616.9652
ก967ก

การพัฒนาชุดตรวจสอบและจำแนกเชื้อโรคเท้าช้าง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เป็นพื้นฐาน

28 ต.ค. 2545

โดย

รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปี 2544

h # 151742

สารบัญ

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย	i
บทคัดย่อ	i
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	7
• การเก็บตัวอย่างเลือดจากคนและแมว	7
• การทำ blood smear และการย้อมสีสไลด์ด้วย Giemsa	9
• การสกัด ดีเอ็นเอ จากเลือดของผู้ป่วยและแมวด้วยวิธี phenol/chloroform	11
• Polymerase Chain Reaction	13
ผลการทดลอง	
• การเก็บตัวอย่างเลือดและการทดสอบ	18
• ผล PCR-RFLP ของ Brugia sp.	21
• ผล PCR-RAPD ของ ยีน small subunit ribosomal RNA	24
• ผล PCR ของยีน Trans-spliced leader exon 1	26
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	30
ประวัติผู้วิจัย	31

สารบัญรูป

รูปที่ 1	ป่าพรุ	1
รูปที่ 2	ยุงเสือ	2
รูปที่ 3	พยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ตัวเต็มวัย	3
รูปที่ 4	Microfilaria ของ *B. malayi*	3
รูปที่ 5	วงจรชีวิตของพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi*	4
รูปที่ 6	ผู้ป่วยด้วยโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi*	5
รูปที่ 7	การเจาะเลือดจากปลายนิ้ว	8
รูปที่ 8	การเจาะเลือดจากใบหูแมว	8
รูปที่ 9	การทำ blood smear และการย้อมสีสไลด์ด้วย Giemsa	10
รูปที่ 10	ชุดอุปกรณ์กรองเลือด	12
รูปที่ 11	แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเลือด การทำ PCR และ Agarose gel electrophoresis	16
รูปที่ 12	*Brugia* sp. จากเลือดแมวย้อม Giemsa	19
รูปที่ 13	*B. malayi* และ *B. pahangi* ย้อม Giemsa	19
รูปที่ 14	*Brugia* sp. จากเลือดแมวย้อม Acid phosphatase	20
รูปที่ 15	*B. malayi* และ *B. pahangi* ย้อม Acid phosphatase	20
รูปที่ 16	ผล PCR ของยีน *Hha* I repetitive gene	21
รูปที่ 17	PCR-RFLP ของยีน *Hha* I repetitive gene	22
รูปที่ 18	ผล PCR ของยีน sheath protein 2	23
รูปที่ 19	PCR-RFLP ของยีน sheath protein 2	23
รูปที่ 20	ผล PCR ของยีน small subunit ribosomal RNA	24
รูปที่ 21	ผล PCR ของยีน small subunit ribosomal RNA	24
รูปที่ 22	PCR-RAPD ของยีน small subunit ribosomal RNA	25
รูปที่ 23	ผล PCR ของยีน Trans-spliced leader exon 1	26
รูปที่ 24	ผล PCR ของยีน Trans-spliced leader exon 1	26

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย : การพัฒนาชุดตรวจสอบและจำแนกเชื้อโรคเท้าช้างโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เป็นพื้นฐาน

ผู้วิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
โทร 02-664 1000 ต่อ 4605

ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยประเภท **ทั่วไป** ประจำปี 2544 จำนวนเงิน 250,000 บาท
ระยะเวลาการทำวิจัย 12 **เดือน** ตั้งแต่ **มกราคม-ธันวาคม** 2544

