



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. อัจฉริยา จิตต์ภักดี, 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) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังนอก (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) แสดงผิวหนังนอก (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) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H) และผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M)	34
12	ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP <i>Brugia malayi</i> หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (G) ภาพขยายใหญ่แสดงส่วนผิวหนังนอก (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* โดยเชื่อนี้ถูกนำเข้ามาโดยแรงงานชาวพม่าและอาจเป็นสาเหตุให้มีการแพร่ระบาดในประเทศไทย (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) ยานานี้มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดได้และพบว่ามีผลข้างเคียงน้อย 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) เอามาใช้ในการเตรียมแอนติบอดีสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้ 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) โดยชุบใส้ไม้ที่พันสำลีแล้วนำไปเสียบในขวดขนาดเล็กสำหรับให้ยุงดูดกินน้ำหวาน 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 แล้วนำไปเก็บในห้องเลี้ยงยุงที่ถูกควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมโดยให้งูกินน้ำหวานและน้ำตามปกติเพื่อรอทำการผ่าตัดยุงเพื่อหาตัวอ่อนระยะที่ 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 การเตรียมสารที่เหลือจากตัวอ่อนของพยาธิปลาเรียว (excretory-secretory product)

เก็บ excretory-secretory product ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มียาหลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของพยาธิปลาเรียวเป็นเวลา 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. ให้อินกิบเล็ดแมวที่มีพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* โดยวิธี artificial membrane feeding และการเก็บยุงหลังจากที่กินเลือดแล้ว

ยุงสามารถกินเลือดจากการเลียนแบบการกินเลือดจากคนโดยวิธี artificial membrane feeding ได้และได้ยุงที่กินเลือดแมวจนอิ่มจำนวนมาก

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).

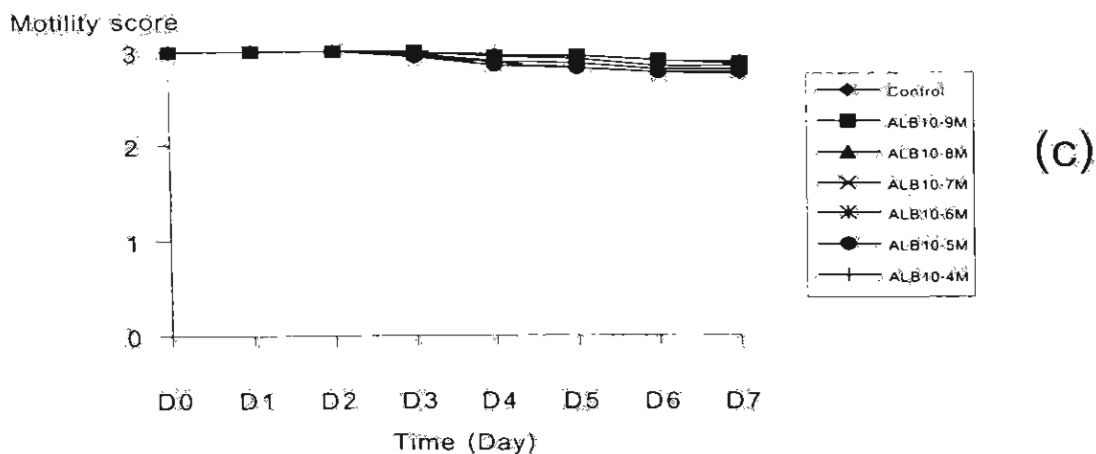
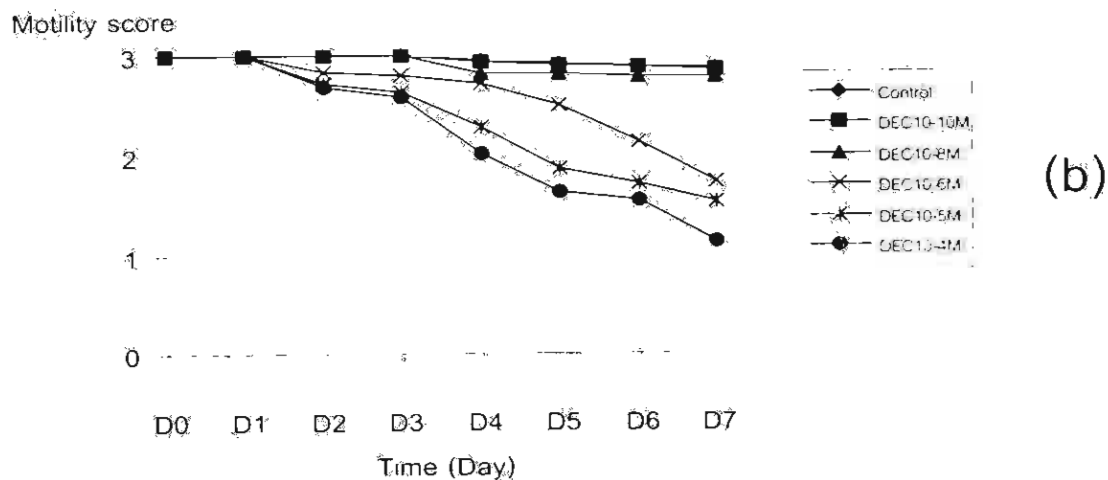
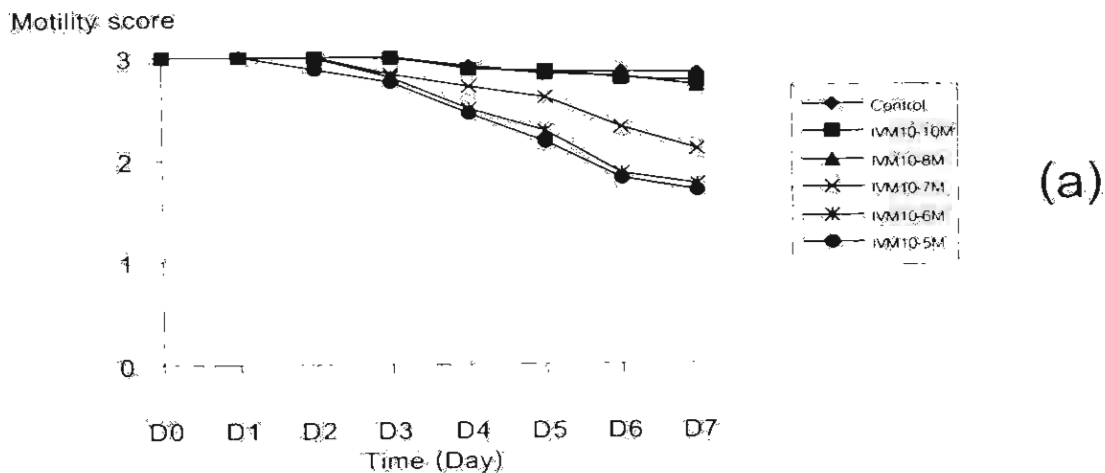
ตารางที่ 2 Motility score ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของยา diethylcarbamazine (DEC) ที่ความเข้มข้นของยาต่างๆ (M) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน

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

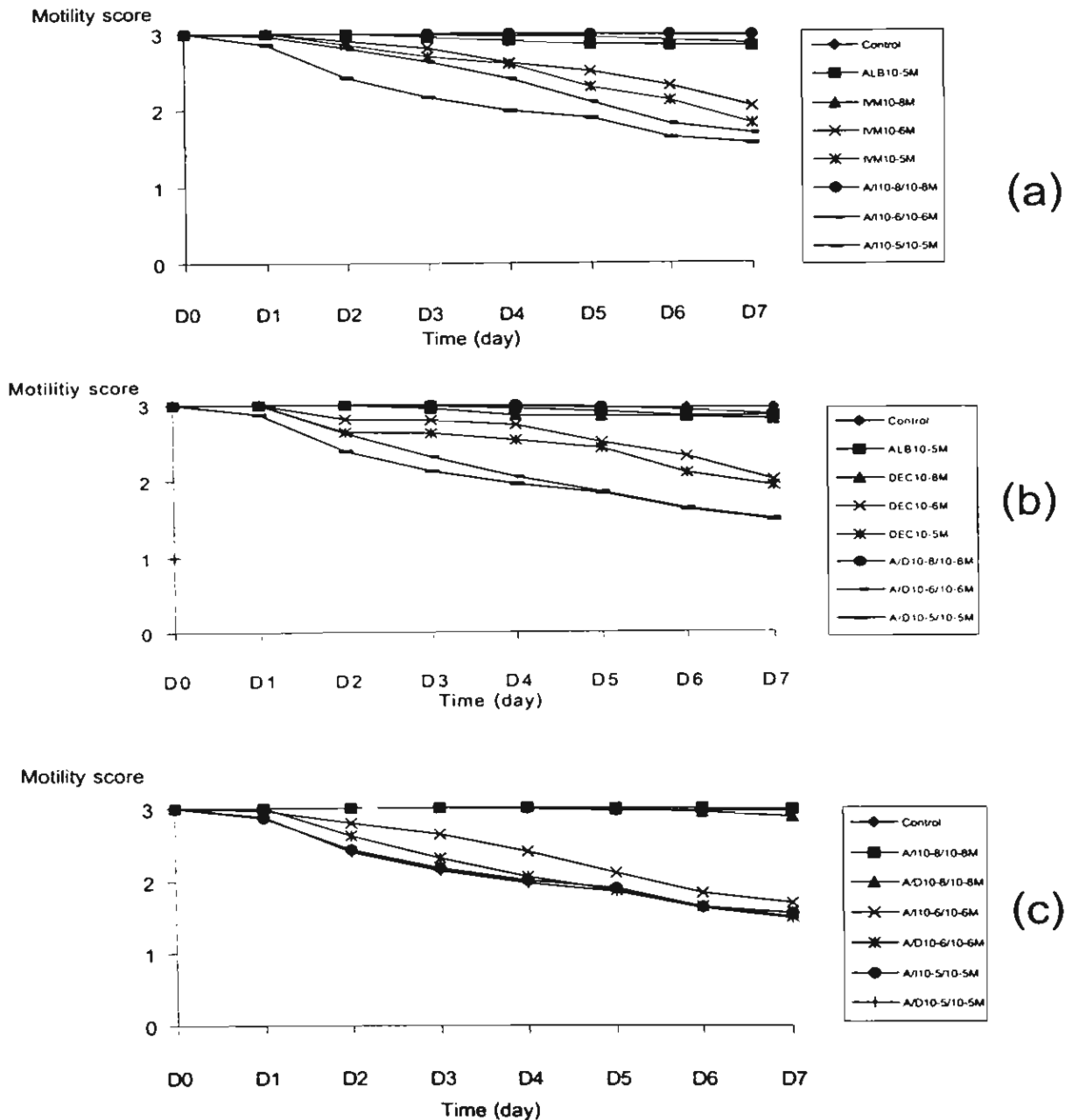
ความเข้มข้น (M)	Motility score (mean $\pm$ SD)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
กลุ่มควบคุม	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	2.98 $\pm$ 0.03	2.97 $\pm$ 0.05	2.95 $\pm$ 0.04
ALB 10 ⁻¹	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 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 ^{abcd}	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 ± 116 (1,320-1,760)], กลุ่มควบคุม Day 7 [2.019 ± 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 ± 116 (1,320-1,760)], กลุ่มควบคุม Day 7 [2.019 ± 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

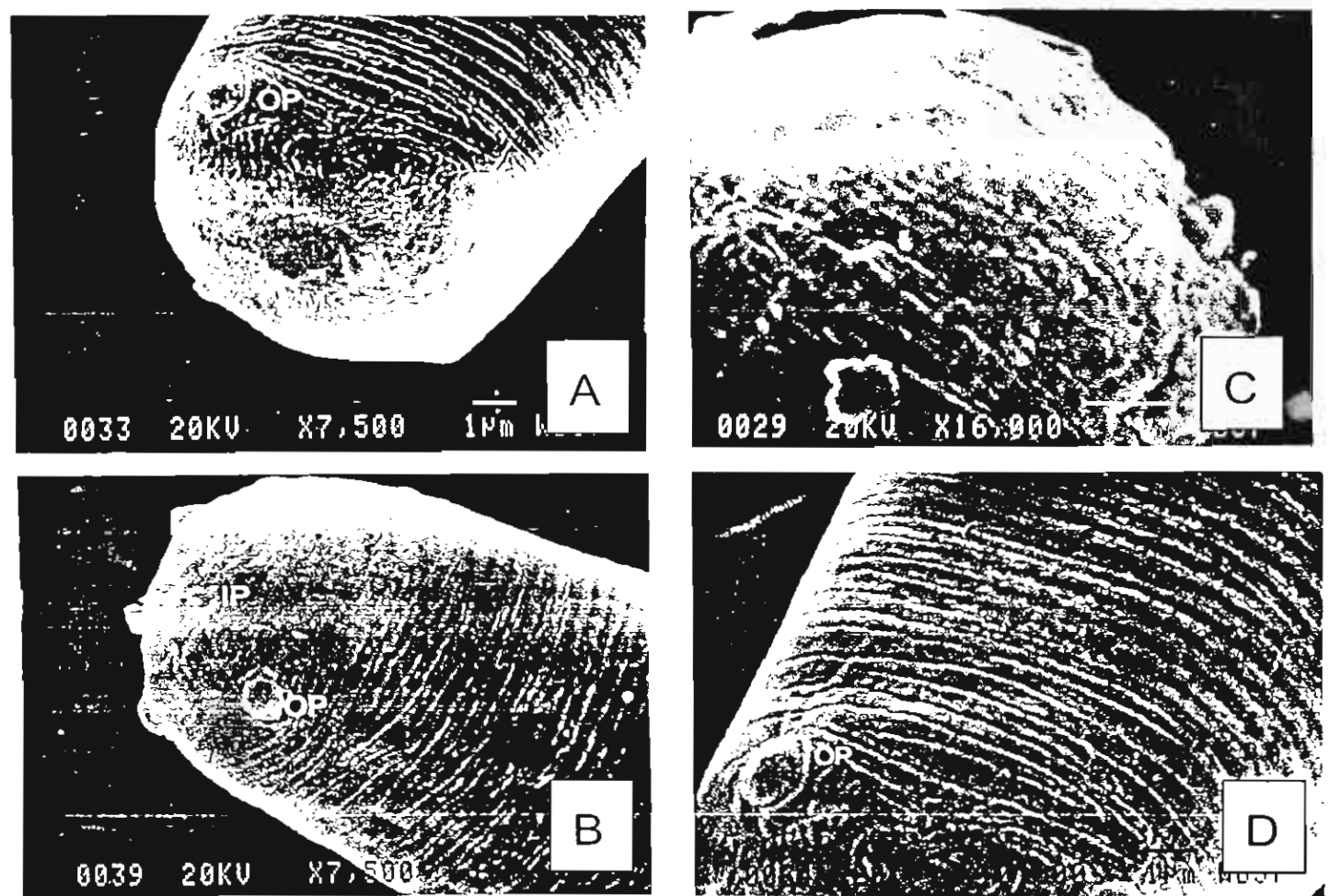
(hypodermis) และผิวหนังกล้ามเนื้อ (muscle) กล้ามเนื้อจะมีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อลายจำนวนมาก ภายในลำตัวมีช่องว่างภายใน (pseudocoelom) และมีเม็ดไขมัน (lipid droplet) กระจายอยู่ทั่วไป หลังจากนำตัวอ่อน L3 มาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน จากผลการทำ TEM พบว่าภาพตัดขวางของตัวอ่อนหลังการเพาะเลี้ยง (รูปที่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

