



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

Comparative assessment of the *in vitro* sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine and ivermectin, and their combinations against nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat)

โดย ผศ.ดร.ม่องศรี ทิพวงศ์โกศล และคณะ

มิถุนายน พศ. 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Comparative assessment of the *in vitro* sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine and ivermectin, and their combinations against nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------|---|
| 1. ผศ.ดร.ผ่องศรี ทิพวงโกศล | ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 2. รศ.เวช ชูโชติ | ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. ศ.ดร.เกศรา ณ บางช้าง | คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยซึ่งเป็นผู้สนับสนุนทุนวิจัยในเรื่องนี้ ขอขอบพระคุณ ผศ.ทพ. นิพนธ์ ตูวานนท์ อธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, รศ.นพ. ปิยะ เนตรวิเชียร อดีตคณบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ศ.นพ. สุพจน์ วุฒิการณ์ คณบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ รศ.ดร.นพ. พิชาดิ อุปรานุเคราะห์ หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุญาตและสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณกองทุนพัฒนาคณะส่วนส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ร่วมสนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. อัจฉรียา จิตต์ภักดิ์, อาจารย์เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์ และ อาจารย์ดวงรัตน์ รียอง ที่เป็นผู้สนับสนุนการวิจัย ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คุณบุษบก ก้นทะลือ, คุณณัญชนาฏ ธิจักร นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิจัยพี่เลี้ยง รศ. เวช ชูโชติ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ศ.ดร. เกศรา ณ. บางช้าง คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ช่วยดูแลและให้คำปรึกษาในด้านงานวิจัย

บทคัดย่อ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	PDF/51/2544
ชื่อโครงการ	การเปรียบเทียบผลของยา albendazole, diethylcarbamazine, ivermectin และยาผสมต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด nocturnally subperiodic <i>Brugia malayi</i> (สายพันธุ์นราธิวาส) ในหลอดทดลอง
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน	ผศ.ดร.ผ่องศรี ทิพวงโกศล ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Email address	ptippawa@gmail.com, cmu.ac.th
ระยะโครงการ	2 ปี
เนื้อหางานวิจัย	

การทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว ivermectin (IVM), diethylcarbamazine (DEC) และยา albendazole (ALB) และยาผสม ALB+IVM, ALB+DEC ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* (สายพันธุ์นราธิวาส) ได้ทำการทดลองในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน นอกเหนือจากนี้การศึกษาโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) และแบบส่องผ่าน (TEM) ได้นำมาใช้ในการศึกษาดูฤทธิ์ของยาโดยดูการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของผิวภายนอกของตัวอ่อนและรายละเอียดภายในของตัวอ่อน ยาเดี่ยว IVM และยา DEC ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M ถึง 10^{-7} M สามารถลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อนได้ แต่ยาเดี่ยว ALB ที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อน การศึกษาโดยใช้ SEM และ TEM พบว่ายาเดี่ยว และยาผสม ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของพยาธิตัวอ่อน อย่างไรก็ตามยา IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M สามารถฆ่าพยาธิตัวอ่อนได้ภายใน 2 ชั่วโมง และพบว่าผิวของพยาธิตัวอ่อนมีลักษณะเป็นร่องลึกเมื่อดูด้วย SEM ยาผสมทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M และ 10^{-6} M/ 10^{-6} M สามารถลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อนได้ดีกว่าการใช้ยาเดี่ยว และ พบว่ายาผสม ALB+DEC ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M/ 10^{-6} M มีประสิทธิภาพดีกว่ายาผสม ALB+IVM จากผลจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าประสิทธิภาพของยาผสมให้ผลสอดคล้องกับผลของยาที่ใช้ในคน

คำหลัก *Brugia malayi*, ivermectin, diethylcarbamazine, albendazole

Abstract

Abstract

Project Code : PDF/51/2544

Project Title: Comparative assessment of the *in vitro* sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine and ivermectin, and their combinations against third stage larva of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain)

Investigator : Assistant Professor Dr. Pongsri Tippawangkosol
Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Email address: ptippawa@mail.med.cmu.ac.th

Project period: 2 years

Content

The antifilaricidal drugs of ivermectin (IVM), diethylcarbamazine (DEC) and albendazole (ALB) alone or in combination against infective third stage larva (L3) of nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* (Narathiwat strain) were performed in an *in vitro* sensitivity test for 7 days in order to observe the efficacy of these drugs. In addition, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) was also examined the morphological change of this larva after treated with drug both used alone and in combination. IVM and DEC alone, but not ALB alone, at concentrations of 10^{-5} to 10^{-7} M, reduced larval motility after 7 days cultivation. No morphological change observed by SEM and TEM when used both drugs alone and their combinations at a concentration of 10^{-5} M. The minimal lethal concentration (MLC) of IVM was 10^{-4} M within 2 hours and SEM study showed damage to the cuticular surface of the larva. Both drug combinations (ALB+IVM and ALB+DEC), at concentrations of 10^{-6} M/ 10^{-6} M and 10^{-5} M/ 10^{-5} M, were effectively better than each drug used alone at those concentrations. ALB+DEC, at a concentration of 10^{-6} M/ 10^{-6} M, seemed to be effective better than ALB+IVM. The result indicated that the *in vitro* sensitivity of both drug combinations correlated with other previous result form *in vivo* study.

Key words : *Brugia malayi*, ivermectin, diethylcarbamazine, albendazole

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ณ
เนื้อหาวิจัย	1
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
1. แหล่งของพยาธิไมโครฟิลาเรีย	3
2. การเพาะเลี้ยงยุงลายชนิด <i>Aedes togoi</i>	3
3. วิธีการให้ยุงกินเลือดแมวที่มีพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> โดยวิธี artificial membrane feeding และการเก็บยุงหลังจากที่กินเลือดแล้ว	4
4. การผ่าตัดยุงเพื่อเก็บตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i>	5
5. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> ในหลอดทดลอง และการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยวและยาผสมต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ในหลอดทดลอง (<i>In vitro</i> sensitivity test)	5
6. การศึกษารูปร่างลักษณะและการวัดขนาดของตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพยาธิที่ไม่ได้รับยาและกลุ่มพยาธิที่ได้รับยาเดี่ยวและยาผสม	7
7. การศึกษารูปร่างลักษณะของตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> ในกลุ่มพยาธิที่ไม่ได้รับยาและกลุ่มพยาธิที่ได้รับยาเดี่ยวและยาผสมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM)	8

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีการทดลอง	8
8. การศึกษารูปร่างลักษณะของตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> ในกลุ่มพยาธิที่ไม่ได้รับยาและกลุ่มพยาธิที่ได้รับยาเดี่ยวและยาผสมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM)	
9. การวัดระดับเอ็นไซม์ acetylcholinesterase (AChE)	8
ผลการศึกษา	
1. การเพาะเลี้ยงยุงลายชนิด <i>Aedes togoi</i>	10
2. ให้ยุงกินเลือดแมวที่มีพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> โดยวิธี artificial membrane feeding และการเก็บยุงหลังจากที่กินเลือดแล้ว	10
3. การผ่าตัดยุงเพื่อเก็บตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i>	10
4. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> ในหลอดทดลอง และการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยวต่อตัวอ่อนระยะที่ 3	10
5. ผลของยา ivermectin (IVM) ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	11
6. ผลของยา diethylcarbamazine (DEC) ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	11
7. ผลของยา albendazole (ALB) ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	11
8. ผลของยาผสม ALB+IVM เมื่อเปรียบเทียบกับยาเดี่ยว	16
9. ผลของยาผสม ALB+DEC เมื่อเปรียบเทียบกับยาเดี่ยว	16
10. เปรียบเทียบผลของยาผสม ALB+DEC และยา ALB+IVM	20
11. ผลการวัดขนาดของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลการศึกษา	
12. รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	24
13. รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	24
14. ผลการวัดระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE)	25
บทวิจารณ์	44
เอกสารอ้างอิง	48
Output จากโครงการวิจัย	54
ภาคผนวก : manuscript	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยา ivermectin (IVM) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	12
2	Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยา diethylcarbamazine (DEC) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	13
3	Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยา albendazole (ALB) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	14
4	การเปรียบเทียบค่า Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยาเดี่ยว ivermectin (IVM), albendazole (ALB) และยาผสม ALB/IVM ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	17
5	การเปรียบเทียบค่า Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยาเดี่ยว diethylcarbamazine (DEC), albendazole (ALB) และยาผสม ALB/DEC ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	18

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
6	การเปรียบเทียบค่า Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียนชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยาผสมระหว่างยา albendazole ผสมกับยา diethylcarbamazine (ALB/DEC) และยา albendazole ผสมกับยา ivermectin (ALB/IVM) ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	21
7	เปรียบเทียบการวัดขนาดของตัวอ่อน (mean $\pm$ SD/range, μ m) ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียนชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาเดี่ยวและยาผสมหลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยาในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน, จำนวนตัวอ่อนที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 20 ตัว	23

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ค่า motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยาเดี่ยว (a) ivermectin [IVM]; (b) diethylcarbamazine [DEC] และ (c) albendazole [ALB] ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	15
2	ค่า motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพยาผสม (a) ยา albendazole (ALB) ผสมกับยา ivermectin (IVM) [A/I], (b) ยา albendazole (ALB) ผสมกับยา diethylcarbamazine (DEC) [A/D] และ (c) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาผสม A/D และ A/I ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน	19
3	บริเวณส่วนหัวของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน; [A] และ [B] ส่วนปาก (mouth, M), ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papillae, IP), ปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papillae, OP); [C] ภาพกำลังขยายใหญ่ของส่วนผิวบริเวณส่วนหัว; [D] ลักษณะเส้นลายตามขวางบริเวณผิวส่วนหัว	26

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4	บริเวณส่วนหางตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน; [E], [H] ปุ่มด้านข้าง (ventrolateral papillae, VLP) และทวารหนักมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (anus, A); [F], [I] ภาพกำลังขยายใหญ่ของทวารหนัก; [G], [J] ภาพกำลังขยายใหญ่ส่วนหาง, ปุ่มด้านข้าง 2 ปุ่ม (VLP), ปุ่มด้านหลัง 1 ปุ่ม (dorsolateral papilla, DLP)	27
5	บริเวณผิวหนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน แสดงลักษณะเส้นลายตามขวาง (transversed annulations); [K] ผิวบริเวณรอบๆ ทวารหนัก; (L) ผิวบริเวณส่วนหัว; [M] ผิวบริเวณ	28
6	ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการทดสอบกับยาเดี่ยวในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน [O], [R] และ [P] ผิวส่วนหัวมีปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papillae, OP), ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papillae, IP) และปาก ทดสอบกับยา ALB ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M [S] ส่วนหางมีปุ่มด้านข้าง (ventrolateral papillae, VLP) 2 ปุ่ม และปุ่มด้านหลัง (dorsoterminal papilla) 1 ปุ่ม ทดสอบกับยา DEC ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M [Q] ผิวส่วนหัว และ [T] ผิวกลางลำตัวที่มีเส้นลายตามขวางหลังจากทดสอบกับยา IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M	29

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
7	การทดสอบประสิทธิภาพของยาผสม (ALB/IVM และ ALB/DEC) ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS, [U] ส่วนหางมีปุ่มด้านข้าง 2 ปุ่ม (ventrolateral papillae, VLP) และปุ่มด้านหลัง 1 ปุ่ม (dorsoterminal papilla, DTP) และ [W] ผิวบริเวณกลางลำตัวเมื่อทดสอบกับยาผสม ALB/DEC ความเข้มข้น $10^{-5}/10^{-5}$ M; [V] ส่วนหัวมีปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papilla, OP) ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papilla, IP) และปาก (mouth, M) และ [X] ผิวบริเวณกลางลำตัวแสดงเส้นลายตามขวางเมื่อทดสอบกับยาผสม ALB/IVM ความเข้มข้น $10^{-5}/10^{-5}$ M	30
8	การทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว ivermectin (IVM) ความเข้มข้น 10^{-4} M ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP <i>Brugia malayi</i> ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS, [Y] ผิวบริเวณกลางลำตัว; [Z] ภาพขยายใหญ่บริเวณผิวกลางลำตัวแสดงส่วนผิวที่เป็นร่องและเส้นลายตามขวางหายไป	31

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
9	ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (A) แสดงช่องว่างภายในลำตัว (pseudocoelom, Ps), (B) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M) และภายในลำตัวมีเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)	32
10	ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (C) แสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M) (D) ภาพขยายใหญ่แสดงส่วนผิวหนังลำตัวทั้ง 3 ชั้น และ basement membrane (B)	33
11	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (E) ภาพตัดตามขวาง (F) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H) และผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M)	34
12	ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (G) ภาพขยายใหญ่แสดงส่วนผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), (H) แสดงช่องว่างภายในลำตัว (pseudocoelom, Ps), ผิวชั้นนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M) และภายในลำตัวมีเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)	35

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยา diethylcarbamazine ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (I) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนบริเวณลำไส้ (J) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M), ช่องว่างภายในลำตัว (pseudocoelom, Ps), ลำไส้ (intestine, I) และช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu)	36
14	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยา diethylcarbamazine ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (K) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนบริเวณลำไส้ แสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ชั้นกลาง (hypodermis, H), ชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M), ลำไส้ (intestine, I), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu), และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom) (L) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น	37
15	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยา ivermectin ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (M) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนบริเวณลำไส้แสดงลำไส้ (intestine, I), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu) และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps), (N) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น และเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)	38

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยา ivermectin ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (O) และ (P) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C; hypodermis, H; muscle, C) และเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)	39
17	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยาผสม albendazole+diethylcarbamazine (ALB+DEC) ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (Q) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M), ลำไส้ (intestine, I), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu) และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps), (R) ภาพขยายใหญ่	40
18	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยาผสม albendazole+diethylcarbamazine (ALB+DEC) ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (S) และ (T) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C; hypodermis, H; muscle, C), ช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps) และเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)	41

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยาผสม albendazole+ivermectin (ALB+IVM) ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (U) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงลำไส้ (intestine, L), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu) และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps) (V) แสดงผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C, hypodermis, H; muscle, C)	42
20	ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทดสอบกับยา albendazole ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (W) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงลำไส้ (intestine, L), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu), ช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps) และผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C; hypodermis, H; muscle, C)	43

เนื้อหางานวิจัย

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

โรคเท้าช้างเป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขในประเทศไทยซึ่งมีสาเหตุมาจากพยาธิฟิลาเรียชนิด *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* (WHO, 1992) องค์การอนามัยโลกได้จัดโรคเท้าช้างเป็นโรคที่เป็นสาเหตุที่ก่ออันตรายต่อคนเป็นอันดับที่ 2 โดยมีผู้ที่ติดเชื้อทั่วโลกประมาณ 120 ล้านคน และมีผู้ที่เสี่ยงต่อโรคนี้ประมาณ 1,100 ล้านคน (Addiss, 1998) ในประเทศไทยพยาธิฟิลาเรียชนิด *W. bancrofti* จะระบาดในแถบภาคตะวันตก และ พยาธิฟิลาเรียชนิด *B. malayi* จะระบาดในภาคใต้ (Harinasuta, 1970; Division of Filariasis, 1995; Guptavaij et al, 1977) การควบคุมโรคเท้าช้างได้เริ่มทำตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 และพบว่าแนวโน้มของผู้ที่ติดเชื้อมีปริมาณลดลงจาก 6% ลดลงถึงน้อยกว่า 1% ในปี พ.ศ. 2541 (Division of Filariasis, 1998) ถึงแม้ว่าการควบคุมโรคเท้าช้างจะได้ผลดีแต่ก็ยังพบการระบาดของโรคอยู่ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อเพิ่ม การศึกษาในปัจจุบันพบว่ามียุงรำคาญชนิด *Culex quinquefasciatus* สามารถเป็นพาหะของพยาธิฟิลาเรียอีกชนิดหนึ่งของ *W. bancrofti* โดยเชื้อนี้ถูกนำเข้ามาโดยแรงงานชาวพม่าและอาจเป็นสาเหตุให้มีการแพร่ระบาดในประเทศไทย (Division of Filariasis, 1996) พยาธิฟิลาเรียในพื้นที่ส่วนใหญ่ของโลกรวมทั้งประเทศไทยจะมีลักษณะเป็นแบบ nocturnally periodic ตัวพยาธิไมโครฟิลาเรียจะออกมาในกระแสเลือดในเวลากลางคืนเท่านั้น (WHO, 1999) ดังนั้นเมื่อตรวจเลือดเพื่อหาตัวพยาธิจากฟิล์มเลือดที่เจาะจากผู้ป่วยในตอนกลางวันพบว่าจะไม่พบพยาธิไมโครฟิลาเรียในผู้ป่วยที่เป็นโรคเท้าช้างที่ไม่มีพยาธิไมโครฟิลาเรียออกมาในกระแสเลือด หรือ ผู้ป่วยที่มีพยาธิไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดต่ำ (Poole et al, 1990; Chanteau et al, 1991) การตรวจเลือดเพื่อหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนก็เป็นวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรค แต่การตรวจเลือดโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) จะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความแม่นยำสูงและเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

การใช้ยารักษาโรคเท้าช้างก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยลดจำนวนไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดและลดการแพร่ระบาดของโรคได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มียาขนานสั้นที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวเต็มวัยของพยาธิได้ (Mc Reynolds et al, 1993) แต่อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาฆ่าพยาธิฟิลาเรียอย่างมากมาย และพบว่ายาผสม ALB+DEC และ ALB+IVM มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัย (Bockarie et al, 1998; Dunyo et al, 2000;

Ismail *et al.*, 1998; 2001; Nicolas *et al.*, 1997; Ottensen, 1997; Shenoy *et al.*, 1998; 1999; 2000; 2002; Supali *et al.*, 2002) และยาที่มีประสิทธิภาพและได้รับการแนะนำให้ใช้ในการรักษาโรคเท้าช้างคือยาผสมระหว่างยา albendazole (400 มิลลิกรัม) ให้กินร่วมกับยา ivermectin (200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม) หรือให้กินร่วมกับยา diethylcarbamazine (6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม) (WHO, 1994; Ottensen *et al.*, 1997) ยานานี้มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดได้และพบว่าผลข้างเคียงน้อย มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในการฆ่าพยาธิไมโครฟิลาเรียและพยาธิตัวแก่ในคนและในหลอดทดลอง (Dreyer *et al.*, 1998; Dunyo *et al.*, 2000; Figueredo-Silva *et al.*, 1996; Gayral *et al.*, 1989; Nicolas *et al.*, 1997; Noroes *et al.*, 1997; Shenoy *et al.*, 1999; 2000; 2002) แต่พบว่าการศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในการฆ่าตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือ ระยะติดต่อในหลอดทดลองมีจำนวนน้อย (Deverre *et al.*, 1989; Gayral *et al.*, 1989) ความก้าวหน้าในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาโดยตรงต่อตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *B. malayi* สายพันธุ์นราธิวาส ในประเทศไทยยังไม่มีพัฒนามากมายเนื่องจากยังขาดแคลนกลุ่มวิจัยที่มีความชำนาญ มีประสบการณ์ และการทดลองที่ต้องใช้สัตว์ทดลองมีราคาแพง โดยมีรายงานพบว่า ลิง และ หนู สามารถติดเชื้อนี้ได้และเป็นแหล่งสะสมเชื้อที่สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้ แต่เนื่องจากการทดลองที่อาศัยสัตว์ทดลองมีราคาแพง และไม่เหมาะสมสำหรับห้องทดลองที่มีพื้นที่ขนาดเล็ก การศึกษาในหลอดทดลองสามารถนำมาใช้ในการดูประสิทธิภาพของยาโดยตรงต่อตัวพยาธิ หรือ มีประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น ชีวเคมี ชีวโมเลกุล ภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นต้น

การศึกษาประสิทธิภาพของยาของยาเดี่ยว albendazole, ivermectin, diethylcarbamazine และยาผสม ALB+DEC และ ALB+IVM ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *B. malayi* ในครั้งนี้เพื่อดูผลของยาโดยตรงต่อตัวพยาธิ โดยศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของพยาธิจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM) และ แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) การศึกษาในหลอดทดลองยังสามารถนำสิ่งที่พยาธิขับออกมา (excretory-secretory products) เอาไปใช้ในการเตรียมแอนติบอดีสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้ ผลการทดลองรวมทั้งข้อมูลที่ได้จากการทำในหลอดทดลองจะมีประโยชน์ต่อการควบคุมและ/หรือการกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปได้

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง

1. แหล่งของพยาธิไมโครฟิลาเรีย

แหล่งของพยาธิไมโครฟิลาเรียเพื่อใช้ในการทดลองได้มาจากแมวที่ติดเชื้อจากแหล่งระบาดของพยาธิฟิลาเรียชนิด nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* ในจังหวัดนราธิวาส แล้วนำแมวมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. การเพาะเลี้ยงยุงลายชนิด *Aedes togoi* จำนวนมาก

ยุงลายชนิด *Aedes togoi* เป็นยุงที่จับได้จากจังหวัดจันทบุรี และได้นำยุงมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงยุงของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 จากการทดลองของ Choochote et al (1987) พบว่ายุงชนิดนี้เป็นยุงที่สามารถยอมนับพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *B. malayi* ได้ดี วิธีการเพาะเลี้ยงยุงจะทำตามวิธีมาตรฐานของ Choochote et al (1981) โดยนำไข่ยุงลายชนิด *Ae. togoi* ที่วางไข่บนกระดาษกรองมาฟักให้เป็นตัวอ่อนในถ้วยที่มีน้ำอยู่ 2-3 วัน นำตัวอ่อนมาเลี้ยงต่อในถาดเลี้ยงยุงขนาด 25x36x6 ลูกบาศก์เซนติเมตรซึ่งมีน้ำอยู่ประมาณ 3 ใน 4 ของถาด (1,500 มิลลิลิตร) 1-2 วัน หลังจากนั้นทำการคัดแยกลูกน้ำยุงที่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (L1) ประมาณ 150 ตัวต่อถาดโดยห้องที่ทำการเลี้ยงยุงนั้นจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 27 ± 2 °C และให้อาหารโดยใช้อาหารสุนัขบดหยาบประมาณ 0.5 กรัมต่อลูกน้ำ 1 ถาดโดยให้วันละ 1 ครั้ง และทำการเปลี่ยนน้ำทุกๆ 2 วัน ใช้เวลาประมาณ 5-10 วัน ลูกน้ำยุงที่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 (L4) จะเจริญเป็นตัวโม่ง (pupae) วันที่ 14-17 หลังจากฟักออกจากไข่ จากนั้นจึงใช้หลอดดูด (dropper pipette) ดูดตัวโม่งใส่ลงในถ้วยพลาสติกที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ แล้วนำไปใส่กรงเลี้ยงยุงขนาด 30x30x30 ลูกบาศก์เซนติเมตรกรงละประมาณ 400-500 ตัว จากนั้นตัวโม่งจะใช้เวลา 2-5 วัน เพื่อจะเจริญเป็นตัวเต็มวัยโดยจะเลี้ยงยุงด้วย 10% น้ำตาลซูโครสผสมกับ multivitamin syrup และ 2% antimicrobial agent (10,000 units/ml ของ penicillin G solution, 10,000 µg/ml ของ streptocycin disulfate และ 25 µg/ml of amphotericin B) โดยชุบใส่ไม้ที่พันสำลีแล้วนำไปเสียบในขวดขนาดเล็กสำหรับให้ยุงดูดกินน้ำหวาน โดยเปลี่ยนน้ำหวานที่ผสมวิตามินทุกๆ 2 วันโดยห้องที่เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 27 ± 2 °C และความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% เลี้ยงยุงตัวเต็มวัยให้มีอายุประมาณ 7 วัน แล้วจึงทำการอดอาหารยุง (fasting) ประมาณ 18 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำยุงมากินเลือดแมวที่ติดเชื้อ NSP *Brugia malayi*

3. ให้งูกินเลือดแมวที่มีพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* โดยวิธี artificial membrane feeding และการเก็บยุงหลังจากที่กินเลือดแล้ว

เจาะเลือดแมวที่มีเชื้อพยาธิฟิลาเรียชนิด nocturnally subperiodic *Brugia malayi* โดยใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตรพร้อมเข็มเบอร์ 21 เจาะเลือดแมวที่เส้นเลือดดำบริเวณขา (cephalic vein) ซึ่งภายใน syringe จะเคลือบด้วยสาร heparin 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดโดยจะนำเลือดที่เจาะได้นี้ไปให้งูกินโดยวิธี artificial membrane feeding และนำไปหาค่าความหนาแน่นของ microfilariae ในเลือด 20 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาณของ microfilariae ที่พอเหมาะต่อการ feeding จะอยู่ระหว่าง 40-60 microfilariae ต่อเลือด 20 ลูกบาศก์มิลลิลิตร ถ้าหากเลือดแมวมีความหนาแน่นของ microfilariae มากจะนำเลือดที่เจาะได้มาปรับให้เจือจางด้วยน้ำยา Hank Balance Salt Solution (HBS) จากนั้นเตรียมยุง *Ae. togoi* ที่ทำการอดอาหารแล้ว 18 ชั่วโมงมากินเลือดแมวด้วยวิธี artificial membrane feeding ตามวิธีของ Chomcharn (1970) ซึ่งจะใช้ parafilm เป็น membrane อุปกรณ์ของเครื่อง artificial membrane feeding ประกอบด้วย cylindrical blood chamber เป็นที่สำหรับใส่น้ำเพื่อรักษาอุณหภูมิของเลือดแมวให้มีอุณหภูมิประมาณ 37 °C โดยอาศัยน้ำจาก water bath ที่มีอุณหภูมิ 39-40 °C ไหลเวียนผ่าน water jacket เพื่อรักษาอุณหภูมิของเลือดให้คงที่ โดยด้านข้างของ water jacket นั้นจะมีท่อสำหรับให้น้ำจาก water bath ผ่านเข้ามาและผ่านออกไป โดยผ่านท่อที่อยู่อีกด้านหนึ่งของ water jacket ซึ่งท่อนี้จะผูกติดกับสายยางที่ทำหน้าที่สำหรับลำเลียงน้ำจาก water bath ขึ้นมา ยุงจะกินเลือดผ่าน parafilm แทนการกินเลือดจากตัวแมวโดยตรงโดยปากของยุงสามารถเจาะทะลุผ่าน parafilm ซึ่งเป็นการเลียนแบบการกินเลือดจากผิวหนังแมวโดยตรง

เตรียมยุงโดยดูดยุงจากกรงเลี้ยงยุงมาใส่ถ้วยใส่ยุง (paper cup) ซึ่งมีรูด้านข้างถ้วยเพื่อใช้สำหรับดูดยุงและด้านบนของถ้วยจะมีตาข่ายปิดปากถ้วยเพื่อป้องกันยุงหลุดหนี จากนั้นนำถ้วยที่บรรจุยุงโดยนำด้านที่มีตาข่ายไปแตะกับ parafilm จากนั้นใส่เลือดแมวเข้าไปใน cylindrical blood chamber โดยให้ปากถ้วยสัมผัสแนบพอดีกับ parafilm ซึ่ง parafilm นั้นจะต้องบางที่สุดเพื่อให้ปากยุงสามารถเจาะทะลุผ่าน parafilm เพื่อกินเลือดได้ซึ่งเป็นการเลียนแบบให้เหมือนกับเวลาที่ยุงกินเลือดผ่านผิวหนังของคน โดยพื้นที่ของแผ่น parafilm สำหรับให้งูกินเลือดจะมีขนาด 3.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นปล่อยให้ยุงกินเลือดจนอิ่มซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที จากนั้นดูดแยกยุงที่กินเลือดแล้วประมาณ 6-8 ตัวใส่ไว้ในถ้วยใส่ยุงขนาด 6 x 7 เซนติเมตร แล้วนำไปเก็บในห้องเลี้ยงยุงที่ถูกควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมโดยให้งูกินน้ำหวานและน้ำตาลตามปกติเพื่อรอทำการผ่าตัดยุงเพื่อหาตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) ในวันที่ 12 นับจากให้งูกินเลือดแมว

4. การผ่าตัดยุงเพื่อเก็บตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi*

หลังจากให้ยุง *Ae. togoi* กินเลือดแมวที่มี microfilariae แล้วเลี้ยงยุงต่ออีกประมาณ 12 วัน จะทำการผ่าตัดยุงเพื่อเก็บ L3 ซึ่งตัวอ่อนระยะนี้เป็นตัวอ่อนระยะติดต่อที่ทำให้ยุงสามารถเป็นพาหะในการแพร่กระจายเชื้อได้ วิธีการผ่ายุงจะใช้ตามวิธีของ Suwan *et al* (1993) นำยุงมาสลบด้วย diethyl ether แล้วใช้เข็มขนาดเล็กปักบริเวณอกของยุง ดึงขา และ ปีกของยุงออกเพื่อป้องกันยุงบินหนีและสะดวกในการผ่าหลังจากนั้นนำยุงที่ผ่าวางบนสไลด์ที่หยด 0.85% normal saline solution (NSS) และทำการแยกยุงออกเป็นส่วนๆ นำส่วนที่แยกได้นี้ไปส่องด้วยกล้อง dissecting microscope เพื่อตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) โดยใช้เข็มขนาดเล็กดึง L3 ขึ้นมาแล้วนำไปล้างใน petri dishes ขนาด 35x10 มิลลิเมตร ที่มี HBS ผสมกับ antimicrobial agent (10,000 units/ml ของ penicillin G solution, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ ของ streptocycin disulfate และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ของ amphotericin B) ใช้เข็มขนาดเล็กดึง L3 มาใส่ไว้ใน culture dishes (24-wells) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับ antimicrobial agent เพื่อทำการเพาะเลี้ยงและทดสอบประสิทธิภาพของยาในหลอดทดลองต่อไป

5. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลอง และการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยวต่อตัวอ่อนระยะที่ 3

5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยง L3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลองประกอบด้วยอัตราส่วนที่เท่ากันโดยปริมาตร 1:1 (v/v) ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NCTC-135 (Sigma) และ Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM; Sigma) ผสมกับ 20 % fetal bovine serum (FBS) ยา antimicrobial agent (10,000 units/ml ของ penicillin G solution, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ ของ streptocycin disulfate และ 25 $\mu\text{g/ml}$ ของ amphotericin B) และ 25 mM ของ HEPES

5.2 การเตรียมยา

ยา diethylcabamazine [N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid] citrat salt, DEC (EC No. 216696-6, Lot 79H1191) โดยละลายยา DEC (stock solution, 10^{-2} M) ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และ เตรียม working solution ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{-3} ถึง 10^{-11} M ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