บทคัดย่อ

พยาธิเท้าช้างของคนชนิด *Brugia malayi* เป็นปรสิตที่พบมากในแถบจังหวัดภาคใต้ของประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านบางประเทศ เช่น มาเลเซีย เป็นต้น ซึ่งประชาชนในแถบนี้มักจะนิยมเลี้ยงแมวไว้เป็นสัตว์เลี้ยงภายในบ้าน คณะผู้วิจัยได้ทำการสุ่มตัวอย่างเจาะเลือดคนในพื้นที่จังหวัด 3 จังหวัด ได้แก่ นราธิวาส สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช จำนวนประมาณ 329 ราย และแมวในพื้นที่เดียวกันจำนวน 88 ราย หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดมาตรวจหาพยาธิเพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างพยาธิ *Brugia malayi* ที่พบในคนและ *Brugia* spp. ที่พบในแมวโดยการย้อมสี Giemsa และการย้อมสี acid phosphatase นอกจากนี้ยังได้นำเทคนิค PCR มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพยาธิทั้ง 2 ชนิดนี้ รวมทั้งเปรียบเทียบกับพนาธิฟิลาเรียในเลือดที่พบในคนได้แก่ *Wuchereria bancrofti* และในแมวได้แก่ *Brugia pahangi, Dirofilaria repens* และ *Dirofilaria immitis* โดยการทำ PCR-RFLP ของยีน *Hhal* repeat และ sheath protein2 การทำ PCR-RAPD ของยีน small subunit rDNA และการทำ PCR แบบทั่วไปโดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีน Trans-spliced Leader Exon1 (SLX) พบว่าจากการเปรียบเทียบผลการย้อมสีพบผู้ป่วยด้วยโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* จำนวน 2 ราย และในแมวพบพยาธิฟิลาเรียจำนวน 18 ตัว หลังจากทำ PCR แล้วพบว่าในแมว 18 ตัวนั้นเป็น *Brugia malayi* 15 ตัว โดยพบพยาธิเท้าช้างชนิดนี้ในคนและแมวที่อาศัยอยู่ในครอบครัวเดียวกันจำนวน 1 ครอบครัว การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า แมวที่เป็นสัตว์เลี้ยงภายในบ้านนอกจากจะเป็นแหล่งของพยาธิฟิลาเรียชนิด *Brugia pahangi, Dirofilaria repens* และ *Dirofilaria immitis* ที่สามารถแพร่กระจายไปสู่สัตว์ตัวอื่นๆแล้ว แมวน่าจะเป็นแหล่งสะสมพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ที่สามารถแพร่กระจายไปสู่คนได้ ดังนั้นนอกจากการควบคุมและกำจัดพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ในคนแล้ว ยังจำเป็นต้องดำเนินการควบคุมและกำจัดในแมวซึ่งเป็นแหล่งสะสมโรคด้วย

การพัฒนาชุดตรวจสอบและจำแนกเชื้อโรคเท้าช้าง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เป็นพื้นฐาน