7.2 ลักษณะภายในของตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียในกลุ่มที่ทดสอบกับยาเดี่ยวและยาผสม

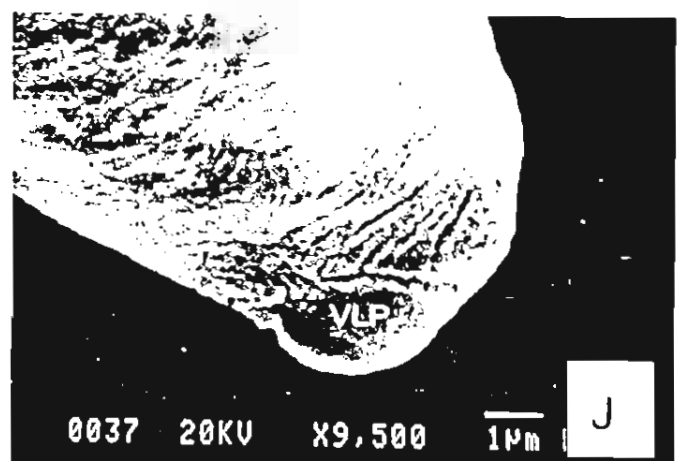
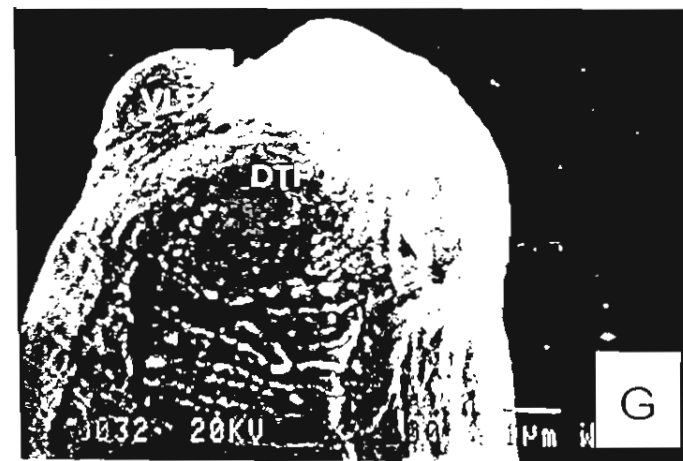
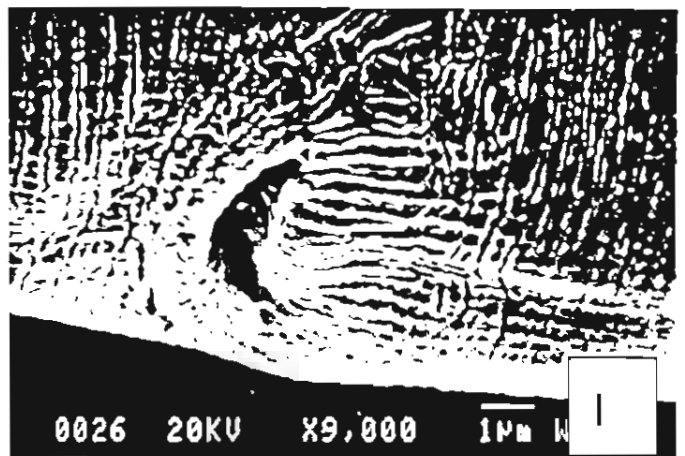
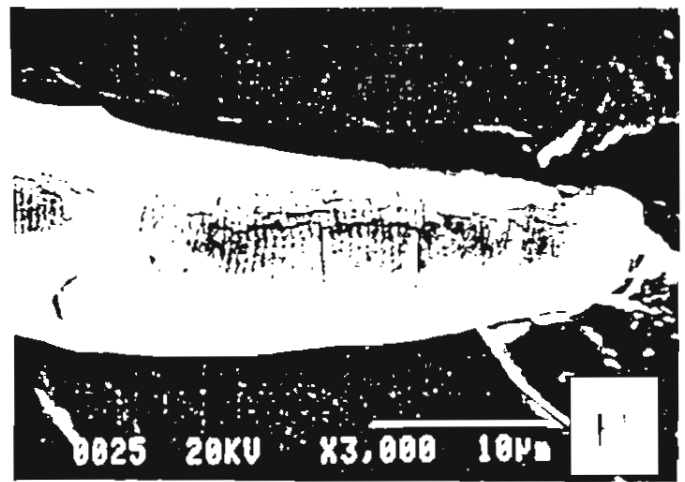
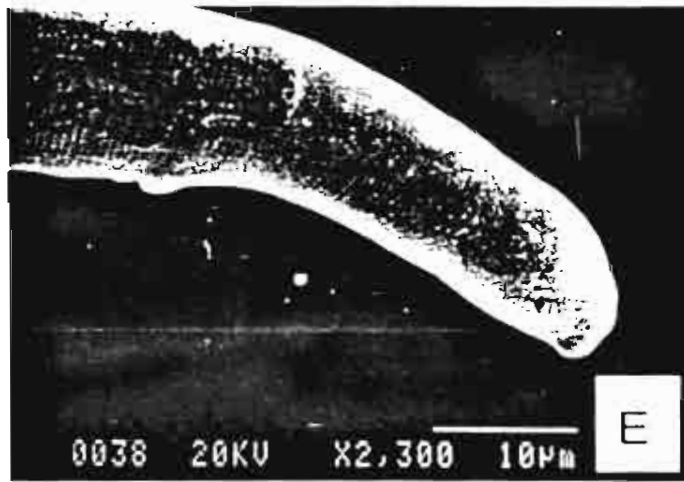
ผลจากการทดสอบกับยาเดี่ยว ALB, IVM, DEC ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M และยาผสม ALB+DEC และ ALB+IVM ที่ความเข้มข้น 10^{-5} M/ 10^{-5} M ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน จากการดูภาพตัดขวางของตัวอ่อนของพยาธิด้วยกล้อง TEM พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายในของตัวอ่อน (รูปที่ 10 ถึงรูปที่ 20) ลักษณะผิวหนังนอกที่สัมผัสกับยา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

8. ระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7, AChE)