ยา ivermectin B_{1a} [N,N-Diethyl-4-methyl-1-piperazinecarboxamide], IVM (EC No. 274-536-0, Lot 80k1435) ละลายยา IVM (stock solution, 10^{-2} M) ใน absolute

methanol และเตรียม working solution ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{-3} ถึง 10^{-11} M ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

ยา albendazole [Methyl-5-(propylthiol)-2-benzimidazolecarbamate], ALB ละลายยา ALB (stock solution, 10^{-2} M) ใน absolute methanol และเตรียม working solution ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{-3} ถึง 10^{-11} M ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของยาต่อ L3 ของพยาธิฟิลาเรีย ในหลอดทดลอง (*in vitro* sensitivity test)

การทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว DEC, IVM, ALB และยาผสม ALB+DEC, ALB+IVM ในการฆ่า หรือลดการเคลื่อนไหวของ L3 ของพยาธิฟิลาเรีย ชนิด NSP *Brugia malayi* สายพันธุ์นราธิวาส จะใช้ตามวิธีของ Riberu *et al* (1990) และ Yates (1994) โดยมีการดัดแปลงวิธีการทำเล็กน้อย โดย Tippawangkosol *et al* (2002) ดังนี้

ใช้เข็มขนาดเล็กเขี่ย L3 ที่แช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใน petri dishes ขนาด 35x10 มิลลิเมตร มาใส่ไว้ใน culture dishes (24-wells) หลุมละ 20 ตัว ซึ่งในแต่ละหลุมที่จะทดสอบประสิทธิภาพของยาแต่ละชนิดจะประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยอัตราส่วนที่เท่ากัน 1:1 (v/v) ของ NCTC-135 และ IMDM ที่มี 20% FBS และ antimicrobial agents ผสมอยู่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับยาแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ (IVM, DEC, ALB, ALB+DEC, ALB+IVM) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ส่วนในหลุมควบคุมจะไม่ใส่ยาลงไป โดยการทดสอบประสิทธิภาพของยาแต่ละชนิดจะทำการทดสอบซ้ำกัน 4 ครั้ง นำ culture dishes ใส่ในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบดูประสิทธิภาพของยาโดยสังเกตดูการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนหลังจากทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมงโดยใช้กล้อง dissecting microscope หลังจากนั้นทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของยาทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยไม่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การแปลผล

การแปลผลประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเคลื่อนไหว หรือ ฆ่าตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียจะใช้ relative motility value (RM) ของ Kiuchi *et al* (1994) ถ้าหากค่า RM มีค่าต่ำ แสดงว่ายามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียได้ดี และถ้าตัวอ่อนตาย ค่า RM จะมีค่าเท่ากับศูนย์ ส่วนค่า Minimal Lethal Concentration หรือ MLC คือค่าความเข้มข้นของยาน้อยที่สุดที่สามารถฆ่าตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียได้ โดยจะให้ค่า RM เท่ากับ ศูนย์หลังจากเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียในหลอดทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า RM คำนวณจาก

$$\text{Motility score} = \frac{\sum nN}{N}$$

nN = จำนวนตัวอ่อนที่มีค่าคะแนนในระดับต่างๆ

N = จำนวนของตัวอ่อนทั้งหมดในแต่ละหลุม

คะแนนที่ใช้ในการคำนวณการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียแบ่งได้เป็น 4 ระดับ

3 = เคลื่อนไหวดี (active movement)

2 = เคลื่อนไหวปานกลาง (moderate movement)

1 = เคลื่อนไหวน้อยมาก (less movement)

0 = ไม่มีการเคลื่อนไหว หรือ ตาย (no movement)

$$\% \text{ RM} = \frac{\text{Motility score (หลุมทดสอบกับยา)}}{\text{Motility score (หลุมควบคุม)}} \times 100$$

การแปรผลเพื่อดูประสิทธิภาพของยาโดยดูจากค่า motility score และค่า % RM ถ้าค่า % RM มีค่าต่ำหมายถึงยามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนของพยาธิ และค่า % RM เท่ากับศูนย์หมายถึงยาสามารถฆ่าตัวอ่อนของพยาธิได้

6. การศึกษาดูรูปร่างลักษณะและการวัดขนาดของตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลองเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาเดี่ยวและยาผสม

นำตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียจากกลุ่มควบคุมและจากกลุ่มที่ได้รับยามาศึกษาดูผลของยาต่อรูปร่างลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) และแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

6.1 การเตรียมตัวอ่อนของพยาธิสำหรับกล้องจุลทรรศน์

การเตรียมตัวอ่อนของพยาธิสำหรับกล้องจุลทรรศน์ จะใช้ตามวิธีของ Ash and Riley (1970) โดยเก็บตัวอ่อนของพยาธิหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้เข็มขนาดเล็กเขี่ยตัวอ่อนของหนอนพยาธิใส่ใน 70% ethanol ที่ร้อน หลังจากนั้นทำให้ตัวอ่อนของพยาธิใส่ด้วย 5% glycerine ใน 70% ethanol และ 20% glycerine ใน 70% ethanol ตามลำดับ ใช้เข็มเขี่ยตัวอ่อนพยาธิวางบนสไลด์ที่มี glycerine อยู่ทำการ mount พยาธิและนำมาวัดขนาดโดยใช้กล้อง *camella lucida*

6.2 การเตรียมตัวอย่างของพยาธิสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

การเตรียมพยาธิตัวอย่างสำหรับทำ SEM จะทำตามวิธีของ Choochote *et al* (1987) โดยนำตัวอย่างของพยาธิมา Fix ใน 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างของพยาธิมาล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นทำการ post fix ใน 1% osmium tetroxide ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ทำการกำจัดน้ำออกด้วยความเข้มข้นของ ethanol ระดับต่างๆดังนี้ 35%, 50%, 70%, 80% โดยในแต่ละความเข้มข้นจะใช้เวลา 10 นาที นำมาผ่าน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที และตามด้วย absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ตัวอย่างของพยาธิจะถูกทำให้แห้งด้วย critical point dryer ทำการ mount พยาธิบน stub แล้วนำไปเคลือบด้วยทองคำ และนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (42 KV JEOL MED JSM 840-A SEM)

6.3 การเตรียมตัวอย่างของพยาธิสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

โดยนำตัวอย่างของพยาธิมาตรึงใน 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างของพยาธิมาล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นทำการ post fix ใน 1% osmium tetroxide ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ทำการกำจัดน้ำออกด้วยความเข้มข้นของ ethanol ระดับต่างๆดังนี้ 35%, 50%, 70%, 80% โดยในแต่ละความเข้มข้นจะใช้เวลา 10 นาที นำมาผ่าน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที และตามด้วย absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ทำการฝังตัวอย่างของพยาธิไว้ใน alraldite media หลังจากนั้นทำการตัด section แบบบาง (80 นาโนเมตร) ย้อม section ด้วย lead citrate และนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านรุ่น JEOL-JEM-1200 EXII

7. การวัดระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7, AChE)

การวัดระดับเอนไซม์ AChE เพื่อศึกษาการชีวิตรอดของตัวอย่างของหนอนพยาธิเนื่องจากตัวอย่างที่มีชีวิตและมีการเคลื่อนไหวจะปล่อยเอนไซม์ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาประสิทธิภาพของยาจะศึกษาโดยดูผลกระทบที่มีต่อ neuromuscular system จากการวัดปริมาณของ AChE ที่พยาธิปล่อยออกมา และจากศึกษาของ Sharma and Rathaur (1999) และ Sharma *et al* (1998) พบว่า *Setaria cervi* ซึ่งเป็นพยาธิพืลาเรียของวัวจะหลั่งสาร AChE ออกมาในระหว่างทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และจากการศึกษาของ Rapson *et al* (1986) การแปรผลเพื่อดูประสิทธิภาพของยามาหนอนพยาธิในหลอดทดลองจะใช้การตรวจวัดผลกระทบของยาต่อการเคลื่อนไหว การเจริญเติบโต และการมีชีวิตของตัวอย่างของหนอนพยาธิ

7.1 การเตรียมสารที่หลังจากตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรีย (excretory-secretory product)

เก็บ excretory-secretory product ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มียาหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียเป็นเวลา 7 วัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูด supernatant fluid แล้วนำไปเก็บที่ -20°C

7.2 การวัดระดับเอนไซม์ AChE

การวัดระดับเอนไซม์ AChE จาก culture fluids จะใช้วิธีการวัดสี (colorimetric method) ตามวิธีของ Pongraveevongsa and Ruangyuttigarn (2000) โดยใช้ acetylthiocholine iodine เป็น substrate และ dithiobisnitrobenzoate เป็น chromophore วิธีการทำมีดังนี้

นำ 5,5'-dithiobisnitrobenzoate ใน phosphate buffer pH 7.7 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ใน cuvette นำไปตั้งระดับค่า 0 ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นเติม 20 ไมโครลิตร ของ culture fluid จากตัวอย่างและ 0.1 มิลลิลิตร ของ 5% w/v acetylthiocholine iodine ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) ที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 วินาที ตามลำดับ นำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปในทุก 30 วินาทีมาคูณด้วย factor ดังสมการ

$$\text{AChE (Unit/L)} = \text{การเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงใน 30 วินาที} \times 23,400$$

ผลการศึกษา

ผลการศึกษา

1. การเพาะเลี้ยงยุงลายชนิด *Aedes togoi* จำนวนมาก

จากการนำไข่ยุงลายชนิด *Aedes togoi* มาเพาะเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงยุงของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ สามารถเพาะเลี้ยงยุงลายตัวเต็มวัยได้เป็นจำนวนมาก และมีจำนวนที่เพียงพอสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยวและยาผสมในหลอดทดลอง

2. ให้อินกิบเลียดแมลงที่มีพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* โดยวิธี artificial membrane feeding และการเก็บยุงหลังจากที่กินเลือดแล้ว

ยุงสามารถกินเลือดจากการเลียนแบบการกินเลือดจากคนโดยวิธี artificial membrane feeding ได้และได้ยุงที่กินเลือดแมลงจนอิ่มจำนวนมาก

3. การผ่าตัดยุงเพื่อเก็บตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi*

จากการทดลองพบว่าหลังจากเลี้ยงยุงไว้ 12 วัน จะมียุงบางส่วนตายตั้งแต่วันที่ 2 หลังจากยุงกินเลือดแล้ว และจะมียุงตายมากขึ้นเรื่อย ๆ อาจเป็นเพราะยุงบางตัวกินเลือดที่มีเชื้อไมโครฟิลาเรียเข้าไปมาก ๆ จนทำให้ยุงไม่สามารถทนต่อการไชของพยาธิไมโครฟิลาเรียจำนวนมาก ๆ ได้ หลังจากเลี้ยงยุง 12 วันแล้วจะมียุงที่รอดเพื่อรอทำการผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอ่อนระยะที่ 3 ครั้งละประมาณ 50 ตัว และเมื่อนำยุงที่รอดทั้งหมดมาทำการผ่าตัดได้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ประมาณครั้งละ 100-150 ตัว

4. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลอง และการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยวต่อตัวอ่อนระยะที่ 3

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของยา ALB, IVM และ DEC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันต่อ L3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (สายพันธุ์นราธิวาส) โดยทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยอัตราส่วนที่เท่ากัน 1:1 (v/v) ของ NCTC-135 และ IMDM ที่เติม 20% FBS เป็นเวลา 7 วัน การแปลผลเพื่อดูประสิทธิภาพของยาจะใช้ค่า motility score และค่า % relative motility (RM) ถ้า % RM มีค่าต่ำประสิทธิภาพในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิจะได้ผลดี และถ้ายาสามารถฆ่าพยาธิได้ ค่า % RM จะมีค่าเท่ากับ ศูนย์

4.1 ผลของยา IVM ต่อการเคลื่อนไหวของ L3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 7 วัน

จากตารางที่ 1 และรูปที่ 1 ในหลุมควบคุมที่ไม่ใส่ยา และในหลุมที่มียา IVM ความเข้มข้น 10^{-10} M และ 10^{-8} M ค่า motility score ของ L3 ไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ L3 ในหลุมควบคุม และพบว่าในหลุมที่มีความเข้มข้นของยา IVM 10^{-7} M, 10^{-6} M และ 10^{-5} M พบว่า L3 มี motility score (mean $\pm$ SD) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับ L3 ในหลุมควบคุมตามลำดับดังนี้ ที่ความเข้มข้นของยา IVM 10^{-7} M [(2.83 $\pm$ 0.02), (2.71 $\pm$ 0.16), (2.60 $\pm$ 0.17), (2.30 $\pm$ 0.44), (2.08 $\pm$ 0.33)], IVM 10^{-6} M [(2.80 $\pm$ 0.10), (2.49 $\pm$ 0.26), (2.28 $\pm$ 0.32), (1.86 $\pm$ 0.20), (1.74 $\pm$ 0.11)] และ IVM 10^{-5} M [(2.75 $\pm$ 0.04), (2.45 $\pm$ 0.17), (2.17 $\pm$ 0.30), (1.81 $\pm$ 0.10), (1.68 $\pm$ 0.19)]

4.2 ผลของยา DEC ต่อการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนระยะที่ 3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 7 วัน

จากตารางที่ 2 และรูปที่ 1 ในหลุมควบคุมที่ไม่ใส่ยา DEC และในหลุมที่มียา DEC ความเข้มข้น 10^{-10} M และ 10^{-8} M พบว่าค่า motility score ของ L3 ไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม และในหลุมที่มีความเข้มข้นของยา DEC 10^{-6} M, 10^{-5} M และ 10^{-4} M พบว่า L3 มี motility score (mean $\pm$ SD) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมตามลำดับดังนี้ ที่ความเข้มข้นของยา DEC 10^{-6} [(2.83 $\pm$ 0.05), (2.83 $\pm$ 0.03), (2.71 $\pm$ 0.04), (2.5 $\pm$ 0.17), (2.13 $\pm$ 0.37), (1.73 $\pm$ 0.26)], DEC 10^{-5} M [(2.71 $\pm$ 0.13), (2.63 $\pm$ 0.12), (2.29 $\pm$ 0.12), (1.86 $\pm$ 0.12), (1.72 $\pm$ 0.06), (1.53 $\pm$ 0.16)] และ DEC 10^{-4} M [(2.68 $\pm$ 0.13), (2.59 $\pm$ 0.08), (2.02 $\pm$ 0.26), (1.64 $\pm$ 0.05), (1.55 $\pm$ 0.07), (1.13 $\pm$ 0.12)]

4.3 ผลของยา ALB ต่อการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนระยะที่ 3 หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 7 วัน

จากตารางที่ 3 รูปที่ 1 ในหลุมควบคุมที่ไม่ใส่ยา ALB และในหลุมที่มีความเข้มข้นของยา ALB 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M และ 10^{-4} M ค่า motility score (mean $\pm$ SD) ของ L3 ไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม

ตารางที่ 1 Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยา Ivermectin (IVM) ที่ความเข้มข้นของยาต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

IVM (M)	Motility score (mean $\pm$ SD)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
หลุมควบคุม	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.91 $\pm$ 0.06	2.85 $\pm$ 0.04	2.84 $\pm$ 0.04	2.83 $\pm$ 0.03
10 ⁻¹⁰	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.88 $\pm$ 0.02	2.86 $\pm$ 0.04	2.78 $\pm$ 0.08	2.76 $\pm$ 0.08
10 ⁻⁸	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.05	2.89 $\pm$ 0.04	2.83 $\pm$ 0.04	2.80 $\pm$ 0.06	2.70 $\pm$ 0.11
10 ⁻⁷	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.83 $\pm$ 0.12*	2.71 $\pm$ 0.16*	2.60 $\pm$ 0.17*	2.30 $\pm$ 0.44*	2.08 $\pm$ 0.33*
10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.03	2.80 $\pm$ 0.10*	2.49 $\pm$ 0.26*	2.28 $\pm$ 0.32*	1.86 $\pm$ 0.20*	1.74 $\pm$ 0.11*
10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.88 $\pm$ 0.04	2.75 $\pm$ 0.04*	2.45 $\pm$ 0.17*	2.17 $\pm$ 0.33*	1.81 $\pm$ 0.10*	1.68 $\pm$ 0.19*

* มีค่าแตกต่างจากหลุมควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05).

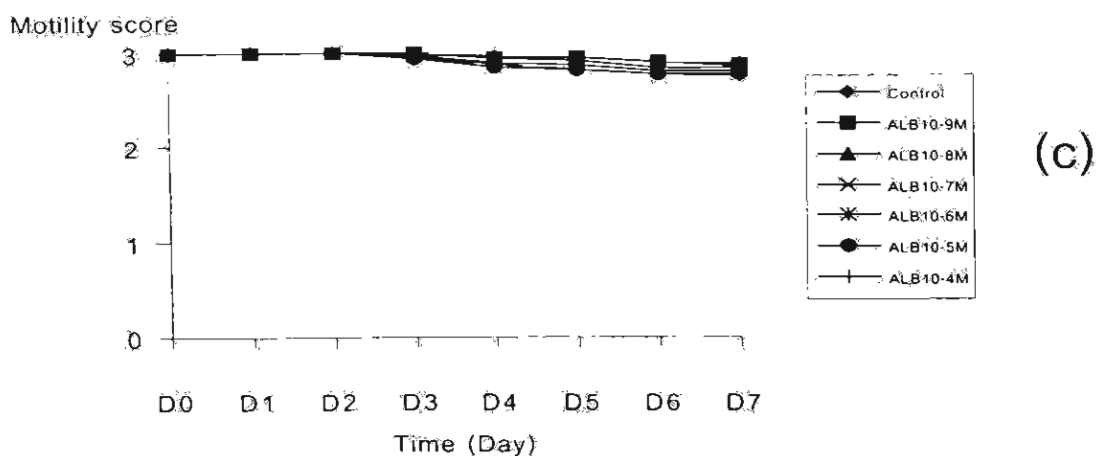
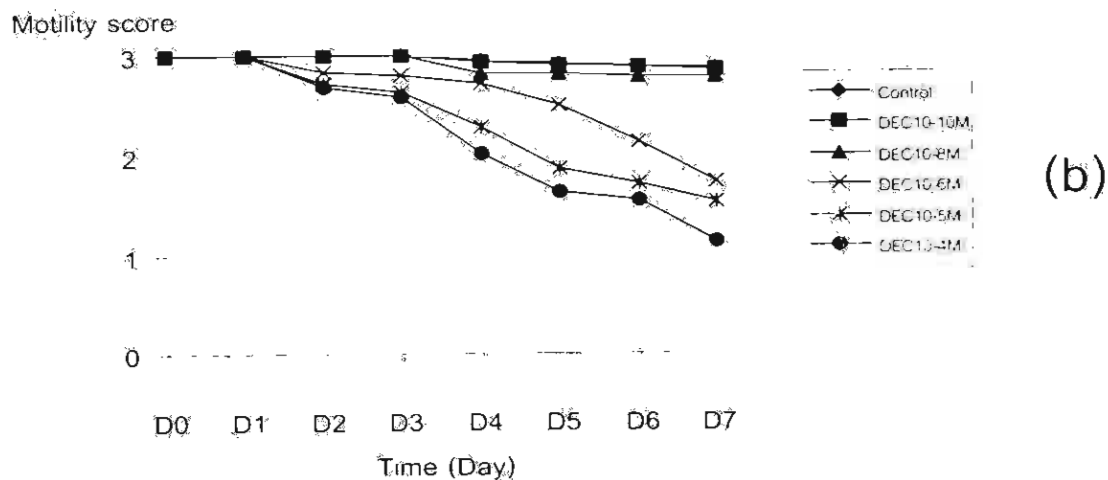
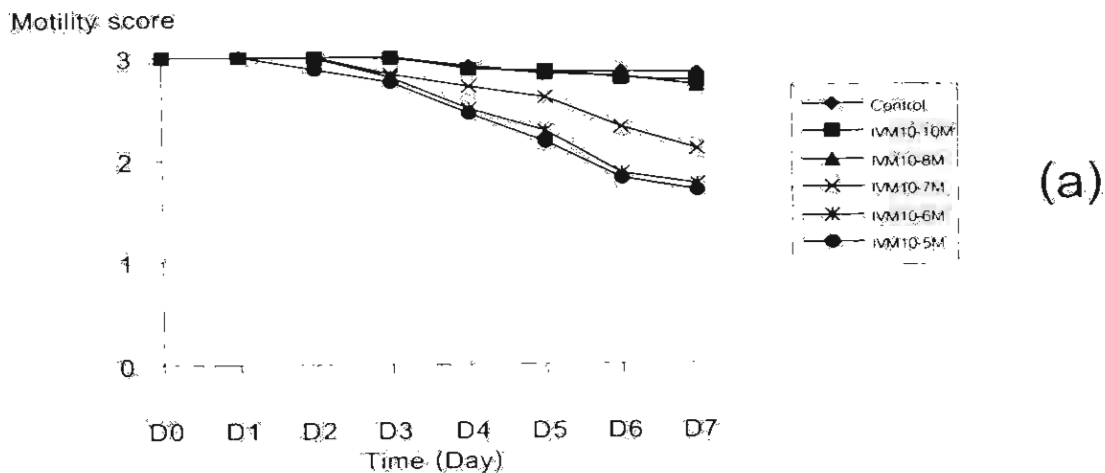
ตารางที่ 2 Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยา diethylcarbamazine (DEC) ที่ความเข้มข้นของยาต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

DEC (M)	Motility score (mean $\pm$ SD)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
หลุมควบคุม	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.95 $\pm$ 0.06	2.91 $\pm$ 0.03	2.89 $\pm$ 0.05	2.86 $\pm$ 0.03
10 ⁻¹⁰	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.93 $\pm$ 0.03	2.90 $\pm$ 0.04	2.89 $\pm$ 0.04	2.85 $\pm$ 0.21
10 ⁻⁸	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.82 $\pm$ 0.10	2.82 $\pm$ 0.06	2.79 $\pm$ 0.06	2.79 $\pm$ 0.04
10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.83 $\pm$ 0.05*	2.80 $\pm$ 0.03*	2.71 $\pm$ 0.04*	2.50 $\pm$ 0.17*	2.13 $\pm$ 0.37*	1.73 $\pm$ 0.26*
10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.71 $\pm$ 0.13*	2.63 $\pm$ 0.12*	2.29 $\pm$ 0.12*	1.86 $\pm$ 0.12*	1.72 $\pm$ 0.06*	1.53 $\pm$ 0.16*
10 ⁻⁴	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.68 $\pm$ 0.13*	2.59 $\pm$ 0.08*	2.02 $\pm$ 0.26*	1.64 $\pm$ 0.05*	1.55 $\pm$ 0.07*	1.13 $\pm$ 0.12*

*: มีค่าแตกต่างจากหุลุมควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05).

ตารางที่ 3 Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยา albendazole (ALB) ที่ความเข้มข้นของยาต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

ALB (M)	Motility score (mean $\pm$ SD)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
กลุ่มควบคุม	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.95 $\pm$ 0.01	2.94 $\pm$ 0.03	2.89 $\pm$ 0.02	2.87 $\pm$ 0.07
10 ⁻⁹	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.93 $\pm$ 0.05	2.93 $\pm$ 0.06	2.89 $\pm$ 0.02	2.85 $\pm$ 0.04
10 ⁻⁸	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.94 $\pm$ 0.05	2.93 $\pm$ 0.06	2.89 $\pm$ 0.02	2.84 $\pm$ 0.05
10 ⁻⁷	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.03	2.94 $\pm$ 0.04	2.90 $\pm$ 0.04	2.82 $\pm$ 0.02	2.82 $\pm$ 0.05
10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.97 $\pm$ 0.03	2.88 $\pm$ 0.05	2.86 $\pm$ 0.06	2.79 $\pm$ 0.04	2.78 $\pm$ 0.20
10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.94 $\pm$ 0.09	2.84 $\pm$ 0.07	2.81 $\pm$ 0.11	2.76 $\pm$ 0.08	2.75 $\pm$ 0.09
10 ⁻⁴	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.95 $\pm$ 0.07	2.87 $\pm$ 0.03	2.80 $\pm$ 0.03	2.75 $\pm$ 0.06	2.74 $\pm$ 0.02



รูปที่ 1 ค่า Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi*. หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว (a) ivermectin [IVM]; (b) diethylcarbamazine [DEC] และ (c) albendazole [ALB] ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน.

4.4 ผลของยาผสมระหว่างยา ALB และยา IVM (ALB/IVM) เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ยาเดี่ยว

ตารางที่ 4 รูปที่ 2 แสดงผลของยาผสมระหว่างยาเดี่ยว ALB และ IVM และยาผสม ALB/IVM จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนในหลุมควบคุมสามารถเคลื่อนไหวได้ดีหลังจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน และเช่นเดียวกับยาผสม ALB/IVM ที่ความเข้มข้น $10^8/10^8$ M พบว่ายาไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนเลยตลอดเวลา 7 วันที่ทำการเพาะเลี้ยง ยาผสม ALB/IVM ที่ความเข้มข้น $10^6/10^6$ M สามารถลดการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 โดยมีค่า motility score $\pm$ SD ตามลำดับดังนี้ [(2.80 $\pm$ 0.05), (2.63 $\pm$ 0.09), (2.40 $\pm$ 0.15), (2.10 $\pm$ 0.15), (1.82 $\pm$ 0.15), (1.68 $\pm$ 0.27)] เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนในหลุมควบคุม, ตัวอ่อนในหลุมที่มียา ALB ความเข้มข้น 10^5 M และ ในหลุมที่มียา IVM ความเข้มข้น 10^8 , 10^6 M เช่นเดียวกับยาผสม ALB/IVM ที่ ความเข้มข้นต่ำสุด $10^5/10^5$ M สามารถลดการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนได้ตั้งแต่วันที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่า motility score $\pm$ SD ตามลำดับดังนี้ [(2.43 $\pm$ 0.09), (2.16 $\pm$ 0.06), (1.99 $\pm$ 0.03), (1.89 $\pm$ 0.08), (1.63 $\pm$ 0.04), (1.55 $\pm$ 0.06)] เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนในหลุมควบคุม, ตัวอ่อนในหลุมที่มียา ALB ความเข้มข้น 10^5 M และ ในหลุมที่มียา IVM ความเข้มข้น 10^8 , 10^6 และ 10^5 M

4.5 ผลของยาผสมระหว่างยา ALB และยา DEC (A/D) เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ยาเดี่ยว

ตารางที่ 5 และ รูปที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบผลของยาผสม ALB/IVM และ ยา ALB/DEC เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ยาเดี่ยว ALB และ DEC พบว่าที่ความเข้มข้นของยาผสม ALB/DEC $10^8/10^8$ M จะไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนเช่นเดียวกับผลของยาผสม ALB/IVM ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยตัวอ่อนสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างรวดเร็วตลอดการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน และในทำนองเดียวกันยาเดี่ยว ALB ความเข้มข้น 10^5 M, DEC 10^8 M ไม่มีผลต่อตัวอ่อน แต่ยาเดี่ยว DEC 10^6 M และ 10^5 M สามารถลดการเคลื่อนไหวได้วันที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 โดยมีค่า motility score $\pm$ SD ตามลำดับดังนี้ DEC 10^6 M [(2.81 $\pm$ 0.13), (2.80 $\pm$ 0.10), (2.73 $\pm$ 0.12), (2.50 $\pm$ 0.11), (2.31 $\pm$ 0.06), (2.01 $\pm$ 0.13)] และ DEC 10^5 M [(2.65 $\pm$ 0.03), (2.63 $\pm$ 0.11), (2.53 $\pm$ 0.12), (2.42 $\pm$ 0.02), (2.10 $\pm$ 0.03), (1.92 $\pm$ 0.11)] ยาผสม ALB/DEC ที่ความเข้มข้น $10^6/10^6$ M สามารถลดการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 โดยมีค่า motility score $\pm$ SD ตามลำดับดังนี้ [(2.62 $\pm$ 0.80), (2.31 $\pm$ 0.06), (2.05 $\pm$ 0.16), (1.85 $\pm$ 0.17), (1.63 $\pm$ 0.12), (1.50 $\pm$ 0.08)] เปรียบเทียบกับตัวอ่อน

ตารางที่ 4. การเปรียบเทียบค่า motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด *NSP Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว albendazole (ALB), ivermectin (IVM) และยาผสม ALB/IVM ที่ความเข้มข้นต่างกัน (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

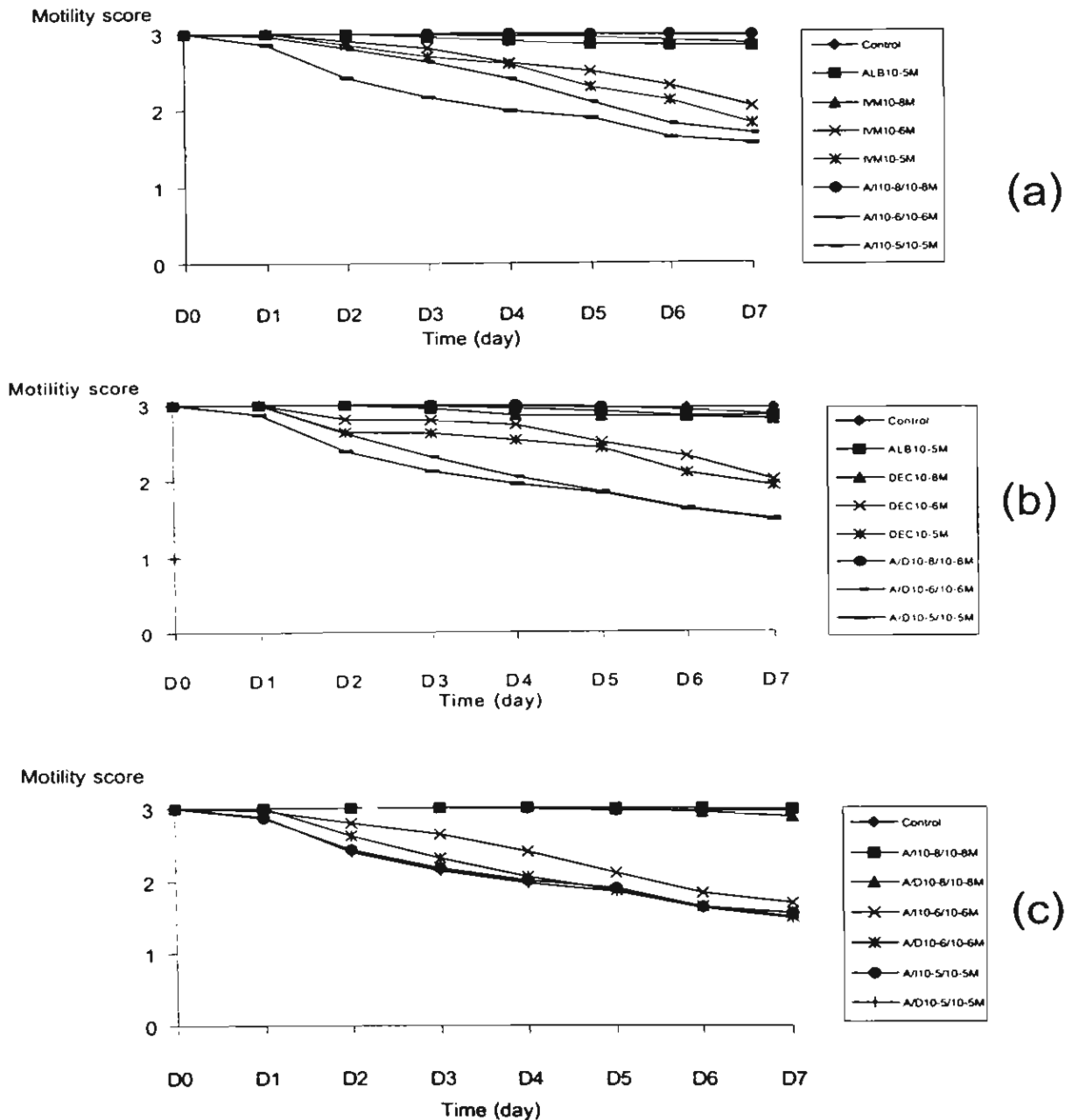
ความเข้มข้น (M)	Motility score (mean $\pm$ SD)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
กลุ่มควบคุม	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.03	2.97 $\pm$ 0.05	2.95 $\pm$ 0.04
ALB 10 ⁻¹	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.95 $\pm$ 0.05	2.90 $\pm$ 0.06	2.85 $\pm$ 0.10	2.84 $\pm$ 0.06	2.83 $\pm$ 0.02
IVM 10 ⁻⁸	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.04	2.97 $\pm$ 0.17	2.95 $\pm$ 0.33	2.90 $\pm$ 0.10	2.85 $\pm$ 0.19
IVM 10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.90 $\pm$ 0.01	2.81 $\pm$ 0.02 ^a	2.61 $\pm$ 0.17 ^a	2.50 $\pm$ 0.30 ^a	2.31 $\pm$ 0.11 ^a	2.03 $\pm$ 0.10 ^a
IVM 10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.86 $\pm$ 0.03	2.70 $\pm$ 0.02 ^a	2.60 $\pm$ 0.20 ^a	2.30 $\pm$ 0.03 ^a	2.11 $\pm$ 0.33 ^a	1.81 $\pm$ 0.09 ^a
ALB/IVM 10 ⁻⁸ /10 ⁻⁸	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.03	2.98 $\pm$ 0.03	2.97 $\pm$ 0.11
ALB/IVM 10 ⁻⁶ /10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	2.96 $\pm$ 0.03	2.80 $\pm$ 0.05 ^{abc}	2.63 $\pm$ 0.09 ^{abcd}	2.40 $\pm$ 0.15 ^{abcd}	2.10 $\pm$ 0.15 ^{abcd}	1.82 $\pm$ 0.15 ^{abcde}	1.68 $\pm$ 0.27 ^{abcde}
ALB/IVM 10 ⁻⁵ /10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	2.86 $\pm$ 0.06	2.43 $\pm$ 0.09 ^{abcde}	2.16 $\pm$ 0.06 ^{abcde}	1.99 $\pm$ 0.03 ^{abcde}	1.89 $\pm$ 0.08 ^{abcde}	1.63 $\pm$ 0.04 ^{abcde}	1.55 $\pm$ 0.06 ^{abcde}

^aมีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ^bมีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา ALB 10⁻⁵ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ^cมีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา IVM 10⁻⁸ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ^dมีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา IVM 10⁻⁶ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ^eมีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา IVM 10⁻⁵ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$).