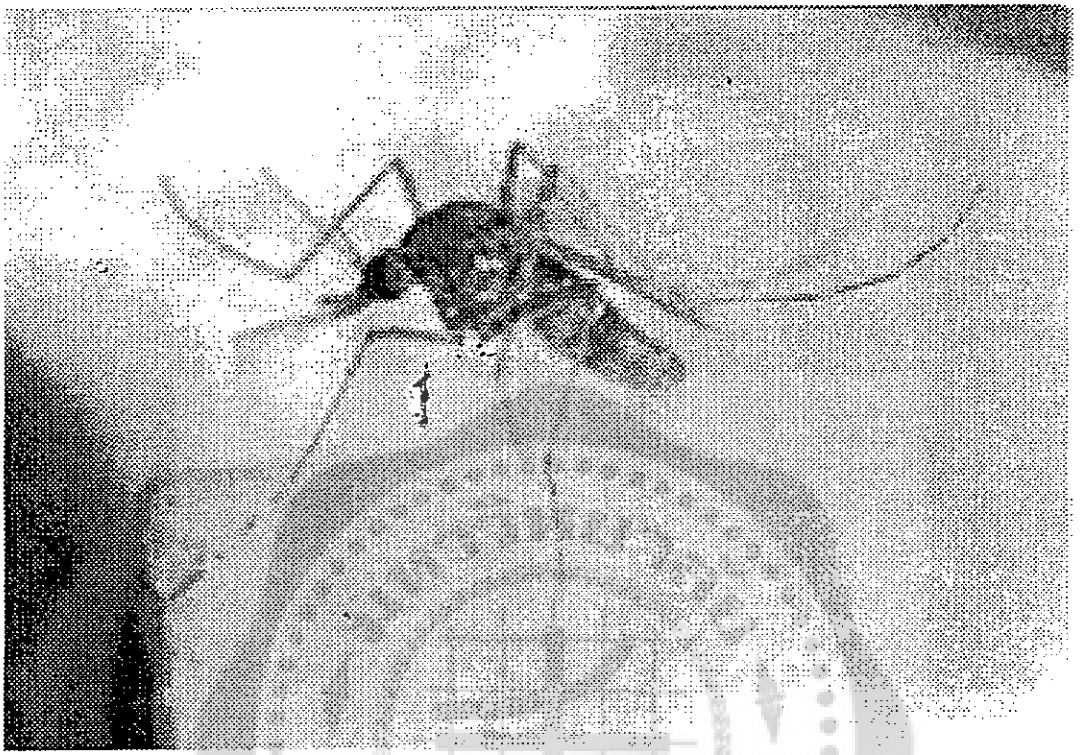
1. บทนำ

โรคเท้าช้าง (elephantiasis) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดอาการทุพลภาพขึ้นในผู้ป่วยเป็นอันดับที่ 2 ของโลก รองจากโรคมาลาเรีย โรคเท้าช้างเกิดจากพยาธิในระบบน้ำเหลือง 2 ชนิด คือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ถึงแม้ว่าโรคนี้จะไม่ทำอันตรายถึงชีวิตแต่ก็เป็นสาเหตุของการลดประสิทธิภาพในการทำงาน ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพจิตเสื่อมและปัญหาในการดำรงชีวิตในสังคมของผู้ป่วย

โรคเท้าช้างที่พบในประเทศไทยเกิดจากพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* โดยมีแหล่งระบาดของโรคที่บริเวณภาคใต้ของประเทศไทยโดยเฉพาะในบริเวณจังหวัดนราธิวาส สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีสภาพพื้นที่แบบป่าพรุ (รูปที่ 1) ซึ่งมีสภาพเป็นบริเวณที่ลุ่มชื้นแฉะหรือมีน้ำขังติดกับสันทราย ดินบริเวณพรุส่วนใหญ่เป็นดินอินทรีย์ (organic soil) ซึ่งเกิดจากการสลายตัวผุพังของซากพืชที่เน่าเปื่อยทับถมเป็นชั้นหนา ถัดจากชั้นดินอินทรีย์ลงไปเป็นชั้นดินเลนสีเทาบนน้ำเงิน (mud clay) ซึ่งมีสารไพไรท์ (pyrite) อยู่สูง ชั้นดินเลนนี้หากสัมผัสกับอากาศ จะปลดปล่อยกรดกำมะถันออกมา และบางส่วนแปรสภาพเป็นสารประกอบจาโรไซท์ (jarosite) เห็นเป็นจุดประสีเหลืองฟางข้าว ทำให้ดินและน้ำบริเวณนั้นเป็นกรดจัด พืชพรรณส่วนใหญ่เป็นพืชจำพวกหญ้า กก กระจูด สลับกับป่าเสม็ด

