



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวิธี Allele-specific nested multiplex PCR
เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการดื้อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของ
พยาธิ *Brugia malayi* ในพื้นที่ระบาดและการให้ยาในกลุ่มภายใต้
โครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาส

โดย อภิรดี อินทรพัทตร์ และคณะ

พฤษภาคม 2558

สัญญาเลขที่ MRG5680087

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาวิธี Allele-specific nested multiplex PCR
เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการดื้อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของ
พยาธิ *Brugia malayi* ในพื้นที่ระบาดและการให้ยากลับภายใต้
โครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาส

คณะผู้วิจัย

สังกัด

อภिरดี อินทรพัถร์
ประภา นันทวรศิลป์
ดานัย แสงทอง
จันทรา โพธิ์กสิกร
ศันสนีย์ โรจนพันธ์
อดิศักดิ์ ภูมิรัตน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงาน
คณะกรรมการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5680087

ชื่อโครงการ : การพัฒนาวิธี Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการดื้อยาของกลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิ *Brugia malayi* ในพื้นที่ระบาดและการให้ยากกลุ่มภายใต้โครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาส

ชื่อนักวิจัย : อภิรดี อินทรพัถร์¹ ประภา นันทวรศิลป์² ดานัย แสงทอง³ จินรภา โพธิ์กสิกร⁴
ศันสนีย์ โรจนพันธ์⁵ อติศักดิ์ ภูมิรัตน์⁶

¹ ภาควิชาคลินิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร, aintarapuk@hotmail.com

² ภาควิชาพื้นฐานสาธารณสุข คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, praparm@hotmail.com

³ ภาควิชาวิชาสัตวบาลและวิชาพื้นฐานวิชาชีพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร, pdanai@mut.ac.th

⁴ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, jinrapa.pho@mahidol.ac.th

⁵ สำนักโรคติดต่อภายในโดยแมลง กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, srojanapanus@yahoo.com

⁶ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, adisak.bhu@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 มิถุนายน 2556 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม 2558

โรคเท้าช้างบรูเกีย เป็นโรคติดต่อมาโดยยุงเกิดจากเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *Brugia malayi* และยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดนราธิวาสยังคงเน้นโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง (The national program to eliminate lymphatic filariasis) ในช่วงระหว่างปี 2545–2554 โดยใช้มาตรการกำจัดโรคได้แก่การรักษากลุ่ม (mass drug administration) ด้วยยาไดเอทิลคาร์บามาซีนร่วมกับอัลเบนดาโซล โดยการจ่ายยาร่วมปีละหนึ่งครั้งให้แก่ประชาชนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่แพร่โรคที่มีอายุตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไป และดำเนินการเฝ้าระวังหลังการหยุดการรักษา (post MDA surveillance) ในช่วงระหว่างปี 2555–2559 การศึกษานี้ดำเนินการขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาและศึกษาปรากฏการดื้อยาของพยาธิฟิลาเรียในคน แมว และยุงพาหะด้วยวิธี Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการดื้อยาของกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในพื้นที่ระบาดของโรคเท้าช้าง และใช้ในการประเมินความสำเร็จของโครงการให้ยากกลุ่มในประชากรที่อาศัยในพื้นที่เสี่ยงต่อโรค โดยทำการสำรวจหาการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในคนและแมวในพื้นที่แพร่โรคจำนวน 4 หมู่บ้านของอำเภอตากใบซึ่งมีความครอบคลุมของการจ่ายยา

รักษากลุ่มน้อยกว่าร้อยละ 90 และทำการสำรวจหาตัวอ่อนพยาธิปลาเรื้อในยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ในพื้นที่เดียวกัน โดยการติดเชื้อปลาเรื้อชนิด *B. malayi* ทั้งในคน แมว และยุง สามารถจำแนกได้โดยวิธี rDNA locus-specific PCR สำหรับตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *B. malayi* สามารถนำไปตรวจหาฮีน β -tubulin gene isotype 1 เพื่อหาอัลลีลที่มีความจำเพาะต่อความไวของยากลุ่มเบนซิมิดาโซล ด้วยวิธี Allele-specific multiplex nested PCR ผลการศึกษาในคน ไม่พบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรื้อในผู้ติดเชื้อรายใหม่ แต่พบผู้ป่วยติดเชื้อไมโครฟิลาเรื้อรายเก่าจำนวน 4 ราย การสำรวจหาการติดเชื้อไมโครฟิลาเรื้อในแมว พบอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรื้อชนิด *B. pahangi* ร้อยละ 2.6 และอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรื้อชนิด *D. immitis* ร้อยละ 9.2 และเชื้อปลาเรื้อชนิด *B. malayi* ที่พบในผู้ป่วยทั้ง 4 ราย ยังคงมีฮีน β -tubulin gene isotype 1 ซึ่งแสดงลักษณะอัลลีลที่เกี่ยวข้องกับความไวต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล (homozygous benzimidazole-sensitive (SS) allele) ในขณะที่พบการกระจายของยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ได้แก่ยุง *Mansonia* spp. ชนิด *Ma. bonneae*, *Ma. uniformis*, *Ma. dives*, *Ma. annulata* และ *Ma. Indiana* ทั้งในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง อย่างไรก็ตามไม่พบตัวอ่อนของเชื้อปลาเรื้อทุกชนิดในตัวอย่างยุงเสื่อที่ศึกษาดังกล่าว ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าผู้ติดเชื้อที่ยังคงมีเชื้อไมโครฟิลาเรื้อทั้งที่ได้รับยาร่วมดังกล่าว (persistence microfilariamia) แต่อย่างไรก็ตามการเกิด persistence microfilariamia ทั้ง 4 ราย ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล นอกจากนี้การศึกษายังชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของยาอัลเบนดาโซล ซึ่งใช้เป็นยาร่วมกับไดเอทิลคาร์บามาซีนในการกำจัดเชื้อปลาเรื้อชนิด *B. malayi* ในคน ส่วนวิธี Allele-specific multiplex nested PCR สามารถประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังและติดตามประเมินผลการดื้อยาของเชื้อปลาเรื้อ (selective pressure) ในพื้นที่แพร่โรคที่มีการจ่ายยารักษากลุ่มด้วยยาร่วมระหว่างไดเอทิลคาร์บามาซีนและอัลเบนดาโซล

คำหลัก : Allele-specific nested multiplex PCR เบนซิมิดาโซล พยาธิบรูเกีย การจ่ายยารักษากลุ่ม ความไว/การดื้อยา

Abstract

Project Code : MRG5680087

Project Title : Development of allele-specific nested multiplex PCR for detection and monitoring of benzimidazole-sensitive/resistant *Brugia malayi* in transmission areas under suppression of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole, part of the National Program to Eliminate Lymphatic Filariasis in Narathiwat Province

Investigator : Apiradee Intarapuk¹, Prapa Nunthawarasilp², Danai Sangthong³, Jinrapa Potikasikorn⁴, Sunsanee Rojanapanus⁵ Adisak Bhumiratana⁶

¹ Department of Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, aintarapuk@hotmail.com

² Fundamental Public Health Department, Burapha University, praparm@hotmail.com

³ Department of Animal Husbandry and Basic Professional Science, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, pdanai@mut.ac.th

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, jinrapa.pho@mahidol.ac.th

⁵ Bureau of Vector Borne Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, srojanapanus@yahoo.com

⁶ Faculty of Public Health, Thammasat University, adisak.bhu@mahidol.ac.th

Project Period : June 1, 2013 – May 31, 2015

Brugian filariasis, a mosquito borne disease, is caused by *Brugia malayi*. In Thailand, the disease has been addressed as public health problem, especially in Narathiwat province where the National Program to Eliminate Lymphatic Filariasis (PELF) had been implemented during years 2002-2011. The Thai PELF employed mass drug administration (MDA) using annual single-dose combination of diethylcarbamazine (DEC) and albendazole, as recommended for the interruption of transmission among eligible persons aged 2 years and over in transmission areas. The program performed post-MDA surveillance during years 2012-2016. The aim of this study was to develop a novel allele-specific nested multiplex PCR as

specific and sensitive assessment tool for detection and monitoring of *B. malayi* infections that carry the alleles responsible for benzimidazole susceptibility or resistance in infected humans, domestic cats and *Mansonia* vectors in the transmission areas. The study areas covered 4 villages of Takbai district, Narathiwat, with less than 90% MDA coverage. Humans and domestic cats were used to identify the presence of microfilarial parasites, whereas *Mansonia* mosquitoes were used in analysis of the infection with any juvenile forms. The rDNA locus-specific PCR was used in detection and identification of *B. malayi* in individual samples. The allele-specific nested multiplex PCR was used in analysis of the infection harboring the alleles responsible for benzimidazole susceptibility or resistance. The results showed that there was no new infection occurring in the populations surveyed, but there were 4 *B. malayi*-infected cases that developed peripheral microfilaremia. All cases related the infections to the presence of the homozygous benzimidazole-sensitive (SS) alleles of β -tubulin gene isotype 1. Among the surveyed domestic cats, *D. immitis* and *B. pahangi* infection rates were 9.2% and 2.6%, respectively. None was infected with *B. malayi*. Based on the entomological surveys, it was likely to show the abundance and distribution of *Mansonia* spp. including *Ma. bonneae*, *Ma. uniformis*, *Ma. dives*, *Ma. Annulata*, and *Ma. Indiana* in both wet and dry seasons, None was found to be infected with any filarial larvae. The findings suggest that the persistent microfilariemia developed in the patients who receiving MDA 2-drugs did not relate the infection to benzimidazole resistance in *B. malayi* populations. It might imply the effective mass treatment of *B. malayi* in the study areas. Moreover, the novel sensitive allele-specific nested multiplex PCR can be used in surveillance and monitoring of the infection whether the selective pressure is associated with benzimidazole resistance in *B. malayi* in transmission areas targeted for the PELFs implementing MDA 2-drugs in Thailand and elsewhere.

Keywords : Allele-specific nested multiplex PCR, Benzimidazole, *Brugia malayi*, Mass drug administration, Sensitivity/Resistance

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
1.2 ขอบเขตของการวิจัย	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	7
2.1 การติดต่อของโรคเท้าช้างจากเชื้อฟิลาเรียชนิด <i>B. malayi</i>	9
2.2 ระบาดวิทยาของเชื้อฟิลาเรียชนิด <i>B. malayi</i> ในประเทศไทย	13
2.3 การวินิจฉัยโรคเท้าช้างบรูเกีย	17
2.4 มาตรการการป้องกันโรคเท้าช้าง	32
2.5 การเฝ้าระวังและการติดตามประเมินผลของโครงการ	34
2.6 การดื้อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล	35
2.7ฤทธิ์ของยาอัลเบนดาโซลต่อเชื้อฟิลาเรียชนิด <i>B. malayi</i>	
และหลักฐานของการดื้อยา ของเชื้อฟิลาเรียชนิด <i>B. malayi</i>	37
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	39
3.1 ประเภทของงานวิจัย	39
3.2 การศึกษานำร่อง (Pilot study) การแพร่กระจายของเชื้อ <i>B. malayi</i>	
ในสัตว์และยุงพาหะ	40
3.3 การศึกษาการกระจายของเชื้อ <i>B. malayi</i> ในคน สัตว์ และยุงพาหะ	
ในพื้นที่ศึกษาจังหวัดนราธิวาส	41

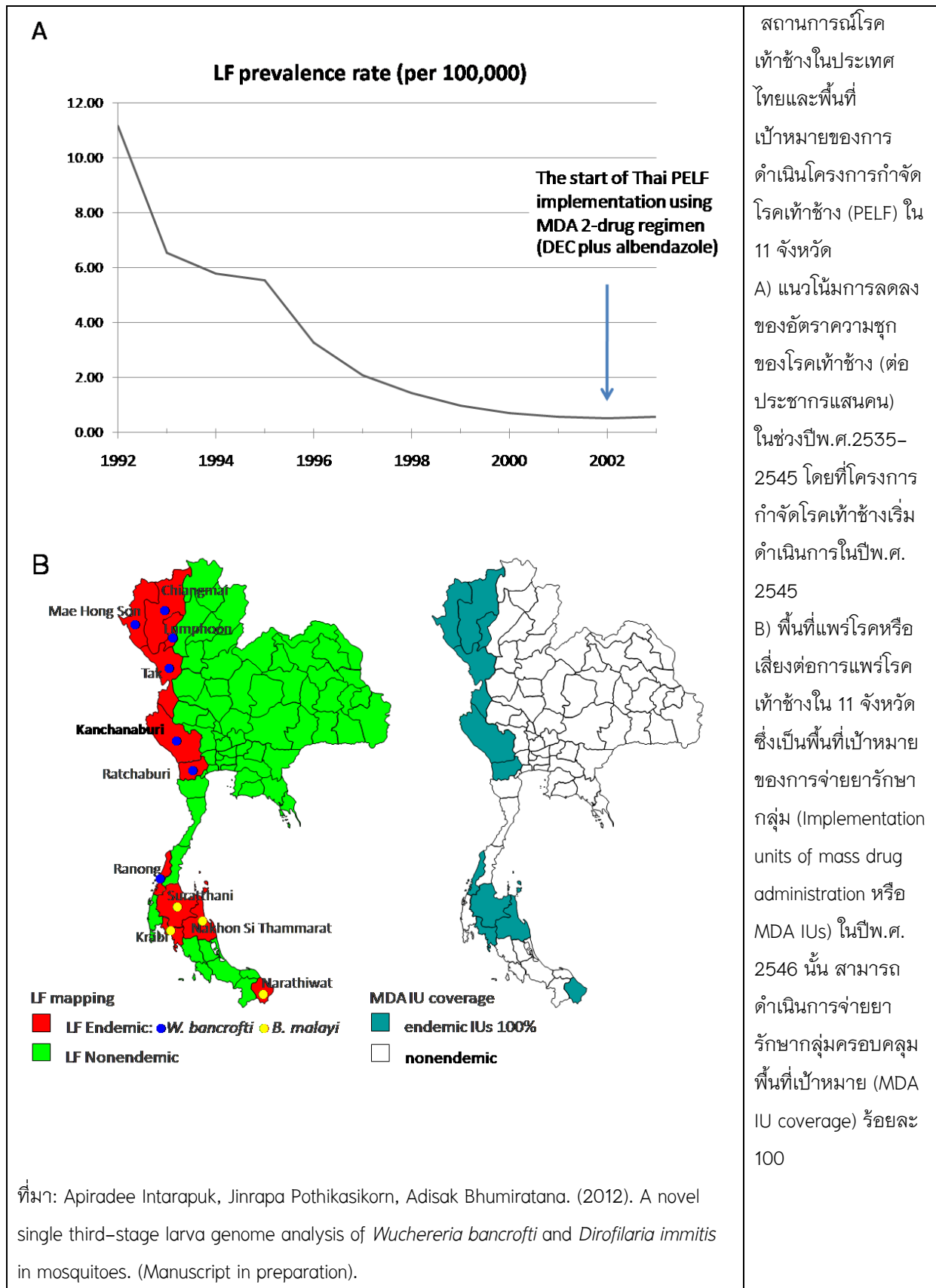
เรื่อง	หน้า
3.5 วิธีการศึกษาในห้องปฏิบัติการ	44
บทที่ 4 ผลการศึกษา	61
4.1 การศึกษานำร่องในพื้นที่ซึ่งมีสภาพทางภูมิศาสตร์และมีการกระจายเชื้อฟิลาเรีย ใกล้เคียงกับพื้นที่ศึกษาในจังหวัดนราธิวาส	61
4.2 การกระจายของเชื้อพยาธิฟิลาเรียในคน สัตว์ และยุง ในอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส	71
4.3 การสำรวจหาการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในสัตว์รังโรค (แมว) ที่อาศัยในพื้นที่แพร่โรคอำเภอตากใบ	76
4.4 การสำรวจหาการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในยุง <i>Mansonia</i> spp. ในพื้นที่แพร่โรคอำเภอตากใบ	77
4.5 ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ	83
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	99
เอกสารอ้างอิง	108
ภาคผนวก	119
ภาคผนวก ก ผลการการสำรวจเชื้อไมโครฟิลาเรียจากคนในพื้นที่ศึกษา	119
ภาคผนวก ข ผลการการสำรวจเชื้อไมโครฟิลาเรียจากตัวอย่างสัตว์	121
ภาคผนวก ค จำนวนและชนิดของยุง <i>Mansonia</i> spp. ที่จำแนกได้ในพื้นที่อำเภอตากใบ	136
ภาคผนวก ง การนำผลงานจากโครงการไปใช้ประโยชน์	140

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญ

โรคเท้าช้าง เป็นโรคติดต่อมาโดยยุงที่เกิดจากเชื้อฟิลาเรียชนิด *Brugia malayi*, *Brugia Trimori* และ *Wuchereria bancrofti* ทั้งยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งสามารถพบโรคเท้าช้างที่มีสาเหตุมาจากเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ *W.bancrofti* ได้ในหลายพื้นที่ สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้ดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปจากประเทศไทย (The National Program to Eliminate Lymphatic Filariasis หรือ PELF) โดยใช้มาตรการหลัก คือ การจ่ายยารักษาในกลุ่มด้วยยาไดเอทิลคาร์บาไมซีน (Diethylcarbamazine citrate หรือ DEC) ชนิดเม็ดรับประทาน ขนาด 6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาอัลเบนดาโซล (Albendazole หรือ ABZ) ชนิดเม็ดรับประทาน ขนาด 400 มิลลิกรัม ให้แก่ประชากรตั้งแต่อายุ 2 ปีขึ้นไป ที่อาศัยอยู่ในหมู่บ้านซึ่งเป็นพื้นที่แพร่โรคหรือเสี่ยงต่อการแพร่โรคเท้าช้างใน 11 จังหวัด ได้แก่ แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี ระนอง สุราษฎร์ธานี กระบี่ นครศรีธรรมราช และนราธิวาส (รูปที่ 1.1) โดยจ่ายยารักษาในกลุ่มปีละครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 5 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2545-2549 และดำเนินการเฝ้าระวังต่อเนื่องระหว่างปี 2550-2554 จนกระทั่งในปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง สามารถหยุดการจ่ายยารักษาในกลุ่มได้ใน 10 จังหวัดที่เป็นพื้นที่เป้าหมายของการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไป ยกเว้นจังหวัดนราธิวาส และภายในปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 สามารถเตรียมความพร้อมการประเมินจากผู้เชี่ยวชาญองค์การอนามัยโลกเพื่อการประกาศปลอดโรคเท้าช้างและหาแนวทางในการดำเนินงานโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในพื้นที่แพร่โรคของจังหวัดนราธิวาส ซึ่งยังไม่สามารถหยุดการจ่ายยารักษาในกลุ่มได้

โครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาสนั้น มีสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนราธิวาสเป็นหน่วยงานหลักในการจ่ายยารักษาในกลุ่ม และจากผลการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 จังหวัดนราธิวาส มีพื้นที่เป้าหมายของการจ่ายยารักษาในกลุ่มมีจำนวนทั้งหมด 87 กลุ่มบ้าน ซึ่งเป็นพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* และยังคงเป็นจังหวัดเดียวที่ยังไม่ผ่านเกณฑ์การหยุดจ่ายยารักษาตามโครงการกำจัดโรคเท้าช้างได้ โดยพบว่า มีอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย (Microfilarial positive rate หรือ MPR) ในระหว่างปีพ.ศ. 2550-2554 ซึ่งผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียนั้น เป็นผู้ป่วยรายเก่าและรายใหม่



รูปที่ 1.1 สถานการณ์โรคเท้าช้างในประเทศไทยและพื้นที่เป้าหมายของการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง (PELF) ใน 11 จังหวัด

สถานการณ์โรคเท้าช้างในประเทศไทยและพื้นที่เป้าหมายของการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง (PELF) ใน 11 จังหวัด

A) แนวโน้มการลดลงของอัตราความชุกของโรคเท้าช้าง (ต่อประชากรแสนคน) ในช่วงปีพ.ศ.2535-2545 โดยที่โครงการกำจัดโรคเท้าช้างเริ่มดำเนินการในปีพ.ศ. 2545

B) พื้นที่แพร่โรคหรือเสี่ยงต่อการแพร่โรคเท้าช้างใน 11 จังหวัด ซึ่งเป็นพื้นที่เป้าหมายของการจ่ายยารักษา (Implementation units of mass drug administration หรือ MDA IUs) ในปีพ.ศ. 2546 นั้น สามารถดำเนินการจ่ายยารักษาครอบคลุมพื้นที่เป้าหมาย (MDA IU coverage) ร้อยละ 100

จากการประชุมคณะผู้เชี่ยวชาญโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค ได้พิจารณาสาเหตุสำคัญสองเรื่องในการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาสที่ยังไม่สามารถหยุดการจ่ายยารักษากลุ่มได้ คือ 1) ผลการจ่ายยารักษาในกลุ่มในช่วงปีพ.ศ. 2545-2549 มีความครอบคลุมต่ำกว่าร้อยละ 80 ในบางปี เนื่องจากบางหมู่บ้าน/กลุ่มบ้าน ไม่สามารถเข้าดำเนินการจ่ายยารักษากลุ่มได้หรือจ่ายยาได้น้อย และ 2) ผลการประเมินหลังการจ่ายยารักษากลุ่มโดยการเจาะโลหิต ไม่สามารถดำเนินงานได้ครบถ้วนและต่อเนื่อง แต่ยังคงพบผู้ป่วยรายใหม่ ดังนั้นสาระสำคัญของปัญหาอุปสรรคการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาส สามารถสรุปประเด็นที่น่าสนใจ ดังนี้ คือ:-

1. ผลการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาสในช่วงปีพ.ศ. 2545-2549 นั้น มีจำนวน 73 กลุ่มบ้าน (ร้อยละ 83.9) ได้รับการจ่ายยารักษากลุ่มครบ 5 ปี ในขณะที่ มีจำนวน 14 กลุ่มบ้าน (ร้อยละ 16.1) ไม่ได้รับการจ่ายยารักษากลุ่มครบ 5 ปี
2. ผลการจ่ายยารักษากลุ่มตามโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง มีความครอบคลุมการจ่ายยารักษา (MDA coverage) มากน้อยแตกต่างกันในช่วงปีพ.ศ. 2545-2552 โดยพบว่า มีความครอบคลุม ร้อยละ 94.6, 78.9, 75.2, 85.9, 45.6, 83.9, 95.6 และ 94.9 ตามลำดับ หรืออีกนัยหนึ่ง มีความครอบคลุมของการจ่ายยารักษาในพื้นที่กลุ่มบ้านแพร่โรคทั้งหมด โดยเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 80 กลุ่มบ้านที่ได้รับการจ่ายยารักษาสูงกว่าร้อยละ 80 มีจำนวน 84 กลุ่มบ้าน (ร้อยละ 96.6) และกลุ่มบ้านที่ได้รับการจ่ายยารักษาอยู่ในช่วงร้อยละ 65-80 มีจำนวน 3 กลุ่มบ้าน (ร้อยละ 3.4)
3. ผลการประเมินหลังจากการจ่ายยารักษาตามโครงการกำจัดโรคเท้าช้างโดยการเจาะโลหิตในช่วงปีพ.ศ. 2545-2552 ยังคงพบว่า มีผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียมากน้อยแตกต่างกัน คือ มีจำนวน 45, 23, 17, 34, 9, 15, 5 และ 17 ราย ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการประเมินผลการจ่ายยารักษาในช่วงปีพ.ศ. 2550-2552 พบผู้ป่วยรายใหม่ โดยที่การสอบสวนโรคในผู้ป่วยรายใหม่ทุกรายนั้น พบว่า เป็นการติดเชื้อในพื้นที่ทั้งหมด เป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิง อายุส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 45 ปี ขึ้นไป

ปีดำเนินการ ประเมิน	ความครอบคลุม				จำนวนผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย (ร้อยละ)
	พื้นที่แพร่โรค (กลุ่มบ้าน)	ประชากร (คน)	จำนวนประชากรสำรวจโดยการเจาะโลหิต (คน)	ร้อยละของความครอบคลุม	
2550	31	26,687	16,268	60.96	15 (0.09)
2551	35	27,545	18,681	67.82	5 (0.03)
2552	40	22,571	16,936	75.03	17 (0.1)

4. ผลการควบคุมโรคในแมวในพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* โดยการเจาะโลหิตแมวทุกตัวในพื้นที่แพร่โรค พร้อมกับให้การรักษากลุ่มโดยการฉีดยา ivermectin ในช่วงปีพ.ศ. 2550-2552 พบว่า มีการติดเชื้อ *Brugia* spp. ในแมวโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงมากกว่าร้อยละ 1.0

คณะผู้วิจัย ซึ่งประกอบด้วยผู้เชี่ยวชาญโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง ได้เฝ้าติดตามสถานการณ์โรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาส และพิจารณาเห็นความสำคัญของปัญหาและอุปสรรคการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาส ซึ่งจะทวีความยุ่งยากซับซ้อนมากขึ้นเรื่อย ๆ และไม่ว่าจะเป็นผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมจากความไม่สงบทางการเมืองในพื้นที่ 3 จังหวัดชายแดนหรือไม่ก็ตาม หน่วยงานรับผิดชอบหลักและหน่วยงานสนับสนุนต่าง ๆ ทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาคจำเป็นต้องดำเนินการหาแนวทางเชิงยุทธศาสตร์สำหรับการบริหารจัดการโครงการกำจัดโรคเท้าช้างให้เหมาะสมสอดคล้องกับสภาพปัญหาของพื้นที่ และค้นหาแนวทางใหม่ ๆ ในการศึกษาพลวัตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ทั้งในคน แมว และยุงพาหะ *Mansonia* spp. ในพื้นที่แพร่โรคหรือเสี่ยงต่อการแพร่โรคโดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการจ่ายยารักษากลุ่มในเกณฑ์ต่ำ เหตุผลสำคัญคือ ในสภาวะการกีดด้วยยารักษากลุ่มในพื้นที่จังหวัดนราธิวาส หลายพื้นที่ที่ได้รับการจ่ายยารักษากลุ่มอย่างต่อเนื่อง แต่บางพื้นที่กลับได้รับการจ่ายยารักษากลุ่มอย่างไม่ต่อเนื่อง เชื้อหนอนพยาธิ *B. malayi* ย่อมสามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาวะการกีดด้วยยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกีดด้วยยาอัลเบนดาโซล สามารถกระตุ้นให้เชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียที่มีความสำคัญทางสัตวแพทย์และทางการแพทย์ มีการตอบสนองในลักษณะการดื้อยา ซึ่งเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์ของยีน β -tubulin โดยที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง 200 จาก phenylalanine ไปเป็น tyrosine (Bhumiratana et al, 2010; 2012; Pechgit et al, 2011) และสามารถแพร่เชื้อได้โดยติดต่อจากแมวที่ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียไปสู่แมวตัวอื่น ๆ และติดต่อจากแมวที่ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียไปสู่คน ถ้าเราไม่สามารถติดตามการปรับตัวของเชื้อหนอนพยาธิ *B. malayi* ซึ่งยังคงแพร่เชื้อได้ในพื้นที่จังหวัดนราธิวาส ย่อมส่งผลกระทบต่อควบคุมโรคในแมว และการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างได้อย่างมีประสิทธิภาพประสิทธิผลได้ ซึ่งก็หมายถึงว่า จะมีจำนวนผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียและผู้ป่วยระยะเรื้อรังทางระบบน้ำเหลืองเพิ่มสูงขึ้นมาอีก และยิ่งทำให้เกิดภาระค่าใช้จ่ายสูงขึ้นในการเฝ้าระวัง การป้องกัน และการควบคุมโรคเท้าช้าง รวมถึงการให้บริการรักษาและดูแลสุขภาพของประชาชนในจังหวัดนราธิวาสอย่างไม่ทั่วถึง

ดังนั้น คณะผู้วิจัย จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจเชื้อหนอนพยาธิ *B. malayi* ในคน แมว และยุงพาหะ ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ และยังไม่มี การตีพิมพ์เผยแพร่มาก่อน โดยสามารถตรวจหาและติดตามการเปลี่ยนแปลงอัลลีลของยีน β -tubulin ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยา กลุ่มเบนซิมิดาโซล (ยาอัลเบนดาโซล) การวิจัยนี้ จะเป็นจุดเชื่อมและจุดนำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่และนำไปสู่การถ่ายทอดองค์ความรู้/นวัตกรรมให้แก่หน่วยงานรับผิดชอบหลักและหน่วยงานสนับสนุนการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศไทยที่กำลังเผชิญปัญหาอุปสรรคอยู่ และช่วยให้เกิด

ความสำเร็จในการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างทั่วโลกในระยะ post-genomic MDA evaluation ในอนาคต

1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1.1 วัตถุประสงค์ทั่วไป

การวิจัยครั้งนี้ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจหาและศึกษาปรากฏการดี้อยากของพยาธิฟิลาเรียในคน แมว และยุงพาหะด้วยวิธี Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและติดตามการดี้อยากกลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิ *Brugia malayi* ในพื้นที่ระบาดของโรคเท้าช้าง และใช้ในการประเมินความสำเร็จของโครงการการให้ยากกลุ่มในประชากรที่อาศัยในพื้นที่เสี่ยงต่อโรค โดยการใช้ยา ร่วมกันระหว่าง Diethylcarbamazine และ Albendazole ครอบคลุมประชากรทั้งพื้นที่ภายใต้โครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศ ในจังหวัดนราธิวาส

1.1.2 วัตถุประสงค์เฉพาะ

- 1) เพื่อพัฒนาวิธี Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อใช้ในการศึกษายีน β -tubulin ของพยาธิ *B. malayi* ซึ่งเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการดี้อยากกลุ่มเบนซิมิดาโซลและสามารถบ่งชี้ถึงการเคยได้สัมผัสกับยากกลุ่มเบนซิมิดาโซลของตัวพยาธิ และด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถนำไปใช้ในเฝ้าระวังและติดตามประเมินความสำเร็จของโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในประเทศไทย
- 2) เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อพยาธิในกลุ่มประชากรคน แมว และยุงพาหะในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศไทยซึ่งมีความครอบคลุมการจ่ายยารักษา (MDA coverage) ด้วยยา Diethylcarbamazine ร่วมกับ Albendazole น้อยกว่าร้อยละ 90
- 3) เพื่อประเมินความสำเร็จของโครงการการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศ (PELF) ในจังหวัดนราธิวาส ด้วยการใช้วิธีการให้ยากกลุ่มครอบคลุมทั้งประชากร ด้วยยา Diethylcarbamazine ร่วมกับ Albendazole

1.2 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ส่วนหนึ่งเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาวิธีการในระดับชีวโมเลกุลเพื่อใช้ในการตรวจหาจำแนกเชื้อและตรวจการดี้อยากกลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิฟิลาเรียในส่วนของการศึกษาในภาคสนาม เป็นการหาความชุกของการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในคน แมว และของยุง *Mansonia spp.* ซึ่งเป็นยุงพาหะของโรค รวมทั้งหาวิเคราะห์การเกิดการดี้อยากกลุ่ม

เบนซิมิดาโซลของพยาธิในพื้นที่ซึ่งมีการใช้ยาในกลุ่มนี้อยู่เป็นประจำ โดยทำการศึกษาในพื้นที่มีการระบาดของโรคเท้าช้างที่มีสาเหตุมาจากเชื้อพลาเรียชนิด *B. malayi* และอยู่ในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศ โดยคัดเลือกพื้นที่ในจังหวัดนราธิวาสซึ่งมีทั้งหมด 87 กลุ่มบ้าน กลุ่มตัวอย่างถูกกำหนดจาก กลุ่มบ้านที่อยู่ในพื้นที่อำเภอตากใบ เป็นพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างซึ่งเคยพบผู้ป่วยในพื้นที่นั้นๆ และมีความคลุมการจ่ายยารักษากลุ่ม (MDA coverage) ในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศในช่วงปีพ.ศ. 2545-2552 โดยกำหนดกลุ่มที่มีความครอบคลุมการจ่ายยารักษา กลุ่ม ด้วยยา Diethylcarbamazine ร่วมกับ Albendazole น้อยกว่าร้อยละ 90 โดยเลือกศึกษาเป็นจำนวนทั้งหมด 4 กลุ่มบ้าน

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

โรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) เป็นโรคที่เกิดพยาธิสภาพและความผิดปกติบริเวณต่อน้ำเหลืองและทำให้เกิดการขยายใหญ่ของอวัยวะส่วนปลาย เช่น แขนและขา จนกลายเป็นภาวะทุพพลภาพอย่างถาวรได้ โรคนี้สามารถติดต่อโดยมียุงเป็นพาหะ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้แก่เชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *Brugia malayi*, *Brugia timori* และ *Wuchereria bancrofti* ซึ่งเป็นพยาธิตัวกลมในวงศ์ฟิลาเรียโออีดี (Filarioidea) เป็นโรคที่ก่อปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขในปัจจุบันในหลายประเทศ โดยองค์การอนามัยโลกได้รายงานการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียในประชากรมากกว่า 120 ล้านคนใน 80 ประเทศในพื้นที่เสี่ยง ซึ่งมีผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคเท้าช้างอย่างชัดเจนถึงประมาณ 40 ล้าน นอกจากนี้ยังพบว่ามากกว่า 120 ล้านล้านคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่แพร่โรคและมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหนอนพยาธินี้ โดยประมาณร้อยละ 70 ของพื้นที่เสี่ยงครอบคลุมในภูมิภาคเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกา และอเมริกา อีกประมาณร้อยละ 30 อยู่ในภูมิภาคแอฟริกา (ตารางที่ 2.1) ซึ่งประมาณร้อยละ 90 ของผู้ติดเชื้อทั้งหมด พบเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *W. bancrofti* ซึ่งพบการกระจายการติดเชื้อตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ทั่วโลก ที่เหลืออีกประมาณเกือบร้อยละ 10 พบการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ซึ่งพบการกระจายการติดเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทยและจีน (จีนตอนใต้) สำหรับการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรีย ชนิด *B. timori* นั้น พบได้น้อยมากและพบเฉพาะในพื้นที่แถบตะวันออกเฉียงของประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น (WHO, 1992; 1999b; 2002; Michael et al, 1996)

ตารางที่ 2.1 การกระจายของเชื้อฟิลาเรียทั่วโลก (อดิศักดิ์ และอภิรดี, 2558)

ภูมิภาค (ประเทศ)	จำนวนประชากร เสี่ยง (ล้านคน)	ประเทศและอาณานิคม
รวมทุกภูมิภาค (81)	1,343.2	
ภูมิภาคเอเชียใต้-เอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้ (9)	873.3	Bangladesh, India, Indonesia, Maldives, Myanmar, Nepal, Sri Lanka, Thailand, Timor- Leste
ภูมิภาคแอฟริกา (39)*	405.9	Angola (12,090,000), Benin (5,282,204), Burkina Faso (15,411,849), Burundi, Cameroon (14,305,000), Cape Verde, Central African Republic (3,300,000), Chad

		(7,270,000), Comoros (514,110), Congo (2,600,000), Côte d'Ivoire (14,000,000), Democratic Republic of Congo (49,140,000), Equatorial Guinea (420,000), Eritrea (3,577,000), Ethiopia (30,000,000), Gabon (1,290,600), Gambia (1,200,000), Ghana (11,587,953), Guinea (6,067,135), Guinea-Bissau (1,311,741), Kenya (3,031,878), Liberia (3,600,000), Madagascar (17,948,748), Malawi (12,887,248), Mali (13,798,000), Mauritius, Mozambique (15,538,610), Niger (11,465,194), Nigeria (70,650,902), Rwanda, Sao Tome and Principe (410,000), Senegal (5,314,600), Seychelles, Sierra Leone (5,319,758), Togo (1,191,720), Uganda (13,264,445), United Republic of Tanzania (37,369,939), Zambia (8,780,000), Zimbabwe (6,000,000)
ภูมิภาคแปซิฟิก ตะวันตก และภูมิภาค ลุ่มแม่น้ำโขง (6)	32.1	Brunei Darussalam, Cambodia, Lao People's Democratic Republic, Malaysia, Philippines, Viet Nam
ภูมิภาคเมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออก (3)	12.6	Egypt, Sudan, Yemen
ภูมิภาคอเมริกา (7)	11.3	Brazil, Costa Rica, Dominican Republic, Guyana, Haiti, Suriname, Trinidad and Tobago
ภูมิภาคแปซิฟิก (17)	5.8	American Samoa, Cook Islands, Fiji, French Polynesia, Kiribati, Marshall Island, Micronesia, New Caledonia, Niue, Palau, Papua New Guinea, Samoa, Solomon Islands, Tonga, Tuvalu, Wallis and Futuna

2.1 การติดต่อของโรคเท้าช้างจากเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi*

พยาธิตัวกลมในกลุ่มบรูเกีย (*Brugia* spp.) เป็นพยาธิที่อาศัยอยู่ในระบบไหลเวียนโลหิตโดยพยาธิตัวอ่อนพบอยู่ในกระแสเลือดและพยาธิตัวแก่อาศัยอยู่ในบริเวณต่อมน้ำเหลืองซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มของพยาธิที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis) ในมนุษย์ อาการแสดงของโรคนั้นมีตั้งแต่ไม่ปรากฏอาการใดๆ (asymptomatic microfilaremia) ถึงมีการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองและท่อน้ำเหลือง (acute lymphatic inflammation) จนกระทั่งเข้าสู่ระยะเรื้อรัง (chronic lymphatic pathology) เกิดพยาธิสภาพที่อวัยวะส่วนปลายเนื่องจากการอุดตันของบริเวณต่อมน้ำเหลืองซึ่งทำให้อวัยวะขยายใหญ่เกิดเป็นภาวะอวัยวะช้าง (elephantiasis) ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะทุพพลภาพและพิการอย่างถาวรจนไม่สามารถกลับมาใช้ชีวิตได้เป็นปกติ เชื้อก่อโรคที่สำคัญได้แก่ *B. malayi* และ *B. timori* ซึ่งพบการระบาดได้ในเขตร้อนและเขตร้อนของทวีปเอเชียได้แก่ประเทศ อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย เวียดนาม เกาหลี จีน และอินเดีย เชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* สามารถแยกออกเป็น 2 สายพันธุ์ตามลักษณะของการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อ คือสายพันธุ์มีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเฉพาะในเวลากลางคืน (Nocturnal periodic strain) ส่วนใหญ่พบการติดเชื้อในคน และสายพันธุ์มีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดในเวลากึ่งกลางคืน (Nocturnal subperiodic strain) ซึ่งพบการติดเชื้อได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยเฉพาะแมวและลิง พยาธิทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีการกระจายในพื้นที่แตกต่างกัน และมีช่วงเวลาของการปรากฏตัวในกระแสเลือดสูงสุดในช่วงวันของแต่ละพื้นที่ต่างกัน (Partono and Purnomo, 1987) พยาธิฟิลาเรียชนิด *B. timori* เป็นพยาธิที่มีรูปร่าง ลักษณะและการก่อโรคคล้ายกับพยาธิ *B. malayi* แต่พบเป็นสาเหตุของการก่อโรคได้เฉพาะในคน มีการกระจายของเชื้อพยาธิชนิดนี้ในพื้นที่ค่อนข้างจำกัดในเขตพื้นที่ฝั่งตะวันออกของประเทศ อินโดนีเซีย และติมอร์ เลสเต (Fischer et al, 2004) ซึ่งพบเฉพาะมีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเฉพาะกลางคืน (Nocturnal periodic strain) เท่านั้น (Supali et al, 2002)

พยาธิ *B. malayi* สามารถติดต่อได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยผ่านทางพาหะนำโรคที่สำคัญคือยุง การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อตามวัฏจักรของการแพร่เชื้อสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ติดต่อในคน (human strain) และสายพันธุ์ที่ติดต่อในสัตว์ (animal strain) จากการศึกษการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของโฮสต์พบว่าเชื้อพยาธิสายพันธุ์ human strain พบการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียได้ทั้งแบบ nocturnal periodic และ nocturnal subperiodic ในขณะที่สายพันธุ์ animal strain ส่วนใหญ่จะพบการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดแบบ nocturnal subperiodic ได้มากกว่า (McNulty et al, 2013)

วงชีวิตของพยาธิ *B. malayi* สายพันธุ์ human strain ในช่วงของวงชีวิตที่อาศัยอยู่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ พบว่าพยาธิจะติดต่อและพัฒนาอยู่ในโฮสต์ที่เป็นคน (anthroponosis) เท่านั้น เมื่อยุงพาหะกัดผู้ที่ติดเชื้อมีตัวไมโครฟิลาเรียซึ่งเป็นตัวอ่อนที่มีปลอกหุ้มตัวอยู่

ในกระแสเลือด ยุงจะดูดเลือดที่มีตัวอ่อนไมโครพลาเรียลงสู่กระเพาะ ตัวอ่อนจะสลัดเปลือกหุ้มลำตัว ออกและพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะ L1 จากนั้นจะไชทะลุกระเพาะเข้าไปฝังอยู่ตามกล้ามเนื้อหน้าอกของ ยุง ในบริเวณนี้ตัวอ่อนพยาธิจะมีการลอกคราบ 2 ครั้ง จากตัวอ่อนระยะ L1 ไปเป็น L2 และ L3 ซึ่ง เจริญต่อไปเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อ (infective filariform larvae) และเคลื่อนที่ไปสู่อวัยวะดูดเลือดที่ส่วน หัว (proboscis) ของยุง เมื่อยุงกัดคน ตัวอ่อนระยะ L3 จะเข้าสู่ผิวหนังและไปตามต่อมน้ำเหลือง ตัวอ่อน เหล่านี้ใช้ระยะเวลานานในการเจริญไปเป็นตัวแก่ ตัวผู้และตัวเมียอาศัยในต่อมน้ำเหลืองของคนได้นาน โดยไม่แสดงอาการหรืออาจก่อให้เกิดอาการแพ้เฉียบพลันในระยะเวลาไม่กี่เดือนหลังติดเชื้อ (Rogers and Denham, 1975; Rogers et al, 1975) และเมื่อพยาธิตัวแก่โตเต็มที่ตัวเมียจะปล่อยไมโครพลาเรีย ในกระแสเลือดต่อไป

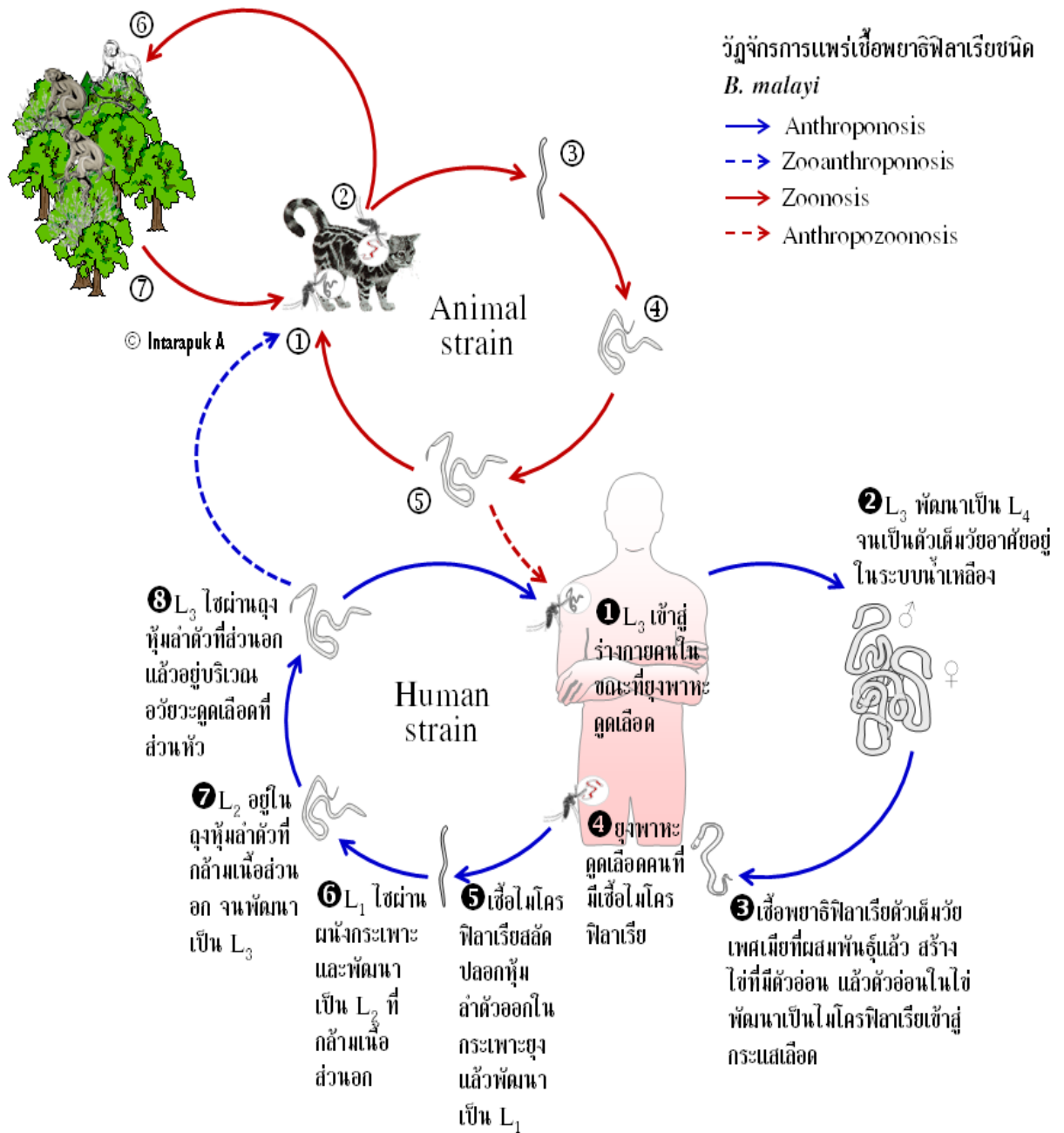
วงชีวิตของเชื้อ *B. malayi* ซึ่งสายพันธุ์ animal strain พบการติดต่อได้ในสัตว์ (zoonosis) มี โฮสต์ที่เป็นแหล่งรังโรคในสัตว์จำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและลิง มีการพัฒนาตัวอ่อนจากระยะไมโครพ ลารียไปสู่ L3 ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อกายสู่สัตว์รังโรค คล้ายกับสายพันธุ์ human strain สัตว์รัง โรคที่ถูกยุงกัดจะได้รับตัวอ่อนระยะติดต่อ L3 ของเชื้อฟิลาเรียเข้าสู่กระแสเลือดและสามารถพัฒนาไป เป็นตัวแก่ทั้งตัวผู้และตัวเมียได้ จากนั้นเมื่อมีการผสมพันธุ์ตัวเมียจะผลิตไมโครพลาเรีย เข้าสู่กระแส เลือดและแพร่กระจายเชื้อไปสู่สัตว์ตัวอื่นๆ ผ่านทางยุงพาหะ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้เชื่อได้ว่า เชื้อฟิลาเรียสายพันธุ์ animal strain นอกจากจะมีการติดต่อระหว่างสัตว์แล้วยังสามารถกระจายเชื้อ ไปสู่คน (anthropozoonosis) ได้อีกด้วย โดยทั่วไปจะพบการติดเชื้อระหว่างแมวและมีการแพร่จากแมว ไปสู่ลิงหรือไปสู่คนได้ โดยเชื้อในสายพันธุ์ animal strain นี้ยังสามารถติดต่อระหว่างคนสู่คนโดยผ่าน ทางยุงพาหะและก่อให้เกิดโรคในคน อีกทั้งยังสามารถติดต่อกับคนกลับมาสู่สัตว์รังโรค (zoonanthroposis) ได้แก่แมวอีกด้วย ซึ่งจากข้อสันนิษฐานนี้ เพียงการแสดงออกลักษณะที่ปรากฏ ออกมาทางกายภาพ (phenotype) ไม่เพียงพอที่จะพิสูจน์ได้ว่าเชื้อไมโครพลาเรียที่พบในคนและสัตว์ใน พื้นที่แพร่โรคเป็นสายพันธุ์ใดและมีความสัมพันธ์กันระหว่างเชื้อพยาธิฟิลาเรียที่พบในคนและสัตว์ใน พื้นที่เดียวกันหรือไม่ ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดๆ ที่สามารถพิสูจน์ความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างเชื้อ *B. malayi* สายพันธุ์ human และ animal strains รวมทั้งยังไม่มีเครื่องมือใดที่สามารถใช้ในการ จำแนกเชื้อ *B. malayi* สายพันธุ์ human strain ออกจาก animal strain ได้ ดังนั้นการพบการ กระจายของเชื้อ *B. malayi* ในคน สัตว์รังโรค และยุงพาหะในพื้นที่แพร่โรคหนึ่งๆ อาจมีหรือไม่มี ความสัมพันธ์กันโดยตรงที่เกิดจากแหล่งแพร่เชื้อเดียวกันก็เป็นได้

เชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal periodic strain มียุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะที่สำคัญ ซึ่งมีชีวิตวัยออกหากินเลือดในเวลากลางคืนจึงสัมพันธ์กับช่วงเวลาการปรากฏ ตัวของเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดในช่วงเวลากลางคืน โดยพบยุงชนิดนี้มีแหล่งเพาะพันธุ์และหา กินในพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรมที่เป็นพื้นที่โล่งแจ้ง ส่วนเชื้อ *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal

subperiodic strain มียุงเสือ (*Mansonia* spp.), ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) และยุงลาย (*Aedes* spp.) เป็นยุงพาหะที่สำคัญ ยุงเสือ *Mansonia* spp. มีแหล่งเพาะพันธุ์ (breeding site) บริเวณแหล่งน้ำในป่าพรุ ซึ่งมีลักษณะเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีพืชน้ำลึกๆ เช่น จอก แหน หรือพืชน้ำอื่นๆ ปกคลุมผิวน้ำอยู่

ชีวนิสัยของยุงเสือ *Mansonia* spp. ตัวแก่เพศเมียชอบออกหากินในช่วงหัวค่ำและส่วนใหญ่พบบริเวณภายนอกอาคารบ้านเรือนมากกว่าภายในอาคาร ในขณะที่มักวางไข่ในแหล่งน้ำสะอาดตามธรรมชาติ โดยยุงตัวแก่มักชอบวางไข่บริเวณรากของพืชน้ำเนื่องจากตัวอ่อนระยะลูกน้ำและตัวโง่งของยุงเสือต้องใช้ออกซิเจนโดยตรงจากพืชน้ำนั้นๆ ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้จำนวนยุงที่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวแก่มีความสัมพันธ์กับจำนวนของพืชน้ำด้วย การเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นที่ในบริเวณพื้นที่แพร่โรค (transmission area หรือ TA) เพื่อนำพื้นที่นั้นมาใช้ประโยชน์ การเปลี่ยนแปลงสภาพป่ารวมทั้งการเกิดมลภาวะที่เพิ่มมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ลดการเจริญพันธุ์ของยุงเสือได้ และส่งผลตามมาก็คือการแพร่กระจายโรคในพื้นที่ก่อโรคลดลงด้วย

พยาธิ *B. timori* เป็นพยาธิฟิลาเรียที่มีคนเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ มีวงจรชีวิตของพยาธิที่คล้ายคลึงกับพยาธิ *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal periodic strain ส่วนการแพร่กระจายของเชื้อในสัตว์ ยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจนในปัจจุบัน แต่พบการระบาดของโรคในคนโดยผ่านทางยุงก้นปล่อง *A. barbirostris* เท่านั้น ในบางการศึกษาพบว่าเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. timori* สามารถพัฒนาไปสู่ระยะต่างๆ ในยุง *Aedes togoi* ในห้องปฏิบัติการได้ โดยทั่วไปยุง *A. barbirostris* เป็นยุงที่มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ง่าย สามารถเพาะพันธุ์ได้ในพื้นที่เกษตรกรรมในพื้นที่ลุ่ม แหล่งน้ำใกล้นาข้าวและคลองชลประทาน ในประเทศอินโดนีเซียสามารถพบยุงเหล่านี้ได้ ในหลายพื้นที่ ได้แก่ เกาะฟลอเรส ชัมบา เลมบาตา อลอร์ และอาร์ชีเปลาโก ซึ่งเป็นพื้นที่ที่พบความชุกของการติดเชื้อ *B. timori* ค่อนข้างสูง (Supali et al, 2002) ในขณะที่ประเทศไทยและมาเลเซียยังไม่พบว่ายุงชนิดนี้สามารถนำเชื้อพยาธิ *B. malayi* ได้ โดยการระบาดทั่วไปของเชื้อพยาธิ *B. timori* บริเวณพื้นที่ภาคกลางของหมู่เกาะเท่านั้น ซึ่งต่างจากการระบาดของเชื้อพยาธิ *W. bancrofti* ในพื้นที่เดียวกันซึ่งมียุง *A. subpictus* เป็นยุงพาหะที่สำคัญในพื้นที่นี้ ซึ่งมีแหล่งเพาะพันธุ์ในแหล่งน้ำกร่อยบริเวณรอบชายฝั่ง



รูปที่ 2.1 วงชีวิตของพยาธิ *B. malayi* สายพันธุ์ human strain และ animal strain เชื้อสายพันธุ์ human strain พบการกระจายในคน เชื้อสายพันธุ์ animal strain พบได้ในคนและสัตว์จำพวกแมวและลิง เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีวงชีวิต 2 ช่วงคือช่วงที่อยู่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และช่วงที่อยู่ในยุงพาหะซึ่งมีการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อ (infective filariform larvae)

ที่มา อติศักดิ์ และอภิรดี (2558)

2.2 ระบาดวิทยาของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในประเทศไทย

ประเทศไทยพบการระบาดของโรคเท้าช้างซึ่งนำโดยเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในแถบภาคใต้ ก่อนเริ่มการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อพยาธิในพื้นที่เกิดโรคในปีพ.ศ. 2494 มีรายงานสำรวจเบื้องต้นกระทรวงสาธารณสุขการพบโรคซึ่งผู้ป่วยแสดงอาการเท้าช้าง (elephantiasis) ใน 10 จังหวัดภาคใต้ได้แก่ ปัตตานี นราธิวาส พัทลุง นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ชุมพร ยะลา กระบี่ ตรัง และระนอง โดยพื้นที่ซึ่งพบผู้ป่วยที่แสดงพยาธิสภาพของโรคเท้าช้างส่วนใหญ่จะอยู่ในแถบทางฝั่งตะวันออกของภาคใต้ได้แก่จังหวัดปัตตานี นราธิวาส พัทลุง นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และชุมพร ซึ่งในจังหวัดนครศรีธรรมราชพบผู้ป่วยแสดงอาการถึง 1,246 ราย รองลงมาคือจังหวัดปัตตานีพบผู้ป่วยจำนวน 603 ราย พบว่าการกระจายของโรคทางภาคใต้ของประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับการกระจายของปาพรซึ่งพบมากในแถบชายฝั่งตะวันออก ส่วนในจังหวัดยะลา ตรัง กระบี่และระนองซึ่งไม่อยู่ในพื้นที่ชายฝั่งตะวันออกพบการเกิดโรคเล็กน้อยกระจายอยู่ในบางพื้นที่และผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ที่ติดเชื้อมาจากพื้นที่แพร่โรค (TA) อื่นๆ กระทั่งในปี พ.ศ. 2494-2495 โดยการศึกษาของ Iyengar (1953) ทำการสำรวจโรคเท้าช้างและการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศ ครอบคลุมพื้นที่ในจังหวัดปัตตานี พัทลุง นครศรีธรรมราชและสุราษฎร์ธานี การสำรวจครั้งนี้ใช้วิธีเยี่ยมบ้าน (house to house visits) ในช่วง 20.00 – 12.00 น. เก็บเลือดทุกคนที่อาศัยในบ้านยกเว้นเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี เป้าหมายของการเก็บตัวอย่างในกลุ่มประชากรคือ 15% – 30% ของจำนวนประชากรทั้งหมดในหมู่บ้าน ใช้วิธีการตรวจหาไมโครฟิลาเรียด้วยฟิล์มสไลด์หนา การศึกษาครั้งนี้พบมีการกระจายเชื้อ *B. malayi* ทั้ง 4 จังหวัดที่ทำการศึกษา โดยในพื้นที่แพร่โรคที่มีความเสี่ยงสูงพบอัตราความชุกของการติดเชื้อ *B. malayi* สูงถึงร้อยละ 20-30 พบผู้ป่วยแสดงอาการร้อยละ 5-10 ต่อมาในปี 2504 กระทรวงสาธารณสุขได้จัดตั้งแผนกโรคเท้าช้างในกองควบคุมไข้มาลาเรียและโรคเท้าช้างเพื่อควบคุมโรค และได้ทำการสำรวจโรคในจังหวัดนราธิวาสพบการติดเชื้อ *B. malayi* ในอัตราการตรวจพบเชื้อร้อยละ 7.3 และได้เริ่มโครงการควบคุมโรคเท้าช้างตั้งแต่ปี 2504 จนถึงปี 2544 โดยการรักษาโรคเฉพาะราย (Single Drug Administration, SDA) ด้วยการให้ผู้ป่วยกินยาไดเอทิลคาร์บามาซีน

ในระหว่างปีพ.ศ. 2507-2509 Harinasuta และคณะ (1970) ได้ทำการสำรวจหาผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียและผู้ป่วยแสดงอาการในจังหวัดชุมพร โดยการเจาะเลือดในเวลากลางคืน (night blood survey) ครอบคลุมทั้งหมด 165 หมู่บ้านจำนวนตัวอย่าง 20,115 คน พบการกระจายของเชื้อพยาธิฟิลาเรียในพื้นที่เป็นชนิด *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal periodic strain อัตราความชุกของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียร้อยละ 2.3 พบผู้ป่วยแสดงอาการร้อยละ 1.3 ต่อมาในปีพ.ศ. 2510-2511 Guptavanij และคณะ (1971) ศึกษาการกระจายของโรคในเฉพาะพื้นที่ 8 หมู่บ้านของจังหวัดชุมพร ซึ่งเป็นพื้นที่เพาะปลูกประกอบด้วยนาข้าว สวนยางพาราและไร่ข้าวโพด พบการกระจายของเชื้อพยาธิ *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal subperiodic strain ในอัตราการความชุกของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียร้อยละ 5 และ

อัตราความชุกของผู้ป่วยโรคเท้าช้างร้อยละ 3.6 พบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงและช่วงอายุที่พบสูงสุดในช่วง 26-30 ปี และ 1-5 ปี จากการศึกษาทั้ง 2 ครั้งนี้ มีการค้นพบว่า ยุง *Mansonia* spp. ที่เป็นพาหะของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal periodic strain ได้แก่ *Ma. annulata*, *Ma. bonneae*, *Ma. indiana* และ *Ma. uniformis* และพยาธิ *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal subperiodic strain มียุง *Ma. bonneae* และ *Ma. uniformis* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ

จากการศึกษาเหล่านี้ถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาเกี่ยวกับระบาดวิทยาของโรคเท้าช้างอย่างจริงจังและมีรายงานการศึกษาอย่างชัดเจนถึงความสัมพันธ์ของลักษณะการกระจายของเชื้อฟิลาเรียและความรุนแรงของโรคที่ปรากฏ จะขึ้นอยู่กับลักษณะการกระจายและชีวนิสของยุงพาหะที่มีศักยภาพในการแพร่โรค กระทั่งในปีพ.ศ. 2513-2514 ได้มีการสำรวจโรคเท้าช้างและการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียทั้งในพื้นที่ทุกจังหวัดของ 2 ชายฝั่งของทางภาคใต้ โดยการตั้งศูนย์ชั่วคราวในแต่ละหมู่บ้านทุกๆ จังหวัด และเก็บเลือดในช่วงเวลา 19.00 ถึง 22.00 น. พบว่าทางชายฝั่งตะวันออกประกอบด้วยจังหวัดสงขลา ปัตตานี นราธิวาสและยะลาพบอัตราการติดเชื้อฟิลาเรียร้อยละ 1.5 พบความชุกของการพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดย่อยละ 0.93 และอัตราป่วยด้วยโรคเท้าช้างร้อยละ 0.59 จังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อฟิลาเรียสูงได้แก่จังหวัดนราธิวาสและปัตตานี (ร้อยละ 4 และ 2.6) ซึ่งจัดเป็นพื้นที่พบโรคเท้าช้างเป็นโรคประจำถิ่น (endemic area) จังหวัดสงขลาและยะลา มีการกระจายโรคเป็นบางพื้นที่แต่ไม่จัดเป็นพื้นที่พบโรคเท้าช้างเป็นโรคประจำถิ่น (non endemic area) ในขณะที่ทางชายฝั่งตะวันตกได้แก่จังหวัดระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง สตูล พบความชุกของการพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเพียงร้อยละ 0.008 และอัตราป่วยด้วยโรคเท้าช้างร้อยละ 0.11 และพบว่าผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในพื้นที่ที่มีการเคลื่อนย้ายมาจากพื้นที่แพร่โรคที่มีความชุกของโรคสูง ได้แก่จังหวัดสุราษฎร์ธานีและนราธิวาสทั้งสิ้น และพบยุงพาหะของเชื้อ *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal periodic strain ที่กระจายอยู่ในพื้นที่จังหวัดปัตตานี ได้แก่ยุง *Ma. uniformis* และ ยุงพาหะของเชื้อ *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnal subperiodic strain ซึ่งกระจายอยู่ในพื้นที่จังหวัดนราธิวาสได้แก่ยุง *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* (Guptavanij et al, 1977; 1978) ในปี 2536 รายงานของ Suvannadabba และคณะ (1993) พบการระบาดของเชื้อ *B. malayi* ในพื้นที่ภาคใต้ซึ่งพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ nocturnal subperiodic strain พื้นที่จังหวัดเพชรบุรี สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราชและนราธิวาส พบยุงพาหะที่สำคัญในพื้นที่ศึกษานี้ ได้แก่ *Ma. bonneae* และ *Ma. dives* ซึ่งมีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณป่าพรุ และเชื้อสายพันธุ์ nocturnal periodic strain พบในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราชและปัตตานี พบยุงพาหะที่สำคัญในพื้นที่ศึกษานี้ ได้แก่ *Ma. uniformis*, *Ma. Indiana* และ *Ma. Annulata* ซึ่งแหล่งเพาะพันธุ์เป็นป่าพรุที่มีลักษณะเป็นป่าเปิด (open swamps forest)

พ.ศ. 2540 (ค.ศ. 1997) องค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้มีการวางแผนการกำจัดโรคเท้าช้างในประเทศในกลุ่มแพร่โรค (Endemic countries) โดยประเทศไทยได้มีโครงการการจ่ายยาครอบคลุมพื้นที่แพร่โรค (MDA) ด้วยยาไดเอทิลคาร์บาไมซีน (Diethylcarbamazine citrate หรือ DEC) ชนิดเม็ด

รับประทาน ขนาด 6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาอัลเบนดาโซล (Albendazole หรือ ABZ) ชนิดเม็ดรับประทาน ขนาด 400 มิลลิกรัม ให้แก่ประชากรตั้งแต่อายุ 2 ปีขึ้นไปทุกคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ endemic area เป็นครั้งแรกกระยะการดำเนินการ 5 ปีในช่วงพ.ศ. 2545-2549 และมีการติดตามการติดเชื้อโมโครฟิลาเรียไปจนหลังจากสิ้นสุดโครงการในปี พ.ศ. 2549 ในขณะที่ดำเนินโครงการจ่ายยา (MDA) ในรอบแรกพบการติดเชื้อโมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในประชากรในพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ นราธิวาส กระบี่ สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช จนกระทั่งสิ้นสุดโครงการพบมีเพียงจังหวัดนราธิวาสจังหวัดเดียวที่มีการดำเนินการจ่ายยา (MDA) รอบที่ 2 ในปี 2550-2554

ในปีพ.ศ. 2545 Chansiri และคณะ ได้รายงานอัตราการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรีย ชนิด *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnally subperiodic strain ในคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่แพร่โรคในจังหวัดสุราษฎร์ธานีและนราธิวาส คือ ร้อยละ 2.7 และ 1.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบอัตราการติดเชื้อโมโครฟิลาเรีย *Brugia* spp. ในแมวจังหวัดสุราษฎร์ธานีและนราธิวาส สูงถึงร้อยละ 53.3 และ 18.4 ตามลำดับ (Lek-Uthai et al., 2004) ในปีพ.ศ. 2546 ชีระยศและสุมาศ ได้รายงานการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnally subperiodic strain ในแมวในจังหวัดนราธิวาส

ในปีพ.ศ. 2547 Lek-Uthai และคณะ ได้รายงานอัตราการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnally subperiodic strain ในแมวในจังหวัดสุราษฎร์ธานี คือ ร้อยละ 15.4 ในปีพ.ศ. 2549 Nuchprayoon และคณะ ได้รายงานการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *B. pahangi* ในแมวในจังหวัดนราธิวาส ในขณะที่ไม่พบการติดเชื้อโมโครฟิลาเรีย *B. malayi* สายพันธุ์ nocturnally subperiodic strain ในคนและแมวในหลายพื้นที่ซึ่งเคยเป็นแหล่งแพร่โรคในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 2.2 ขอบเขตการกระจายตามสภาพภูมิศาสตร์ของเชื้อพยาธิฟิลาเรีย *B. malayi* และ *B. pahangi* ในพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างบรูเกียในประเทศไทย (อดิศักดิ์ และอภิรดี, 2558)

เชื้อฟิลาเรีย	สายพันธุ์	โฮสต์	พื้นที่แพร่โรค	อัตราการติดเชื้อ ไมโคร ฟิลาเรีย (%)	ชั่วโมงสูงสุดของการ ปรากฏตัวในกระแส เลือด (น.)	อ้างอิง
<i>B. malayi</i>	NSP	คน	ปัตตานี, พัทลุง, นครศรีธรรมราช, สุราษฎร์ธานี	21.0	20:00–24:00	Iyengar, 1953
<i>B. malayi</i>	NP	คน	ชุมพร	2.3	22:00–06:00	Harinasuta et al, 1970
<i>B. malayi</i>	NSP DSP	คน	ชุมพร	5.0	18:00–22:00 12:00	Guptavanij et al, 1971
<i>B. malayi</i>	NSP	คน	สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ยะลา กระบี่	0.08 1.6 2.8 0.04 0.02	19:00–22:00 น.	Guptavanij et al, 1977
<i>B. malayi</i>	NSP NP	คน คน	เพชรบุรี, สุราษฎร์ธานี, นราธิวาส, นครศรีธรรมราช เพชรบุรี, ชุมพร, สุราษฎร์ธานี, นครศรีธรรมราช, ปัตตานี	0.01	ND ND	Suvannadabba et al, 1993
<i>B. malayi</i>	NSP	คน แมว	สุราษฎร์ธานี นราธิวาส สุราษฎร์ธานี นราธิวาส	2.7 1.3 53.3 18.4	4:00-6:00 น. 2.00-4.00 น.	Chansiri et al, 2002
<i>B. malayi</i>	NSP	แมว	สุราษฎร์ธานี	15.4	24:00 น.	Lek-Uthai et al, 2004
<i>B. malayi</i>	NSP	แมว	สุราษฎร์ธานี	ND	ND	Nuchpratoon et
<i>B. pahangi</i>	NSP	แมว	สุราษฎร์ธานี	3.8	ND	al, 2006
<i>B. malayi</i>	NSP	แมว	นราธิวาส	ND	24:00 น.	ธีระยศ และสุ มาศ 2546

ND – ไม่มีข้อมูล, NSP – สายพันธุ์ปรากฏตัวในเวลากลางคืน (nocturnally subperiodic strain), NP – สายพันธุ์ปรากฏตัวในเวลากลางคืน (nocturnally periodic strain)

2.3 การวินิจฉัยโรคเท้าช้างบรูเกีย

2.3.1 การจำแนกเชื้อ

โดยทั่วไปการวินิจฉัยการติดเชื้อฟิลาเรีย (filarial detection) ทั้งในคนและสัตว์สามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะรูปร่างโครงสร้างอวัยวะภายในของเชื้อไมโครฟิลาเรียตัวเต็มวัย แต่เนื่องจากการเก็บตัวอย่างที่เป็นพยาธิตัวเต็มวัยซึ่งอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของคนหรือสัตว์นั้นทำได้ยาก ดังนั้นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยการติดเชื้อฟิลาเรียจึงใช้วิธีการจำแนกการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย (mf identification) ในกระแสเลือดคนและสัตว์ ได้แก่ วิธีฟิล์มโลหิตหย่อมด้วยสียิมซา ซึ่งวิธีนี้สามารถจำแนกเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ออกจากเชื้อไมโครฟิลาเรียอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน ตัวอ่อนไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. มีความยาวประมาณ 170–330 ไมครอน กว้าง 5–7 ไมครอน มีปลอกหุ้มลำตัว (sheath) ซึ่งสามารถดูการติดสีได้อย่างชัดเจนเมื่อย้อมด้วยสียิมซาและสีมาท็อกซิไลน์ (hematoxylin stain) ที่ปลายหางพบนิวเคลียสประเภท terminal nuclei จำนวน 2 นิวเคลียส แยกกันปรากฏชัดเจนโดย terminal nuclei ที่ปลายหางจะมีขนาดเล็กกว่า ในขณะที่โครงสร้างอวัยวะภายในของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *W. bancrofti* ไม่พบ terminal nuclei ที่ปลายหาง ดังนั้นการพบ terminal nuclei เป็นลักษณะจำเพาะที่สามารถแยกเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ออกจากเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิดอื่นๆ ได้ (รูปที่ 2.2)

ลักษณะจำเพาะของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi*, *B. timori* และ *B. pahangi* มีความแตกต่างกัน ซึ่งลักษณะเด่นดังกล่าวนี้ใช้ในการจำแนกชนิดของพยาธิ ได้แก่ ความยาวลำตัว, ความกว้างลำตัว, Cephalic space, innenkorper ความกว้างของ nerve ring และปลอกหุ้มลำตัว (Sirivanandam and Fredericks, 1966; Sucharit et al, 1975; Fischer et al, 2004) ตารางที่ 2.3 อธิบายความแตกต่างของลักษณะของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* จากเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งลักษณะสำคัญของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* คือ ขนาดความยาวประมาณ 177–230 μm ซึ่งจะสั้นกว่า *B. timori* และ *B. pahangi* และมีความยาวของ innenkorper สั้นที่สุด เชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ทุกชนิดจะมีปลอกหุ้มลำตัว นิวเคลียสของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ติดสีม่วงแดง ปลอกหุ้มลำตัวติดสีชมพู มีพื้นผิวค่อนข้างเรียบและโปร่งแสง นิวเคลียสเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. timori* เมื่อย้อมด้วยสียิมซาติดสีม่วงแดงเข้ม ขณะที่ปลอกหุ้มลำตัวของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. timori* ไม่ติดสียิมซา หรือติดสีชมพูค่อนข้างจางมาก (Purnomo et al, 1977; David et al, 1997, Fischer et al, 2004) ส่วนนิวเคลียสของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. pahangi* ซึ่งเป็นเชื้อฟิลาเรียในสัตว์ เมื่อย้อมด้วยสียิมซาเห็นนิวเคลียสติดสีม่วงแดงเข้ม ปลอกหุ้มลำตัวติดสีชมพูเช่นเดียวกับเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* แต่ผิวมีลักษณะขรุขระไม่เรียบเหมือนเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi*

ตารางที่ 2.3 ลักษณะภายนอกของเชื้อไมโครพลาเรีย

ไมโครพลาเรีย	<i>Brugia malayi</i>	<i>Brugia timori</i>	<i>Brugia pahangi</i>
- ค่าเฉลี่ยความยาวลำตัว (μm)	220	310	280
- ค่าเฉลี่ยความกว้างลำตัว (μm)	3.88		3.59
- Cephalic space (อัตราส่วนของ ความยาวต่อความกว้าง)	2:1	3:1	2:1
- ความยาวเฉลี่ยของ innenkorper (μm)	31	60	53
- ความกว้างของ nerve ring (μm)	6-7		4
- ปลอกหุ้มลำตัว	ติดสีชมพูของสี Geimsa ผิวเรียบ สม่ำเสมอ	ไม่ติดสี Geimsa	ติดสีชมพูของสี Geimsa, granular sheat

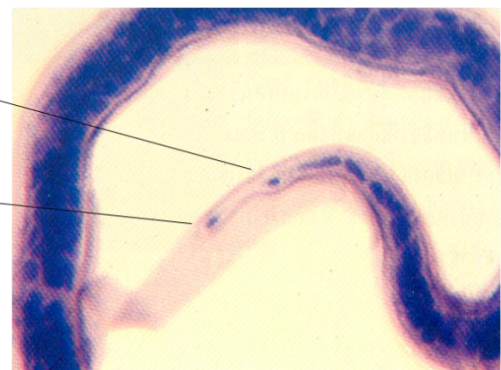
ดัดแปลงมาจาก Fischer et al, 2004

Diagnostics and approaches:



B. malayi
microfilariae

stn -subterminal nuclei
tn -terminal nuclei

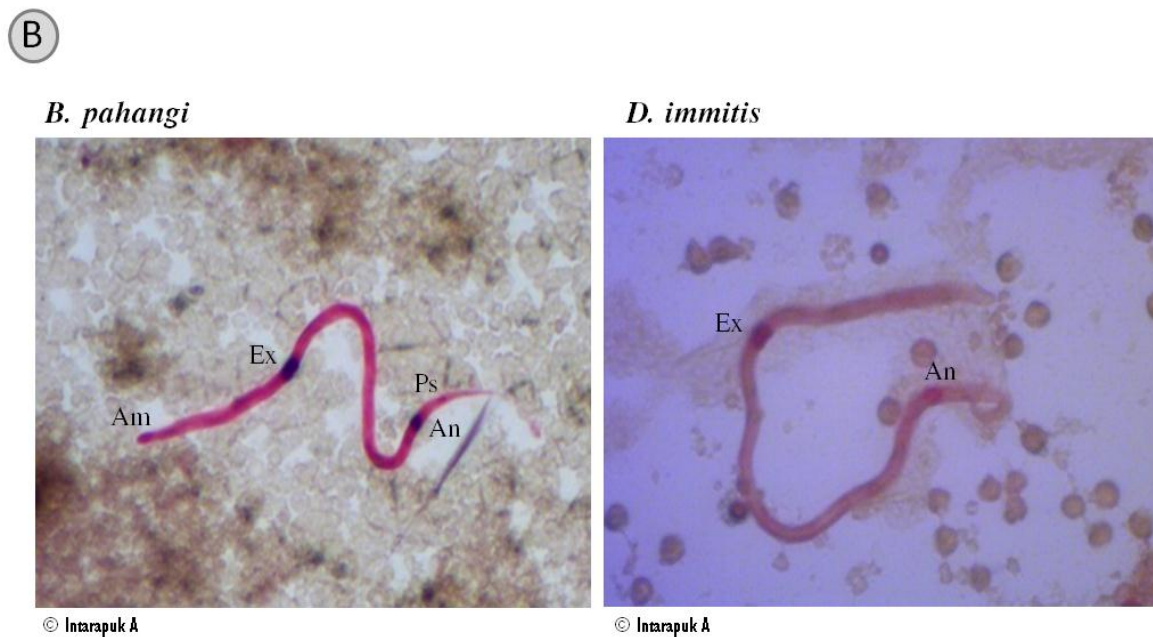
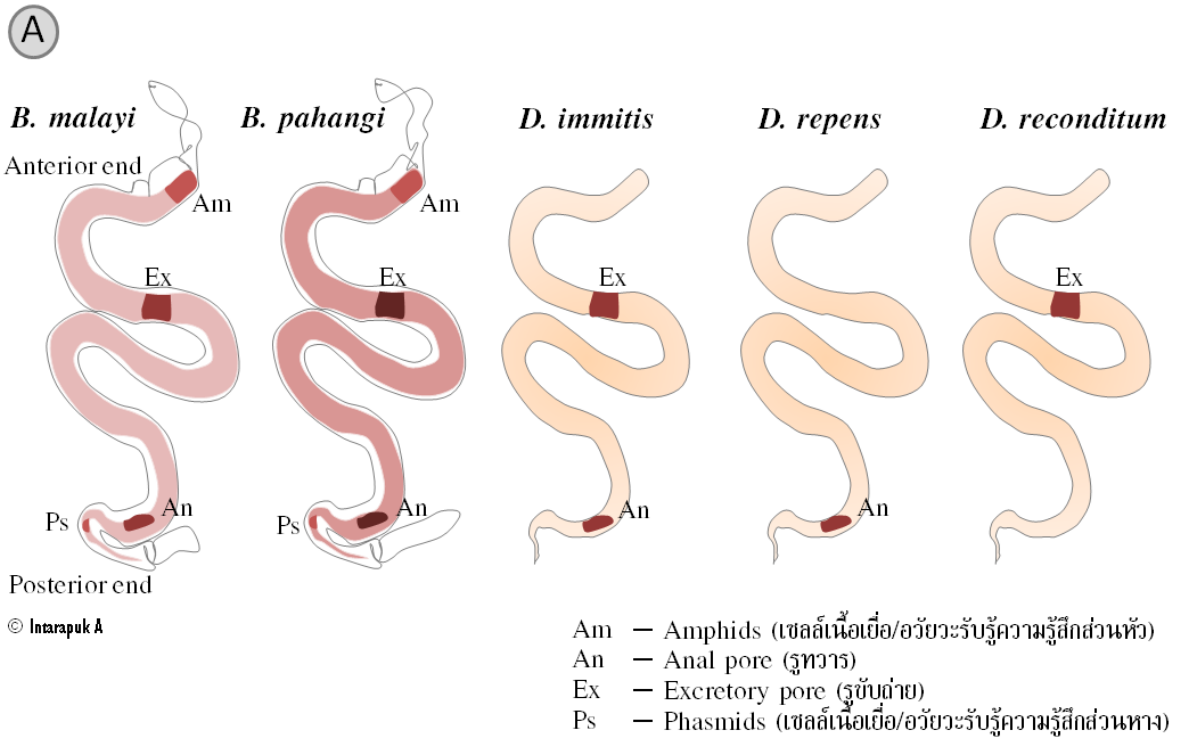


W. bancrofti
microfilariae



รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ *W. bancrofti* เมื่อย้อมด้วยสียิมซ่าและดูผ่านกล้องจุลทรรศน์

โดยทั่วไปสามารถจำแนกชนิดของเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. ตามลักษณะโครงสร้างลำตัว ระหว่างเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi* ซึ่งเป็นเชื้อพลาเรียที่สามารถก่อโรคในคนและในสัตว์ได้ และเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* ซึ่งเป็นเชื้อพลาเรียที่ไม่ก่อโรค โดยวิธีการย้อมด้วยสีย้อมซาและดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ เป็นวิธีที่สามารถจำแนกเชื้อที่ 2 ชนิดออกจากกันได้โดยอาศัยความแตกต่างกันของลักษณะโครงสร้างของเชื้อตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น แต่ยังมีข้อจำกัดคือ วิธีการจำแนกตามลักษณะโครงสร้างของตัวเชืื่อนั้น ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญและมีประสบการณ์ในการจำแนกเชื้อเป็นอย่างมาก จึงจะให้ผลการจำแนกที่ถูกต้องและแม่นยำสูง ดังนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีการจำแนกเชื้ออื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อและง่ายต่อการอ่านผลการจำแนกเชืื่อนั้น ซึ่งเทคนิคการย้อมสีทางฮิสโตเคมี (acid phosphatase stain) สามารถเห็นถึงความแตกต่างระหว่างลักษณะโครงสร้างของเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi* และ *B. pahangi* ได้ง่าย โดยการย้อมด้วยสี acid phosphatase stain พบว่าเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi* มีปลอกหุ้มติดสีและมีสีเข้มบริเวณ amphids, excretory pore, anal pore และ phasmid (Kobasa et al, 2004; Ambily et al, 2011; Ravendran et al, 2014) ในขณะที่เชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* พบการติดสีชมพูตลอดทั้งลำตัวและติดสีเข้มเฉพาะบริเวณ excretory pore และ anal pore เท่านั้น (Ravendran et al, 2014) (รูปที่ 2.3)



รูปภาพที่ 2.3 เกณฑ์วินิจฉัยสำหรับเชื้อไมโครฟิลาเรียที่ย้อมด้วยวิธี acid phosphatase staining (A) เกณฑ์วินิจฉัยเชื้อพยาธิฟิลาเรีย *Brugia* spp. และ *Dirofilaris* spp. (B) ตัวอย่างเชื้อพยาธิฟิลาเรีย *B. pahangi* และ *D. immitis* ที่ย้อมด้วยวิธี acid phosphatase staining
 ที่มา: อดิศักดิ์ และอภิรดี, 2558

2.3.2 การวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. malayi* ในเลือดคนและยุงโดยใช้เทคนิค PCR

เชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* เป็นพยาธิตัวกลมในระบบเลือดและน้ำเหลืองที่สามารถแพร่กระจายในคนโดยมียุงเป็นพาหะโดยเฉพาะยุงเสื่อ *Masonia* spp. นอกจากนี้ยังมีสัตว์เป็นแหล่งรังโรค (Ambily et al, 2011) ดังนั้นในโปรแกรมการกำจัดโรคเท้าช้างนอกจากการควบคุมการติดเชื้อในคนแล้วการควบคุมการติดเชื้อในสัตว์และยุงพาหะจึงมีความสำคัญเช่นกัน ในสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคนั้นไม่เพียงแต่พบการติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* แต่ยังสามารถพบการติดเชื้อฟิลาเรียในเลือดชนิดอื่นๆ ได้แก่ *B. pahangi*, *D. immitis* และ *D. repens* (Chansiri et al, 2002) โดยทั่วไปวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในตัวอย่างเลือด ใช้วิธีตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียด้วยวิธีพิมพ์โลฮีหนา ซึ่งมีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของเชื้อไมโครฟิลาเรียโดยเฉพาะระหว่างเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ *B. pahangi* ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายกันมาก อีกทั้งยังเป็นการยากหากมีการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อไมโครฟิลาเรียหลายชนิด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจจำแนกเชื้อไมโครฟิลาเรียทั้งในตัวอย่างเลือด (Chansiri et al, 2002; Nuchprayoon et al, 2003) และยุง (Hoti et al, 2001; Chanteau et al, 1994; Williams et al, 1996; Ramzy et al, 1997) เทคนิค PCR-linked restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เป็นวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการจำแนกไมโครฟิลาเรีย การศึกษาของ Hoti และคณะ (2001), Chansiri และคณะ (2002) และ Ambily และคณะ (2011) ได้ศึกษาการจำแนกเชื้อไมโครฟิลาเรียจากยีน Trans-spliced leader exon 1 (SLX) และ HhaI repetitive region (HR) แล้วตัดสาย DNA ด้วย Restriction enzyme *Alu I* ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อ *B. malayi*, *B. pahangi*, *D. immitis* และ *D. repens* ได้ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค PCR-RFLP ในการจำแนกไมโครฟิลาเรียโดยศึกษากับยีนอื่นๆ ได้แก่ ยีน Glutathione peroxidase (Gp29) ซึ่งเป็นยีนที่สังเคราะห์ glycoprotein ที่บริเวณผิวของไมโครฟิลาเรีย และใช้ restriction enzyme *HpaI*, *PstI*, *AluI* และ *HinfI* ในการจำแนกระหว่างเชื้อ *B. malayi*, *B. pahangi* และ *W. bancrofti* (Thanomsab et al, 2000) ยังมีการศึกษาโดยใช้ยีน ribosomal DNA (rDNA) บริเวณตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS1) และตัดด้วย restriction enzyme *Alu I* เป็นครั้งแรก ซึ่งสามารถจำแนกระหว่างเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi*, *B. pahangi*, *W. bancrofti*, *D. immitis* และ *D. repens* ได้ (Nuchprayoon et al, 2003; 2005; 2006)

การศึกษาการติดเชื้อไมโครพลาสมาในยูง เริ่มต้นมีการใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยการศึกษา ยีน Ssp1 สำหรับการจำแนกเชื้อ *W. bancrofti* (Chanteau et al, 1994; Williams et al 1996; Ramzy et al, 1997; Hoti et al, 2001; Vasuki et al, 2003) และมีการศึกษาในยีน Hha I สำหรับการจำแนกเชื้อ *B. malayi* (Hoti et al, 2001; Cox-Singh et al 2000; Vasuki et al, 2001) ซึ่งตรวจหาเชื้อโดยแยกเป็น 2 ขั้นตอนของการทำ PCR นี้จะทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณและเวลา จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ขึ้นมาเพื่อใช้ในการจำแนกระหว่าง *W. bancrofti* และ *B. pahangi* โดยศึกษาจากยีน Ssp1 (Mishra et al, 2007) วิธีนี้นอกจากจะสามารถตรวจหาเชื้อในยูง ยังสามารถตรวจในตัวอย่างเลือดอีกด้วย เป็นวิธีที่สามารถตรวจจำแนกตัวอย่างที่มีการติดเชื้อไมโครพลาสมาของ *W. bancrofti* และ *B. malayi* รวมกันได้ เนื่องจาก PCR product ที่ได้จะมีขนาดต่างกันโดยที่ *B. malayi* ให้ผล PCR มีขนาด 188 bp ในขณะที่ *W. bancrofti* ให้ผล PCR มีขนาด 129 bp นอกจากนี้ยังมีความไวในการตรวจสอบ สามารถตรวจพบเชื้อได้เมื่อมีเชื้อเพียง 1 ตัวที่รวมอยู่กับไมโครพลาสมาอื่นๆ อีก 75 ตัว

ตารางที่ 2.4 List of oligonucleotide primers that are specific for *B. malayi*

Primers	Sequences (5'–3')	Species identification	References
Trans-spliced leader exon 1 SLX1 (forward) SLX2 (reverse)	GTCTACGACCATAACCACGTTGA GAAACATTCAATTACCTCAAAC	<i>B. malayi</i>	Chansiri, et al, 2002; Ambily, et al, 2011
Hha1 repetitive region BM1 BM2	GCGCATAAAATTCATCAGCAA ATGACAACCTCAATACTCGAC	<i>B. malayi</i>	Chansiri, et al, 2002; Ambily, et al, 2011
rDNA ITS1–F ITS1–R	GGTGAACCTGCGGAAGGATC GCGAATTGCAGACGCATTGAG	<i>B. malayi</i>	Nuchprayoon, et al, 2003; 2005; 2006
Glutathione peroxidase (GSHPx) MF/F MF/R	ATGTCCGCACAACCTTTGATTTATCG TTAAATTTACGTTCCAGTTCATCGAT	<i>B. malayi</i> , <i>B. pahangi</i> cW. <i>bancrofti</i>	Thanomsab, et al, 2000
Sspl NV1 NV2	CGTGATGGCATCAAAGTAGCG CCCTCACTTACCATAAGACAAC	<i>W. bancrofti</i>	Chanteau, et al, 1994; Williams, et al, 1996; Ramzy, et al, 1997; Hoti, et al, 2001; Vasuki, et al, 2003
HhaI Hha I F Hha I R	GCGCATAAAATT–CATCAGC GCGCAAACTTAATTACACCCGC	<i>B. malayi</i>	Hoti, et al, 2001; Cox–Singh, et al 2000; Vasuki et al, 2001
Sspl BM / WBF (forward) BMR 188 (reverse for BM) WBR 129 (reverse for WB)	AGCGTGATGGCATCAAAGTAG TTCCATCCCCAAGAAAATATTAG AGGTATACCAAGCAAACAAAAA	<i>B. malayi</i> <i>W. bancrofti</i>	Mishra, et al, 2007

ด้วยเทคนิค conventional PCR ที่มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีความแม่นยำในการตรวจหาเชื้อและมีความไวในการตรวจสูง แต่อย่างไรก็ดีการตรวจด้วยวิธีนี้ยังต้องอาศัยวิธีการอ่านผล DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอน อีกทั้งยังไม่สามารถตรวจในเชิงปริมาณได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธี Real-time PCR ขึ้นเพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อไมโครพลาสมาเรียทั้งในตัวอย่างเลือดและยาง (Rao et al, 2006 (A); 2006 (B)) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจและยังสามารถลดขั้นตอนและลดโอกาสในการปนเปื้อนของตัวอย่างของวิธี conventional PCR ได้ อย่างไรก็ตามหลายๆ พื้นที่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และฟิลิปปินส์ พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ในพื้นที่ทับซ้อนกัน ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคอย่างมีประสิทธิภาพจะต้องติดตามการเกิดโรคจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดไปพร้อมๆ กัน จะเห็นได้ว่าการใช้วิธี Multiple singleplex real-time PCR ในการตรวจหาโรคนั้นจะทำให้เกิดการสิ้นเปลืองเวลา งบประมาณ และผู้ปฏิบัติงาน จึงได้มีการพัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ขึ้น ในปัจจุบันวิธี Fluorescence Resonance Energy Transfer Real-time PCR (FRET PCR) และ Melting curve analysis ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพิ่มใช้ในการตรวจหาไมโครพลาสมาเรียในเลือดคนและสัตว์ (สุนัขและแมว) และยาง (Intapan et al, 2009; Thanchomnang et al, 2010; Wongkamchai et al, 2013) วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถลดระยะเวลาการตรวจลงได้และมีความไวและความจำเพาะสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR และหาลำดับเบส (DNA sequences) จึงเหมาะที่จะใช้เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาระบาดของโรคและติดตามการแพร่กระจายของเชื้อในชุมชนพหุเชื้อในพื้นที่ซึ่งมีการระบาดของโรค แต่อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธี FRET PCR นั้นจำเป็นจะต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะและใช้ Fluorescently labeled oligonucleotide probes จำนวนมาก จึงทำให้ต้นทุนการตรวจวินิจฉัยโรคสูงขึ้น

2.3.3 การตรวจหาเชื้อโดยใช้แอนติบอดี

วิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพลาสมาเรียโดยการตรวจหาเชื้อไมโครพลาสมาเรียในเลือดเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้หาความชุกในการประเมินสถานการณ์ความรุนแรงของการกระจายโรคในพื้นที่แพร่โรค ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าความไวค่อนข้างต่ำ มักตรวจหาเชื้อไมโครพลาสมาเรียไม่พบเมื่อระดับความเข้มข้นของเชื้อไมโครพลาสมาเรียในกระแสเลือดต่ำหรือแม้ว่าจะใช้เทคนิคในการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเชื้อมาโครพลาสมาเรียก็ตาม (Turner et al, 1993) จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพลาสมาเรีย การตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเชื้อพลาสมาเรียเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อพลาสมาเรีย *B. malayi* และ *B. timori* ในพื้นที่การแพร่โรค เป็น

วิธีที่มีความไวของการตรวจค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจหาไมโครฟิลาเรีย นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะต่อเชื้อฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. เนื่องจากโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจจับแอนติบอดีถูกพัฒนามาจากแอนติเจนของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ซึ่งเป็นแอนติเจนประเภท *B. malayi* recombinant antigen (Bm14 และ BmR1) (Weil et al, 2011; Jamail et al, 2005; Rahman et al, 2001(a); Haarbrink et al, 1999) มีความจำเพาะกับแอนติบอดีชนิด IgG4 ซึ่งเป็น anti-filaria IgG antibody โดยทั่วไปแล้วการติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. และ *W. bancrofti* ทำให้สามารถพบระดับ parasite-specific IgG4 antibody ในเลือดสูง โดยระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ เมื่อไมโครฟิลาเรียเข้าสู่ร่างกาย การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยการสร้างแอนติบอดีชนิด IgM ซึ่งอยู่ในร่างกายประมาณ 2 -3 สัปดาห์ จากนั้นแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG2 จะถูกสร้างขึ้น และค่อยๆ เปลี่ยนเป็น IgG4 เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นและคงอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน (Ghosh, 2012; Ravichandran et al, 1997) แอนติบอดีชนิด IgG ถูกกระตุ้นได้จากแอนติเจนที่พบทั้งในไมโครฟิลาเรีย ตัวอ่อนระยะอื่นๆ และพยาธิตัวแก่ จึงสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ในการติดเชื้อทุกระยะทั้งในการตรวจหาผู้ป่วยใหม่และการติดตามประเมินผลของโครงการกำจัดโรค โดยข้อจำกัดของการตรวจวัดระดับแอนติบอดีชนิด IgG4 นั้นไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าระดับของแอนติบอดีที่พบนั้น เนื่องจากการติดเชื้อพยาธิครั้งใหม่หรือมาจากการเคยได้สัมผัสกับเชื้อฟิลาเรียมาก่อนแล้ว แต่อย่างไรก็ดีพบว่าระดับของ IgG4 จะลดลงได้หลังจากได้รับยากำจัดพยาธิฟิลาเรียในกลุ่ม Diethylarbomazine (DEC) ประมาณ 6-12 เดือน (Kurniawan et al, 1995; McCarty et al, 1995) แอนติเจนชนิด Bm14 เป็นแอนติเจนประเภท *B. malayi* recombinant antigen มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีที่ถูกผลิตขึ้นมาเมื่อโฮสต์มีการสัมผัสหรือได้รับเชื้อฟิลาเรียเข้าสู่ร่างกาย จึงมีการนำแอนติเจนชนิด Bm14 มาใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อฟิลาเรียทั้งชนิด *B. malayi*, *B. timori* และ *W. bancrofti* ได้ แต่ความไวของเครื่องมือในการจำแนกเชื้อฟิลาเรียแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน โดยการใช้แอนติเจนชนิด Bm14 เมื่อนำมาตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ *B. timori* จะมีความไวสูงกว่าการตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อฟิลาเรียชนิด *W. bancrofti* ในขณะที่แอนติเจนชนิด BmR1 มีความจำเพาะในการตรวจจำแนกเฉพาะแอนติบอดีของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ *B. trimori* เท่านั้น ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อพยาธิฟิลาเรียในรูปแบบของชุดตรวจสำเร็จรูป Brugia Rapid (BR) (Reszon Diagnostics International Sdn. Bhd., Malaysia) อาศัยหลักการของ dipstick test โดยใช้แอนติเจนชนิด Bm14 เป็นโมเลกุลที่ใช้ตรวจสอบหาแอนติบอดี IgG4 ในตัวอย่างจากทั้งผู้ติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ *B. timori* (Jamail et al, 2005; Fischer et al, 2005; Supali et al, 2004; Rahmah et al,

2001 (b)) ในขณะที่การตรวจวัดระดับ IgG4 ของผู้ติดเชื้อด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ได้มีการพัฒนารูปแบบการตรวจและปรับนำไปใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคในหลายพื้นที่ โดยใช้ แอนติเจนชนิด BmR1 ในการจำแนกแอนติบอดี IgG4 ของเชื้อฟิลาเรีย (Weil et al, 2011; Rahmah et al, 2001 (a); Haarbrink et al, 1999; Rahmah et al, 1998) ซึ่งวิธีการตรวจหาแอนติบอดีนี้ถูกนำไปใช้ในการประเมินหาอัตราความชุกของโรคโดยใช้การตรวจแอนติบอดีในหลายประเทศ ได้แก่ อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย เป็นต้น ซึ่งพบว่าในพื้นที่แพร่โรคหนึ่งๆ ค่าอัตราความชุกของการติดเชื้อฟิลาเรียแอนติบอดีค่อนข้างสูงกว่าอัตราความชุกของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด การตรวจหาการติดเชื้อพยาธิโดยการหาแอนติบอดีในเลือดนั้นสามารถเก็บตัวอย่างเลือด/ซีรัม/พลาสมาซึ่งเก็บตัวอย่างในเวลาใดของวันก็ได้ ซึ่งเป็นข้อแตกต่างของการตรวจหาเชื้อพยาธิโดยการหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด ซึ่งต้องเก็บตัวอย่างเลือดที่ต้องการตรวจในช่วงกลางคืนเท่านั้นเนื่องจากคุณสมบัติของการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียแบบ nocturnal periodic และ nocturnal subperiodic นอกจากนี้การตรวจหาการติดเชื้อฟิลาเรียโดยหาแอนติบอดียังให้ค่าความไวและความจำเพาะสูง (ร้อยละ 90-100 และร้อยละ 99-100 ตามลำดับ) ดังนั้น WHO จึงแนะนำให้ใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยโดยใช้แอนติบอดี IgG4 ในการตรวจคัดกรองโรคและการหาอัตราความชุกการติดเชื้อฟิลาเรียแอนติบอดีเพื่อติดตามและประเมินผลในโปรแกรมการกำจัดโรคเท้าช้างทั่วโลก (Global Programm to Eliminate Lymphatic Filariasis; GPELF)

อย่างไรก็ตาม มีข้อเสนอแนะสำหรับประเทศที่มีการแพร่ระบาดของโรคเท้าช้างบรูเกีย (Brugia-endemic country) ในการใช้การตรวจหาความชุกของโรคโดยใช้การตรวจแอนติบอดีในการกำหนดพื้นที่ในโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง (PELFs) ไว้ดังนี้ (1) ในพื้นที่ซึ่งอัตราความชุกการติดเชื้อฟิลาเรียแอนติบอดีมากกว่าร้อยละ 10 ของประชากรในพื้นที่ให้พิจารณาว่าพื้นที่นั้นมีโรคเท้าช้างเป็นโรคประจำถิ่นมี การกำหนดค่าประมาณของอัตราความชุกของการพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 และกำหนดให้เป็นพื้นที่สำหรับสำหรับการจ่ายยาครอบคลุมพื้นที่ (MDA) (2) ในพื้นที่ซึ่งมีอัตราความชุกการติดเชื้อฟิลาเรียแอนติบอดีน้อยกว่าร้อยละ 1 ของประชากร มีการกำหนดค่าประมาณของอัตราความชุกของการพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดน้อยกว่าร้อยละ 1 (3) ในพื้นที่ซึ่งมีอัตราความชุกการติดเชื้อฟิลาเรียแอนติบอดีระหว่างร้อยละ 1-10 ของประชากร แนะนำให้ต้องมีการตรวจหาอัตราความชุกของการพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเพื่อใช้ประเมินสถานการณ์การเกิดโรคเท้าช้างในพื้นที่ (WHO, 2006)

2.3.3.1 หลักการทดสอบของ Brugia ELISA Test

หลักการของ Indirect ELISA ได้ถูกนำไปใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG4 เพื่อประเมินการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรีย โดยอาศัยโมเลกุลแอนติเจนเป้าหมายชนิด BmR1 หรือ Bm14 ซึ่งเคลือบเพลทไว้ที่ก้นหลุม และใช้แอนติบอดี 2 ชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดีหนู ที่จำเพาะต่อ IgG4 ของคนที่ติดเชื้อพยาธิฟิลาเรีย หรือที่เรียกว่า mouse anti-human antifilarial IgG4 monoclonal antibody (MAb) และ IgG ที่จำเพาะต่อ mouse MAb ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ horseradish peroxidase (HRP) หรือที่เรียกว่า anti-mouse MAb IgG-HRP conjugate ในตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่ให้ผลบวกกับวิธี indirect ELISA แอนติบอดี human antifilarial IgG4 ซึ่งเป็น primary antibody จะถูกจับด้วย recombinant *B. malayi* antigen ที่เคลือบไว้ที่ก้นหลุมของเพลท ELISA โดยเป็นการจับกันแบบปฏิกิริยาจำเพาะ (affinity reaction) จากนั้นแอนติบอดี human antifilarial IgG4 จะถูกจับกับ mouse MAb ซึ่งเป็น secondary antibody ที่จำเพาะต่อแอนติบอดี human antifilarial IgG4 โดยเป็นการจับกันแบบปฏิกิริยาจำเพาะเช่นกัน ในขั้นตอนการเกิดสี mouse MAb จะถูกจับกับ anti-mouse MAb IgG-HRP conjugate แล้วเกิดโมเลกุลคอมเพล็กซ์ขึ้น ดังนั้น เมื่อเติมสารซับสเตรทที่ไม่มีสี (colorless substrate) เอ็นไซม์ HRP ก็จะทำให้เปลี่ยนซับสเตรทที่ไม่มีสีให้เป็นผลผลิตที่มีสี สารซับสเตรทที่ใช้ คือ สาร 2,2'-Azino-di(ethylbenzthiazoline-sulphonate) การอ่านผลการทดสอบสำหรับตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาที่ให้ผลบวก พิจารณาจากจากความเข้มของค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะ (absorbance) ของสารผลผลิตที่มีสี และการคำนวณปริมาณแอนติบอดีที่วัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในบทที่ 2 หัวข้อย่อย 2.3.2.2 ชุดทดสอบฟิลาเรียแอนติเจนสำเร็จรูปแบบ enzyme-linked immunosorbent assay (Og4C3 ELISA assay) วิธี Brugia ELISA สามารถวัดระดับ human antifilarial IgG4 เป็นค่า antibody titer จึงใช้เพื่อติดตาม ประเมินผลการรักษาโรคเท้าช้างบรูเกีย โดยพิจารณาจากการลดลงของ antifilarial IgG4 titer หลังการรักษา อีกทั้ง วิธีนี้ยังสามารถใช้ทดสอบตัวอย่างในคราวละหลายๆ จึงทำให้ประหยัดงบประมาณในการตรวจอีกด้วย

2.3.3.2 หลักการทดสอบของ Brugia Rapid Test

ชุดตรวจฟิลาเรียแอนติบอดีสำเร็จรูปที่จำเพาะต่อการติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ได้ถูกพัฒนามาจากเทคโนโลยีทางด้าน recombinant DNA technology และ lateral flow device ชุดตรวจฟิ

ลาเรียแอนติบอดีสำเร็จรูปที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ ชุดทดสอบ Brugia Rapid (BR) (Reszon Diagnostics International Sdn. Bhd., Malaysia) โดยอาศัยหลักการทำงานของ lateral flow device (รูปภาพที่ 2.4) เราสามารถเรียกชุดตรวจฟิลาเรียแอนติบอดีสำเร็จรูป BR Test ว่า เป็นวิธีการ indirect solid-phase immunochromatographic assay ในรูปภาพที่ 5.3A ชุดตรวจฟิลาเรียแอนติบอดีสำเร็จรูป BR Test มีช่องสำหรับใส่ตัวอย่างและสารละลายบัฟเฟอร์จำนวน 2 ช่อง คือ ช่องที่ 1 เป็น square well ใช้สำหรับหยดตัวอย่างเลือด ซีรัม หรือพลาสมาที่ใช้ทดสอบ ปริมาตรที่ใช้ทดสอบ คือ 35 ไมโครลิตร ซึ่งสามารถใช้หลอดแคปพิลลารีหรือปิเปตต์อัตโนมัติ ปรับปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ทดสอบก็ได้ อีกชนิดหนึ่งคือสารละลายบัฟเฟอร์ (chase buffer) ปริมาตรที่ใช้ คือประมาณสองหยด หยดแรกใช้หลังจากหยดตัวอย่างเลือด ซีรัม หรือพลาสมา สำหรับหยดที่สอง ใช้หลังจากที่ดึงลิ้นพลาสติกใส (plastic tub) ออกจาก cassette ส่วนช่องที่ 2 เป็น circle well สำหรับหยดสารละลาย chase buffer เท่านั้น ปริมาตรที่ใช้ คือประมาณสามหยด ใช้หลังจากที่ตัวอย่างได้เคลื่อนที่ไปยังตำแหน่ง A หรือแถบสีฟ้า

ในรูปภาพที่ 2.4A-B สาร immobilized substance ซึ่งถูกตรึงไว้ที่เยื่อกระดาษ nitrocellulose membrane มี 2 ประเภท คือ ประเภทที่หนึ่ง recombinant *B. malayi* antigen ถูกตรึงไว้ที่แถบทดสอบหรือตำแหน่ง C และประเภทที่สอง อิมมูโนโกลบูลิน G ของแพะ หรือ goat anti-mouse PAb-dye IgG antibody ซึ่งจำเพาะต่อโพลีโคลนอลแอนติบอดีของหนู ซึ่งติดฉลากด้วยลาเท็กซ์เคลือบสี หรือที่เรียกว่า mouse PAb-dye conjugate โมเลกุล goat IgG ดังกล่าว ถูกตรึงไว้ที่แถบควบคุม หรือตำแหน่ง B โมเลกุล PAb-dye conjugate ของหนู จะจำเพาะต่อ human antifilarial IgG4 antibody ส่วนแถบสีฟ้าหรือตำแหน่ง A เป็นไวนิลเทป (vinyl tape) ทำหน้าที่หยุดการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง ในรูปภาพที่ 2.4B ในตัวอย่างเลือด ซีรัม หรือพลาสมา ที่ให้ผลบวกกับชุดทดสอบ BR Test โมเลกุล human antifilarial IgG4 antibody ซึ่งเป็น primary antibody จะถูกจับโดย mouse PAb-dye conjugate ซึ่งเป็น secondary antibody ด้วยปฏิกิริยาแบบจำเพาะเจาะจง เกิดเป็นโมเลกุลคอมเพล็กซ์ แล้วเคลื่อนที่ไปบนเยื่อกระดาษไนโตรเซลลูโลส เมื่อเคลื่อนที่ผ่านแถบทดสอบ human antifilarial IgG4 antibody จะถูกจับโดยโมเลกุล recombinant *B. malayi* antigen ที่ถูกตรึงไว้ที่แถบทดสอบ ทำให้เกิดโมเลกุลคอมเพล็กซ์ระหว่าง recombinant *B. malayi* antigen กับ human antifilarial IgG4 antibody ซึ่งถูกจับไว้ด้วย mouse anti-human antifilarial IgG4 PAb-dye conjugate แล้วเกิดเป็นแถบสีแดงหรือสีแดงม่วงขึ้นที่แถบทดสอบ หรือ ตำแหน่ง C ส่วนโมเลกุล mouse anti-human antifilarial IgG4 PAb-dye conjugate ที่ไม่ได้จับกับ primary antibody ก็จะเคลื่อนที่จากแถบทดสอบไปยังแถบควบคุม เมื่อเคลื่อนที่ผ่านแถบ

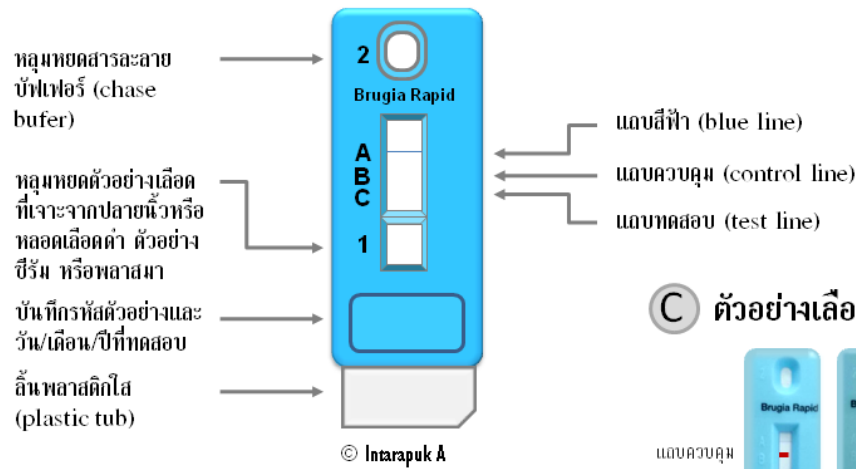
ควบคุม โมเลกุล mouse anti-human antifilarial IgG4 PAb-dye conjugate จะถูกจับด้วยโมเลกุล แอนติบอดี goat IgG antibody ที่จำเพาะต่อ mouse PAb-dye conjugate แล้งเกิดเป็นโมเลกุลคอมเพล็กซ์ระหว่าง goat IgG antibody กับ mouse PAb-dye conjugate จึงเกิดเป็นแถบสีแดงหรือสีแดงม่วง ขึ้นที่แถบควบคุม หรือ ตำแหน่ง B ในรูปภาพที่ 2.4C การอ่านผลการทดสอบ สามารถแปรผลตามแถบสีที่ปรากฏที่แถบทดสอบและแถบควบคุม โดยที่แถบควบคุมจะต้องปรากฏแถบสีแดงม่วงในทุกกรณีทำการทดสอบกับตัวอย่าง ไม่ว่าการทดสอบจะให้ผลเป็นบวกหรือเป็นลบก็ตาม การไม่ปรากฏสีที่แถบควบคุม หมายถึง ความบกพร่องของชุดทดสอบ BR Test

การศึกษาโดยใช้ชุดตรวจอื่นๆ ที่มีการพัฒนาโดยใช้หลักการใกล้เคียงกัน และมีความแตกต่างในรายละเอียด เช่น การใช้ recombinant B. malayi antigen เคลือบบนแถบทดสอบ และแถบควบคุมใช้การแสดงผลโดยการจับกันของ Monoclonal anti-human IgG4 antibody และ gold anti-mouse antibody แล้งเกิดสีที่แถบควบคุม (Rahmah et al, 2001(b); Supali et al, 2004; Jamail et al, 2005) และจะเห็นได้ว่าทั้ง Brugia ELISA และ Brugia Rapid ใช้หลักการในการตรวจที่คล้ายคลึงกัน แตกต่างกันที่ปริมาณของตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ใช้นามาทดสอบ ชนิดของชุดนำยาที่ใช้ทดสอบ และวิธีการอ่านผลการทดสอบจึงเป็นสาเหตุให้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีทั้ง 2 วิธีนี้ให้ค่าความไวและความจำเพาะต่างกัน แต่พบข้อดีของการใช้ชุดทดสอบ BR คือ