ตารางที่ 5. การเปรียบเทียบค่า motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิปลาเรย์ชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว albendazole (ALB), diethylcarbamazine (DEC) และยาผสม ALB/DEC ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (M) เพื่อเสี่ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้น (M)	Motility score (mean $\pm$ SD)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
กลุ่มควบคุม	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.01	2.98 $\pm$ 0.01	2.95 $\pm$ 0.03	2.95 $\pm$ 0.02	2.95 $\pm$ 0.04
ALB 10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.04	2.95 $\pm$ 0.02	2.90 $\pm$ 0.16	2.85 $\pm$ 0.08	2.84 $\pm$ 0.07
DEC 10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.95 $\pm$ 0.01	2.86 $\pm$ 0.02	2.85 $\pm$ 0.11	2.83 $\pm$ 0.06	2.80 $\pm$ 0.12
DEC 10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.81 $\pm$ 0.13 ^a	2.80 $\pm$ 0.10 ^a	2.73 $\pm$ 0.12 ^a	2.50 $\pm$ 0.11 ^a	2.31 $\pm$ 0.06 ^a	2.01 $\pm$ 0.13 ^a
DEC 10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.65 $\pm$ 0.03 ^a	2.63 $\pm$ 0.11 ^a	2.53 $\pm$ 0.12 ^a	2.42 $\pm$ 0.02 ^a	2.10 $\pm$ 0.03 ^a	1.92 $\pm$ 0.11 ^a
ALB/DEC 10 ⁻⁸ /10 ⁻⁸	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.97 $\pm$ 0.03	2.93 $\pm$ 0.03	2.86 $\pm$ 0.05
ALB/DEC 10 ⁻⁶ /10 ⁻⁶	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.62 $\pm$ 0.08 ^{a,b,c,d}	2.31 $\pm$ 0.06 ^{a,b,c,d,e}	2.05 $\pm$ 0.16 ^{a,b,c,d,e}	1.85 $\pm$ 0.17 ^{a,b,c,d,e}	1.63 $\pm$ 0.12 ^{a,b,c,d,e}	1.50 $\pm$ 0.08 ^{a,b,c,d,e}
ALB/DEC 10 ⁻⁵ /10 ⁻⁵	3.0 $\pm$ 0.0	2.87 $\pm$ 0.06	2.40 $\pm$ 0.09 ^{a,b,c,d,e}	2.13 $\pm$ 0.13 ^{a,b,c,d,e}	1.96 $\pm$ 0.05 ^{a,b,c,d,e}	1.84 $\pm$ 0.09 ^{a,b,c,d,e}	1.62 $\pm$ 0.08 ^{a,b,c,d,e}	1.48 $\pm$ 0.12 ^{a,b,c,d,e}

*มีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, *มีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา ALB 10⁻⁵ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, *มีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา DEC 10⁻⁸ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, *มีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา DEC 10⁻⁵ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, *มีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มียา DEC 10⁻⁵ M อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 2. ค่า Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาผสม (a) ยา albendazole (ALB) ผสมกับยา ivermectin (IVM) [A/I], (b) ยา albendazole (ALB) ผสมกับยา diethylcarbamazine (DEC) [A/D] และ (c) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาผสม A/D และ A/I ที่ความเข้มข้นต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

ในหลุมควบคุม, ตัวอ่อนในหลุมที่มียา ALB ความเข้มข้น 10^{-5} M และ ในหลุมที่มียา DEC ความเข้มข้น 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-5} M นอกเหนือจากนี้ยาผสม A/D ที่ความเข้มข้นต่ำสุด $10^{-5}/10^{-5}$ M สามารถลดการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 โดยมีค่า motility score $\pm$ SD ตามลำดับดังนี้ $[(2.49 \pm 0.09), (2.13 \pm 0.13), (1.96 \pm 0.05), (1.84 \pm 0.09), (1.62 \pm 0.08), (1.48 \pm 0.12)]$ เปรียบเทียบกับตัวอ่อนในหลุมควบคุม, ตัวอ่อนในหลุมที่มียา ALB ความเข้มข้น 10^{-5} M และ ในหลุมที่มียา DEC ความเข้มข้น 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-5} M

4.6. การเปรียบเทียบผลของยาผสมระหว่างยา ALB/DEC (A/D) และ ALB/IVM (A/I)

ตารางที่ 6 และรูปที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาผสม A/D และ A/I พบว่ายาผสมทั้งสองชนิดให้ผลในการลดการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนได้ไม่แตกต่างกันในทุกๆ ความเข้มข้นของยาผสม A/D และ A/I ตลอดจนการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน ยกเว้นยาผสม A/D ที่ความเข้มข้น $10^{-6}/10^{-6}$ M จะมีค่า motility score $\pm$ SD น้อยกว่ายาผสม A/I อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในวันที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 ตามลำดับดังนี้ A/D vs A/I $[(2.62 \pm 0.08, 2.80 \pm 0.05), (2.31 \pm 0.06, 2.63 \pm 0.09), (2.05 \pm 0.16, 2.4 \pm 0.15), (1.85 \pm 0.17, 2.10 \pm 0.13), (1.63 \pm 0.12, 1.82 \pm 0.06), (1.50 \pm 0.08, 1.68 \pm 0.07)]$ แปลผลคือ ยาผสม ALB/DEC จะมีประสิทธิภาพในการลดการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนได้ดีกว่ายาผสม ALB/IVM

5. ผลการวัดขนาดของตัวอ่อนพยาธิในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบกับยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (camella lucida และ cervimeter)

5.1 ขนาดของตัวอ่อนพยาธิในกลุ่มควบคุม

ผลการวัดขนาดของตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทำการทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสมก่อนการเพาะเลี้ยงและหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในตารางที่ 7 ตัวอ่อนของพยาธิระยะติดต่อ (L3) ก่อนการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (Day 0) มีขนาดความยาวโดยเฉลี่ย mean $\pm$ SD (range) เท่ากับ $1,518 \pm 116$ (1,320-1,760) ไมโครเมตร และมีความกว้างโดยเฉลี่ยเท่ากับ 23.4 ± 1.6 (21.6-27.0) ไมโครเมตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของพยาธิในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (Day 7) ตัวอ่อนของพยาธิมีขนาดความยาวและความกว้างโดยเฉลี่ย mean $\pm$ SD (range) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนี้ ความยาวโดยเฉลี่ยเท่ากับ $2,019 \pm 105$ (1,850-2,250) ไมโครเมตร และความกว้างโดยเฉลี่ยเท่ากับ 32.2 ± 6.9 (22.0-50.0) ไมโครเมตร

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบค่า motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิปลาเรียวชนิด *NSP bangia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยาผสมระหว่างยา albendazole ผสมกับยา diethylcarbamazine (ALB/DEC) และยา albendazole ผสมกับยา ivermectin (ALB/IVM) ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้น (M)	Motility score (mean ± SD)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
กลุ่มควบคุม	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.98±0.01	2.98±0.16	2.95±0.10	2.95±0.02	2.95±0.04
10 ⁻⁶ /10 ⁻⁸ M								
ALB/IVM	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.98±0.03	2.98±0.03	2.97±0.11
ALB/DEC	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.97±0.03	2.93±0.03	2.86±0.05
10 ⁻⁵ /10 ⁻⁵ M								
ALB/IVM	3.0±0.0	2.96±0.03	2.80±0.05	2.63±0.09	2.40±0.15	2.10±0.13	1.82±0.06	1.68±0.27
ALB/DEC	3.0±0.0	3.0±0.0	2.62±0.08*	2.31±0.06*	2.05±0.16*	1.85±0.17*	1.63±0.12*	1.50±0.08*
10 ⁻⁵ /10 ⁻⁵ M								
ALB/IVM	3.0±0.0	2.86±0.06	2.43±0.09	2.16±0.06	1.99±0.03	1.89±0.08	1.63±0.04	1.55±0.06
ALB/DEC	3.0±0.0	2.87±0.06	2.40±0.09	2.13±0.13	1.96±0.05	1.84±0.09	1.62±0.08	1.48±0.12

* มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ระหว่างกลุ่มที่มียา ALB/IVMและยา ALB/DEC

5.2 ขนาดของตัวอ่อนพยาธิในกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยว

ขนาดของตัวอ่อนในกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยว ALB, IVM และ DEC ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าตัวอ่อนพยาธิที่ทดสอบกับยาเดี่ยวมีความยาวของลำตัวไม่แตกต่างจากตัวอ่อนพยาธิในกลุ่มควบคุมก่อนทำการเพาะเลี้ยง (Day 0) แต่มีขนาดความยาวโดยเฉลี่ย $\text{mean} \pm \text{SD}$ (range) น้อยกว่าตัวอ่อนพยาธิหลังทำการเพาะเลี้ยง 7 วัน (Day 7) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังนี้ กลุ่มควบคุม Day 0 [$1,518 \pm 116$ (1,320-1,760)], กลุ่มควบคุม Day 7 [$2,019 \pm 105$ (1,850-2,250)], ALB [1525 ± 118 (1320-1750)], IVM [1537 ± 160 (1210-1700)], DEC [1534 ± 176 (1100-1760)] ไมโครเมตร และตัวอ่อนพยาธิมีขนาดความกว้างโดยเฉลี่ยไม่แตกต่างจากตัวอ่อนหลังทำการเพาะเลี้ยง 7 วัน (Day 7) แต่มีขนาดความกว้างมากกว่าตัวอ่อนก่อนทำการเพาะเลี้ยง (Day 0) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนี้ กลุ่มควบคุม Day 0 [23.4 ± 1.6 (21.6-27.0)], กลุ่มควบคุม Day 7 [32.2 ± 6.9 (22.0-50.0)], ALB [32.6 ± 1.8 (29.7-35.1)], IVM [32.0 ± 2.7 (27.0-37.8)], DEC [32.4 ± 3.4 (27.0-37.8)] ไมโครเมตร

5.3 ขนาดของตัวอ่อนพยาธิในกลุ่มที่ทดสอบกับยาผสม

ตารางที่ 7 แสดงผลของยาผสมต่อขนาดของตัวอ่อนพยาธิโดยให้ผลเหมือนกับยาเดี่ยว คือขนาดของตัวอ่อนในกลุ่มที่ทดสอบกับยาผสม ALB/DEC และ ALB/IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M/ 10^{-6} M มีขนาดความยาวโดยเฉลี่ย $\text{mean} \pm \text{SD}$ (range) ไม่แตกต่างจากตัวอ่อนที่ Day 0 แต่มีขนาดความยาวโดยเฉลี่ย $\text{mean} \pm \text{SD}$ (range) น้อยกว่าตัวอ่อนที่ Day 7 ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนี้ กลุ่มควบคุม Day 0 [$1,518 \pm 116$ (1,320-1,760)], กลุ่มควบคุม Day 7 [$2,019 \pm 105$ (1,850-2,250)], ALB/DEC [1539 ± 148 (1300-1760)], ALB/IVM [1527 ± 185 (1210-1760)] ไมโครเมตร และตัวอ่อนพยาธิมีขนาดความกว้างโดยเฉลี่ยไม่แตกต่างจากตัวอ่อนพยาธิที่ Day 7 แต่มีขนาดความกว้างโดยเฉลี่ยมากกว่าตัวอ่อนพยาธิที่ Day 0 ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนี้ กลุ่มควบคุม Day 0 [23.4 ± 1.6 (21.6-27.0)], กลุ่มควบคุม Day 7 [32.2 ± 6.9 (22.0-50.0)], ALB/DEC [32.4 ± 2.0 (29.7-35.1)], ALB/IVM [32.4 ± 2.8 (27.0-35.1)] ไมโครเมตร

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการวัดขนาดของตัวอ่อน (mean $\pm$ SD/range, μ m) ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *B. malayi* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาเดี่ยวและยาผสมหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน, จำนวนตัวอ่อนของพยาธิที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 20 ตัว

เวลาในการเพาะเลี้ยง (ยา, ความเข้มข้น)	ความยาวลำตัว (μ m)	ความกว้างลำตัว (μ m)
วันที่ 0 (กลุ่มควบคุม)	1518 $\pm$ 116 (1320-1760)	23.4 $\pm$ 1.6 (21.6-27.0)
วันที่ 7 (กลุ่มควบคุม)	2019 $\pm$ 105*	32.2 $\pm$ 6.9*
วันที่ 7 (ALB, 10 ⁻⁶ M)	1525 $\pm$ 118** (1320-1750)	32.6 $\pm$ 1.8* (29.7-35.1)
วันที่ 7 (IVM, 10 ⁻⁶ M)	1537 $\pm$ 160** (1210-1760)	32.0 $\pm$ 2.7* (27.0-37.8)
วันที่ 7 (DEC, 10 ⁻⁶ M)	1534 $\pm$ 176** (1100-1760)	32.4 $\pm$ 3.4* (27.0-37.8)
วันที่ 7 (ALB/DEC, 10 ⁻⁶ M/10 ⁻⁶ M)	1539 $\pm$ 148** (1300-1760)	32.4 $\pm$ 2.0* (29.7-35.1)
วันที่ 7 (ALB/IVM, 10 ⁻⁶ M/10 ⁻⁶ M)	1527 $\pm$ 185** (1210-1760)	32.4 $\pm$ 2.8* (27.0-35.1)

* มีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในวันที่ 0 (ก่อนการเพาะเลี้ยง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p < 0.05$

** มีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p < 0.05$

6. รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสมในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน ภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

6.1 รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มควบคุม

ส่วนหัวของตัวอ่อนพยาธิประกอบด้วยปาก (mouth) ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papillae) ปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papillae) (รูปที่ 3A, B, C) และผิวหนังบริเวณส่วนหัวมีลักษณะเป็นลายเส้นตามขวาง (รูปที่ 3D) บริเวณส่วนหางของตัวอ่อนพยาธิ (รูปที่ 4H, F, I) มีรูทวารหนัก (anus) มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crecent-shaped) บริเวณปลายหางมีปุ่ม 3 อัน คือ ปุ่มด้านข้าง (ventrolateral papillae) จำนวน 2 ปุ่ม และปุ่มด้านหลัง (dorsoterminal papilla) จำนวน 1 ปุ่ม (รูปที่ 4E, G, J) ส่วนผิวของลำตัวของตัวอ่อนพยาธิที่บริเวณรอบ ๆ ทวารหนัก (รูปที่ 5K) บริเวณส่วนหัว (รูปที่ 5L) บริเวณกลางลำตัว (รูปที่ 5M) และภาพกำลังขยายใหญ่ของส่วนผิวบริเวณกลางลำตัว (รูปที่ 5N) มีลักษณะเป็นเส้นลายตามขวาง (transversed annulations)

6.2 รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสม

ผลการทดลองพบว่าไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของตัวอ่อนที่ผิวหนังบริเวณส่วนหัว ผิวบริเวณส่วนลำตัว และผิวหนังบริเวณส่วนหางหลังจากทดสอบกับยาเดี่ยว ALB (รูปที่ 6O, R), IVM (รูปที่ 6Q, T) และ DEC ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M (รูปที่ 6P, S) และยาผสม ALB 10^{-5} M/DEC 10^{-5} M (รูปที่ 7U, W) และ ALB 10^{-5} M/IVM 10^{-5} M (รูปที่ 7V, X) โดยที่บริเวณส่วนหัวมี ปาก (mouth) ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papillae) และ ปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papillae) บริเวณหางมี ปุ่มด้านข้าง (ventrolateral papillae) จำนวน 2 ปุ่ม และปุ่มด้านหลัง (dorsoterminal papilla) จำนวน 1 ปุ่ม ผิวลำตัวทั้งส่วนหัว ส่วนกลางลำตัว และ ส่วนหางยังคงมีเส้นลายตามขวางอยู่ แสดงว่ายาเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ALB, DEC, IVM และยาผสม ALB/DEC, ALB/IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M ไม่สามารถทำลายผิวลำตัวของตัวอ่อนพยาธิหรือไม่มีผลต่อรูปร่างของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรีย IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M สามารถทำลายผิวหนังนอกลำตัวของตัวอ่อนพยาธิโดยทำให้ผิวหนังบริเวณลำตัวเกิดเป็นร่องลึก และทำให้เส้นลายตามขวางหายไป (รูปที่ 8Y, Z)

7. รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

7.1 ลักษณะภายในของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มควบคุม

รูปที่ 9 แสดงภาพตัดขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ L3 ก่อนการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นส่วนประกอบภายในลำตัวประกอบด้วย ผิวชั้นนอก (cuticle), ผิวชั้นกลาง

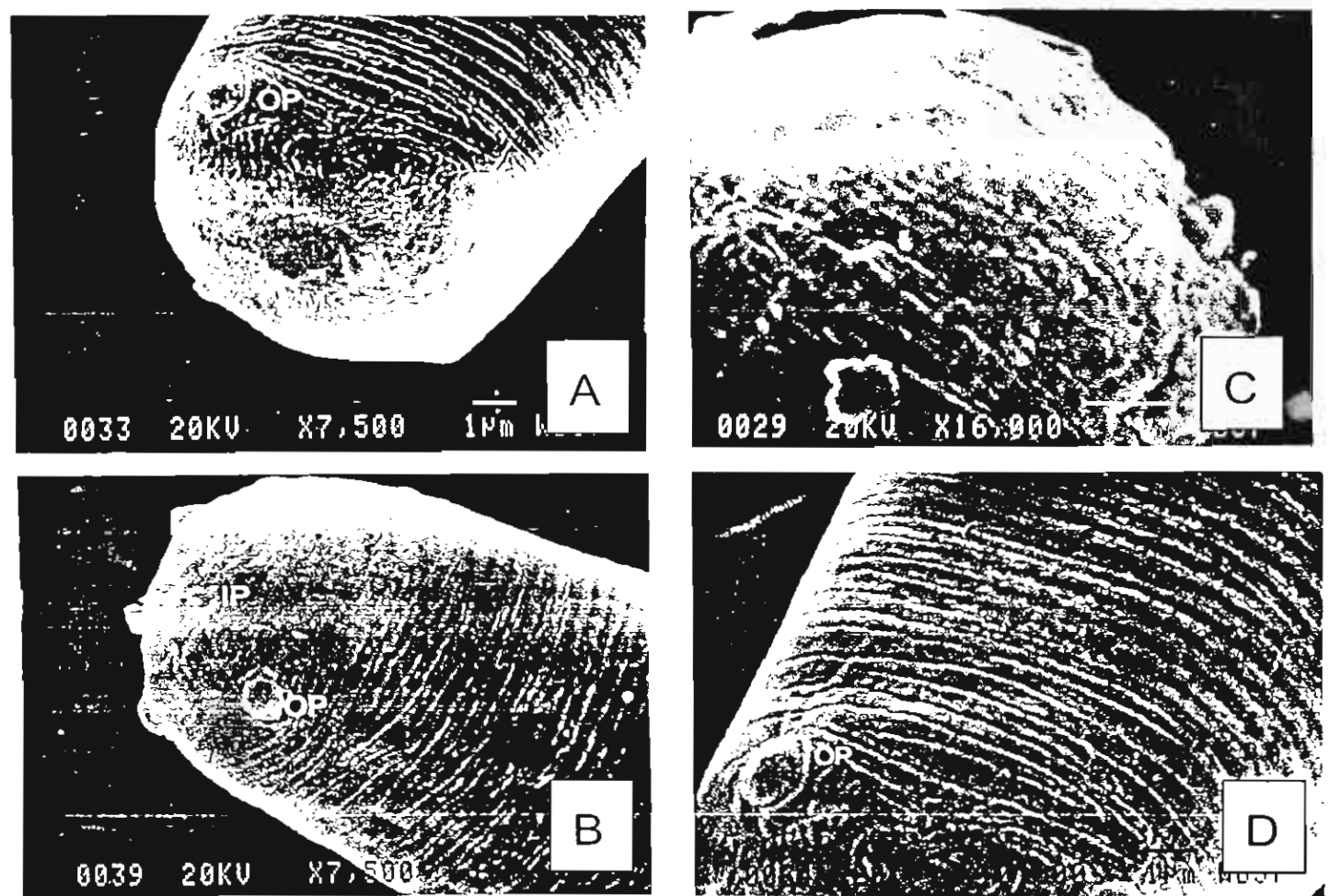
(hypodermis) และผิวหนังกล้ามเนื้อ (muscle) กล้ามเนื้อจะมีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อลายจำนวนมาก ภายในลำตัวมีช่องว่างภายใน (pseudocoelom) และมีเม็ดไขมัน (lipid droplet) กระจายอยู่ทั่วไป หลังจากนำตัวอ่อน L3 มาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน จากผลการทำ TEM พบว่าภาพตัดขวางของตัวอ่อนหลังการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 10) มีลักษณะเหมือนกับตัวอ่อน L3 ก่อนการเพาะเลี้ยง รูปร่างลักษณะภายในของตัวอ่อนไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากการดูลักษณะของผิวหนังนอก (cuticle) มีลักษณะเหมือนกับผิวหนังนอกของตัวอ่อน L3 และไม่เห็นคราบของผิวของตัวอ่อนแสดงว่าหลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน ตัวอ่อนไม่สามารถลอกคราบและไม่สามารถเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 ได้

7.2 ลักษณะภายในของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสม

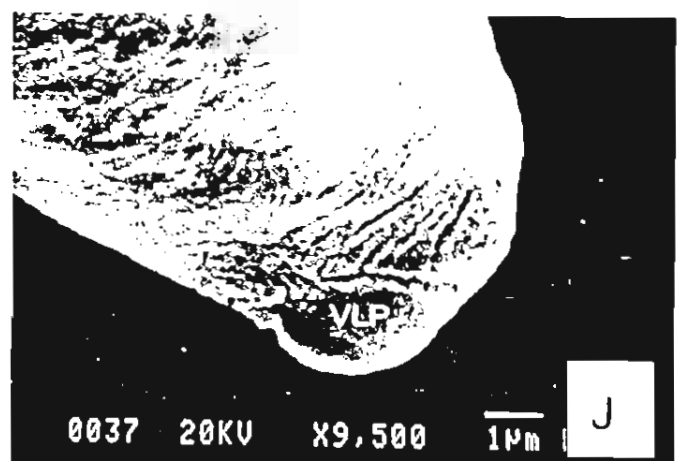
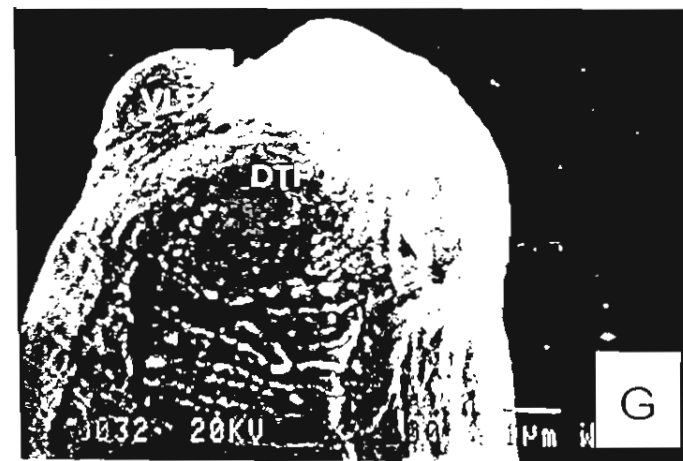
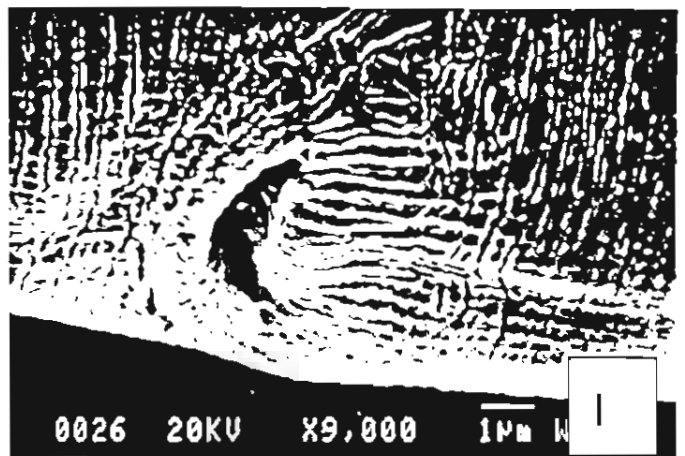
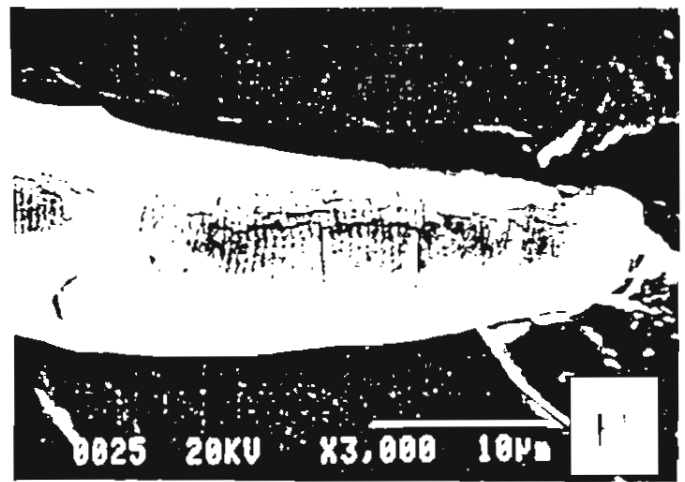
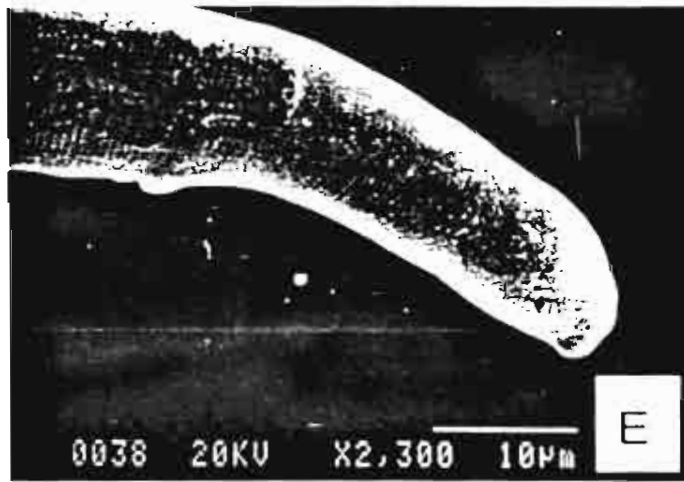
ผลจากการทดสอบกับยาเดี่ยว ALB, IVM, DEC ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M และยาผสม ALB+DEC และ ALB+IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน จากการดูภาพตัดขวางของตัวอ่อนของพยาธิด้วยกล้อง TEM พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายในของตัวอ่อน (รูปที่ 10 ถึงรูปที่ 20) ลักษณะผิวหนังนอกที่สัมผัสกับยา และส่วนของชั้นกล้ามเนื้อที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนมีลักษณะเหมือนกับในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับยา ถึงแม้ว่าตัวอ่อนพยาธิมีการเคลื่อนไหวลดลงจากการทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสมที่ความเข้มข้นนี้เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ผ้าตัดแมลง (dissecting microscopy) แต่จากการทำ TEM ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายในตัวอ่อน

8. ระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7, AChE)

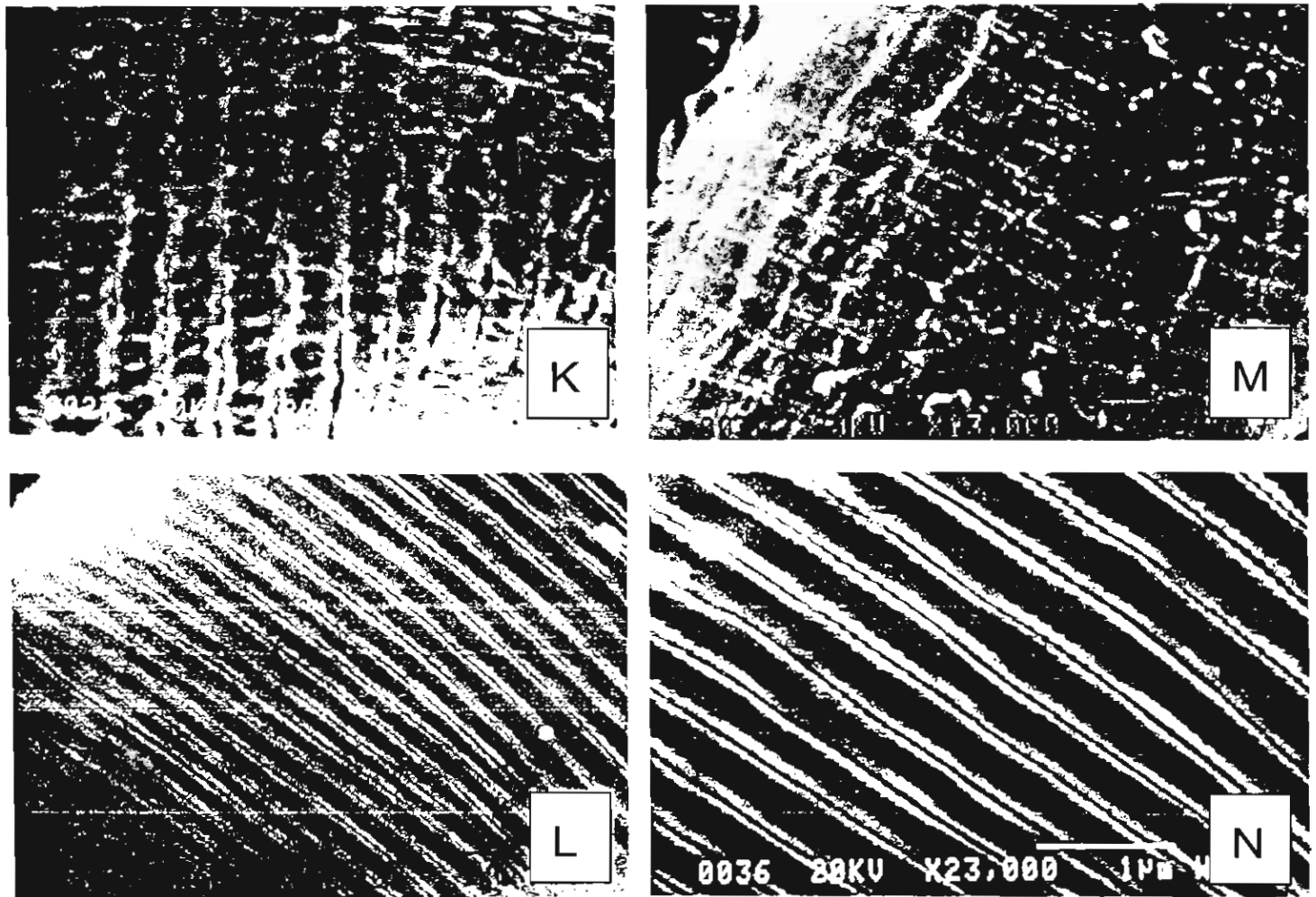
การตรวจวัดระดับเอนไซม์ AChE ของพยาธิตัวอ่อนที่ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เป็นวิธีการตรวจดูการมีชีวิตของพยาธิตัวอ่อน ถ้าตัวอ่อนพยาธิมีชีวิตอยู่ตัวอ่อนจะปล่อยเอนไซม์ออกมาขณะที่เคลื่อนไหว ถ้าหากยามีผลกระทบต่อการทำงานของตัวอ่อนหรือสามารถฆ่าตัวอ่อนได้ระดับของเอนไซม์ก็จะมีค่าลดลง ระดับของเอนไซม์จะเป็นตัวบ่งชี้การมีชีวิตอยู่ของพยาธิ แต่จากการทำทดลองไม่สามารถหาค่าระดับเอนไซม์ AChE ได้ อาจเป็นเพราะในการทดลองแต่ละครั้งใช้ตัวอ่อนในปริมาณที่ไม่มาก ระดับของเอนไซม์จึงมีไม่มากพอที่จะสามารถตรวจพบได้



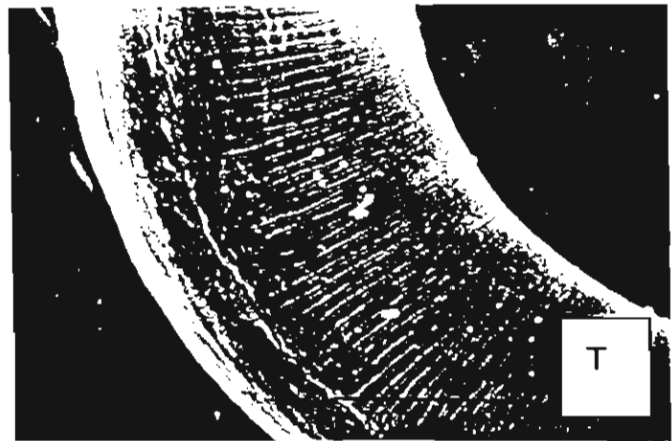
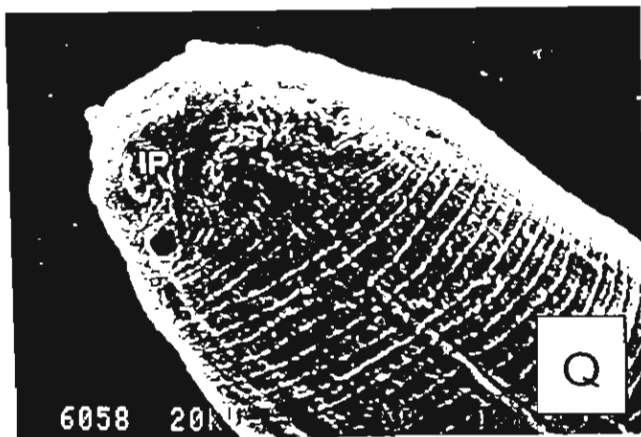
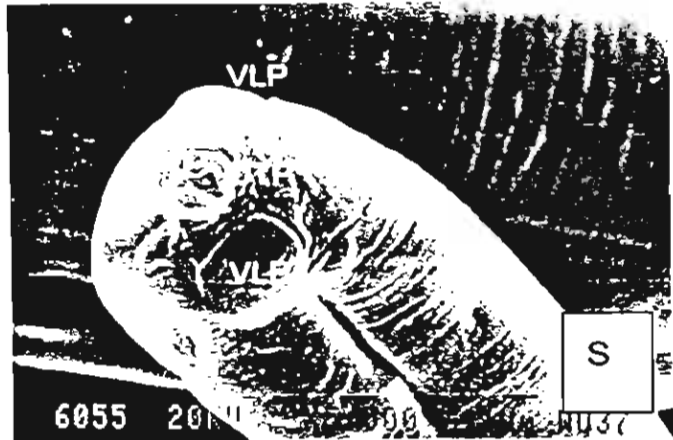
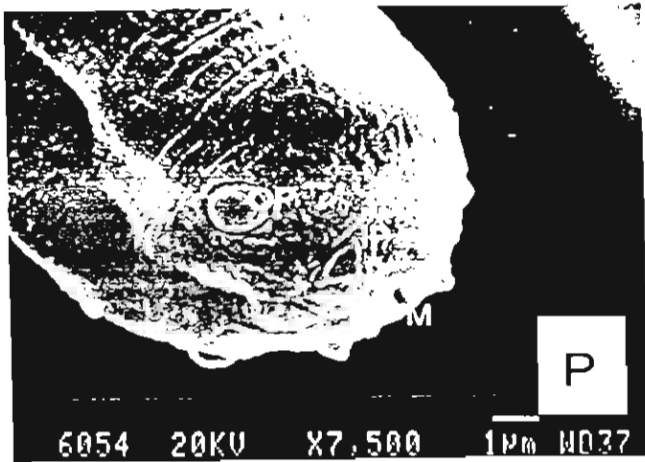
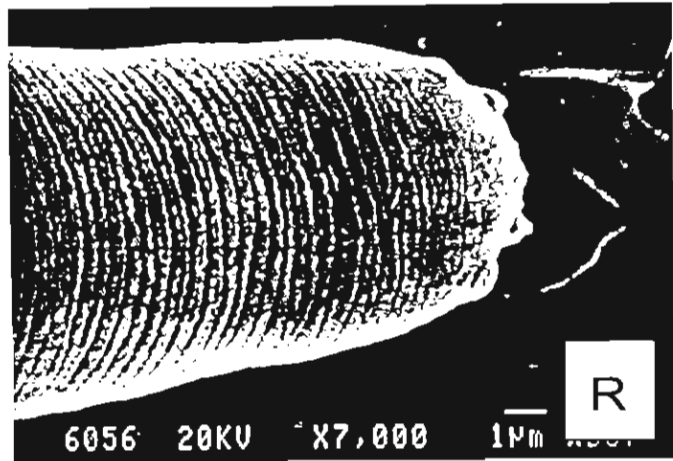
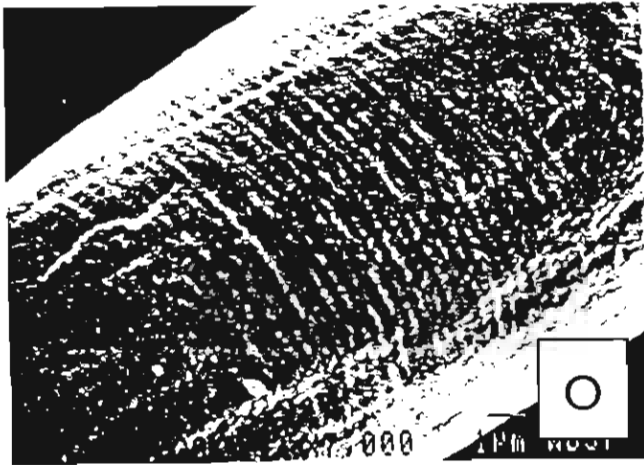
รูปที่ 3 บริเวณส่วนหัวของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน; [A] และ [B] ส่วนปาก (mouth, M), ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papillae, IP), ปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papillae, OP); [C] ภาพกำลังขยายใหญ่ของส่วนหัวบริเวณส่วนหัว; [D] ลักษณะเส้นลายตามขวางบริเวณหัวส่วนหัว



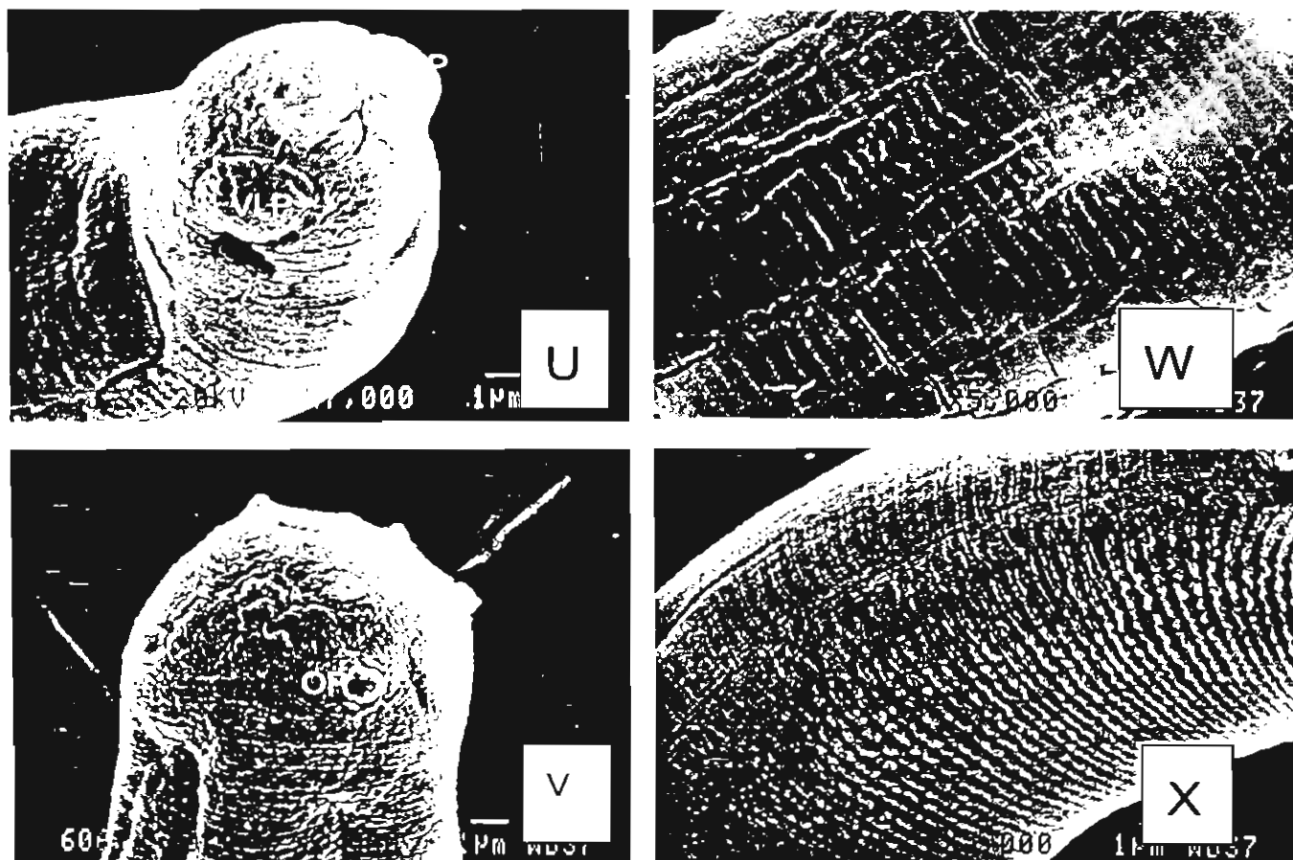
รูปที่ 4 บริเวณส่วนหางตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน; [E], [H] ปุ่มด้านข้าง (ventrolateral papillae, VLP) และทวารหนักมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (anus, A); [F], [I] ภาพกำลังขยายใหญ่ของทวารหนัก; [G], [J] ภาพกำลังขยายใหญ่ส่วนหาง, ปุ่มด้านข้าง 2 ปุ่ม (VLP), ปุ่มด้านหลัง 1 ปุ่ม (dorsolateral papilla, (DLP))



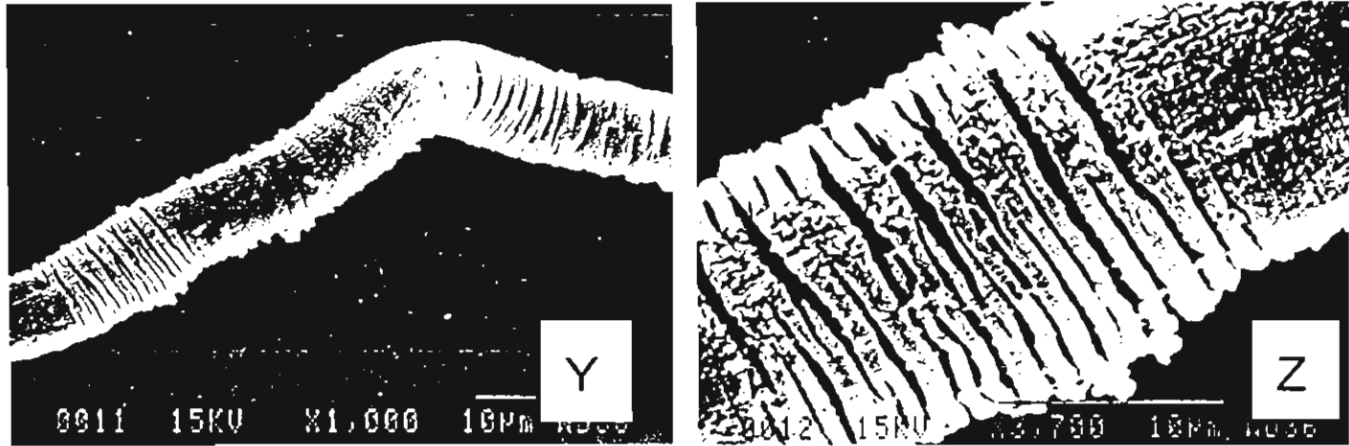
รูปที่ 5 บริเวณผิวหนังของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน แสดงลักษณะเส้นลายตามขวาง (transversed annulations); [K] ผิวบริเวณรอบๆ ทวารหนัก; [L] ผิวบริเวณส่วนหัว; [M] ผิวบริเวณส่วนกลางลำตัว; [N] ภาพกำลังขยายใหญ่ของผิวบริเวณกลางลำตัว



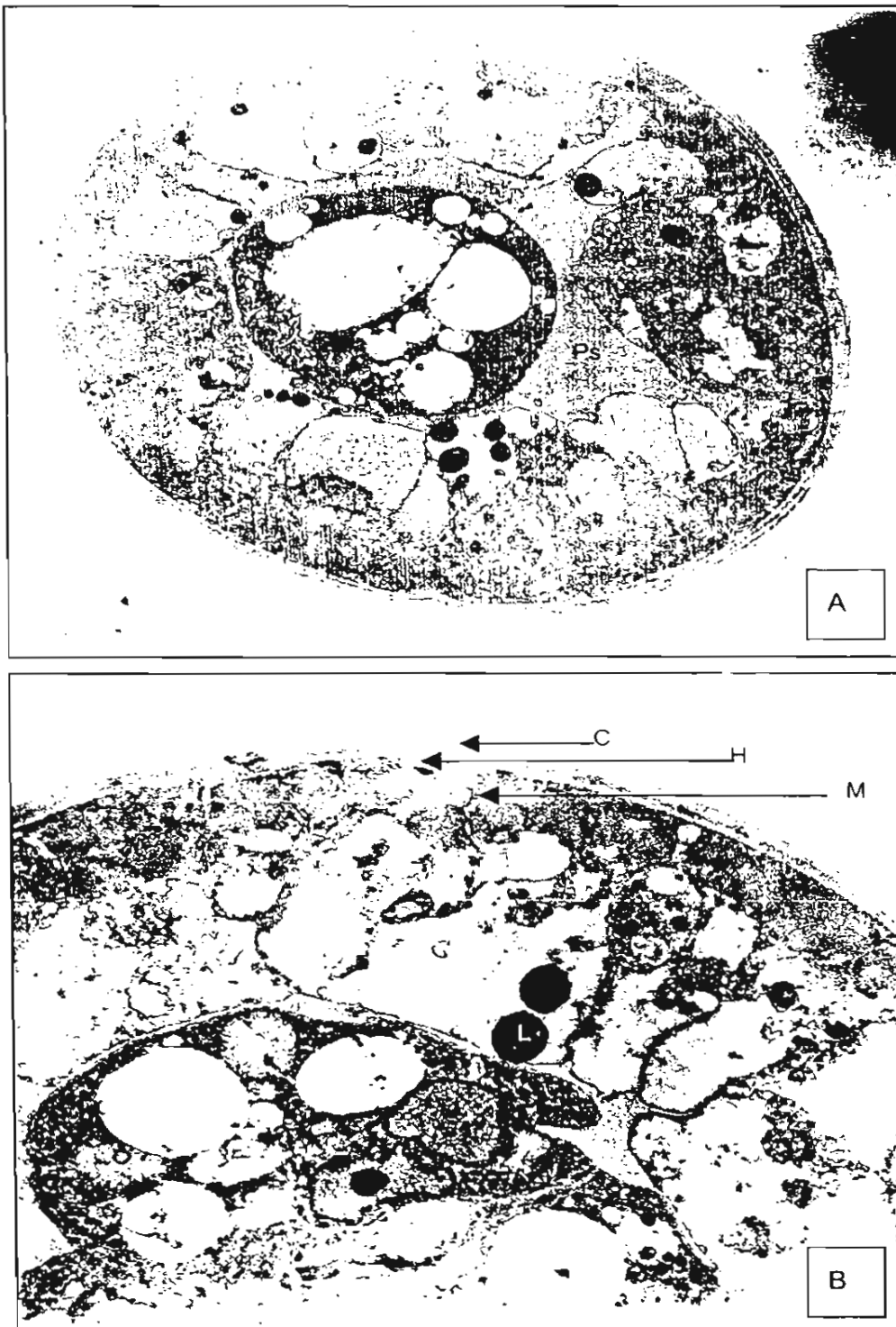
รูปที่ 6 ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบกับยาเดี่ยวในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน [O], [R] และ [P] ผิวบริเวณส่วนหัวมีปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papilla, OP), ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papilla, IP) และปาก (mouth, M) ทดสอบกับยา ALB ความเข้มข้น 10^{-5} M; [S] ส่วนหางมีปุ่มด้านข้าง 2 ปุ่ม (ventrolateral papillae, VLP) และปุ่มด้านหลัง 1 ปุ่ม (dorsoterminal papilla, DTP) ทดสอบกับยา DEC ความเข้มข้น 10^{-5} M; [Q] ผิวส่วนหัว และ [T] ผิวกลางลำตัวที่มีเส้นลายตามขวางหลังจากทดสอบกับยา IVM ความเข้มข้น 10^{-5} M



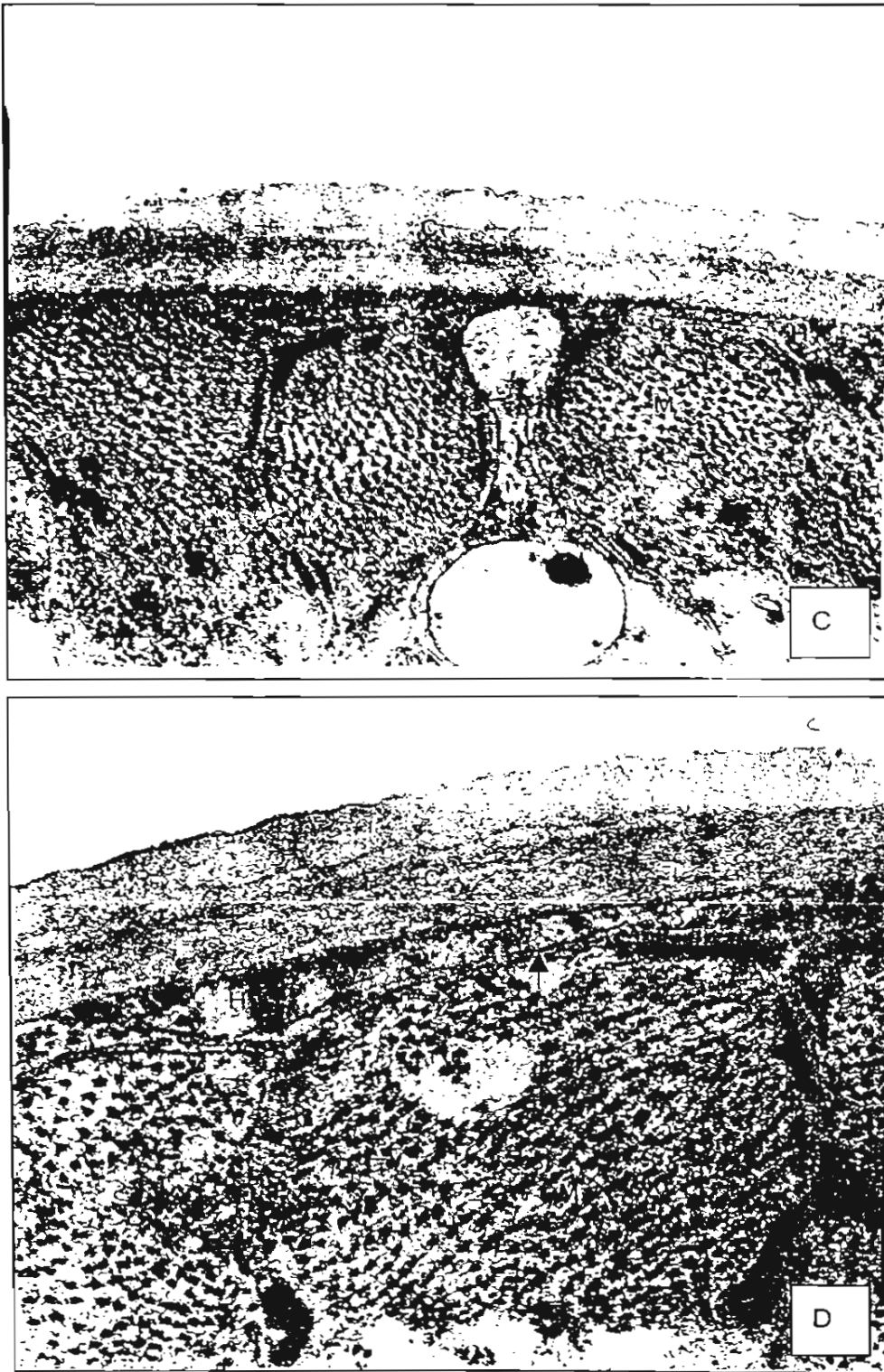
รูปที่ 7 การทดสอบประสิทธิภาพของยาผสม (ALB/IVM และ ALB/DEC) ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS, [U] ส่วนหางมีปุ่มด้านข้าง 2 ปุ่ม (ventrolateral papillae, VLP) และปุ่มด้านหลัง 1 ปุ่ม (dorso-terminal papilla, DTP) และ [W] ผิวบริเวณกลางลำตัวเมื่อทดสอบกับยาผสม ALB/DEC ความเข้มข้น $10^{-5}/10^{-5}$ M; [V] ส่วนหัวมีปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papilla, OP) ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papilla, IP) และปาก (mouth, M) และ [X] ผิวบริเวณกลางลำตัวแสดงเส้นลายตามขวางเมื่อทดสอบกับยาผสม ALB/IVM ความเข้มข้น $10^{-5}/10^{-5}$ M



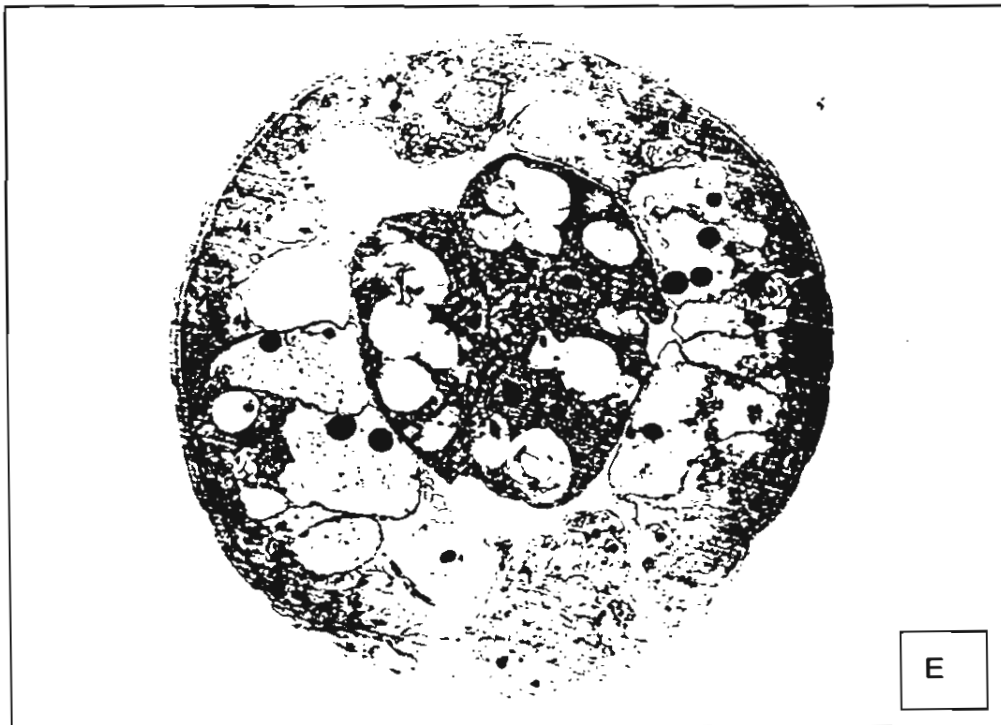
รูปที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว ivermectin (IVM) ความเข้มข้น 10^{-4} M ต่อดัวอ่อน ระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วันในอาหาร เลี้ยงเชื้อ NI-FBS, [Y] ผีวบริเวณกลางลำตัว; [Z] ภาพขยายใหญ่บริเวณผิวกลางลำตัวแสดงส่วนผิว ที่เป็นร่องและเส้นลายตามขวางหายไป



