5	41.7	41	41.7	41	42.5
17	40.5	41.5	41.3	40.2	42	41.7	42.2	42	42.6
18	40.5	40.5	41.2	41	41	42	42	42.5	42.5
19	39.5	40.5	41.4	40.2	41.6	41.5	42	42	41.3
20	40	40.5	41.2	41	41	42	42	41.8	42
21	40.5	40	41.4	40.6	41	41.2	41.7	41.8	42
22	40.5	40	41.3	40.7	41	41.5	43	42.2	41.6
23	40.5	41.5	41.3	41.5	42	41.2	42	42	42.2
24	40	40.5	40.5	41	41.5	41.5	41.5	41.7	41.6
25	39.5	41.2	41.2	41.5	41.7	41.8	42.2	42	41.8
26	40.5	40.5	41.6	40.8	41	41.2	42	42	42
27	40.5	41	41.6	41.2	41.5	41	42	41.8	42.2
28	40.5	40	40.9	40.2	41.7	41.8	42	42.6	41.7
29	40.5	41	41.7	41.2	40.5	*	*	*	*
30	40	40.5	41.2	40.2	41	*	*	*	*
31	39.5	40	41	40.5	41	*	*	*	*
32	40.5	41	41.2	41.4	41.5	*	*	*	*
33	40.5	41	41.4	41	41.2	*	*	*	*
34	40.5	40.2	41.2	41	41.2	*	*	*	*

* = ทำให้ตายอย่างสงบ

ตารางที่ ผ4 (ต่อ)อุณหภูมิ (^{0} ซ) ของไก่ในกลุ่มทดลองในกลุ่มที่ 2 (หมายเลข 11-34) ในช่วงวันที่ 0-16 หลังฉีดเชื้อ

หมายเลขสัตว์	วันที่ 9	วันที่ 10	วันที่ 11	วันที่ 12	วันที่ 13	วันที่ 14	วันที่ 15	วันที่ 16
11	42	42	42.3	41.5	42	42	41.7	41
12	41.5	41.7	43.2	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย
13	42.5	42.3	42.7	41.5	42	41.5	41.5	42
14	41.5	41.5	42	41.5	42.5	42	ตาย	ตาย
15	42.5	42.5	42.22	42	42.2	ตาย	ตาย	ตาย
16	42	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย	ตาย
17	42.6	42	41.5	42	*	*	*	*
18	43	42.3	42	42	*	*	*	*
19	42.5	42	42.5	42	*	*	*	*
20	42	41.6	42.5	42.3	*	*	*	*
21	42	42.3	42.7	42.5	*	*	*	*
22	42	42.5	42.7	41.5	*	*	*	*
23	*	*	*	*	*	*	*	*
24	*	*	*	*	*	*	*	*
25	*	*	*	*	*	*	*	*
26	*	*	*	*	*	*	*	*
27	*	*	*	*	*	*	*	*
28	*	*	*	*	*	*	*	*
29	*	*	*	*	*	*	*	*
30	*	*	*	*	*	*	*	*
31	*	*	*	*	*	*	*	*
32	*	*	*	*	*	*	*	*
33	*	*	*	*	*	*	*	*
34	*	*	*	*	*	*	*	*

* = ทำให้ตายอย่างสงบ

ตารางที่ ผ5 อุณหภูมิ (^{o} ซ) ของไก่ในกลุ่มควบคุมหมายเลข 1-10 ในช่วงวันที่ 0-8 หลังจากฉีดเชื้อ

หมายเลขสัตว์กลุ่มควบคุม	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8
1	40	40	41.2	40.5	42	41	41	41.3	41.5
2	40.5	40.5	41	42	41	*	*	*	*
3	39.5	40.2	41.4	41	41.5	41.7	42	42.3	42.3
4	40.5	40.5	41.5	41.5	41	41.2	41	41.5	42
5	40.5	40.5	41.1	41.5	41.5	40.5	41.5	41.5	41.5
6	40.5	41	41.5	41	41.5	41.5	41	41.2	42
7	40.5	41	42	41.5	41.5	41.7	41.6	41.6	41.5
8	39.5	40.5	41.2	41	40.5	41	41.2	41.8	42
9	40.5	40	41.2	40.5	41	41	42	42.2	42.3
10	40	40.2	41.2	40.5	42	*	*	*	*

* = ทำให้ตายอย่างสงบ

ตารางที่ ผ6 อุณหภูมิ (^{o} ซ)ของไก่ในกลุ่มควบคุมหมายเลข1-10ในช่วงวันที่ 9-16 หลังจากฉีดเชื้อ

หมายเลขสัตว์กลุ่มควบคุม	วันที่ 9	วันที่ 10	วันที่ 11	วันที่ 12	วันที่ 13	วันที่ 14	วันที่ 15	วันที่ 16
1	*	*	*	*	*	*	*	*
2	*	*	*	*	*	*	*	*
3	41.9	42.5	42.5	42	42.2	42.5	42	41.5
4	42	42.7	42.2	41	42	42.5	42.2	41
5	41.5	42.3	41.8	41.5	42.3	42.2	41.3	42
6	*	*	*	*	*	*	*	*
7	41.2	42	42.2	41.5	*	*	*	*
8	41.4	42	42	42	41.8	42	41.5	44.5
9	41.7	42	42	41.5	*	*	*	*
10	*	*	*	*	*	*	*	*

* = ทำให้ตายอย่างสงบ

ตารางที่ ผ7 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อระหว่างเชื้อที่เก็บไว้ใน Glycerol-lactate buffer (GLB), Glycerol-sorbitol (GS) และ Polyvinyl pyrolidone (PVP) ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 เดือน และเชื้อที่ไม่ได้เก็บแช่แข็ง

วัน	Cryoprotectant			Control
	GLB	GS	PVP	
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	50
3	0	0	0	50
4	0	0	0	80
5	0	0	0	80
6	20	0	0	80
7	70	0	0	100
8	90	10	0	100
9	100	20	0	100
10	100	20	0	100
11	100	20	0	100
12	100	20	0	100
13	100	20	0	100
14	100	20	0	100
15	100	20	0	100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ผ8 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อระหว่างเชื้อที่เก็บไว้ใน Glycerol-lactate buffer (GLB), Glycerol-sorbitol (GS) และ Polyvinyl pyrolidone (PVP) ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 3 เดือน และเชื้อที่ไม่ได้เก็บแช่แข็ง

วัน	Cryoprotectant			Control
	GLB	GS	PVP	
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	50
3	0	0	0	50
4	0	0	0	80
5	0	0	0	80
6	40	0	0	80
7	50	0	0	100
8	50	0	0	100
9	60	0	0	100
10	60	0	0	100
11	60	0	0	100
12	60	0	0	100
13	60	0	0	100
14	60	0	0	100
15	60	0	0	100

ประวัติผู้เขียน

นายปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์ เกิดวันที่ 11 กรกฎาคม พ.ศ. 2517 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพยาธิชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2540