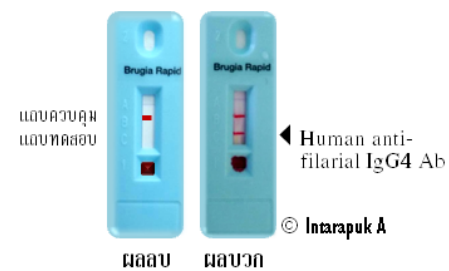
- ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบนั้นใช้ได้ทั้งเลือด ซีรัม หรือพลาสมา โดยใช้ในปริมาณน้อยต่อการทดสอบ เพียง 30-35 μ l
- ใช้เวลาในการตรวจ 15-25 นาที
- การเก็บตัวอย่างจะเก็บช่วงใดของวันก็ได้ ไม่จำเป็นต้องเป็นตัวอย่างที่มาจาก night blood survey
- ตัวอย่างที่เก็บมาที่ใช้ทดสอบได้ทันทีโดยไม่ต้องมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อน
- ไม่ต้องการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์มากและซับซ้อนในการทดสอบ
- อ่านผลและแปรผลการทดสอบได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผล

อย่างไรก็ตามวิธี Brugia ELISA สามารถแสดงผลปริมาณของแอนติบอดีเป็นค่าไตเตอร์ที่วัดได้ จึงเป็นเครื่องมือที่เหมาะสมในการติดตามผลการรักษาโรคเท้าช้างโดยการประเมินการลดลงของ Filarial-specific IgG4 titer หลังการให้ยารักษาพยาธิฟิลาเรีย อีกทั้งวิธีนี้ยังสามารถใช้ทดสอบได้กับตัวอย่างผู้ป่วยได้ครั้ง/เพลทหลายๆ ตัวอย่าง จึงทำให้ประหยัดงบประมาณในการตรวจอีกด้วย

A ชุดทดสอบฟิลาเรียแอนติบอดี Brugia Rapid Test

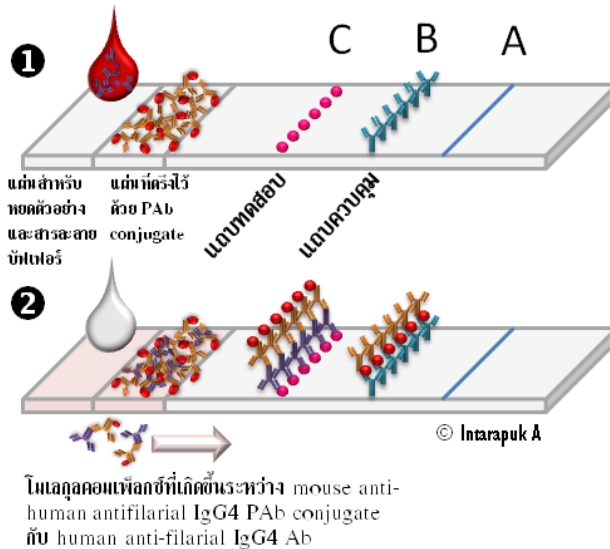


C ตัวอย่างเลือดที่ทดสอบ



B หลักการทดสอบ

ตัวอย่างเลือด ซีรัม หรือพลาสมา
ที่ให้ผลบวก



- *B. malayi* แอนติเจนสังเคราะห์หรือ recombinant Ag
- Y Human anti-filarial IgG4 แอนติบอดี
- Y โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากหนูคอนจูเกตด้วยสี (mouse PAb conjugate) ที่จำเพาะต่อ human anti-filarial IgG4 แอนติบอดี
- Y อิมมิวโนโกลบูลิน G ที่สร้างขึ้นจากแพะ (goat IgG Ab) ที่จำเพาะต่อ mouse PAb conjugate
- แถบสีฟ้า
- ตัวอย่างเลือด ซีรัม หรือพลาสมาที่ทดสอบ
- สารละลายบัฟเฟอร์ (chase buffer) ที่ใช้เจือจางตัวอย่างและพาโมเลกุลแอนติบอดีให้เคลื่อนที่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

รูปที่ 2.4 ชุดทดสอบฟิลาเรียแอนติบอดี (A) Brugia Rapid Test; (B) หลักการทดสอบ; (C) การอ่านผลการทดสอบ

ที่มา: อดิศักดิ์และอภิรดี (2558)

ตารางที่ 2.5 การหา Seroprevalence ของการติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ *B. timori* ในภูมิภาคอาเซียน

กลุ่มตัวอย่างเลือด/ซีรัม/ พลาสมาที่ใช้ทดสอบ				ความชุก	อัตราการพบ antifilarial IgG4 ในแต่ละกลุ่ม (%)		อ้างอิง	
วิธีการตรวจ (แอนติเจน)	โรค เท้าช้าง	ประเทศที่มีแหล่ง แพร่โรค	จำนวน ประชากร ที่สำรวจ	อัตราการติด เชื้อไมโครฟิ ลาเรีย (%)	อัตราการพบ antifilarial IgG4 (%)	Microfialaremia	Amicrofilaremia	
ICT test kit								
Brugia Rapid	B. malayi	มาเลเซีย,อินนีเซีย ,อินเดีย	753	27.5	27.4	96.6	1.1	Rahmah et al, 2001 (b)
Brugia Rapid (BmR1)	B. malayi	อินเดีย	164	95.1	96.3	100	25	Rahmah et al, 2003
BR test kit (มาเลเซีย) (BmR)	B. timori	อินโดนีเซีย	759	26	80.5	100	74	Supali et al, 2004
Brugia Rapid dipstick test (in-house)	B. malayi	มาเลเซีย	2545	0.9	9.4	87	8.6	Jamail et al, 2005
ELISA								
IgG4-ELISA	B. malayi	มาเลเซีย	330	7	12.7	100	18.8	Rahmah et al, 1998
IgG4-ELISA	B. malayi	อินโดนีเซีย	238	6.7	49.2	100	45.5	Haarbrink et al, 1999
Brugia-ELISA (Nunc, USA) / (BmR1)		มาเลเซีย,อินเดีย, ไทย	-	-	-	98.5	40.5	Rahmah et al, 2001 (a)
Brugia-ELISA (BmR1)	B. malayi	มาเลเซีย	1,334	0.3	2.5	100	2.2	Lim et al, 2001
Brugia ELISA (BmR1)	B. malayi	อินเดีย	164	95.1	90.8	95.5	0	Rahmah et al, 2003
Indirect ELISA (in house)	B. malayi	ไทย	-	-	-	97	30	Wongkamchai et al, 2006
CELISA (Cellabs, Brookvale, NSW, Australia) / BM14	B. malayi B. timori	อินเดีย, อินโดนีเซีย	-	-	-	91	-	Weil et al, 2011

2.4 มาตรการการป้องกันโรคเท้าช้าง

ในปัจจุบันมีการกำหนดนโยบายร่วมกันในการกำจัดโรคเท้าช้างในกลุ่มประเทศที่มีความเสี่ยงต่อโรคซึ่งได้ข้อสรุปเป็น Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GPELF) ซึ่งมีเป้าหมายร่วมกันของแต่ละประเทศโดยเฉพาะในประเทศที่มีการระบาดของโรคในการกำจัดโรคให้หมดไปภายในปี 2020 กลยุทธ์หลักที่ใช้กันทั่วไปคือการให้ยาครอบคลุมในกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยง (Mass drug administration, MDA) ปีละครั้งเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4–6 ปีติดต่อกัน (Ottesen et al, 1997) ยาที่

ถูกกำหนดให้ใช้ในโปรแกรม GPELF เพื่อการกำจัดโรคให้หมดจากพื้นที่คือการให้ยาร่วมกันระหว่าง Diethylcarbamazine citrate (DEC) 6 mg/kg ร่วมกับ Albendazole 400 mg/kg ในพื้นที่ซึ่งมีการระบาดของ *W. bancrofti* แต่ไม่พบ *Onchocerca volvulus* และใช้ยาร่วมกันระหว่าง Ivermectin 200 µg และ Albendazole 400 mg ในพื้นที่ซึ่งมีการระบาดของ *W. bancrofti* และ *O. volvulus* (Ottesen, et al 1997; 1999; Ottesen, 2000; WHO 1999a, 2000, 2001, 2002) การให้ยาในพื้นที่เสี่ยงทุกปีติดต่อกันให้ครอบคลุม 60–80% ของจำนวนประชากรสามารถหยุดการแพร่กระจายโรคได้ และจะไม่สามารถตรวจพบเชื้อในยุงพาหะได้ (Gyapong et al, 2005)

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในพื้นที่เสี่ยงของโรคเท้าช้าง ได้มีการรับนโยบายของ WHO และปรับเป็นกลยุทธ์ในการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศ โดยกำหนดนโยบาย National Program to Eliminate Lymphatic Filariasis (PELF) ซึ่งกำหนดให้มีการให้ยา DEC ร่วมกับ Albendazole ในพื้นที่เสี่ยงเพื่อลดอัตราความชุกของการติดเชื้อ ในช่วงปี 2002–2006 (Filariasis Division, 2000) และได้มีการดำเนินการตาม PELF ในพื้นที่ซึ่งมีการระบาดของเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* (Filariasis Division, 2000; Koyadun et al, 2007) และในพื้นที่ซึ่งพบการติดเชื้อ *W. bancrofti* ในกลุ่มแรงงานพม่าที่เข้ามาทำงานในประเทศไทย (Koyadun and Bhumiratana, 2005; Yongyuth et al, 2006) เป้าหมายของโครงการกำจัดโรคเท้าช้างที่ใช้ในประเทศไทยถูกกำหนดไว้ 2 ประการ คือเพื่อเป็นการยับยั้งการกระจายของโรคเท้าช้างในพื้นที่เสี่ยง ไม่ว่าจะเป็นพื้นที่การระบาดของ *W. bancrofti* หรือ *B. malayi* โดยจะให้ผ่านหน่วยงานสาธารณสุขในทุกระดับ (Koyadun and Bhumiratana, 2005) อีกประการหนึ่งคือการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อหนอนพยาธิ Nocturnal periodic *W. bancrofti* ในพื้นที่ซึ่งมีการระบาดในกลุ่มของแรงงานพม่า ซึ่งเป็น Transmission prone area ซึ่งการจัดการกับ Imported bancroftian filariasis นั้นจะมุ่งเน้นไปที่การให้ยา DEC กับแรงงานต่างชาติทุกคนโดยเฉพาะแรงงานพม่าเนื่องจากประเทศพม่าเป็นพื้นที่ซึ่งมีการระบาดของโรคอยู่เป็นประจำ (Endemic area) โดยกำหนดให้มีการให้ยา DEC กับแรงงานพม่าทุกคนที่มาขึ้นทะเบียนแรงงานในประเทศไทย (Filariasis Division, 2000; 2001; CDC, 2002)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าอัตราการเกิดโรคเท้าช้างในประเทศไทยจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจากมีการดำเนินการตามโครงการกำจัดโรคเท้าช้างมานานกว่า 30 ปี โดยการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อหนอนพยาธิด้วยการกำจัดเชื้อในตัวผู้ที่ติดเชื้อและยุงพาหะเป็นกลยุทธ์หลักในการมุ่งสู่เป้าหมายในการลดจำนวนผู้ป่วย การลดจำนวนผู้ติดเชื้อทำได้โดยการให้ยา DEC ขนาด 6 mg/kg โดยการกินมื้อเดียว ให้ทุกปี ปีละ 2 ครั้งเพื่อใช้ฆ่าเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเป็นวิธีมาตรฐานในการรักษาโรคเท้าช้าง แต่การใช้ยา DEC ร่วมกับ Albendazole ขนาด 400 mg เพื่อใช้ในการป้องกันโรค สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยาในการลดการแพร่กระจายเชื้อลงได้ (Filariasis Division, 2000; Yongyuth et al, 2006) จากความสำเร็จในการควบคุมโรคในประเทศที่มีการระบาดของโรคในระยะยาว ทำให้ทราบว่า

การให้ยาร่วมกันระหว่าง DEC และ Albendazole สามารถลดอัตราการพบเชื้อ mf ในกระแสเลือดอย่างรวดเร็ว และสามารถยับยั้งการแพร่กระจายเชื้อสู่มนุษย์ได้อย่างสมบูรณ์ ในการใช้โปรแกรมการกำจัดโรคเท้าช้างในพื้นที่อื่นๆ มีการรณรงค์การให้ยาแบบครอบคลุมกลุ่มประชากรในหลายรูปแบบ ทำให้เห็นว่าประชากรกลุ่มเสี่ยงจำนวนมากทั้งที่ไม่พบการแสดงอาการของโรคและตรวจไม่พบเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด ถ้าได้รับยา DEC ร่วมกับ Albendazole ในโครงการการกำจัดโรคเท้าช้างในช่วงระยะเวลาหนึ่งก็จะไม่พบการติดเชื้ออีกต่อไป และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของโครงการ ซึ่งมีผลทำให้ประชากรในกลุ่มพื้นที่เสี่ยงต่อ *B. malayi* มีการจ่ายยาอย่างครอบคลุมและมีกินยาตามที่กำหนดไว้ใน PELF ได้แก่ปัจจัยทางด้านกลยุทธ์ทางการตลาดเพื่อสังคมและปัจจัยเรื่องการมีส่วนร่วมของชุมชน (Koyadun et al, 2007) ถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มปัจจัยที่จะทำให้มีการจ่ายยาอย่างครอบคลุมให้กับประชากรกลุ่มเสี่ยงและกระตุ้นให้มีการกินยาตามที่กำหนดไว้ใน PELF ก็ยังทำให้การใช้ยา DEC ร่วมกับ Albendazole เพียงแต่ลดอัตราความชุกของการติดเชื้อโรคเท้าช้างเท่านั้น แต่ยังไม่สามารถทำให้การติดเชื้อในประชากรกลุ่มเสี่ยงลดลงจนเป็นศูนย์ได้

2.5 การเฝ้าระวังและการติดตามประเมินผลของโครงการ

โรคเท้าช้างมีลักษณะของการเกิดโรคและอาการแสดงของผู้ติดเชื้อหลายระดับ ตั้งแต่มีการติดเชื้อพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดแต่ไม่แสดงอาการ มีการติดเชื้อและพบการอักเสบของหลอดเลือดอย่างเฉียบพลัน จนถึงแสดงอาการอย่างรุนแรงจนทำให้เกิดพิการแขนและขาบวมโตอย่างเรื้อรัง (WHO, 1992; 1999(b)) โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคมักจะต้องอยู่ในพื้นที่เสี่ยงเป็นระยะเวลาอันยาวนานอาจหลายเดือนจนถึงหลายปี หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าผู้ที่ป่วยเป็นโรคเท้าช้างเป็นผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยงและมีโอกาสสัมผัสสูงพาหะที่มีเชื้อระยะ L3 ไม่น้อยกว่า 6 เดือน อัตราความชุกของการเกิดโรคในมนุษย์ขึ้นกับจำนวนผู้ที่ติดเชื้อและพบเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดและความหนาแน่นของเชื้อไมโครฟิลาเรียที่พบในผู้นั้น ดังนั้นความรุนแรงของการแพร่กระจายเชื้อในพื้นที่สามารถประเมินได้จากความชุกของการติดเชื้อ mf ของประชากรในพื้นที่นั้นได้ ความชุกของการติดเชื้อและการแพร่กระจายของเชื้อที่พบในพื้นที่เสี่ยงมีบทบาทสำคัญในการใช้ประเมินศักยภาพของยุงพาหะในการกระจายโรค รวมทั้งเป็นตัวบ่งชี้สำหรับการประเมินการวินิจฉัยโรคและการเฝ้าระวังการเกิดโรคในพื้นที่เสี่ยงอีกด้วย ดังนั้นไม่ว่าจะเป็นการศึกษาลักษณะของการระบาดของโรคหรือผลกระทบจากการเกิดโรคไม่ว่าจะเป็นในระดับบุคคลหรือผลกระทบต่อชุมชน ล้วนแล้วแต่เป็นพื้นฐานทางด้านสาธารณสุขในการหามาตรการในการควบคุมและป้องกันโรคทั้งสิ้น วิธีการวินิจฉัยโรคโดยเน้นไปที่การตรวจหาการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อแต่ละคนโดยใช้วิธีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscope) ยังคงเป็นวิธีการวินิจฉัยโรคที่สำคัญซึ่งใช้ในโปรแกรมการควบคุมโรคเท้าช้างอยู่ในปัจจุบันซึ่งเป้าหมายของโปรแกรมนี้อคือการลดจำนวนเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดผู้ที่ติดเชื้อเพื่อ

เป็นการลดโอกาสในการแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่นได้ การเก็บเลือดจากประชากรกลุ่มเสี่ยงด้วยวิธีที่ถูกต้องและการใช้วิธีการวินิจฉัยหาเชื้ออย่างเหมาะสมสามารถที่จำแนกผู้ที่ได้รับเชื้อได้อย่างรวดเร็วซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการรักษาและลดการก่อการของโรคอย่างรุนแรงลงได้ อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์จำเพาะของการควบคุมโรคซึ่งจะมีความสำคัญน้อยกว่าการกำจัดโรคซึ่งไม่เพียงแต่ไปขัดขวางการแพร่กระจายโรคเท่านั้นซึ่งมีเป้าหมายทั้งทำให้สามารถกำจัดเชื้อออกจากผู้ที่ติดเชื้อในทั้งพื้นที่เสี่ยงได้ทั้งหมดและยังสามารถลดอัตราการแพร่กระจายของการติดเชื้อ ซึ่งเป็นการส่งเสริมสุขภาพทั้งในระดับบุคคลและในภาพรวมชุมชนอีกด้วย เพื่อให้ถึงเป้าหมายของโครงการที่ตั้งไว้นั้นการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อในพื้นที่จะต้องอาศัยข้อมูลการกระจายของโรคในประชากรที่อาศัยในพื้นที่เสี่ยง เพื่อให้เข้าใจลักษณะการกระจายของโรคในพื้นที่เสี่ยงเหล่านั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยระบบในการเฝ้าระวังและการติดตามการเกิดโรคที่มีประสิทธิภาพเพื่อที่จะใช้ในการจำแนกประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อใหม่ ซึ่งเครื่องมือในการใช้จำแนกผู้ติดเชื้อที่ใช้อยู่ในโครงการได้แก่ ชุดทดสอบสำเร็จรูปในการตรวจหาฟิลาเรียแอนติบอดี (RB test) การตรวจหาฟิลาเรียแอนติบอดี IgG4 ด้วยวิธี ELISA หรือวิธีทางโมเลกุล (Molecular technique) ซึ่งวิธีเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในการเฝ้าระวังการติดเชื้อในพื้นที่เสี่ยงและการติดตามเพื่อประเมินโปรแกรมการให้ยาครอบคลุมประชากรทั้งพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นโครงการ PELF หรือ GPPEL (WHO, 1999a; 1999b; Ottesen, 2000)

2.6 การดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล

ยาในกลุ่ม Benzimidazoles (BZs) เป็นยาที่มีใช้มานานกว่า 40 ปี มีฤทธิ์ในการทำลายหนอนพยาธิโดยเฉพาะพยาธิตัวกลม ซึ่งใช้อยู่ในโปรแกรมการถ่ายพยาธิในสัตว์เลี้ยงทั้งในสุนัขและแมว ในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นกลุ่มยาที่เป็น broad spectrum สามารถทำลายพยาธิตัวกลมได้ทุกชนิด มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนพยาธิได้ดี ราคาถูก และมีผลข้างเคียงจากการใช้น้อย ยาในกลุ่ม BZs ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ยา mebendazole และ albendazole ซึ่งออกฤทธิ์โดยมีกลไกในการจับกับโปรตีนเบต้าทูบูลิน (β -tubulin) ในเซลล์พยาธิและยับยั้งขบวนการโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) ของโปรตีนทูบูลินเพื่อที่จะสร้างเป็นไมโครทิวบูล (microtubule) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในระบบเส้นใยของเซลล์ (cytoskeleton) ที่มีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ ดังนั้นเมื่อเซลล์ขาดไมโครทิวบูลจึงมีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ ตั้งแต่การขนส่งสาร การแบ่งเซลล์ การทำงานของสารสื่อประสาท และการพัฒนารูปร่างของเซลล์ ซึ่งจะมีผลทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Lacey, 1988; Lacey and Gill, 1994) จากการศึกษาการออกฤทธิ์ของยา BZs ในพยาธิตัวกลมฟิลาเรีย (filarial nematode) พบว่ายาดังกล่าวออกฤทธิ์โดยจับกับเบต้าทูบูลินได้ดีและมีผลต่อการสร้างไมโครทิวบูลของพยาธิ แม้ว่ายา BZs ไม่สามารถฆ่าพยาธิฟิลาเรียได้โดยตรงแต่ก็ไปยับยั้งการผลิตตัวอ่อนพยาธิ (microfilaria) ได้ตลอดไป (Ottesen et al, 1999)

ในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อยา BZs ของหนอนพยาธิในสัตว์หลายชนิดทั่วโลก เนื่องจากมีการใช้ยาในกลุ่มนี้กันอย่างแพร่หลาย โดยเริ่มมีการศึกษาการดื้อยากลุ่ม BZs ในพยาธิกลุ่ม Trichostrongyloid ในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กซึ่งมีการพัฒนาการดื้อยาไปทั่วโลก (Conder and Campbell, 1995; Sangster, 1999; Zajac and Gipson, 2000) และมีการศึกษาความเกี่ยวข้องของยีนเบต้าทูบูลินต่อการดื้อยาทั้งในสัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์ชนิดอื่นๆ (Roos et al, 1990; 1995; Silvestre and Humbert, 2002; Kwa et al, 1993; 1994; 1995; Elard et al, 1996; Elard and Humbert, 1999; Lether et al, 1995) กระทั่งมีการขยายการศึกษาไปถึงเชื้อพยาธิเรื้อรังชนิด *B. pahangi* (Guenette et al, 1991) และ *Onchocerca volvulus* และ *D. immitis* (Geary et al, 1998) กลไกสำคัญของการดื้อยา BZs เกี่ยวข้องกับ Phe-Tyr polymorphism ของยีนเบต้าทูบูลิน ไอโซไทป์ 1 (isotype1) ที่ตำแหน่งของโปรตีน 167 และ 200 (Roos et al, 1990; Kwa et al, 1993, 1994) การศึกษาของ Kwa และคณะ (1995) ใช้ transgenic technology ในพยาธิ *C. elegans* เพื่อศึกษาการดื้อยา BZs จากยีนเบต้าทูบูลินที่ตำแหน่ง 200 มีการนำ cDNA encoding *H. contortus* β -tubulin ที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโน (amino acid) จากฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine, Phe) ไปเป็นไทโรซีน (Tyrosine, Tyr) ที่ตำแหน่งโปรตีน 200 ถ้าย้ายเข้าเซลล์ของ wild-type *C. elegans* ทำให้เกิดการแสดงออกลักษณะดื้อยาของ BZs โดยเมื่อพยาธิ *C. elegans* ที่มีการใส่ยีนที่เป็น β -tubullin cDNA encoding Phe ที่ตำแหน่งโปรตีน 200 แสดงออกเป็นลักษณะ susceptibility ของ BZs แสดงให้เห็นว่าการแสดงลักษณะการดื้อยา BZs เกิดจากการเปลี่ยนแปลงยีนตำแหน่งเดียวคือ Phe ไปเป็น Tyr ที่ตำแหน่งโปรตีน 200 ของยีนเบต้าทูบูลิน

การศึกษาโดยใช้องค์ความรู้และเทคนิคทางอณูพันธุวิทยา เพื่อศึกษา allele-specific ที่พบตำแหน่งโปรตีน 200 ซึ่งอยู่ในส่วนของ Exon 5 ของยีนเบต้าทูบูลิน ไอโซไทป์ 1 (Hoti et al, 2003; Bhumiratana et al, 2010; Pechgit et al, 2011) เพื่อที่จะศึกษาการเกิดการดื้อยา BZs ในพยาธิพยาธิเรื้อรัง โดยการจำแนกตำแหน่ง allele-specific ที่เกิดขึ้นโดยการใช้วิธี PCR ในการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งของ Exon 4 และ 5 ของยีนเบต้าทูบูลินไอโซไทป์1 เพื่อศึกษาลำดับเบส (DNA sequence) ของยีนที่ได้มา และใช้เป็นพื้นฐานในการกำหนดวิธีการตรวจหา allele-specific ของยีนที่ดื้อยา BZs เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังและติดตามการเกิดการดื้อยา BZs ในพยาธิพยาธิเรื้อรังต่อไป

ORIGIN >Bm_BRQD553TR_3-789 nucleotides

```

1 ATACGGAAGGTGCGGAAGTAGTTGATAATGTGTTGGACGTGATACGAAAAGAGCTGAAG exon 3
   T E G A E L V D N V L D V I R K E A E
61 GATGCGATTGTCTTCAGgtacggattgctatagttttataagacattttaattgtggatg
   G C D C L Q
121 tgtttttattttaagaaaaaattaaaaatattttcagGGATTTCAACTAACGCATTCA exon 4
           G F Q L T H S
181 CTTGGTGGTGGTACCGGTTCCGGCATGGGAACATTGCTGATCTCGAAAAATTCGTGAGGAG
   L G G G T G S G M G T L L I S K I R E E
241 TATCCAGATCGAATTATGAGCTCTTTTCGGTTGTGCCATCGCCCAAgtatatatttga
   Y P D R I M S S S F S V V P S P K
301 atttctgattcttatttttaacatctgttatatctatttttaacatagctccataacttt
361 taagtggcgattgtctcacaagtgggttttcggctatcatatcattttcatagttgaag
421 aaaagtatgctagacgtattaatgatttccagGTATCAGATGTTGTGTTGGAACCCCTAC exon 5
           V S D V V L E P Y
481 AATGCAACATTATCAGTCCACCAACTAGTTGAAAACTGACGAAACTTTCTGCATTGAT
   N A T L S V H Q L V E N T D E T F C I D
541 AACGAGGCTTTGTATGACATCTGCTTCCGAACGTTGAAGTTGGCAAATCCAATTACGGT
   N E A L Y D I C F R T L K L A N P T Y G
601 GACCTCAACCATTTGGgttcgtcctttaatttattcttcaagctgtccggtttaaatgca
   D L N H L
661 ttctatttaacatattataaattcggatttaattgcaattttttcaactcttctagaggt
721 taaaatttctatttagTGCTGTGACAATGTCGGAGTAACAACCTTGCTTACGTTTCCCT exon 6
           V S V T M S G V T T C L R F P
781 GGACAGTTGAACGCCGATCTCCGTAAACTGCGCTCAATATGGTACCATTTCACGGTTG
   G Q L N A D L R K L A V N M V P F P R L
841 CATTTCCTTTATGCCAGGATTGCTCCTCTCTGCTCGTGATGCTGCTGCTTATCGAGCC
   H F F M P G F A P L S A R D A A A Y R A
901 CTCAATGTGTGCTGAACCTTACTCAACAGgtctctgtttatttttatga
   L N V A E L T Q Q

```

รูปที่ 2.5 โครงสร้างลำดับเบสและโปรตีนของ β -tubulin gene ตำแหน่งระหว่าง exon 3-6 ของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* : ตำแหน่งของ nucleotide sequences ที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งของลำดับดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ออกแบบมาในการศึกษานี้เพื่อใช้ศึกษาอัลลีสที่จำเพาะต่อการดื้อยา BZ ของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi*

2.7ฤทธิ์ของยาอัลเบนดาโซลต่อเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* และ หลักฐานของการดื้อยาของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi*

การดื้อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (Benzimidazole) ของพยาธิเริ่มมีการศึกษาในพยาธิ *Caenorhabditis elegans* (free living nematode) และพยาธิในกลุ่ม Trichostrongylid และ Ascarid ได้แก่ *Haemonchus contortus* และ *Ascarid suum* โดยศึกษากลไกของยากกลุ่มเบนซิมิดาโซลในการจับกับโปรตีน β -tubulin เพื่อไปยับยั้งขบวนการ polymerization ของโปรตีน tubulin และการฟอร์มเป็น microtubules การขาด microtubule จะทำให้เกิดการยับยั้ง cellular function ได้แก่ transport, cell division, neuronal transmission และ cell differentiation ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายในที่สุด มีการศึกษาที่พบว่ายากกลุ่มเบนซิมิดาโซลออกฤทธิ์โดยการจับกับ β -tubulin และยับยั้งขบวนการ polymerization ใน

microtubule ของพยาธิพิลารีเรีย ยากลุ่มเบนซิมิดาโซลไม่ได้ฆ่าพยาธิตัวแก่พยาธิแต่ไปทำลายและยับยั้งการผลิตไมโครพิลารีเรีย ในพยาธิ *W. bancrofti* การยับยั้งการผลิตไมโครพิลารีเรียอาจเกิดขึ้นได้ตลอดไป (Ottesen et al, 1999) ซึ่งในกลุ่มพยาธิพิลารีเรียนั้นพบได้ว่าการเกิด Phe200Tyr polymorphism ใน β -tubulin เกิดขึ้นในอัตราที่สูงปานกลาง (Pichard, 2005) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยพบหลักฐานที่แน่นอนในการพบการดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิ *B. malayi* ในประเทศไทย แต่เนื่องจากการจ่ายยากลุ่ม MDA 2-drug ในพื้นที่ระบาดของโรค ซึ่งมีความแตกต่างกันของการครอบคลุมการจ่ายยา (MDA coverage) ในแต่ละพื้นที่ จึงเป็นที่มาของสมมุติฐานว่าในพื้นที่ซึ่งมีการครอบคลุมการจ่ายยาแตกต่างกัน จะพบการตอบสนองต่อการรักษากลุ่มต่างกันโดยที่จะพบลักษณะ genotype ของกลุ่มประชากร มี allele *B. malayi* frequencies ของยีน β -tubulin ที่ตอบสนองต่อยาอัลเบนดาโซล ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มที่ไวต่อยาที่มี Homozygous (SS) หรือ heterozygous (Sr) dominant alleles หรือกลุ่มดื้อต่อยาที่มี homozygous recessive (rr) allele ที่แตกต่างกัน

การดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลพบได้ในพยาธิตัวกลมหลายชนิดทั้งที่เป็นพยาธิในคนและสัตว์ ดังที่กล่าวมา ซึ่งกลไกหลักของการดื้อยาจะเกี่ยวข้องกับยีน β -tubulin ซึ่งการเกิด Phe-Try polymorphism ที่ codon 200 ของ β -tubulin ถูก characterized จากพยาธิ Trichostrongylid ต่อมาจึงพบ phe-Try polymorphism ที่ codon 167 ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลจากพยาธิ *H. contortus* จากการสำรวจการเกิดการดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิกลุ่ม Trichostrongylid ในพื้นที่เลี้ยงสัตว์ชี้ให้เห็นว่าตำแหน่ง amino acid ที่ codon Phe 167-Try polymorphism จะทำให้เกิดการดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อ *Teladorsagia circumcincta* ในแกะ (Silvestre and Cabaret, 2002) และ small strongyle species จากม้า (Drogemuller et al, 2004) ซึ่งต่อมามีรายงานการพบ Phe200Tyr polymorphism ที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลในพยาธิ *W. bancrofti* โดยศึกษาเกี่ยวกับยีน isotype 1 β -tubulin ของ close related *B. pahangi* (Guenette et al, 1991) *O. volvulus* และ *D. immitis* (Geary et al, 1998) ทำให้เกิดมุมมองของการเป็นไปได้ของการศึกษาพื้นฐานทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความไวหรือการดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิ *W. bancrofti* และเป็นครั้งแรกที่พบ amino acid ที่ codon 200 ของ isotype 1 β -tubulin gene ที่ตำแหน่ง exon 5 ของพยาธิ *W. bancrofti* ซึ่งตอบสนองต่อการดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลเช่นเดียวกับในพยาธิตัวกลมชนิดอื่นๆ (Kwa et al, 1994, Elard et al, 1996 Elard and Humbert, 1999, Lether et al, 1995)

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

3.1 ประเภทของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยเชิงประยุกต์ โดยใช้องค์ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลและระบาดวิทยาเพื่อพัฒนารูปแบบในการติดตามการดื้อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. และประเมินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศไทย โดยดำเนินการสำรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* จากตัวอย่างเลือดคน เลือดแมว และยุงสายพันธุ์ *Mansonia* spp. ในพื้นที่แพร่โรคและร่วมอยู่ในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศไทย (The National Program to Eliminate Lymphatic Filariasis หรือ PELF) ซึ่งมีความครอบคลุมการจ่ายยารักษากลุ่ม (MDA coverage) ด้วยยาไดเอทิลคาร์บามาซีน (Diethylcarbamazine หรือ DEC) ร่วมกับยาอัลเบนดาโซล (Albendazole) น้อยกว่าร้อยละ 90

ในการศึกษานี้เลือกพื้นที่ตำบลประสงค์ อำเภอนาทม จังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นพื้นที่ในการศึกษานำร่อง เก็บตัวอย่างจากแมวและสุนัขซึ่งเป็นสัตว์รังโรคของโรคเท้าช้าง และยุงสายพันธุ์ *Mansonia* spp. ในพื้นที่ เพื่อศึกษาแนวโน้มและความเสี่ยงของวิธีการเก็บตัวอย่างและดูการกระจายของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ในพื้นที่เพื่อนำมาปรับใช้กับพื้นที่ศึกษาจริงที่อำเภอดากโบ จังหวัดนราธิวาส ซึ่งพื้นที่นี้เป็นพื้นที่รอยโรคของโรคเท้าช้างบรูเกียมาก่อนและพบการติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในคนในช่วงก่อนโครงการจ่ายยาครอบคลุมพื้นที่รอบที่ 1 (ระหว่างปี 2545–2549) จากการศึกษาในพื้นที่นำร่องนี้ได้มีการปรับกระบวนการศึกษาและประเมินหาความเสี่ยงของการศึกษาเพื่อนำมาใช้ในพื้นที่จริงได้แก่พื้นที่อำเภอดากโบ จังหวัดนราธิวาส ซึ่งในพื้นที่อำเภอดากโบนี้ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจาก 4 หมู่บ้านที่ได้รับการจ่ายยารักษาของโรคเท้าช้างในปี 2555 มีความครอบคลุมต่ำกว่าร้อยละ 90 เก็บตัวอย่างทั้งคน แมวและยุง *Mansonia* spp. ผลที่ได้สามารถสรุปเป็นความชุกของการพบเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในพื้นที่และพัฒนารูปแบบ Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อใช้ในการศึกษายีน β -tubulin ของเชื้อ *B. malayi* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการติดตามประสิทธิภาพของการใช้ยาอัลเบนดาโซล (Albendazole) ในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อพยาธิ *B. malayi* และเป็นเครื่องมือในการประเมินความสำเร็จของโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในพื้นที่ต่อไป

3.2 การศึกษานำร่อง (Pilot study) การแพร่กระจายของเชื้อ *B. malayi* ในสัตว์และยุงพาหะ

3.2.1 ลักษณะพื้นที่ศึกษา

การศึกษานี้ดำเนินการเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของโครงการวิจัยฯ ในการเก็บข้อมูลให้ถูกต้องและครบถ้วน ดังนั้นจึงเลือกพื้นที่ซึ่งมีลักษณะทางภูมิศาสตร์และมีการกระจายของโรคเท้าช้างใกล้เคียงกับพื้นที่เป้าหมายในจังหวัดนราธิวาสอีกทั้งยังเป็นพื้นที่เป้าหมายที่มีศักยภาพในการดำเนินกิจกรรมของโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศไทย (PELF) โดยกระทรวงสาธารณสุข เพื่อสำรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในตัวอย่างเลือดสัตว์และยุง ทั้งนี้เลือกพื้นที่ 4 หมู่บ้านของตำบลประสงค์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่หมู่ 3 บ้านน้ำดำ หมู่ 11 บ้านพรุเรียน หมู่ 12 บ้านเขาแก้ว และหมู่ 22 บ้านห้วยเคี่ยม เป็นพื้นที่เป้าหมายในการสำรวจ เนื่องจากเป็นพื้นที่โดยรอบของป่าพรุน้ำดำ (ตามแผนที่ในรูปที่ 3.1 ซึ่งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ (breeding site) หากิน (feeding site) ของยุง *Mansonia* spp. ทั้งยังเป็นพื้นที่ซึ่งเคยมีรายงานผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างด้วย



รูปที่ 3.1 แผนที่ตำบลประสงค์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ที่มา http://www.prasong.go.th/content/show_map.html

3.2.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรศึกษาคือแมวมและสุนัขทั้งหมดที่เลี้ยงในพื้นที่หมู่ 3 บ้านน้ำดำ หมู่ 11 บ้านพุดเรียน หมู่ 12 บ้านเขาแก้ว และหมู่ 22 บ้านห้วยเคี่ยม ตำบลประสงค์ อำเภอกำแพง จังหวัดสุราษฎร์ธานี กลุ่มตัวอย่างเป็นแมวมและสุนัขในพื้นที่ศึกษาที่มีเจ้าของเท่านั้น และเจ้าของยินยอมให้เก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ ซึ่งจากการเข้าศึกษาในพื้นที่สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 201 ตัวอย่าง ประกอบด้วยแมวม 161 ตัวอย่าง สุนัข 40 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำ Cephalic vein เก็บเลือดประมาณ 3 มล. เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อไมโครพลาสมาด้วยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ (microscope) ด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และฟิล์มโลหิตหนา ซึ่งย้อมด้วยสี Wright-Geimsa stain เพื่อหาความหนาแน่นของเชื้อไมโครพลาสมาในเลือด ตัวอย่างเลือดทั้งหมดจะถูกส่งไปยังห้องปฏิบัติการอนุพันธุวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เพื่อนำไปสกัด DNA และใช้ในงานด้านชีวโมเลกุลต่อไป

การเก็บตัวอย่างยุงในพื้นที่ โดยวิธีใช้คนเป็นเหยื่อล่อจับยุง (Human-landing catch) ใช้เจ้าหน้าที่จับยุงทีมละ 2 คนต่อบ้าน 1 หลัง (นอกบ้าน) จับยุงจากบ้าน 2 หลังใน 1 setting ในช่วงเวลา ระหว่าง 18.00 – 21.00 น. โดยที่เก็บตัวอย่างยุงเป็นเวลา 3 คืนติดกัน โดยบ้านที่เก็บยุงนั้นเลือกจากบ้านที่มีสัตว์ที่พบเชื้อไมโครพลาสมาได้จากผลการสำรวจโดยการตรวจวิธี Micro haematocrit tube technique นำตัวอย่างยุงที่ได้ไปจำแนกสปีชีส์ของยุง และหาตัวอ่อนพยาธิพลาสมาในยุงโดยวิธีผ่ายุง (dissection) และ PCR ต่อไป

3.3 การศึกษาการกระจายของเชื้อ *B. malayi* ในคน สัตว์ และยุงพาหะในพื้นที่ศึกษาจังหวัดนราธิวาส

3.3.1 ลักษณะพื้นที่ศึกษา

เป็นการสำรวจหาการติดเชื้อพยาธิกลุ่ม *Brugia* spp. ในคน แมวม และยุง *Mansonia* spp. ในพื้นที่อำเภอบาเจาะ จังหวัดนราธิวาส โดยการศึกษาในคนมีการเก็บตัวอย่างจากประชากร 2 กลุ่ม ได้แก่ จากกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อพลาสมาชนิด *B. malayi* ซึ่งขึ้นทะเบียนการติดตามการรักษาโรคเท้าช้างโดยสาธารณสุขอำเภอบาเจาะ และจากการสำรวจหาผู้ติดเชื้อของเชื้อพลาสมาในพื้นที่รอยโรค ซึ่งมีการจ่ายยารักษา (MDA) ของโรคเท้าช้างในปี 2555 มีความครอบคลุมต่ำกว่าร้อยละ 90 การสำรวจครั้งนี้ดำเนินการเพื่อหาการแพร่กระจายของเชื้อไมโครพลาสมาชนิด *B. Malayi* ในคนที่อาศัยในพื้นที่ศึกษา และมีการเก็บตัวอย่างเลือดในแมวมและยุง *Mansonia* spp. ซึ่งเป็นยุงพาหะของโรค โดยเลือกพื้นที่เก็บตัวอย่างให้สอดคล้องกับการเก็บตัวอย่างเลือดคน นำตัวอย่างเลือดของคนและแมวมที่เก็บได้ไป

ตรวจหาเชื้อไมโครพลาเรียโดยวิธีส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และฟิล์มโลหิตหนา ซึ่งย้อมด้วยสี Wright-Geimsa stain และตรวจจำแนกสปีชีส์ของไมโครพลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR และนำตัวอย่างเชื้อ *B. malayi* ที่จำแนกได้ไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหา specific allele ของยีนที่มีความจำเพาะต่อการตอบสนองต่อยากลับเบนซิมิดาโซล

3.3.2 การติดตามและเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi* ในพื้นที่อำเภอตากใบ

จากรายงานผู้ป่วยติดเชื้อพลาเรียชนิด *B. malayi* ในพื้นที่อำเภอตากใบในปี 2556 พบผู้ขึ้นทะเบียนการติดตามการรักษาในกลุ่มด้วยยาร่วมระหว่าง Diethylcarbamazine และ Albendazole รวมทั้งหมด 18 ราย กระจายอยู่ในตำบลบางขุนทองจำนวน 12 ราย และตำบลโฆสิตจำนวน 6 ราย ซึ่งที่ผู้ป่วยในพื้นที่ตำบลบางขุนทองประกอบด้วยพื้นที่หมู่ 1 บางขุนทอง พบผู้ป่วยจำนวน 5 ราย หมู่ 5 บ้านโคกชุมบก พบผู้ป่วยจำนวน 3 ราย และหมู่ 6 บ้านยูโย พบผู้ป่วยจำนวน 4 ราย ในตำบลโฆสิตพบผู้ป่วยที่หมู่ 1 จำนวน 1 รายและหมู่ 5 จำนวน 5 ราย การศึกษาครั้งนี้ทำการติดตามผู้ป่วยครบทั้ง 18 ราย โดยการเจาะเลือดประมาณ 3 ml. เพื่อตรวจหาการติดเชื้อไมโครพลาเรียด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และฟิล์มโลหิตหนา และดำเนินการสอบสวนโรคผู้ป่วยรายที่ยังคงสามารถตรวจพบเชื้อไมโครพลาเรียในเลือด ตัวอย่างเลือดที่พบเชื้อไมโครพลาเรียจะถูกส่งไปยังห้องปฏิบัติการอนุพันธุวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานครเพื่อสกัด DNA เพื่อใช้ในงานด้านชีวโมเลกุลต่อไป

3.3.3 การสำรวจหาผู้ที่ติดเชื้อ *B. malayi* ในพื้นที่แพร่โรค

สำรวจหาการติดเชื้อไมโครพลาเรียในคนที่อาศัยในพื้นที่เป้าหมายของโครงการวิจัยได้แก่ พื้นที่อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส โดยเลือกกลุ่มตัวอย่างจาก 4 หมู่บ้านที่เคยพบว่ามีคนติดเชื้อ *B. malayi* ในระหว่างปี 2445-2555 และมีการจ่ายยารักษาของกลุ่มของโรคเท้าช้างในปี 2555 มีความครอบคลุมต่ำกว่าร้อยละ 90 ได้แก่ หมู่ 1 บางขุนทอง หมู่ 3 บ้านโคกสูง และหมู่ 5 บ้านโคกชุมบก ตำบลบางขุนทอง และหมู่ 2 บ้านโคกไผ่ ตำบลพร่อน เก็บตัวอย่างทั้งหมด 1,046 คน ตามตารางที่ 1 การเก็บเลือดจะเก็บในช่วงกลางวัน (18.00-21.00 น.) ใช้วิธีเจาะเลือดที่ปลายนิ้ว และตรวจหาเชื้อไมโครพลาเรียด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และฟิล์มโลหิตหนา ผู้ที่พบการติดเชื้อไมโครพลาเรียจะถูกเก็บเลือดซ้ำเพื่อนำเลือดไปสกัด DNA เพื่อใช้ในงานด้านชีวโมเลกุลต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงความครอบคลุมการจ่ายยาในปี 2555 จำนวนผู้ป่วยเฉพาะโรคเท้าช้าง ในปี 2554–2555 และจำนวนผู้ที่เข้าสำรวจหาการติดเชื้อ *B. malayi*

อำเภอตากใบ		ประชากร	ความครอบคลุม	ผู้ป่วยที่ตรวจด้วยวิธีต่างๆ			ตัวอย่างที่เจาะเลือด
หมู่	ตำบล	(คน)	การจ่ายยา (คน)	Tick blood			(คน)
				film	IgG4	ICT	
1	บางขุนทอง	1977	1452 (73.4%)	56	3	2	317 (16%)
3	บางขุนทอง	709	582 (82%)	–	–	19	232 (32.7%)
5	บางขุนทอง	425	327 (76.9%)	3	1	23	318 (74.8%)
2	พร่อน	368	244 (66%)	–	–	6	179 (48.6%)

3.3.4 การสำรวจหาแมงที่ติดเชื้อ *B. malayi* ในพื้นที่

สำรวจหาการติดเชื้อไมโครพลาเรียในแมงที่อาศัยในพื้นที่เป้าหมาย โดยเลือกตัวอย่างแมงจาก 2 กลุ่มตัวอย่างคือ กลุ่มที่ 1 เลือกแมงที่อาศัยอยู่บริเวณบ้านของผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi* ในพื้นที่อำเภอตากใบทั้งหมด ซึ่งเก็บตัวอย่างเลือดแมงได้จำนวน 8 ตัว และกลุ่มที่ 2 เป็นแมงที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เป้าหมายใน 4 หมู่บ้านที่มีการสำรวจการติดเชื้อไมโครพลาเรียในคนจำนวนทั้งสิ้น 87 ตัว ได้แก่แมงที่อาศัยในพื้นที่หมู่ 1 บางขุนทอง หมู่ 3 บ้านโคกงู และหมู่ 5 บ้านโคกซุมบก ตำบลบางขุนทอง และหมู่ 2 บ้านโคกไผ่ ตำบลพร่อน โดยทำการเก็บเลือดในช่วงเวลากลางคืน (night blood survey) ระหว่างเวลา 18.00 – 21.00 น. เก็บเลือดปริมาณประมาณ 3 มล. จากเส้นเลือดดำ Cephalic vein เพื่อนำไปตรวจหาไมโครพลาเรียด้วยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และฟิล์มไลเทินาและย้อมด้วย Wright–Geimsa stain จากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่เหลือไปสกัด DNA เพื่อใช้ในการงานด้านชีวโมเลกุลต่อไป

3.3.5 การสำรวจยุง *Mansonia* spp. ในพื้นที่

วิธีการเก็บตัวอย่างยุงในพื้นที่ศึกษา โดยมีเกณฑ์การเลือกบ้านที่เก็บยุง หรือดำเนินการเลือกตำแหน่ง/บ้านที่จะเข้าเก็บตัวอย่างยุง ดังนี้

1. บ้าน/ระแวกบ้านที่มีแมงติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. จากการสำรวจการติดเชื้อไมโครพลาเรียในเลือดแมงเวลากลางคืน (Night blood survey) โดยวิธี Micro haematocrit tube technique

2. บ้าน/ระแวกบ้านที่เลือกเก็บตัวอย่างจะต้องอยู่ใกล้บริเวณป่าพรุ ในรัศมีที่ยุง *Mansonia* spp. ออกหากิน ระยะประมาณ 0.5 ถึง 1.5 กิโลเมตร
3. บ้าน/ระแวกบ้านที่อยู่ในพื้นที่แพร่โรคหรือเคยมีผู้ป่วยโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* หรือเคยมีแมวที่ติดเชื้อ (สำนักงานสาธารณสุขอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส)

การเก็บตัวอย่างยุงทำทั้งหมด 3 ครั้ง ระยะเวลาในการเก็บห่างกันทุกประมาณ 6 เดือน โดยเลือกในช่วงฤดูฝน (wet season) และฤดูแล้ง (dry season) โดยเก็บครั้งแรกเมื่อเดือนสิงหาคม 2556 ครั้งที่ 2 เมื่อเดือนมีนาคม 2557 และครั้งที่ 3 เมื่อเดือนสิงหาคม 2557 ในการศึกษาครั้งนี้เลือกดำเนินการในเดือนสิงหาคมซึ่งเป็นช่วงต้นฤดูฝน เนื่องจากหากทำศึกษาช่วงกลางและปลายฤดูฝน (เดือนตุลาคมถึงธันวาคม) ในเขตพื้นที่จังหวัดนราธิวาสจะมีฝนตกหนักและเกิดน้ำท่วมทุกปี ทำให้ความชุกชุมของยุง *Mansonia* spp. ลดลงอย่างมาก อีกทั้งถ้าปริมาณน้ำฝนมากทำให้เป็นอุปสรรคในการเข้าทำงานพื้นที่การเก็บตัวอย่างยุงแต่ละครั้งจะเก็บที่บ้านที่ถูกเลือกมาตามเกณฑ์การเลือก setting ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมทั้งหมด 4 settings โดยเก็บ setting ละ 2 คน (นอกบ้าน) เก็บในช่วงเวลา 18.00 – 21.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พบยุง *Mansonia* ได้ทุกสปีชีส์ (Apiwathnasorn *et al*, 2006; Chang *et al*, 1984) โดยใช้เวลาเก็บติดต่อกันเป็นเวลา 3 คืน หรือรวมเป็น 1 mosquito pool ต่อ 1 setting สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ได้พิจารณาเลือกการจับยุงด้วยวิธีใช้คนเป็นเหยื่อล่อ (Human-landing catch) เนื่องจากการทดลองนำร่องในพื้นที่อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่าวิธีดังกล่าวได้ผลดีกว่าการจับยุงโดยวิธี CDC light trap (Chang *et al*, 1984) นำตัวอย่างยุง *Mansonia* spp. ที่ได้ในแต่ละ pool ไปจำแนกสปีชีส์ ตาม Keys ที่กำหนด (Rattanarithiku *et al*, 1994; 2006; 2010) และทำการผ่ายุงโดยวิธีการ dissection ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) เพื่อหาตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรีย (larva) ระยะที่ 1–3 จากนั้นจะนำตัวอย่างยุง *Mansonia* spp. และ larvae ไปยังห้องปฏิบัติการอนุพันธุวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เพื่อตรวจวินิจฉัยและจำแนกพยาธิฟิลาเรียในตัวอย่างดังกล่าวด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

3.4 วิธีการศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาตัวอย่างในห้องปฏิบัติการโดยการนำตัวอย่างเลือดคนและสัตว์ และยุงที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ศึกษามาสกัด DNA และใช้เป็นตัวอย่างในการพัฒนาวิธีการทางชีวโมเลกุลในการจำแนกสปีชีส์ของพยาธิฟิลาเรีย และการศึกษาและนำไปศึกษายีนที่มีอัลลีลจำเพาะต่อความไวรับของยากุ่มเบนซิมิดาโซล โดยมีวิธีการศึกษาทางห้องปฏิบัติการดังนี้

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างเลือดคนและเลือดแมว

ตัวอย่างเลือดคนและเลือดแมวที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด โดยการตรวจหาและนับจำนวนไมโครฟิลาเรีย (mf) ในเลือดโดยวิธีฟิล์มโลหิตหนา (tick smear technique) ย้อมด้วยสี Wright-Giemsa stain และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกค่าความหนาแน่นของเชื้อไมโครฟิลาเรีย (mf density) ของแต่ละตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป เตรียมตัวอย่างเลือดที่จะใช้เป็น negative control ได้แก่เลือดคนและแมวที่มีปรสิตในเลือดอื่นๆ ได้แก่ *Dipetalonema reconditum*, *Pasmodium* spp., *Babesia* spp., และ *Anaplasma* spp. และเตรียม internal control โดยใช้เลือดคนและแมวที่ตรวจไม่พบ mf และตัวอย่าง genomic DNA ของยุงที่ไม่พบพยาธิฟิลาเรีย

3.4.2 วิธีเก็บพยาธิจากตัวยุง

ใช้ Aspirator ดูดยุงออกมาจากกระบอกเก็บยุงที่เก็บได้มาจากพื้นที่ นำมาทำให้ตายด้วยการแช่เย็นในตู้เย็น (4°C) แล้วส่องดูรายละเอียดของอวัยวะผ่านกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) เพื่อจำแนกชนิดของยุงด้วย keys ชนิดต่างๆ (Rattanarithiku *et al*, 1994; 2006; 2010) แล้วหยดสารละลาย Phosphate buffer solution (PBS) หรือน้ำเกลือ Normal saline บนแผ่นสไลด์ วางยุงที่จำแนกชนิดแล้วลงบนสารละลายนั้น แล้วผ่าแยกส่วนหัว ออก และท้อง ออกจากกัน ทำการผ่ายุงภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อค้นหาตัวอ่อน (larvae) ของพยาธิฟิลาเรียระยะ L1, L2, L3 ในอวัยวะต่างๆ ของยุงดังกล่าว นำตัวอ่อนพยาธิที่เก็บได้จากตัวยุงเก็บไว้ในน้ำเกลือ (normal saline) ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอจำแนกชนิดด้วยเทคนิค PCR ต่อไป บันทึกรายละเอียดที่ได้จากการทดลอง เช่น วัน สถานที่และเวลาที่เก็บยุง ชนิดของยุง และผลการศึกษาทาง PCR เพื่อใช้วิเคราะห์ผลการศึกษา

การหาตัวอ่อนของเชื้อฟิลาเรีย (larvae) ในตัวยุง *Mansonia* spp. นั้น ยุงทั้งหมดที่เก็บได้ในพื้นที่ศึกษาตามที่กำหนดจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่ากัน ส่วนที่หนึ่งนำมาผ่าเพื่อหาตัวอ่อนพยาธิ อีกส่วนที่เหลือนำมารวมกันเป็น Mosquito pool และหาการติดเชื้อฟิลาเรียโดยใช้วิธี rDNA locus-specific PCR ต่อไป

3.4.3 การออกแบบไพรเมอร์

3.4.3.1 ไพรเมอร์สำหรับเทคนิค rDNA locus-specific PCR

การจำแนกเชื้อไมโครฟิลาเรียในตัวอย่างเลือดคนและสัตว์ด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR โดยการหาตำแหน่งยีนที่เหมาะสมในการศึกษาและประเมินความเป็นไปได้ของการใช้ nucleotide sequences ของพยาธิฟิลาเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *B. malayi*, *B. pahangi*, *W. bancrofti*, *onchocerca*

volvulus, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, *M. ozzardi*, *D. immitis* และ *Dipetalonema reconditum* เพื่อหาตำแหน่งที่จำเพาะในการจำแนกพยาธิพลาเรีย โดยมุ่งไปที่ยีน rDNA (ตำแหน่งของ 18S, ITS1 และ 5.8S) nucleotide sequence ได้มาจาก genome databases ของ GenBank, EMBL และ DDBJ หา homology ของ DNA และ protein ที่ต้องการศึกษาโดยการวิเคราะห์ sequence similarity algorithms จากโปรแกรม BLASTN, BLASTx and BLASTP