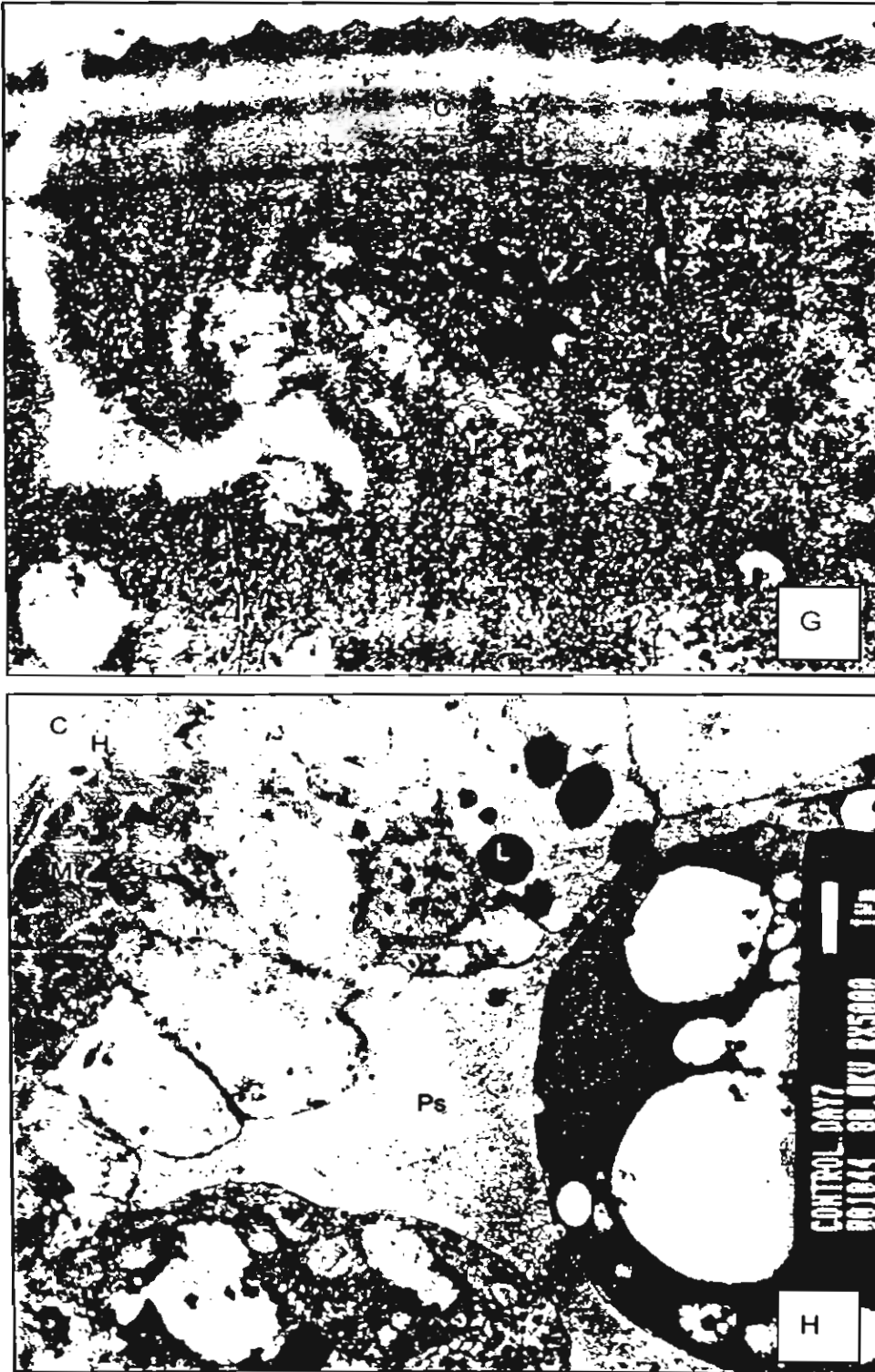
รูปที่ 9. ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (A) แสดงช่องว่างภายในลำตัว (pseudocoelom, Ps), (B) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M) และภายในลำตัวมีเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)



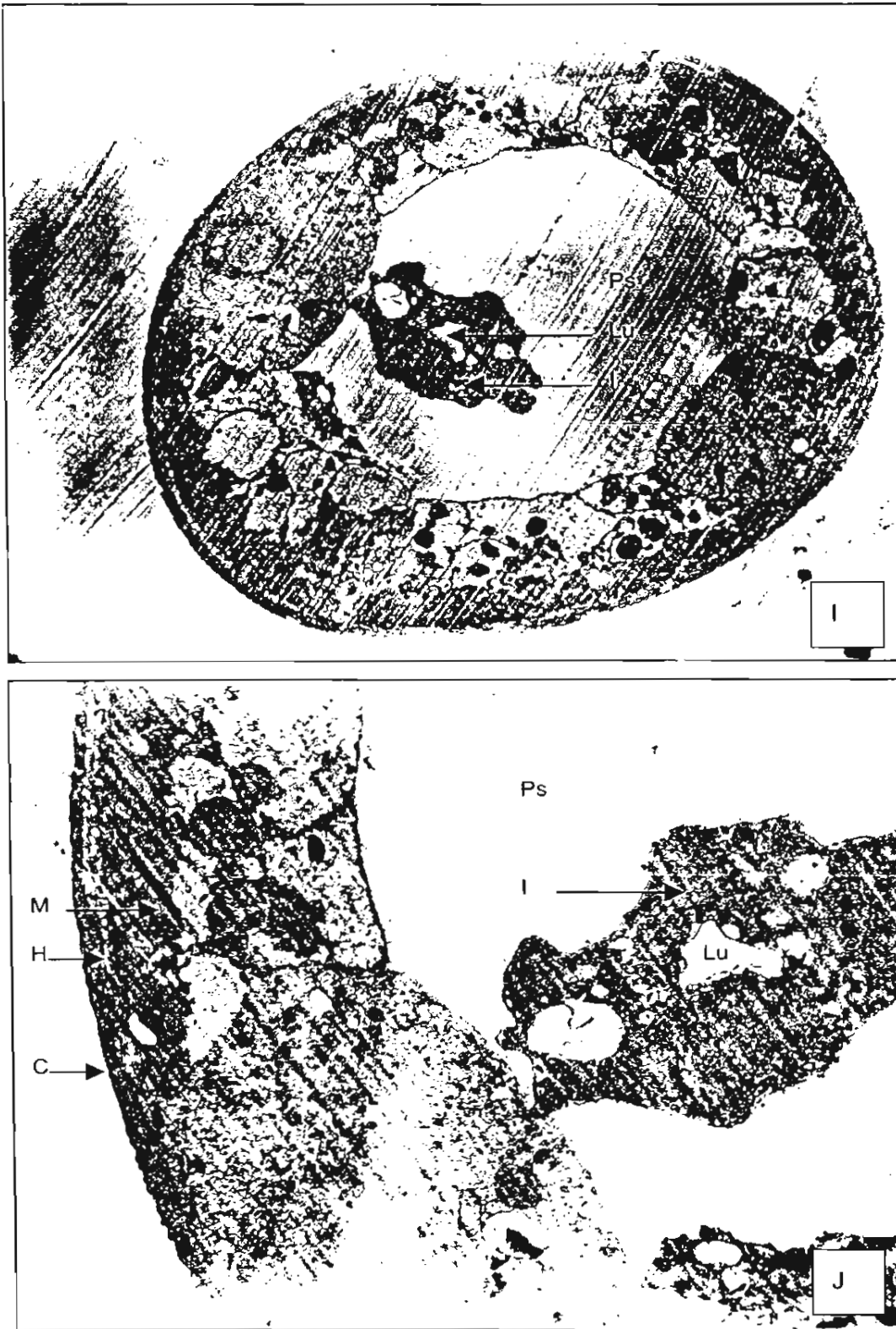
รูปที่ 10. ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อก (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (C) แสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวหนังชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวหนังชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M) (D) ภาพขยายใหญ่แสดงส่วนผิวหนังลำตัวทั้ง 3 ชั้น และ basement membrane (B)



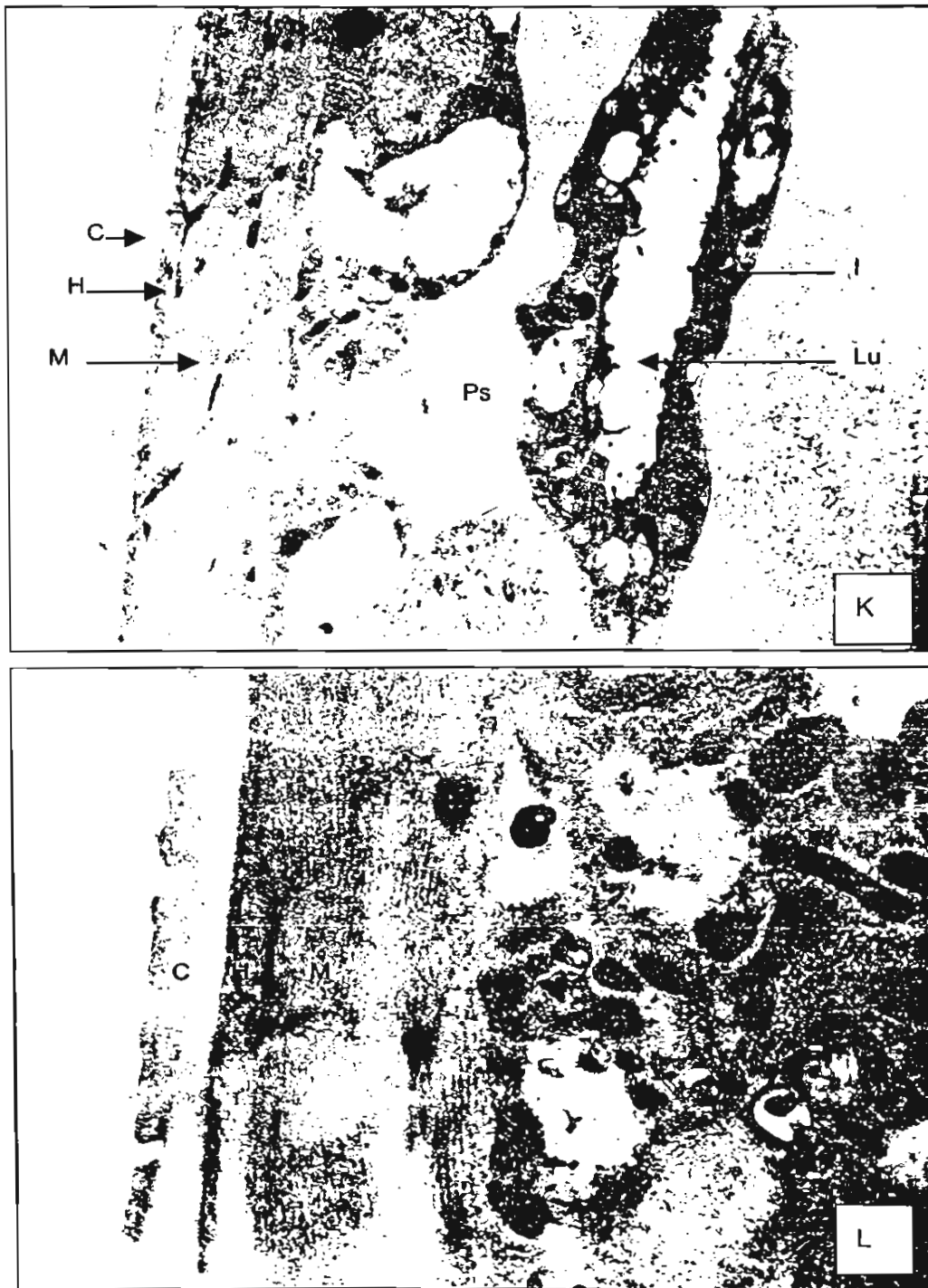
รูปที่ 11. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (E) ภาพตัดตามขวาง (F) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวหนังกลาง (hypodermis, H) และกล้ามเนื้อ (muscle, M)



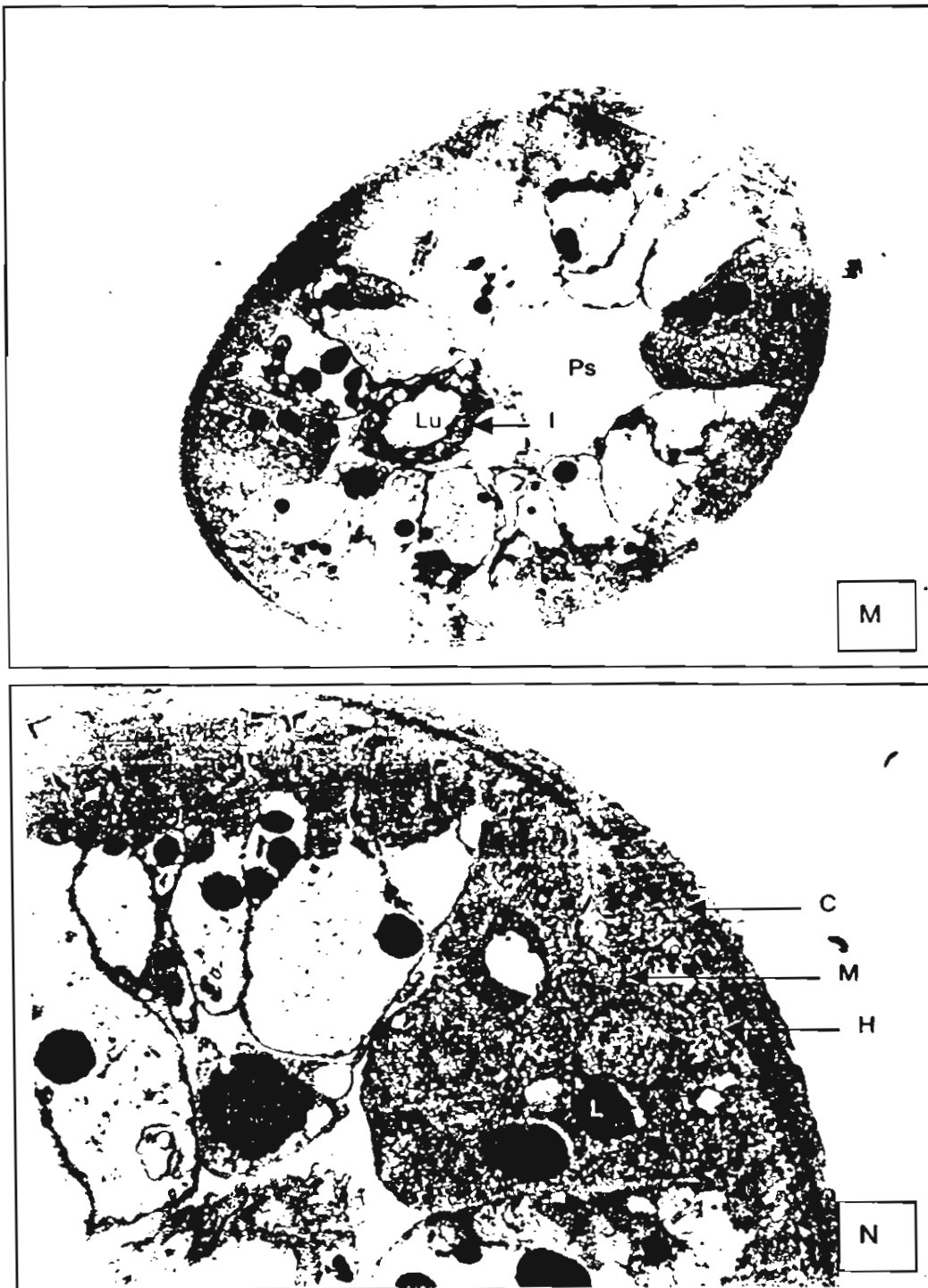
รูปที่ 12. ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (G) ภาพขยายใหญ่แสดงส่วนผิวหนังนอก (cuticle, C), (H) แสดงช่องว่างภายในลำตัว (pseudocoelom, Ps), ผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวหนังกลาง (hypodermis, H), ผิวหนังกล้ามเนื้อ (muscle, M) และภายในลำตัวมีเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)



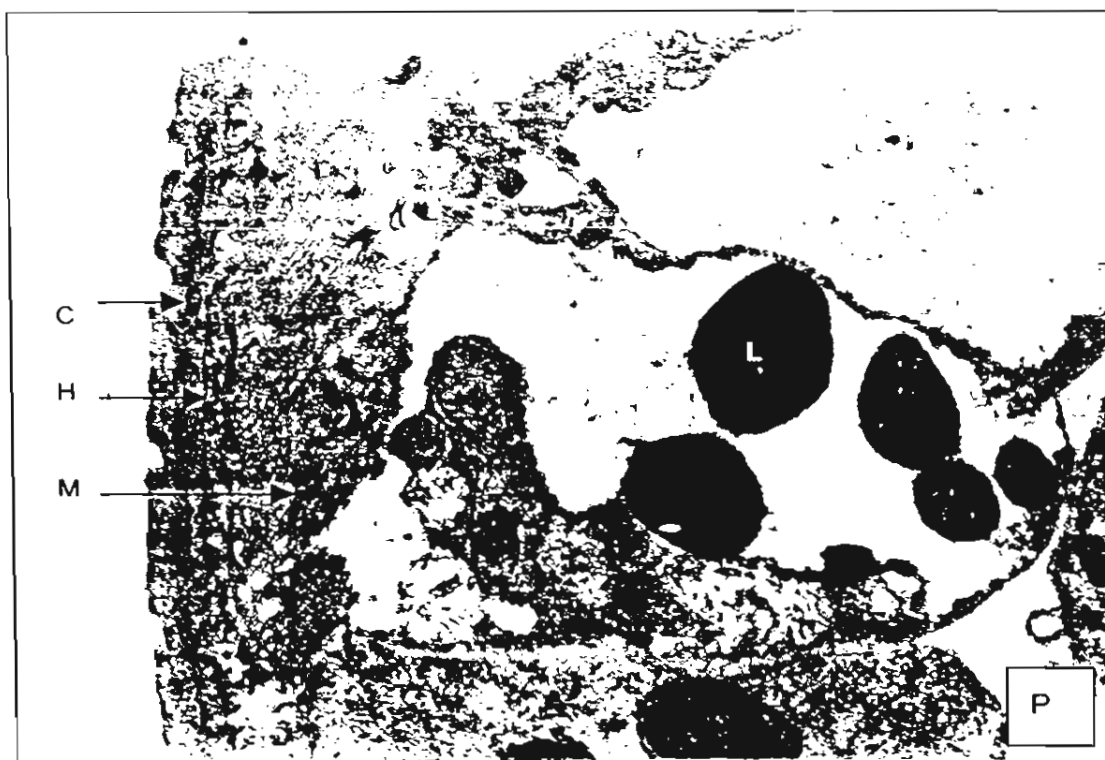
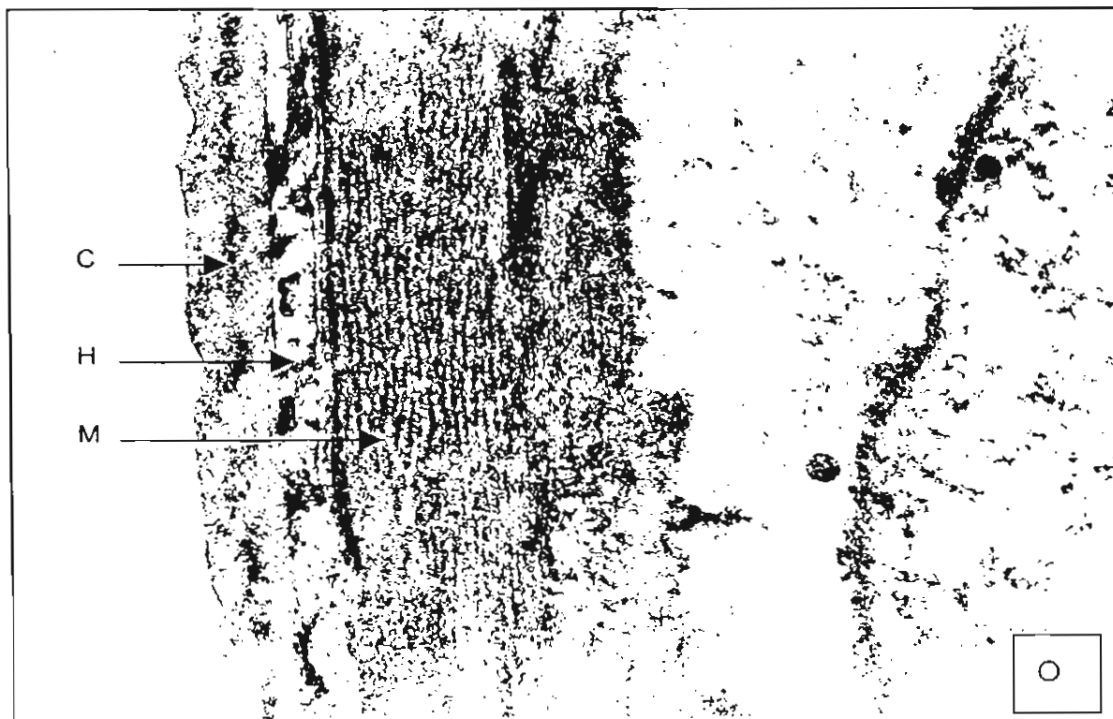
รูปที่ 13. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยา diethylcarbamazine ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (I) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนบริเวณลำไส้ (J) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M), ช่องว่างภายในลำตัว (pseudocoelom, Ps), ลำไส้ (intestine, I) และช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu)



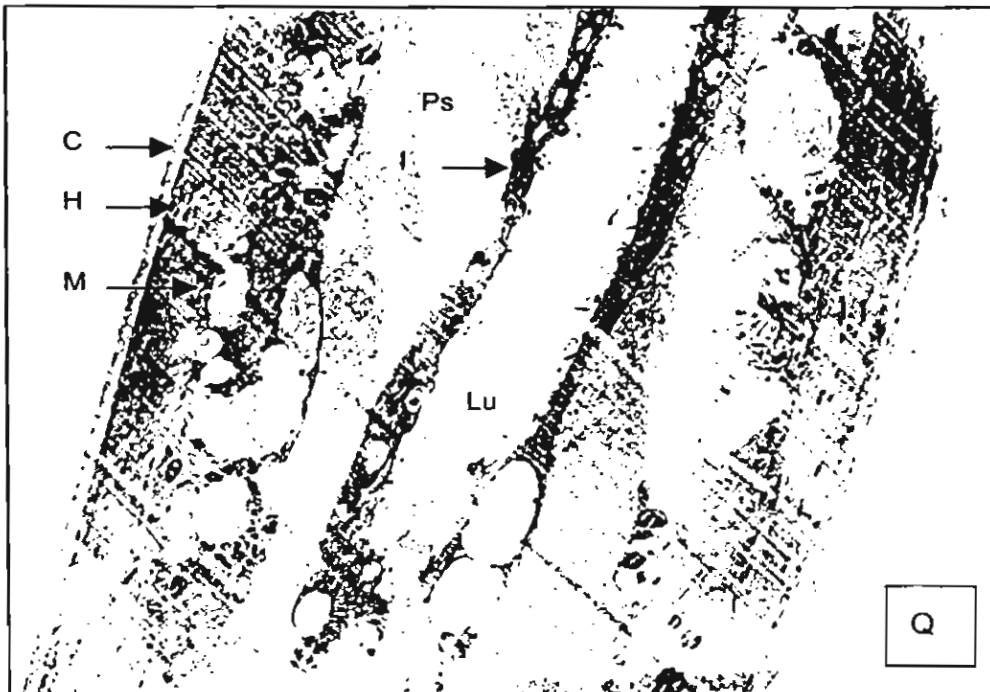
รูปที่ 14. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยา diethylcarbamazine ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (K) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนบริเวณลำไส้แสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ชั้นกลาง (hypodermis, H), ชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M), ลำไส้ (intestine, I), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu), และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom) (L) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น



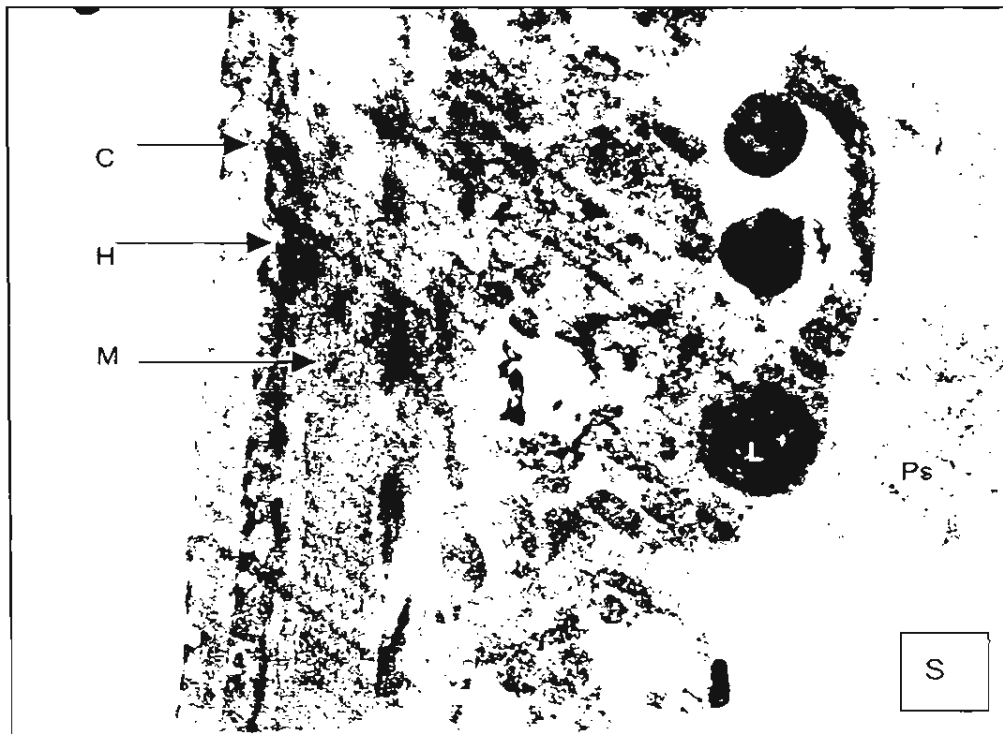
รูปที่ 15. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยา ivermectin ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (M) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนบริเวณลำไส้แสดงลำไส้ (intestine, I), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu) และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps), (N) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวลำตัวทั้งสามชั้น และเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)



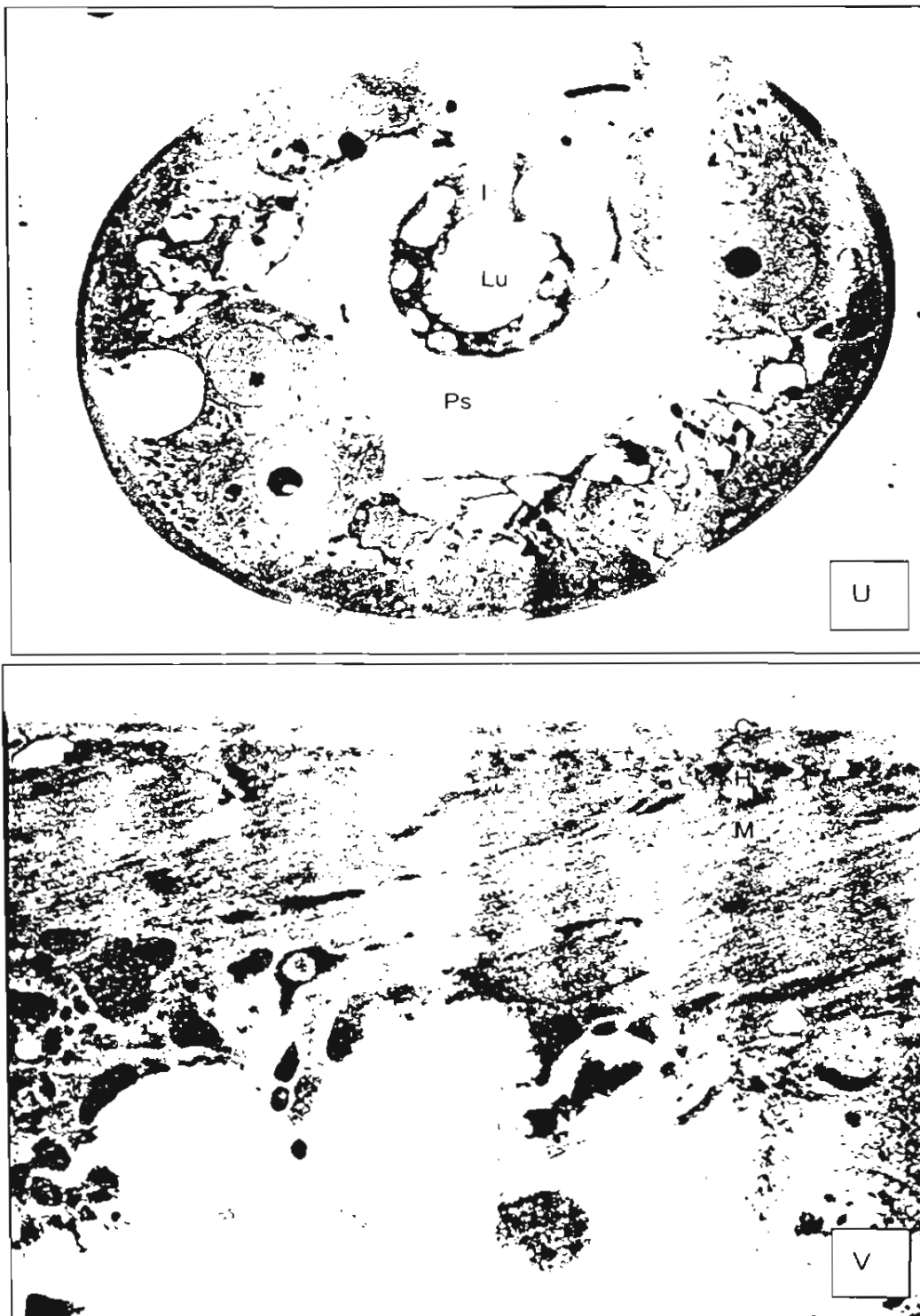
รูปที่ 16. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยา ivermectin ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (O) และ (P) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงผิวลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C; hypodermis, H; muscle, C) และเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)



รูปที่ 17. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยาผสม albendazole+diethylcarbamazine (ALB+DEC) ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (Q) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวหนังกลาง (hypodermis, H), ผิวหนังกล้ามเนื้อ (muscle, M), ลำไส้ (intestine, I), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu) และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps), (R) ภาพขยายใหญ่



รูปที่ 18. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยาผสม albendazole+diethylcarbamazine (ALB+DEC) ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (S) และ (T) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงผิวลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C; hypodermis, H; muscle, C), ช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps) และเม็ดไขมัน (lipid droplet, L)



รูปที่ 19. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยาผสม albendazole+ivermectin (ALB+IVM) ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (U) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงลำไส้ (intestine, L), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu) และช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps) (V) แสดงผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C; hypodermis, H; muscle, M)



รูปที่ 20. ตัวอ่อนระยะติดต่อดำรง (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทดสอบกับยา albendazole ความเข้มข้น 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (W) ภาพตัดตามขวางตัวอ่อนแสดงลำไส้ (intestine, L), ช่องว่างในลำไส้ (lumen, Lu), ช่องว่างในลำตัว (pseudocoelom, Ps) และผิวหนังลำตัวทั้งสามชั้น (cuticle, C; hypodermis, H; muscle, M)