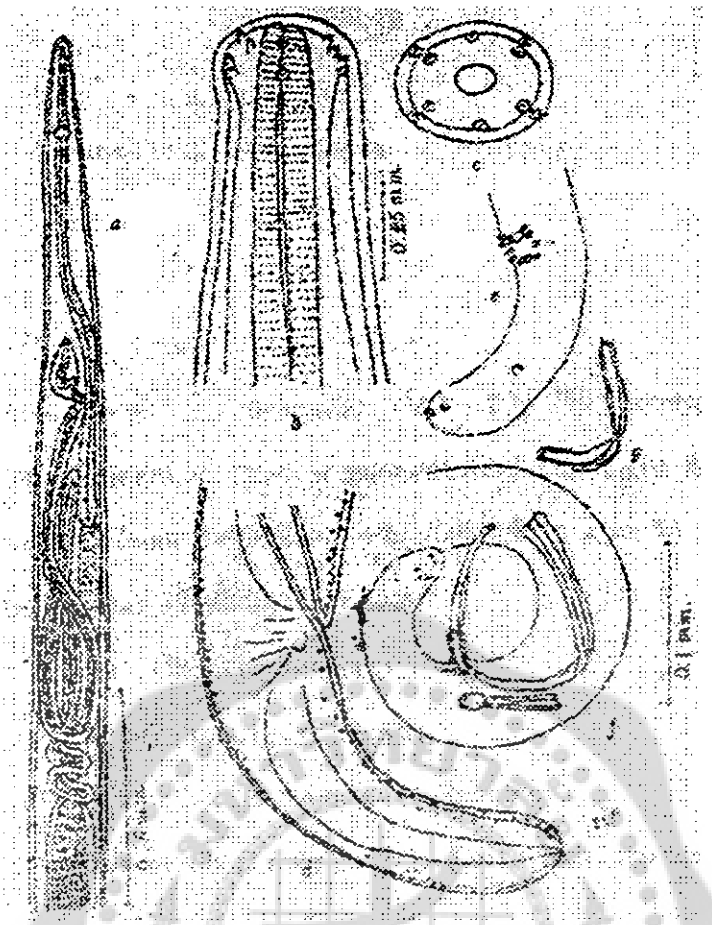
รูปที่ 1 ป่าพรุ

ปาพรุนี้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ที่สำคัญของยุงเสือ (*Mansonia* spp. รูปที่ 2) ซึ่งเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างที่เกิดจากพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ยุงชนิดนี้เป็นยุงที่มีลักษณะการออกหากินในช่วงกลางคืน (nocturnal periodic) ตั้งแต่ช่วง 21.00น. ถึง 2.00น.

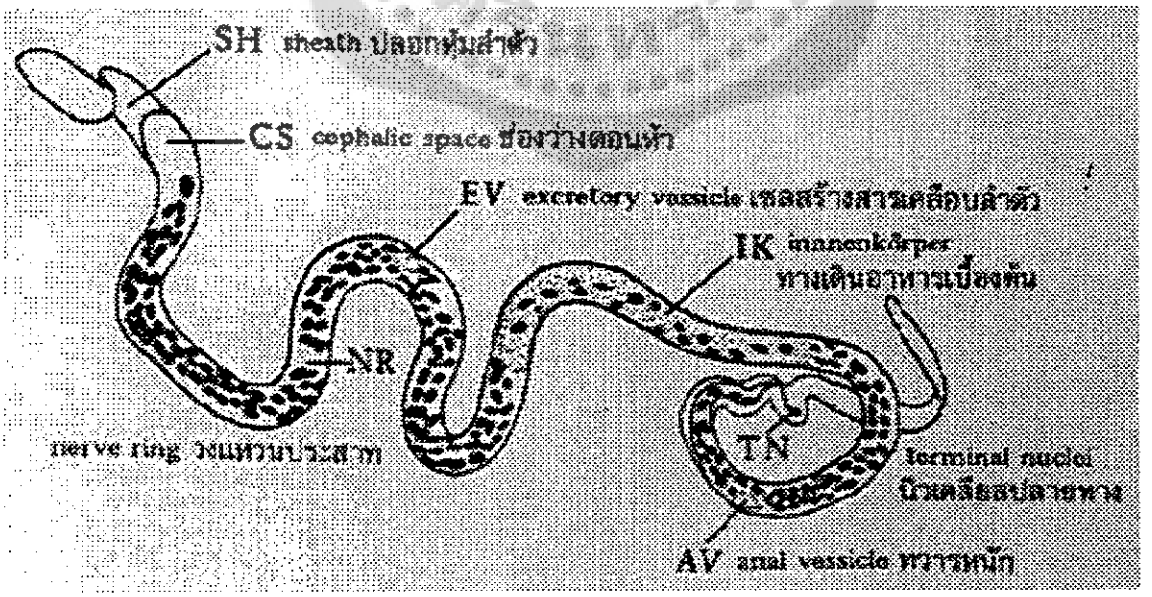


รูปที่ 2 ยุงเสือ (*Mansonia* spp.)

พยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* นี้มีชื่อสามัญว่า Malayan filarial worm จัดอยู่ใน Phylum Nematoda, Class Phasmidia และอยู่ใน Order Spirurida พยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในต่อมน้ำเหลืองหรือท่อน้ำเหลือง แต่สามารถตรวจพบพยาธิระยะ microfilaria ได้ในกระแสเลือด รูปลักษณะโดยทั่วไปของตัวเต็มวัยมีรูปร่างยาวเรียวเหมือนเส้นด้ายสีขาว cuticle เรียบ ตัวผู้และตัวเมียมักพันกันอยู่ตามต่อมน้ำเหลือง หัวและหางมน ส่วนหัวโป่งพองออกเล็กน้อย มี sessile cephalic papillae ล้อมรอบเป็นสองแถว มีช่องปาก (oral cavity) เปิดเข้าสู่ oesophagus ซึ่งเป็นชนิด spiruroid ตัวเมียยาว 43.5-55.0 มิลลิเมตร ตัวผู้ยาว 13.5 – 23.3 มิลลิเมตร ความกว้างโดยเฉลี่ยของพยาธิ 0.07 – 0.08 มิลลิเมตร ในตัวผู้มีจำนวนและตำแหน่งของ pre- และ post-cloacal 5-8 คู่ มี adanal papillae 3-4 คู่ และ pre-cloacal ที่สามารถเห็นได้เพียง 1 อัน (รูปที่ 3) ระยะ microfilaria เป็นระยะที่พบได้ในกระแสเลือดของผู้ป่วย และเป็นชนิด sheathed microfilaria มีขนาดยาว 244-296 ไมครอน กว้าง 7.5-10 ไมครอน มีส่วนหัวมนแหลม cuticle เรียบ ส่วนหน้าสุดของตัวมี stylet ยึดติดอยู่ภายในลำตัวมี nuclei กระจายเกือบตลอดความยาว โดยมีช่องว่างระหว่างส่วนหน้าสุดของตัวจนถึงจุดเริ่มต้นที่มี nuclei (cephalic space) ยาวเป็นสองเท่าของความกว้าง และที่ปลายหางมี nuclei อยู่ 2 ก้อน (รูปที่ 4)