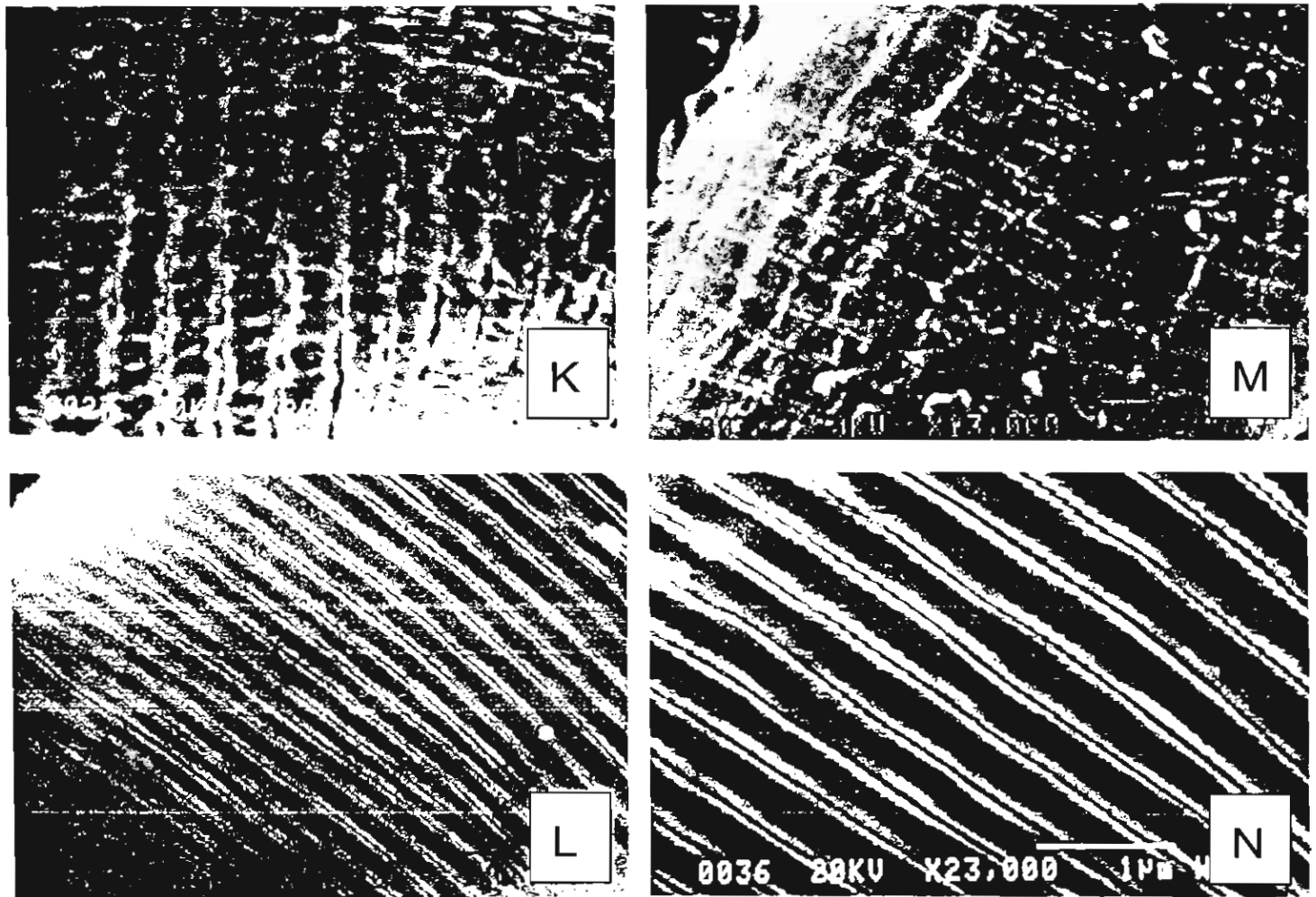
การตรวจวัดระดับเอนไซม์ AChE ของพยาธิตัวอ่อนที่ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เป็นวิธีการตรวจดูการมีชีวิตของพยาธิตัวอ่อน ถ้าตัวอ่อนพยาธิมีชีวิตอยู่ตัวอ่อนจะปล่อยเอนไซม์ออกมาขณะที่เคลื่อนไหว ถ้าหากยามีผลกระทบต่อการทำงานของตัวอ่อนหรือสามารถฆ่าตัวอ่อนได้ระดับของเอนไซม์ก็จะมีค่าลดลง ระดับของเอนไซม์จะเป็นตัวบ่งชี้การมีชีวิตอยู่ของพยาธิ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



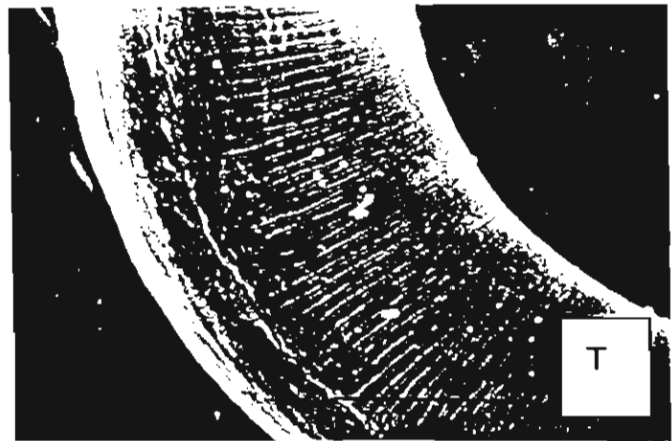
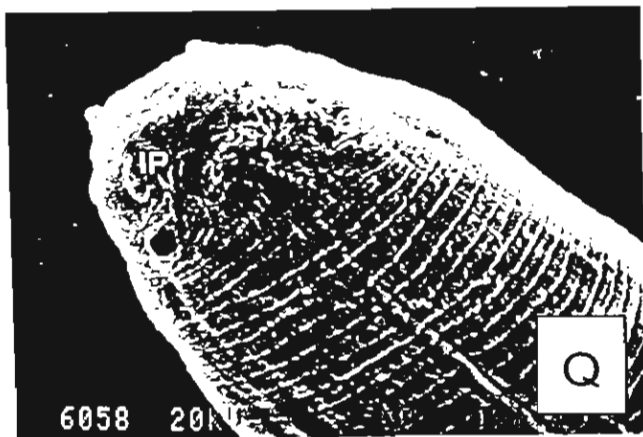
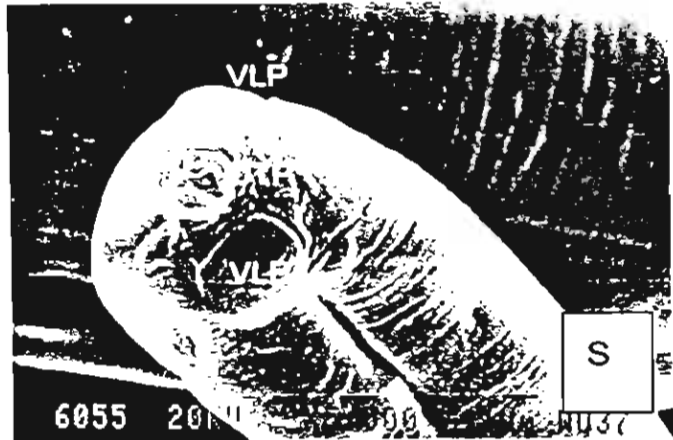
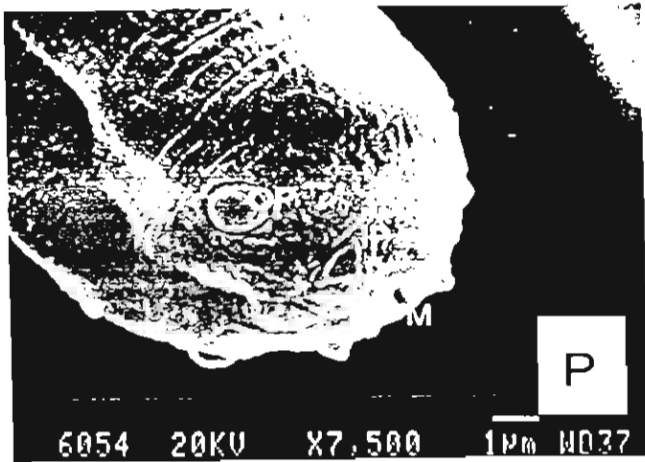
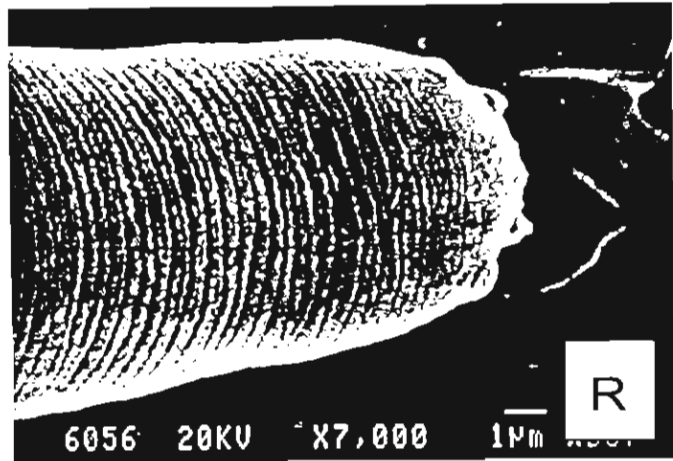
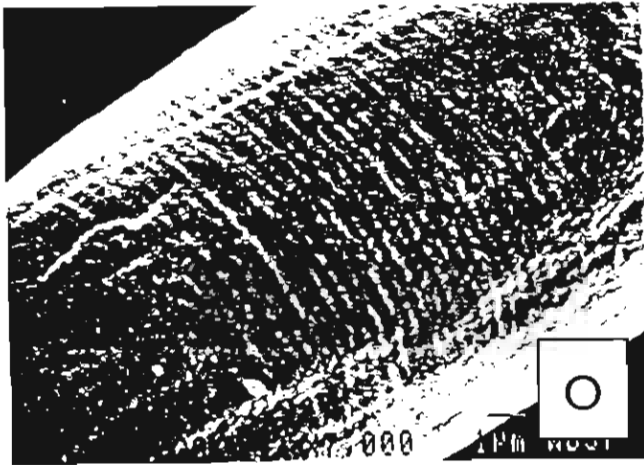
รูปที่ 3 บริเวณส่วนหัวของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน; [A] และ [B] ส่วนปาก (mouth, M), ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papillae, IP), ปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papillae, OP); [C] ภาพกำลังขยายใหญ่ของส่วนหัวบริเวณส่วนหัว;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