วิจารณ์ผลการทดลอง

บทวิจารณ์

จากการศึกษาวิจัยจากนักวิจัยหลายกลุ่มและจากองค์การอนามัยโลก (Ottensen, 1997, WHO, 1995) ได้แนะนำโปรแกรมที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) คือ ให้ใช้ยาผสม 2 ขนาน คือ ยา albendazole (ALB) ผสมกับยา ivermectin (IVM) และยา albendazole ผสมกับยา diethylcarbamazine (DEC) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของยาทั้งสอง ขนานนี้จึงได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว ALB, DEC, IVM และยาผสม ALB+DEC, ALB+IVM ในหลอดทดลองต่อตัวอ่อนระยะติดต่อนของพยาธิฟิลาเรียชนิด nocturnally subperiodic *Brugia malayi* สายพันธุ์นราธิวาส ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดของโรคเท้าช้างอยู่ แถบภาคใต้ของประเทศไทย ตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อนที่จะนำมาใช้ในการ ทดสอบประสิทธิภาพของยาในหลอดทดลองในครั้งนี้ ได้มาจากการผ่าเอา L3 ออกจากยุงลาย ชนิด *Aedes togoi* หลังจากให้ยุงกินเลือดแมวที่มีพยาธิฟิลาเรียชนิดนี้เป็นเวลา 12 วัน วิธีการ ทดสอบประสิทธิภาพของยาในหลอดทดลองต่อพยาธิตัวอ่อนชนิดนี้ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของยาต่อพยาธิตัวอ่อนในหลอดทดลองจะใช้วิธีการเพาะเลี้ยง พยาธิตัวอ่อนในหลอดทดลองของ Tippawangsool et al (2002) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สามารถทำ การเพาะเลี้ยงพยาธิตัวอ่อนชนิดนี้ได้ในหลอดทดลอง และเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ ประสิทธิภาพของยา โดยทั่วไปแล้วการทดสอบประสิทธิภาพของยาในการรักษาโรคเท้าช้างส่วน ใหญ่จะทดสอบกับคน หรือใช้สัตว์ทดลองเพื่อดูประสิทธิภาพในการฆ่าไมโครฟิลาเรียในกระแส เลือด หรือฆ่าตัวแก่ (Bockarie et al., 1998; Dunyo et al., 2000; Nicholas et al., 1997; Ottensen, 1997; Shenoy et al., 1999; 2000; 2002) ผลจากการศึกษาพบว่ายา DEC หรือยา IVM ที่ผสมกับยา ALB จะมีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อใช้ยาเดี่ยวๆ ในการลดจำนวนของไมโครฟิลา เรียในกระแสเลือด อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีรายงานใดที่สันที่สุดที่สามารถกำจัดพยาธิตัว แก่ได้ (Mc Reynolds et al, 1993) จากการศึกษาประสิทธิภาพของยาในหลอดทดลองครั้งนี้ให้ผล สอดคล้องกับการศึกษาของคนอื่นๆ คือยาผสมทั้งสองขนาน ALB+DEC, ALB+IVM มีประสิทธิ ภาพในการลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อนได้ดีกว่าเมื่อใช้ยาเดี่ยว DEC และ IVM และพบว่า ยาเดี่ยว ALB ไม่มีผลต่อพยาธิตัวอ่อนในหลอดทดลองหลังจากทำการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน จาก การศึกษาของ Shenoy et al (2002) ให้ผลตรงกันข้ามคือเมื่อศึกษาเภสัชจลศาสตร์ (pharmacokinetic) ของยา DEC และยา ALB เมื่อใช้เดี่ยวหรือใช้ผสมกันพบว่ายาทั้งสองไม่มีผล เภสัชจลศาสตร์ต่อกัน มีการศึกษาในหลอดทดลองจำนวนเล็กน้อยเท่านั้นที่ทำการทดสอบถึงฤทธิ์

ของยาโดยตรงต่อพยาธิตัวอ่อนระยะติดตัวของโรคเท้าช้าง เนื่องจากชาดสัตว์ทดลองที่เป็นแหล่งของพยาธิ และมีค่าใช้จ่ายสูงในการดูแลสัตว์ทดลองเหล่านี้ นอกเหนือจากนี้ยังไม่เหมาะสมกับห้องแล็บที่มีพื้นที่จำกัด อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาในคนพบว่ายา IVM และยา DEC เมื่อใช้เดี่ยวหรือใช้ผสมกับยา ALB จะมีประสิทธิภาพต่อระยะไมโครฟิลาเรีย ในขณะที่ยาเดี่ยว ALB มีฤทธิ์ในการฆ่าตัวแก่ได้ (Jayakody *et al.*, 1993; Ismail *et al.*, 1998; WHO, 1996) การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรต่อพยาธิฟิลาเรียของสัตว์ชนิด *B. pahangi* ในหลอดทดลองของ Khunkitti *et al* (2000) พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวแก่และยับยั้งการปล่อยไมโครฟิลาเรียจากตัวเมีย และที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการเคลื่อนไหวของไมโครฟิลาเรียได้หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 2 วัน การศึกษาของ Shenoy *et al* (1999, 2000) รายงานผลของยาผสม ALB+DEC ว่ามีประสิทธิภาพดีกว่ายาผสม ALB+IVM ในการรักษาคนที่เป็นโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ทำในหลอดทดลองในครั้งนี้อยู่ โดยพบว่ายาผสม ALB+DEC มีประสิทธิภาพในการลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อนได้ดีกว่ายาผสม ALB+IVM ที่ความเข้มข้นของยา 10^{-6} M/ 10^{-6} M ความเข้มข้นสูงสุดที่เชื่อว่ามีประสิทธิภาพต่อพยาธิฟิลาเรียจะอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 800-1,000 ng/ml (Stephenson and Wiselka, 2000) จากการศึกษาของ Shenoy *et al* (2002) พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของยา DEC ในกระแสเลือดเมื่อใช้เดี่ยวเท่ากับ 1,930 ng/ml และเมื่อใช้ผสมกับยา ALB เท่ากับ 1,813 ng/ml แต่ความเข้มข้นของยา DEC ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาในหลอดทดลองในครั้งนี้อยู่ระหว่าง 391 pg/ml ถึง 391 $\mu\text{g/ml}$ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของยา DEC ในช่วงระหว่าง 391 ng/ml ถึง 391 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อนได้เมื่อทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสม เนื่องจากการทดสอบในหลอดทดลองนั้นยาสามารถมีฤทธิ์ต่อพยาธิตัวอ่อนโดยตรงดังนั้นความเข้มข้นของยาที่ใช้ทดสอบจะใช้น้อยกว่าที่ใช้ในคน ถึงแม้ว่าในการศึกษาเภสัชจลศาสตร์ของยาพบว่ายา ALB และยา DEC ไม่มีผลเภสัชจลศาสตร์ต่อกัน แต่จากการทดลองในหลอดทดลองพบว่ายาทั้งสองมีฤทธิ์เสริมกัน ยาเดี่ยว ALB ไม่มีผลต่อพยาธิตัวอ่อนอาจเป็นเพราะว่าตัวยาที่ออกฤทธิ์ต่อพยาธิคือ albendazole sulphoxide ซึ่งเป็นเมตาโบไลต์ของยา ALB และยา ALB ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น albendazole sulphoxide ได้ในหลอดทดลอง ดังนั้นยา ALB เมื่อใช้เดี่ยวๆจะไม่มีผลต่อพยาธิตัวอ่อนในหลอดทดลองแต่เมื่อผสมกับยา DEC หรือยา IVM จะทำให้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเมื่อใช้ยาเดี่ยวๆ ดังนั้นยา ALB อาจจะมีส่วนร่วมที่ช่วยในการเสริมฤทธิ์ยา DEC และยา IVM นอกจากการดูผลของยาต่อการลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อนแล้ว ได้มีการวัดขนาด

ของพยาธิตัวอ่อนด้วย จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนในกลุ่มที่มียาเดี่ยวและยาผสมมีค่าเฉลี่ยความยาวของลำตัวสั้นกว่าพยาธิตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ายาเดี่ยว DEC ความเข้มข้น 10^{-4} M ถึง 10^{-6} M, ยา IVM 10^{-5} M ถึง 10^{-7} M และยาผสม ALB+DEC ความเข้มข้น 10^{-6} M/ 10^{-6} M, 10^{-5} M/ 10^{-5} M มีผลต่อการเคลื่อนไหวและรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิตัวอ้วน *B. malayi* แต่อย่างไรก็ตามยาชนิดเดี่ยวและผสมที่ความเข้มข้นนี้ไม่สามารถฆ่าพยาธิตัวอ่อนได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยา IVM เท่ากับ 10^{-4} M พบว่ายาสสามารถฆ่าพยาธิตัวอ่อนได้ภายใน 2 ชั่วโมง ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา IVM ที่สามารถฆ่าพยาธิตัวอ่อน (minimal lethal concentration, MLC) คือ 10^{-4} M และเมื่อนำพยาธิตัวอ่อนไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าผิวบริเวณลำตัวของพยาธิตัวอ่อนมีลักษณะเป็นร่องลึก และเส้นลายตามขวางหายไป ยาเดี่ยว ALB, IVM, DEC ความเข้มข้น 10^{-6} M และยาผสม ALB+DEC, ALB+IVM ความเข้มข้น 10^{-6} M/ 10^{-6} M ความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของยาที่พบในกระแสเลือดคน จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าที่ความเข้มข้นนี้ยาเดี่ยว IVM และ DEC ยกเว้น ALB และยาผสม ALB/DEC, ALB/IVM สามารถลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวอ่อน แต่เมื่อนำตัวอ่อนเหล่านี้มาศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าตัวอ่อนหลังจากที่ทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสมเป็นเวลา 7 วันไม่พบการเปลี่ยนแปลงบนผิวของพยาธิตัวอ่อนเลย รูปร่างลักษณะของพยาธิตัวอ่อนหลังจากทำการเพาะเลี้ยง 7 วันจะมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับตัวอ่อนที่ได้มีการศึกษามาก่อนแล้ว (Maleewong *et al.*, 1987) แต่ตัวอ่อนจากการศึกษาในครั้งก่อนไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาก่อน แต่ L3 ที่ได้เป็น L3 ที่ได้จากยุงชนิดเดียวกันคือ *Ae. togoi* อาจเป็นไปได้ว่าพยาธิตัวอ่อนไม่สามารถเจริญต่อไปเป็นระยะอื่นได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยง 7 วัน เพราะจากการศึกษาของ Tippawangkosol *et al* (2002) พบว่า L3 สามารถลอกคราบและเปลี่ยนระยะเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 ได้หลังจากเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมากกว่า 7 วัน จากการทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยวและยาผสม พบว่ายาเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ALB, DEC, IVM และยาผสม ALB/DEC, ALB/IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M ไม่สามารถทำลายผิวลำตัวของตัวอ่อนพยาธิตัวอ้วนหรือไม่มีผลต่อรูปร่างของตัวอ่อนพยาธิตัวอ้วน หลังจากทำการเพาะเลี้ยง 7 วัน เช่นเดียวกับการศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของพยาธิตัวอ่อนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่ายาเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดและยาผสม 2 ชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ไม่มีผลต่ออวัยวะภายในของพยาธิตัวอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับพยาธิตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมทั้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จากการศึกษาลักษณะภาพของยาในหลอดทดลองพบว่าให้ผลสอดคล้องกันกับผลที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพ

ภาพในคน คือ ยาผสม ALB+DEC และยา ALB+IVM มีประสิทธิภาพดีกว่ายาเดี่ยวๆ และยาผสม ALB+DEC มีประสิทธิภาพดีกว่ายา ALB+IVM ดังนั้นยาผสม ALB+DEC และยา ALB+IVM จึงเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคเท้าช้างและเป็นยาที่องค์การอนามัยโลก (WHO) นำมาใช้ในการควบคุมโรคเท้าช้างในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- Addiss D. Lymphatic filariasis. Bull Wld Hlth Org 1998; 76 (Supl 2): 145-146.
- Ash LR and Riley JM. Development of subperiodic *Brugia malayi* in the jirds, *Meriones unguiculatus*, with notes on infections in other rodents. J Parasitol 1970; 56: 969-973.
- Bockarie MJ, Alexander ND, Hyun P, Dimber Z, Bockarie F, Ibam E, Alpers MP, Kazura JW. Randomised community-based trial of annual single-dose diethylcarbamazine with or without ivermectin against *Wuchereria bancrofti* infection in human beings and mosquitoes. Lancet 1998; 351: 162-168.
- Chanteau S, Plichart R, Spiegel A, Martin PM, Cartel JL. Diagnosis values of ELISA-IgG4 as compared to ELISA-IgG and indirect immunofluorescence for the routine diagnosis of bancroftian filariasis in South Pacific. Trop Med Parasitol 1991; 42: 339-342.
- Chomcharn Y. The study of *Plasmodium falciparum* in Thailand with respect to the mosquito vector, *Anopheles balbacensis* Baisis, and the effect of primaquine on the gametocytes and sporogony. Ph.D. Thesis of the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand 1979: 177.
- Choochote W. Determination of the susceptibility of laboratory bred *Aedes togoi* and *Anopheles mosquitoes* to *Brugia phangi*. MSc. Thesis, School of Tropical Medicine, University, Bangkok, Thailand, 1981:130.
- Choochote W, Keha P, Sukhvat K, Khamboonruang C, Sukontason K. *Aedes* (Finlaya) *togoi* Theobald 1907, Chantaburi strain, a laboratory vector in studies of filariasis in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1987; 18: 259-260.
- Deverre JR, Loiseau P, P Couvreur, Letourneux Y, Gayral P, Benoit JP. *In vitro* evaluation of filaricidal activity of GABA and 1,3-dipalmitoyl-2-(4-aminobutyl) glycerol HCl: a diglyceride prodrug. J Pharm Pharmacol 1989; 41: 191-193.

- Division of Filariasis. Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health 1995; 46.
- Division of Filariasis. Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health 1996; 17-29.
- Division of Filariasis. Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health 1998.
- Dollery C. Therapeutic Drugs. Edinburgh: Churchill Livingstone 1991.
- Dreyer GD, Addiss A, Santos J, Figueredo-Silva, Noroes J. Direct assessment *in vivo* of the efficacy of combined single-dose ivermectin and diethylcarbamazine against adult *Wuchereria bancrofti*. Trans R Soc Trop Med. Hyg 1998; 92: 219-222.
- Dunyo SK, Nkrumah FK, Simonsen PE. A randomized double-blind placebo-controlled field trial of ivermectin and albendazole alone and in combination for the treatment of lymphatic filariasis in Ghana. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 205-211.
- Figueredo-Silva J, Jungmann P, Noroes J, Piessens WF, Coutinho A, Brito C, Rocha A, Dreyer G. Histological evidence for adulticidal effect of low dose of diethylcarbamazine in bancroftian filariasis. . Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 192-194.
- Gayral P, Gueyouche C, Bories C, Loiseau P, Demersemann P, Lamotte G, Royer R. Macrofilaricidal activity of metabolites of diethylcarbamazine. Arzneimittel Forschung Drug Research 1989; 39: 226-230.
- Guptavanij P, Harinasuta C, Surathin K, Vutikes S, Deesin T. Studies on the prevalence of malayan filariasis in southern Thailand Southeast Asian J Trop Med Public Health 1977; 8: 42-52.
- Harinasuta C, Charoenlarp P, Sucharit S, Deesin T, Surathin K, Vutikes S. Studies on Malayan filariasis in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1970; 1: 29-30.

- Horton J, Witt C, Ottensen EA et al. An analysis of the safety of the single dose, two drug regimens used in programmes to eliminate lymphatic filariasis. *Parasitol* 2000; 121 (suppl): 147-160.
- Ismail MM, Jayakody RL, Weil GJ, et al. Efficacy of single dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 94-97.
- Jayakody RL, Desilva CSS, Weerasinghe WI. Treatment of bancroftian filariasis with albendazole: evaluation of efficacy and adverse reactions. *Trop Biomed* 1993; 10: 19-24.
- Khunkitti W, Fujimaki Y, Aoki Y. *In vitro* antifilarial activity of extracts of the medical plant *Cardiospermum halicacabum* against *Brugia pahangi*. *J Helminth* 2000; 74: 241-246.
- Kiuchi F, Miyashita N, Tsuda Y, Yoshimura H, Kondo R. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans, identification of larvicidal principals in Betel nuts. *Chem. Pharm. Bull* 1987; 35: 2880-2886.
- Maleewong W, Choochote W, Sukhavat C, Khamboonruang C, Arunyanart C. Scanning electron microscopic study of third- stage larva of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987; 18: 261-264.
- Mc Reynolds LA, Poole C, Hong Y, William SA, Partono F, Bradley J. Recent advances in the application of molecular biology in filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993; 24: 55-63.
- Nicolas L, Luquiaud P, Lardeux F, Mereer DR. Reduction of *Wuchereria bancrofti* adult worm circulating antigen after annual treatments of diethylcarbamazine combined with ivermectin in French Polynesia. *J Infect Dis* 1997; 175: 489-492.
- Noroës J, Dreyer G, Santos M, Mendes VG, Medeiros Z, Addis D. Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti* *in vivo*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1997; 91: 78-81.

- Ottensen EA, Duke BOL, Karam M, Behbehani K. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariae. *Bull Wild Hlth Org* 1997; 75: 491-503.
- Pongraveevongsa P and Ruangyuttikarn W. Measurement of serum cholinesterase level in normal Thai people. *Chiang Mai Med Bull* 2000; 39:21-29.
- Poole C, William SA. A rapid DNA assay for the species-specific detection and quantification of *Brugia malayi* in blood samples. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 40: 129-136.
- Rapson EB, Chiwan AS, Jenkins DC. Acetylcholinesterase secretion-a parameter for the interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. *Parasitol* 1986; 92: 599-608.
- Riberu WA, Atmosoedjono S, Purnomo S, Tirtokusuma S, Bangs MJ, Baird JK. Cultivation of sexually mature *Brugia malayi* *in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol* 1990; 43: 3-5.
- Sharma S, Misra S, Rathaur S. Secretory acetylcholinesterase of *Setaria cervi* microfilariae and its antigenic cross-reactivity with *Wuchereria bancrofti*. *Trop Med Int Health*. 1998; 3: 46-51.
- Sharma S, Rathaur S. Characterization of secretory acetylcholinesterase from *Setaria cervi* microfilaria: a potential antigen for diagnosis of human filariasis. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 341-8.
- Shenoy RK, George LM, John A, Suma TK, Kumaraswami V. Treatment of the microfilaremia in asymptomatic brugian filariasis: the efficacy and safety of the combination of single dose of ivermectin and diethylcarbamazine. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 579-585.
- Shenoy RK, Dalia S, John A, Suma TK, Kumaraswami V. Treatment of the microfilaraemia of asymptomatic brugian filariasis with a single dose of ivermectin, diethylcarbamazine or albendazole, in various combinations. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; 93: 643-651.
- Shenoy RK, John A, Babu BS, Suma TK, Kumaraswami V. Two years follow up of the microfilaremia of asymptomatic brugian filariasis after treatment with two annual

- single doses of ivermectin, diethylcarbamazine and albendazole in various combinations. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 607, 614.
- Shenoy RK, Suma TK, John A, Arun SR, Kumaraswanmai V, Fleckenstein LL, Na-Bangchang K. The pharmacokinetics, safety and tolerability of the co-administration of diethylcarbamazine and albendazole. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 603, 614.
- Stephenso O and Wiselka M. Drug treatment of tropical parasitic infections: recent achievements and developments. *Drugs* 2000; 60: 985-995.
- Supali T, Ismid IS, Ruckert P, Fischer P. Treatment of *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti* infections in Indonesia using DEC or a combination of DEC and albendazole: adverse reactions and short-term effects on microfilariae. *Trop Med Int Hlth* 2002; 7: 894-901.
- Suwan N, Rongsriyam Y, Tippawangkosol P, Choochote W. A suitable technique for *in vitro* development of *Dirofilaria immitis* from the second stage larvae to the infective larvae. *Mosq Borne Dis Bull* 1993; 10: 83-90.
- Tippawangkosol P, Choochote W, Riyong D, Jitpakdi A, Pitasawat B. A simple technique for the *in vitro* cultivation of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* infective larvae. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33 (suppl 3): 16-22.
- World Health Organization. Lymphatic filariasis. The disease and its control. World Health Organization, Geneva, WHO Tech Rep Ser 1992; 821.
- World Health Organization. Strategies for control of lymphatic filariasis infection and disease: Report of a WHO/CTD/TDR consultative meeting held at the University Sains, Penang, Malaysia, 22-24 August Geneva: WHO 1994 (TDR/CTD/FIL/PENANG/94.1).
- World Health Organization. Lymphatic filariasis. World Health Organization Fact Sheet No. 102 Rev. March 1999.

World Health Organization. Report from the WHO Informal Consultation on Albendazole Research Findings in Lymphatic Filariasis. Document WHO/FIL.194. Geneva: WHO 1996.

Yates JA, Schmitz K.A, Nelson FK, Rajan TV. Infectivity and normal development of *Brugia malayi* maintained *in vitro*. J Parasitol 1994; 80: 891-894.

Output จากโครงการวิจัย

Output จากโครงการวิจัย

ผลงานเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง

1. วารสาร
เรื่อง Annals of Tropical Medicine and Parasitology (submitted)
"Comparative assessment of the *in vitro* sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine and ivermectin alone, and in combination against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain)"

2. วารสาร
เรื่อง Journal of Vector Ecology
"The *in vitro* effect of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine and their combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain) : scanning electron microscopy"

Manuscript

Manuscript

Manuscript จำนวน 2 เรื่อง

1. Comparative assessment of the *in vitro* sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine and ivermectin alone, and in combination against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain) (submitted)
2. The *in vitro* effect of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine and their combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain) : scanning electron microscopy



Department of Parasitology
Faculty of Medicine
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 THAILAND
Tel. 66-53-945342-5 Fax. 66-53-217144
<http://www.medicine.cmu.ac.th>

3 June, 2003

Dr. Keith Wallbanks, Editor
Liverpool School of Tropical Medicine
Pembroke Place
Liverpool L3 5QA
U.K.

Dear Dr. Wallbanks:

Enclosed please find manuscripts submitted for consideration for publication in the *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. This paper is entitled "Comparative assessment of the *in vitro* sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine, ivermectin alone and their combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain)"

I hope you will find the paper interesting and suitable for publication. It has not been submitted or published elsewhere, and I agree that, if accepted, the copyright will be assigned to the *Annals of Tropical Medicine*.

Sincerely yours,

Pongsri Tippawangkosol, Ph.D.

Email : ptippawangkosol@mail.med.cmu.ac.th

- Encl: 1. Three original copies of manuscript
2. Floppy disk (File name = *brugiamanu*); Microsoft Word 97

ANNALS OF TROPICAL MEDICINE AND PARASITOLOGY

Dr P Tippawangkosol
Department of Parasitology
Faculty of Medicine
Chiang Mai University
Chiang Mai
50200

Dr Ref: 03/102

09 June 2003

Dear Dr Tippawangkosol

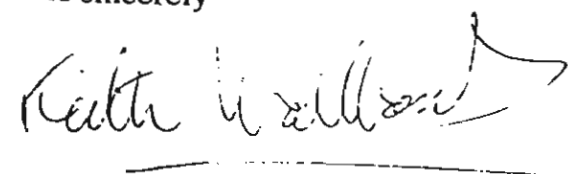
Comparative assessment of the in vitro sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine and ivermectin alone, and in combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain)

P. Tippawangkosol, W. Choochote, K. Na-Bangchan, A. Jitpakdi, B. Pitasawat, D. Riyong

Thank you for the above manuscript, which will now be sent to referees. I will let you have their decision soon as possible.

I wish

Yours sincerely



Keith Wallbanks

Editor: Dr Keith Wallbanks

Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, U.K.
Telephone: +44 (0)151 705 3131 Fax: +44 (0)151 707 9115 E-mail: krw@liverpool.ac.uk

Published by Maney Publishing for the Liverpool School of Tropical Medicine

<http://www.maney.co.uk/atmp.html>




M A N E Y
Publishing

Comparative assessment of the *in vitro* sensitivity of albendazole, diethylcarbamazine and ivermectin alone, and in combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain)

Running title: IN VITRO DRUG SENSITIVITY

P. TIPPAWANGKOSOL*, W. CHOOCHOTE

Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

K. NA-BANGCHAN

Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, 99 Mu 18, Paholyothin Road, Klongluang District, Pathumthanee 12121, Thailand

A. JITPAKDI, B. PITASAWAT, D. RIYONG

Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

*Author to whom correspondence should be addressed.

Email: ptippawa@mail.med.cmu.ac.th; fax: +66-53-217144.

The antifilaricidal drugs of ivermectin (IVM), diethylcarbamazine (DEC) and albendazole (ALB), used alone or in combinations against infective third stage larvae (L3) of nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* (Narathiwat strain), were performed in an *in vitro* sensitivity test for 7 days. IVM alone reduced larval motility at concentrations of 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} M on day 3. DEC alone also had this effect at concentrations of 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M on day 2. ALB alone did not have this effect throughout the experiments, even at a high concentration. However, it had more effect when used in combination with either DEC or IVM. The result also indicated that DEC or IVM, when used in combination with ALB at concentrations of 10^{-6} M/ 10^{-6} M and 10^{-5} M/ 10^{-5} M was effectively better than each drug used alone at those concentrations. When both drug combinations were compared, ALB/DEC was effectively better than ALB/IVM against L3 at a concentration of 10^{-6} M/ 10^{-6} M on day 3. Although all these drugs can reduce larval motility when used alone or in combinations, they cannot kill these larvae in an *in vitro* cultivation, even at a high concentration (10^{-5} M).

INTRODUCTION

Filariasis is still a major public health problem world wide, particularly in tropical and sub tropical regions (WHO, 1992). In Thailand, at least two endemic areas of filariasis have been reported, i.e. malayan filariasis due to *Brugia malayi* in the south, and bancroftian filariasis due to *Wuchereria bancrofti* in a limited area in the west (Division of Filariasis, 1995; Guptavanij *et al.*, 1977; Harinasuta *et al.*, 1970). Even though a control programme for malayan filariasis has been established in Thailand for a long time, the disease is still endemic year by year.

Chemotherapy is one of the strategic tools used for reducing microfilaremia in humans. However, it is currently known that no short chemotherapeutic treatment will clear all adult parasites (Mc Reynolds *et al.*, 1993). Recently, there have been several studies that show the efficacy and safety of a single dose of the filaricidal drug combination, ALB+IVM or ALB+DEC (Dunyo *et al.*, 2000; Harton *et al.*, 2000; Ismail *et al.*, 1998; 2001; Shenoy *et al.*, 1999; 2000; 2002; Supali *et al.*, 2002). The effective single dose of ALB (400 mg), given in combination with either DEC (6 mg/kg) or IVM (200 µg/kg), is now recommended to interrupt the transmission of lymphatic filariasis (Ottesen, 1997; WHO, 1994). Although several studies on the effect of filaricidal drugs against both microfilaria (Shenoy *et al.*, 1999; 2000; 2002) and adult worm (Dreyer *et al.*, 1998; Figueredo-Silva *et al.*, 1996; Noroes *et al.*, 1997; Gayral *et al.*, 1989) have been carried out, few studies have been reported on the effect of these drugs against infective larvae, which are transmitted to humans by mosquitoes (Deverre *et al.*, 1989; Gayral *et al.*, 1989).

Advanced and modernized studies of filariasis due to *B. malayi*, particularly the nocturnally subperiodic (NSP) strain from southern Thailand, are still hampered by the lack of practical and facile systems. Although the most successful system has been with Mongolian jirds, which was a host model for NSP *B. malayi* (Narathiwat strain), it is rather expensive to use laboratory animals as experimental hosts (Choochote *et al.*, 1986; 1991). An *in vitro* cultivation system and drug sensitivity test should be developed in order to achieve a practical and inexpensive system in which to carry out a variety of

investigations, i.e. biochemistry, pharmacology, physiology, immunology and molecular biology. In addition, it is important in the study of a possible site for filaricidal drugs to kill the filarial larvae that can only be performed *in vitro*, where all direct response and symptomatological and specific organs can be observed. Furthermore, parasitocidal activity is much more efficient *in vitro* than *in vivo*. This was the first study on the assessment of the *in vitro* drug sensitivity test against third stage larvae of NSP *B. malayi* (Narathiwat strain). In this study, we focused on the direct effect of filaricidal drugs alone; ALB, DEC and IVM, and their combinations of ALB with either DEC or IVM against the larvae of this parasite. The morphological change of the treated larvae was observed under a dissecting microscope. All information from this study will contribute to the various aspects of important basic and advanced knowledge.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of NSP *B. malayi* Infective Third Stage Larvae

Infective third stage larvae (L3) of NSP *B. malayi* (Narathiwat strain) were obtained from laboratory reared *Aedes togoi*, which had been fed from microfilaremic cats 12 days previously. Mass colonization of *Ae. togoi* and mosquito rearing followed the techniques as described by Choochote (1981). This mosquito strain was proved to be highly susceptible to NSP *B. malayi* (Choochote *et al.*, 1987). The whole bodies of 12-day post-infection mosquitoes were dissected by using the aseptic technique (Suwan *et al.*, 1993). Mass dissection was carried out in Hank's Balance Salt Solution (HBSS) with antimicrobial agents (10,000 units/ml of penicillin G solution, 10,000 µg/ml of streptomycin disulfate, and 25 µg/ml of amphotericin B) in a sterile petri dish (diameter 30 mm).

Preparation of Culture Media and Filaricidal Drugs

The method for *in vitro* cultivation used in this study mainly followed the methods described previously by Riberu *et al* (1990) and Yates *et al* (1994). The modification and/or simplification was also performed (Tippawangkosol *et al.*, 2002). The culture media used to support growth and development of the larvae consisted of a 1:1 (v/v) mixture of NCTC-135 (Sigma) and Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Sigma) supplemented with 20% heat inactivated fetal bovine serum (NI-FBS), a mixture of antimicrobial agents (10,000 units/ml of penicillin G solution, 10,000 µg/ml of streptomycin disulfate, and 25 µg/ml of amphotericin B) and 25 mM of HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid]; Sigma).

Preparation of Filaricidal Drugs

Diethylcarbamazine [N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid] citrate salt (DEC; Sigma) was dissolved in distilled water, which was diluted with culture media at various concentrations (10^{-3} M to 10^{-11} M). Ivermectin B_{1a} [N,N-Diethyl-4-methyl-1-piperazinecarboxamide] (IVM; Sigma) and albendazole [Methyl-5-(propylthiol)-2-benzimidazolecarbamate] (ALB; Sigma) were dissolved in absolute methanol, which was diluted with culture media at appropriate concentrations (10^{-3} M to 10^{-11} M).

***In Vitro* Sensitivity Test**

Larvicidal activity against L3 of NSP *B. malayi* was determined according to the method of Kiuchi *et al.*, 1987. Fresh L3 was washed by repeatedly transferring to fresh media with a mixture of antibiotic agents in culture dishes. Thirty L3 were pipetted into each well of a 24-well culture dish, which contained 0.9 ml of culture media (NI-FBS) and 0.1 ml of filaricidal drugs alone, e.g. ALB, IVM and DEC and their combinations (ALB/IVM and ALB/DEC) at various concentrations (10^{-3} M to 10^{-11} M). Each experiment was performed in four replicates. The culture dishes were incubated at 37°C in 5% CO₂ in air for 7 days. Motility of larva was examined daily under dissecting microscopy.