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS) โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกออกแบบจากการวิเคราะห์ DNA alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

การจำแนกชนิดของพยาธิพลาเรียโดยใช้ rDNA เป็นยืนยันเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษา วิเคราะห์มา จากชนิดของพยาธิและ accession no. ตามที่ปรากฏในรูปของ Multiple sequence alignment ในรูปที่ 3.2 ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้เป็น universal primers ออกแบบมาให้มีความจำเพาะและใช้ในการจำแนกพยาธิพลาเรียได้หลายชนิดทั้งที่เป็นปรสิตในคนและในสัตว์ โดยการจำแนกชนิดของพยาธิจะขึ้นอยู่กับ การเพิ่มจำนวนยีนในตำแหน่ง rDNA (18S-ITS1-5.8S) ของพยาธิแต่ละชนิด ซึ่งจะได้ PCR product ที่มีขนาด (amplicon size) ที่แตกต่างกันดังรูปที่ 3.2

การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยารอบที่ 2 ของวิธี rDNA locus-specific PCR เพื่อใช้ในการ จำแนกชนิดของพยาธิพลาเรีย ซึ่งออกแบบให้เป็น semi-nested PCR โดยในปฏิกิริยารอบ 2 นี้จะ ออกแบบ forward primer ให้มีความจำเพาะต่อพยาธิพลาเรียแต่ละชนิด โดยจะใช้ reverse primer ที่มี DNA sequence เหมือนกับในปฏิกิริยารอบแรก (first round PCR) ซึ่งไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในปฏิกิริยา semi-nested PCR นี้แสดงในตารางที่ 3.2

CLUSTAL multiple sequence alignment

FW1-UNI primer

5' **GGTGAACCTGCGGAAGGATCATT** 3'

```

Mp_EU272184  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACGAGCTTCCA-----AACAA-ATACATAATA--- 50
Mp_EU272183  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACGAGCTTCCA-----AACAA-ATACATAATA--- 50
Mp_EU272182  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACGAGCTTCCA-----AACAA-ATACATAATA--- 50
Mp_EU272181  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACGAGCTTCCA-----AACAA-ATACATAATA--- 50
Mp_DQ995498  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACGAGCTTCCA-----AACAA-ATACATAATA--- 50
Mp_EU272177  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACGAGCTTCCA-----AACAA-ATACATAATA--- 50
Mo_EU272180  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACGAGCTTCCA-----AACAA-ATACATAATA--- 50
Bm_AY621467  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Bm_AY621464  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Bm_AY621468  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 48
Bm_AY621466  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Bm_AY621465  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Bp_AY621471  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Bp_AY621470  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Bp_AY621469  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Bp_AY621472  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTCAA-----AAAAA-A---ATAACACA- 49
Wb_EU272178  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTTTA-----AAAAC-A---ACAATAAAT 50
Wb_AY621476  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTTTA-----AAAAC-A---ACAATAAAT 50
Wb_AY621478  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTTTA-----AAAAC-A---ACAATAAAT 50
Wb_AY621475  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTTTA-----AAAAC-A---ACAATAAAT 50
Wb_AY621474  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTTTA-----AAAAC-A---ACAATAAAT 50
Wb_AY621477  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTTTA-----AAAAC-A---ACAATAAAT 50
Wb_AY621473  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGCTTTTA-----AAAAC-A---ACAATAAAT 50
Ll_EU272176  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAA-----AAACA-A---CAAAATA--- 48
Ll_DQ995497  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAA-----AAACA-A---CAAAATA--- 48
Di_EU087700  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAACAAA-CAACAA-ACACATCATCATC 58
Di_AF217800  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAACAAA-CAACAA-ACACATCATCATC 58
Dr_AY621480  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAACAAAACAAACAA-ACACATCATCATC 59
Dr_AY621479  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAACAAAACAAACAA-ACACATCATCATC 59
Dr_AY621481  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAACAAAACAAACAA-ACACATCATCATC 59
Ov_EU272179  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAAC-----AACAAACAATAATCATAAT 55
Dre_AF217801  GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTTCAAC-----AACACAA---ACAATA--- 49
*****

```

```

Mp_EU272184  ---ACAATGAAATGTTAT-----CCATAATTATTATT-----ACTATTC-- 86
Mp_EU272183  ---ACAATGAAATGTTAT-----CCATAATTATTATT-----ACTATTC-- 86
Mp_EU272182  ---ACAATGAAATGTTAT-----CCATAATTATTATT-----ACTATTC-- 86
Mp_EU272181  ---ACAATGAAATGTTAT-----CCATAATTATTATT-----ACTATTC-- 86
Mp_DQ995498  ---ACAATGAAATGTTAT-----CCATAATTATTATT-----ACTATTC-- 86
Mp_EU272177  ---ACAATGAAATGTTAT-----CCATAATTATTATT-----ACTATTC-- 86
Mo_EU272180  ---ACAATTAAATGTTAT-----CCATAATTATTATTG---TTACTATTC-- 89
Bm_AY621467  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTAT---AGCTACCATATAT 88
Bm_AY621464  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTAT---AGCTACCATATAT 88
Bm_AY621468  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTAT---AGCTACCATATAT 87
Bm_AY621466  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTAT---AGCTACCATATAT 88
Bm_AY621465  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTAT---AGCTACCATATAT 88
Bp_AY621471  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTATTATAGCTACCATAT-- 89
Bp_AY621470  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTATTATAGCTACCATAT-- 89
Bp_AY621469  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTATTATAGCTACCATAT-- 89
Bp_AY621472  ---ACAATGATTG--AAT-----TTATTATTATTATTATAGCTACCATAT-- 89
Wb_EU272178  AAAACAATGATTATTAAT-----TTATT--TATTAT---ACTACCATAT-- 89
Wb_AY621476  AAAACAATGATTATTAAT-----TTATT--TATTAT---ACTACCATAT-- 89
Wb_AY621478  AAAACAATGATTATTAAT-----TTATT--TATTAT---ACTACCATAT-- 89
Wb_AY621475  AAAACAATGATTATTAAT-----TTATT--TATTAT---ACTACCATAT-- 89
Wb_AY621474  AAAACAATGATTATTAAT-----TTATT--TATTAT---ACTACCATAT-- 89
Wb_AY621477  AAAACAATGATTATTAAT-----TTATT--TATTAT---ACTACCATAT-- 89
Wb_AY621473  AAAACAATGATTATTAAT-----TTATT--TATTAT---ACTACCATAT-- 89
Ll_EU272176  ---ACGATTATTTATCATC-----ATCATCATAATTAT-----TACTATAC-- 86
Ll_DQ995497  ---ACGATTATTTATCATC-----ATCATCATAATTAT-----TACTATAC-- 86
Di_EU087700  ---ATCATTATTA-----CTACTACTACTACT---ACTACTACTAAT 94
Di_AF217800  ---ATCATCATTATTACT-----ACTTCTACTACTACTACT---ACTACTACTAAT 103
Dr_AY621480  ---ATCATTATTACTACTTCTACTACTACTACTACTACT---ACTACTACTAAT 113

```

Dr_AY621479	--ATCATTATTACTACTTCTACTACTACTACTACTACT---	ACTACTACTAAT	113
Dr_AY621481	---ATCATTATTACTACTTTCTACTACTACTACTACTACT---	ACTACTACTAAT	113
Ov_EU272179	ATTTTTATTATATGTAATG-----ATCATTATTAC----	CAACCATAT--	94
Dre_AF217801	----CATCATACAGCAC-----TACT--TGACAC-----	GCTAAAG--	79
	** *	* *	*
Mp_EU272184	----ACTTT-----TA-T--TTAGCAACATGCATGAGTATATA	CATATAT-ATAGTTGC	132
Mp_EU272183	----ACTTT-----TA-T--TTAGCAACATGCATGAGTATATA	CATATAT-ATAGTTGC	132
Mp_EU272182	----ACTTT-----TA-T--TTAGCAACATGCATGAGTATATA	CATATAT-ATAGTTGC	132
Mp_EU272181	----ACTTT-----TA-T--TTAGCAACATGCATGAGTATATA	CATATAT-ATAGTTGC	132
Mp_DQ995498	----ACTTT-----TA-T--TTAGCAACATGCATGAGTATATA	CATATAT-ATAGTTGC	132
Mp_EU272177	----ACTTT-----TA-T--TTAGCAACATGCATGAGTATATA	CATATAT-ATAGTTGC	132
Mo_EU272180	----ATTTT-----TT-TA-TTAGCAGCA-----ACAT-ATA	GTAGTT-T	118
Bm_AY621467	ATATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Bm_AY621464	ATATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Bm_AY621468	ATATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	127
Bm_AY621466	ATATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Bm_AY621465	ATATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Bp_AY621471	-TATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Bp_AY621470	-TATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Bp_AY621469	-TATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Bp_AY621472	-TATATTATGAT-ACTA-TA-TTAAACAACATA-----	TTGTTGTA--TGT	128
Wb_EU272178	---TATTTT--T-GCTA-TA-TTAGTAATAAAA-----	ACAT-ATA--TGT	123
Wb_AY621476	---TATTTT--T-GCTA-TA-TTAGTAATAAAA-----	ACAT-ATA--TGT	123
Wb_AY621478	---TATTTT--T-GCTA-TA-TTAGTAATAAAA-----	ACAT-ATA--TGT	123
Wb_AY621475	---TATTTT--T-GCTA-TA-TTAGTAATAAAA-----	ACAT-ATA--TGT	123
Wb_AY621474	---TATTTT--T-GCTA-TA-TTAGTAATAAAA-----	ACAT-ATA--TGT	123
Wb_AY621477	---TATTTT--T-GCTA-TA-TTAGTAATAAAA-----	ACAT-ATA--TGT	123
Wb_AY621473	---TATTTT--T-GCTA-TA-TTAGTAATAAAA-----	ACAT-ATA--TGT	123
Ll_EU272176	----ATA-----TA-TA-TTATTAGTATT-----	CAT-----	107
Ll_DQ995497	----ATA-----TA-TA-TTATTAGTATT-----	CAT-----	107
Di_EU087700	----TACTAAT-ACTACTA-TTAAACATCATTATTCTGC-----	TTATTTTCATTCT	139
Di_AF217800	ACTAATACTAAT-ACTACTA-TTAAACATCATTATGCTGC-----	TTATTTTCATTCT	153
Dr_AY621480	ACTAATACTAAT-ACTACTA-TTAAACATCATTATGCTGC-----	TTATTTTCATTCT	163
Dr_AY621479	ACTAATACTAAT-ACTACTA-TTAAACATCATTATGCTGC-----	TTATTTTCATTCT	163
Dr_AY621481	A---ATACTAAT-ACTACTA-TTAAACATCATTATGCTGC-----	TTATTTTCATTCT	160
Ov_EU272179	---CACTTAAATCATTATCA-TTATTATTATTTTATATTA-----	ACATAAAATTCT	143
Dre_AF217801	---CATTGAG-----TAGGAGCTAATAGCAC-----		102
	* ** * *		
Mp_EU272184	TTTGCTATTA-----T-TTAATATTAGTGAATAG-----	TTAA-A-----	165
Mp_EU272183	TTTGCTATTA-----T-TTAATATTAGTGAATAG-----	TTAA-A-----	165
Mp_EU272182	TTTGCTATTA-----T-TTAATATTAGTGAATAG-----	TTAA-A-----	165
Mp_EU272181	TTTGCTATTA-----T-TTAATATTAGTGAATAG-----	TTAA-A-----	165
Mp_DQ995498	TTTGCTATTA-----T-TTAATATTAGTGAATAG-----	TTAA-A-----	165
Mp_EU272177	TTTGCTATTA-----T-TTAATATTAGTGAATAG-----	TTAA-A-----	165
Mo_EU272180	TTTGCTAATA-----AATTGCTATTTATGAATAG-----	TTAA-A-----	152
Bm_AY621467	GTTATTAATA-----GATTGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	161
Bm_AY621464	GTTATTAATA-----GATTGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	161
Bm_AY621468	GTTATTAATA-----GATTGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	160
Bm_AY621466	GTTATTAATA-----GATTGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	161
Bm_AY621465	GTTATTAATA-----GATTGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	161
Bp_AY621471	GTTACTAATA-----GATTGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	161
Bp_AY621470	GTTACTAATA-----GATCGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	161
Bp_AY621469	GTTACTAATA-----GATTGATGTTAATAAATT-----	TTAATA-----	161
Bp_AY621472	GTTACTAATA-----GATTGATGTTGATAAATT-----	TTAATA-----	161
Wb_EU272178	GTTACTAATAT-----AGATTGATGTGAATAAATT-----	TTAATA-----	158
Wb_AY621476	GTTACTAATAT-----AGATTGATGTGAATAAATT-----	TTAATA-----	158
Wb_AY621478	GTTACTAATAT-----AGATTGATGTGAATAAATT-----	TTAATA-----	158
Wb_AY621475	GTTACTAATAT-----AGATTGATGTGAATAAATT-----	TTAATA-----	158
Wb_AY621474	GTTACTAATAT-----AGATTGATGTGAATAAATT-----	TTAATA-----	158
Wb_AY621477	GTTACTAATAT-----AGATTGATGTGAATAAATT-----	TTAATA-----	158
Wb_AY621473	GTTACTAATAT-----AGATTGATGTGAATAAATT-----	TTAATA-----	158
Ll_EU272176	-TTACTAATAAT-----AGATTAAATAATAGTTAATAT-----	ATAATA-----	144
Ll_DQ995497	-TTACTAATAAT-----AGATTAAATAATAGTTAATAT-----	ATAATA-----	144
Di_EU087700	TTTTCAAATAATGCAAGAATGAAATAGAATGAATGAATGATGTT	TAATAGATTAAT	199
Di_AF217800	TTTTCAAATAATGCAAGAATGAAATAGAATGAATGAATGA---TG	TTTAATAGATTAAT	209
Dr_AY621480	TTTTCAAATAATGCAAGAATGAAATAGAATGAATGAATGA---TG	TTTAATAGATGGAT	219

Dr_AY621479	TTTTCAAATAATGCAAGAATGAAATAGAATGAATGAATGA----	TGTTTAATAGATGGAT	219
Dr_AY621481	TTTTCAAATAATGCAAGAATGAAATAGAATGAATGAATGA----	TGTTTAATAGATGGAT	216
Ov_EU272179	TTTTTCATTTA-----	AGCAACGAAAAAGAATGTG-----TTAATA-----	178
Dre_AF217801	-TAGCCAATC-----	ATAGAAGGCAAGAGTTGA-----TTGGTG-----	135
	*	*	
Mp_EU272184	-----T----	AATAAT-----TGAT	176
Mp_EU272183	-----T----	AATAAT-----TGAT	176
Mp_EU272182	-----T----	AATAAT-----TGAT	176
Mp_EU272181	-----T----	AATAAT-----TGAT	176
Mp_DQ995498	-----T----	AATAAT-----TGAT	176
Mp_EU272177	-----T----	AATAAT-----TGAT	176
Mo_EU272180	-----T-GATAATAAT-----	TGAT	166
Bm_AY621467	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AA-----ATAATAATAATAATAAT	192
Bm_AY621464	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AA-----ATAATAATAATAATAAT	192
Bm_AY621468	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AA-----ATAATAATAATAATAAT	191
Bm_AY621466	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AA-----ATAATAATAATAATAAT	192
Bm_AY621465	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AA-----ATAATAATAATAATAAT	192
Bp_AY621471	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AAGTAATAATAATAATAATAATAAT	198
Bp_AY621470	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AAGTAATAATAATAATAATAATAAT	198
Bp_AY621469	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AAGTAATAATAATAATAATAATAAT	198
Bp_AY621472	-----T-GGTAGTAGCAT-----	AAGTAATAATAATAATAATAATAAT	198
Wb_EU272178	-----T-GGTAATAGTA-----	AAT	172
Wb_AY621476	-----T-GGTAATAGTA-----	AAT	172
Wb_AY621478	-----T-GGTAATAGTA-----	AAT	172
Wb_AY621475	-----T-GGTAATAGTA-----	AAT	172
Wb_AY621474	-----T-GGTAATAGTA-----	AAT	172
Wb_AY621477	-----T-GGTAATAGTA-----	AAT	172
Wb_AY621473	-----T-GGTAATAGTA-----	AAT	172
Ll_EU272176	-----TTGATGATGAT-----	AT	157
Ll_DQ995497	-----TTGATGATGAT-----	AT	157
Di_EU087700	AGATGAATAGTTAGTAGTAGTTAGTTAGTTAGTTAGATAGATAGATAAAATGAAATGATGAT		259
Di_AF217800	AGATGAATAGTTAGTAGTAGTTAGTTAGTTAGTTAGTTAGATAGATAGATAAAATGAAATGATGAT		269
Dr_AY621480	AGTTAGTTAGTTAGTAGT-----	TAGTCAGTTAGATAGATAGATAAAATGAAATGATGAT	273
Dr_AY621479	AGTTAGTTAGTTAGTAGT-----	TAGTCAGTTAGATAGATAGATAAAATGAAATGATGAT	273
Dr_AY621481	AGTTAGTTAGTTAGTAGT-----	TAGTCAGTTAGATAGATAGATAAAATGAAATGATGAT	270
Ov_EU272179	--ATAGATGAATGATAATA-----	ATAGTGAT	203
Dre_AF217801	-----TGGTG-----	TGAG	144
	*	*	
Mp_EU272184	AC-----	AACTGAATT--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	210
Mp_EU272183	AC-----	AACTGAATT--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	210
Mp_EU272182	AC-----	AACTGAATT--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	210
Mp_EU272181	AC-----	AACTGAATT--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	210
Mp_DQ995498	AC-----	AACTGAATT--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	210
Mp_EU272177	AC-----	AACTGAATT--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	210
Mo_EU272180	AC-----	AACTGAATT--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	200
Bm_AY621467	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	225
Bm_AY621464	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	225
Bm_AY621468	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	224
Bm_AY621466	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	225
Bm_AY621465	AA-----	TA-TGAATG--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	225
Bp_AY621471	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGTTATTTCGTTGGTGTCT	231
Bp_AY621470	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGTTATTTCGTTGGTGTCT	231
Bp_AY621469	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGTTATTTCGTTGGTGTCT	231
Bp_AY621472	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGTTATTTCGTTGGTGTCT	231
Wb_EU272178	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	205
Wb_AY621476	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	205
Wb_AY621478	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	205
Wb_AY621475	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	205
Wb_AY621474	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	205
Wb_AY621477	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	205
Wb_AY621473	AA-----	TA-TGAATA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	205
Ll_EU272176	AT-----	GA-TGAAGA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	190
Ll_DQ995497	AT-----	GA-TGAAGA--AACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	190
Di_EU087700	GA-----	AATATTTTTATTTCG-ATCAATTGAATATAAACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	312
Di_AF217800	GA-----	AATATTTTTATTTCG-ATCAATTGAATATAAACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT	322
Dr_AY621480	GATAAGCGAATGTATTATTTCATATGAATTGAATATAAACGGTGATATTTCGTTGGTGTCT		333

Dr_AY621479	GATAAGCGAATGTATTTATTCATATGAATTGAATATAAACCGTGATATTCGTTGGTGTCT	333
Dr_AY621481	GATAAGCGAATGTATTTATTCATATGAATTGAATATAAACCGTGATATTCGTTGGTGTCT	330
Ov_EU272179	ATATTTTGTGATTGGTTAAATTA---AAAATGAATA--AACGGTGATATTCGTTGGTGTCT	258
Dre_AF217801	AA-----A--GAA---AACGGTGATATTCGTTGGTGTCT	173
	* **	
Mp_EU272184	ATACTTTATCCAAATTATCGCCTAAACCGTCGATAATGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	270
Mp_EU272183	ATACTTTATCCAAATTATCGCCTAAACCGTCGATAATGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	270
Mp_EU272182	ATACTTTATCCAAATTATCGCCTAAACCGTCGATAATGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	270
Mp_EU272181	ATACTTTATCCAAATTATCGCCTAAACCGTCGATAATGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	270
Mp_DQ995498	ATACTTTATCCAAATTATCGCCTAAACCGTCGATAATGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	270
Mp_EU272177	ATACTTTATCCAAATTATCGCCTAAACCGTCGATAATGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	270
Mo_EU272180	ATACTTTATCCAAATTATCGCCTAAACCGTCGATAATGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	260
Bm_AY621467	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	284
Bm_AY621464	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	284
Bm_AY621468	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	283
Bm_AY621466	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	284
Bm_AY621465	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	284
Bp_AY621471	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	290
Bp_AY621470	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	290
Bp_AY621469	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	290
Bp_AY621472	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	290
Wb_EU272178	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	264
Wb_AY621476	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	264
Wb_AY621478	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	264
Wb_AY621475	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	264
Wb_AY621474	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	264
Wb_AY621477	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	264
Wb_AY621473	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	264
Ll_EU272176	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	249
Ll_DQ995497	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	249
Di_EU087700	ATATTTTATCTAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAGCGATGAAGATAAAATGATAGCTTA	371
Di_AF217800	ATATTTTATCTAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAGCGATGAAGATAAAATGATAGCTTA	381
Dr_AY621480	ATATTTTATCTAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAGCGATGAAGATAAAATGATAGCTTA	392
Dr_AY621479	ATATTTTATCTAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAGCGATGAAGATAAAATGATAGCTTA	392
Dr_AY621481	ATATTTTATCTAAGTTATCGCCTAA--CCGTCGATAGCGATGAAGATAAAATGATAGCTTA	389
Ov_EU272179	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTGA--CCGTCGATAACAATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	317
Dre_AF217801	ATACTTTATCCAAGTTATCGCCTGA--CCGTCGGTAACGATGAAGATAAAGCGATAGCTTA	232
	*** **	
Mp_EU272184	ATTAATTTT-TT---ATGAAAATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAA-AT	324
Mp_EU272183	ATTAATTTT-TT---ATGAAAATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAA-AT	324
Mp_EU272182	ATTAATTTT-TT---ATGAAAATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAA-AT	324
Mp_EU272181	ATTAATTTT-TT---ATGAAAATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAA-AT	324
Mp_DQ995498	ATTAATTTT-TT---ATGAAAATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAA-AT	324
Mp_EU272177	ATTAATTTT-TT---ATGAAAATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAA-AT	324
Mo_EU272180	ATTAATTTT-TTTTATAGAAAATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAA-AT	317
Bm_AY621467	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	334
Bm_AY621464	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	334
Bm_AY621468	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	333
Bm_AY621466	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	334
Bm_AY621465	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	334
Bp_AY621471	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	340
Bp_AY621470	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	340
Bp_AY621469	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	340
Bp_AY621472	ATTAATTTT-ACC-----ATTTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTT-ATGCTAG-AT	340
Wb_EU272178	ATTAATTTT-ATC-----ATT-AATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAAGCTAG-AT	314
Wb_AY621476	ATTAATTTT-ATC-----ATT-AATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAAGCTAG-AT	314
Wb_AY621478	ATTAATTTT-ATC-----ATT-AATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAAGCTAGGAT	315
Wb_AY621475	ATTAATTTT-ATC-----ATT-AATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAAGCTAG-AT	314
Wb_AY621474	ATTAATTTT-ATC-----ATT-AATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAAGCTAG-GT	314
Wb_AY621477	ATTAATTTT-ATC-----ATT-AATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAAGCTAG-AT	314
Wb_AY621473	ATTAATTTT-ATC-----ATT-AATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAAGCTAG-AT	314
Ll_EU272176	ATTAATGAT-ATC-----ATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTA-GCTAG-AT	298
Ll_DQ995497	ATTAATGAT-ATC-----ATTAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTA-GCTAG-AT	298
Di_EU087700	ATTGATGATGATT-----GCTCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTA-GCTAG--T	421
Di_AF217800	ATTGATGATGATT-----GCTCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTA-GCTAG--T	431
Dr_AY621480	ATTGATGATGATT-----GCTCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTA-GCTAG--T	442

Dr_AY621479	ATTGATGATGATT-----GCTCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTGA-GCTAG--T	442
Dr_AY621481	ATTGATGATGATT-----GCTCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTGA-GCTAG--T	439
Ov_EU272179	ATTAATTTT-----AAGTAGACTTAATAAGCATTTTGA-GCTAG--T	355
Dre_AF217801	GTTAACTTTGTGCT--AGTGTGTTAATTAAGTAGACTTAATGAGCACTTGA-GCTAG-TT	288
	*** * *	***** ** * **** *
Mp_EU272184	ATGCTACCAACAA--ATAAA-TACACACATA--CATATACTAATTG-TAA-TTAT-TGA-	375
Mp_EU272183	ATGCTACCAACAA--ATAAA-TACACACATA--CATATACTAATTG-TAA-TTAT-TGA-	375
Mp_EU272182	ATGCTACCAACAA--ATAAA-TACACACATA--CATATACTAATTG-TAA-TTAT-TGA-	375
Mp_EU272181	ATGCTACCAACAA--ATAAA-TACACACATA--CATATACTAATTG-TAA-TTAT-TGA-	375
Mp_DQ995498	ATGCTACCAACAA--ATAAA-TACACACATA--CATATACTAATTG-TAA-TTAT-TGA-	375
Mp_EU272177	ATGCTACCAACAA--ATAAA-TACACACATA--CATATACTAATTG-TAA-TTAT-TGA-	375
Mo_EU272180	ATGCTACCAACAA--ATAAAATACACACACA--TACATAC-AATTG-TAATTAT-TAAG	370
Bm_AY621467	ATGCTACCAACAA--AAAAAAAAAAAAAAAA--GACATACAAAA---AAATTAT-ATAT	384
Bm_AY621464	ATGCTACCAACAA--AAAAAAAAAAAAAAAA--GACATACAAAA---AAATTAT-ATAT	384
Bm_AY621468	ATGCTACCAACAA--AAAAAAAAAAAAAAAA--GACATACAAAA---AAATTAT-ATAT	384
Bm_AY621466	ATGCTACCAACAA--AAAAAAAAAAAAAAAA--GACATACAAAA---AAATTAT-ATAT	386
Bm_AY621465	ATGCTACCAACAA--AAAAAAAAAAAAAAAA--GACATACAAAA---AAATTAT-ATAT	383
Bp_AY621471	ATGCTACCAACAA--AAGAAAAAAAAAAAAAAAA--AACATACAAAA---AAGTTAT-ACAT	391
Bp_AY621470	ATGCTACCAACAA--AA--AAAAAAAAAAAAA--AACATACAAAA---AAGTTAT-ACAT	389
Bp_AY621469	ATGCTACCAACAA--AAAAAAAAAAAAAAAAAAC--AACATACAAAA---AAGTTAT-ACAT	392
Bp_AY621472	ATGCTACCAACAA--AAAAAAAAAAAAAAAAAAC--AACATACAAAA---AAGTTAT-ACAT	392
Wb_EU272178	ATGCTACCAACAA--AATAAAAAAAAAAAG---GATACACAAATTGATAGATTAC-ATA-	366
Wb_AY621476	ATGCTACCAACAA--AATAAAAAAAAAA-G---GATACACAAATTGATAGATTAC-ATA-	365
Wb_AY621478	ATGCTACCAACAA--AATAAAAAAAAAAAG---GATACACAAATTGATAGATTAC-ATA-	367
Wb_AY621475	ATGCTACCAACAA--AATAAAAAAAAAAAG---GATACACAAATTGATGGATTAC-ATA-	366
Wb_AY621474	ATGCTACCAACAA--AATAAAAAAAAAA-G---GATACACAAATTGATAGATTAC-ATA-	365
Wb_AY621477	ATGCTACCAACAA--AATAAAAAAAAAAAG---GATACACAAATTGATAGATTAC-ATA-	366
Wb_AY621473	ATGCTACCAACAA--AATAAAAAAAAAAAG---GATACACAAATTGATAGATTAC-ATA-	366
Ll_EU272176	ATGCTACCAACAA--AAAACACACACATA---CACATATATATTA-TTATTTGT-ATTT	350
Ll_DQ995497	ATGCTACCAACAA--AAAACACACACATA---CACATATATATTA-TTATTTGT-ATTT	350
Di_EU087700	ATGCTACCAACAA--AATAA-TACACACATACATACACAA-----TAA--TATGATAT	471
Di_AF217800	ATGCTACCAACAA--AATAA-TACACACACATACATACAA-----TAA--TATGATAT	481
Dr_AY621480	ATGCTACCAACAA--AATAA-TACACACACAC---ATACAA-----TAA--TACGATAT	488
Dr_AY621479	ATGCTACCAACAA--AATAA-TACACACACAC---ATACAA-----TAA--TACGATAT	486
Dr_AY621481	ATGCTACCAACAA--AATAA-TACACACACAC---ATACAA-----TAA--TACGATAT	485
Ov_EU272179	ATGCTGCCAACAA--AACAAATACACACACAA--ACTATATGTATT--TGATTCA-----	404
Dre_AF217801	GTGCTGCCACCAACCACCAAAAAAACCGATGC-CCCAGATG-----TGAATTTT-----	336
	**** ** *	* * * *
Mp_EU272184	AAAAAACATTAAAGAAA-----TTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGACCTTTGG	420
Mp_EU272183	AAAAAACATTAAAGAAA-----TTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	420
Mp_EU272182	AAAAAACATTAAAGAAA-----TTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	420
Mp_EU272181	AAAAAATATTAAAGAAA-----TTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	420
Mp_DQ995498	AAAAAATATTAAAGAAA-----TTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	420
Mp_EU272177	AAAAAATATTAAAGAAA-----TTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	420
Mo_EU272180	AAAAAAAAAAAAAAAA-----TTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	415
Bm_AY621467	ATATTATAGTAATAATAATAAAATTTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	440
Bm_AY621464	ATATTATAGTAATAATAATAAAATTTTTTTTT---A-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	439
Bm_AY621468	ATATTATAGTAATAA-----AAATTTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	434
Bm_AY621466	ATATTATAGTAATAATAATAAAATTTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	442
Bm_AY621465	ATATTATAGTAATAATAATAAAATTTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	439
Bp_AY621471	ATATTATAGTAATAACAATA-AAATTTTTTTTT---A-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	445
Bp_AY621470	ATATTATAGTAATAACAATA-AAATTTTTTTTT---A-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	443
Bp_AY621469	ATATTATAGTAATAACAATA-AAATTTTTTTTT---A-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	446
Bp_AY621472	ATATTATAGTAATAACAATA-AAATTTTTTTTT---A-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	446
Wb_EU272178	AAATAATAGCATTAATTTTTTT---TTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	420
Wb_AY621476	AAATAATAGCATTAATTTTTTT---TTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	419
Wb_AY621478	AAATAATAGCATTAATTTTTTTCTTTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	423
Wb_AY621475	AAATAATAGCATTAATTTTTTT---TTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	419
Wb_AY621474	AAATAATAGCATTAATTTTTTT---TTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	417
Wb_AY621477	AAATAATAGCATTAATTTTTTT---TTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	418
Wb_AY621473	AAATAATAGCATTAATTTTTTT---TTTTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	418
Ll_EU272176	TTTCCAAAATAATA-----TTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	393
Ll_DQ995497	TTTCCAAAATAATA-----TTTTTT---TA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	393
Di_EU087700	AATTGTTATTTATAATAA-----TTTTTCAATA-ACTCTAAGCGGGGATCACCTG	521
Di_AF217800	AATTGTTATTTATAATAA-----TTTTTCAATA-ACTCTAAGCGGGGATCACCTG	531
Dr_AY621480	AATTGTTATTTATAATAA-----TTTTTCAATA-ACTCTTAGCGGTGGATCACTTG	538

Dr_AY621479	AATTGTTATTATAATAA-----TTTTTCAATA-CTCTTAGCGGTGGATCACTTG	536
Dr_AY621481	AATTGTTATTATAATAA-----TTTTTCAATA-CTCTTAGCGGTGGATCACTTG	535
Ov_EU272179	ATTTTTTCATTATTAACA-----TTTTTTTTTA-CTCTTAGCGGTGGATCACTTG	453
Dre_AF217801	-TTTTATACCATTAATA-----TCCAATATACTTTAAGCGGTGGATCACTTG	382
	* * * * *	
RW1-UNI primer		
	3' GATCGACGCTATTTATCAGCCTT 5'	
Mp_EU272184	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	468
Mp_EU272183	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	468
Mp_EU272182	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	468
Mp_EU272181	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	468
Mp_DQ995498	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	468
Mp_EU272177	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	468
Mo_EU272180	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	463
Bm_AY621467	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	488
Bm_AY621464	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	487
Bm_AY621468	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	482
Bm_AY621466	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	436
Bm_AY621465	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	487
Bp_AY621471	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	493
Bp_AY621470	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	491
Bp_AY621469	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	494
Bp_AY621472	GCTCATGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	494
Wb_EU272178	GCTCGCGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	468
Wb_AY621476	GCTCGCGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	467
Wb_AY621478	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	471
Wb_AY621475	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	467
Wb_AY621474	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	465
Wb_AY621477	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	466
Wb_AY621473	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	466
Ll_EU272176	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	441
Ll_DQ995497	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	441
Di_EU087700	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	569
Di_AF217800	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	579
Dr_AY621480	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	486
Dr_AY621479	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	484
Dr_AY621481	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	483
Ov_EU272179	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	501
Dre_AF217801	GCTCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAA	430

รูปที่ 3.2 Multiple alignment ของ filarial ITS1 sequences โดยไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นมีความจำเพาะกับเชื้อฟิลาเรียหลายชนิดได้แก่ *B. malayi* (Bm), *B. pahangi* (Bp), *W. bancrofti* (Wb), *onchocerca volvulus* (Ov), *Loa loa* (Ll), *Mansonella perstans* (Mp), *Mansonella ozzardi* (Mo), *D. immitis* (Di) และ *Dipetalonema reconditum* (Dre)

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา rDNA locus-specific PCR เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดคนและสัตว์ และจำแนกชนิดของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรีย (larvae) ที่แยกได้จากยุง

Primer Name	Sequence (5' to 3')	Direction	G-C (%)	Length (bases)	Identified filaria	Amplicon size
Uni-F1	GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTA	Forward	50	24	filariids	~430-570 bp
Uni-R1	TTCGCACTATTTATCGCAGCTAG	Reverse	43	23		
Bm-F1 ^a	<u>GGATCCT</u> GGTAGTAGCATAAATA	Forward	39	23	<i>B. malayi</i>	~370 bp
Bp-F1 ^a	<u>GGATCCT</u> GGTAGTAGCATAAGTAA	Forward	42	24	<i>B. pahangi</i>	~370 bp
Wb-F1 ^a	<u>GGATCCT</u> GGTAATAGTAAATAATATG	Forward	31	26	<i>W. bancrofti</i>	~350 bp
Di-F1	GATGAATAGTTAGTAGTAGTTAGTAGTT	Forward	29	28	<i>D. immitis</i>	~450 bp
Dr-F1	GGATAGTTAGTTAGTTAGTAGTTAGTC	Forward	33	27	<i>D. repen</i>	~300 bp
Dre-F1	GATTGGTGTGGTGTGAGAAAGA	Forward	45	22	<i>D. reconditum</i>	~320 bp

Additional recognition sequences of *Bam*H I^a are underlined.

3.4.3.2 ไพร์เมอร์สำหรับวิธี Allele-specific nested multiplex PCR

การศึกษาอัลลีลที่จำเพาะต่อความไวของยากลุ่มเบนซิมิดาโซลของยีน β -tubulin gene isotype1 ในส่วนของ exon 5 มีตำแหน่งของโปรตีนที่ 200 ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่าง phenylalanine และ tyrosine (Phe-Try polymorphism) ดังนั้นการพัฒนาวิธี Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อศึกษาอัลลีลที่จำเพาะนี้จึงออกแบบไพร์เมอร์คู่นอก (outer primers) เป็น universal primers ครอบคลุมในส่วนของ exon 4 และ 5 ของยีน β -tubulin gene isotype1 ที่จำเพาะกับเชื้อฟิลาเรียหลายชนิดโดยเฉพาะฟิลาเรียในคน พยาธิฟิลาเรียที่ใช้วิเคราะห์มาจาก พยาธิ (accession no. และ positions) ได้แก่ *B. malayi* (BRQD553TR, 3-789), *B. pahangi* (M36380, 2267-3054), *W. bancrofti* (AY705383, 109-916), *D. immitis* (HM596854, 1462-2244) และ *O. volvulus* (AF019886, 1582-2400) ในขณะที่ปฏิกิริยา nested PCR รอบที่ 2 ออกแบบให้เป็น multiplex PCR ใช้ไพร์เมอร์ 2 ชุด โดยทำขั้นตอนของ PCR แยกกัน โดยชุดที่ 1 ใช้ไพร์เมอร์ BT121/122/122S เพื่อจำแนกอัลลีลที่ความไวต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล มียืนตำแหน่งของโปรตีนที่ 200 เป็น TTC (Phe) และไพร์เมอร์ชุดที่ 2 คือ BT121/122/121R เพื่อจำแนกอัลลีลที่ความไวต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล มียืนตำแหน่งของโปรตีนที่ 200 เป็น TAC (Try) โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบในการศึกษานี้มีคุณสมบัติดังที่แสดงในตารางที่ 3.3 และนำไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ไปวิเคราะห์ค่าคุณสมบัติที่จำเพาะต่างๆ ด้วยโปรแกรม Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) ก่อนส่งให้บริษัทสังเคราะห์

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment set gap open 5, gap extend 0.1, gap distance 5		
BT7 → 5-GCTGAAGGA		
BM	ACGGAAGGTGCGGAAGTGTGATAATGTGTTGGACGTGATACGAAAAGAGCTGAAGGA	60
BP	ACGGAAGGTGCGGAAGTGTGATAATGTGTTGGACGTGATACGAAAAGAACTGAAGGA	60
WB	ACGGAAGGTGCGGAAGTGTGATAATGTGTTGGACGTGATACGAAAAGAGCTGAAGGA	60
Ov	ACGGAAGGTGCGGAAGTGTGATAATGTGTTGGACGTGATACGAAAAGAGCTGAAGGA	60
Di	ACAGAAGGTGCGGAAGTGTGATAACGTTTGGACGTGATACGAAAAGAACTGAAGGA	60
** .***** ** * .***** ** ***** ** .***** .***** .***		
TGCGAITGTCTTCAG-3'		
BM	TGCGATTGTCTTCAGGTACGGATTGCT-ATAGT-----TTTATAAGACATTTTAATTGTG	114
BP	TGCGATTGTCTTCAGGTACGGATTGCC-ATAGT-----TTTATAAGACATTTTAATTGTG	114
WB	TGCGATTGTCTTCAGGTACAGATTGCT-ACAGT-----TTTATAACACATTTTAAGTGTG	114
Ov	TGCGACTGTCTTCAGGTGCAATTTGTGGATCGTTATAGTTTTTAAGC-ATTTTAAGTTCA	119
Di	TGCGACTGTCTTCAGGTGCAATTTGTGGATTGTTACGATTCTTAGCTATTTTGAATGTG	120
***** .***** .*** * * * * * * * * * * * * * * *		
BM	GATGTGTTTTT-----ATTTT-----AAAGAAAAATTAATAA-----TATTT	153
BP	GATGTGTTTTT-----ATTTT-----AAAGAAAAATTAATAA-----TATTT	153
WB	AATGTG-TTTT-----ATTTT-----AAAGAAAAA-----AAAG-----TATTT	148
Ov	GATGTGTTTTTGAAGTATCCCATTTTCGTAAATAATTCAGTCTTAATAAATAAATTTATTT	179
Di	AATGTGTTTTTGAAGTATCCCATTTT-TTTTGAATAAATTAATGAA-----TTTTT	173
.***** *** .*** * * * * * * * * * * * * * * *		
BM	TCAGGGATTTCAACTAACGCATTCACCTTGGTGGTGGTACCGGTTCCGGCATGGGAACATT	213
BP	TCAGGGATTTCAACTAACGCATTCACCTTGGTGGTGGTACCGGTTCCGGCATGGGAACATT	213
WB	TCAGGGATTTCAACTAACGCATTCACCTTGGTGGGCGGTACCGGTTCCGGTATGGGAACATT	208
Ov	TCAGGGATTTCAACTAACGCATTCACCTTGGGCGGTGGTACCGGTTCTGGTATGGGAACATT	239
Di	TCAGGGATTTCAACTAACGCATTCACCTTGGAGGTGGTACAGGTTCTGGTATGGGAACATT	233
***** ** * .** ***** ** ***** ** *****		
BM	GCTGATCTCGAAAATTCGTGAGGAGTATCCAGATCGAATTATGAGCTCTTTTTCGGTTGT	273
BP	GCTGATCTCGAAAATTCGTGAGGAGTATCCGGATCGAATTATGAGCTCTTTTTCGGTTGT	273
WB	GCTGATCTCGAAAATTCGTGAGGAGTATCCGGATCGAATTATGAGCTCTTTTTCGGTTGT	268
Ov	GTTGATCTCGAAAATTCGTGAGGAATATCCGGATCGAATTATGAGCTCTTTTTCGGTTGT	299
Di	GCTTATCTCGAAGATCCGTGAGGAATATCCAGATCGGATTATGAGCTCTTTTTCGGTTGT	293
* * ***** .** ***** .***** .***** .***** .***** .*****		
BM	GCCATCGCCCAAAGTATATATTTGAATTTCTGAT--TCTTATTTTAAACAT--CTGTTAT	329
BP	GCCATCGCCCAAAGTATATATTTGAATTTCTGAT--TCTTATTTTAAACAT--CTGTTAT	329
WB	GCCGTCGCCCAAAGTATATTTGGGTTTTTGATTATCTTGGTTTTTAAACAT--CTGTTTT	326
Ov	ACCATCACCCAAAGTATATTTGGGTC----CTATTTTAAATTTAATTTTGCTGCTTC	355
Di	GCCATCACCTAAAGTATATATTTGTGTCTTAAGTATTTGATTAAATTTTCTTGGTTC	353
.***.***.*** *****.*** :* . * : ** :***** :* ** *:		
BM	ATCTATTT-----TAAACATAGCTCCATAACTTTTA-----	360
BP	ATCTATTT-----TAAACATAGCTCCATAACTTTTA-----	360
WB	ATCTACTATAACGCATAAAACATAGCTATAAAACATAGCTCCATAACTTTTA-----	377
Ov	ATCTCGTTTC-----AGAAGCCGTCATTATGTCTGCTCCAAACTTCACAAGTGTCTA	408
Di	ATACCTTTTCTGTTATTTAGAAGCCATCATTTTATTTGCTTCAA--TTCATGAATG---	407
** . * : *:: : :*** **:* ** :		
BM	-AGTGGCGATTGTCTCACAAAGTGGTTTTT--CGGCTATCATA---TCATTTTCATAGTT	414
BP	-AGTGGCGATTGTCTCACAAAGTGGTTTTT--CGGCTATCATT---TCATTTTCATAGTT	414
WB	-AGTGGTGAATGTCTGCACAAAGTGGTCTTT--TAACATATCATTGCTTCATTTTCATAGTT	434
Ov	GAGTGGATACTGTTTGGCGAGATGATTTTTTTTATCTCTCTCAACTTTTTTTTTTTTTT	468
Di	AAGTGAACACTATCTGACGAGATGATTTT--AATCTGTCCC-----TATTTCTTTTGA	459
****. .*. * .*.***.*** ** . ** * :*** :*: :		
BM	GAAGAAAAAG-----TATG-----CTAGACGTATTAATGATTTCC	449
BP	GAAGAAAAAG-----TATG-----CTAGACGTATTAATGATTTCC	449
WB	GAAGAAAAAG-----TATG-----GTAGACGTATTAATGATTTCC	469
Ov	TTTGCAAGATATAATTAATAAAGAATTTGGCCTGCATATTAGAGAGATTATTGATTTTT	528

Di	AATGCAAGG-----TTG-----GTTTTTC	478
	::*.***. : ** * : ***	
BT121→	5'-GTATCAGATGTTGTG-3'	BT 121R→ 5'CTGGTAG
BM	AGGTATCAGATGTTGTGTTGGAACCTTACAATGCAACATTATCAGTCCACCAACTAGTTG	509
BP	AGGTATCAGATGTTGTGTTGGAACCTTACAATGCAACATTATCAGTCCACCAACTAGTTG	509
WB	AGGTATCAGATGTTGTGTTGGAACCTTACAATGCAACATTATCAGTCCACCAACTAGTTG	529
Ov	AGGTATCAGATGTTGTATTGGAACCTTATAACGCAACATTATCAGTGCATCAATTAGTTG	588
Di	AGGTATCAGATGTTGTGTTGGAACCTTACAATGCAACGTTATCAGTGCATCAATTAGTTG	538
	*****.***** ** ** *****.***** ** ** *	
	AAAACACTGACGAAACTTA-3'	
	3'-AGACGTAACCTATTGCTCCGAAACATA-5'←BT122S	
	Phe200Tyr	
BM	AAAACACTGACGAAACTTCTGCATTGATAACGAGGCTTTGTATGACATCTGCTTCCGAA	569
BP	AAAACACTGACGAAACTTCTGCATTGATAACGAGGCTTTGTATGACATCTGCTTCCGAA	569
WB	AAAACACTGACGAAACTTCTGCATTGATAACGAGGCTTTGTATGACATCTGCTTCCGAA	589
Ov	AAAACACTGACGAAACTTCTGCATTGATAACGAGCTTTATATGACATCTGCTTCCGAA	648
Di	AAAACACTGATGAAACTTCTGCATTGATAATGAAGCTTTATATGATATCTGCTTCCGAA	598
	*****.***** ** ** *****.***** ** ** *	
	GTTACCAACTCCAGC	
	3'-GCTGGAGTTGGTGAAC-5'←BT122	
BM	CGTTGAAGTTGGCAAATCCAACCTACGGTGACCTCAACCATTGCGG-TTCGTCCTTTAAT	628
BP	CGTTGAAGTTGGCAAATCCAACCTACGGTGACCTCAACCATTGCGG-TTCGTCCTTTAAT	628
WB	CGTTGAAGTTGGCAAATCCAACCTACGGTCGACCTCAACCCTTGGTTTCGTCCTTTAAT	649
Ov	CATTGAAATTGACGAATCCAACCTATGGCGATCTCAATCATTGCGG-TTCGTT-----	700
Di	CATTGAAATTGACGAATCCAACCTACGGCGATCTCAATCACTTGGG-TCCGTTGATTGAG	657
	*.*****.***.*.***** ** ** ***** ** ***** * ** *	
BM	TT--ATTCTTCAAGCTGTCCGGTTTAAAT-GCATTCTATTTAACTATT--ATAAAATTCTG	683
BP	TT--ATTCTTCAAGCTGTCCGGTTTAAAT-GCATTCTATTTAACTATT--ATAAAATTCTG	684
WB	TT--ATTCTTCAAGCTGTCCGGTTTAAATCGCATTCTATTTAACTATT--ATAAAGTTTG	705
Ov	-----TCTTCAC-----TT-----GTTCTTTAAATTTTATTTTAAATTTCTG	737
Di	TCCGTCCTCTTCAT-----TT-----ATTCTTCATATCTTTG--CTAAACTTCA	698
	****. ** .****: :*: * : * *	
	3'-AGACAIT	
BM	GATTTAATTGCAATTTTTTCAACTCTTCTAGAGGTTAAAATTTCTATTTAGTCTGTGA	743
BP	GATTTAATTGTAATTTATTCAACTCTTCTAAAGGTTAAAATTTCTATTTAGTCTGTGA	744
WB	GGTTAATTGCAATTTTTTCAACTGTTCTAAAGGTTACATTTT-TATTTAGTCTGTGA	764
Ov	-----AATT-C-----ATTCTGAAGATTACG-TTT--ATTCAGTATCTGTGA	775
Di	-----AATTGCGG-----TTTCTTCA-ATCATGTTTT--ATTTAGTATCTGTAA	739
	**** * . * . * * * * * *	
	GTTACAGICCTCA-5' ←BT10	
BM	CAATGTCGGGAGTAACAACCTTGCTTACGTTTCCCTGGACAGTTG	787
BP	CAATGTCGGGAGTAACAACCTTGCTTACGTTTCCCTGGACAGTTG	788
WB	CAATGTCGGGAGTAACAACCTTGCTTACGTTTCCCTGGACAGTTG	808
Ov	CAATGTCGGGAGTGACAACATGCTTGCGTTTCCCTGGACAGTTA	819
Di	CAATGTCGGGAGTAACAACATGTTTACGTTTCCCTGGACAATTA	783
	*****.*****: ** ** *****.*****.***.	

รูปที่ 3.3 Multiple alignment ของ filarial β -tubulin (exon4, 5) sequences โดยไฟร์เมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นมีความจำเพาะกับฟิลาเรียหลายชนิดได้แก่ *B. malayi* (Bm), *B. pahangi* (Bp), *W. bancrofti* (Wb), *O. volvulus* (Ov), และ *D. immitis* (Di)

ตารางที่ 3.3 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา Allele-specific nested multiplex PCR

Primer Name	Sequence (5' to 3')	Direction	G-C (%)	Tm1/Tm2 (°C)	Length (bases)	Amplicon size
BT7	ATACGAAAAGA <u>I</u> GCTGAAGGA	Forward	38-43	49/57	21	~720 bp
BT10	ACTCC <u>I</u> GACATTGTGACAGA	Reverse	40-45	48/56	20	
BT121 ^a	GGATCCGTATCAGATGTTGTG	Forward	48	52/60	21	~174 bp
BT122 ^b	GAATTCCAAGTGGTTGAGGTCG	Reverse	50	55/62	22	
BT121R	CTGGTAGAAAACACTGACGAACTTA	Forward	38	55/63	26	~90 bp
BT122S	ATACAAAGCCTCGTTATCAATGCAGA	Reverse	38	55/63	26	~90 bp
BT17	GGCTTCCAGCTGACCCACTCACTG	Forward	63	63/71	24	~288 bp
BT18	GTGGTTCAGATCCCCGTAGGTTGG	Reverse	58	61/69	24	

I = inositol. Additional recognition sequences of *Bam*HI^a and *Eco*R I^b are underlined.