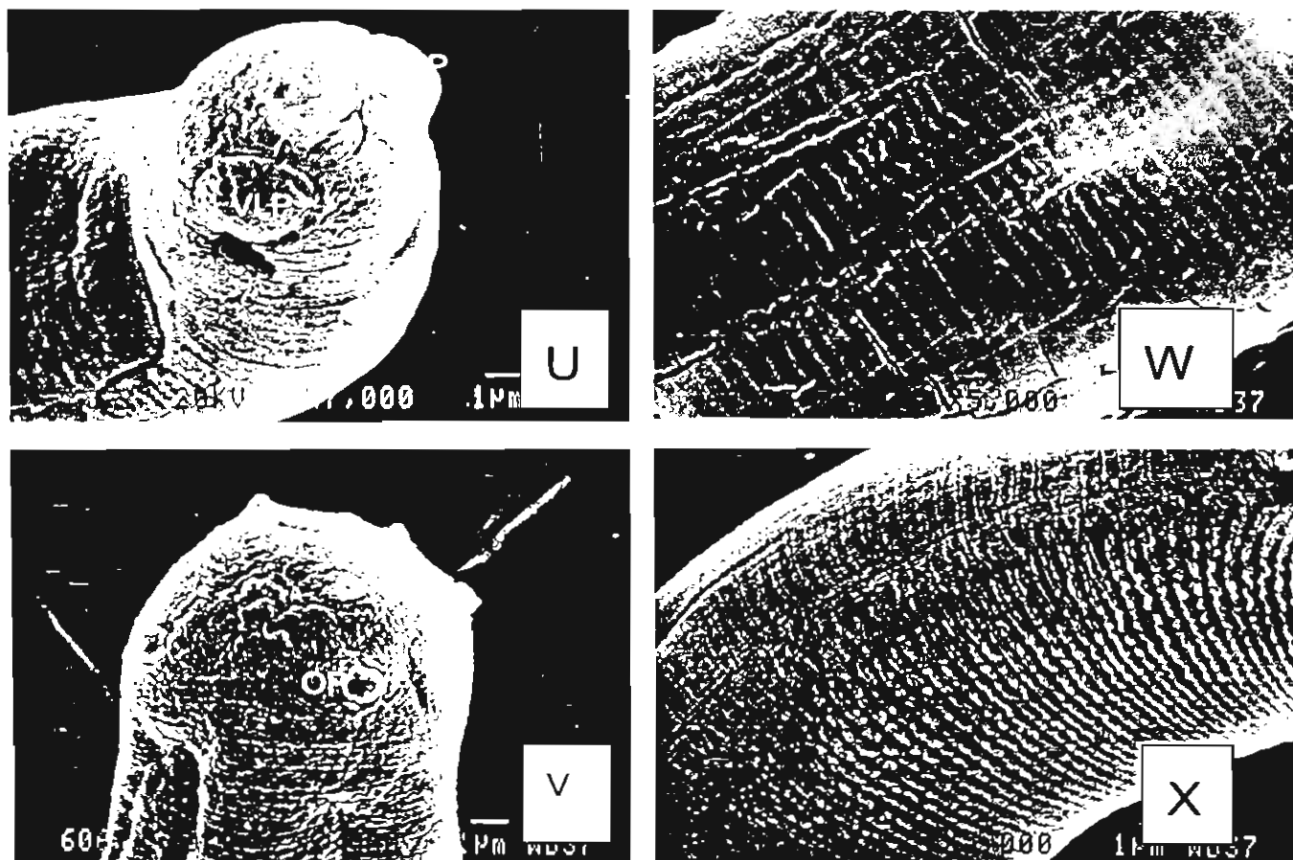
รูปที่ 4 บริเวณส่วนหางตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน; [E], [H] ปุ่มด้านข้าง (ventrolateral papillae, VLP) และทวารหนักมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (anus, A); [F], [I] ภาพกำลังขยายใหญ่ของทวารหนัก; [G],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



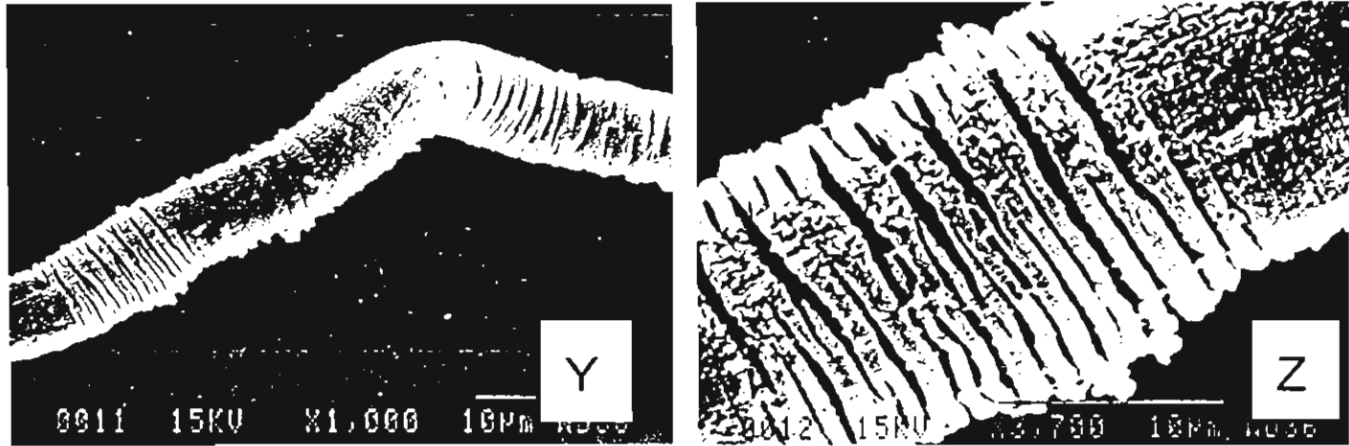
รูปที่ 5 บริเวณผิวหนังของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน แสดงลักษณะเส้นลายตามขวาง (transversed annulations); [K] ผิวบริเวณรอบๆ ทวารหนัก; [L] ผิวบริเวณส่วนหัว; [M] ผิวบริเวณส่วนกลางลำตัว; [N] ภาพกำลังขยายใหญ่ของผิวบริเวณกลางลำตัว