Evaluation of Result

The larvicidal activity of the test drugs was evaluated in terms of the relative mobility (RM) value (Kiuchi *et al.*, 1987). A smaller RM value indicated stronger larvicidal activity, and when all larvae died, this value was 0. A minimal lethal concentration (MLC) was determined as the lowest concentration, giving an RM of 0 after 24 hours incubation. The RM value was calculated by using the motility score. The motility of larva was recorded using an arbitrary score of 3 (highly active), 2 (moderately active), 1 (less active), and 0 (immobile for at least 10 sec). The results were expressed as the average motility score with respect to the exposure time of motile parasites in treated and untreated groups.

Data Analysis

Comparison between the data from the *in vitro* sensitivity test of the test drugs alone or their combination groups to a control group was evaluated by using the Man-Whitney U-test at a P value of <0.05.

RESULTS

Reduction of larval motility was used to evaluate the efficacy of diethylcarbamazine (DEC), ivermectin (IVM) and albendazole (ALB) when used alone and in combinations against L3 of NSP *Brugia malayi* (Narathiwat strain) in an *in vitro* cultivation with NI-FBS medium for 7 days.

Efficacy of DEC, IVM and ALB Alone

Figure 1 shows the motility of treated larvae reduced in a concentration- and time-dependent pattern after being cultured with IVM and DEC alone. None of the L3 was completely immobile after being cultured with these drugs throughout the experiments. In the control wells of all drugs, larvae showed highly active movement in the culture medium by day 7. Both DEC and IVM alone, at concentrations of 10^{-8} M and 10^{-10} M, had no effect against larval motility. IVM alone, at concentrations of 10^{-7} M, 10^{-6} M and 10^{-5} M, gradually and significantly reduced ($P < 0.05$) larval motility on day 3, and the larva had less active movement on day 6 at IVM concentrations of 10^{-6} M and 10^{-5} M (Figure 1a). DEC, at concentrations of 10^{-6} M, 10^{-5} M and 10^{-4} M, gradually and significantly reduced ($P < 0.05$) larval motility on day 2, and the larva had less active movement on day 5 at concentrations of 10^{-4} M and 10^{-5} M (Figure 1b). ALB alone, at various concentrations (10^{-4} M to 10^{-9} M), had no effect against L3 throughout the experiments and all of the larvae had highly active movement on all 7 days (Figure 1c).

Efficacy of the Combined Drugs (ALB/IVM) and (ALB/DEC) Compared with Each Drug Alone

ALB/IVM : Figure 2a shows the effect of ALB/IVM against L3 compared with ALB and IVM alone. ALB/IVM, at a concentration of $10^{-6}/10^{-6}$ M, significantly ($P < 0.05$) reduced larval motility on day 2 compared with either ALB 10^{-5} M or IVM 10^{-6} M, and also on day 3 compared with IVM 10^{-5} M. At a concentration of $10^{-5}/10^{-5}$ M, ALB/IVM significantly ($P < 0.05$) reduced larval motility on day 2 compared with ALB 10^{-5} M, IVM 10^{-6} M and IVM 10^{-5} M. IVM, at a concentration of 10^{-8} M had no effect against L3 compared with the control when used alone or in combination. Although ALB alone had no effect, it was more effective when combined with IVM.

ALB/DEC : Figure 2b shows the effect of ALB/DEC against L3 compared with ALB and DEC alone. DEC alone, and ALB/DEC, at a concentration of 10^{-8} M, had no effect on the reduction of larval motility when compared with the control. ALB/DEC significantly ($P < 0.05$) reduced larval motility on day 2 at a concentration of $10^{-6}/10^{-6}$ M when compared with ALB 10^{-5} M and DEC 10^{-6} M, and on day 3 when compared with DEC 10^{-5} M. On day 1, ALB/DEC, at a concentration of $10^{-5}/10^{-5}$ M, had more effect than ALB 10^{-5} M, DEC 10^{-6} M and DEC 10^{-5} M.

Comparison Between the Effect of ALB/IVM and ALB/DEC

Figure 2c shows the effect of drugs in combinations of ALB/DEC and ALB/IVM. ALB/DEC had significantly ($P < 0.05$) more effect than ALB/IVM at a concentration of $10^{-6}/10^{-6}$ M on day 3. Both drug combinations at concentrations of $10^{-8}/10^{-8}$ M and $10^{-5}/10^{-5}$ M had no significant difference between each other. None of the L3 was completely immobile throughout experiment.

Effect of Drugs Against Larvae Morphology

The morphometric measurements of untreated and treated larvae, with drugs alone and in combination, were assessed for effect (Table 1). The mean body length and width of the *B. malayi* larvae in the control group increased significantly ($P < 0.05$) more than in L3 that had been cultured in NI-FBS medium for 7 days (2019 and 32.2 vs 1518 and 23.4 μ m). The larva treated with both drugs alone and in combination, at a concentration of 10^{-6} M, had a mean body length shorter than that in the larva of the control group after being cultured for 7 days. The mean body width of treated larva was not significantly different compared with that in the larva of the control group after being cultured for 7 days.

DISCUSSION

Besides the drug combination of ALB/DEC and ALB/IVM, the lymphatic filariasis control programme was recommended (Ottensen, 1997; WHO, 1994). The *in vitro* sensitivity in this study was performed in order to assess the efficacy of ALB, DEC and IVM when using either drugs alone or in combination against NSP *B. malayi* (Narathiwat strain), which is endemic in southern Thailand. The infective third stage larva (L3) of this parasite dissected from 12 days post-infection *Ae togoi* was used to test the efficacy of all drugs prior to observing the direct effect against this larva, which was a method never tried out before in an *in vitro* cultivation. A simple technique modified by previous study (Tippawangkosol, 2002) for the *in vitro* cultivation of (NSP) *B. malayi* (Narathiwat strain) was easy to perform, and it led to the assessment of drug sensitivity of the parasite in this study. In general, many studies have assessed the efficacy of filaricidal drugs *in vivo*, e.g. human and animal models to observe microfilaricidal or adulticidal activity (Bockarie *et al.*, 1998; Dunyo *et al.*, 2000; Nicholas *et al.*, 1997; Ottensen, 1997; Shenoy *et al.*, 1999; 2000; 2002). The results have shown that trials with DEC or IVM used in combination with ALB are superior to those of either drug alone for reducing microfilaremia in humans. However, it is currently known that no short chemotherapeutic treatment will clear all of the adult parasites (Mc Reynolds *et al.*, 1993). Similarly, the effect of both ALB/IVM and ALB/DEC drug combinations in this study has been shown as superior to that of either IVM or DEC alone by rapidly reducing larval motility. IVM and DEC alone but not ALB, also have this effect against the larva. Contrary to our study, the results of a recent study showed that pharmacokinetics of the co-administration of DEC and ALB demonstrated that there was no adverse pharmacokinetic and pharmacodynamic effects, whether each drug was given alone or in combination (Shenoy *et al.*, 2002). Few studies reported the direct effect of filaricidal drugs against the larval stage of human lymphatic filariasis in an *in vitro* cultivation because of the lack of a reservoir, or laboratory-animal host that is expensive and difficult to maintain, particularly in a small space. However, the results from an *in vivo* study showed that both DEC and IVM, when used alone or in combination were effective

against microfilaria stage larvae, and ALB had some effect against adult stage larvae (Jayakody *et al.*, 1993; Ismail *et al.*, 1998; WHO, 1996). In recent years, the *in vitro* antifilarial activity of extracts from the medical plant, *Cardiospermum halicacabum*, against *B. pahangi* was performed in a culture medium for 7 days (Khunkitti *et al.*, 2000). The result demonstrated that a higher concentration of ethanol extract (2 mg/ml) inhibited both the motility of adult worms and release of microfilaria from females, and rapidly reduced the motility of microfilaria on day 2 with an ethanol extract of 500 µg/ml. Shenoy *et al* (1999, 2000) reported that ALB/DEC seemed to have more effect than ALB/IVM in brugian microfilaria. This result was the same as the one in this study, which showed that ALB/DEC had more effect in reducing larval motility than ALB/IVM at a concentration of 10^{-6} M/ 10^{-6} M on day 3. The maximum concentration of DEC, believed to be required for antifilarial activity, was 800-1,000 ng/ml (Stephenson and Wiselka, 2000). The mean maximum concentrations of DEC given alone and in combination were 1,930 and 1,813 ng/ml in amicrofilaremic subjects living in endemic area (Shenoy *et al.*, 2002). The concentration of DEC used *in vitro* in this study was 391 pg/ml to 391 µg/ml. DEC, at concentrations of 391 ng/ml to 391 µg/ml, gradually reduced larval motility using both drugs alone and in combination with ALB. Since the drug had direct action against the parasite in the *in vitro* study, the amount of drug concentration might be less than that of *in vivo* study. Although the result in this study indicated that there was a pharmacodynamic adverse effect of ALB/DEC *in vitro*, there has been no pharmacokinetic adverse effect of this combination drug reported in recent *in vivo* studies (Shenoy *et al.*, 2002). ALB sulphoxide is a pharmacological active substance that has much antiparasite action (Dollery, 1991). ALB did not biotransform to ALB sulphoxide in the *in vitro* test, therefore, it had no effect against the larval stage in this study. ALB alone also had no effect in this study, but it was effective when combined with DEC or IVM. This result may be the synergistic adverse effect of ALB with either IVM or DEC because these drug combinations have more effect than each drug alone. The morphology of larvae was also performed to observe the effect of all the drugs. The result showed that larva treated with all drugs alone or in combination had a mean body

length shorter than that in untreated larva. The result indicated that ALB and DEC at a concentration of 10^{-4} M, and IVM at a concentration of 10^{-5} M, had an effect against *B. malayi* in both larval morphology and motility. However, the parasite cannot be killed at those concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS. The authors thank Professor Dr. Supot Wudhikarn, Dean of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for his interest in this research. The authors are also grateful to the Thailand Research Fund (Post-Doctoral Fellowship), for financial support, and the Faculty of Medicine Endowment Fund for Research Publication, for helping to defray the publication cost.

REFERENCES

- Addiss, D. (1998). Lymphatic filariasis. *Bulletin of the World Health Organization*, **76** (Suppl 2), 145-146.
- Addiss, D. G., Beach, M. J., Streit, T., Lutwic, S., Leconte, F. H., Lafontant, J. G., Hightowr, A. W. & Lammie, P. J. (1997). Randomised placebo-controlled comparision of ivermectin and albendazole alone and in combination for *Wuchereria bancrofti* microfilaremia in Haitian children. *Lancet*, **350**, 480-484.
- Bockarie, M. J., Alexander, N. D., Hyun, P., Dimber, Z., Bockarie, F., Ibam, E., Alpers, M. P. & Kazura, J. W. (1998). Randomised community-based trail of annual single-dose diethylcarbamazine with or without ivermectin against *Wuchereria bancrofti* infection in human beings and mosquitoes. *Lancet*, **351**, 162-168.
- Choochote, W. (1981). Determination of the susceptibility of laboratory bred *Aedes togoi* and *Anopheles mosquitoes* to *Brugia phangi*. MSc. Thesis, School of Tropical Medicine, University, Bangkok, Thailand, 130.
- Choochote, W., Chaithong, U., Soomboon, P., Pakdicharoen A., Tookyang, B., Likitvong, K., Siriprasert, V., Sukontason, K. & Thitasut, P. (1991). Small laboratory animal for nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat province, southern Thailand strain). *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, **14**, 51-58.
- Choochote, W., Keha, P., Sukhavat, K., Khamboonruang, C. & Sukontason, K. (1987). *Aedes* (Finlaya) *togoi* Theobald 1907, Chantaburi strain, a laboratory vector in studies of filariasis in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **18**, 259-260.
- Choochote, W., Sukhavat, K., Somboon, P., Khamboonruang, C., Maleewong, W. & Suwanpanit, P. (1986). The susceptibility of small laboratory animals to nocturnally subperiodic *Brugia malayi* in Thailand. *The Journal of Parasitology and Tropical Medicine Association of Thailand*, **9**, 35-37.
- Deverre, J. R., Loiseau, P., Couvreur, P., Letourmeux, Y., Gayral, P. & Benoit, J. P. (1989). *In vitro* evaluation of filaricidal activity of GABA and 1,3-dipalmitoyl-2-

- (4-aminobutyl)glycerol HCl: a diglyceride prodrug. *Journal of Pharmaceutical Pharmacol*, **41**, 191-193.
- Division of Filariasis. (1995). *Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health*, 46.
- Dollery, C. (1991). *Therapeutic Drugs*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Dreyer, G., Addiss, D., Santos, A., Figueredo-Silva, J. & Noroes, J. (1998). Direct assessment *in vivo* of the efficacy of combined single-dose ivermectin and diethylcarbamazine against adult *Wuchereria bancrofti*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 219-222.
- Dunyo, S. K., Nkrumah, F. K. & Simonsen, P. E. (2000). A randomized double-blind placebo-controlled field trial of ivermectin and albendazole alone and in combination for the treatment of lymphatic filariasis in Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**, 205-211.
- Figueredo-Silva, J., Jungmann, P., Noroes, J., Piessens, W. F., Coutinho, A., Brito, C., Rocha, A. & Dreyer, G. (1996). Histological evidence for adulticidal effect of low dose of diethylcarbamazine in bancroftian filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90**, 192-194.
- Gayral, P., Gueyouche, C., Bories, C., Loiseau, P., Demerseman, P., Lamotte, G. & Royer, R. (1989). Macrofilaricidal activity of metabolites of diethylcarbamazine. *Arzneimittel Forschung Drug Research*, **39**, 226-230.
- Guptavanij, P., Harinasuta, C., Surathin, K., Vutikes, S. & Deesin, T. (1977). Studies on the prevalence of malayan filariasis in southern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **8**, 42-52.
- Harinasuta, C., Charoenlarp, P., Sucharit, S., Deesin, T., Surathin, K. & Vutikes, S. (1970). Studies on Malayan filariasis in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **1**, 29-30.
- Horton, J., Witt, C., Ottensen, E. A., Lazdins, J. K., Addiss, D. G., Awadzi, K., Beach, M. J., Belzario, V. Y., Dunyo, S. K., Espinel, M., Gyapong, J. O., Hossain, M., Ismail M. M., Jayakody, R. Y., Lammie, P. J., Makunde, W., Richard-Lenoble, D.,

- Selve, B., Shenoy, R. K., Simonsen, P. E., Wamae, C. N. & Weerasooriya, M. V. (2000). An analysis of the safety of the single dose, two drug regimens used in programmes to eliminate lymphatic filariasis. *Parasitology* 121 (suppl), 147-60.
- Ismail, M. M., Jayakody, R. L., Weil, G. J., Fernando, D., De Silva, M. S., De Silva, G. A. & Balasooriya, W. K. (2001). Long-term efficacy of single-dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, 332-335.
- Ismail, M. M., Jayakody, R. L., Weil, G. J., Nirmalan, N., Jayasinghe, K. S., Abeyewickrema, W., Rezvi Sheriff, M. H., Rajaratnam, H. N., Amarasekera, N., de Dilva, D. C., Michalski, M. L. & Balasooriya, W. K. (1998). Efficacy of single dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 94-97.
- Jayakody, R. L., Desilva, C. S. S. & Weerasinghe, W. I. (1993). Treatment of bancroftian filariasis with albendazole: evaluation of efficacy and adverse reactions. *Tropical Biomedicine*, 10, 19-24.
- Khunkitti, W., Fujimaki Y. & Aoki Y. (2000). *In vitro* antifilarial activity of extracts of the medical plant *Cardiospermum halicacabum* against *Brugia pahangi*. *Journal of Helminthology*, 74, 241-246.
- Kiuchi, F., Miyashita, N., Tsuda, Y., Yoshimura, H. & Kondo R. (1987). Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans, identification of larvicidal principals in Betel nuts. *Chemical Pharmaceutical Bullitin*, 35, 2880-2886.
- Mc Reynolds, L. A., Poole, C., Hong, Y., William, S. A., Partono, F. & Bradley, J. (1993). Recent advances in the application of molecular biology in filariasis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 24, 55-63.
- Nicolas, L., Luquiaud, P., Lardeux, F. & Mereer, D. R. (1997). Reduction of *Wuchereria bancrofti* adult worm circulating antigen after annual treatments of

- diethylcarbamazine combined with ivermectin in French Polynesia. *Journal of Infectious Disease*, 175, 489-492.
- Noroës, J., Dreyer, G., Santos, M., Mendes, V. G., Medeiros, Z. & Addis, D. (1997). Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti* *in vivo*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91, 78-81.
- Ottensen, E. A., Duke, B. O. L., Karam, M. & Behbehani, K. (1997). Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariae. *Bulletin of the World Health Organization*, 75, 491-503.
- Ramaiah, K. D., Vanamail, P., Pani, S. P., Yuvaraj, J. & Das, P. K. (2002). The effect of six rounds of single dose treatment with diethylcarbamazine or ivermectin on *Wuchereria bancrofti* infection and its implications for lymphatic filariasis elimination. *Trop Med Int Health*, 7, 767-774.
- Riberu, W. A., Atmosoedjono, S., Purnomo, S., Tirtokusuma, S., Bangs, M. J. & Baird, J. K. (1990). Cultivation of sexually mature *Brugia malayi* *in vitro*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 43, 3-5.
- Shenoy, R. K., Dalia, S., John, A., Suma, T. K. & Kumaraswami, V. (1999). Treatment of the microfilaraemia of asymptomatic brugian filariasis with a single dose of ivermectin, diethylcarbamazine or albendazole, in various combinations. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93, 643-651.
- Shenoy, R. K., John, A., Babu, B. S., Suma, T. K. & Kumaraswami, V. (2000). Two years follow up of the microfilaremia of asymptomatic brugian filariasis after treatment with two annual single doses of ivermectin, diethylcarbamazine and albendazole in various combinations. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94, 607, 614.
- Shenoy, R. K., Suma, T. K., John, A., Arun, S. R., Kumaraswami, V., Fleckenstein, L. L. & Na-Bangchang, K. (2002). The pharmacokinetics, safety and tolerability of the co-administration of diethylcarbamazine and albendazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96, 603, 614.

- Stephenso, O. & Wiselka, M. (2000). Drug treatment of tropical parasitic infections: recent achievements and developments. *Drugs*, **60**, 985-995.
- Supali, T., Ismid, I. S., Ruckert, P. & Fischer, P. (2002). Treatment of *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti* infections in Indonesia using DEC or a combination of DEC and albendazole: adverse reactions and short-term effects on microfilariae. *Tropical Medicine International Health*, **7**, 894-901.
- Suwan, N., Rongsriyam, Y., Tippawangkosol, P. & Choochote, W. (1993). A suitable technique for *in vitro* development of *Dirofilaria immitis* from the second stage larvae to the infective larvae. *Mosquito Borne Diseases Bullitin*, **10**, 83-90.
- Tippawangkosol, P., Choochote, W., Riyong, D., Jitpakdi, A. & Pitasawat B. (2002). A simple technique for the *in vitro* cultivation of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* infective larvae. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **33** (suppl 3), 16-22.
- World Health Organization (1992). Lymphatic filariasis. The disease and its control. *World Health Organization*, Geneva, WHO Technical Report Series, 821.
- World Health Organization (1994). Strategies for control of lymphatic filariasis infection and disease: *Report of a WHO/CTD/TDR consultative meeting held at the University Sains, Penang, Malaysia, 22-24 August* Geneva: WHO (TDR/CTD/FIL/PENANG/94.1).
- World Health Organization (1996). *Report from the WHO Informal Consultation on Albendazole Research Findings in Lymphatic Filariasis*. Document WHO/FIL.194. Geneva: WHO.
- Yates, J. A., Schmitz, K. A., Nelson, F.K. & Rajan, T. V. (1994). Infectivity and normal development of *Brugia malayi* maintained *in vitro*. *Journal of Parasitology*, **80**, 891-894.

TABLE 1

Comparative morphometric measurements (mean $\pm$ SD/range, μ m) of untreated and drugs treated nocturnally subperiodic Brugia malayi larvae cultured from infective third stage larvae (L3) in NI-FBS medium for 7 days, number of larvae = 20

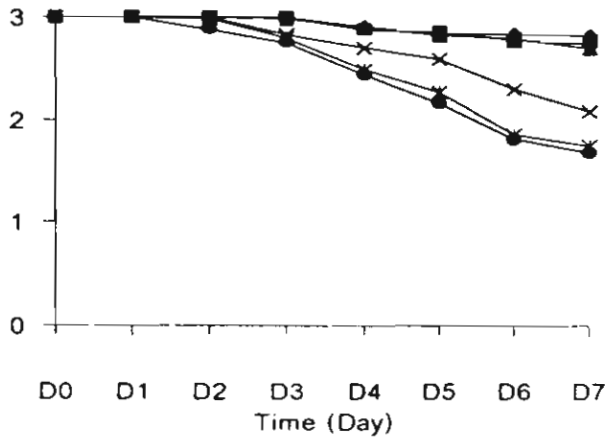
Day in cultured (drugs)	Body length (μ m)	Body width (μ m)
Day 0 (control)	<u>1518$\pm$116</u> (1320-1760)	<u>23.4$\pm$1.6</u> (21.6-27.0)
Day 7 (control)	<u>2019$\pm$105*</u> (1850-2250)	<u>32.2$\pm$6.9*</u> (22.0-50.0)
Day 7 (ALB, 10 ⁻⁶ M)	<u>1525$\pm$118'</u> (1320-1750)	<u>32.6$\pm$1.8*</u> (29.7-35.1)
Day 7 (IVM, 10 ⁻⁶ M)	<u>1537$\pm$160'</u> (1210-1760)	<u>32.0$\pm$2.7*</u> (27.0-37.8)
Day 7 (DEC, 10 ⁻⁶ M)	<u>1534$\pm$176'</u> (1100-1760)	<u>32.4$\pm$3.4*</u> (27.0-37.8)
Day 7 (ALB/DEC, 10 ⁻⁶ M/10 ⁻⁶ M)	<u>1539$\pm$148'</u> (1300-1760)	<u>32.4$\pm$2.0*</u> (29.7-35.1)
Day 7 (ALB/IVM, 10 ⁻⁶ M/10 ⁻⁶ M)	<u>1527$\pm$185'</u> (1210-1760)	<u>32.4$\pm$2.8*</u> (27.0-35.1)

* Significant difference from Day 0 in control group, $P < 0.05$

' Significant difference from Day 7 in control group, $P < 0.05$

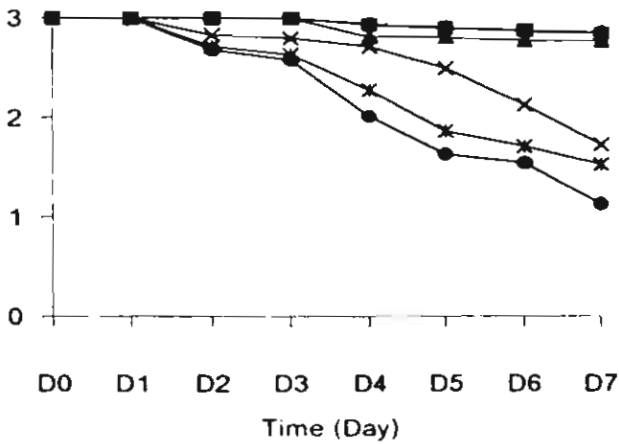
FIG. 1. Motility score of nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* infective third stage larvae (L3) after culture with drugs alone; ivermectin [IVM] (a); diethylcarbamazine [DEC] (b) and albendazole [ALB] (c) at various concentrations (M) in NI-FBS medium for 7 days.

Motility score



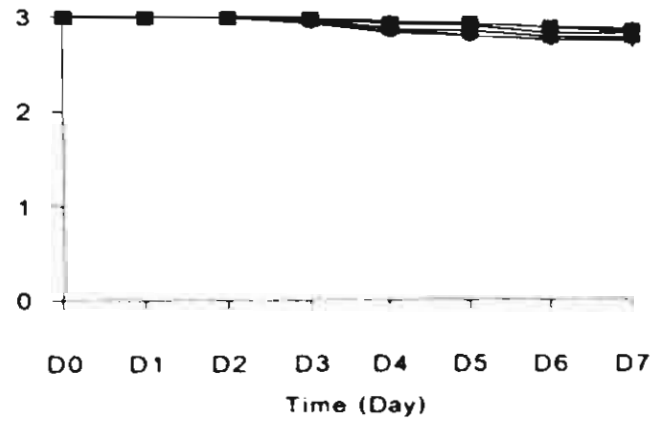
(a)

Motility score



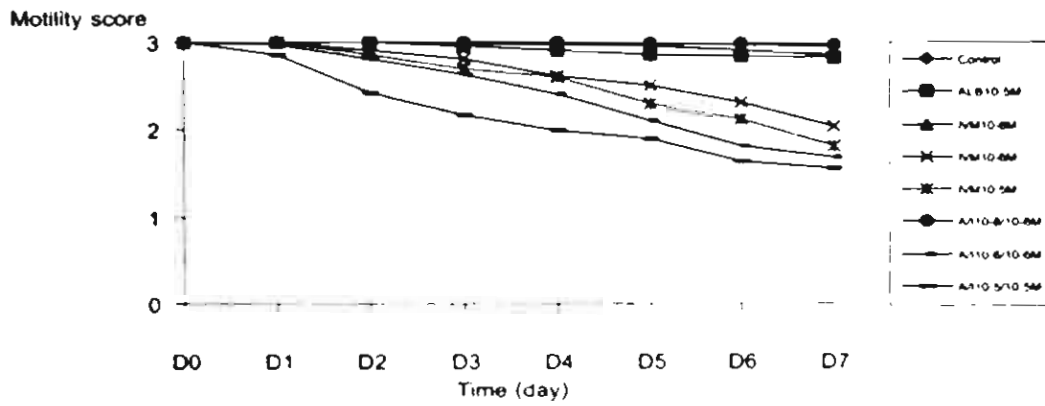
(b)

Motility score

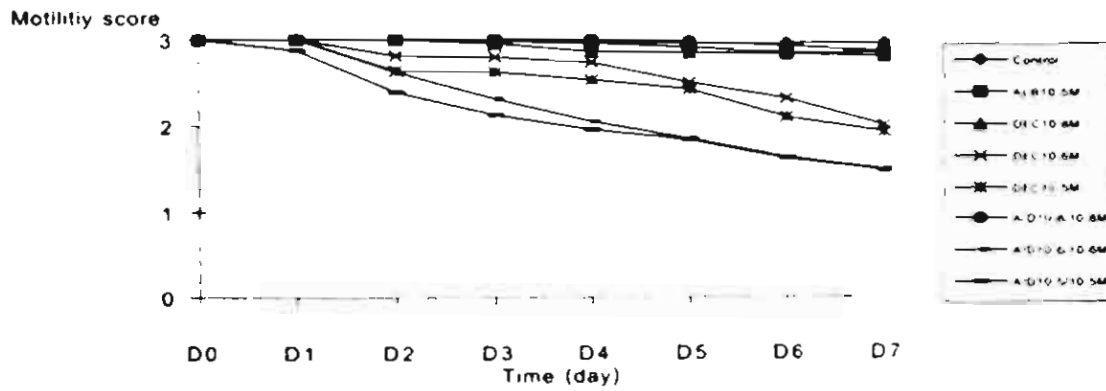


(c)

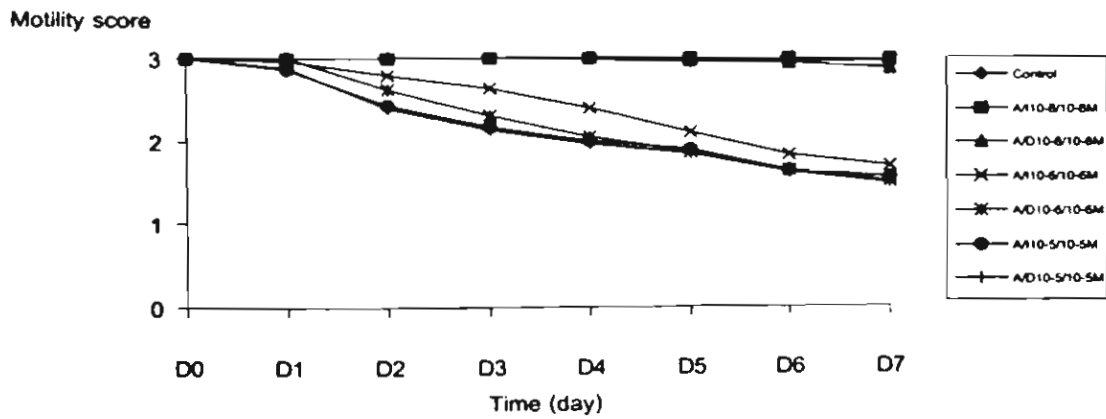
FIG. 2. Motility score of nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* infective third stage larvae (L3) after culture with drug in combinations compared with each drug alone; (a) albendazole/ivermectin (A/I), (b) albendazole/diethylcarbamazine (A/D) and (c) the comparison between both drug combinations at various concentrations (M) culture in NI-FBS medium for 7 days.



(a)



(b)



(c)



Department of Parasitology
Faculty of Medicine
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 THAILAND
Tel. 66-53-945342-5 Fax. 66-53-217144
<http://www.medicine.cmu.ac.th>

June 23, 2003

Dr. Marc J. Klowden, Editor
Division of Entomology
University of Idaho
Moscow, Idaho 83844-2339
U.S.A.

Dear Dr. Klowden:

Enclosed please find manuscripts submitted for consideration for publication in the Journal of Vector Ecology. This paper is entitled "*In vitro* effect of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine, and their combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain): scanning electron microscopy"

I hope you will find the paper interesting and suitable for publication. It has not been submitted or published elsewhere, and I agree that, if accepted, the copyright will be assigned to the Journal of Vector Ecology.

Sincerely yours,

Pongsri Tippawangkosol, Ph.D.