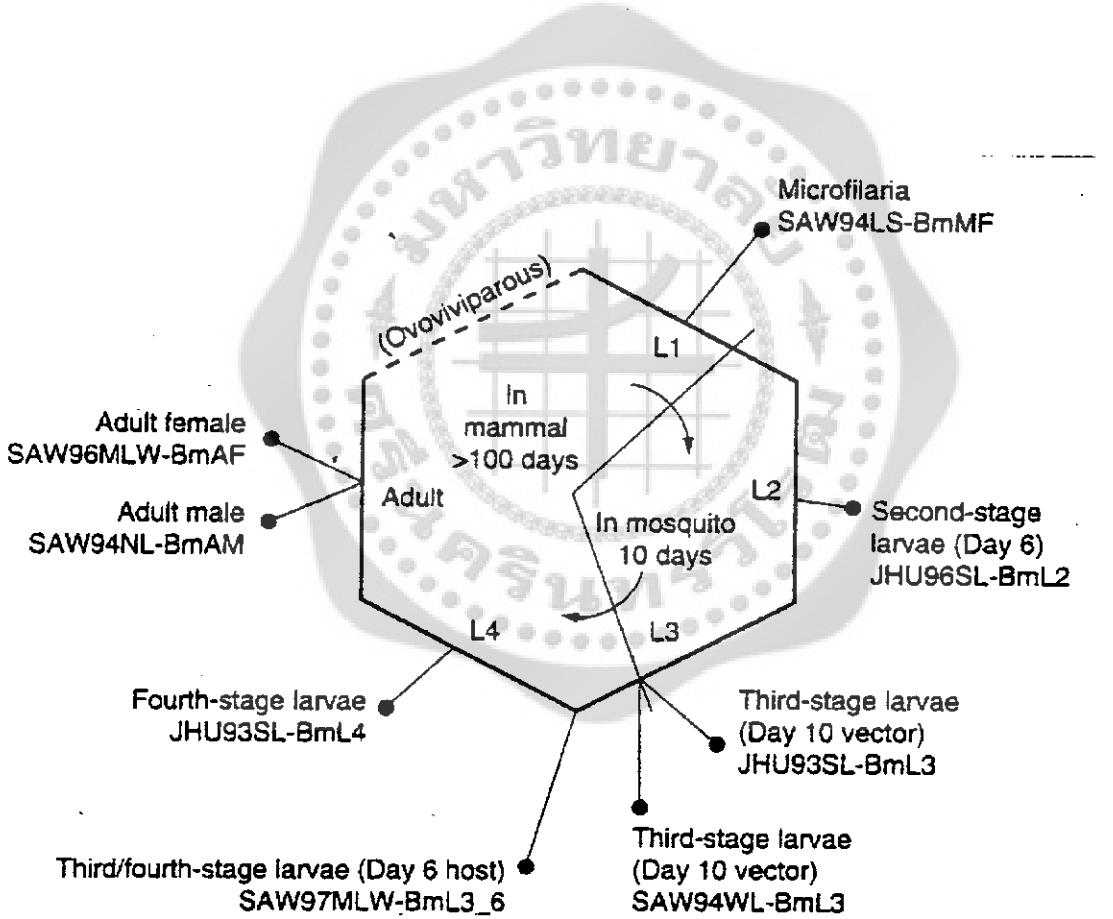


รูปที่ 3 พยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ตัวเต็มวัย a. ส่วนหัวของเพศเมียแสดงอวัยวะสืบพันธุ์ b.ส่วนหัวของเพศเมียโดยมองจากด้านข้าง c.ส่วนหัวของพยาธิแสดงรูปแบบของ perioral papillae d.ส่วนท้ายของเพศเมีย e,f.ส่วนท้ายของเพศผู้



รูปที่ 4 microfilaria ของ *Brugia malayi*

คนติดโรคเท้าช้างได้จากยุงที่มีระยะติดต่อของโรค คือระยะ larva stage 3 มากัดและปล่อย larva stage นี้ (รูปที่ 5) ออกมา larva stage 3 จะเข้าสู่เส้นเลือดและระบบน้ำเหลือง พยาธิเท้าช้างนี้มีระยะเวลาตั้งแต่ได้รับระยะติดต่อจากยุงจนตรวจพบ microfilaria ในเลือดประมาณ 7-8 เดือน ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ขึ้นสูงเป็นช่วงๆ (periodic fever) ต่อมาจะมีอาการบวมโตของต่อมน้ำเหลือง มี hyperplasia ของ follicles มี cells ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะ lymphocyte และ eosiniphils แทรกเข้ามารวมทั้ง histocute epitheloid cells, giant cells และ fibroblasts อันเป็นลักษณะของ granuloma ที่หลอดน้ำเหลืองก็มีพยาธิสภาพคล้ายกัน ทำให้ผนังของหลอดน้ำเหลืองบวมหนาเกิดการอุดตันขึ้น *Brugia malayi* มักทำให้เกิดอาการขาโต หรืออาจมีแขนโตได้แต่พบน้อยมาก (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 วงชีวิตของพยาธิโรคเท้าช้างชนิด *Burgia malayi*