BT7/10 ใช้ใน nested PCT รอบที่ 1, BT121/122S/121R/122 ใช้ใน Allele-specific nested multiplex PCR รอบที่ 2, BT17/18 ใช้เป็น internal control สำหรับการศึกษาในชุดการทดลองนี้

3.4.4 การสกัดดีเอ็นเอจากหนองพยาธิปลาเรียว

3.4.4.1 การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด (Modified from Pechgit, et al., 2010)

ขั้นตอนของการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด ดังนี้ เติมน Protease K (10 mg/ml) และ สารละลาย AL buffer ปริมาตร 200 μ l ลงในหลอดบดเนื้อเยื่อ (Tissue grinder) ที่มี mf positive blood sample ปริมาตร 200 μ l บดตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 40 ครั้ง แล้วดำเนินการตามขั้นตอนของวิธีสกัด DNA ของ QIA nassy Blood, QIAGEN โดยสรุปคือ นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 10 นาที เติมน absolute ethanol ปริมาตร 200 μ l แล้วนำสารละลายที่ได้ใส่ลงไปใน spin column ปริมาตร 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายที่ได้ทิ้ง เติมนสารละลาย AW1 ลงใน Spin column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายที่ได้ทิ้ง เติมนสารละลาย AW2 ปริมาตร 500 μ l ลงใน spin column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาที เทสารละลายที่ได้ทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาทีอีกครั้ง เทสารละลายที่ได้ทิ้ง ย้าย spin column มาใส่ใน หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมนสารละลาย AE ปริมาตร 200 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm นาน 3 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะใช้งาน

3.4.4.2 การสกัด DNA จากตัวอย่างยุง

ใช้ยุงตัวแก่โดยแยกปีกและขาของยุงออก ส่วนที่นำมาสกัด DNA จะใช้เพียงส่วนหัว ออก และ ท้องของยุงเท่านั้น ใช้ยุงประมาณ 5 ตัวรวมกันในการสกัด DNA แต่ละครั้ง นำตัวอย่างยุงที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดบดเนื้อเยื่อ (tissue grinder) แล้วเติมเอ็นไซม์ Chitinase (1 mg/ml) และ PBS buffer บด จำนวนประมาณ 40 ครั้ง นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นเติมเอ็นไซม์

Lysizyme (10 mg/ml) และ ATL buffer ลงในหลอดตัวอย่าง บดตัวอย่างให้เข้ากันอีกครั้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 56°C นาน 60 นาที หลังจากนั้นเติม AL buffer แล้วดำเนินการตามวิธีสกัดดีเอ็นเอของ QIA Nassy Blood, QIAGEN ดังที่กล่าวมาข้างต้น

3.4.4.3 การสกัด DNA จากพยาธิตัวอ่อนที่แยกได้จากยุง

เตรียมตัวอย่างตัวอ่อน (Larva) ที่แยกได้จากยุง ใช้ตัวอ่อนยุงจำนวน 1 ตัวต่อ 1 ตัวอย่างใส่ใน Capillary tube ที่มีน้ำเกลือ 200 μ l นำตัวอย่างเทใส่ในหลอดบดเนื้อเยื่อ แล้วเติมเอ็นไซม์ Lysizyme (10 mg/ml) และสารละลาย AL buffer บดจำนวนประมาณ 40 ครั้ง แล้วดำเนินการตามขั้นตอนของวิธีสกัดดีเอ็นเอ ของ QIA Nassy Blood, QIAGEN ดังที่กล่าวมาข้างต้น

3.4.5 ขั้นตอนการทำ PCR (ประยุกต์จาก Bhumiratana et al, 2010; Pechgit et al, 2011)

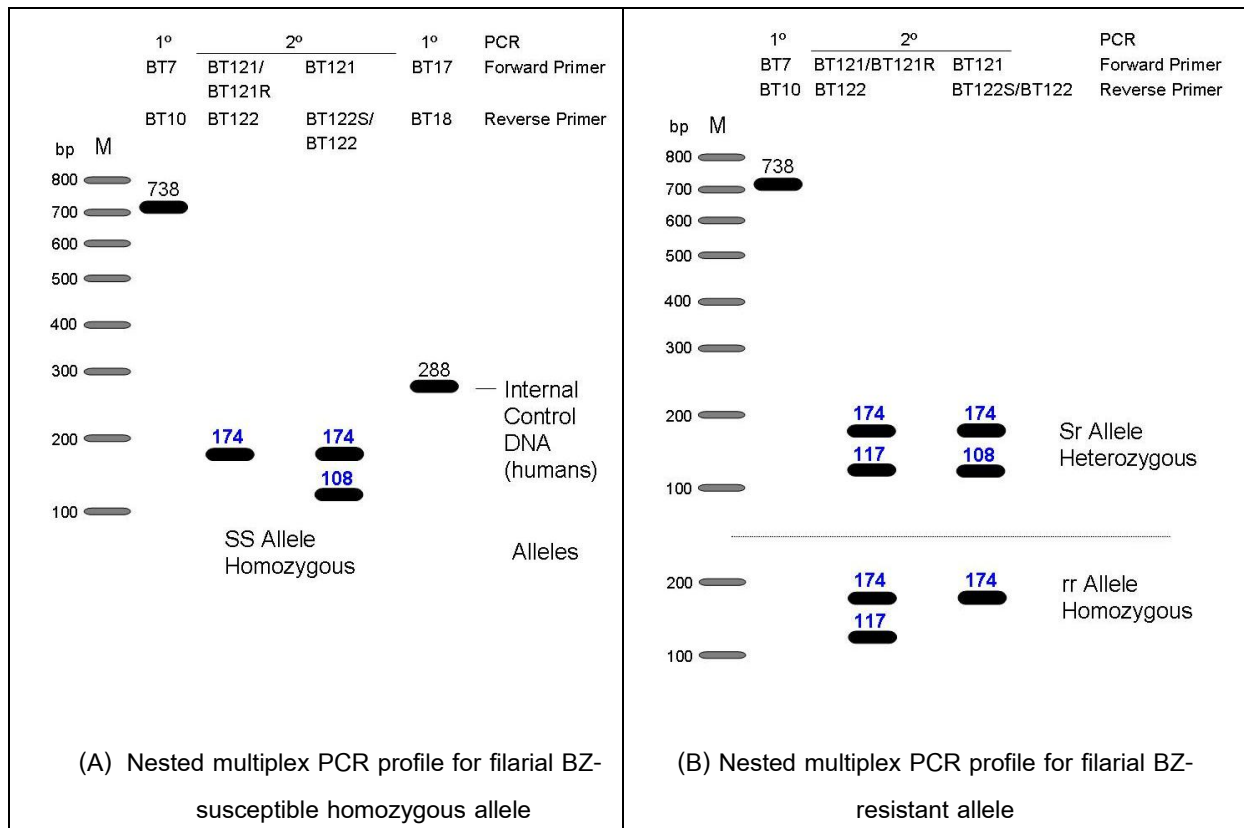
3.4.5.1 rDNA locus-specific PCR

การตรวจพิสูจน์หาการติดพยาธิพลาเรียและการจำแนกชนิดของพยาธิพลาเรียที่พบโดยวิธีการการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของพยาธิพลาเรียครั้งนี้ใช้ยีน rDNA ในการจำแนกชนิดของพยาธิ ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมประกอบด้วยการเตรียมสารตั้งต้นของปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 25 μ l ใน Commercial PCR kit (TopTaqTM PCR; QIAGEN) ใช้ความเข้มข้นของ DNA template 20 ng/ μ l โดย condition ที่เหมาะสมใช้ annealing temperature ที่ 62°C สำหรับ Uni-F1/R1 primers ในปฏิกิริยา PCR รอบแรก (first round PCR) ซึ่งใช้ในการจำแนกพยาธิพลาเรียทั้งในคนและสัตว์ โดยมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอน DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที ก่อนเข้าสู่รอบของ PCR เป็นจำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที primer annealing ใช้อุณหภูมิ 62°C เวลา 1 นาที และ primer extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA elongation ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 10 นาที

ในปฏิกิริยา PCR รอบ 2 (second round PCR) สำหรับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิพลาเรียแต่ละชนิด สำหรับการจำแนกชนิดของพยาธิพลาเรีย ใช้ annealing temperature ที่เหมาะสมที่ 53°C โดยมีขั้นตอนการต่างๆ ของการทำปฏิกิริยา PCR เหมือนกับขั้นตอนของ first round PCR

3.4.5.2 Specific-allele nested multiplex PCR

ในการศึกษา ยีน β -tubulin ตำแหน่งของอัลลีลที่มีความจำเพาะต่อการตอบสนองต่อยา รักษาโรคพยาธิกลุ่ม Benzimidazole ซึ่งใช้ในการศึกษาการเกิดการดื้อยาของพยาธิฟิลาเรียในพื้นที่ การศึกษา ยีนเบต้าทูบูลินโดยเทคนิค Specific-allele nested multiplex PCR อาศัยหลักการของ nested PCR โดยทั่วไป โดยที่การทำปฏิกิริยา PCR รอบแรก (first round PCR) สำหรับ BT7/10 outer primers ใช้ annealing temperature ที่ 57°C มีขั้นตอนประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที ก่อนเข้าสู่รอบของ PCR เป็นจำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที, primer annealing ใช้อุณหภูมิ 57°C เวลา 1 นาที, และ primer extension ใช้ อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA elongation ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 10 นาที ใน การทำปฏิกิริยา PCR รอบที่ 2 โดยใช้ PCR product จาก first round PCR เป็น DNA template ใช้วิธี multiplex PCR โดยแยกเป็น 2 ปฏิกิริยา ใช้ BT121/122/122S primers ในการจำแนก specific allele ของ ยีนเบต้าทูบูลินที่จำเพาะต่อความไวของยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล และใช้ BT121/122/121R primers สำหรับ จำแนกยีนเบต้าทูบูลินที่จำเพาะต่อยีนดื้อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล โดยทั้ง 2 ปฏิกิริยามี PCR condition ที่ เหมาะสมใช้ Annealing temperature ที่ 62°C ในขั้นตอนของเทคนิค turn up PCR ประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที ตามด้วย 5 รอบของขั้นตอน turn up PCR ประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที, primer annealing ใช้อุณหภูมิ 56→62°C เวลา 1 นาที, และ primer extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ 30 รอบของ DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที primer annealing ใช้อุณหภูมิ 57°C เวลา 1 นาที และ primer extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA elongation ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 10 นาที ลักษณะการปรากฏของจีโนไทป์ของยีนเบต้าทูบูลิน ไอโซไทป์ 1 ที่มีความสัมพันธ์ กับการแสดงออกของความไวต่อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล จะแสดงอัลลีล “SS” เป็นอัลลีลเด่น (wild type) และอัลลีล “Sr” เป็นอัลลีลที่พบ mutation ซึ่งทั้ง 2 แบบแสดงออกโดยมีความไวต่อยาในกลุ่มเบนซิมิดา โซล และอัลลีล “rr” เป็นอัลลีลด้อย ซึ่งคือต่อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล โดยผลของการทำ nested PCR ใน การจำแนกอัลลีลทั้ง 3 แบบนี้จะแสดงผลของ PCR products ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ภาพจำลองของ PCR product ที่ปรากฏบน Agarose gel เมื่อผ่านขบวนการ Electrophoresis: (1) การทำ PCR รอบที่ 1 โดยเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ไพรเมอร์ BT7/BT10 ได้ PCR product มีขนาดประมาณ 738 คู่เบส ตัวอย่างที่ให้ผล PCR เป็นลบให้ทดสอบโดยการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ไพรเมอร์ต่อยีนของมนุษย์ BT17/BT18 ซึ่งได้ PCR product ขนาดประมาณ 288 คู่เบส (2) การทำ PCR รอบที่ 2 ใช้ขั้นตอนของ Multiplex PCR โดยแยกเป็น 2 ปฏิกริยา: (A) BZ-susceptible homozygous allele (SS) สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้จากไพรเมอร์ชุด BT121/BT122/BT122S, (B) BZ-susceptible heterozygous allele (Sr) สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้จากไพรเมอร์ชุด BT121/BT122/BT122S และ BT121/BT122/BT121R และ BZ-resistant homozygous allele (rr) สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้จากไพรเมอร์ชุด BT121/BT122/BT121R

3.4.5.3 ขั้นตอน Electrophoresis

การอ่านผลของ PCR products สำหรับตัวอย่างที่ใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและยูง ใช้ PCR product ปริมาณ 5 µl ใส่ในหลุมบน 1% agarose gel ผ่านขบวนการ Electrophoresis นาน 30–45 นาที จากนั้นย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide นาน 30 นาที ก่อนนำไปดูด้วยเครื่อง Gel Documentation สำหรับตัวอย่างที่ได้จากตัวอย่างพยาธิฟิลาเรียเนื่องจากปริมาณ DNA ที่เพิ่มจำนวนได้นั้นค่อนข้างน้อย การทำ Electrophoresis จึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณ PCR product เพิ่มขึ้นโดยใช้ PCR product ปริมาณ 12 µl นำไปปั่นให้แห้งโดยเครื่อง evaporation ให้ปริมาตรลดลง 1/2 ของปริมาตรเริ่มต้น จากนั้นนำไปผ่านขบวนการ Electrophoresis และย้อมสีดีเอ็นเอโดย ethidium bromide เช่นเดียวกับ PCR product ที่ได้จากตัวอย่างเลือด

3.4.5.4 Sequencing and genetic analysis

PCR products ที่ได้จากการศึกษาถูกส่งไปยังหน่วยรับบริการ sequencing ของ บริษัท Pacific Science CO, LTD. จากนั้นผลของ DNA sequence จะถูกวิเคราะห์เทียบกับยีนของพยาธิฟิลาเรียใน Nucleotide sequence database (www.ebi.ac.th) ที่ใช้ในการออกแบบ Primers ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยการปรับและวิเคราะห์ DNA alignment ใช้โปรแกรมจาก BioEdit software, version 7.1 และใช้โปรแกรมจาก MEGA software, version 5.0 สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างทาง Phylogenetic tree โดยใช้สถิติ Neighbor joining ในการวิเคราะห์

3.4.5.4 Positive และ negative control

ในการศึกษาใช้ positive control เป็น DNA ของพยาธิฟิลาเรียในคนได้แก่ *W. bancrofti* และพยาธิฟิลาเรียในสัตว์ได้แก่ *D. immitis* และ *B. pahagi* ซึ่งจำแนกและพิสูจน์ชนิดของเชื้อด้วยวิธีศึกษาลำดับเบส (DNA sequences) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วน negative control ใช้ DNA ของปรสิตในเลือดชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Dipetalonema reconditum*, *Plasmodium* spp., *Babesia* spp., และ *Anaplasma* spp. และ internal control ใช้ DNA ของ non-target genomic DNA ได้แก่ คน แมว และยูงที่ปราศจากเชื้อ

บทที่ 4

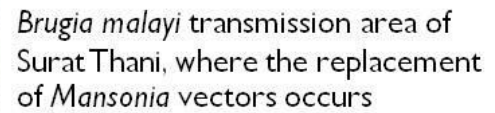
ผลการศึกษา

4.1 การศึกษานำร่องในพื้นที่ซึ่งมีสภาพทางภูมิศาสตร์และมีการกระจายเชื้อฟิลาเรียใกล้เคียงกับพื้นที่ศึกษาในจังหวัดนราธิวาส

4.1.1 ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่ศึกษานำร่อง

การสำรวจหาการติดพยาธิฟิลาเรียในสัตว์และยุงพาหะของโรคเท้าช้าง เพื่อใช้ประเมินความเป็นไปได้และความเสี่ยงในการเก็บข้อมูลพื้นที่ศึกษาจังหวัดนราธิวาส โดยการเก็บตัวอย่างเลือดแมวและสุนัขในพื้นที่ศึกษานำร่อง ได้แก่ หมู่ 3 บ้านน้ำดำ, หมู่ 11 บ้านพรุเรื่อน, หมู่ 12 บ้านเขาแก้ว และหมู่ 22 บ้านห้วยเคียน ตำบลประสงค์ อำเภอกาบัง จังหวัดสุราษฎร์ธานี พื้นที่ศึกษานำร่องดังกล่าวครอบคลุมพื้นที่รอยโรคของโรคฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ซึ่งมีการกระจายของยุงพาหะนำโรคเท้าช้าง ได้แก่ ยุงเสือ *Mansonia* spp. แต่ในปัจจุบัน พื้นที่ดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศวิทยา โดยที่พื้นที่ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินและสิ่งปกคลุมดิน หรือมีการทำการเกษตรเป็นพื้นที่เพาะปลูกยางพาราและปาล์มน้ำมัน แทนที่พื้นที่ป่าพรุน้ำดำ นอกจากนี้ พื้นที่รอยโรคของโรคฟิลาเรียชนิด *B. malayi* หรือพื้นที่ทั้ง 4 หมู่บ้าน ได้ถูกกำหนดเป็นพื้นที่เป้าหมายของการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในช่วงระหว่าง พ.ศ. 2545–2549 โดยดำเนินการจ่ายยารักษากลุ่ม (MDA) ด้วยยาไดเอทิลคาร์บาไมซิน (Diethylcarbamazine หรือ DEC) ร่วมกับยาอัลเบนดาโซล (Albendazole) ปีละครั้งติดต่อกัน 5 ปี และดำเนินการเฝ้าระวังหลังจากการจ่ายยารักษากลุ่ม (Post MDA surveillance) ในช่วงระหว่าง พ.ศ. 2550–2554 และได้ดำเนินการหยุดการจ่ายยารักษากลุ่มเนื่องจากไม่ปรากฏผู้ป่วยรายใหม่ในพื้นที่รอยโรคเลย

เมื่อทำการสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ยุงเสือและสภาพแวดล้อมทางนิเวศวิทยาในพื้นที่ศึกษา พบว่ายังคงพบป่าพรุกระจายอยู่ในขอบเขตจำกัดในแต่ละหมู่บ้าน พื้นที่ป่าพรุเดิมส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นพื้นที่เกษตรกรรมทั้งที่เป็นสวนยางพารา สวนปาล์ม และสวนผลไม้ และมีบ้านเรือนกระจายอยู่ทั่วไป ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 สภาพการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินและสิ่งปกคลุมดินในพื้นที่ศึกษานำร่อง ซึ่งครอบคลุม 4 หมู่บ้าน ได้แก่ บ้านน้ำดำ หมู่ 3, บ้านพรุเริอน หมู่ 11, บ้านเขาแก้ว หมู่ 12 และ บ้านห้วยเคียน หมู่ 22 ตำบล ประสงค์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดสุราษฎร์ธานี พื้นที่ป่าพรุเดิม ซึ่งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุง *Masonia vectors* ได้ ถูกแทนที่ด้วยพื้นที่เพาะปลูกยางพารา ปาล์มน้ำมัน และสวนผลไม้

จากการเก็บตัวอย่างเลือดแมวและสุนัขในพื้นที่ศึกษานำร่องทั้ง 4 หมู่บ้าน ตัวอย่างเลือดทั้งหมด 168 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 138 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดสุนัขจำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดทั้งหมดได้ถูกนำมาตรวจหาเชื้อไมโครพิลลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และวิธีฟิล์มโลหิตหนาและย้อมด้วย Wright-Geimsa stain เพื่อหาความหนาแน่นของเชื้อไมโครพิลลาเรียในเลือด

ในตารางที่ 4.1 ผลของการตรวจวินิจฉัยเชื้อไมโครพลาเรียในแมงด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า แมงที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 19 ตัว จากจำนวนแมงที่สำรวจทั้งหมดจำนวน 138 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียในแมง 13.77% เมื่อจำแนกชนิดของการติดเชื้อ พบว่า แมงที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. จำนวน 18 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. 13.0% ในขณะที่ แมงที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 1 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. 0.7% โดยทั่วไปแล้ว พบว่า พื้นที่หมู่ 11 มีอัตราการติดเชื้อ *Brugia* spp. ในแมงสูงที่สุด

ในทำนองเดียวกัน ผลของการตรวจวินิจฉัยเชื้อไมโครพลาเรียในสุนัขด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า สุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 19 ตัว จากจำนวนสุนัขที่สำรวจทั้งหมดจำนวน 30 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียในสุนัข 63.33% เมื่อจำแนกชนิดของการติดเชื้อ พบว่า สุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. จำนวน 11 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. 36.7% ในขณะที่ สุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 8 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. 26.7% โดยทั่วไปแล้ว ยังคงพบว่า พื้นที่หมู่ 11 มีอัตราการติดเชื้อ *Brugia* spp. ในสุนัขสูงที่สุด

ตารางที่ 4.1 ผลการจำแนกชนิดของไมโครพลาเรีย จากตัวอย่างจากเลือดสัตว์ ที่ตำบล

ประสงค์ อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งจำแนกโดยใช้วิธีย้อมด้วย Wright-Geimsa stain และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่าง	พื้นที่	จำนวน	จำนวนตัวอย่างที่พบไมโครฟิลาเรีย (%)		
			ตัวอย่าง	<i>Brugia</i> spp.	<i>Dirofilaria</i> spp.
แมว	หมู่ 11	37	11 (29.7)	1 (2.7)	25 (67.7)
	หมู่ 12	19	1 (5.3)	0 (0)	18 (94.7)
	หมู่ 22	37	4 (10.8)	0 (0)	33 (89.2)
	หมู่ 3	45	2 (4.4)	0 (0)	43 (95.6)
รวม		138	18 (13.0)	1 (0.7)	119 (86.2)
สุนัข	หมู่ 11	24	10 (41.7)	5 (20.8)	9 (37.5)
	หมู่ 12	6	1 (16.7)	3 (50)	2 (33.3)
	หมู่ 22	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	หมู่ 3	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
รวม		30	11 (36.7)	8 (26.7)	11 (36.7)

จากตารางที่ 4.2 เมื่อนำตัวอย่างเลือดสัตว์ที่เก็บได้มาจำแนกหาการติดเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR ซึ่งพัฒนาโดยผู้วิจัย เพื่อที่จะยืนยันการติดเชื้อไมโครพลาเรียที่ปรากฏในกระแสเลือดของแมวและสุนัขในการศึกษาครั้งนี้ ความไวและความจำเพาะของวิธี PCR ดังกล่าว จะอาศัยคุณลักษณะเฉพาะของยีน rRNA genes ซึ่งได้ถูกกำหนดเป็นเป้าหมายของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเชื้อไมโครพลาเรียชนิดต่างๆ ผลของการทำ PCR พบว่า มีแมวที่ติดเชื้อจำนวน 23 ตัวจากตัวอย่างแมวที่สำรวจทั้งหมด 138 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียในแมว 16.7% เมื่อจำแนกชนิดของการติดเชื้อ พบว่า แมวที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. จำนวน 22 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. 15.9% ในขณะที่ แมวที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 1 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. 0.7% โดยทั่วไปแล้ว พบว่า พื้นที่หมู่ 11 มีอัตราการติดเชื้อ *Brugia* spp. ในแมวสูงที่สุด

ในขณะที่ ผลของการตรวจวินิจฉัยเชื้อไมโครพลาเรียในสุนัขด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR พบว่า สุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 18 ตัว จากจำนวนสุนัขที่สำรวจทั้งหมดจำนวน 30 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียในสุนัข 60% เมื่อจำแนกชนิดของการติดเชื้อ พบว่า สุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. จำนวน 10 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. 33.3% และพบสุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 6 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. 20% นอกจากนี้ ยังพบว่า สุนัขที่มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. จำนวน 2 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. 6.7% ซึ่งการติดเชื้อร่วมกันของพยาธิพลาเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้ตรวจพบได้โดยวิธี PCR เท่านั้น ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีการจำแนกด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในที่นี้ ตัวอย่างเลือดสุนัขจำนวน 2 ตัวอย่าง มีเชื้อไมโครพลาเรียส่วนใหญ่ ซึ่งมีลักษณะเหมือนพยาธิไมโครพลาเรีย *Dirofilaria* spp. มากกว่าพยาธิไมโครพลาเรีย *Brugia* spp. โดยอาศัยการจำแนกการติดเชื้อไมโครพลาเรียที่ย้อมติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์ และในทำนองเดียวกัน เมื่อพิจารณาพื้นที่แพร่กระจายโรคพยาธิพลาเรีย พบว่า พื้นที่หมู่ 11 มีอัตราการติดเชื้อ *Brugia* spp. ในสุนัขสูงที่สุดเช่นกัน

ตารางที่ 4.2 ผลการจำแนกชนิดของไมโครพลาเรีย จากตัวอย่างจากเลือดสัตว์ ที่ตำบล
ประสงค์ อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งจำแนกด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR

ตัวอย่าง	พื้นที่	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบไมโครพลาเรีย (%)			
			<i>Brugia</i> spp.	<i>Dirofilaria</i> spp.	<i>Brugia</i> spp. & <i>Dirofilaria</i> spp.	Negative
แมว	หมู่ 11	37	14 (37.8)	1 (2.7)	0 (0)	22 (59.5)
	หมู่ 12	19	1 (5.3)	0 (0)	0 (0)	18 (94.7)
	หมู่ 22	37	4 (10.8)	0 (0)	0 (0)	33 (89.2)
	หมู่ 3	45	3 (6.7)	0 (0)	0 (0)	42 (93.3)
รวม		138	22 (15.9)	1 (0.7)	0 (0)	115 (83.3)
สุนัข	หมู่ 11	24	9 (37.5)	3 (2.5)	2 (8.3)	10 (41.7)
	หมู่ 12	6	1 (16.7)	3 (50)	0 (0)	2 (33.3)
	หมู่ 22	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	หมู่ 3	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
รวม		30	10 (33.3)	6 (20)	2 (6.7)	12 (40)

4.1.3 ข้อมูลการกระจายโรคในสัตว์รังโรค ในเชิงพื้นที่

จากข้อมูลการสำรวจการติดเชื้อไมโครพลาเรียในสัตว์เลี้ยงโดยจำแนกตามครัวเรือนที่พบ
สัตว์เลี้ยงในแต่ละพื้นที่หมู่บ้าน จากการจำแนกหาการติดเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดด้วยวิธี
rDNA locus-specific PCR พบมีบ้านที่มีสัตว์เลี้ยงติดเชื้อไมโครพลาเรียในพื้นที่หมู่ 11 จำนวน 13
หลังจากตัวอย่างที่สำรวจในบ้านทั้งหมด 27 หลังคาเรือน หรือคิดเป็นอัตราของหลังคาเรือนที่พบสัตว์
เลี้ยงติดเชื้อไมโครพลาเรีย 48.2% ในพื้นที่หมู่ 12 พบมีบ้านที่มีสัตว์เลี้ยงติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 4
หลัง จากตัวอย่างที่สำรวจในบ้านทั้งหมด 16 หลังคาเรือน หรือคิดเป็นอัตราหลังคาเรือนที่พบสัตว์เลี้ยง
ติดเชื้อไมโครพลาเรีย 25% ในพื้นที่หมู่ 22 พบมีบ้านที่มีสัตว์เลี้ยงติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 4 หลัง
จากตัวอย่างที่สำรวจในบ้านทั้งหมด 22 หลังคาเรือน หรือคิดเป็นอัตราหลังคาเรือนที่พบสัตว์เลี้ยงติด
เชื้อไมโครพลาเรีย 18.2% ในขณะที่ ในพื้นที่หมู่ 3 พบมีบ้านที่มีสัตว์เลี้ยงติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 3
หลัง จากตัวอย่างที่สำรวจในบ้านทั้งหมด 23 หลังคาเรือน หรือคิดเป็นอัตราของหลังคาเรือนที่พบสัตว์
เลี้ยงติดเชื้อไมโครพลาเรียน้อยที่สุดซึ่งเท่ากับ 13%

การกระจายของการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงในแต่ละหมู่บ้านตามตารางที่ 3 ซึ่งพบการกระจายของโรคแบบเป็นกลุ่มบ้าน (cluster) โดยจะพบการแพร่โรคในสัตว์เลี้ยงสูงที่สุดตามกลุ่มบ้านในพื้นที่หมู่ 11 และเนื่องจากในพื้นที่หมู่ 11 นี้ เป็นพื้นที่ซึ่งเคยมีการสำรวจการติดพยาธิฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในคนมาก่อนหน้านี้แต่ไม่เคยถูกสำรวจการติดพยาธิฟิลาเรียใดๆ ในสัตว์เลี้ยงมาก่อนเลย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เลือกศึกษาการกระจายโรคตามพิกัดภูมิศาสตร์ของบ้านที่มีสัตว์เลี้ยงติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในหมู่ 11 เท่านั้น โดยการแสดงการกระจายของบ้านที่ทำการสำรวจทั้งหมดและบ้านที่พบสัตว์เลี้ยงติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในหมู่ 11 ทั้งหมดพบการกระจายทางภูมิศาสตร์ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลแสดงการกระจายการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในสัตว์เลี้ยงในพื้นที่ตำบลประสงค์ อำเภอกำแพงแสน ซึ่งตรวจโดยวิธี rDNA locus-specific PCR

พื้นที่	จำนวนหลังคาเรือนสัตว์เลี้ยงที่สำรวจ*			จำนวนสัตว์เลี้ยงที่สำรวจ					
	สัตว์ติดเชื้อ	สัตว์ไม่ติดเชื้อ	รวมทั้งหมด	แมว		สุนัข		รวมทั้งหมด	
				ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ
หมู่ 11**	13	14	27	15	22	14	10	29	32
หมู่ 12	4	12	16	1	18	4	2	5	20
หมู่ 22	4	18	22	4	33	0	0	4	33
หมู่ 3	3	20	23	3	42	0	0	3	42
รวม	24	64	88	23	115	18	12	41	127

* การติดเชื้อในหลังคาเรือนหมายถึงการติดเชื้อในสุนัขหรือแมวจำนวน 1 ตัวหรือมากกว่า 1 ตัว

** เฉพาะหมู่ 11 มีการเก็บข้อมูลการกระจายครัวเรือนและครัวเรือนที่สำรวจพบแมวหรือสุนัขที่ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียโดยพิกัดภูมิศาสตร์

4.1.4 ผลการศึกษาชีวนิเวศในพื้นที่ตำบลประสงค์ อำเภอท่าชนะ จังหวัด
สุราษฎร์ธานี

การศึกษาชีวสังขยงในการออกหากินเลือด (feeding habit) ในพื้นที่ตำบลประสงค อําเภอยาชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างยุงพาหะตัวเต็มวันเพศเมียในพื้นที่ครั้งแรกในช่วงเดือนมิถุนายน 2556 โดยใช้วิธีคนเป็นเหยื่อล่อ (human-landing catch) ใช้จำนวนคนจับยุง 2 คน ต่อ 1 จุด จับติดต่อกันเป็นเวลา 3 คืน คืนละ 6 ชั่วโมง เริ่ม 15.00 น. ถึง 21.00 น. โดยทำการนั่งจับยุงเป็นเวลา 55 นาทีและหยุดพัก 5 นาที การสำรวจครั้งนี้ทำการจับยุงเฉพาะภายนอกบ้านเท่านั้น เนื่องจากการทดสอบจับยุงภายในบ้านแล้วปรากฏว่าไม่พบยุงออกหากินภายในบ้าน จึงได้ทำการเก็บข้อมูลเฉพาะภายนอกบ้านเท่านั้น ซึ่งได้ผลการกระจายของยุงตามตารางที่ 4 ซึ่งจุดจับยุงจุด A, B, C และ D ตั้งอยู่ที่หมู่ 11, 3, 12 และ 22 ตามลำดับ โดยเลือกจากบริเวณบ้านที่พบการติดเชื้อไมโคพ

ลาเรียในสัตว์เลี้ยง ผลการสำรวจพบยุงที่มีการกระจายอยู่ในพื้นที่สูงที่สุดได้แก่ *Ae. Albopictus* และ *Ar. Suballbatus* ซึ่งเป็นยุงที่กินเลือดสัตว์ (zoophagy) เป็นส่วนใหญ่ และสามารถพบยุง *Mansonia* spp. ได้ในหมู่ 11, 12 และ 22 ซึ่งชั่วโมงที่สามารถพบยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ออกหากินหรือเป็นช่วงที่มีความหนาแน่นสูงสุด (peak hour) ได้แก่ชั่วโมงที่ 4 (18.00 –19.00 น.) และชั่วโมงที่ 5 (19.00–20.00 น.) ตามผลที่แสดงไว้ในภาคผนวก

ตารางที่ 4.4 แสดงการกระจายของยุงที่พบในพื้นที่ศึกษาทั้ง 4 หมู่บ้าน ตำบลประสงค์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดสุราษฎร์ธานี

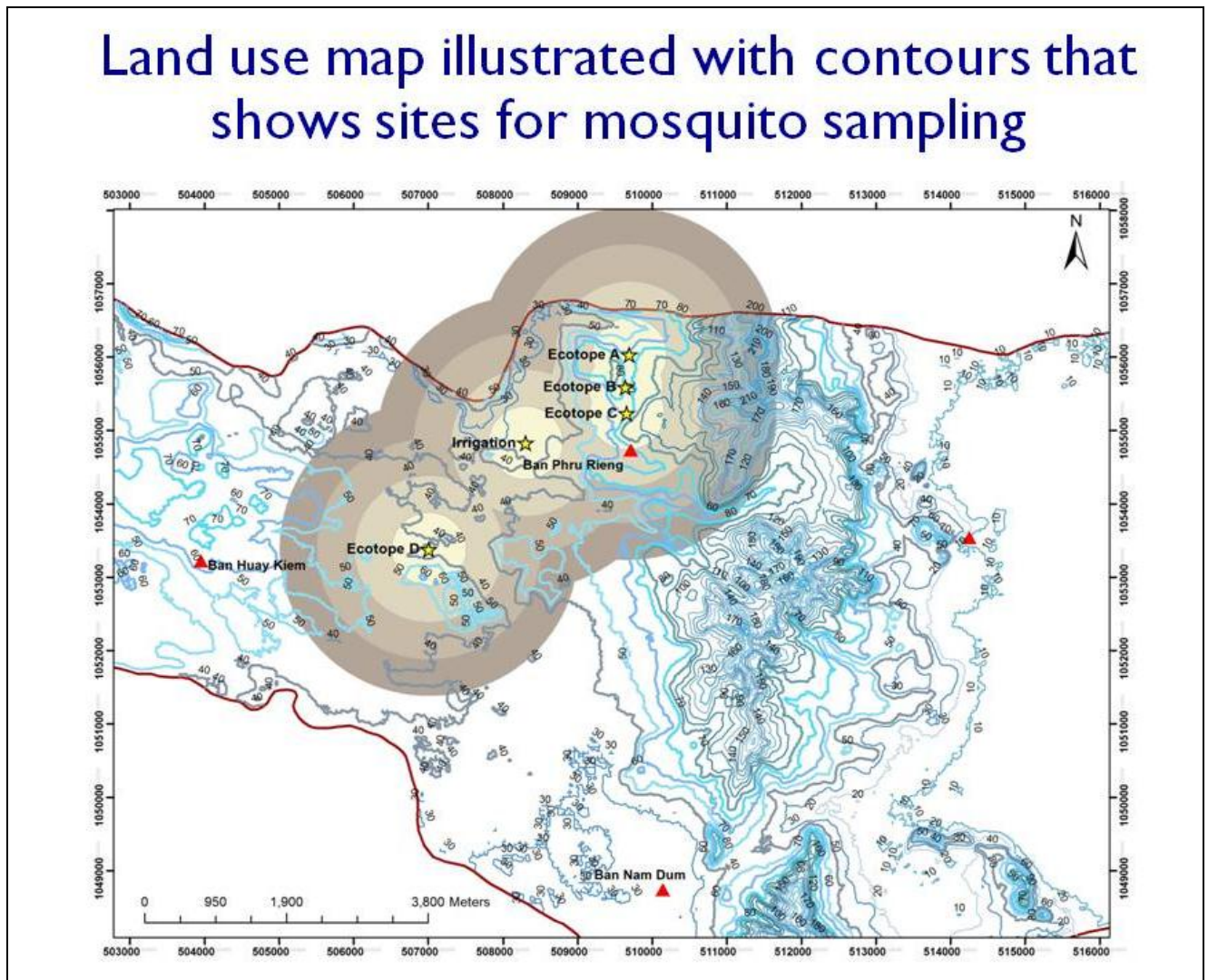
ชนิดของยุง	จำนวนยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย				
	จุด A	จุด B	จุด C	จุด D	รวม
<i>Ma. uniformis</i>	1	0	0	4	5
<i>Mn. indiana</i>	0	0	2	0	2
<i>Aedes</i> spp.	0	0	1	0	1
<i>Ae. albopictus</i>	84	142	107	39	372
<i>Ae. aegypti</i>	1	1	2	0	4
<i>An. subpictus</i>	0	0	1	0	1
<i>An. whartoni</i>	0	1	0	0	1
<i>Ar. suballbatus</i>	40	1	85	70	196
<i>Cq. crassipes</i>	0	1	1	0	2
<i>Culex</i> spp.	0	8	7	1	16
<i>Cx. gelidus</i>	3	0	0	1	4
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	2	1	1	1	5
<i>Cx. vishnui</i>	147	48	69	249	513
รวม	277	203	274	361	1115

จากข้อมูลชีวนิสัยการออกหากินเลือดของยุง *Mansonia* spp. และความชุกของการติดเชื้อพยาธิพลาเรียในสัตว์ที่ศึกษาได้เป็นเบื้องต้นจากการศึกษาครั้งนี้ จึงทำให้สามารถออกแบบการศึกษาโดยกำหนดพื้นที่การจับยุงตาม ecotope based ซึ่งคำนึงถึงการกระจายของยุงพาหะของโรคในเชิงพื้นที่ (spatial distribution) และในเชิงของเวลา (temporary distribution) เป็นสำคัญ โดยทดลองออกแบบพื้นที่การจับยุงทั้งหมดในพื้นที่หมู่ 11 ดำเนินการศึกษาในช่วงเดือนสิงหาคม 2556 โดยพื้นที่จับยุงถูกกำหนด

เป็น 4 Ecotopes (A – D) และลดเวลาการจับยุงลงเหลือคืนละ 3 ชั่วโมง ระหว่างช่วง 18.00 – 21.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พบความหนาแน่นของยุง *Mansonia* spp. สูงสุด จับเฉพาะภายนอกบ้านเป็นเวลาติดต่อกัน 3 คืน ได้ผลการกระจายตามตารางที่ 4.5 ซึ่งสามารถพบการกระจายของยุง *Mansonia* spp. เพิ่มมากขึ้น ชนิดของยุง *Mansonia* spp. ที่พบได้แก่ *Ma. Uniformis*, *Mn. Indiana* และ *Ma. Bonneae* ดังนั้น จึงได้มีการประยุกต์ใช้วิธีนี้ในการสำรวจความชุกและชนิดของยุง *Mansonia* spp. ในพื้นที่จริงที่ต้องการศึกษาในอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส ต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงการกระจายของยุงที่พบในพื้นที่หมู่ 11 ตำบลประสงค์ จำแนกตาม Ecotope

ชนิดของยุง	จำนวนยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย				รวม
	Ecotope	Ecotope	Ecotope	Ecotope	
	A	B	C	D	
<i>Ma. Bonneae</i>	0	0	1	9	10
<i>Ma. uniformis</i>	1	2	3	52	58
<i>Mn. indiana</i>	2	0	10	3	15
<i>Ae. albopictus</i>	11	40	26	3	80
<i>Ae. aegypti</i>	5	3	10	5	23
<i>Ar. subalbatus</i>	356	382	203	12	953
<i>Cq. crassipes</i>	3	0	3	0	6
<i>Cx. gelidus</i>	11	13	69	12	105
<i>Cx. nigropunctatus</i>	0	0	0	0	0
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0	0	0	5	5
<i>Culex</i> spp.	0	1	1	2	4
<i>Cx. vishnui</i>	52	20	48	13	133
รวม	438	459	360	52	1309



รูปที่ 4.3 แผนที่แสดงจุดจับยุงในพื้นที่หมู่ 11 โดยอาศัยข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินและสภาพภูมิประเทศ

4.1.5 ผลการศึกษาการพบตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรีย (L3) ในยุง *Mansonia* spp.

การศึกษาหาการพบตัวอ่อน (larva) ของพยาธิฟิลาเรียในยุง *Mansonia* spp. ที่จับได้จากพื้นที่ตำบลประสงค์ อำเภอกำแพงแสน โดยการนำยุง *Mansonia* spp. ตัวเต็มวันเพศเมียที่จับได้ในพื้นที่ศึกษาทั้งหมดมาผ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (dissection) แยกเพื่อหาตัวอ่อนพยาธิในระยะต่างๆ ได้แก่ L1, L2 และ L3 ทั้งในส่วนหัว ออ และท้อง ผลการศึกษาโดยการ dissection ไม่พบการติดตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียในทุกตัวอย่างยุง *Mansonia* spp. ที่เก็บได้ เมื่อนำยุงทุกตัวอย่างที่ถูกผ่าแล้วไปพิสูจน์การติดเชื้อพยาธิฟิลาเรีย โดยวิธี rDNA locus-specific PCR ที่ประยุกต์มาจากการศึกษา DNA ของไมโครฟิลาเรียที่ได้จากตัวอย่างเลือด โดยครั้งนี้ใช้การสกัด DNA จากซากยุง ผลของการจำแนกตัวอ่อนพยาธิฟิ

ลาเรียด้วยวิธี PCR ไม่พบดีเอ็นเอของพยาธิฟิลาเรียในทุกตัวอย่างของยุงที่เก็บได้จากพื้นที่ศึกษาดำบล ประสงค์ทั้งหมด

4.2 การกระจายของเชื้อพยาธิฟิลาเรียในคน สัตว์ และยุง ในอำเภอตากใบ จังหวัด นราธิวาส

4.2.1 ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่ศึกษา

การสำรวจหาการติดพยาธิฟิลาเรียในคน สัตว์รังโรค และยุงพาหะของโรคเท้าช้าง ในพื้นที่ แพร่โรค (TA) อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส โดยการสำรวจในผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อฟิลาเรีย ชนิด *B. malayi* ซึ่งพบอาศัยอยู่ในพื้นที่อำเภอบางขุนทองและอำเภอโสมพิสัย และทำการสำรวจการติด เชื้อเพื่อหาผู้ติดเชื้อรายใหม่ในพื้นที่ หมู่ 1 บางขุนทอง หมู่ 3 บ้านโคกสูง และหมู่ 5 บ้านโคกชุมบก ตำบล บางขุนทอง และหมู่ 2 บ้านโคกไผ่ ตำบลพร่อน ซึ่งพบว่าทั้ง 3 อำเภอที่ทำการศึกษานี้ครอบคลุมพื้นที่ ของป่าพรุโต๊ะแดงซึ่งมีสภาพนิเวศน์ที่เหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ของยุงเสื่อ *Mansonia* spp. อีกทั้งยังเป็น พื้นที่ซึ่งติดต่อกับเขตอำเภอสุไหงปาดี ซึ่งเป็นพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างและพบผู้ป่วยได้ในปัจจุบัน ดังแสดงใน รูปที่ 4.3 จังหวัดนราธิวาสได้ถูกกำหนดเป็นพื้นที่เป้าหมายของการดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในช่วงระหว่าง พ.ศ. 2545–2549 (รอบที่ 1) และระหว่างปี พ.ศ. 2550–2554 (รอบที่ 2) โดยการดำเนินการจ่ายยาแต่ละรอบของโครงการฯ มีการดำเนินการจ่าย ยารักษากลุ่ม (MDA) ด้วยยาร่วม Diethylcarbamazine และ Albendazole ปีละครั้งติดต่อกัน 5 ปี โดยที่ จังหวัดนราธิวาสนี้เป็นเพียงจังหวัดเดียวของประเทศไทยที่ดำเนินโครงการจ่ายยารักษากลุ่ม (MDA) ติดต่อกันถึง 2 รอบ เนื่องจากหลังสิ้นสุดโครงการในรอบแรกในปี พ.ศ. 2549 แล้วยังคงพบผู้ติดเชื้อ พิลาเรียชนิด *B. malayi* อยู่ในพื้นที่ จึงไม่สามารถหยุดการให้ยาได้

เมื่อทำการสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ยุงเสื่อและสภาพแวดล้อมทางนิเวศวิทยาในพื้นที่ศึกษา พบว่า บริเวณที่เป็นป่าพรุโต๊ะแดงนั้นยังคงสภาพป่าพรุที่มีระบบนิเวศน์ของป่าที่สมบูรณ์มากกว่าเมื่อเทียบกับ ป่าพรุน้ำดำในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในผืนป่ายังคงพบแหล่งน้ำตามธรรมชาติหลายแห่ง แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่าในหลายพื้นที่ของป่าพรุ มีการเปลี่ยนแปลงนิเวศวิทยา โดยการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ ที่ดินไปเป็นพื้นที่การเกษตร โดยเฉพาะการปลูกยางพารา ปาล์มน้ำมันและสวนผลไม้ อีกทั้งยังพบ บ้านเรือนที่ตั้งอยู่ในบริเวณส่วนยางหรือบริเวณชายแนวป่าได้ (ดังรูปที่ 4.4)

ลักษณะพื้นที่ซึ่งทำการสำรวจ



© Bhumirattana A & Intarapuk I

รูปที่ 4.4 ลักษณะของพื้นที่ศึกษา อำเภอตากใบจังหวัดนราธิวาส A) แผนที่อำเภอตากใบ และที่ตั้งของตำบลบางขุนทอง ตำบลพุนพินและตำบลโพนพิสัย ซึ่งเป็นพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างและได้รับการสำรวจหาโรคในการศึกษาครั้งนี้; B) แหล่งแพร่โรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ซึ่งเป็นพื้นที่พรุในจังหวัดนราธิวาส

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก อติศักดิ์และอภิรติ, 2558 และ <http://www.pnylink.com/>

4.2.2 การสำรวจหาการติดพยาธิพลาเรียชนิด *B. malayi* ในประชากรที่อาศัยในพื้นที่แพร่โรค อำเภอตากใบ

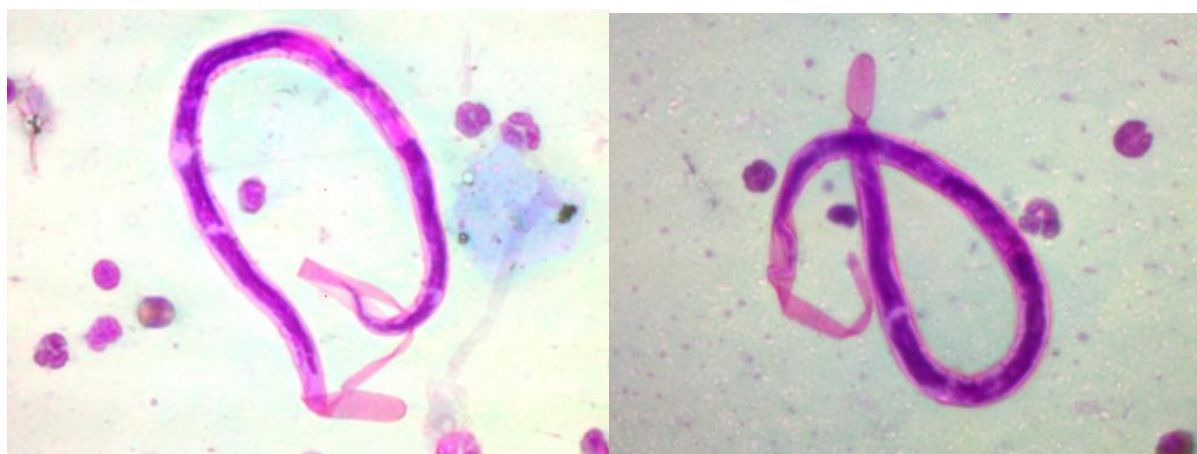
การสำรวจหาการแพร่กระจายพยาธิชนิด *B. malayi* ในคนที่อาศัยในพื้นที่แพร่โรค (พื้นที่ซึ่งเคยมีรายงานการพบผู้ป่วยโรคเท้าช้างหรือพบผู้ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi*) การศึกษาในประชากรเป้าหมายในการสำรวจหาการติดเชื้อพลาเรียชนิด *B. malayi* ถูกกำหนดเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อพลาเรียชนิด *B. malayi* ซึ่งขึ้นทะเบียนการติดตามการรักษาโรคเท้าช้างโดยสาธารณสุขอำเภอตากใบในปี 2556 และการสำรวจการติดเชื้อพยาธิพลาเรียกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่รอยโรคและมีการและมีการจ่ายยารักษาของกลุ่มของโรคเท้าช้างในปี 2555 มีความครอบคลุมต่ำกว่าร้อยละ 90 (ตามตารางที่ 3.1)

จากการติดตามผู้ป่วยติดเชื้อพลาเรียชนิด *B. malayi* ในพื้นที่อำเภอตากใบ ที่ได้รับการจ่ายยาในปี 2556 (สาธารณสุขอำเภอตากใบ) พบผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 18 ราย อาศัยอยู่ในตำบลบางขุนทอง 12 รายและตำบลโฆสิต 6 ราย ดำเนินการตรวจหาการติดเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดของกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อพลาเรียชนิด *B. malayi* โดยการเจาะเลือดที่ปลายนิ้วเพื่อตรวจหาเชื้อไมโครพลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และวิธีฟิล์มโลหิตหนาและย้อมด้วย Wright-Geimsa stain และมีการยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR พบผู้ที่ยังคงติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 4 ราย จากจำนวนผู้มีประวัติเคยติดเชื้อทั้งหมดจำนวน 18 ราย ในจำนวนผู้ที่ยังคงมีเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดนี้ ประกอบด้วยผู้ป่วยเพศหญิงจำนวน 3 รายและผู้ป่วยเพศชายจำนวน 1 ราย ซึ่งอาศัยอยู่ในพื้นที่หมู่ 1 จำนวน 1 ราย และหมู่ 6 จำนวน 3 ราย

ลักษณะของพยาธิไมโครพลาเรียที่พบเมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์มีลักษณะเป็นพยาธิตัวกลม มีเปลือกหุ้มลำตัวซึ่งติดสีชมพูของสีย้อมซาซด์เจน และพบ Terminal nuclei ที่ปลายหาง ซึ่งสามารถจำแนกชนิดเป็นพยาธิ *Brugia* spp. เมื่อนำพยาธิไปตรวจยืนยันชนิดของไมโครพลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR และวิธี DNA sequencing สามารถยืนยันพยาธิที่ได้ทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi*

ตารางที่ 4.6 จำนวนผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ขึ้นทะเบียนการรักษาและได้รับการจ่ายยาไดเอธิลคาร์บามาซีนในปี 2556 ในอำเภอตากใบ

หมู่ที่	ที่อยู่ตำบล	จำนวนผู้ป่วยที่กินยารักษา (คน)			จำนวนผู้ที่พบเชื้อในปัจจุบัน (คน)
		ชาย	หญิง	รวม	
1	บางขุนทอง	3	2	5	1
5	บางขุนทอง	0	3	3	0
6	บางขุนทอง	3	1	4	3
1	โฆยิต	0	1	1	0
5	โฆยิต	3	2	5	0
รวม		9	9	18	4



รูปที่ 4.5 ลักษณะทางกายภาพของไมโครฟิลาเรียของพยาธิ *B. malayi* ที่ได้จากผู้ป่วยในอำเภอตากใบ ซึ่งย้อมด้วย Wright-Geimsa stain และดูผ่านกล้องจุลทรรศน์

การสอบสวนโรคในผู้ป่วยทั้ง 4 ราย พบว่าทั้งหมดได้รับยา Diethylcarbamazine ร่วมกับ Albendazole ปีละ 1 ครั้ง ในโครงการจ่ายยารักษากลุ่ม (MDA) ตั้งแต่ปี 2545 โดยมีผู้ป่วย 1 รายเป็นเพศหญิง ได้รับยาดิตตอกันอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 10 ปี และเป็นผู้ที่ไม่เคยเดินทางออกจากพื้นที่เลย ซึ่งอาจเป็นข้อสันนิษฐานได้ว่าน่าจะมีเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* อยู่ในพื้นที่ หรือเชื้อ *B. malayi* ที่พบอาจมีความทนต่อยาที่ใช้รักษา ส่วนผู้ป่วยอีก 3 รายเป็นผู้ป่วยที่ได้รับยาดิตตอกันอย่างไม่สม่ำเสมอ และมีการเดินทางออกไปพักค้างนอกพื้นที่ โดยเฉพาะมีการเดินทางไปยังพื้นที่อำเภอเจาะไอร้อง

ร้อง ซึ่งเป็นพื้นที่แพร่โรค จึงมีความเป็นไปได้ที่การพบเชื้อไมโครฟิลาเรียอาจมาจากเชื้อที่คงอยู่ในร่างกายหรืออาจมาจากการติดเชื้อครั้งใหม่

ตารางที่ 4.7 การสอบสวนโรคผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ที่ยังคงพบเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด

Patient ID	เพศ	อายุ (ปี)	ลักษณะการติดเชื้อ <i>B. malayi</i> ที่ตอบสนองต่อการรักษากลุ่มด้วยยา DEC ร่วมกับ Albendazole	ผลการสำรวจแมงที่ติดเชื้อ <i>Brugia</i> spp. ในบ้าน
Bm001	หญิง	76	มีการขึ้นทะเบียนการรักษาช่วงระหว่างปี 2544-2549 (ระหว่างโครงการจ่ายยา MDA 2-drugs เฟส 1) เชื้อคงอยู่ในขณะที่มีการกินยาต่อเนื่องทั้ง 10 รอบของการจ่ายยา (MDA 2-drugs เฟส 1 และ 2) ไม่พบการเคลื่อนย้ายออกนอกพื้นที่	ไม่พบการติดเชื้อ
Bm002	ชาย	62	มีการขึ้นทะเบียนการรักษาช่วงระหว่างปี 2544-2549 (ระหว่างโครงการจ่ายยา MDA 2-drugs เฟส 1) เชื้อคงอยู่ และกินยารักษามากกว่า 5 รอบของการจ่ายยา แต่กินยาไม่ต่อเนื่องทุกปี และมีการเดินทางระหว่างอำเภอตากใบและเจาะไอร้อง	ไม่มีแมงเป็นสัตว์เลี้ยงในบ้าน
Bm004	หญิง	21	มีการขึ้นทะเบียนการรักษาช่วงหลังปี 2554 (หลังโครงการจ่ายยา MDA 2-drugs เฟส 2) และกินยารักษาไม่ต่อเนื่อง และมีการเดินทางระหว่างอำเภอตากใบและเจาะไอร้อง	ไม่พบการติดเชื้อ
Bm008	หญิง	20	มีการขึ้นทะเบียนการรักษาช่วงในปี 2552 (ระหว่างโครงการจ่ายยา MDA 2-drugs เฟส 2) และกินยารักษาไม่ต่อเนื่อง เนื่องจากตั้งท้องระหว่างโครงการจ่ายยา และมีการเดินทางระหว่างอำเภอตากใบและเจาะไอร้อง	ไม่พบการติดเชื้อ

การสำรวจหาการติดเชื้อพยาธิไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในกระแสเลือดของประชากรที่อาศัยในพื้นที่แพร่ระบาดของโรคและมีการจ่ายยาป้องกันโรคเท้าช้างในโครงการจ่ายยารักษากลุ่ม (MDA) ครอบคลุมพื้นที่น้อยกว่า 90% โดยเลือกสำรวจในกลุ่มประชากรในพื้นที่หมู่ 1 บางขุนทอง หมู่ 3 บ้านโคกสูง และหมู่ 5 บ้านโคกชุมบก ตำบลบางขุนทอง และหมู่ 2 บ้านโคกไผ่ ตำบลพร่อน อำเภอตากใบ เก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรทั้งหมด 1,046 คน ประกอบด้วยกลุ่มตัวอย่างจากพื้นที่หมู่ 1 ตำบลบางขุนทอง จำนวน 317 คน คิดเป็นอัตราการสำรวจ 16% ของจำนวนประชากรทั้งหมดในหมู่บ้าน กลุ่มตัวอย่างจากพื้นที่หมู่ 3 ตำบลบางขุนทอง จำนวน 232 คน คิดเป็นอัตราการสำรวจ 32.7% ของจำนวนประชากรทั้งหมดในหมู่บ้าน กลุ่มตัวอย่างจากพื้นที่หมู่ 5 ตำบลบางขุนทอง จำนวน 318 คน คิดเป็นอัตราการสำรวจ 74.8% ของจำนวนประชากรทั้งหมดในหมู่บ้าน และกลุ่มตัวอย่างจากพื้นที่หมู่ 2 ตำบลพร่อน จำนวน 179 คน คิดเป็นอัตราการสำรวจ 48.6% ของจำนวนประชากรทั้งหมดในหมู่บ้าน การเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้วิธีเจาะเลือดที่ปลายนิ้ว และตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และฟิล์มโลหิตหนา ผลการศึกษาค้นครั้งนี้ไม่พบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในทุกตัวอย่างเลือดที่เก็บมา

4.3 การสำรวจหาการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในสัตว์รังโรค (แมว) ที่อาศัยในพื้นที่แพร่โรคอำเภอตากใบ

การศึกษากการแพร่กระจายเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. Malayi* ในแมวซึ่งเป็นสัตว์รังโรคซึ่งมีศักยภาพในการในการกักโรคได้ดี และสามารถแพร่โรคไปสู่คนได้ การสำรวจหาการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดแมวโดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือด cephalic vein ที่ขาหน้า และนำไปตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และวิธีฟิล์มโลหิตหนาและย้อมด้วย Wright-Geimsa staining เพื่อตรวจหาเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์ และตรวจยืนยันการพบเชื้อไมโครฟิลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR จากการสำรวจในสัตว์โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มตัวอย่าง คือการสำรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียจากจากเลือดแมวที่เลี้ยงในบริเวณบ้านของผู้ป่วยที่คงพบการติดเชื้อ *B. malayi* ทั้ง 4 ราย จากการตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเก็บเลือดแมวบริเวณบ้านผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 8 ตัว ซึ่งผลการสำรวจไม่พบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมวทุกตัว และการสำรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมวที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ศึกษาซึ่งทำการสำรวจการหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในคน ได้แก่หมู่ 1

หมู่ 3 และหมู่ 5 ตำบลบางขุนทอง และหมู่ 2 ตำบลพร่อน โดยเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด 76 ตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจหาเชื้อไมโครพลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยวิธี Micro haematocrit tube technique และวิธีฟิล์มโลหิตหนา พบแมวที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 9 ตัว คิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรีย 11.8% ทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธี rDNA locus-specific PCR พบแมวติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* จำนวน 2 ตัว คิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* 2.6% และพบติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *D. immitis* จำนวน 7 ตัว คิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *D. immitis* 9.2%

ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจหาเชื้อไมโครพลาเรียด้วยวิธีส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ จากตัวอย่างจากเลือดแมว ตำบลบางขุนทอง และตำบลพร่อน อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส

ตัวอย่าง	พื้นที่		จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบไมโครพลาเรีย (%)		
	หมู่	ตำบล		<i>Brugia</i> spp.	<i>Dirofilaria</i> spp.	Negative
แมว	หมู่ 1	บางขุนทอง	15	0 (0)	0 (0)	15 (100)
	หมู่ 3	บางขุนทอง	19	0 (0)	1 (5.3)	18 (94.7)
	หมู่ 5	บางขุนทอง	25	2 (8)	3 (12)	20 (80)
	หมู่ 2	พร่อน	17	0 (0)	3 (7.6)	14 (88.2)
รวม			76	2 (2.6)	7 (9.2)	67 (88.2)

4.4 การสำรวจการติดเชื่อพยาธิพลาเรียในยุง *Mansonia* spp. ในพื้นที่แพร่โรคอำเภอตากใบ

4.4.1 การศึกษาการกระจายของยุง *Mansonia* spp.