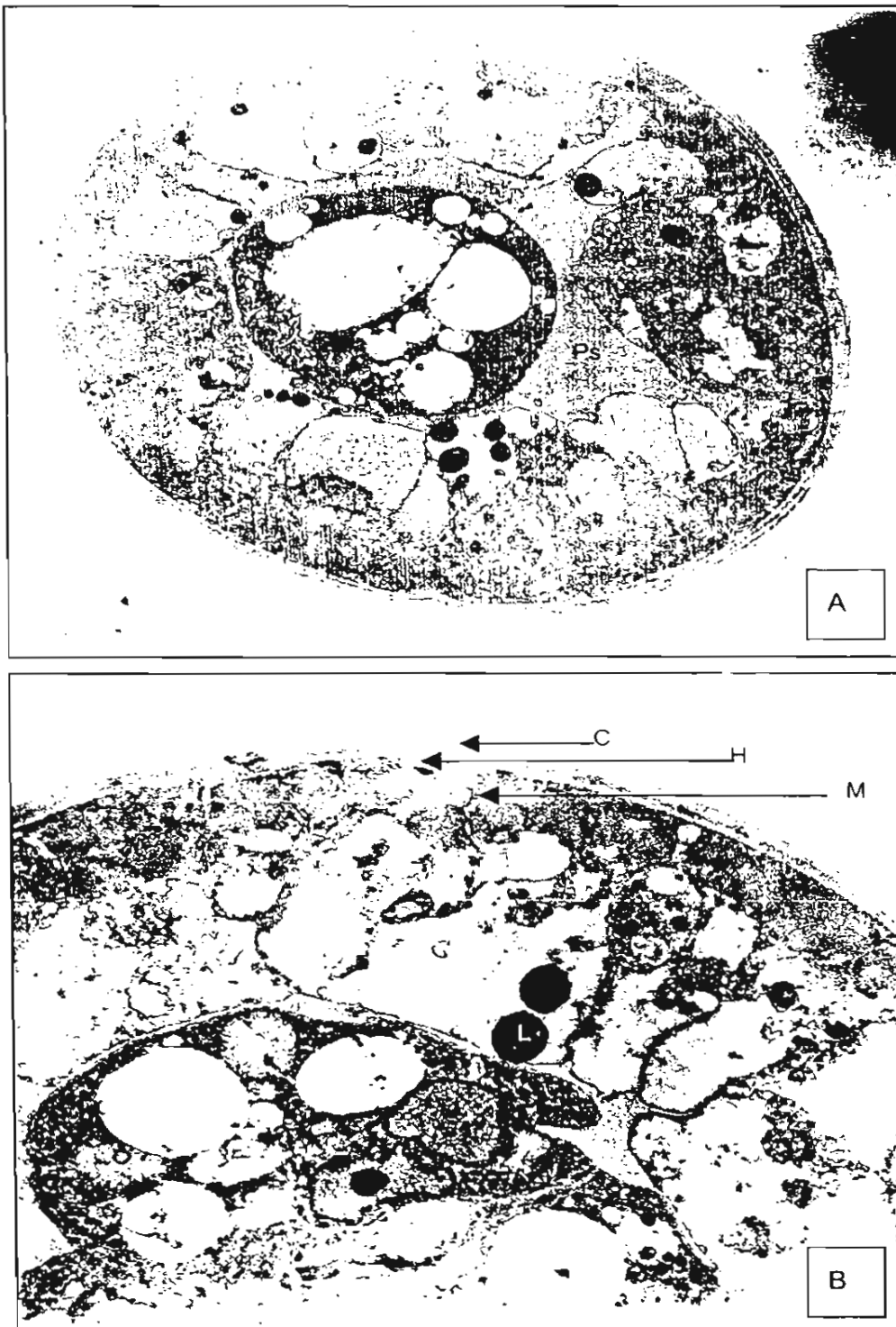
รูปที่ 6 ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการทดสอบกับยาเดี่ยวในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน [O], [R] และ [P] ผิวบริเวณส่วนหัวมีปุ่มรับสัมผัสด้านนอก (outer papilla, OP), ปุ่มรับสัมผัสด้านใน (inner papilla, IP) และปาก (mouth, M) ทดสอบกับยา ALB ความเข้มข้น 10^{-5} M; [S] ส่วนหางมีปุ่มด้านข้าง 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



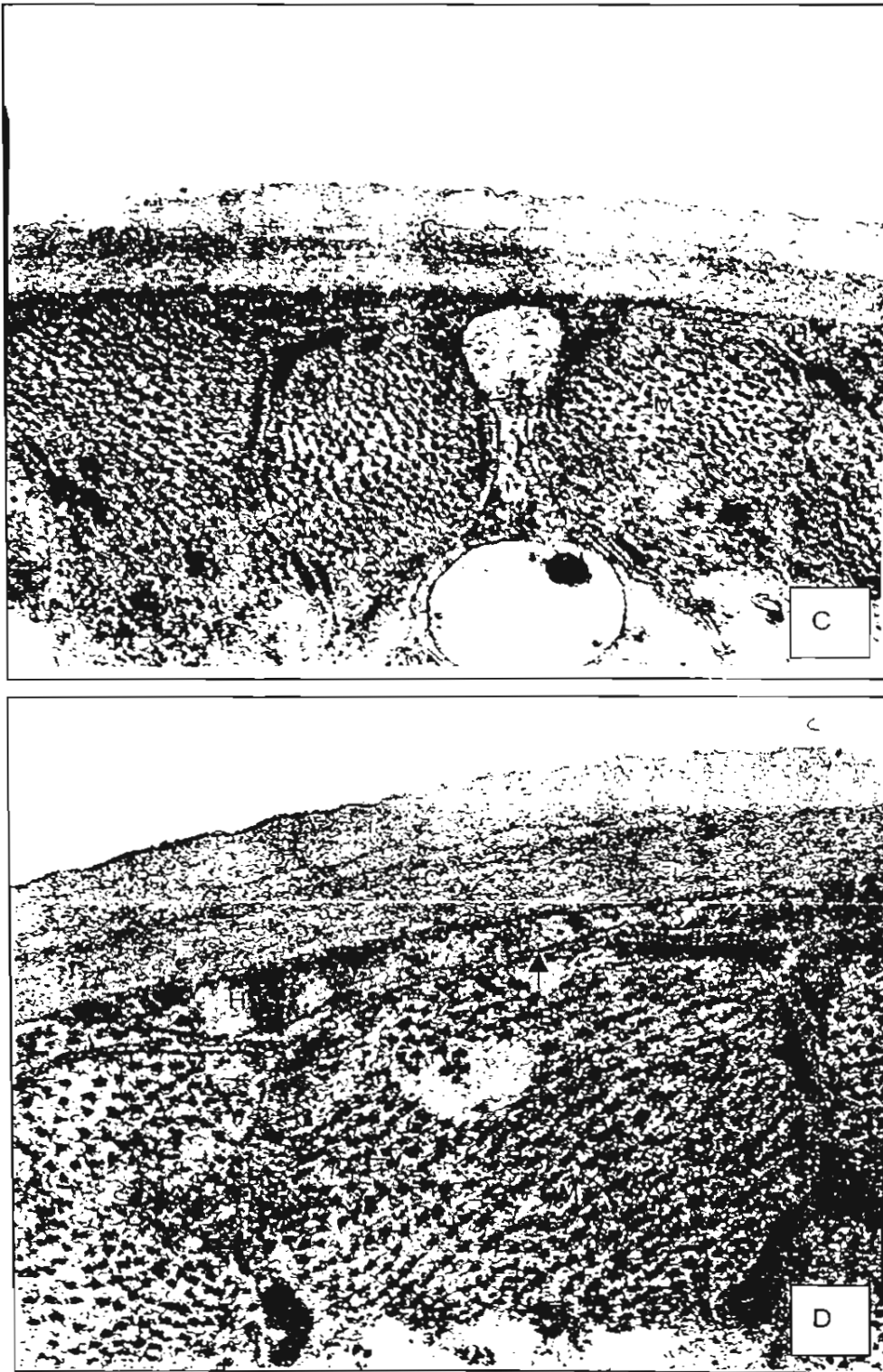
รูปที่ 7 การทดสอบประสิทธิภาพของยาผสม (ALB/IVM และ ALB/DEC) ต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS, [U] ส่วนหางมีปุ่มด้านข้าง 2 ปุ่ม (ventrolateral papillae, VLP) และปุ่มด้านหลัง 1 ปุ่ม (dorso-terminal papilla, DTP) และ [W] ผิวบริเวณกลางลำตัวเมื่อทดสอบกับยาผสม 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