รูปที่ 6 ผู้ป่วยด้วยโรคพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* มีอาการบวมโตที่ขา

ในอดีต การระบาดของโรคจะพบในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นฤดูที่พบยุงเสือ (Mansonia spp.) อันเป็นพาหะของโรคซุกซุม แต่ในปัจจุบันนี้พบว่าการระบาดของโรคลดลงมากเนื่องจากมียาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพร่วมไปกับการใช้ยากำจัดลูกน้ำยุงเสือ นอกจากนี้การลดลงของพื้นที่ป่าพรุก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ยุงเสือลดจำนวนลงตามไปด้วย แม้ว่าอุบัติการการเกิดโรคจะลดน้อยลงแต่กลับไม่สามารถกำจัดโรคนี้ให้หมดไปได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีสัตว์ที่เป็นแหล่งสะสม (animal reservoir) ของพยาธิชนิดนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการกลับมาของโรคได้อีกในทุกๆปี จากการสำรวจพบว่าสัตว์เลี้ยงประจำถิ่นในบริเวณระบาดของโรค อันได้แก่บริเวณจังหวัดนราธิวาส สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช ได้แก่ แมวและโค อาจพบการเลี้ยงสุนัขบ้างแต่ไม่เป็นที่นิยม

แมวเป็นสัตว์เลี้ยงที่พบมากที่สุด พบว่ามีการเลี้ยงแมวแทบทุกครัวเรือนในหมู่บ้านที่ทำการสำรวจ จากข้อมูลทางสัตววิทยาพบว่าสัตว์ในตระกูลแมวจะมีพยาธิ filaria ในเลือดหลักๆ 2 ชนิด คือ *Brugia pahangi* และ *Dirofilaria repens* และเนื่องจากพยาธิชนิด *Brugia pahangi* นี้มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* มาก นำไปสู่สมมติฐานว่า มีความเป็นไปได้หรือไม่ที่แมวจะเป็นแหล่งสะสมของพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ของคน

เพื่อตรวจสอบสมมติฐาน ผู้ทดลองได้ออกปฏิบัติการภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรในหมู่บ้านและแมวในเขตที่มีการระบาดของโรคโดยการสุ่มเก็บ และทำการตรวจสอบขั้นต้นโดยการปั่นตก

ตะกอนเลือดและการทำ blood smear พร้อมทั้งย้อมด้วยสี Giemsa และ acid phosphatase จากนั้นได้ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อจำแนกความแตกต่างและระบุชนิดของเชื้อที่พบในคนและแมว

<u>จุดประสงค์การทดลอง</u>

1. เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ของการเป็นแหล่งสะสมพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ในแมวซึ่งเป็นสัตว์ท้องถิ่นในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค
2. เพื่อหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ และแยกแยะความแตกต่างระหว่างพยาธิโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ในคน และ *Brugia pahangi* ในแมว

2.อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือดจากคนและแมว

ผู้ทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากคนและแมวจากสถานที่ดังต่อไปนี้

1) หมู่บ้านกุแบสาลอ ตำบลกะลุวอ อ.เมือง จ.นราธิวาส
2) หมู่ที่ 6 ตำบลบาเระใต้ อ.บาเจาะ จ.นราธิวาส
3) หมู่ที่ 3 ตำบลประสง อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
4) หมู่ที่ 3 ตำบลเคร็ง อ.ชะอวด จ.นครศรีธรรมราช