การสำรวจหาความชุกและชนิดของยุงตัวเต็มวัยเพศเมียในกลุ่ม *Mansonia* spp. ในพื้นที่พบการแพร่โรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ในพื้นที่อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส ในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาใน 2 ช่วงเวลาของปีตามการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล ซึ่งในภาคใต้ของประเทศไทยมีฝนตกเกือบตลอดทั้งปี จึงเลือกที่จะเก็บตัวอย่างยุงในช่วงเดือนสิงหาคมซึ่งเป็นช่วงที่มีฝนตก (wet season) และช่วงเดือนมีนาคมซึ่งเป็นช่วงที่อากาศร้อนและแห้ง (dry season) ดังนั้นการสำรวจจึงแบ่งออกเป็น 3 ครั้งคือ ครั้งที่ 1 สำรวจในช่วงเดือนสิงหาคม 2556 ครั้งที่ 2 ในช่วงเดือนมีนาคม 2557 และครั้งที่ 3 ช่วงเดือนสิงหาคม 2557 การเลือกเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนสิงหาคมซึ่งเป็นช่วงต้นฤดูฝนในพื้นที่มีอากาศชื้นและ

เป็นช่วงที่มีการแพร่พันธุ์ของยุงค่อนข้างมาก และการเลือกเก็บตัวอย่างช่วงต้นฤดูฝนเนื่องจากในช่วงกลางถึงปลายฤดูฝนพื้นที่บริเวณนี้มีน้ำท่วมอยู่เป็นประจำทุกปีจึงไม่สะดวกในการเข้าทำงานในพื้นที่ และการสำรวจในช่วงเดือนมีนาคมเป็นช่วงหน้าแล้งอากาศร้อนและแห้งน่าเป็นช่วงที่มีการแพร่พันธุ์ของยุงลดลง

การเลือกพื้นที่ซึ่งทำการสำรวจ เลือกจากพื้นที่เดียวกับที่ทำการสำรวจหาการติดเชื้อในคนและสัตว์เลี้ยง โดยการประยุกต์การศึกษานำร่องที่ตำบลประสงค์ อำเภوتاขนา จังหวัดสุราษฎร์ธานีมาใช้ พิจารณาการเลือกจุดจับยุง ซึ่งพิจารณาจากบ้านที่มีคนหรือสัตว์พาหะที่ติดเชื้อซึ่งพบในการศึกษาครั้งนี้ และมีความหนาแน่นของยุง *Mansonia* spp. ที่มีการกระจายในเชิงพื้นที่ (spatial distribution) ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับการกำหนดระยะทางการบินในการออกหากินเลือดของยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ ไปยังบ้านเรือนที่มีผู้คนอยู่อาศัยที่เป็นแหล่งอาหารของยุง ซึ่งสามารถกำหนดจุดจับยุงได้ทั้งหมด 4 ecotopes ดังแสดงตามภาพพิกัดทางภูมิศาสตร์ของอำเภอดากโบ จังหวัดนราธิวาสตามรูปที่ 4.6

การสำรวจยุงพาหะนำโรคในแหล่งแพร่โรคเท้าช้างชนิด

B. malayi สายพันธุ์ nocturnally subperiodic strain



พรุโต๊ะแดง อำเภอดาโต๊ะ จังหวัดนราธิวาส



ยุงพาหะนำโรคสำคัญ
Mansonia และ
Coquillettidia



© Bhumiravana A & Inrapak I



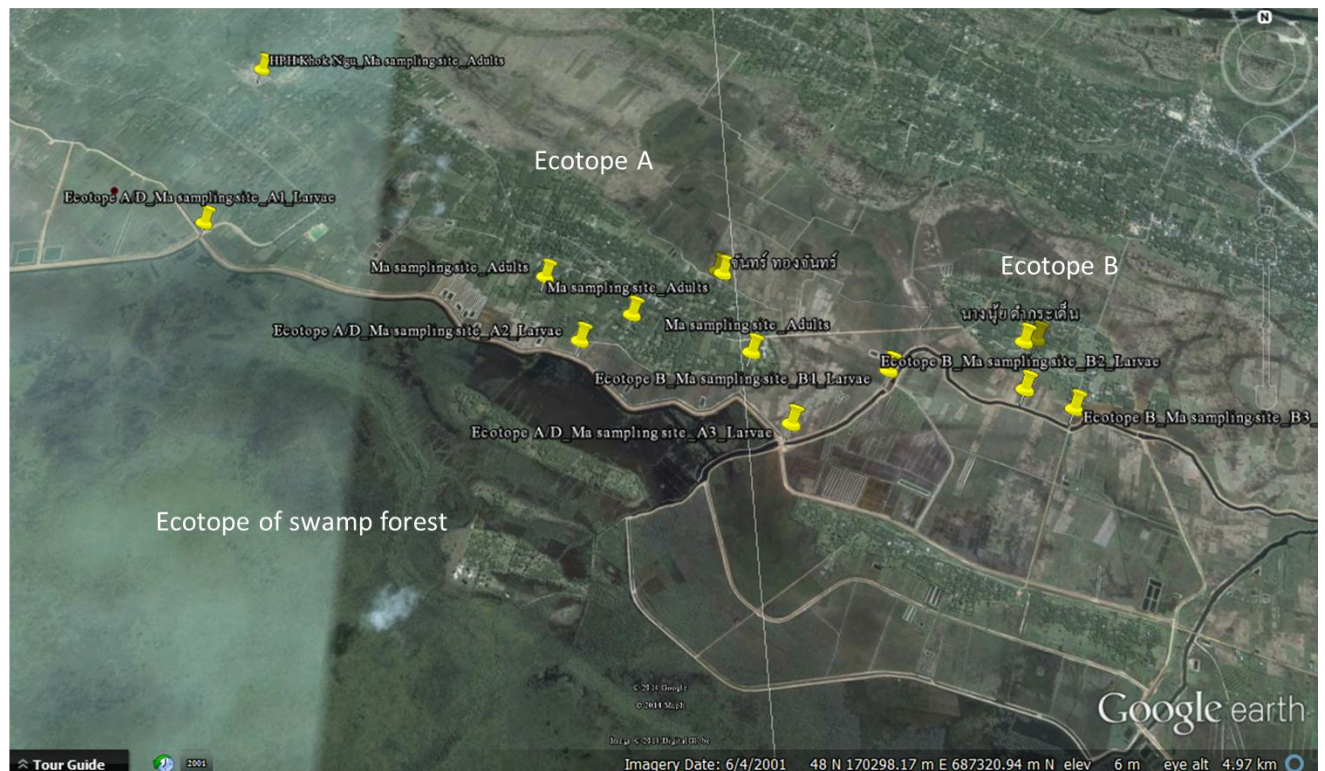
ความหนาแน่นสูงสุด
เวลา 18:00 – 21:00 น.

รูปที่ 4.6 แสดงแนวทางการสำรวจยุงพาหะนำโรคเท้าช้างในแหล่งแพร่โรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ในรัศมี 1.0-1.5 กิโลเมตรจากพรุ ได้แก่ การสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ลูกน้ำยุง *Mansonia* spp. และ *Coquillettidia* spp. และการสำรวจยุงตัวเต็มวัยของยุงพาหะ

ที่มา: อติศักดิ์และอภิรติ, 2558

การสำรวจตัวอย่างยุง *Mansonia* spp. ในพื้นที่ศึกษาทั้ง 3 ครั้ง (แสดงในตารางที่ 4.9–4.11) โดยเก็บยุงในแต่ละพื้นที่จำนวน 2 จุด ใช้ผู้เก็บจำนวน 2 คน เก็บเฉพาะนอกบ้านตามลักษณะนิสัยของยุงที่ใช้แหล่งเกาะพักนอกบ้าน (outdoor resting) เก็บตัวอย่างในช่วง 18.00 – 21.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาการออกหากินเลือดของยุงหรือมีความหนาแน่นของยุงสูงที่สุด (peak hour) ที่ได้จากการศึกษาในตำบลประสงค์ อำเภอกำแพง จังหวัดสุราษฎร์ธานี การเก็บตัวอย่างครั้งแรกดำเนินการในเดือนสิงหาคม 2556 เก็บตัวอย่างยุง 1 พื้นที่ และการเก็บข้อมูลครั้งที่ 2 และ 3 ในเดือนมีนาคม และ สิงหาคม 2557 ตามลำดับ ในแต่ละครั้งเก็บตัวอย่างยุง 4 พื้นที่ (A–D) การสำรวจยุงทั้ง 3 ครั้งพบการกระจายของยุง *Ma. bonneae*, *Ma. uniformis*, *Ma. dives*, *Ma. annulata* และ *Ma. Indiana* (รูปที่ 4.5) โดยยุง *Mansonia* spp. ที่พบทั้งหมดจากการเก็บข้อมูลทั้ง 3 ครั้งมีจำนวน 600 ตัวประกอบด้วยยุง *Ma. Bonneae* จำนวน 219 ตัว, *Ma. Uniformis* จำนวน 301 ตัว, *Ma. Dives* จำนวน 1 ตัว, *Ma. annulata* จำนวน 59 ตัวและ *Ma. Indiana* จำนวน 12 ตัว ยุงส่วนใหญ่ที่พบทั้ง 3 ครั้งเป็น *Ma. Uniformis* จากการเก็บตัวอย่างครั้งแรกในเดือนสิงหาคม 2556 สามารถคำนวณค่าเฉลี่ย Man biting rate ได้ 7.38 ครั้ง/ชั่วโมง การสำรวจครั้งที่ 2 ในเดือนมีนาคมซึ่งเป็นช่วง dry season พบค่าเฉลี่ย Man biting rate 3.59 ครั้ง/ชั่วโมง ส่วนการสำรวจครั้งที่ 3 สิงหาคม 2557 นั้น พบว่าขณะช่วงที่ทำการสำรวจนั้นมีฝนตกตลอดในช่วงระยะเวลาของการเก็บยุง จึงเป็นเหตุให้พบความหนาแน่นของยุงลดลงอย่างมากโดยพบค่าเฉลี่ยของ Man biting rate เพียง 0.81 ครั้ง/ชั่วโมง เท่านั้น

Ecotope Database 2001



Ecotope A – M5, Bang Khun Thong subdistrict, Tak Bai district
Ecotope B – M2, Pron subdistrict, Tak Bai district

รูปที่ 4.7 พิกัดทางภูมิศาสตร์แสดงจุดจับยุงที่ตำบลบางขุนทองและตำบลพร่อน อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส

ตารางที่ 4.9 ค่าความหนาแน่นของยุง *Mansonia* spp. แต่ละสปีชีส์ในพื้นที่ศึกษา อำเภอตากใบ ในช่วงเดือนสิงหาคม 2556

Setting Number	Pool number	Mansonia species identification					Total	Man biting rate	
		<i>Ma. bonneae</i>	<i>Ma. Uniformis</i>	<i>Ma. dives</i>	<i>Ma. annulata</i>	<i>Ma. indiana</i>		(No. of pool Ma./No. person/hours)	Mean
A	AW1	21	40	0	24	2	87	7.25	7.38
	AW2	13	41	0	29	7	90	7.5	
Total		34	81	0	53	9	177		

ตารางที่ 4.10 ค่าความหนาแน่นของยุง *Mansonia* spp. แต่ละสปีชีส์ในพื้นที่ศึกษา
อำเภอตากใบ ในช่วงเดือนมีนาคม 2557

Setting Number	Pool number	Mansonia species identification					Total	Man biting rate (No. of pool Ma./No. person/hours)	Mean
		Ma. <i>bonneae</i>	Ma. <i>uniformis</i>	Ma. <i>dives</i>	Ma. <i>annulata</i>	Ma. <i>indiana</i>			
A	AD1	15	8	0	3	1	27	2.25	2.04
	AD2	15	4	1	2	0	22	1.83	
B	BD1	42	46	0	0	0	88	7.33	7.71
	BD2	39	58	0	0	0	97	8.08	
C	CD1	18	22	0	0	0	40	3.33	2.67
	CD2	5	19	0	0	0	24	2.00	
D	DD1	24	10	0	0	0	34	2.83	1.96
	DD2	7	6	0	0	0	13	1.08	
Total		165	173	1	5	1	345		
Mean								3.59	3.59

ตารางที่ 4.11 ค่าความหนาแน่นของยุง *Mansonia* spp. แต่ละสปีชีส์ในพื้นที่ศึกษาอำเภอ
ตากใบ ในช่วงเดือนสิงหาคม 2557

Setting Number	Pool number	Mansonia species identification					Total	Man biting rate (No. of pool Ma./No. person/hours)	Mean
		Ma. <i>bonneae</i>	Ma. <i>uniformis</i>	Ma. <i>dives</i>	Ma. <i>annulata</i>	Ma. <i>indiana</i>			
A	AD11	3	7	0	0	0	10	0.83	1.08
	AD21	6	9	0	0	1	16	1.33	
B	BD11	1	16	0	0	0	17	1.42	1.21
	BD21	3	8	0	0	1	12	1.00	
C	CD11	1	6	0	0	0	7	0.58	0.42
	CD21	0	2	0	1	0	3	0.25	
D	DD11	5	3	0	0	0	8	0.67	0.54
	DD21	1	4	0	0	0	5	0.42	
Total		20	55	0	1	2	78		
Mean								0.81	0.81

Man biting rate per *Mansonia* spp

4.4.2 การตรวจหาตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในยุง *Mansonia* spp. จากพื้นที่

การศึกษากการตรวจหาตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรีย (larvae) ระยะ L1, L2 และ L3 ในยุง *Mansonia* spp. ที่จับได้จากพื้นที่อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส โดยการนำยุง *Mansonia* spp. ตัวเต็มวันเพศเมียที่จับได้ในพื้นที่ศึกษาทั้ง 3 ครั้ง ทั้งหมดจำนวน 600 ตัว จะถูกแบ่งครึ่งโดยยุงจำนวนครึ่งหนึ่งจำนวน 302 ตัวประกอบด้วยยุง *Ma. Bonneae* จำนวน 110 ตัว, *Ma. Uniformis* จำนวน 155 ตัว, *Ma. Dives* จำนวน 1 ตัว, *Ma. annulata* จำนวน 30 ตัวและ *Ma. Indiana* จำนวน 6 ตัว ยุงส่วนนี้จะถูกผ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (dissection) แยกเพื่อหาตัวอ่อนพยาธิในระยะต่างๆ ได้แก่ L1, L2 และ L3 ทั้งในส่วนหัว ออก และท้อง ผลการศึกษาโดยการ dissection ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการติดตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียในทุกตัวอย่างยุง *Mansonia* spp. สำหรับยุงที่เหลืออีก 298 ตัวจะถูกนำมารวมกันเป็น pool sample โดยแบ่งเป็นยุงสปีชีส์เดียวกัน 5 ตัวต่อ 1 pool sample เพื่อนำไปสกัด DNA และตรวจวิเคราะห์หาตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR โดยผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ DNA ของเชื้อพยาธิฟิลาเรียในทุกตัวอย่างของยุงที่เก็บได้จากพื้นที่ศึกษาเช่นกัน

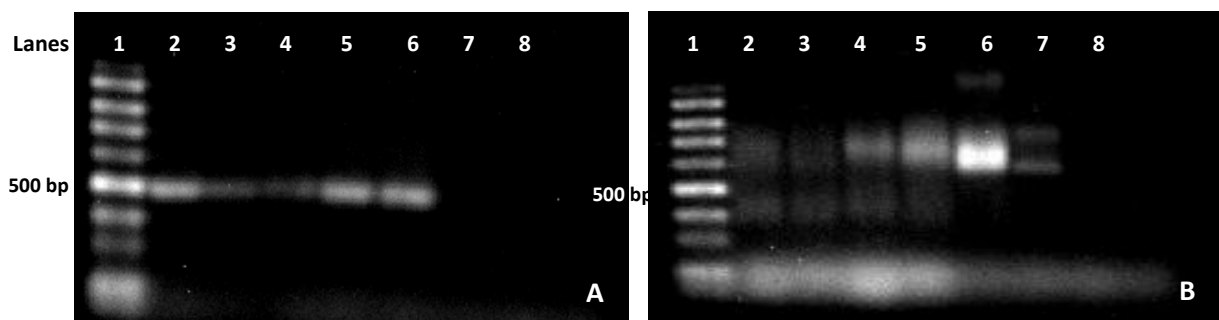
4.5 ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ

4.5.1 การจำแนกชนิดของไมโครฟิลาเรียโดยใช้วิธี rDNA locus-specific PCR

การจำแนกชนิดของการติดพยาธิไมโครฟิลาเรียโดยวิธี rDNA locus-specific PCR เป็นวิธีที่อาศัยพื้นฐานของเทคนิค nested PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยออกแบบไพรเมอร์คู่แรก (outer primers) สำหรับปฏิกิริยา PCR รอบแรกให้มีความจำเพาะต่อยีนของพยาธิฟิลาเรียหลายชนิด (universal primers) ซึ่งสามารถยืนยันการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียได้ทั้งพยาธิในคนและในสัตว์ และไพรเมอร์คู่ใน (inner primers) สำหรับใช้ในขั้นตอนการปฏิกิริยา PCR รอบที่ 2 เป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิฟิลาเรียแต่ละชนิด ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้มีความจำเพาะต่อ rRNA gene (18S, ITS1 และ 5.8S) สามารถจำแนกชนิดพยาธิไมโครฟิลาเรียได้ ทั้งชนิดอยู่ในคนได้แก่เชื้อ *W. bancrofti* และในสัตว์ ได้แก่ เชื้อ *B. malayi*, *B. pahangi* และ *D. immitis*

ก่อนที่จะมีการศึกษากการจำแนกตัวอย่างเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือดคนและสัตว์ที่ได้จากการสำรวจตัวอย่างในพื้นที่ ได้มีการศึกษาปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบของพยาธิฟิลาเรีย โดยการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอ

ต้นแบบ (annealing temperature) ในขั้นตอน PCR โดยใช้เทคนิค gradient PCR มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงของ annealing temperature ตั้งแต่ 50°C ถึง 75°C ใช้ gDNA ของพยาธิไมโครฟิลาเรียของเชื้อ *W. bancrofti* และ *D. immitis* ที่ยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี DNA sequencing จากการศึกษาก่อนหน้านี้ เพื่อใช้เป็นเชื้ออ้างอิง (reference) สำหรับการทดลองนี้ ผลของ PCR products ของเชื้อ *W. bancrofti* และ *D. immitis* จากปฏิกิริยา PCR รอบแรกมีขนาด (amplicon size) เท่ากับ 450 bp. และ 570 bp. ตามลำดับ ในการศึกษานี้เลือกใช้ annealing temperature ของ first round PCR ที่ 62°C (รูปที่ 4.8) ในขณะที่การทำปฏิกิริยา second round PCR เลือกใช้ annealing temperature ที่ 53°C ได้ PCR products ของ *W. bancrofti* และ *D. immitis* มีขนาด (amplicon size) 350 bp. และ 450 bp. ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 ผลของ gradient PCR ในการเพิ่มจำนวน *rRNA* gene โดยใช้ DNA template ได้แก่ DNA ของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *W. bancrofti* (รูป A) และ *D. immitis* (รูป B)

Lane 1: 100 bp Ladder maker

Lanes 2–9: PCR products ที่ annealing temperature 50, 52, 55, 59, 65, 70, 73

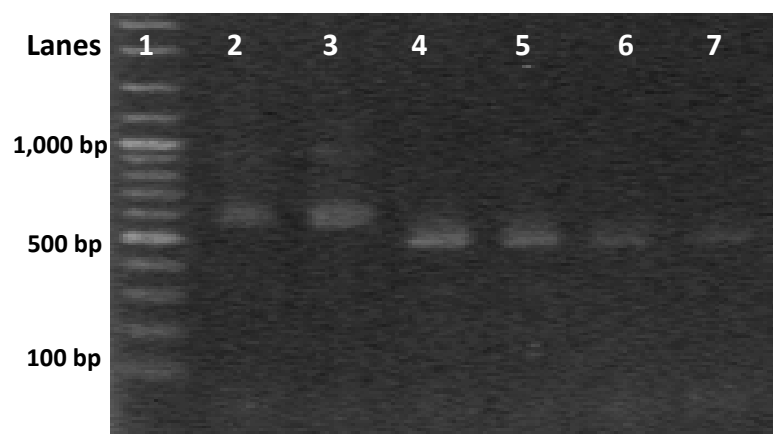
และ 75 องศาเซลเซียสตามลำดับ

วิธี rDNA locus-specific PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ มีการทดสอบปฏิกิริยาที่เหมาะสม (optimization) จนได้ขั้นตอนของการทำ nested PCR เพื่อจำแนกชนิดของพยาธิฟิลาเรียในตัวอย่างเลือด ดังนี้

- First round PCR ประกอบด้วย ขั้นตอน DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที ก่อนเข้าสู่รอบของ PCR เป็นจำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที, primer annealing ใช้อุณหภูมิ 62°C เวลา 1 นาที, และ primer extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA elongation ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 10

นาที่ ได้ PCR products ของเชื้อ *D. immitis*, *B. pahangi* และ *W. bancrofti* มีขนาดเท่ากับ 570 bp., 470 bp. และ 450 bp. ตามลำดับ (รูปที่ 4.9)

- Second round PCR ประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 5 นาที ก่อนเข้าสู่ วงรอบของ PCR เป็นจำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย DNA denaturation ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 1 นาที, primer annealing ใช้อุณหภูมิ 53°C เวลา 1 นาที, และ primer extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA elongation ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 10 นาที ได้ PCR products ของเชื้อ *D. immitis*, *B. pahangi* และ *W. bancrofti* มีขนาดเท่ากับ 450 bp., 370 bp. และ 350 bp. ตามลำดับ (รูปที่ 4.10)



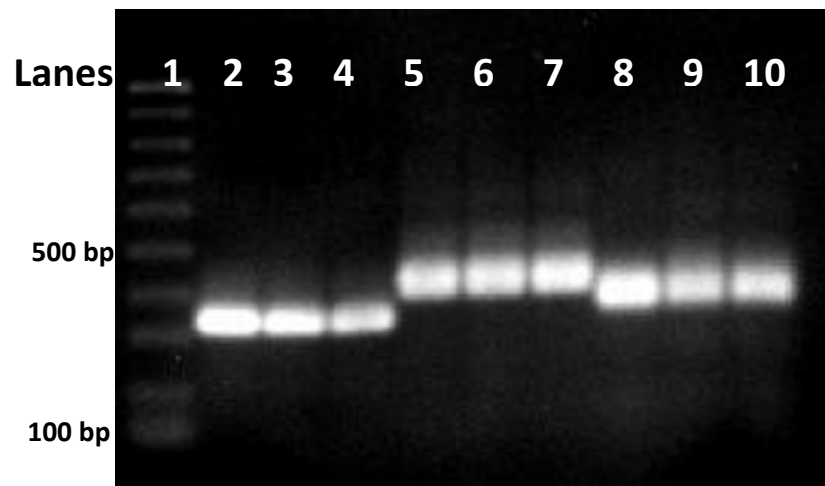
รูปที่ 4.9 First round PCR ของ rDNA locus-specific PCR โดยใช้ DNA template เป็น gDNA ของ ไมโครพลาเรีย

Lane 1: 100 bp Ladder maker

Lanes 2-3: PCR products ของ *D. immitis* จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้ amplicon size เท่ากับ 570 bp.

Lanes 4-5: PCR product ของ *B. pahangi* จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้ amplicon size เท่ากับ 470 bp.

Lanes 6-7: PCR product ของ *W. bancrofti* จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้ amplicon size เท่ากับ 450 bp.



รูปที่ 4.10 Second round PCR ของ rDNA locus-specific PCR โดยใช้ DNA template เป็น PCR products จาก first round PCR ของไมโครฟิลาเรีย

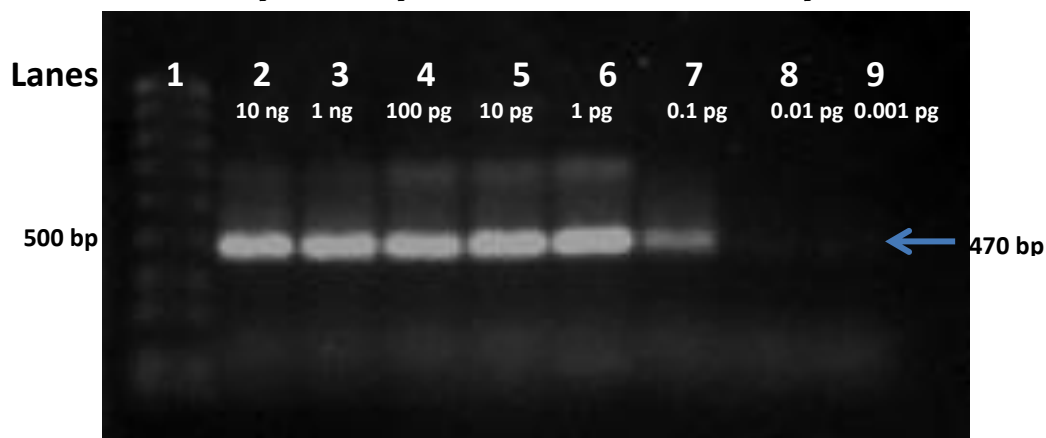
Lane 1: 100 bp Ladder maker

Lanes 2–4: PCR products ของ *W. bancrofti* มีขนาด amplicon size เท่ากับ 350 bp.

Lanes 5–7: PCR product ของ *D. immitis* มีขนาด amplicon size เท่ากับ 450 bp.

Lanes 8–10: PCR product ของ *B. pahangi* มีขนาด amplicon size เท่ากับ 370 bp.

เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจพบด้วยวิธี PCR ได้ (detection limit) ของการจำแนกชนิดของเชื้อพยาธิฟิลาเรียโดยการเจือจาง gDNA เริ่มต้นลงครึ่งละ 10 เท่า (serial dilution) ตั้งแต่ 10 ng จนถึง 0.001 pg และนำไปผ่านขั้นตอน PCR พบว่าเชื้อ *Brugia* spp. และ *D. immitis* มี detection limit อยู่ที่ 0.1 pg (รูปที่ 4.11) ส่วนเชื้อ *W. bancrofti* อยู่ที่ 1 pg



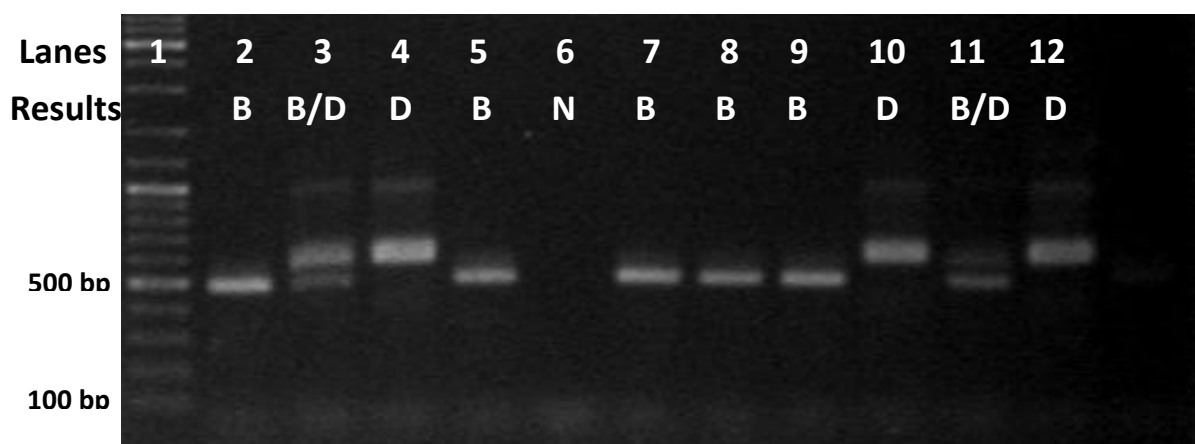
รูปที่ 4.11 Detection limit ของวิธี rDNA locus-specific PCR ที่สามารถจำแนกเชื้อ *Brugia* spp. สามารถพบ PCR products ได้เมื่อ DNA มีความเข้มข้นน้อยถึง 0.1 ng/ml

Lane1: 100 bp Ladder maker

Lanes 2–9: PCR products ของ *B. pahangi* มีปริมาณ DNA template 10 ng/ml – 0.001 pg/ml

4.5.2 การจำแนกเชื้อจากตัวอย่างที่ได้ในพื้นที่

จากการสำรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียในสัตว์ ในพื้นที่หมู่ 3 หมู่ 11 หมู่ 12 และหมู่ 22 ตำบลประสงค์ อำเภอกำแพง จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยการเก็บเลือดจากแมวและสุนัขและตรวจหาการติดเชื้อด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และวิธีย้อม Wright-Geimsa stain พบเชื้อไมโครพิลาเรียทั้งหมด 42 ตัวอย่างจากทั้งหมด 168 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบไมโครพิลาเรียทั้งหมดไปทดสอบโดยวิธี rDNA locus-specific PCR ได้ผลการคัดแยกเชื้อไมโครพิลาเรียเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ติดเชื้อ *Brugia* spp. กลุ่มที่ติดเชื้อ *Dirofilaria* spp. และ กลุ่มที่มีการติดเชื้อร่วมกันของ *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. ซึ่งภาพของ PCR product ของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อทั้ง 3 แบบนี้แสดงในรูปที่ 4.12 ซึ่งสามารถสรุปผลการแยกเชื้อไมโครพิลาเรียได้ตามตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.12 การใช้วิธี rDNA locus-specific PCR ในการตรวจหาเชื้อไมโครพิลาเรียในเลือดสัตว์ จากตำบลประสงค์ อำเภอกำแพง จังหวัดสุราษฎร์ธานี

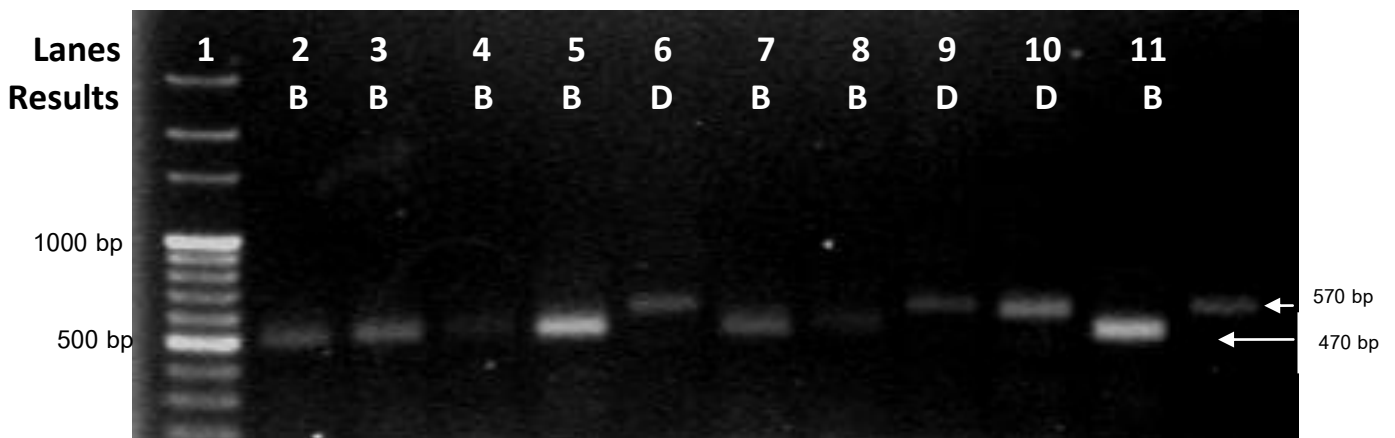
Lane 1: 100 bp Ladder maker

Lanes 2–12: PCR products ของตัวอย่าง B12, B13, B14, B15, B16, B21, B23, 26, B29 B30 และ B33 (B = *Brugia* spp., D = *Dirofilaria* spp., N = negative)

Lanes 13: PCR product ของ *B. pahangi* ใช้เป็น Positive control

จากการสำรวจการติดเชื้อไมโครพิลาเรียในพื้นที่เป้าหมายอำเภอดากโบ จังหวัดนราธิวาส โดยการติดตามผู้ป่วยติดเชื้อ *B. malayi* ในพื้นที่อำเภอดากโบ ที่ได้รับการฉายยาในปี 2556 (สาธารณสุขอำเภอดากโบ) พบผู้ป่วยทั้งจำนวน 18 ราย ซึ่งยังคงให้ผลบวกต่อการตรวจหาไมโครพิลาเรียในกระแส

เลือดด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และวิธีย้อม Wright-Geimsa stain อยู่ 4 ราย ซึ่งอาศัยอยู่ในตำบลบางขุนทอง หมู่ 1 จำนวน 3 ราย และหมู่ 6 จำนวน 1 ราย เมื่อนำตัวอย่างเลือดทั้ง 4 ตัวอย่างไปตรวจจำแนกชนิดของเชื้อไมโครพิลลาเรียด้วยวิธี PCR พบ PCR products ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *Brugia* spp. ทั้งสิ้น และจากการสำรวจการติดเชื้อในแมวในพื้นที่หมู่ 1 บางขุนทอง หมู่ 3 บ้านโคกสูง และหมู่ 5 บ้านโคกชุมบก ตำบลบางขุนทอง และหมู่ 2 บ้านโคกไผ่ ตำบลพร่อน อำเภอดงบัง โดยเก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด 76 ตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจหาเชื้อไมโครพิลลาเรียโดยผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบตัวอย่างที่มีเชื้อไมโครพิลลาเรียจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพิลลาเรีย 11.8% ทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธี rDNA locus specific PCR และศึกษาลำดับเบสของยีน rRNA gene โดยพบแมวติดเชื้อ *B. pahangi* จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพิลลาเรียชนิด *B. pahangi* 2.6% และพบติดเชื้อ *D. immitis* จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพิลลาเรียชนิด *D. immitis* 9.2% ดังแสดงตัวอย่างของการตรวจด้วยวิธี rDNA locus specific PCR ในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 การใช้วิธี rDNA locus-specific PCR ในการตรวจหาเชื้อไมโครพิลลาเรียในเลือดคนและแมวจากพื้นที่อำเภอดงบัง จังหวัดนครราชสีมา

Lane 1: 100 bp Ladder marker

Lanes 2-5: PCR products ของตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคเท้าช้างอำเภอดงบัง (Patient No. 001, 002, 004 และ 008)

Lanes 6-10: PCR products ของตัวอย่างเลือดแมว เก็บในพื้นที่หมู่ 5 อำเภอดงบัง (case number: 510, 515, 516, 517 และ 520)

Lanes 11-12: PCR product ของ *B. pahangi* และ *D. immitis* ใช้เป็น Positive control (B = *Brugia* spp., D = *Dirofilaria* spp., N = negative)

4.5.3 ความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยการติดเชื้อไมโครพิลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR เมื่อเทียบกับการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

การศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องมือการตรวจจำแนกเชื้อไมโครพิลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR เทียบกับวิธีการตรวจหาเชื้อไมโครพิลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากลักษณะทางกายภาพ (morphology) จากตัวอย่างที่ทำการสำรวจทั้งหมดทั้งที่เป็นตัวอย่างจากเลือดคนและสัตว์ทั้งหมด 256 ตัวอย่าง วิธีตรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์ให้ผลการทดสอบเป็นบวกมีจำนวน 50 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี rDNA locus-specific PCR ให้ผลการทดสอบเป็นบวกมีจำนวน 53 ตัวอย่าง ในตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกนี้มี 49 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกตรงกันทั้ง 2 วิธี คิดเป็นค่าความไว (sensitivity) ของวิธี rDNA locus-specific PCR เมื่อเทียบกับการตรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์ เท่ากับ 98% และค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predict value) ของวิธี rDNA locus-specific PCR คิดเป็น 92.5% และด้วยวิธีการตรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์สามารถแยกตัวอย่างที่เป็นลบทั้งหมด 206 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี rDNA locus-specific PCR สามารถแยกตัวอย่างที่ลบต่อการทดสอบได้ 203 ตัวอย่าง ซึ่งทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดสอบเป็นลบตรงกันจำนวน 202 ตัวอย่าง คิดเป็นค่าความจำเพาะ (specificity) ของวิธี rDNA locus-specific PCR เมื่อเทียบกับวิธีตรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์ เท่ากับ 98.1% และค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predict value) ของวิธี rDNA locus-specific PCR คิดเป็น 99.5% ทั้งนี้ที่ค่าความแม่นยำของเครื่องมือ (accuracy) ของวิธี rDNA locus-specific PCR เมื่อเทียบกับการตรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์ของวิธี คิดเป็น 98% (ตามตารางที่ 4.12)

การศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อไมโครพิลาเรียในเลือดของวิธี วิธี rDNA locus-specific PCR เมื่อเทียบกับวิธีตรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่าจากตัวอย่างที่ทำการสำรวจทั้งหมดทั้งที่เป็นตัวอย่างจากเลือดคนและสัตว์ทั้งหมด 256 ตัวอย่าง ด้วยวิธีตรวจหาการติดเชื้อไมโครพิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์พบการติดเชื้อไมโครพิลาเรียจำนวน 50 ตัวอย่าง จำแนกชนิดของเชื้อไมโครพิลาเรียที่พบได้เป็นการติดเชื้อไมโครพิลาเรียชนิด *Brugia* spp. 31 ตัวอย่าง การติดเชื้อไมโครพิลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 19 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี rDNA locus-specific PCR พบการติดเชื้อไมโครพิลาเรียจำนวน 53 ตัวอย่าง จำแนกชนิดของเชื้อไมโครพิลาเรียที่พบได้เป็นการติดเชื้อไมโครพิลาเรียชนิด *Brugia* spp. 34 ตัวอย่าง การติดเชื้อไมโครพิลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 17 ตัวอย่าง

และมีการติดเชื้อมาร่วมกันระหว่างเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. จำนวน 2 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4.12 ตาราง 2x2 เพื่อแสดงผลของการตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือด ด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR เทียบกับวิธีตรวจหาการติดเชื้อมิโครฟิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์

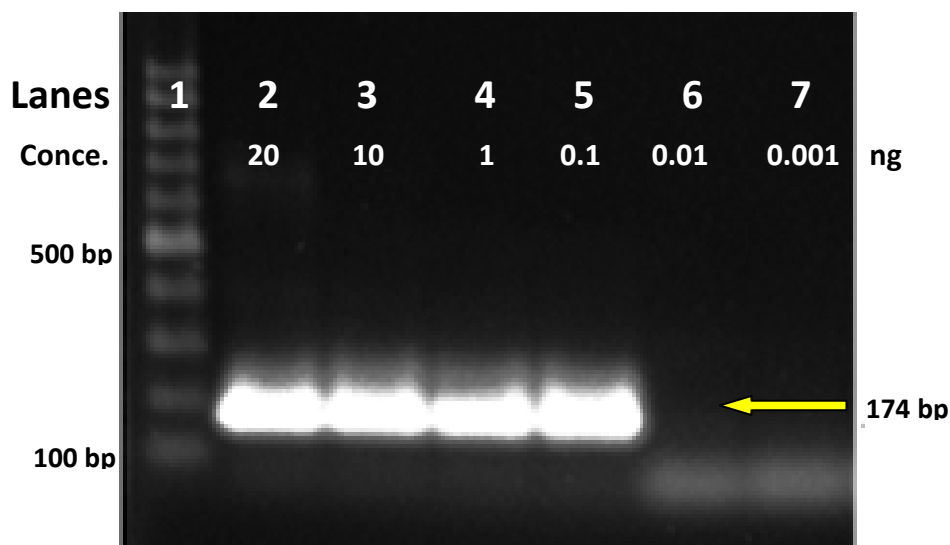
		วิธี TBF		
		positive	negative	total
วิธี PCR	positive	49	4	53
	negative	1	202	203
	total	50	206	256

ตารางที่ 4.13 ผลของการตรวจจำแนกเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือด ด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR เทียบกับวิธีตรวจหาการติดเชื้อมิโครฟิลาเรียผ่านกล้องจุลทรรศน์

		วิธี TBF			
		Brugia	Dirofilaria	negative	total
วิธี PCR	Brugia	30	0	4	34
	Dirofilaria	0	17	0	17
	Brugia & Dirofilaria	0	2	0	2
	negative	1	0	202	203
	total	31	19	206	256

4.5.4 การศึกษา β -Tubulin gene ของพยาธิฟิลาเรียที่แยกได้จากคนและสัตว์

การศึกษา β -tubulin gene บริเวณ exon 5 ครอบคลุมตำแหน่งของ amino acid ที่ 200 ของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *W. bancrofti* สเตรนอ้างอิง (reference strain) ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งพบ homozygous β -tubulin gene ที่แสดงออกถึงความไวต่อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (Pechgit et al, 2011) ดังนั้นตัวอย่างนี้จึงถูกนำมาใช้เป็น positive control ของการศึกษานี้ ตามรูปที่ 4.14 เป็นการศึกษหา detection limit ของเทคนิค PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาปริมาณ DNA ต้นแบบที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบ DNA นั้นได้ พบว่า reference stain *W. bancrofti* มี detection limit อยู่ที่ 0.1 ng/ml ในขณะที่ในรูปที่ 4.15 แสดงผลของ detection limit ของการตรวจหายีน β -tubulin ของเชื้อ *B.malayi* ที่จำแนกได้จากพื้นที่ศึกษา พบว่ามี detection limit อยู่ที่ 0.01 ng/ml

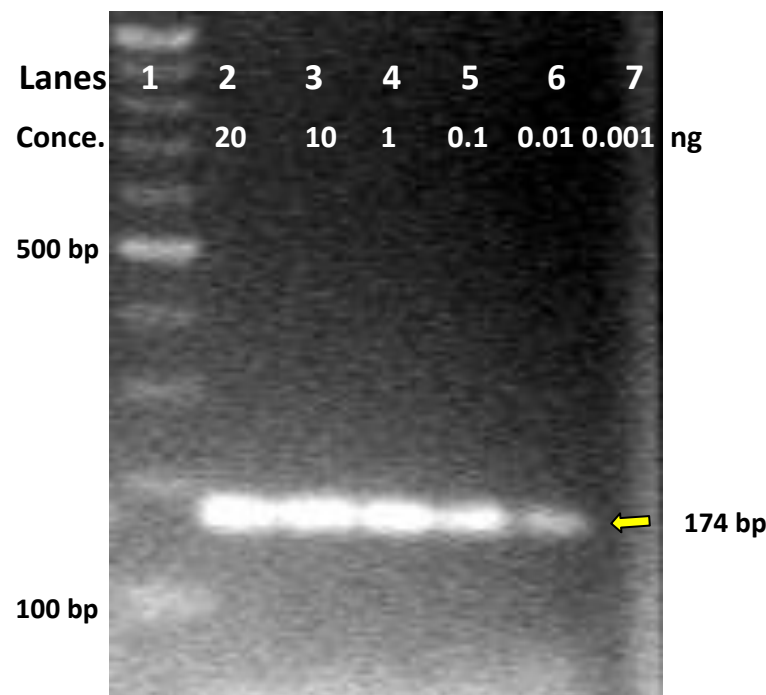


รูปที่ 4.14 Second round PCR ของ *W. bancrofti* β -TUBB gene มีขนาด amplicon size ~174 bp

Lane1: 100 bp marker

Lanes2-7: Serial-diluted (20, 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng) ของ referent strain *W. bancrofti*

DNA. ที่ความเข้มข้นของ gDNA 20 ng/ μ l จะถูกนำไปหา optimization ของวิธี nested PCR

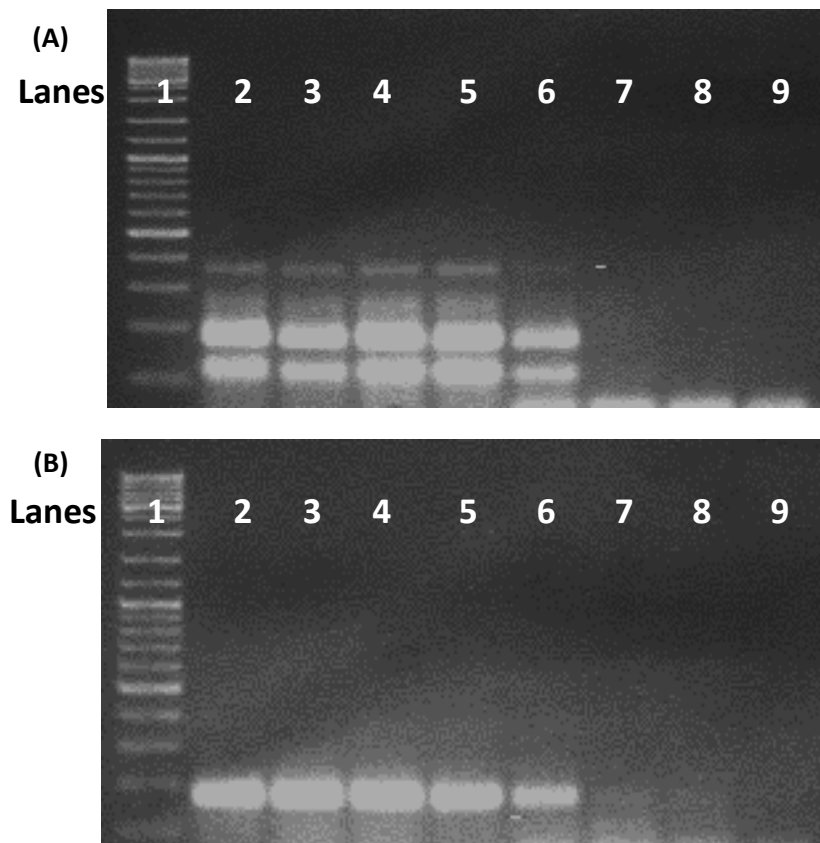


รูปที่ 4.15 Second round PCR ของ *B. malayi* β -TUBB gene มีขนาด amplicon size $\sim$ 174 bp

Lane1: 100 bp marker

Lanes2-7: Serial-diluted (20, 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng) ของ *B. malayi* DNA.

การศึกษายีนดื้อต่อยากกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* โดยใช้วิธี Allele-specific nested multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถใช้จำแนกยีนที่เกิด mutation บริเวณตำแหน่งของ specific allele ที่ amino acid ที่ 200 ของ β -tubulin gene (exon 5) ซึ่งจะเปลี่ยนจาก Phenylalanine (TTC) ไปเป็น Tyrosine (TAC) ได้ ซึ่งผลของ PCR products จะแสดงในรูปแบบที่ 4.15 โดยที่ตัวอย่างที่ใช้จะมีลักษณะการแสดงออกทางฟีโนไทป์แบบ homologous sensitive allele (SS) ซึ่งเป็น wild type จะพบว่าในรูปแบบ A เมื่อ DNA ถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ β -tubulin gene (exon 5) ที่มี specific allele ที่พบ Phenylalanine (TTC) จะได้ PCR products ที่มีขนาด amplicon size 174 bp และ 90 bp ในขณะที่รูป B เป็นตัวอย่างเดียวกันเมื่อนำมาเพิ่มจำนวน DNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ β -tubulin gene (exon 5) ที่มี specific allele ที่พบ Tyrosine (TAC) จะพบว่าไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ยีนในตำแหน่งนี้ขึ้นมาได้ เนื่องจากไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับ DNA ต้นแบบที่มี homologous sensitive allele (SS) ได้จึงทำให้พบ PCR product เพียงแถบ (band) เดียวที่มีขนาด amplicon size 174 bp เท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้ยังสามารถพบ detection limit ของวิธี Allele specific nested multiplex PCR ได้ถึง 0.01 ng/ml อีกด้วย



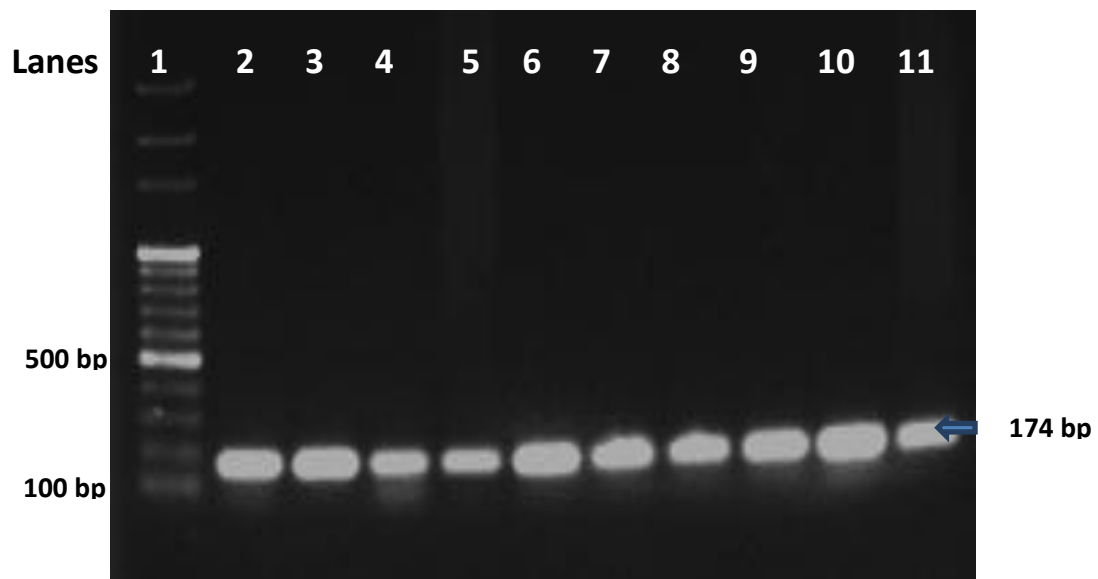
รูปที่ 4.16 Second round PCR products ของ *B. malayi* specific allele β -*TUBB* gene มีขนาด amplicon size ~174 และ 90 bp

Lane1: 100 bp marker

Lanes2-9: Serial-diluted (20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 ng) ของ *B. malayi* DNA

4.5.5. ผลการศึกษา β -*Tubulin* gene ของเชื้อ *B. malayi* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ในพื้นที่ศึกษา

เมื่อนำ gDNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดคน และแมวที่พบเชื้อ *B. malayi* และ *B. pahangi* ใช้เทคนิค nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR 2 รอบคือ BT7/10 และ BT121/122 primers เพื่อศึกษา β -*tubulin* gene ตำแหน่ง exon 5 ครอบคลุมตำแหน่งของ amino acid ที่ 200 ซึ่งเป็น specific allele ที่จำเพาะต่อผลของยากลุ่มเบนซิมิดาโซล ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตัวอย่างจากเชื้อ *B. malayi* ทั้งหมดได้ PCR products มี amplicon size ~174 bp เช่นเดียวกับ positive control ได้แก่ ดีเอ็นเอของเชื้อ *W. bancrofti* และ *D. immitis* ตามรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 Second round PCR ของยีน fialrial β -TUBB ที่ amplicon size ~ 174 bp

Lane1: 100 bp marker

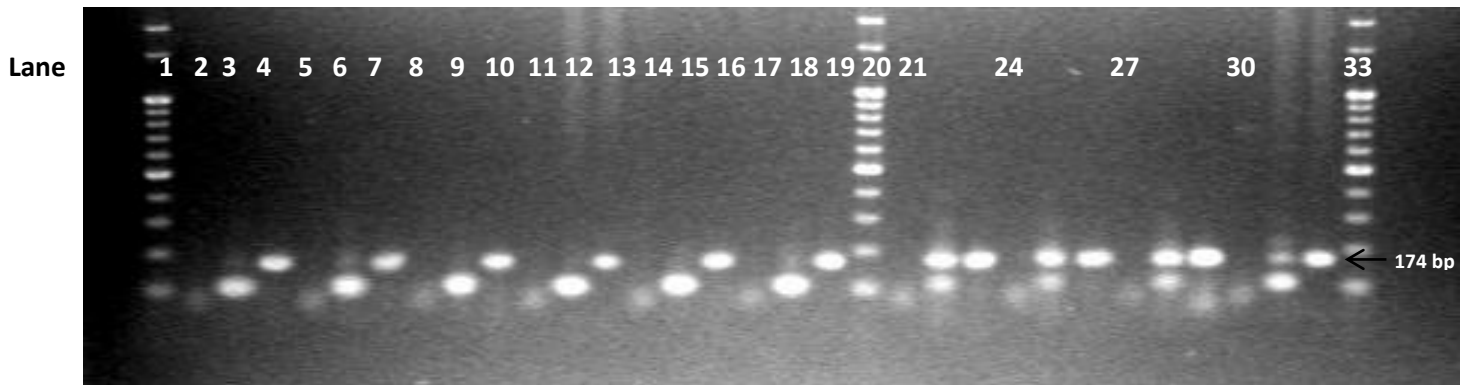
Lanes2-5: *B. malayi* samples from patients (Patient No.: 001, 002, 004, 008)

Lanes6-7: *B. malayi* samples from infected cat (Case No.: 515, 516)

Lanes8-11: Positive control *W. bancrofti* (Patient No.: 110, 120, 130), and *D. immitis* (Case No. 103)

การศึกษาหาชนิดของยีนกลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิ *B. malayi* ที่พบในพื้นที่ศึกษา ด้วยวิธี Allele-specific nested multiplex PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถใช้จำแนกยีนที่เกิด mutation บริเวณตำแหน่งของ amino acid ที่ 200 ของ β -tubulin gene (exon 5) ซึ่งจะเปลี่ยนจาก Phenylalanine (TTC) ไปเป็น Tyrosine (TAC) โดยจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนเฉพาะตำแหน่ง (point mutation) บริเวณ Phe200Try ในทุกตัวอย่างของ *B. malayi* ที่จำแนกได้จากพื้นที่อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส โดยผลของการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.18 ซึ่งเป็นผลของปฏิกิริยา Allele-specific nested multiplex PCR ซึ่ง 1 ตัวอย่างจะแสดงผลใน 3 lanes โดย lane ที่ 1 แสดงผลของ first round PCR ซึ่งมี amplicon size ~ 720 bp ใน lane ที่ 2 แสดงผล second round multiplex PCR ซึ่งถ้าตำแหน่งของ amino acid ที่ 200 ของ β -tubulin gene เป็น Phenylalanine (TTC) จะพบ PCR product จำนวน 2 bands ที่ amplicon size ~ 174 bp และ ~ 90 bp หรือหากเกิด point mutation ของยีนในตำแหน่งนี้จะพบ PCR product ที่ amplicon size ~ 174 bp เท่านั้น ในขณะที่ lane ที่

3 แสดงผล second round multiplex PCR ซึ่งถ้าตำแหน่งของ amino acid ที่ 200 ของ β -tubulin gene เมื่อเกิด point mutation ยื่นตำแหน่งของ amino acid ที่ 200 ของ β -tubulin gene ลักษณะเป็น Phe200Tyr (TTC→TAC) จะได้ผลของ PCR product จำนวน 2 bands ที่ amplicon size ~174 bp และ ~90 bp แสดงผลของการแสดงออกลักษณะการดื้อต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล ในที่นี้ผลการศึกษาที่ปรากฏ พบแต่ homozygous β -tubulin gene ที่มีความไวต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล (SS) ในทุกตัวอย่าง จึงแสดงผลของ PCR produces ที่ปรากฏในรูปแบบเดียวกับผลที่ได้จาก referent strain *W. bancrofti* และ *D. immitis*



รูปที่ 4.18 samples included 3 lanes of products as first round PCR, sensitive allele and resistant allele

Lane1, 20, 33 : 100 bp markers

Lanes2-13: *B. malayi* from patients (Patient No.: 001, 002, 004, 008)

Lanes14-19: *B. malayi* from infected cat (Case No. 515, 516)

Lanes21-32: Positive control *W. bancrofti* (Patient No.: 110, 120, 130) and *D. immitis* (Case No.103)

จากผลของการศึกษา specific allele ของ β -tubulin gene ของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ในพื้นที่ศึกษา ยังคงพบว่าเป็น homozygous β -tubulin gene ที่แสดงลักษณะมีความไวต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลนั้นสามารถยืนยันผลได้จากผลของ DNA sequences ของ β -tubulin gene ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งพบ Phenylalanine (TTC) ที่ตำแหน่งของ amino acid ที่ 200 ดังแสดงในภาพที่ 4.18 นอกจากนี้ยังพบว่ามี base substitution เกิดขึ้นในตัวอย่าง case No. BT 004 (*B. malayi* ที่

แยกได้จากเลือดคน) ที่ตำแหน่งของ PCR product ที่ 129 ซึ่งยีนของ wild type พบเบส C ซึ่งในตัวอย่าง จะพบถูกแทนที่ด้วย T

BT515	TTGGAACCCCTACAATGCAACATTATCAGTCCACCAACTAGTTGAAAACACTGACGAAACT	60
AY705382	-----	60
BT001	-----	60
BT004	-----	60
BT002	-----	60
BT008	-----	60
BRQD553TR	-----	60
M36380	-----	60
BT516	-----	60

	Phe200Tyr	
BT515	TTCTGCGATTGATAACGAGGCTTTGTATGACATCTGCTTCCGAACGTTGAAGTTGGCAAAT	120
AY705382	-----	120
BT001	-----	120
BT004	-----	120
BT002	-----	120
BT008	-----	120
BRQD553TR	-----	120
M36380	-----	120
BT516	-----	120

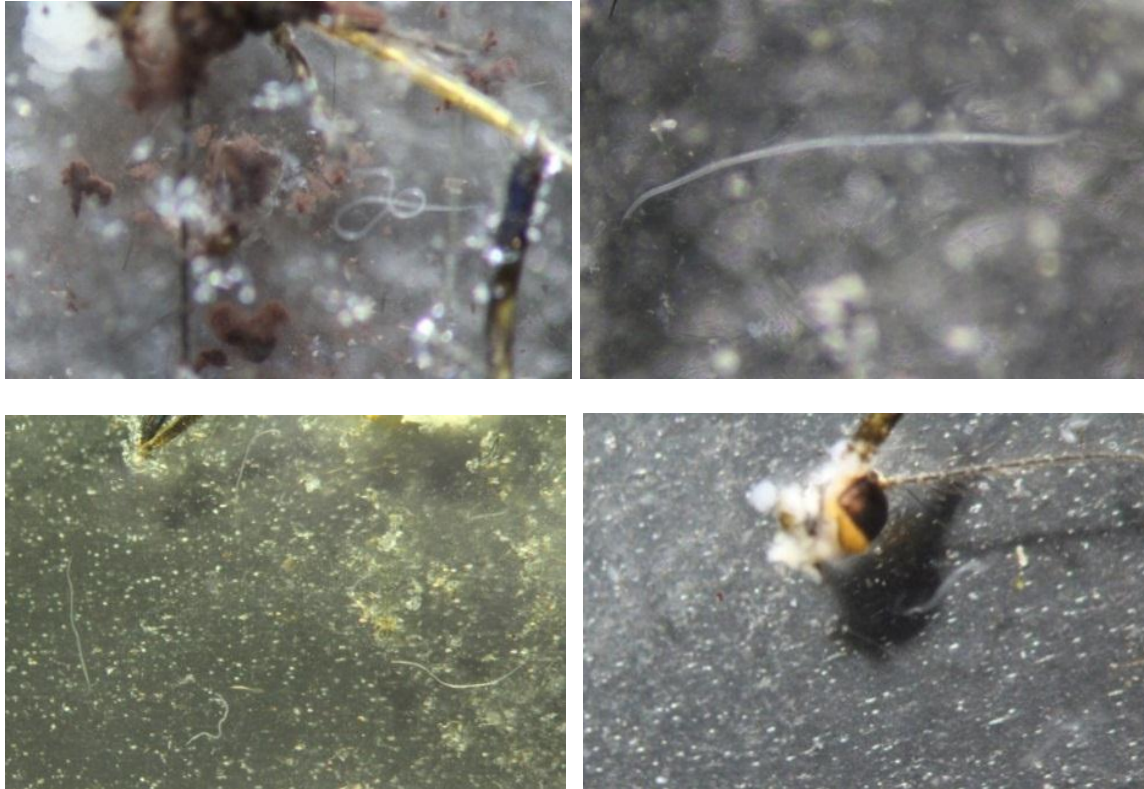
BT515	CCAACCTTACGG	131
AY705382	-----	131
BT001	-----	131
BT004	-----T--	131
BT002	-----	131
BT008	-----	131
BRQD553TR	-----	131
M36380	-----	131
BT516	-----	131
***** **		

รูปที่ 4.19 *Brugia* β -TUBB gene alignment. The partial nucleotide sequence of representatives (accession no.): *Brugia malayi* (AY705382 and BRQD553TR), *Brugia pahangi* (M36380). This gene region is shown the primers-unprimed nucleotide bases without primers. An amino acid substitutions at positions Phe200Tyr (gray boxes) retained in DNA fragment could be identified.