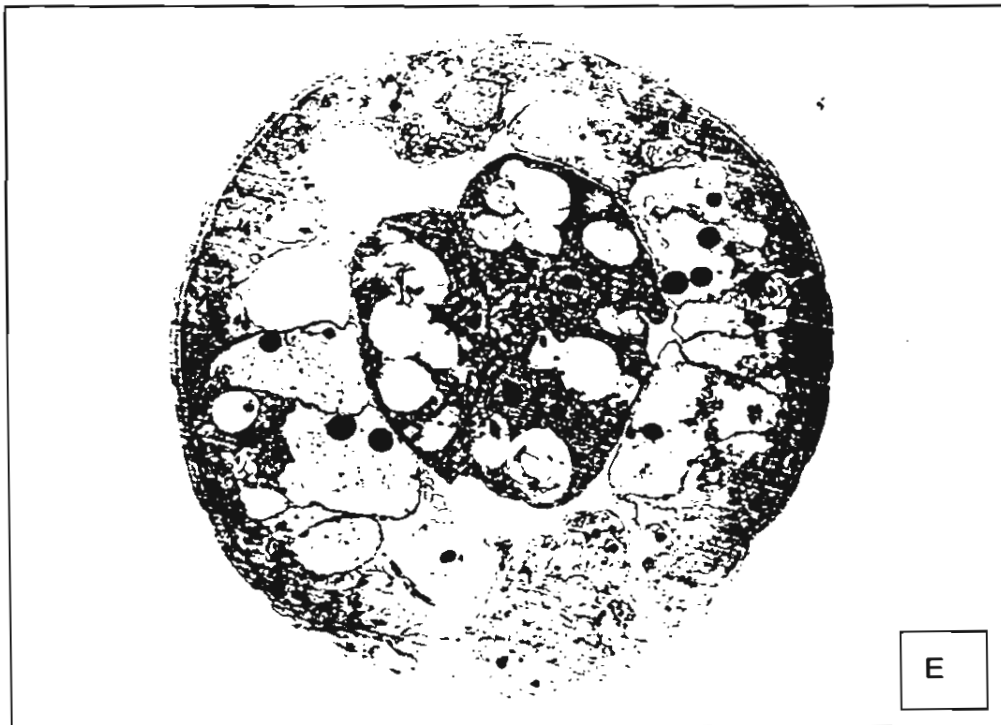
รูปที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของยาเดี่ยว ivermectin (IVM) ความเข้มข้น 10^{-4} M ต่อดัวอ่อน ระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิด NSP *Brugia malayi* ในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NI-FBS, [Y] ผีวบริเวณกลางลำตัว; [Z] ภาพขยายใหญ่บริเวณผิวกลางลำตัวแสดงส่วนผิวที่เป็นร่องและเส้นลายตามขวางหายไป



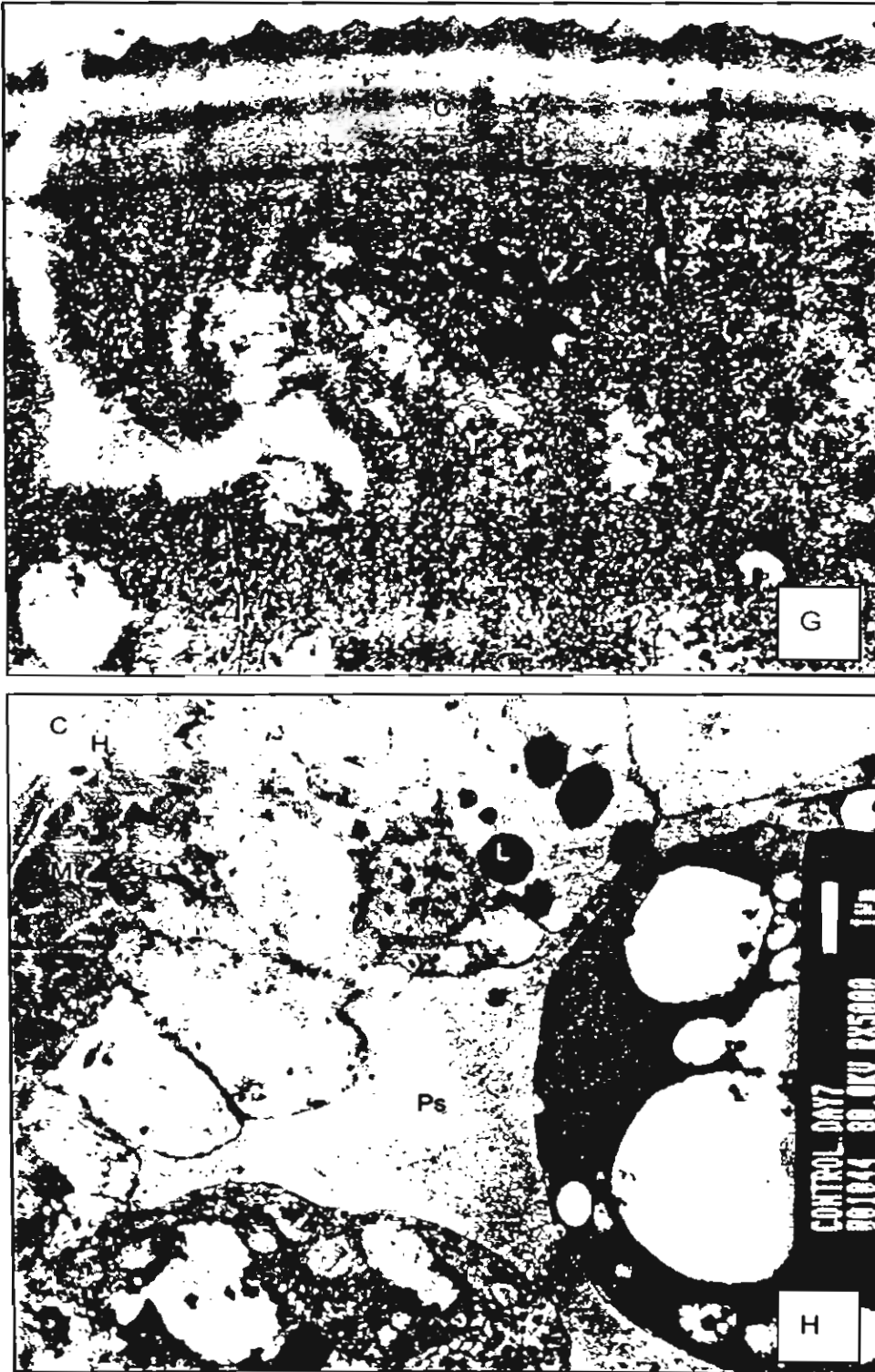
รูปที่ 9. ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อดำ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (A) แสดงช่องว่างภายในลำตัว (pseudocoelom, Ps), (B) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังชั้นนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M) และภายในลำตัวมีเม็ดไขมัน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