Email : plippawa@mail.med.cmu.ac.th

- Encl:
1. Three original copies of manuscript
 2. Three original copies of figure
 3. Floppy disk (File name =scanmanu); Microsoft Word 97

Tippawangkosol et al.: The *in vitro* effect of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine, and their combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain): scanning electron microscopy

Pongsri Tippawangkosol
Department of Parasitology
Faculty of Medicine
Chiang Mai University
Chiang Mai 50200
Thailand
Phone : 66-53-945342
Fax : 66-53-217144

Journal of Vector Ecology

Email : ptippawa@mail.med.cmu.ac.th

The *in vitro* effect of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine, and their combinations against infective third stage larvae of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Narathiwat strain) : scanning electron microscopy

Pongsri Tippawangkosol¹, Wej Choochote¹, Kesara Na-bangchang², Atchariya Jitpakdi¹,
Benjawan Pitasawat¹ and Doungnat Riyong¹

¹Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, THAILAND. ²Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthanee 12121, THAILAND. *Correspondence Author

ABSTRACT : A scanning electron microscopy (SEM) was performed to observe the effect of ivermectin (IVM), diethylcarbamazine (DEC) and albendazole (ALB) alone, and the drugs in combination (ALB+IVM and ALB+DEC) against infective third stage larvae (L3) of nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* (Narathiwat strain) *in vitro*. IVM, at a concentration of 10^{-4} M, killed L3 within 1-2 hours. An SEM study showed damage to the L3 surface and loss of regular cuticular annulations. The cuticles were grooved in the middle region of the body. In comparison with normal L3 before treatment with IVM, the cuticular surface showed transversed striations with periodic annulations. The result demonstrated that IVM showed a larvicidal activity against L3 of NSP *B. malayi* cultivated *in vitro*. Compared with those larvae in the control group, the treated larvae had no morphological change in the cuticular surface at the head, body and tail regions after cultivation with all drugs alone, and in their combinations, at a concentration of 10^{-5} M for 7 days. In this system, and at that concentration, only the larva cultured with ALB alone remained highly motile. Although no morphological change had been observed by SEM, those drugs used alone (IVM and DEC) and in combinations (ALB+IVM and ALB+DEC), reduced larval motility throughout the experiments at a concentration of 10^{-5} M. The minimum lethal concentration (MIC) of IVM against NSP *B. malayi* was 10^{-4} M.

Key words index: *Brugia malayi*, ivermectin, diethylcarbamazine, albendazole, scanning electron microscopy (SEM), nocturnally subperiodic

INTRODUCTION

Chemotherapy is one of the most strategic tools used for reducing microfilaremia in humans. Diethylcarbamazine (DEC) and ivermectin (IVM) are the only drugs available and widely accepted for the control of onchocerciasis and filariasis. Given as a single dose at 6 to 12 month intervals, they effectively suppress or reduce the microfilariae that cause clinical manifestations, i.e. ocular lesions in onchocerciasis, lymphoedema or elephantiasis in lymphatic filariasis (Karbwang et al. 1997, Michael et al. 1996, Whiworth et al. 1996). Albendazole (ALB) has been previously reported as having some macrofilaricidal against the filarial parasite and clear intestinal helminths (WHO 1996). Mass treatment with either an annual single dose of antifilarial drugs or through fortification of salt with DEC, is now recommended to interrupt transmission [ALB (400 mg, for all ages)+DEC (6 mg/kg body weight) and ALB+IVM (200 µg/kg body weight)] (Ottesen 1997). IVM, a derivative of avermectin B, is a macrocyclic lactone and fermentation product of *Streptomyces avermitilis*. The mechanism of action of IVM is unknown. However, it appears to prevent the release of intrauterine microfilaria. It has also been shown to mimic the actions of the neurotransmitter, gamma aminobutyric acid (GABA), which induces paralysis in infective larvae, but is inactive on microfilariae (Deverre et al. 1989). A high dose of IVM suppresses microfilaremia in lymphatic filariasis (Richards et al. 1991). DEC has been a drug of choice for filariasis for more than 40 years. The mechanism of action of DEC against adult filariae is not understood, but it may be involved in muscular paralysis. It has been shown as a microfilaricidal against *Onchocerca volvulus* (Sowa 1987).

Scanning electron microscopy (SEM) of adult, infective larvae and microfilaria of *Brugia malayi* has been examined in several studies (Chew et al. 1983, Franz and Ienze 1982, Zaman 1987, Zaman and Narayanan 1986, Lim et al. 1983, Choochote et al. 1987, Maleewong et al. 1987). In addition, the ultrastructure surface morphology of nocturnal subperiodic (NSP) *B. malayi* strain from Narathiwat province, southern Thailand has also been studied (Choochote et al. 1987). Besides, there has been evidence of efficacy when using drug combinations in the management of microfilaria, due to

lymphatic filariasis (Ottesen 1997, Karam and Ottensen 2000). The action of these drugs against infective larvae should be observed for effectiveness both *in vivo* and *in vitro*. Although the filaricidal drugs affect the parasite in the *in vivo*, the possible action site of these drugs against the infective larvae or third stage larva (L3) in the *in vitro* cultivation examined by SEM has not been studied yet. Thus, the present study was undertaken to examine the external morphology structures of the L3 of NSP *B. malayi* (Narathiwat strain) after exposure to filaricidal drugs, i.e. IVM, DEC and ALB alone, and the drug combinations in the *in vitro* cultivation by SEM.

MATERIALS AND METHODS

The infective third stage larvae (L3) of nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* were obtained from laboratory reared *Aedes togoi*, which had been fed on the blood from microfilaraemic cats 12 days previously. Mass colonization of *Ae. togoi* and rearing of mosquitoes followed the techniques described by Choochote (1981). The whole bodies of 12-day post-infection mosquitoes were dissected by using the aseptic technique (Suwan et al. 1993). Mass dissection was carried out in Hank Balance Salt Solution (HBSS) with antimicrobial agents (10,000 unit/ml of penicillin G, 10,000 μ g/ml of streptomycin disulfate, and 25 μ g/ml of amphotericin B) in a sterile petri dish (diameter 30 mm). The *in vitro* cultivation was followed by a simple technique modified by Tippawangkosol et al. 2002. The culture media consisted of a 1:1 (v/v) mixture of NCTC-135 (Sigma) and Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Sigma) supplemented with 20% heat inactivated fetal bovine serum (NI-FBS) and a mixture of antimicrobial agents. Fresh L3 were washed by repeatedly transferring to fresh media with a mixture of antibiotic agents in a culture petri dish. Then the L3 were pipetted into each well of a 24-well culture dish, which contained 0.9 ml of culture media (NI-FBS) and 0.1 ml of filaricidal drugs alone, e.g. ivermectin (IVM), albendazole (ALB) and diethylcarbamazine (DEC), and their combinations (ALB+IVM and ALB+DEC) at concentrations of 10^{-3} to 10^{-6} M. Each experiment was performed in four replicates. Plates were placed in a candle jar (a glass desicator equipped with stopcock and white candle). By this method, an atmosphere with low oxygen (90% N₂, 5% O₂, 5% CO₂) was produced. The candle jar was incubated at 37°C in an incubator for 7 days. Motility of the L3 was examined daily under dissecting microscopy for 7 days. The larvicidal activity of the test drugs was evaluated in terms of the relative mobility (RM) value (Kiuchi et al. 1987). A smaller RM value indicates stronger larvicidal activity, and when all larvae died, this value was 0. A minimal lethal concentration (MLC) was determined as the lowest concentration giving an RM of 0 after 24 hours of incubation. The RM value was calculated by using the motility score. The motility of larva was recorded using an arbitrary score of 3 (highly active), 2 (moderately active), 1 (less active), and 0

(immobile for at least 10 seconds). The results were expressed as the average motility score with respect to the exposure time of motile parasites in treated and untreated groups. For the scanning electron microscopy (SEM) study, the larvae were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 at 4°C, washed with PBS (10 minutes, 2 changes), and then post fixed (1 hour) in 1% osmium tetroxide at room temperature. Dehydration was performed via a passage through a long ethanol series, i.e. 30%, 50%, 70%, 80% (10 minutes), 95% (15 minutes, 2 changes) and followed by absolute ethanol (10 minutes, 2 changes). The specimens were finally dried by a critical point dryer, mounted on stubs, sputter coated with gold, and examined at 42 KV in a JEOL MED JSM 840-A SEM.

RESULTS AND DISCUSSION

The *in vitro* evaluation on the infective third stage larva (L3) of nocturnally subperiodic (NSP) *Brugia malayi* (Narathiwat strain) was performed for 7 days in order to observe the larval motility and viability when cultured with antifilarial drugs alone; albendazole (ALB), diethylcarbamazine (DEC) and ivermectin (IVM), and their combinations (ALB+DEC and ALB+IVM). In addition, a scanning electron microscopy (SEM) study also examined the surface morphological structures of this larva after treatment with these drugs alone and in their combinations. The surface morphological structure of the L3 treated with and without drugs is shown in Figure 1-16. The surface morphological structure of untreated larva after cultivation in this study was similar to that described previously by Maleewong et al. 1987 (Figure 1-6), although the L3 in the previous study was not performed in the *in vitro* cultivation. The L3 in the previous study was dissected from the same species of mosquito (*Aedes togoi*) and then examined directly for surface morphological structure by SEM. The result indicated that the L3 in this study could not molt to a further stage during 7 days cultivation *in vitro*. Our recent study reported that a simplification of the *in vitro* culture system promoted molting of the L3 to the fourth stage larva after 7 days cultivation (Tippawangkosol et al. 2002). SEM showed the head region of untreated larva after 7 days cultivation (Figure 1). The mouth was circular shaped. There were eight cephalic papillae arranged in two concentric circles. The four smaller inner papillae were nipple-like protuberance, and the four bigger outer papillae were spherical shaped. Apart from these oral papillae, the two amphids could not be seen clearly. The tail end showed the crescent shaped anus with a raised anterior border and three caudal papillae (Figure 2,3). The two ventrolateral caudal papillae were seen clearly and were rather similar in size, and they appeared spherical in shape, whereas the dorsoterminal papillae were round and rudimentary in appearance (Figure 4). There were numerous transversed annulations on the cuticular surface (Figure 5,6), except at the anterior and posterior ends. After treatment with IVM and DEC alone, at a concentration of 10^{-5} M, and combinations of ALB+DEC and ALB+IVM at a concentration of 10^{-5} M/ 10^{-5} M, the larva gradually reduced larval motility

throughout the experiment, compared with those in the control group (Figure 17). Except for ALB, at that concentration, the larva showed high active movement for 7 days (Figure 17). After treatment with drugs alone (ALB, DEC and IVM) and in their combinations (ALB+DEC and ALB+IVM), at a concentration of 10^{-5} M, SEM showed normal surface morphological structures of the whole body of this larva. (Figure 7-16). Observations on the surface topography of L3 of NSP *B. malayi* before and after treatment with the drugs in this study, indicated that the morphological structures of both larvae were generally in agreement with the descriptions of previous investigations on *B. malayi* larva (Maleewong et al. 1987, Saitongdee et al. 1989, Zaman and Narayanan 1986, Zaman 1987). However, IVM, at a high concentration (10^{-4} M), began to kill L3 within 1-2 hours, as observed under dissecting microscopy (Figure 17), and SEM study showed damage to the surface of L3 (Figure 11,12). They also lost regular cuticular annulations, and the cuticles were grooved in the middle region of the body. The minimal lethal concentration (MIC) of IVM against *B. malayi* (L3) *in vitro* cultivation was 10^{-4} M. The effect of this drug was unknown, but it could be diffused through the cuticular surface of the parasite. The loss of regular annulations in this parasite by some monoclonal antibodies was previously studied by SEM (Tan et al. 1989). The study of the *in vitro* IVM uptake by adult male *Onchocerca ochengi*, a cattle parasite closely related to *O. volvulus*, showed that the epicuticle had an irregular surface, which greatly increased the absorptive surface of the worm examined under SEM and transmission electron microscope (TEM) (Cross et al. 1998). Yates and Higashi (1986) reported the effect of a vaccination with 60cobalt radiation attenuation *B. malayi* (L3) in jird and TEM, which showed that a high number of eosinophil were present around and within the damaged larvae structure to the L3 cuticle. The study of Bandi et al. (1999) showed the effect of tetracycline in blocking embryo development in *B. pahangi* and *Dirofilaria immitis*, in which embryo degeneration was documented by TEM. Hamann et al. (1990) reported that the eosinophil granule proteins were toxic to microfilariae of *B. pahangi* and *B. malayi* in their *in vitro* study. A lot of ultrastructural studies on *B. malayi* have been examined to determine the effect of many agents against the parasite in order to

learn the mechanism of action and target region, with an aim to control and eradicate lymphatic filariasis.

The study of a possible action site of filaricidal drugs for killing larva can only be performed *in vitro*, where all direct responses, symptomatological and specific organ, can be observed. However, we could not see the direct responses to the drug *in vivo* because there were factors involved, i.e. pharmacokinetics of the drug and host factor. IVM, at a concentration of 10^{-5} M, only reduced larval motility, while this drug at a high concentration (10^{-4} M) killed this larva in the *in vitro* study. In this study, however, the effectiveness of IVM, DEC, ALB and their combinations in the *in vitro* study was correlated with other recent *in vivo* studies (Dunyo et al. 2000, Harton et al. 2000, Ismail et al. 2001, Shenoy et al. 2000, Supali et al. 2002). Although the morphological structure appearance could not be seen by SEM when using IVM and DEC alone, and in combinations with ALB at a concentration of 10^{-5} M, these drugs appeared to disturb the motility of the parasite. Further action of these drugs will be examined by TEM in order to observe the abnormality in the intra organells.

Acknowledgements

The authors thank Professor Dr. Supot Wudhikarn, Dean of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University for his interest in this research. The authors are also grateful to the Thailand Research Fund (Post-Doctoral Fellowship), for financial support, and the Faculty of Medicine Endowment Fund for helping to defray the publication cost.

REFERENCES CITED

- Bandi, C., J. W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco and L. Sacchi. 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts Wolbachia. *Int. J. Parasitol.* 29: 357-364.
- Chew, L. K., L. H. Kwong and M. Singh. 1983. Scanning electron microscopic study of *Brugia malayi* (Filarioidea: Onchocercidae). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 14: 113.
- Choochote, W. 1981. Determination of the susceptibility of laboratory bred *Aedes togoi* and *Anopheles* mosquitoes to *Brugia pahangi*. MSc. Thesis, School of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. 130 pp.
- Choochote, W., W. Maleewong, S. Sucharit, V. Pipitgool and C. Khamboonruang. 1987. Scanning electron microscopic study of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* (Filarioidea: Onchocercidae), Narathiwat, southern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 18: 14-23.
- Cross H. F., A. Renz and A. J. Trees. 1998. *In vitro* uptake of ivermectin by adult male *Onchocerca ochengi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92: 711-720.
- Deverre, J. R., P. Loiseau, Y. Letourneux, P. Gayral and J. P. Benit. 1989. *In vitro* evaluation of filaricidal activity of GABA and 1,3-dipalmitoyl-2-(4-aminobutyl) glycerol HCL: a diglyceride product. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 191-193.
- Dunyo, S. K., F. K. Nkrumah and P. E. Simonsen. 2000. A randomized double-blind placebo-controlled field trial of ivermectin and albendazole alone and in combination for the treatment of lymphatic filariasis in Ghana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 205-211.
- Franz, M. and W. Lenze. 1982. Scanning electron microscope study of adult *Brugia malayi*. *Tropenmedizin* 33: 17-22.
- Hamann, K. J., G. J. Gleich, J. L. Checkel, D. A. Loegering, J. W. McCall and R. L. Barker. 1990. *In vitro* killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J. Immunol* 144: 3166-3173.

- Horton, J., C. Witt, E. A. Ottensen, J. K. Lazdins, D. G. Addiss, K. Awadzi, M. J. Beach, V. Y. Belzario, S. K. Dunyo, M. Espinel, J. O. Gyapong, M. Hossain, M. M. Ismail R. Y. Jayakody, P. J. Lammie, W. Makunde, D. Richard-Lenoble, B. Selve, R. K. Shenoy, P. E. Simonsen, C. N. Wamae and M. Weerasooriya. 2000. An analysis of the safety of the single dose, two drug regimens used in programmes to eliminate lymphatic filariasis. *Parasitol.* 121 (suppl): 147-160.
- Ismail, M. M., R. L. Jayakody, G. J. Weil, D. Fernando, M. S. De Silva, G. A. De Silva and W. K. Balasooriya. 2001. Long-term efficacy of single-dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 332-335.
- Karam, K. and E. A. Ottensen. 2000. The control of lymphatic filariasis. *Med. Trop.* 60: 291-296.
- Karbwang, J., K. Na-Bangchang and W. H. Wernsdorfer. 1997. Emerging Drugs: The prospect for improved medicines. *Annual Executive Briefing.* 328-380.
- Kiuchi, F., N. Miyashita, Y. Tsuda, H. Yoshimura and R. Kondo. 1987. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans, identification of larvicidal principals in Betel butts. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 2880-2886.
- Lim, K. C., A. K. Loh and M. Singh. 1983. Scanning electron microscopic study of *Brugia malayi* (Filarioidea: Onchocercidae). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 14: 113-121.
- Maleewong, W., W. Choochote, K. Sukhavat, C. Khamboonruang and C. Arunyanart. 1987. Scanning electron microscopic study of third-stage larva of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi* in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 18: 261-264.
- Michael, E., D. W. Meyrowitsch and P. E. Simonsen. 1996. Cost and cost effectiveness of mass diethylcarbamazine chemotherapy for the control of bancroftian filariasis: comparison of four strategies in Tanzania. *Trop. Med. Int. Health.* 1: 414-426.

- Ottensen, E. A., B. O. L. Duke, M. Karam and K. Behbehani. 1997. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 75: 491-503.
- Rao, U. R., A. C. Vickery, B. H. Kwa and J. K. Nayar. 1992. *Brugia malayi*: ivermectin inhibits the exsheathment of microfilaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 183-188.
- Richards, F. O. Jr., M. L. Eberhard, R. T. Bryan, D. F. McNeeley, P. J. Lammie, M. B. McNeeley, Y. Bernard, A. W. Hightower and H. C. Spencer. 1991. Comparison of the high dose ivermectin and diethylcarbamazine for activity against bancroftian filariasis in Haiti. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 3-10.
- Saitondee P. 1989. Scanning electron microscopic study of third-stage larvae and adult of *Brugia malayi*, *Brugia pahangi* and third-stage larva of *Wuchereria bancrofti*. Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Bangkok, MSc thesis. 149pp.
- Shenoy, R. K., A. John, B. S. Babu, T. K. Suma and V. Kumaraswamai. 2000. Two years follow up of the microfilaremia of asymptomatic brugian filariasis after treatment with two annual single doses of ivermectin, diethylcarbamazine and albendazole in various combinations. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94: 607, 614.
- Sowa, J and S. C. Sowa. 1987. Long-term treatment of onchocerciasis in children with low doses of diethylcarbamazine. *J. Liq. Chrom.* 10: 3451-3462.
- Supali, T., I. S. Ismid, P. Ruckert and P. Fischer. 2002. Treatment of *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti* infections in Indonesia using DEC or a combination of DEC and albendazole: adverse reactions and short-term effects on microfilariae. *Trop. Med. Int. Hlth.* 7: 894-901.
- Suwan, N., Y. Rongsriyam, P. Tippawangkosol and W. Choochote. 1993. A suitable technique for *in vitro* development of *Dirofilaria immitis* from the second stage larvae to the infective larvae. *Mosq. Born. Dis. Bull.* 10: 83-90.
- Tan, M. A., J. W. Mak and H. S. Yong. 1989. *In vitro* activity of some monoclonal antibodies against *Brugia malayi* microfilariae and infective larvae. *Trop. Med. Parasitol.* 40: 317-321.

- Tippawangkosol, P., W. Choochote, D. Riyong, A. Jitpakdi and B. Pitasawat. 2002. A simple technique for the *in vitro* cultivation of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* infective larvae. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 33 (suppl 3): 16-22.
- Whitworth, J. A. G., M. D. Downham, G. Lahai and G. H. Maude. 1996. A community trial of ivermectin for onchocerciasis in Sierra Leone: compliance and parasitological profiles after three and half years of intervention. Trop. Med. Int. Health. 1: 52-58.
- World Health Organization. 1996. Report from the WHO informal Consultation on Albendazole Research Findings in Lymphatic Filariasis. Document WHO/FIL. 194 Geneva: WHO.
- Yate, J. A. and G. I. Higashi. 1986. Ultrastructural observations on the fate of *Brugia malayi* in jirds previously vaccinated with irradiated infective stage larvae. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 982-7.
- Zaman, V. 1987. Scanning electron microscopy of *Brugia malayi*. Ciba. Found. Symp. 127, 77-93.
- Zaman, V. and E. Narayanan. 1986. Differentiation of infective larvae of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* by scanning electron microscopy. Ann. Trop. Med. Parasitol. 80: 333-338.

Figure 1-6. Scanning electron microscope of NSP *Brugia malayi* infective third stage larvae after cultured in NI-FBS medium for 7 days. (1) Head region with circular mouth (M), four smaller inner papillae (IP), four spherical shaped outer papillae (OP). (2) Tail end showing anus (A) and ventrolateral papillae (VLP). (3) Crescent-shaped anus with a raised anterior border. (4) Three caudal papillae; two VLP and one dorsoterminal papilla (DTP). (5) Body cuticular surface around head region. (6) A higher magnification of body cuticular surface at the middle of the body showing the transversed annulations.

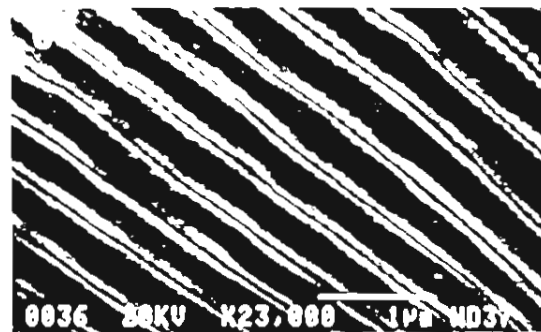
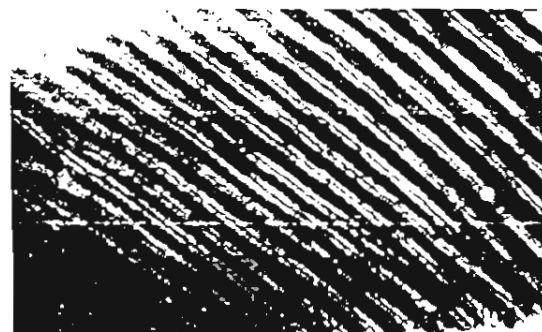
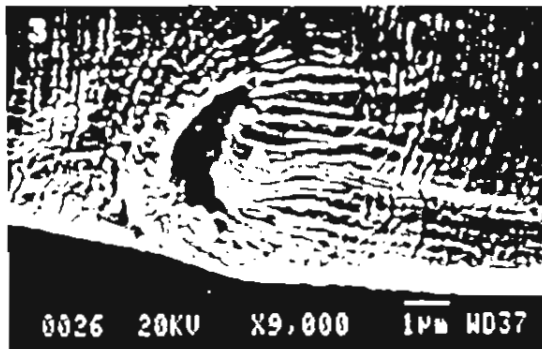
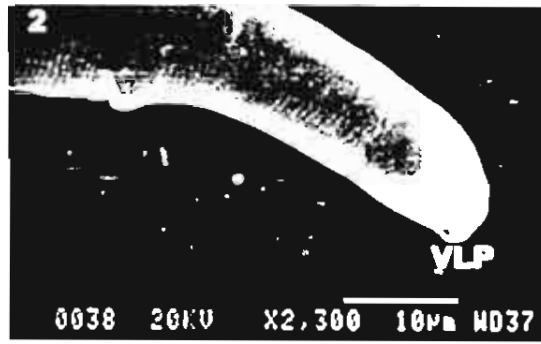
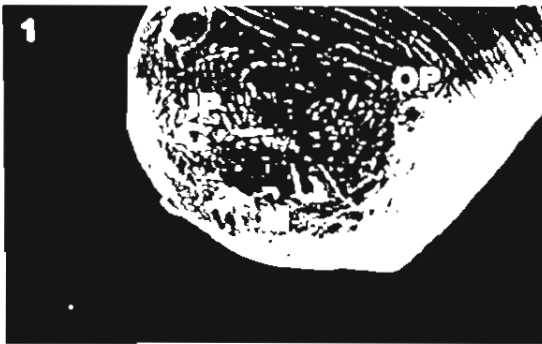


Figure 7-12. *In vitro* cultivation of NSP *Brugia malayi* infective third stage larvae for 7 days in NI-FBS medium with drugs alone. (7) Body cuticle around head region showing outer papilla (OP), inner papilla (IP) and mouth (M) after cultured with albendazole (ALB 10^{-5} M). (8) Tail end showing two ventrolateral papillae (VLP) and dorsoterminal papilla (DTP) after cultured with diethylcarbamazine (DEC 10^{-5} M). (9) Body cuticle around head region and (10) body cuticle at the middle of the body after cultured with ivermectin (IVM 10^{-5} M) showing transversed annulations. (11) Body cuticle at the middle of body and (12) a higher magnification showing many grooves of body cuticle and loss of regular cuticular annulations after cultured with IVM 10^{-4} M.

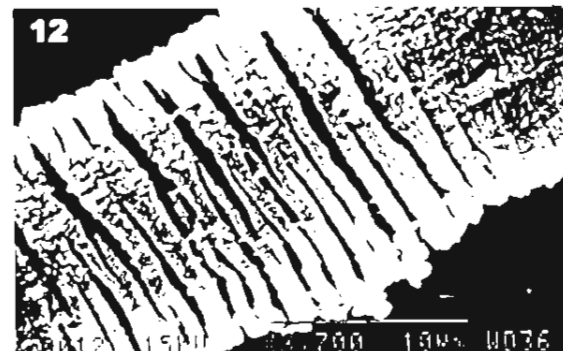
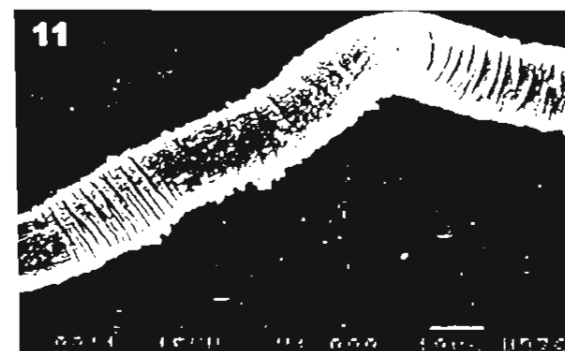
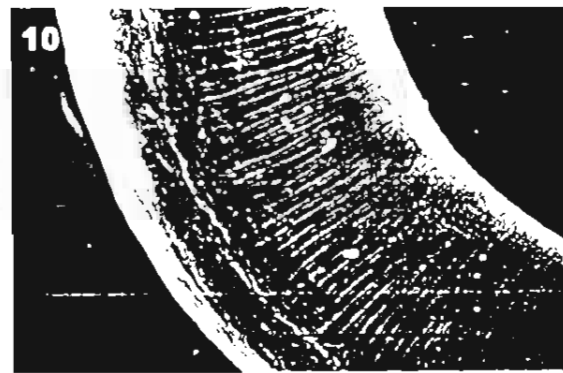
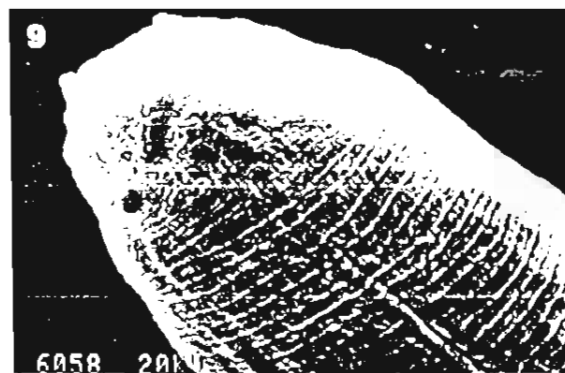
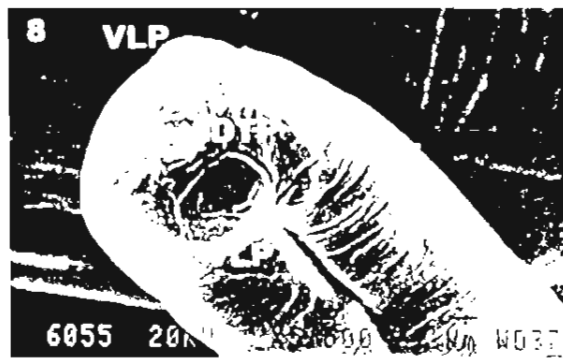
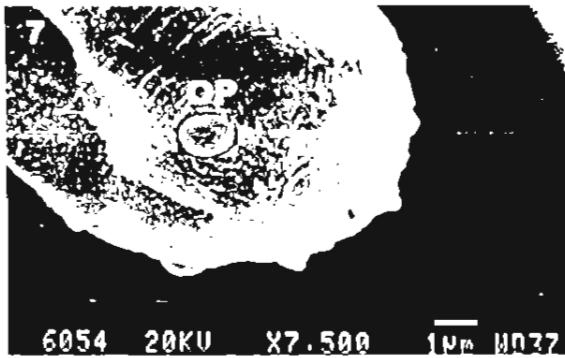


Figure 13-16. *In vitro* cultivation of NSP *Brugia malayi* infective third stage larvae for 7 days in NI-FBS medium with combination drugs. (13) Tail end showing two ventrolateral papillae (VLP) and dorsoterminal papilla (DTP) and (14) body cuticle in the middle of the body after cultured with albendazole/diethylcarbamazine (ALB/DEC $10^{-5}/10^{-5}$ M) showing transversed annulations. (15) Head region showing the normal structure of outer papilla (OP), inner papilla (IP) and mouth (M) and (16) body cuticle in the middle of the body showing transversed annulations of body cuticle after cultured with albendazole/ivermectin (ALB/IVM $10^{-5}/10^{-5}$ M).

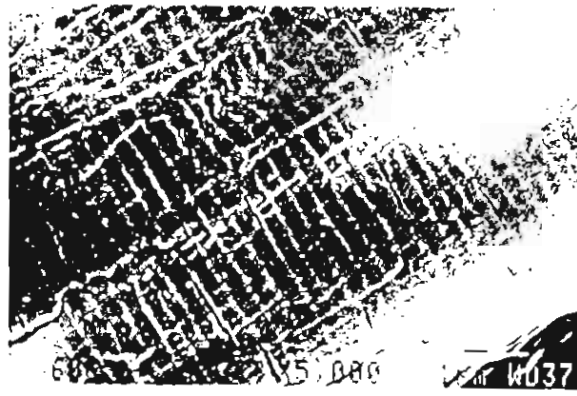
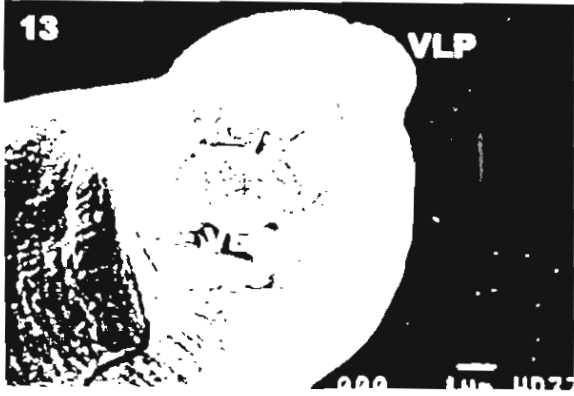


Figure 17. Comparative of motility score of NSP *Brugia malayi* infective third stage larvae after cultured with drug alone; albumin (ALB), ivermectin (IVM), diethylcarbamazine (DEC) and the drug in combinations (ALB/IVM and ALB/DEC) in NI-FBS medium for 7 days.