4.5.6 การศึกษาพยาธิไมโครฟิลาเรียซึ่งแยกได้จากยุงพาหะ

การศึกษาเบื้องต้น เพื่อหาขั้นตอนที่จะใช้ในการศึกษาการจำแนกชนิดของตัวอ่อนพยาธิ (larvae) ที่จำแนกได้จากยุง และการหาอัลลีลของยีน β -tubulin gene ที่จำเพาะต่อความไวของยากุ่มเบนซิมิดาโซล ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ยุง *Armigeres spp.* ซึ่งพบมีการติดเชื้อตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ เมื่อทำการผ่ายุงเพื่อหาตัวอ่อนพยาธิ โดยผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ พบว่า

สามารถแยกตัวอ่อนพยาธิได้จากทั้งในส่วนท้อง ออก และปากของยุง ดังแสดงในรูปที่ 4.20 จึงทำการเก็บแยกตัวอ่อนพยาธิแต่ละตัว และทำการศึกษาทางชีวโมเลกุลในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.20 ตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรีย (larva) ที่แยกได้จากยุง โดยการผ่า (dissection) ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอ

ในการจำแนกชนิดของ larva ที่ได้จากยุงด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR สามารถจำแนกชนิดของ larva ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ *Brugia* spp., *Dirofilaria* spp. และ พยาธิ Filaridei อื่นๆ เมื่อศึกษา ยีน β -tubulin gene โดยวิธี Nested PCR ใช้ไพรเมอร์เดียวกับการศึกษา ยีน β -tubulin gene จากตัวอย่างไมโครฟิลาเรียที่อยู่ในเลือด ทำให้ได้ PCR products ดังรูปที่ 4.21 เมื่อนำ PCR product ที่ได้ไปศึกษาลำดับเบส พบว่าตำแหน่งของอัลลีสที่จำเพาะต่อยากลุ่ม Benzimidazole ยังคงพบยีนที่แสดงออกของลักษณะที่มีความจำเพาะต่อความไวต่อยาเบนซิมิดาโซล ซึ่งยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่จะทำให้เกิดลักษณะการดื้อยาเกิดขึ้น



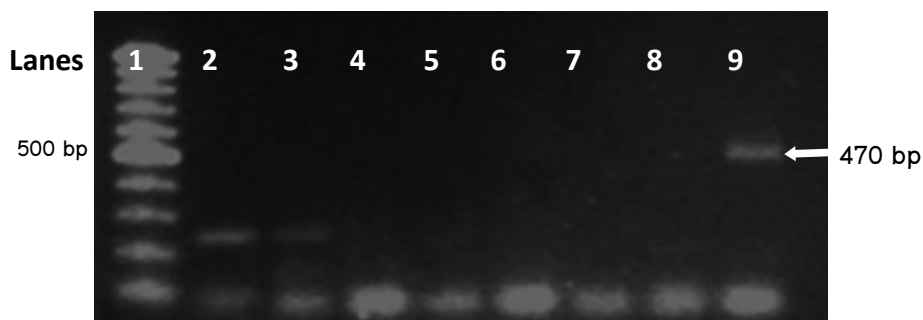
รูปที่ 4.21 Second round PCR products of L3 β -TUBB gene with amplicon size $\sim$ 174 bp

Lane1: 100 bp marker

Lanes2-7: L3 sample from mosquito

Lanes8-9: Positive control *B.malayi* and *D. immitis*

การศึกษาการกระจายของเชื้อพยาธิฟิลาเรียที่พบในยุง *Mansinia* spp. ซึ่งการเก็บตัวอย่างยุงในพื้นที่ศึกษาทั้งหมดสามารถจำแนกชนิดของยุงออกได้เป็นชนิด *Ma. bonneae*, *Ma. uniformis*, *Ma. dives*, *Ma. annulata* และ *Ma. Indiana* โดยการผ่ายุงเพื่อหาตัวอ่อนไมโครฟิลาเรียที่อยู่บริเวณทางเดินอาหารตั้งแต่ต่อมน้ำลายซึ่งอยู่ในบริเวณส่วนหัวของยุงจนถึงในกระเพาะอาหารซึ่งอยู่ในส่วนท้อง ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบตัวอ่อนของพยาธิในตัวอย่างยุงที่เก็บได้จากพื้นที่ศึกษาเลย ซึ่งเมื่อนำยุงตัวอย่างอีกครั้งหนึ่งมาตรวจหาการติดพยาธิฟิลาเรียด้วยวิธี PCR พบว่าตัวอย่างทั้งหมดให้ผลเป็นลบต่อการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียเช่นกัน



รูปที่ 4.22 PCR products ของ rDNA locus-specific PCR โดยใช้ gDNA ที่สกัดจากยุงเสืง *Mansonia* spp. ที่ได้จากพื้นที่ศึกษา ซึ่งพบว่าทุกตัวอย่างไม่พบ band ที่มีความจำเพาะต่อ DNA ของเชื้อฟิลาเรีย

Lane1: 100 bp marker

Lanes2-8: mosquito DNA จากตัวอย่างยุง

Lanes8-9: Positive control *B.malayi*

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธี Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อใช้ในการศึกษา β -tubulin gene isotype 1 ของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ที่ตำแหน่ง specific allele ซึ่งมีความจำเพาะและเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาในกลุ่มเบนซิมิดาโซล และสามารถนำวิธี Allele-specific nested multiplex PCR นี้ ไปประยุกต์ใช้ในการเฝ้าติดตามการเกิดเชื้อดื้อยา ของพยาธิฟิลาเรียในพื้นที่ซึ่งมีการใช้ยาติดต่อกันมาเป็นเวลานาน อีกทั้งยังเป็นเครื่องมือในการประเมินโครงการการจ่ายยา (MDA) ในพื้นที่แพร่โรคของประเทศ

จากการสำรวจการแพร่กระจายของเชื้อไมโครฟิลาเรียในคน สัตว์รังโรคและยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ได้ดำเนินการไปใน 2 พื้นที่ ได้แก่ พื้นที่ตำบลประสงค์ อำเภอนะ จังหัดสุราษฎร์ธานี เป็น การศึกษานำร่องโดยการสำรวจความชุกของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในสัตว์เลี้ยงได้แก่แมวและสุนัข และการพบตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในยุงเสื่อ *Mansonia* spp. และการศึกษาในพื้นที่อำเภอดาบกอบ จังหวัด นราธิวาส เพื่อสำรวจความชุกของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในคน และแมว และการ พบตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในยุงเสื่อ *Mansonia* spp. นอกจากนี้ยังศึกษาความไวต่อยาถ่ายพยาธิใน กลุ่มเบนซิมิดาโซล ของเชื้อไมโครฟิลาเรียที่จำแนกได้จากพื้นที่ศึกษา

ในพื้นที่ตำบลประสงค์ อำเภอนะ จังหัดสุราษฎร์ธานี ทำการสำรวจทั้งหมด 4 หมู่บ้าน ได้แก่ หมู่ 3 บ้านน้ำดำ, หมู่ 11 บ้านพรุเรือน, หมู่ 12 บ้านเขาแก้ว และ หมู่ 22 บ้านห้วยเคียน โดยการเก็บ ตัวอย่างเลือดในแมวและสุนัขเพื่อตรวจหาการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด โดยวิธีการ rDNA locus-specific PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้เพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือด พบแมวที่ ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียจำนวน 23 ตัว จากตัวอย่างแมวที่สำรวจทั้งหมด 138 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการ ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมว 16.7% เมื่อจำแนกชนิดของการติดเชื้อ พบว่า แมวที่ติดเชื้อไมโครฟิ ลารียชนิด *Brugia* spp. จำนวน 22 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. 15.9% ในขณะที่ แมวที่ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 1 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการ ติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย ชนิด *Dirofilaria* spp. 0.7% การกระจายของเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด

สุนัขพบว่า สุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียจำนวน 18 ตัว จากจำนวนสุนัขที่สำรวจทั้งหมดจำนวน 30 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียในสุนัข 60% เมื่อจำแนกชนิดของการติดเชื้อ พบว่า สุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. จำนวน 10 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. 33.3% และพบสุนัขที่ติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. จำนวน 6 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. 20% นอกจากนี้ ยังพบว่า สุนัขที่มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. จำนวน 2 ตัว หรือคิดเป็นอัตราการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. 6.7%

การจำแนกชนิดของเชื้อไมโครพลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR และศึกษา DNA sequences สามารถยืนยันชนิดของเชื้อไมโครพลาเรียที่พบในพื้นที่ตำบลประสงค์ทั้งหมดมี 2 ชนิดได้แก่ เชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* และ *D. immitis*

การศึกษากระจายของเชื้อไมโครพลาเรียในสัตว์เลี้ยง ในเชิงพื้นที่ของทั้ง 4 หมู่บ้านในตำบลประสงค์ พบว่าบ้านที่มีสัตว์เลี้ยงติดเชื้อไมโครพลาเรียส่วนใหญ่จะอยู่ในพื้นที่หมู่ 11 ซึ่งพบอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียในเชิงพื้นที่คิดเป็น 48.2% ในขณะที่หมู่ 12, หมู่ 22 และหมู่ 3 มีอัตราการติดเชื้อไมโครพลาเรียของสัตว์เลี้ยงในเชิงพื้นที่คิดเป็น 25%, 18.2% และ 13% ตามลำดับ

การศึกษาชีวสัณยวิทยาในการออกหากินเลือด (feeding habit) ในพื้นที่ตำบลประสงค์ พบยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ออกหากินหรือเป็นช่วงที่มีความหนาแน่นสูงสุด (peak hour) ในช่วง 19.00–20.00 น. ในการศึกษาจึงปรับช่วงเวลาการจับยุงให้เหมาะสมกับช่วงเวลาออกหากินของยุงเสื่อ *Mansonia* spp. คือช่วงระหว่าง 18.00–21.00 น. การสำรวจการกระจายของยุงครั้งที่ 1 ในช่วงเดือนพฤษภาคม ดำเนินการสำรวจทั้ง 4 หมู่บ้านของตำบลประสงค์ โดยการสำรวจยุงตัวเมียด้วยวิธี ใช้วิธีคนเป็นเหยื่อล่อ (human-landing catch) ชนิดของยุงที่พบได้สูงสุด ได้แก่ยุง *Ae. Albopictus* และ *Ar. Suballbatus* และพบยุงพาหะโรคเท้าช้างในพื้นที่หมู่ 11 ได้แก่ยุง *Ma. Uniformis* และในพื้นที่หมู่ 12 ได้แก่ยุง *Ma. Uniformis* และยุง *Mn. Indiana* เมื่อดำเนินการสำรวจครั้งที่ 2 ในช่วงเดือนสิงหาคม เฉพาะในพื้นที่หมู่ 11 พบการกระจายของยุง *Mansonia* spp. เพิ่มขึ้น ชนิดของยุง *Mansonia* spp. ที่พบได้แก่ *Ma. Uniformis*, *Mn. Indiana* และ *Ma. Bonneae*

การสำรวจการแพร่กระจายของพยาธิไมโครฟิลาเรียในคน แมวและยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ในพื้นที่เป้าหมายของการศึกษาในอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส จากการติดตามผู้ป่วยติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ที่ได้รับการฉายยาในปี 2556 จากสาธารณสุขอำเภอตากใบ มีจำนวนทั้งหมด 18 ราย โดยการเจาะเลือดที่ปลายนิ้วเพื่อตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยวิธี Micro haematocrit tube technique และวิธีฟิล์มโลหิตหนาและย้อมด้วย Wright-Geimsa stain พบผู้ที่ยังคงติดเชื้อไมโครฟิลาเรียจำนวน 4 ราย และมีการยืนยันชนิดของเชื้อด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR การศึกษา DNA sequence พบเชื้อไมโครฟิลาเรียทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นชนิด *B. malayi* ขณะที่การสำรวจหาผู้ที่ติดเชื้อใหม่ในพื้นที่แพร่ระบาดของโรคและมีการฉายยาป้องกันโรคเท้าช้างในโครงการฉายยารักษาภูมิ (MDA) ครอบคลุมพื้นที่น้อยกว่า 90% โดยเลือกสำรวจในกลุ่มประชากรในพื้นที่หมู่ 1 บางขุนทอง หมู่ 3 บ้านโคกงู และหมู่ 5 บ้านโคกซุมบก ตำบลบางขุนทอง และหมู่ 2 บ้านโคกไผ่ ตำบลพร่อน อำเภอตากใบ เก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรทั้งหมด 1,046 คน ไม่พบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในทุกตัวอย่างเลือดที่เก็บมา

การสำรวจการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมวที่อาศัยในพื้นที่อำเภอตากใบ ใช้พื้นที่ในการสำรวจเป็นที่เดียวกับที่มีการสำรวจการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในคน พบอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. 2.6% และอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Dirofilaria* spp. 9.2% การจำแนกชนิดของเชื้อไมโครฟิลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR และศึกษา DNA sequences สามารถยืนยันชนิดของเชื้อไมโครฟิลาเรียที่จำแนกได้จากแมวในพื้นที่อำเภอตากใบ ได้ 2 ชนิดได้แก่เชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. pahangi* และ *D. immitis*

การศึกษาชีวนิสัยยุง *Mansonia* spp. ในการออกหากินเลือด (feeding habit) ในพื้นที่อำเภอตากใบ ได้ดำเนินการ 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 สำรวจในช่วงเดือนสิงหาคม 2556 ครั้งที่ 2 ในช่วงเดือนมีนาคม 2557 และครั้งที่ 3 ช่วงเดือนสิงหาคม 2557 โดยการสำรวจยุงตัวเต็มวัยเพศเมียของยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ในการสำรวจครั้งแรกช่วงฤดูฝน ชนิดของยุงที่พบได้แก่ *Ma. bonneae*, *Ma. uniformis*, *Ma. annulata* และ *Ma. Indiana* มีค่าเฉลี่ย Man biting rate 7.38 ครั้ง/ชั่วโมง ครั้งที่ 2 ดำเนินการสำรวจในช่วงฤดูแล้ง ชนิดของยุงที่พบได้แก่ *Ma. bonneae*, *Ma. uniformis*, *Ma. dives*, *Ma. annulata* และ *Ma. Indiana* มีค่าเฉลี่ย Man biting rate 3.59 ครั้ง/ชั่วโมง และครั้งที่ 3 ดำเนินการสำรวจในช่วงฤดูฝน ชนิด

ของยุงที่พบได้แก่ *Ma. bonneae*, *Ma. uniformis*, *Ma. dives*, *Ma. annulata* และ *Ma. Indiana* มีค่าเฉลี่ย Man biting rate 0.8 ครั้ง/ชั่วโมง

การศึกษาการติดตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรีย (larvae) ในยุงโดยการผ่าดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (dissection) แยกเพื่อหาตัวอ่อนพยาธิในระยะต่างๆ และตรวจวิเคราะห์หาตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียด้วยวิธี rDNA locus-specific PCR ใน mosquito pool ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการติดตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในยุงเลื้อย *Mansonia* spp. ที่เก็บได้จากพื้นที่ศึกษา

การติดตามการติดยากลุ่มเบนซิมิดาโซลของพยาธิฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ที่พบในพื้นที่อำเภอตากใบ ด้วยวิธี Allele-specific nested multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ พบว่าทุกตัวอย่างของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ที่จำแนกได้จากพื้นที่ศึกษา ซึ่งประกอบด้วยเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ที่จำแนกได้จากตัวอย่างเลือดคน และเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. pahangi* ที่จำแนกได้จากตัวอย่างเลือดแมว ยังคงพบ homologous sensitive allele (SS) ของยีน β -tubulin gene isotype 1 ซึ่งแสดงออกในลักษณะของเชื้อไมโครฟิลาเรียที่มีความไวต่อยากลุ่มเบนซิมิดาโซล

การสำรวจการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในคนในพื้นที่อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส ซึ่งเป็นพื้นที่เป้าหมายในการศึกษานี้ โดยกำหนดจากพื้นที่ซึ่งเคยเป็นพื้นที่แพร่โรคและมีความครอบคลุมการจ่ายยารักษา (MDA coverage) ด้วยยา DEC ร่วมกับ Albendazole น้อยกว่า 90% ผลจากการสำรวจไม่พบผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียเลยในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 1,046 คนที่ทำการสำรวจ ซึ่งเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของโครงการกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศไทย (PELF) ด้วยการจ่ายยารักษา (MDA) ติดต่อกันทุกปี ซึ่งได้ดำเนินการมาตั้งแต่ปี 2545 โดยจังหวัดนราธิวาสเป็นเพียงจังหวัดเดียวของประเทศไทยที่มีการดำเนินโครงการจ่ายยากลุ่มติดต่อกันถึง 2 รอบ คือในปี 2545-2559 และ 2550-2554 เนื่องจากหลังสิ้นสุดโครงการรอบแรกในปี 2559 แล้วยังคงพบผู้ติดเชือรายใหม่อยู่

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ แม้ว่าจะไม่พบผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* รายใหม่ แต่ก็ยังคงพบผู้ที่ยังคงติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ถึง 4 ราย ในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ที่ขึ้นทะเบียนการจ่ายยากับสาธารณสุขอำเภอตากใบในปี 2556 จากการสอบสวนโรคผู้ป่วยทั้ง 4 รายพบว่าผู้ป่วย 1 รายเป็นเพศหญิง ได้รับยาติดต่อกันอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 10 ปี

และเป็นผู้ที่ไม่เคยเดินทางออกจากพื้นที่เลย ซึ่งอาจเป็นข้อสันนิษฐานได้ว่าน่าจะมีเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* อยู่ในพื้นที่ หรือเชื้อ *B. malayi* ที่พบอาจมีความทนต่อยา Diethylcarbamazine ร่วมกับ Albendazole ที่ใช้ในการรักษา เมื่อตรวจพิสูจน์การติดของเชื้อไมโครฟิลาเรียที่จำแนกได้จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยรายนี้ ด้วยวิธี Allele-specific nested multiplex PCR เพื่อยืนยันการพบยีนดื้อยากลุ่มเบนซิ มิตาโซล จาก DNA sequence ของ β -tubulin gene ของเชื้อไมโครฟิลาเรียที่จำแนกได้จากผู้ป่วยรายนี้ ยังคงพบ homologous sensitive allele (SS) ของยีน β -tubulin gene isotype 1 ซึ่งแสดงออกในลักษณะของเชื้อไมโครฟิลาเรียที่มีความไวต่อยากลุ่มเบนซิ มิตาโซล ส่วนผู้ป่วยอีก 3 รายเป็นผู้ป่วยที่ได้รับยาติดต่อกันอย่างไม่สม่ำเสมอ และมีการเดินทางออกไปพักค้างนอกพื้นที่ โดยเฉพาะมีการเดินทางไปยังพื้นที่อำเภอเจาะไอร้องเป็นประจำ ซึ่งอำเภอเจาะไอร้องเป็นพื้นที่แพร่โรคซึ่งพบผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียเนื่องจากเป็นพื้นที่เสี่ยงจากปัญหาความไม่สงบใน 3 จังหวัดภาคใต้ ซึ่งเป็นเหตุให้การดำเนินโครงการกำจัดโรคเท้าช้างมีความครอบคลุมการจ่ายยารักษา (MDA coverage) ต่ำ จึงมีความเป็นไปได้ที่ผู้ป่วยที่ยังคงพบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียอยู่ อาจมีการติดเชื้อครั้งใหม่จากพื้นที่อำเภอเจาะไอร้องได้

การสำรวจการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในสัตว์เลี้ยงในพื้นที่อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส ใน การศึกษานี้ดำเนินการสำรวจการติดเชื้อเฉพาะในแมวเนื่องจากพื้นที่ศึกษาประชากรส่วนใหญ่เป็นชาวมุสลิม จึงทำให้พบสุนัขในหมู่บ้านเป็นจำนวนน้อยมาก โดยกำหนดพื้นที่ศึกษาตามการสำรวจหาการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในคน พบอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *B. pahangi* 2.6% ในขณะที่พบอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิด *D. immitis* 9.2% ซึ่งอัตราการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมวนี้น่าจะแตกต่างกับพื้นที่ จังหวัดสุราษฎร์ธานีอย่างเห็นได้ชัด จังหวัดนราธิวาสเป็นพื้นที่ในโครงการจ่ายยา (MDA) มีการจ่ายยาให้คนในพื้นที่ติดต่อกันเป็นเวลา 10 ปี (พ.ศ. 2545–2549, พ.ศ. 2550–2554) ผลของโครงการน่าจะตัดวงจรการติดต่อของเชื้อไมโครฟิลาเรียโดยเฉพาะไมโครฟิลาเรียในกลุ่ม *Brugia* spp. ลงได้ นอกจากนี้ยังมีการให้ยาไอเวอร์แม็กติน (Ivermectin) แก่แมวด้วย แม้ว่าการให้ยากับแมวจะเป็นไปอย่างสม่ำเสมอก็ตาม ก็ยังคงส่งผลให้สามารถลดการกระจายของเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมวในพื้นที่ได้

จากข้อมูลการกระจายของพยาธิไมโครฟิลาเรียในสัตว์เลี้ยง ในพื้นที่ตำบลประสงค์ อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบการติดพยาธิไมโครฟิลาเรียในแมวทั้งหมด 16.7% ในสุนัขพบ 33.3% ซึ่งในการศึกษาการกระจายของพยาธิไมโครฟิลาเรียในหลายพื้นที่อื่นๆ พบการติดเชื้อในสุนัขมากกว่าใน

แมวเช่นเดียวกัน (Boonyapakorn et al., 2008) ในการศึกษาพบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในแมวเป็นชนิด *Brugia* spp. 15.9% และ *Dirofilaria* spp. 0.7% และการติดเชื้อในสุนัขพบเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *Brugia* spp. 40% และ *Dirofilaria* spp. 26.7% และยังพบสุนัขที่มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อ *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. อีกด้วย จากการจำแนกชนิดของเชื้อไมโครพลาเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลพบว่าสามารถจำแนกเชื้อไมโครพลาเรียได้เป็น *B. pahangi* และ *D. immitis* ซึ่งการพบเชื้อไมโครพลาเรียในสัตว์เลี้ยงทั้ง 2 ชนิดนี้สอดคล้องกับการศึกษาการสำรวจหาการติดพยาธิไมโครพลาเรียในแมวที่อำเภอพระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ในปี 2002 ซึ่งพบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในแมว 9.5% จำแนกเป็นการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* 7.6% และเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *D. immitis* 1.9% และไม่พบการติดพยาธิเชื้อไมโครพลาเรีย ชนิด *B. malayi* ในแมวเลย (Nuchprayoon et al, 2006) โดยทั่วไปสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค (reservoir) ของพยาธิ *B. malayi* ได้แก่ลิง (*Presbytis* spp.) และแมว แต่ในสัตว์เลี้ยงได้แก่แมวและสุนัขก็สามารถเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ *B. malayi* (human strain) ได้ (Phantana et al, 1987; Mak et al. 1990) ความชุกของการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. malayi* น่าจะมีความสัมพันธ์กับความชุกของการเกิดโรคในคนและการแพร่กระจายของตัวอ่อนพยาธิในยุงที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน ซึ่งในพื้นที่ตำบลประจักษ์นี้แม้ว่าเป็นพื้นที่ซึ่งเคยพบการแพร่ระบาดของโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ในคน แต่ในปัจจุบันไม่พบผู้ที่ติดเชื้อใหม่เลยหลังจากสิ้นสุดโครงการจ่ายยาครอบคลุมพื้นที่ (MDA) ในปี 2549 เป็นต้นมา

พยาธิ *B. pahangi* เป็นเชื้อพลาเรียในกลุ่ม *Brugia* spp. ที่พบการกระจายของเชื้อในโฮสต์จำพวกแมวและสุนัขในประเทศไทย และพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Nithiuthai et al, 1992; Chungpivat et al, 1990; 1993) การศึกษาเพื่อหาความชุกของเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* ในแมวพบสูงถึง 25 % ในพื้นที่กรุงเทพมหานคร (Chungpivat et al, 1993) โดยการพบการติดเชื้อไมโครพลาเรียมีความสัมพันธ์กับยุงพาหะของเชื้อ ซึ่งพบว่าทั้งยุง *Aedes* spp. และ *Mansonia* spp. มีความสามารถในการแพร่กระจายตัวอ่อนของเชื้อ *Brugia* spp. ได้ดี และเป็นยุงที่กินทั้งเลือดคนและเลือดสัตว์เป็นอาหาร ในการศึกษาครั้งนี้พบความชุกของการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* ในพื้นที่ศึกษาค่อนข้างสูงทั้งในแมวและสุนัข ซึ่งสูงกว่าความชุกของการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *D. immitis* ซึ่งผลการศึกษาจะตรงกันข้ามกับพื้นที่อื่นๆ ของประเทศไทยที่พบว่าสุนัขมีอัตราความชุกของการติดเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *D. immitis* มากกว่าเชื้อไมโครพลาเรียชนิด *B. pahangi* (Boonyapakorn et al., 2008) ความชุกของการติดเชื้อพลาเรียที่พบน่าจะมีความสัมพันธ์กับยุงพาหะของเชื้อ พบว่า

ลักษณะการติดและพัฒนาตัวอ่อนเชื้อฟิลาเรียในยุง *Ar. suballbatus* จะแตกต่างจากยุงชนิดอื่นๆ ยุง *Ar. suballbatus* เป็นยุงที่มีความไวรับต่อเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. pahangi* สูง อีกทั้งยังสามารถพัฒนาของตัวอ่อนระยะ L1 ไปสู่ตัวอ่อนระยะ L3 ที่กระเพาะอาหารส่วนกลาง (midgut) ของยุงได้ง่ายกว่าตัวอ่อนระยะ L1 ของเชื้อไมโครฟิลาเรียชนิดอื่นๆ (Muslim et al., 2013) ในขณะที่ไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* จะถูกทำลายใน haemocoel ของยุง *Ar. suballbatus* โดยขบวนการ melanotic encapsulation (Yamamoto et al., 1985, Beerntsen et al., 1989)

ผลการศึกษาความชุกของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียตามพื้นที่ พบการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. มากในพื้นที่หมู่ 11 ซึ่งลักษณะทั่วไปในพื้นที่หมู่ 11 ยังคงเป็นพื้นที่ป่าพรุและมีพื้นที่บางส่วนถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสวนยาง สวนปาล์ม และสวนผลไม้ ในขณะที่พื้นที่หมู่ 3, 12 และ 22 เป็นพื้นที่ติดถนนหลักของอำเภอท่าชนะ เป็นลักษณะชุมชนที่มีที่ตั้งของบ้านเรือน ด้วยสภาพนิเวศน์ของพื้นที่ซึ่งมีความเปลี่ยนแปลงไปตามการใช้ประโยชน์จากพื้นที่ จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแหล่งเพาะพันธุ์ยุงซึ่งมีต่อการพบจำนวนของยุงด้วย

การศึกษากการกระจายของยุงเสื่อ *Mansonia* spp. ในพื้นที่แพร่โรค จากการศึกษานำร่องในพื้นที่ตำบลประสงค์โดยกำหนดจุดจับยุง 4 จุดตามบ้านที่พบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมวทั้ง 4 หมู่บ้านที่ดำเนินการสำรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรีย จากผลการศึกษาครั้งนี้นำมาปรับวิธีการเก็บยุงตัวอย่าง โดยอาศัยข้อมูลการกระจายของยุงพาหะของโรคในเชิงพื้นที่ (spatial distribution) และในเชิงของเวลา (temporary distribution) และทดลองเก็บยุงในจุดจับยุงที่กำหนดขึ้นใหม่ในพื้นที่หมู่ 11 พบว่าสามารถพบการกระจายของยุง *Mansonia* spp. จำนวนมากขึ้น จึงนำหลักการในการกำหนดจุดจำยุงนี้ไปใช้ในการเก็บยุง *Mansonia* spp. ที่อำเภอตากใบ

ยุง *Mansonia* spp. ที่พบในพื้นที่ศึกษาอำเภอตากใบ ได้แก่ *Ma. uniformis*, *Ma. unnulata*, *Ma. bonneae*, *Ma. indiana* และ *Ma. dives* ในการเก็บตัวอย่างยุงครั้งแรก ยุงที่พบได้มาได้แก่ยุงชนิด *Ma. uniformis* *Ma. annulata* และ *Ma. bonneae* ขณะที่การเก็บตัวอย่างยุงครั้งที่ 2 และ 3 ยุงที่พบได้มาได้แก่ยุง *Ma. Uniformis* และ *Ma. bonneae* ในขณะที่ยุง *Ma. dives* มีโอกาสพบน้อยมาก ยุง *Mansonia* spp. เป็นยุงที่มีแหล่งเพาะพันธุ์บริเวณที่เป็นป่าพรุ โดยยุง *Ma. Uniformis* และ *Ma. bonneae* มักจะชอบวางไข่บริเวณที่มีพืชน้ำเล็ก เช่นต้นจอก และผักตบชวา ในขณะที่แหล่งเพาะพันธุ์ของยุง *Ma. dives* จะอยู่ตามรากขนอ่อนของต้นไม้ที่ขึ้นอยู่ชายน้ำ (Muslim et al, 2013) ดังนั้นสภาพแวดล้อมในพื้นที่ศึกษา

จึงเป็นปัจจัยเอื้อต่อการแพร่พันธุ์ของยุง *Ma. Uniformis* และ *Ma. bonneae* มากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาแล้วยังพบว่ามียุง *Ar. Suballbatus* ในจำนวนที่สูงเช่นกัน เนื่องจากยุงชนิดนี้มีแหล่งเพาะพันธุ์ ที่มีลักษณะเป็นแหล่งน้ำเสียมีคุณภาพต่ำ และอยู่ในแหล่งอาศัยของคน (Yamamoto et al, 1985) และยังสามารถแยกตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp. ได้จากยุง *Ar. Suballbatus* ซึ่งผลการศึกษา สอดคล้องและชี้ให้เห็นว่ายุง *Ar. Suballbatus* เป็นยุงพาหะสำคัญของเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. pahangi*

นอกจากปัจจัยเรื่องแหล่งเพาะพันธุ์ยุง (breeding site) ที่มีผลต่อการพบยุงพาหะของโรคแล้วยังพบว่าความชื้นและอุณหภูมิก็เป็นปัจจัยที่สำคัญในการแพร่กระจายของยุง โดยจากการเก็บตัวอย่างยุงในพื้นที่ 3 ครั้ง ครั้งแรกทำในฤดูฝน (เดือนสิงหาคม) พบค่าเฉลี่ย Man biting rate 7.38 ครั้ง/ชั่วโมง ในขณะที่การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ทำในฤดูแล้ง (เดือนมีนาคม) จะพบค่าเฉลี่ย Man biting rate 3.59 ครั้ง/ชั่วโมง ซึ่งลดลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างยุงครั้งที่ 3 แม้ว่าจะเก็บในฤดูฝน (เดือนสิงหาคม) แต่ในช่วงที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างยุงนั้น มีฝนตกติดต่อกันทุกวัน จึงทำให้พบจำนวนยุงที่เก็บได้ลดลง จึงพบค่าเฉลี่ยของ Man biting rate เพียง 0.81 ครั้ง/ชั่วโมง เท่านั้น จากการศึกษาของ Sassnau และคณะ (2014) พบว่าอุณหภูมิส่งผลถึงการพัฒนาตัวอ่อนพยาธิในตัวยุงด้วย โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อไมโครฟิลาเรียจะพัฒนาไปเป็น L3 ในตัวยุงใช้เวลาประมาณ 8-13 วัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของยุง และจะใช้เวลาในการพัฒนาตัวอ่อนนานขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลง

การเฝ้าระวังหลังหยุดการจ่ายยารักษาในกลุ่มในพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างบรูเกีย ตามโปรแกรมกำจัดโรคเท้าช้างของประเทศไทย (Thai PELF) เริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ในช่วงหลังระยะสิ้นสุดการดำเนินโปรแกรมกำจัดโรคเท้าช้างบรูเกีย และทำการประเมินเพื่อพิจารณาหยุดการจ่ายยารักษา กลุ่มด้วยยาร่วมสองชนิดในพื้นที่ (MDA) โดยอาศัยหลักการ วิธีการ กระบวนการ และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการสำรวจการติดเชื้อฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ในคน สัตว์ และยุงพาหะนำโรค ในพื้นที่แพร่โรค รวมถึงพื้นที่การเฝ้าระวัง โดยพิจารณาขอบเขตพื้นที่การสำรวจการติดเชื้อฟิลาเรีย ตามปัจจัยแวดล้อมที่มีผลให้เกิดโอกาสในการกระจายโรคในพื้นที่แพร่โรค เช่น การกำหนดพื้นที่และประชากรกลุ่มเป้าหมาย (target population and area) และการกำหนดกรอบการสำรวจการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในคน สัตว์ และยุงพาหะ เครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินการเพื่อประเมินผลของโครงการและการเฝ้าระวัง คือ วิธีการตรวจเชื้อไมโครฟิลาเรียในเลือด ซึ่งใช้ประเมินการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในประชากรกลุ่มเป้าหมายที่ได้รับการรักษากลุ่มด้วยยาร่วมสองชนิด เพื่อตรวจหาผู้ติดเชื้อรายใหม่และ ประเมินผลการรักษากลุ่ม

WHO ได้มีข้อกำหนดว่า หากพบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในเด็กที่เกิดใหม่หลังจากเริ่มดำเนินโปรแกรมกำจัดโรคเท้าช้าง ในอัตรา 1 ต่อ 3,000 คน ให้ถือว่าโปรแกรมกำจัดโรคเท้าช้างนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จ และไม่สามารถหยุดการจ่ายยารักษาในกลุ่มในพื้นที่ MDA นั้นๆ ได้ (WHO, 20010) ดังนั้น การประเมินความสำเร็จของโปรแกรมกำจัดโรคเท้าช้างในระยะดำเนินโปรแกรมนี้นี้ จึงต้องอาศัยข้อมูลที่ได้จากการตรวจประเมินการติดเชื้อ คือ ข้อมูลประเมินในกลุ่มผู้ติดเชื้อสะสม ได้แก่ ความชุกการติดเชื้อไมโครพลาเรีย และความชุกการติดเชื้อพลาเรียแอนติบอดี ข้อมูลประเมินในประชากรกลุ่มเสี่ยง ได้แก่ เด็กที่เกิดใหม่หลังจากเริ่มดำเนินโปรแกรมกำจัดโรคเท้าช้าง หรือผู้อพยพเคลื่อนย้ายเข้ามาอยู่อาศัยหรือประกอบอาชีพในพื้นที่แพร่โรค ข้อมูลระบาดวิทยาที่สำคัญ คือ อุบัติการณ์การติดเชื้อไมโครพลาเรียในผู้ติดเชื้อรายใหม่

การพัฒนาเครื่องมือ rDNA locus specific PCR และ allele-specific nested multiplex PCR ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการจำแนกหาการติดเชื้อไมโครพลาเรียและประเมินความไวต่อยาที่ใช้ในโครงการรักษากลุ่ม (MDA) โดยที่ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งตัวอย่างที่เป็นคน สัตว์ และยุงพาหะ จึงเป็นเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเฝ้าระวังหลังหยุดการจ่ายยารักษาในกลุ่มในพื้นที่แพร่โรคเท้าช้างได้ ซึ่งจะเป็นเครื่องมือในการประเมินการติดเชื้อไมโครพลาเรียในประชากรกลุ่มเป้าหมายที่ได้รับการรักษากลุ่มด้วยยาร่วมสองชนิด ค้นหาผู้ติดเชื้อรายใหม่ในพื้นที่ อีกทั้งยังประเมินประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในโครงการกำจัดโรคเท้าช้าง โดยการติดตามการดื้อยากลุ่มเบนซิมิดาโซลในเชื้อพลาเรียชนิด *B. malayi* ภายใต้ภาวะการฉกฉดด้วยยารักษากลุ่มด้วยยาร่วมสองชนิด

เอกสารอ้างอิง

- Ambily, V.R., Pillai, U.N., Arun, R., Pramod, S. and Jayakumar, K.M. (2011). Detection of human filarial parasite *Brugia malayi* in dogs by histochemical staining and molecular techniques. *Vet Parasitol* 181:210–214.
- Apiwathnasorn, C., Samung, Y., Prummongkol, S., Asavanich, A. and Komalamisra, N. (2006). Surveys for natural host plants of *Mansonia* mosquitoes inhabiting Toh Daeng peat swamp forest, Narathiwat Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37, 279–282.
- Beerntsen, B.T., Luckhart, S. and Christensen, B.M. (1989). *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*: Inherent difference in immune activation in the mosquitoes *Armigeres subalbatus* and *Aedes aegypti*. *J Parasitol* 75, 76–81.
- Bhumiratana, A., Intarapuk, A., Sangthong, D., Koyadun, S., Pechgit, P. and Pothikasikorn, J. (2012). Molecular diagnosis and monitoring of benzimidazole susceptibility of human filariids. In: *Current Topics in Tropical Medicine*, Rodriguez–Morales AJ (ed.). p.p. 397–424.
- Bhumiratana, A., Pechgit, P., Koyadun, S., Siriaut, C. and Yongyuth, P. (2010). Imported bancroftian filariasis: diethylcarbamazine response and benzimidazole susceptibility of *Wuchereria bancrofti* in dynamic cross-border migrant population targeted by the National Program to Eliminate Lymphatic Filariasis in South Thailand. *Acta Trop* 113, 121–128.
- Boonyapakorn, C., Srikitjakarn, L., Morakote, N. and Hoerchner, F. (2008). The epidemiology of *Dirofilaria immitis* infection in outpatient dogs at Chiang Mai University Small Animal Hospital, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 39(1), 33–38.
- CDC. (1993). Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. *Morb Mortal Wkly Rep* 42(RR16), 1–38. [<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00025967.htm>]
- Chansiri, K., Tejangkura, T., Kwaosak, P., Sarataphan, N., Phantana, S. and Sukhumsirichart, W. (2002). PCR based method for identification of zoonotic *Brugia malayi* microfilariae in domestic cats. *Mol Cell Probes* 16(2), 129–35.
- Chanteau, S., Luguiaud, P., Failloux, A.M. and Williams, S. (1994). Detection of *Wuchereria bancrofti* larvae in pooled mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89, 665–666.

- Chiang, G.L., Cheong, W.H., Samarawickrema, W.A., Mak, J.W. and Kan, S.K. (1984). Filariasis in Bengkoka Peninsula, Sabah, Malaysia: vector studies in relation to the transmission of filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 15(2), 179–189.
- Chungpivat, S., Nithiuthai, N., Sichanasai, B. and Santiwatanatarm, T. (1990). Histochemical diagnosis of *Dirofilaria immitis* microfilariae by acid phosphatase activity. *J Thai Vet Pract* 2, 195– 203.
- Chungpivat, S. and Sucharit, S. (1993). Microfilariae in cats in Bangkok. *Thai J Vet Med* 23, 75– 87.
- Communicable Disease Control, Ministry of Public Health. (2002). Evaluation of prevention and control of disease and health threats in the National Health Plan of the 9th National Plan of Social and Economic Development by fiscal years 2002–2006.
- Conder, G.A. and Campbell, W.C. (1995). Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Adv Parasitol* 35, 1–84.
- Cox–Singh, J., Pomrehn, A.S., Wolfe, N.D., Rahman, H.A., Lu, H.Y. and Singh, B. (2000). Sensitivity of the nested–polymerase chain reaction (PCR) assay for *Brugia malayi* and significance of ‘free’ DNA in PCR–based assays. *Int J Parasitol* 30, 1177–1179.
- David HL and Edeson JFB. (1965). Filariasis in *Portuguese Timor*, with observation on a new microfilaria found in man. *Ann Trop Med Parasitol* 59, 193–204.
- Drogemuller, M., Schieder, T. and von Samson–Himmelstjerna, G. (2004). Beta–tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole–susceptible and –resistant populations. *J Parasitol* 90, 868–870.
- Elard, L. and Humbert, J.F. (1999). Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 β –tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small–ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol Res* 85, 452–456.
- Elard, L., Comes, A.M. and Humbert, J.F. (1996). Sequences of beta–tubulin cDNA from benzimidazole–susceptible and –resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Mol Biochem Parasitol* 79, 249–253.
- Filariasis Division, Communicable Disease Control Department, Ministry of Public Health. The National Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis by Fiscal Years 2002–2006. Bangkok: Amigo Studio. 2000:1–35.

- Filariasis Division, Communicable Disease Control Department, Ministry of Public Health. National conference on development of lymphatic filariasis control planning and evaluation in the National Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis of the 9th National Plan for Social and Economic Development by fiscal years 2002–2006, Bangkok, Thailand, 2–3 August 2001.
- Fischer, P., Bonow, I., Supali, T., Rückert, P. and Rahmah, N. (2005). Detection of filaria-specific IgG4 antibodies and filarial DNA, for the screening of blood spots for *Brugia timori*. *Ann Trop Med Parasitol* 99(1), 53–60.
- Fischer, P., Supali, T. and Maizels, R.M. (2004). Lymphatic filariasis and *Brugia timori*: prospects for elimination. *Trends Parasitol* 20(8), 351–355.
- Gery, T.G., Nulf, S.C., Alexander–Bowman, S.J., Mahmoud, B.M., Prichard, R.K. and Klein, R.D. (1998). Cloning and characterization of cDNAs encoding beta-tubulin from *Dirofilaria immitis* and *Onchocerca volvulus*. *J Parasitol* 84, 356–360.
- Ghosh, U.S. (2012). Filariasis: Marking an early diagnosis. *Med Update* 22, 20–23.
- Guenette, S., Prichard, R.K., Klein, R.D. and Matlashewski, G. (1991). Characterization of a beta-tubulin gene and a beta-tubulin gene products of *Brugia pahangi*. *Mol Biochem Parasitol* 44, 153–164.
- Guptavanij, P., Harinasuta, C., Sucharit, S. and Vutikes, S. (1971). Studies on sub-periodic *Brugia malayi* in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2(1), 44–50.
- Guptavanij, P., Harinasuta, C., Surathin, K., Vutikes, S. and Deesin, T. (1977). Studies on the prevalence of Malayan filariasis in South Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 8(1), 42–52.
- Guptavanij, P., Harinasuta, C., Vutikes, S., Deesin, T. and Surathin, K. (1978). The vectors of *Brugia malayi* in Southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 9(4), 543–548.
- Gyapong, J.O., Kumaraswami, V., Biswas, G., and Ottesen, E.A. (2005). Treatment strategies underpinning the global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Expert Opin Pharmacother* 6, 179–200.
- Haarbrink, M., Terhell, A.J., Abadi, K., Asri, M., de Medeiros, F, and Yazdanbakhsh, M. (1999). Anti-filarial IgG4 in men and women living in *Brugia malayi* endemic areas. *Trop Med Int Health* 4(2), 93–97.

- Harinasuta, C., Charoenlarp, P., Sucharit, S., Deesin, T., Surathin, K. and Vutikes, S. (1970). Study of malayan filariasis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1(1), 29–39.
- Hoti, S.L., Subramaniam, K. and Das, P.K. Detection of codon for amino acid 200 in isotype 1 beta-tubulin gene of *Wuchereria bancrofti* isolates, implicated in resistance to benzimidazoles in other nematodes. *Acta Trop* 88, 77–81.
- Hoti, S.L., Vasuki, V., Lizotte, M.W., Patra, K.P., Ravi, G., Vanamail, P., Manonmani, A., Sabesan, S., Krishnamoorthy, K. and Williams, S.A. (2001). Detection of *Brugia malayi* in laboratory and wild-caught *Mansonioides* mosquitoes (Diptera: Culicidae) using Hha I PCR assay. *Bull Entomol Res* 91, 87–92.
- Intapan, P.M., Thanchomnang, T., Lulitanond, V. and Maleewong W. (2009). Rapid detection of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi* in mosquito vectors (Diptera: Culicidae) using a real-time fluorescence resonance energy transfer multiplex PCR and melting curve analysis. *J. Med. Entomol* 46, 158–164.
- Iyengar MO. (1953). Filariasis in Thailand. *Bull World Health Org* 9(6), 731–766.
- Jamail, M., Andrew, K., Junaidi, D., Krishnan, A.K., Faizal, M. and Rahmah, N. (2005). Field validation of sensitivity and specificity of rapid test for detection of *Brugia malayi* infection. *Trop Med Int Health* 10(1), 99–104.
- Kobasa, T., Thammapalo, S., Suvannalabha, S., Armesombun, A., Loymak, S., Sawat L, et al. (2004). Identification of *Brugia malayi* like microfilaria in naturally infected cats from Narathivat Province, South Thailand. *J Trop Med Parasitol* 27, 21–25.
- Koyadun, S., and Bhumiratana, A. (2005). Surveillance for imported bancroftian filariasis after two year multi dose diethylcarbamazine treatment, *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36, 882–831.
- Koyadun, S., Wiboolchak, P. and Bhumiratana, A. (2007). An innovative intervention for disease prevention and control: social marketing for mass drug administration campaign in the National Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis in Nakhon Si Thammarat. *J Health Sci* 16, 409–421.
- Kurniawan, A., Atkinson, R., Sartono, E., Partono, F., Yazdanbakhsh, M. and Maizels, R.M. (1995). Differentiate decline in filaria-specific IgG1, IgG4 and IgE antibodies in *Brugia malayi* infected patients after diethylcarbamazine therapy. *J Immunol* 150, 3941–3950.

- Kwa, M.S., Veenstra, J.G. and Roos, M.H. (1993). Molecular characterisation of beta-tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 60, 133–143.
- Kwa, M.S., Veenstra, J.G. and Roos, M.H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 63, 299–303.
- Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Van Dijk, M. and Roos, M.H. (1995). Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 246, 500–510.
- Lacey, E. (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18, 885–936.
- Lacey, E. and Gill, J.H. (1994). Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Trop* 56, 245–262.
- Lehrer, S., Davey, H., Watson, T. and Wilkins, R.J. (1995). Sensitive PCR for detecting benzimidazole resistant sub populations of ovine nematodes in the Waikito. *Proc New Zealand Soc Anim Prod* 55, 209–210.
- Lek-Uthai, U., Chansiri, K. and Yodmek, S. (2004). Periodicity of *Brugia malayi* appearance in blood of domestic Thai cats in Surat Thani province. *J Trop Med Parasitol* 27, 15–20.
- Mak, J.W., Choong, M.F., Lam, P.L.W. and Sureh, K. (1990). Experimental infection of the leaf-monkeys, *Presbytis cristata* and *Presbytis melalophos* with subperiodic *Brugia malayi*. *Acta Tropica* 47(4), 223–226.
- McCarthy, J.S., Guinea, A., Weil, G.J. and Ottesen, E.A. (1995). Clearance of circulation filarial antigen as a measure of the macrofilaricidal activity of diethylcarbamazine in *Wuchereria bancrofti* infection. *J Infect Dis* 172, 521–526.
- McNulty, S.N., Mitreva, M., Weil, G.J. and Fischer, P.U. (2013). Inter and intra-specific diversity of parasites that cause lymphatic filariasis. *Infect Genet Evol* 14, 137–146.
- Mishra, K., Raj, D.K., Hazra, R.K., Dash, A.P. and Supakar, P.C. (2007). The development and evaluation of a single step multiplex PCR method for simultaneous detection of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol Cell Probes* 21, 355–362.
- Mitchael, E., Bundy, D.A.P. and Grenfell, B.T. (1996). Re assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. *Parasitol* 112, 409–428.