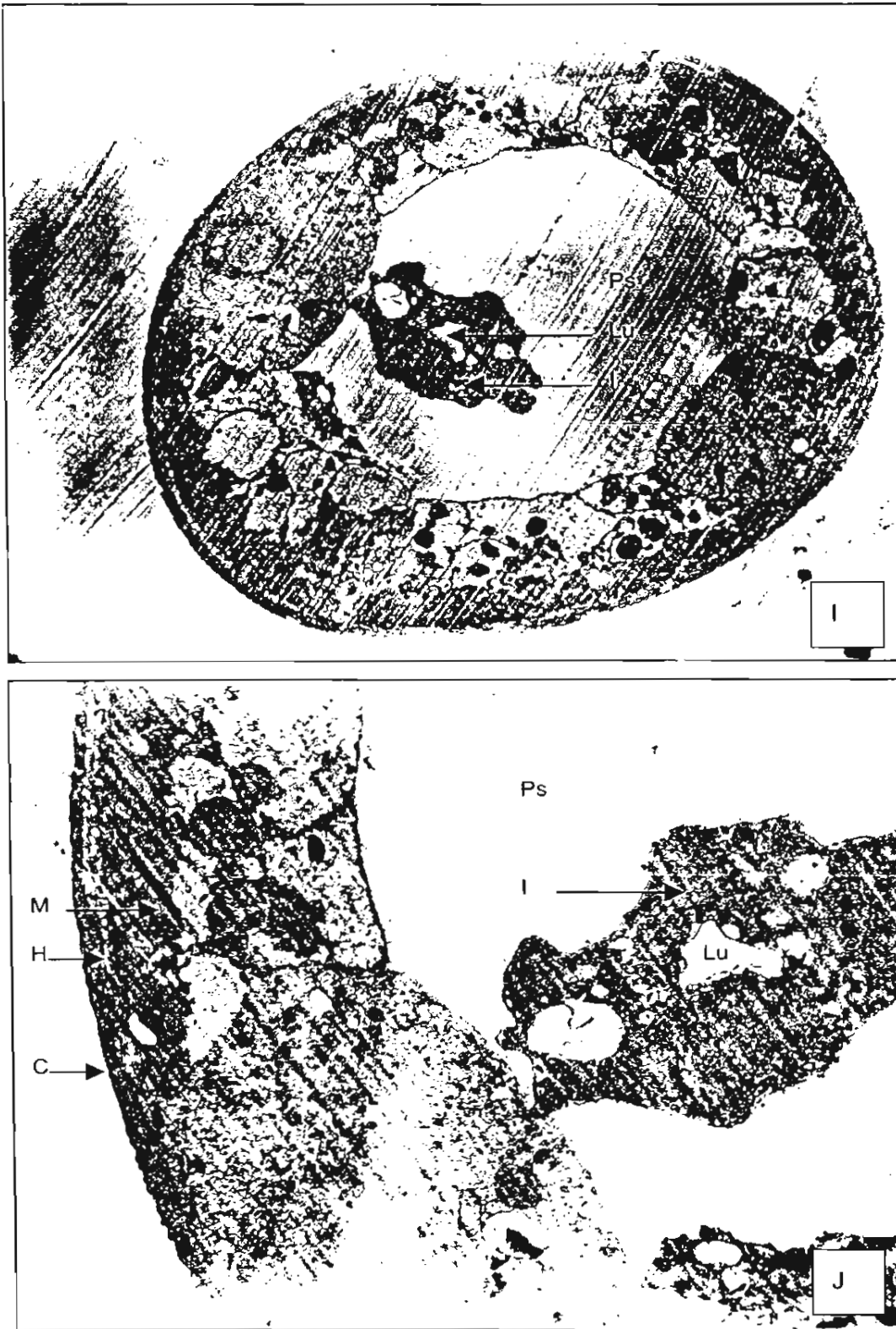
รูปที่ 10. ภาพตัดตามขวางของตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* จากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (C) แสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวชั้นกลาง (hypodermis, H), ผิวชั้นกล้ามเนื้อ (muscle, M) (D) ภาพขยายใหญ่แสดงส่วนผิวหนังลำตัวทั้ง 3 ชั้น และ basement membrane (B)



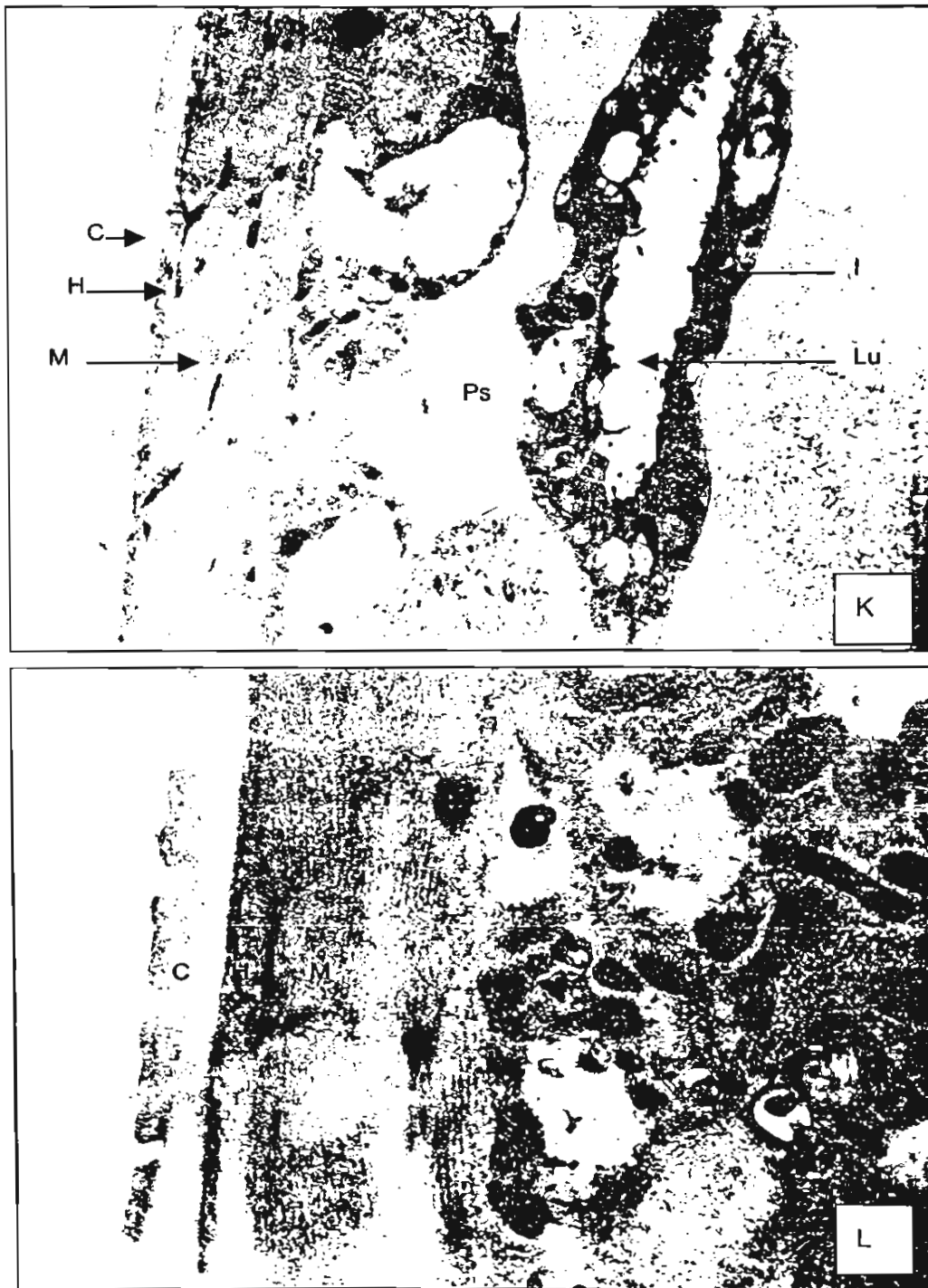
รูปที่ 11. ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) ของพยาธิฟิลาเรีย NSP *Brugia malayi* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 วัน (E) ภาพตัดตามขวาง (F) ภาพขยายใหญ่แสดงผิวหนังนอก (cuticle, C), ผิวหนังกลาง (hypodermis, H) และกล้ามเนื้อ (muscle, M)



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