- Muslim, A., Fong, M.Y., Mahmud, R., Lau, Y.L. and Sivanandam, S. (2013). *Armigeres subalbatus* incriminated as a vector of zoonotic *Brugia pahangi* filariasis in suburban Kuala Lumpur, Peninsular Malaysia. *Parasit Vectors* 6, 219.
- Nithiuthai, S. and Chungpivat, S. (1992). Lymphatic filariasis (*Brugia pahangi*) in dogs. *J Thai Vet Pract* 4, 122–133.
- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Nithiuthai, S., Chungpivat, S., Suvannadabba, S. and Poovorawan, Y. (2006). Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR–RFLP of ITS1. *Vet Parasitol* 140(3–4), 366–372.
- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Poovorawan, Y. and Scott, A.L. (2005). Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 73, 895–900.
- Nuchprayoon, S., Sangprakarn, S., Junpee, A., Nithiuthai, S., Chungpivat, S. and Poovorawan, Y. (2003). Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR–RFLP of ITS1 and ITS2. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34, 67–73.
- Ottesen, E.A. (2000). The global programme to eliminate lymphatic filariasis. *Trop Med Int Health* 5, 591–594.
- Ottesen, E.A., Duke, B.O.L., Karam, M. and Behbehani, K. (1997). Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bull World Health Org* 75, 491–503.
- Ottesen, E.A., Ismail, M.M. and Horton, J. (1999). The role of albendazole in programmes to eliminate lymphatic filariasis. *Parasitol Today* 15, 382–386.
- Partono, F. and Purnomo. (1987). Periodicity studies of *Brugia malayi* in Indonesia: recent findings and a modified classification of the parasite. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(4), 657–662.
- Pechgit, P., Intarapuk, A., Pinyoowong, D. and Bhumiratana, A. (2011). Touchdown–touchup nested PCR for low–copy gene detection of benzimidazole–susceptible *Wuchereria bancrofti* with a *Wolbachia* endosymbiont imported by migrant carriers. *Exp Parasitol* 127, 559–568.
- Phantana, S., Shutidamrong, C. and Chusattayanond, W. (1987). *Brugia malayi* in a cat from southern Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(1), 173–174.
- Prichard, R.K. (2005). Is anthelmintic resistance a concern for heartworm control? What can we learn from the human filariasis control programs? *Vet Parasitol* 133, 243–253. Epub 2005 Apr 26.

- Purnomo, Dennis, D.T. and Partono, F. (1977). The microfilaria of *Brugia timori* (Partono et al. 1977 = Timor microfilaria, David and Edeson, 1964): morphologic description with comparison to *Brugia malayi* of Indonesia. *J Parasitol* 63(6), 1001–1006.
- Rahmah, N., Lim, B.H., Khairul Anuar, A., Shenoy, R.K., Kumaraswami, V., Lokman Hakim S, et al. (2001). A recombinant antigen-based IgG4 ELISA for the specific and sensitive detection of *Brugia malayi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(3), 280–284. (a)
- Rahmah, N., Khairul Anuar, A., Tengku Ariff, R.H., Zurainee, M.N., Noor A'shikin, A., Fadzillah, A., et al. (1998). Use of antifilarial IgG4–ELISA to detect *Brugia malayi* infection in an endemic area of Malaysia. *Trop Med Int Health* 3(3), 184–188.
- Rahmah, N., Taniawati, S., Shenoy, R.K., Lim, B.H., Kumaraswami, V., Khairul Anuar, A., et al. (2001). Specificity and sensitivity of a rapid dipstick test (*Brugia Rapid*) in the detection of *Brugia malayi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(6), 601–604. (b)
- Ramzy, R., Farid, H.A., Kamal, I.H., Ibrahim, G.H., Morsey, Z.S., Faris, R., Weil, G.J., Williams, S.A. and Gad, A.M. (1997). A polymerase chain reaction–based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood and *Culex pipiens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91, 156–160.
- Rao, R.U., Atkinson, L.J., Ramzy, R.M., Helmy, H., Farid, H.A., Bockarie, M.J., Susapu, M., Laney, S.J., Williams, S.A. and Weil, G.J. (2006). A real–time PCR–based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in blood and mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 74, 826–832. (a)
- Rao, R.U., Weil, G.J., Fischer, K., Supali, T. and Fischer, P. (2006). Detection of *Brugia* parasite DNA in human blood by real–time PCR. *J Clin Microbiol* 44, 3887–3893. (b)
- Rattanarithikul, R, and Panthusiri, P. (1994). Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand III. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25, 1–85.
- Rattanarithikul, R., Harbach, R.E., Panthusiri, P., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Peyton, E.L., Coleman, R.E. and Richardson, J.H. (2010). Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand VI. TRIBE AEDINI. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 41, 1–225.
- Rattanarithikul, R., Harrison, B.A., Panthusiri, P., Peyton, E.L. and Coleman, R.E. (2006). Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand III. Genera *Aedeomyia*, *Ficalbia*, *Mimomyia*, *Hodgesia*, *Coquillettia*, *Mansonia*, and *Uranotaenia*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37, 1–85.

- Ravichandran, M., Regunathan, J., Narayanan, R.B., Jayaraman, K. and Kaliraj, P. (1997). Modulation of cellular immune response by cytokines in bancroftian filariasis Indian. *J Clin Biochem* 12(Suppl 1), 27–31.
- Ravindran, R., Varghese, S., Nair, S.N., Balan, V.M., Lakshmanan, B., Ashruf, R.M., et al. (2014). Canine filarial infections in a human *Brugia malayi* endemic area of India. *BioMed Res Int* 2014, 630160.
- Rogers, R. and Denham, D.A. (1975). Studies with *Brugia pahangi*: 11. Measurements of lymph flow in infected cats. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 6, 199–205.
- Rogers, R., Denham, D.A., Nelson, G.S., Guy, F. and Ponnudurai, T. (1975). Studies with *Brugia pahangi*. III. Histological changes in the affected lymph nodes of infected cats. *Ann Trop Med Parasitol* 69, 77–84.
- Roos, M.H., Boersema, J.H., Borgsteede, F.H.M., Cornelissen, J., Taylor, M. and Ruitenber, E.J. (1990). Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Hemonchus contortus*. *Mol. Biochem Parasitol* 43, 77–88.
- Roos, M.H., Kwa, M.S.G. and Grant, W.N. (1995). New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Today* 11, 148–150.
- Sangster, N.C. (1999). Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int J Parasitol* 29, 115–124.
- Sassnau, R., Dauschies, A., Lendner, M. and Genchi, C. (2014). Climate suitability for the transmission of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Germany. *Vet Parasitol* 205, 239–245.
- Silvestre, A. and Humbert, J.F. (2002). Diversity of benzimidazole–resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *Int J Parasitol* 32, 921–928.
- Sivanandam, S. and Fredericks, H.J. (1966). The "Innenkorper" in differentiation between the microfilariae of *Brugia pahangi* and *B. malayi* (sub-periodic form). *Med J Malaya* 20(4), 337–338.
- Sucharit, S., Harinasuta, C., Viraboonchai, S. and Smithanonda, S. (1975). The differentiation of *Brugia malayi*, *B. pahangi*, *B. tupaiae* and *Wuchereria bancrofti*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 6(4), 549–554.

- Supali, T., Rahmah, N., Djuardi, Y., Sartono, E., Ruckert, P. and Fischer, P. (2004). Detection of filaria-specific IgG4 antibodies using Brugia Rapid test in individuals from an area highly endemic for *Brugia timori*. *Acta Trop* 90(3), 255–261.
- Supali, T., Wibowo, H., Rückert, P., Fischer, K., Ismid, I.S., Purnomo, et al. (2002). High prevalence of *Brugia timori* infection in the highland of Alor island, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 66, 560–565.
- Suvannadabba, S. (1993). Current status of filariasis in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 24(Suppl 2), 5–7.
- Thanchomnang, T., Intapan, P.M., Lulitanond, V., Sangmaneeet, S., Chungpivat, S., Taweethavonsawat, P., Choochote, W. and Maleewong, W. (2010). Rapid detection of *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. *Vet Parasitol* 168, 255–260.
- Thanomsub, B.W., Chansiri, K., Sarataphan, N. and Phantana, S. (2000). Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR–RFLP. *Mol Cell Probes* 14, 41–46.
- Turner, P., Copeman, B., Gerisi, D. and Speare, R. (1993). A comparison of the Og4C3 antigen capture ELISA, the Knott test, an IgG4 assay and clinical signs, in the diagnosis of Bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol* 44(1), 45–48.
- Vasuki, V., Hoti, S.L., Sadanandane, C. and Jambulingam, P. (2003). A simple and rapid DNA extraction method for the detection of *Wuchereria bancrofti* infection in the vector mosquito, *Culex quinquefasciatus* by *Ssp I* PCR assay. *Acta Trop* 86, 109–114.
- Vasuki, V., Patra, K.P. and Hoti, S.L. (2001). A rapid and simplified method of DNA extraction for the detection of *Brugia malayi* infection in mosquitoes by PCR assays. *Acta Trop* 79, 245–248.
- Weil, G.J., Curtis, K.C., Fischer, P.U., Won, K.Y., Lammie, P.J., Joseph, H., et al. (2011). A multicenter evaluation of a new antibody test kit for lymphatic filariasis employing recombinant *Brugia malayi* antigen Bm–14. *Acta Trop* 120(Suppl 1), S19–S22.
- WHO. (1992). Lymphatic filariasis: disease and its control. Fifth Report of the WHO Expert Committee on Filariasis. Geneva: World Health Organization. *WHO Tech Rep Ser* 821, p. 1–71.
- WHO. (1999a). Guidelines for certifying lymphatic filariasis elimination (including discussion of critical issues and rationale), following from Informal consultation on epidemiologic

- approaches to lymphatic filariasis elimination: initial assessment, monitoring, and certification, Atlanta, Georgia, USA 2–4 September 1998. Geneva: World Health Organization. Mimeographed documented WHO/FIL/99/197.
- WHO. (1999b). Informal consultation on epidemiologic approaches to lymphatic filariasis elimination: initial assessment, monitoring, and certification, Atlanta, Georgia, USA 2–4 September 1998. Geneva: World Health Organization. Mimeographed documented WHO/FIL/99.195.
- WHO. (2000). Elimination of lymphatic filariasis. Report of informal consultative meeting on lymphatic filariasis in SEA region, Bhubaneswar, Orissa, India, 23–25 February 2000.
- WHO. (2001). Regional strategic plan for elimination of lymphatic filariasis (2000–2004). South–East Asia Regional Office, New Delhi: World Health Organization. Mimeographed documented SEA/FIL/28.corr.1.
- WHO. (2002). Global programme to eliminate lymphatic filariasis: Annual report on lymphatic filariasis 2001. Geneva: World Health Organization. Mimeographed document WHO/CDS/CPE/CEE/2002.28.
- WHO. (2006). Sixth meeting of the Technical Advisory Group on the Global Elimination of Lymphatic Filariasis. *Wkly Epidemiol Rec* 46, 401–408.
- WHO. (2010). Progress report 2000–2009 and strategic plan 2010–2020 of the global programme to eliminate lymphatic filariasis: halfway towards eliminating lymphatic filariasis. Geneva: World Health Organization; Mimeographed document WHO/HTM/NTD/PCT/2010.6.
- Williams, S.A., Nicolas, L., Lizotte–Waniewski, M., Plichart, C., Luquiaud, P., Nguyen, L.N. and Moulia–Pelat, J.P. (1996). A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90, 384–387.
- Wongkamchai, S., Monkong, N., Mahannol, P., Taweethavonsawat, P., Loymak, S. and Foongladda, S. (2013). Rapid detection and identification of *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* by high–resolution melting assay. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13, 31–36.
- Yamamoto, H., Kobayashi, M., Ogura, N., Tsuruoka, H. and Chigusa, Y. (1985). Studies on filariasis. VI. The encapsulation of *Brugia malayi* and *B. pahangi* larva in the mosquito, *Armigeres subalbatus*. *Japanese J Sanitary Zool* 36, 1–6.
- Yongyuth, P., Koyadun, S., Jaturabundit, N., Sampuch, A., Bhumiratana, A. (2006). Efficacy of a single–dose treatment with 300 mg diethylcarbamazine and a combination of 400 mg

- albendazole in reduction of *Wuchereria bancrofti* antigenemia and concomitant geohelminths in Myanmar migrants in Southern Thailand. *J Med Assoc Thai* 89, 1237–1248.
- Zajac, A.M. and Gipson, T.A. (2000). Multiple anthelmintic resistance in a goat herd. *Vet Parasitol* 87(2–3), 163–172.
- ธีระยศ กอบอาษา, และ สุมาศ ลอยเมฆ. การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia malayi* ในแมว จังหวัดนราธิวาส. วารสารมาลาเรีย. 2546;38:112–8.
- อดิศักดิ์ ภูมิลรัตน์ และ อภิรดี อินทรพัถร์. ความรู้พื้นฐานโรคเท้าช้าง. กรุงเทพมหานคร. มีนเซอริวิส ซัพพลาย; 2558. หน้า 1–196.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลการการสำรวจเชื้อไมโครพลาเรียจากคนในพื้นที่ศึกษา

ลำดับ ที่	Isolate No.	โฮสต์	พื้นที่	ช่วงเวลา เก็บ ตัวอย่าง	TBF exam		Microscopic species identification	PCR identification
					Pos result	Density (mf/ml)		
1	C06D001	คน	นราธิวาส	กลางคืน	pos	300	Brugia	<i>B. malayi</i>
2	C06D002	คน	นราธิวาส	กลางคืน	pos	334	Brugia	<i>B. malayi</i>
3	C06D003	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	neg
4	C06D004	คน	นราธิวาส	กลางคืน	pos	33	Brugia	<i>B. malayi</i>
5	C01D005	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	neg
6	C01D006	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	neg
7	C01D007	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	neg
8	C01D008	คน	นราธิวาส	กลางคืน	pos	500	Brugia	<i>B. malayi</i>
9	C01D009	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	neg
10	S01-001	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
11	S01-002	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
12	S01-003	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
13	S01-004	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
14	S01-005	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
15	S01-006	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
16	S01-007	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
17	S01-008	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
18	S01-009	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d

19	S01-010	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
20	S01-011	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
329	to S01-320							
330	S02-001	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
331	S02-002	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
332	S02-003	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
333	S02-004	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
334	S02-005	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
335	S02-006	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
336	S02-007	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
337	S02-008	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
338	S02-009	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
339	S02-010	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
340	S02-011	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
508	to S02-179							
509	S03-001	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
510	S03-002	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
511	S03-003	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
512	S03-004	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
513	S03-005	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
514	S03-006	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
515	S03-007	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
516	S03-008	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
517	S03-009	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
518	S03-010	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
519	S03-011	คน	นราธิวาส	กลางคืน	neg	-	-	n/d
741	to D03-233							

ภาคผนวก ข

ผลการการสำรวจเชื้อไมโครพลาเรียจากตัวอย่างสัตว์

ลำดับ ที่	Isolate No.	โฮสต์	พื้นที่	ช่วงเวลา เก็บ ตัวอย่าง	TBF exam		Microscopic species identification	PCR identification
					Pos result	Density (mf/ml)		
1	A11N01	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	pos	167	Brugia	-
2	A11N02	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	pos	67	Brugia	Brugia
3	A11N03	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	neg	-	-	
4	A11N04	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	neg	-	-	
5	A11N05	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	neg	-	-	Brugia
6	A11N06	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	pos	33	Brugia	Brugia
7	A11N07	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	pos	167	Dirof	Dirof
8	A11N08	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	neg	-	-	
9	A11D09	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	
10	A11D10	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	633	Brugia	Brugia
11	A11D11	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	
12	A11D12	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	300	Brugia	Brugia

13	A11D13	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	100	Brugia	Brugia
14	A11D14	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	133	Brugia	Brugia
15	A11D15	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	33	Brugia	Brugia
16	A11D16	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	500	Brugia	Brugia
17	A11D17	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	833	Brugia	Brugia
18	A11D18	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
19	A11D19	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	133	Brugia	Brugia
20	A11D20	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	133	Brugia	Brugia
21	A11D21	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	1800	Brugia	Brugia
22	A11D22	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
23	A11D23	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
24	A11D24	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
25	A11D25	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
26	A11D26	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
27	A11D27	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

28	A11D28	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
29	A11D37	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	167	Brugia	Brugia
30	A11D38	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
31	A11D39	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
32	B11N01	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	pos	500	Brugia	Brugia
33	B11N02	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	neg	-	-	neg
34	B11N03	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	neg	-	-	neg
35	B11N04	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางคืน	neg	-	-	neg
36	B11D05	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	267	Brugia	Brugia
37	B11D06	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
38	B11D07	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	33	Dirof	Dirof
39	B11D08	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	200	Dirof	Dirof
40	B11D09	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
41	B11D10	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
42	B11D11	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

43	B11D12	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	2,476	Brugia	Brugia
44	B11D13	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	367	Dirof	Dirof/Brugia
45	B11D14	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	15,400	Dirof	Dirof
46	B11D15	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	133	Brugia	Brugia
47	B11D16	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	100	Brugia	Brugia
48	B11D17	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
49	B11D18	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
50	B11D19	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
51	B11D20	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
52	B11D21	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	Brugia
53	B11D22	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
54	B11D23	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	Brugia
55	B11D24	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
56	B11D25	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
57	B11D26	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	3,400	Brugia	Brugia

58	B11D27	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
59	B11D28	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
60	B11D29	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	377	Brugia	Brugia
61	B11D30	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	567	Dirof	Brugia/Dirof
62	A3D78	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
63	A3D79	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
64	A3D80	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
65	A3D81	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
66	A3D82	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
67	A3D83	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
68	B3D67	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
69	B3D68	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
70	B3D69	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
71	B3D70	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	Brugia
72	B3D71	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

73	B3D72	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
74	B3D73	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
75	B3D74	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
76	B3D75	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
77	B3D76	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
78	B3D77	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
79	B3D78	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
80	B3D79	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
81	B3D80	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
82	B3D81	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
83	B3D82	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
84	B3D83	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
85	B3D84	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
86	B3D85	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
87	A3D58	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

88	A3D59	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
89	A3D60	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
90	A3D61	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
91	A3D62	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
92	A3D63	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	6,100	Brugia	Brugia
93	A3D64	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
94	A3D65	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
95	A3D66	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
96	A3D67	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
97	A3D68	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
98	A3D69	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
99	A3D70	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
100	A3D71	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
101	A3D72	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
102	A3D73	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

103	A3D74	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
104	A3D75	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
105	A3D76	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
106	A3D77	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	833	Brugia	Brugia
107	B12D31	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
108	B12D32	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
109	B12D33	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	31,300	Dirof	Dirof
110	B12D34	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
111	B12D35	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	1,000	Dirof	Dirof
112	B12D36	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	867	Dirof	Dirof
113	B12D37	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	167	Brugia	Brugia
114	B12D38	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
115	B12D39	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	33	Brugia	Brugia
116	B12D40	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
117	B12D41	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

118	B12D42	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
119	B12D43	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
120	B12D44	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
121	B12D45	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
122	B12D46	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
123	B12D47	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
124	A12D29	สุนัข	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
125	A12D30	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
126	A12D31	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
127	A12D32	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
128	A12D33	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
129	A12D34	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
130	A12D35	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
131	A12D36	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
132	B22D48	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

133	B22D49	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
134	B22D50	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
135	B22D51	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
136	B22D52	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
137	B22D53	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
138	B22D54	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
139	B22D55	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
140	B22D56	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
141	B22D57	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
142	B22D58	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
143	B22D59	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
144	B22D60	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
145	B22D61	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
146	B22D62	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
147	B22D63	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	92,133	Brugia	Brugia

148	B22D64	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
149	B22D65	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
150	B22D66	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
151	A22D40	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
152	A22D41	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
153	A22D42	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
154	A22D43	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
155	A22D44	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	133	Brugia	Brugia
156	A22D45	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
157	A22D46	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	10,000	Brugia	Brugia
158	A22D47	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	pos	367	Brugia	Brugia
159	A22D48	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
160	A22D49	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
161	A22D50	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
162	A22D51	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg

163	A22D52	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
164	A22D53	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
165	A22D54	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
166	A22D55	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
167	A22D56	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
168	A22D57	แมว	สุราษฎร์ธานี	กลางวัน	neg	-	-	neg
169	N2A01	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
170	N2A02	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	634	Dirof	Dirof
171	N2A03	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	1,534	Dirof	Dirof
172	N2A04	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
173	N2A05	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
174	N2A06	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
175	N2A07	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
176	N2A08	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
177	N2A09	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	800	Dirof	Dirof
178	N2A10	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
179	N2A11	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
180	N2A12	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
181	N2A13	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
182	N2A14	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
183	N2A15	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
184	N2A16	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
185	N2A17	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg

186	N3A01	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
187	N3A02	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
188	N3A03	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
189	N3A04	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
190	N3A05	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
191	N3A06	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
192	N3A07	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
193	N3A08	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
194	N3A09	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
195	N3A10	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
196	N3A11	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
197	N3A12	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
198	N3A13	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	600	Dirof	Dirof
199	N3A14	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
200	N3A15	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
201	N3A16	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
202	N3A17	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
203	N3A18	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
204	N3A19	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
205	N5A01	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
206	N5A02	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
207	N5A03	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
208	N5A04	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
209	N5A05	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
210	N5A06	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
211	N5A07	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
212	N5A08	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
213	N5A09	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg

214	N5A10	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	467	Dirof	Dirof
215	N5A11	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
216	N5A12	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
217	N5A13	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
218	N5A14	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
219	N5A15	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	33	Brugia	Brugia
220	N5A16	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	66	Brugia	Brugia
221	N5A17	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	866	Dirof	Dirof
222	N5A18	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
223	N1A01	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
224	N1A02	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
225	N1A03	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
226	N1A04	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
227	N1A05	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
228	N1A06	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
229	N1A07	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
230	N1A08	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
231	N1A09	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
232	N1A10	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
233	N1A11	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
234	N1A12	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
235	N1A13	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
236	N1A14	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
237	N1A15	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
238	D005-033	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
239	D005-034	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
240	D005-035	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	pos	33	Dirof	Dirof
241	D005-036	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	pos	33	Dirof	Dirof

242	D005-037	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	pos	166	Dirof	Dirof
243	D005-038	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
244	D005-039	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
245	D005-040	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
246	D005-001	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
247	D005-002	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	pos	100	Dirof	Dirof
248	D005-003	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
249	D005-004	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
250	D005-005	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
251	D005-006	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
252	D005-007	แมว	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
253	D005-008	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
254	D005-009	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
255	D005-010	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg
256	D005-011	สุนัข	นราธิวาส	กลางวัน	neg	-	-	neg

ภาคผนวก ค

จำนวนและชนิดของยุง *Mansonia spp.* ที่จำแนกได้ในพื้นที่อำเภอตากใบ

ตารางแสดงจำนวนยุงและจำแนกชนิดของยุงตามเวลาในการจับในจุดที่ 1 (จุด A)

ชั่วโมงที่ ศึกษา*	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ 11	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ 11	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน
1	<i>Ae. albopictus</i> = 30	26/74	<i>Ar. subalbatus</i> = 1 <i>Cx. gelidus</i> = 1 <i>Cx. vishnui</i> = 43 <i>Ae. albopictus</i> = 18	24/70
2	<i>Ae. albopictus</i> = 31 <i>Ae. aegypti</i> = 1	26/74	<i>Ar. subalbatus</i> = 4 <i>Cx. vishnui</i> = 10 <i>Cx. quinquefasciatus</i> = 1 <i>Ma. uniformis</i> = 1	23/68
3	<i>Ae. albopictus</i> = 1 <i>Ar. subalbatus</i> = 1 <i>Cx. vishnui</i> = 25	27/73	<i>Cx. vishnui</i> = 23 <i>Cx. gelidus</i> = 1 <i>Ar. subalbatus</i> = 1	23/67
4	<i>Ae. albopictus</i> = 4 <i>Ar. subalbatus</i> = 1 <i>Cx. vishnui</i> = 10	25/78	<i>Cx. vishnui</i> = 2	23/67
5	<i>Ar. subalbatus</i> = 4 <i>Cx. vishnui</i> = 1	24/79	<i>Cx. vishnui</i> = 11 <i>Cx. quinquefasciatus</i> = 1 <i>Ar. subalbatus</i> = 27	22/67
6	<i>Cx. vishnui</i> = 1 <i>Cx. gelidus</i> = 1	23/79	<i>Cx. vishnui</i> = 21 <i>Ar. subalbatus</i> = 1	23/80
รวม	111		167	

*หมายถึง ชั่วโมงที่ 1: 15.00 น. – 15.55 น. ชั่วโมงที่ 4: 18.00 น. – 18.55 น.
 ชั่วโมงที่ 2: 16.00 น. – 16.55 น. ชั่วโมงที่ 5: 19.00 น. – 19.55 น.
 ชั่วโมงที่ 3: 17.00 น. – 17.55 น. ชั่วโมงที่ 6: 20.00 น. – 20.55 น.

ตารางแสดงจำนวนยุงและจำแนกชนิดของยุงตามเวลาในการจับในจุดที่ 2 (จุด B)

ชั่วโมงที่ ศึกษา*	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ 3	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ 3	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน
1	<i>Cx. vishnui</i> = 2 <i>Ae. albopictus</i> = 32	36/40	<i>Ae. albopictus</i> = 7 <i>Cx. quinquefasciatus</i> = 1	31/60
2	<i>Ae. albopictus</i> = 29 <i>Ae. aegypti</i> = 1 <i>Cx.</i> = 4	27/74	-	30/60
3	<i>Ae. albopictus</i> = 40 <i>Cx.</i> = 3	27/71	<i>Ae. albopictus</i> = 2	29/60
4	<i>Ae. albopictus</i> = 11 <i>Cx.</i> = 1	28/55	<i>Ae. albopictus</i> = 8 <i>Cx. vishnui</i> = 5	29/65
5	<i>Ar. subalbatus</i> = 1 <i>Ae. albopictus</i> = 11	28/58	<i>Cq. crassipes</i> = 1 <i>Ae. albopictus</i> = 2 <i>Cx. vishnui</i> = 34 <i>An. whartoni</i> = 1	28/68
6	-	25/75	<i>Cx. vishnui</i> = 7	26/72
รวม	135		68	

*หมายถึง ชั่วโมงที่ 1: 15.00 น. – 15.55 น. ชั่วโมงที่ 4: 18.00 น. – 18.55 น.
 ชั่วโมงที่ 2: 16.00 น. – 16.55 น. ชั่วโมงที่ 5: 19.00 น. – 19.55 น.
 ชั่วโมงที่ 3: 17.00 น. – 17.55 น. ชั่วโมงที่ 6: 20.00 น. – 20.55 น.

ตารางแสดง จำนวนยุงและจำแนกชนิดของยุงตามเวลาในการจับในจุดที่ 3 (จุด C)

ชั่วโมงที่ ศึกษา*	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ 12	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ 12	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน
1	<i>Ae. albopictus</i> = 4	34/58	<i>Ae. albopictus</i> = 20 <i>Ae. aegypti</i> = 2 <i>Cx.</i> = 2 <i>Ar. subalbatus</i> = 1	34/58
2	<i>Ae. albopictus</i> = 10	30/65	<i>Ae. albopictus</i> = 22 <i>Cx. vishnui</i> = 1 <i>Ar. subalbatus</i> = 2 <i>Ae.</i> = 1	30/66
3	<i>Ar. subalbatus</i> = 6 <i>Ae. albopictus</i> = 14 <i>Cx. vishnui</i> = 8	28/68	<i>Ae. albopictus</i> = 12 <i>Ar. subalbatus</i> = 14 <i>Cx. vishnui</i> = 1	28/68
4	<i>Ae. albopictus</i> = 12 <i>Ar. subalbatus</i> = 2 <i>Mn. indiana</i> = 2	27/70	<i>Ae. albopictus</i> = 12 <i>Ar. subalbatus</i> = 41	27/70
5	<i>Cx. vishnui</i> = 22 <i>Ar. subalbatus</i> = 18 <i>Ae. albopictus</i> = 1	26/72	<i>Cx. vishnui</i> = 17 <i>An. subpictus</i> = 1 <i>Cq. Crassipes</i> = 1	26/72
6	<i>Cx. vishnui</i> = 13 <i>Cx. quinquefasciatus</i> = 1	26/74	<i>Cx. vishnui</i> = 7 <i>Ar. subalbatus</i> = 1 <i>Cx.</i> = 5	26/74
รวม	113		163	

*หมายถึง

ชั่วโมงที่ 1: 15.00 น. – 15.55 น.

ชั่วโมงที่ 2: 16.00 น. – 16.55 น.

ชั่วโมงที่ 3: 17.00 น. – 17.55 น.

ชั่วโมงที่ 4: 18.00 น. – 18.55 น.

ชั่วโมงที่ 5: 19.00 น. – 19.55 น.

ชั่วโมงที่ 6: 20.00 น. – 20.55 น.

ตารางแสดงจำนวนยุงและจำแนกชนิดของยุงตามเวลาในการจับในจุดที่ 4 (จุด D)

ชั่วโมงที่ ศึกษา*	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ 22	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน	จับจากภายนอกบ้าน หมู่ที่ 22 บ้านพัก	อุณหภูมิ (°C)/ ความชื้น (%) ภายนอกบ้าน
1	<i>Ae. albopictus</i> = 3	30/64	-	-
2	<i>Ae. albopictus</i> = 8	30/64	-	-
3	<i>Cx.</i> = 1 <i>Ae. albopictus</i> = 7 <i>Ar. subalbatus</i> = 2	29/69	-	-
4	<i>Ar. subalbatus</i> = 66 <i>Cx. vishnui</i> = 8 <i>Ae. albopictus</i> = 18	28/68	-	-
5	<i>Cx. vishnui</i> = 60 <i>Ae. albopictus</i> = 2 <i>Ar. subalbatus</i> = 2	27/68	<i>Ma. Uniformis</i> = 3 <i>Cx. vishnui</i> = 33 <i>Cx. gelidus</i> = 1 <i>Ae. albopictus</i> = 1	28/62
6	<i>Cx. vishnui</i> = 57 <i>Cx. quinquefasciatus</i> = 1	25/73	<i>Ma. Uniformis</i> = 1 <i>Cx. vishnui</i> = 12	28/68
7	<i>Cx. vishnui</i> = 54	24/76	<i>Cx. vishnui</i> = 25	28/68
รวม	289		76	

*หมายถึง ชั่วโมงที่ 1: 15.00 น. – 15.55 น. ชั่วโมงที่ 4: 18.00 น. – 18.55 น.
 ชั่วโมงที่ 2: 16.00 น. – 16.55 น. ชั่วโมงที่ 5: 19.00 น. – 19.55 น.
 ชั่วโมงที่ 3: 17.00 น. – 17.55 น. ชั่วโมงที่ 6: 20.00 น. – 20.55 น.

ภาคผนวก ง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หนังสือชื่อ “ความรู้พื้นฐานโรคเท้าช้าง (Essentials of Lymphatic Filariasis)” โดย อติศักดิ์ ภูมิรัตน์และอภิรติ อินทรพัถร์ ซึ่งมีการเผยแพร่ไปยังห้องสมุดมหาวิทยาลัย และในเวปไซด์ www.essentials-lf.com ตั้งแต่เดือนเมษายน 2558 ถึงเดือนพฤษภาคม 2559 ตามเล่มหนังสือที่แนบมากับรายงาน และเอกสารแสดงหน้าเวปไซด์ และการดาวน์โหลด
2. ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสาร เรื่อง “Development of allele-specific duplex nested PCR for detection and identification of beta-tubulin gene responsible for benzimidazole susceptibility and resistance in filariids” ในขณะนี้อยู่ในขั้นตอนของการดำเนินการ
3. การใช้องค์ความรู้ที่ได้ในการตรวจยืนยันการเกิดโรคให้กับผู้ติดเชื้อไมโครฟิลาเรียที่อยู่ในการดูแลของสำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดชลบุรี และยังได้มีการถ่ายทอดองค์ความรู้ทางด้านการศึกษานิเวศวิทยาที่มีผลต่อการแพร่กระจายของยุง

1. เว็บไซต์ www.essentials-lf.com และสถิติการดาวน์โหลด

11/6/2559

ความรู้พื้นฐานโรคเท้าช้าง, ESSENTIALS OF LYMPHATIC FILARIASIS

MESE

สารบัญ

บทที่ 1

บทที่ 2

บทที่ 3

บทที่ 4

บทที่ 5

บทที่ 6

ความรู้พื้นฐานโรคเท้าช้าง

ESSENTIALS OF LYMPHATIC FILARIASIS



ชื่อหนังสือ: ความรู้พื้นฐานโรคเท้าช้าง
ESSENTIALS OF LYMPHATIC FILARIASIS

ชื่อผู้แต่ง: อติศักดิ์ ภูมิรัตน
อภิรักษ์ อินทรพิทักษ์

ISBN: 978-974-8242-93-4

เล่มเผยแพร่เมื่อ: 1 เมษายน 2558

การสั่งซื้อหนังสือ: www.essentials-lf.com

สั่งซื้อหนังสือ: สามารถสั่งซื้อหนังสือได้ตั้งแต่
วันที่ 15 สิงหาคม 2558 เป็นต้นไป

อ้างอิงหนังสือ:
อติศักดิ์ ภูมิรัตน, อภิรักษ์ อินทรพิทักษ์, ความรู้พื้นฐานโรคเท้าช้าง,
กรุงเทพมหานคร:เมิน เซอร์วิส ซัพพลาย, 2558, หน้า 1-196.

© สงวนลิขสิทธิ์ โดย อติศักดิ์ ภูมิรัตน และ อภิรักษ์ อินทรพิทักษ์

ความรู้พื้นฐานโรคเท้าช้าง
ESSENTIALS OF LYMPHATIC FILARIASIS
อติศักดิ์ ภูมิรัตน
อภิรักษ์ อินทรพิทักษ์

203.188.20.251

[Manage](#)

2. บทคัดย่อของบทความที่กำลังดำเนินการเพื่อตีพิมพ์

Development of allele-specific duplex nested PCR for detection and identification of beta-tubulin gene responsible for benzimidazole susceptibility and resistance in filariids

Apiradee Intarapuk^{1,2}, Danai Saengthong³, Suntorn Pimnon⁴, Prapa Sorosjinda-Nunthawarasilp⁵,
Adisak Bhumiratana^{2,4}

¹Department of clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok, Thailand

²Center for Ecohealth Education and Research (CEER), Faculty of Public Health, Thammasat University, Rangsit Center, Prathumthani, Thailand

³Department of Animal Husbandry and Basic Professional Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok, Thailand

⁴Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Bangkok, Thailand

⁵Department of Fundamentals of Public Health, Faculty of Public Health, Burapha University, Chonburi, Thailand

ABSTRACT

The nucleotide polymorphism occurring at the codon 200 of the isotype 1 β -tubulin gene serves as a potential molecular marker for diagnosis and monitoring of benzimidazole (BZ) susceptibility/resistance in some nematodes. The BZ-resistant population of both human and animal filariids confers the point mutation at the position Phe (TTC) to Try (TAC). The allele-specific duplex nested PCR (A-PCR) technique was developed to detect and identify the BZ susceptible/resistant allele of the isotype 1 β -tubulin gene retained in filarial genomes including *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*, *Dirofilaria immitis*, and *Dipetalonema recognitum*. The A-PCR employed primary reaction containing the primer set universal for the nucleotide sequence spanning the exon 5 of the isotype 1 β -tubulin gene retained in the filarial genomes, whereas in second-round PCR, two separate reactions containing the primer sets specific for the alleles were performed. The BZ-susceptible homozygous SS allele yielded a 174 bp and duplex 174 and 108 bp. The BZ-susceptible heterozygous Sr allele yielded duplex DNA fragments of 174 plus 117 bp and 174 plus 108 bp. The BZ-resistant homozygous rr allele yielded duplex 174 plus 117 bp and a 174 bp. The technique that specifically amplified all the target genomes originally obtained from microfilaremic blood samples was tested to evaluate the specificity and sensitivity by using a ten-fold serially diluted filarial gDNAs. As for internal controls, gDNA templates from infected and uninfected blood samples of humans, dogs, and cats were used. The gDNA templates from *Haemonchus contortus* and other parasite infections were used positive and negative controls. When examined for each filarial genome, all PCR reactions corresponded to the detectable BZ-susceptible homozygous SS allele, which was authentically derived from the exon 5 of β -tubulin gene based on sequencing and the analysis of the homologous sequences. Furthermore, the advancement of the A-PCR will augment diagnosis and monitoring of BZ susceptibility/resistance in the wild populations of the filariids, as well as molecular xenomonitoring of any larval stages of the filariids present in filariasis vectors.

3. ตัวอย่างการตรวจยืนยันการเกิดโรคและการนำเสนอองค์ความรู้ให้กับสำนักงานป้องกันและควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดชลบุรี

A Report of Laboratory-Confirmed Blood Examination of Unknown *Brugia*-Like Microfilaria Isolate from a Rayong Patient

Adisak Bhumiratana

Dept. Parasitology and Entomology, Fac. Public Health, Mahidol Univ.

Apiradee Intarapuk

Dept. Clinics, Fac. Veterinary Medicine, Mahanakorn Univ. of Technology

1

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

A: Microscopic Analysis of Comparative Morphology of Microfilaria

Unknown *Brugia*-like microfilaria

B. malayi

B. pahangi

Wuchereria bancrofti

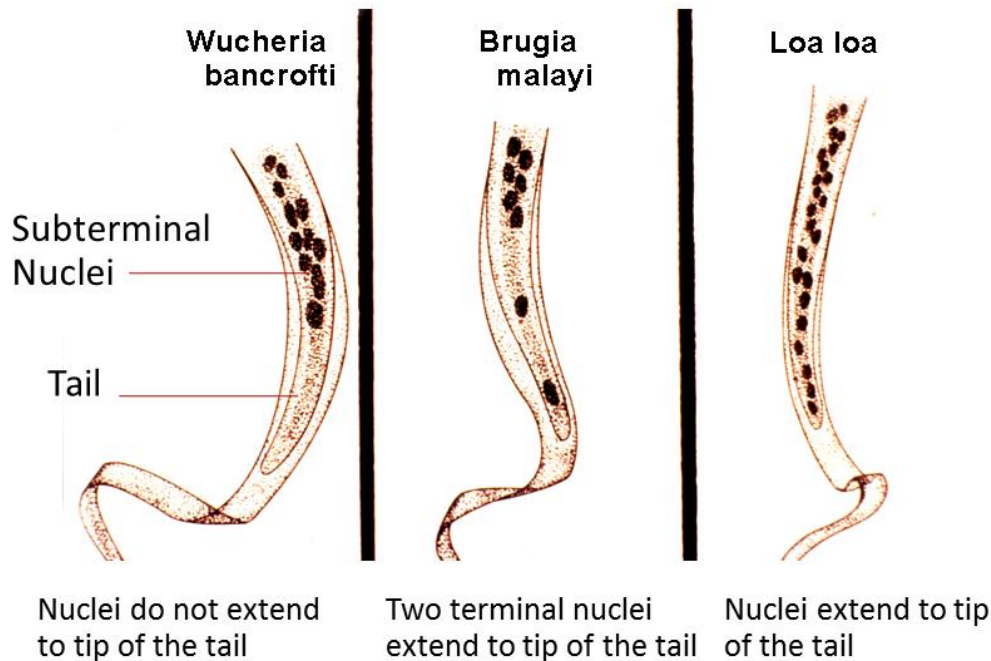
Dirofilaria immitis

Mansonella-like microfilaria

2

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

Nuclei tail of microfilaria



© 2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

Unknown *Brugia*-like microfilaria isolate obtained from a Rayong patient

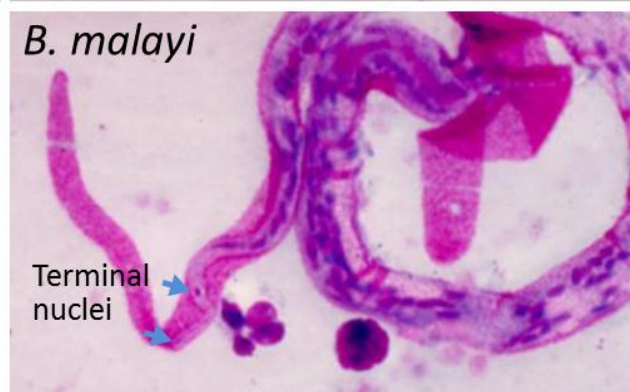
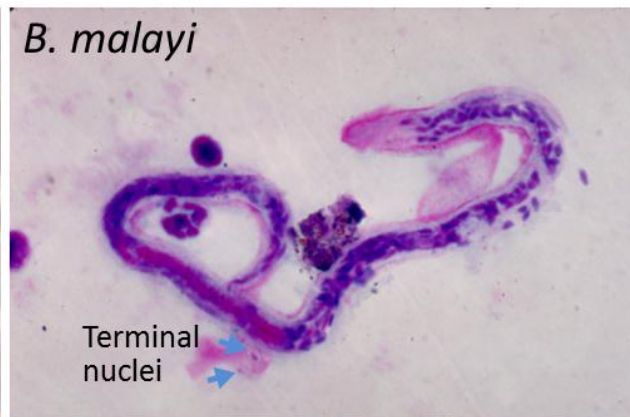


- Sheath stains strongly
- Nuclei in the body are coarse and crowded
- Body has irregular curves and can take on a corkscrew appearance
- **Terminal nuclei extending to tip of the tail are unclear**

4 © 2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk



Unknown
Brugia-like
microfilaria



5

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

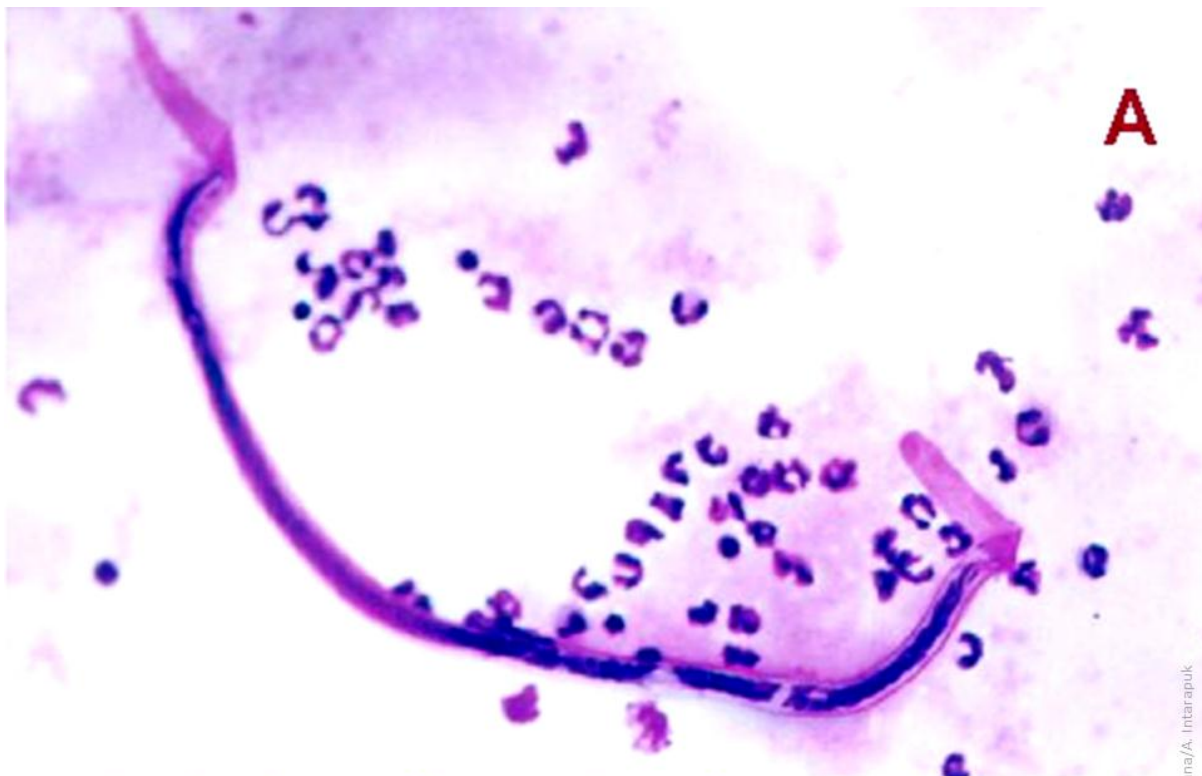


Unknown
Brugia-like
microfilaria



6

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk



Sheathed microfilaria isolate of nocturnally subperiodic *Brugia pahangi*

7

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk



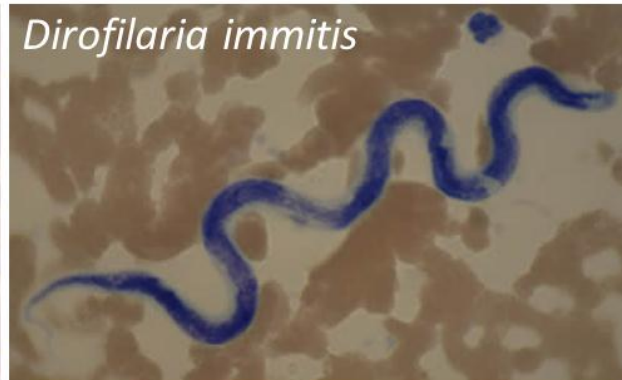
Sheathed microfilaria isolate of nocturnally periodic *Wuchereria bancrofti*

8

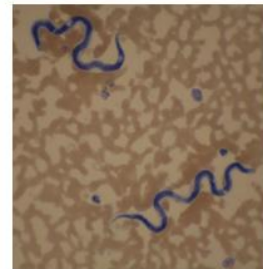
2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk



Unknown
Brugia-like
microfilaria



Dirofilaria immitis



©

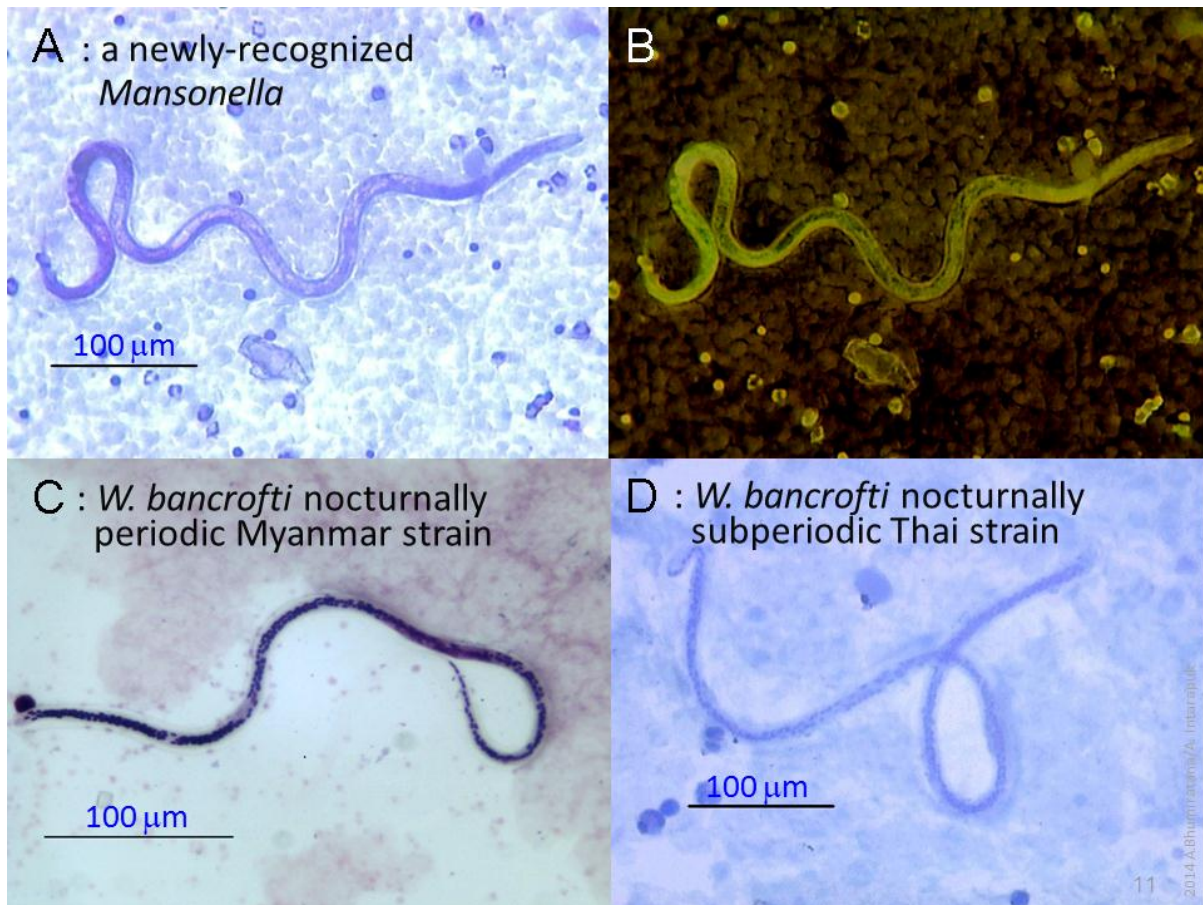
2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk



Unknown
Brugia-like
microfilaria



A) *Mansonella*-like microfilaria



Thick Blood Films of Venous Bloods of Suspected Patient and Parents



Unknown
Brugia-like
microfilaria

- Post-treatment day blood samples (60 ul each) of suspected patient are negative with Giemsa-stained thick blood films
- Day blood samples of parents are also negative
- **Post-treatment night blood sample of the patient as well as pre-treatment one are not available for testing**
- All samples were tested 7 Feb 2014, a day after receiving the samples

B: PCR Analysis of Microfilaria-Positive Blood Samples

Unknown *Brugia*-like microfilaria

B. malayi

B. pahangi

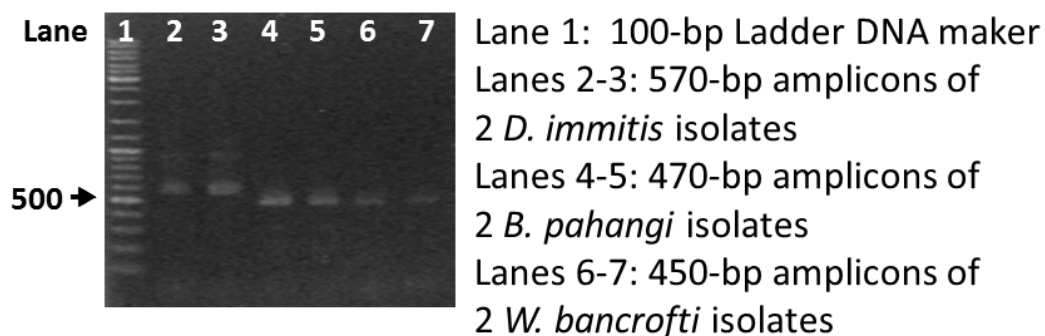
Wuchereria bancrofti

Dirofilaria immitis

13

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

Pan-specific PCR Profile* of gDNAs of Filarial Hemoparasites Isolated from Microfilaremic Bloods Served as Reference

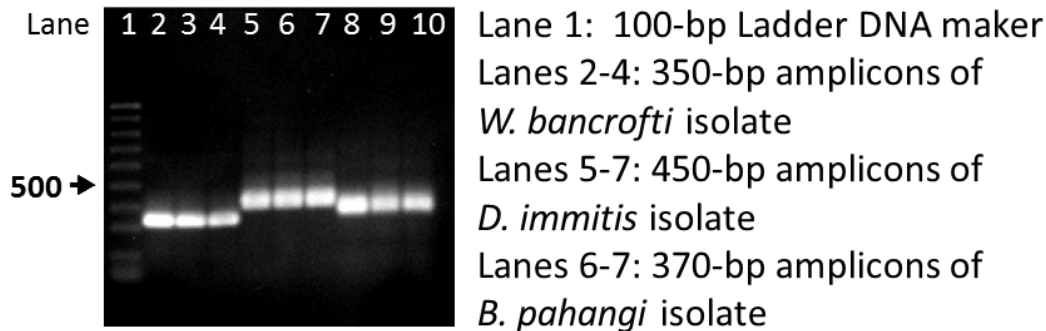


*Pan-specific PCR—of which universal primer set specifically amplifies internal transcribed spacer I of orthologous rRNA genes of filarial hemoparasites—could yield heterogeneous amplicons with expected sizes (bp) in first round reaction

14

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

Pan-specific PCR Profile* of gDNAs of Filarial Hemoparasites Isolated from Microfilaremic Bloods Served as Reference

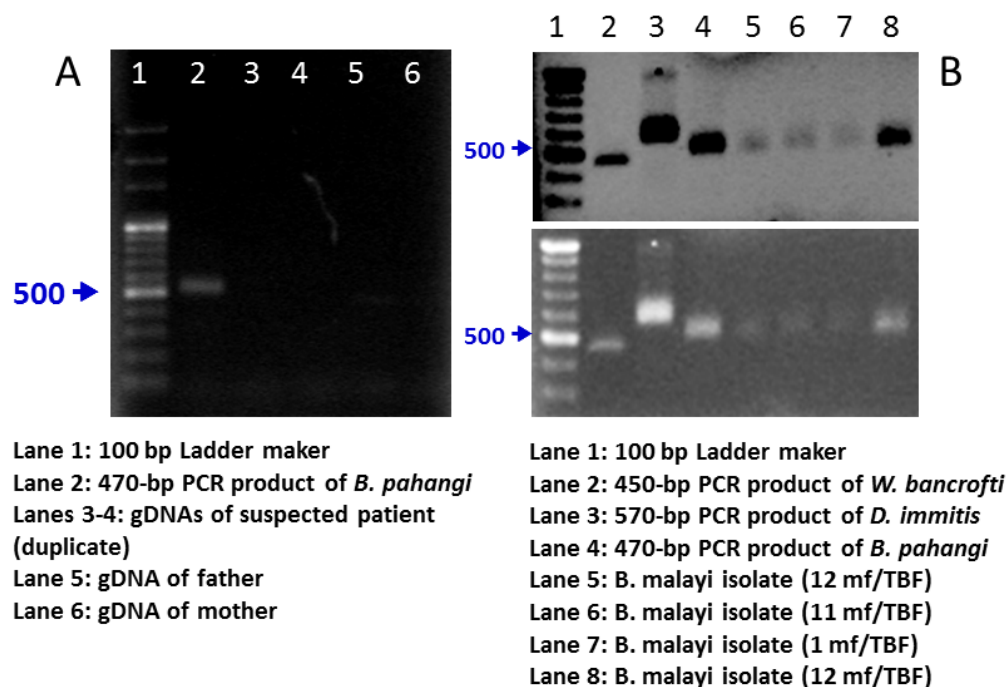


*Pan-specific PCR—of which universal primer set specifically amplifies internal transcribed spacer I of orthologous rRNA genes of filarial hemoparasites—could yield heterogeneous amplicons with expected sizes (bp) in second round reaction

15

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

Pan-specific PCR Profile (First-round) of gDNAs Isolated from Bloods of Suspected Patient and Parents (A), Compared to that of *B. malayi* Patient Isolates from Narathiwat (B)



16

2014 A.Bhumiratana/A. Intarapuk

Molecular Marker-Based PCR of Venous Bloods of Suspected Patient and Parents



Unknown
Brugia-like
microfilaria

- Genomic DNAs isolated from post-treatment day blood samples (200 ul each) of suspected patient are negative using PCR based on universal primers specific for filarial hemoparasites
- gDNAs of day blood samples of parents are also negative
- **gDNAs of post-treatment night blood sample of the patient as well as pre-treatment one are not available for testing**
- All samples were tested 11 Feb 2014, 5 days after receiving the samples