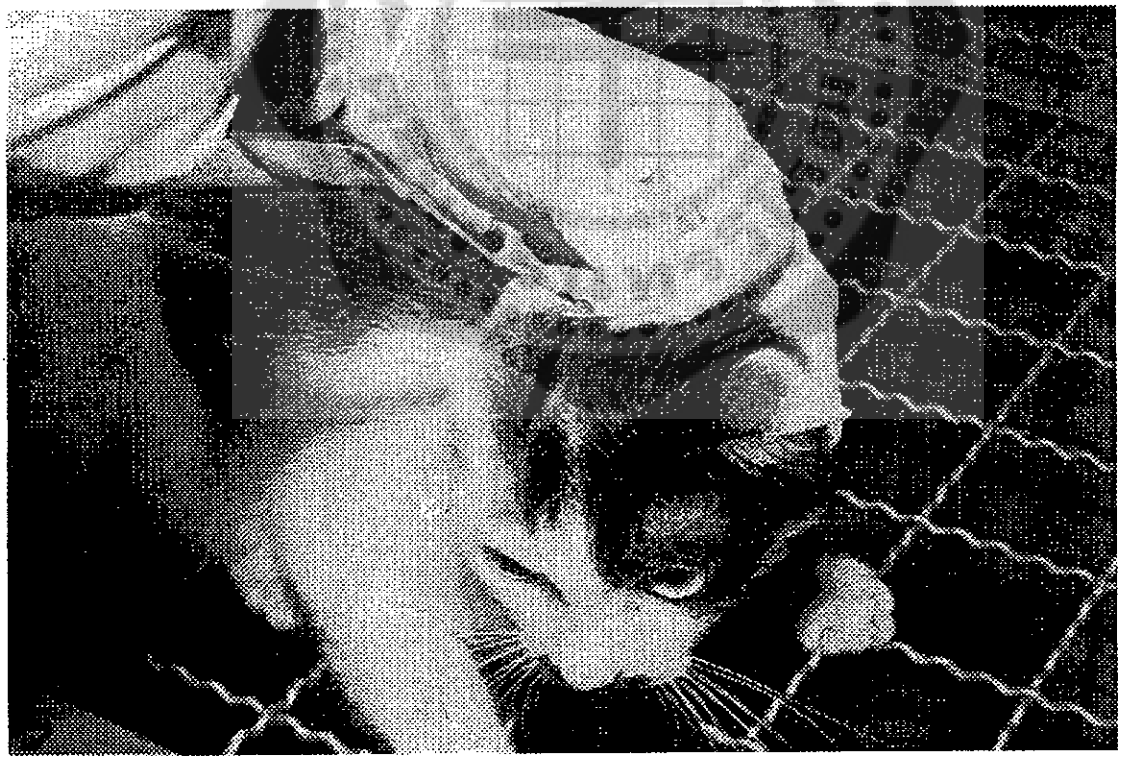
อุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่

- เข็มเจาะโลหิต
- สำลีสะอาดม้วนกลมขนาดเท่าหัวแม่มือ
- แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- capillary tube
- เครื่องปั่นตกตะกอนเลือดชนิดใช้กับ capillary tube
- แผ่นสไลด์สะอาด
- กล่องใส่สไลด์
- แบบฟอร์มจดรายชื่อผู้ได้รับการตรวจลหิต (F.S. 1)

โดยมีวิธีการดังนี้

1) ทำความสะอาดนิ้วคนและใบหูแมว โดยใช้สำลีก้อนชุบแอลกอฮอล์เช็ดตรงส่วนที่โป่งพองของปลายนิ้วและบริเวณด้านข้างของหูแมว รอจนแอลกอฮอล์แห้งสนิท
2) ใช้เข็มเจาะโลหิตเจาะเลือดจากปลายนิ้วมือของคนโดยแทงให้ลึกประมาณ 1 – 2 มิลลิเมตร และจากเส้นเลือดเวนที่ใบหู (ear vein) ของแมว ดังรูปที่ 7 และ 8
3) ใช้ capillary tube เก็บเลือด และนำมาปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนเลือดชนิดที่ใช้กับ capillary tube เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของเม็ดเลือดและพลาสมา
4) นำ capillary tube แต่ละอันมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้ามีพยาธิชนิด *B. malayi* หรือ *B. pahangi* และ *Dirofilaria repens* ในแมวอยู่จะพบที่บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของเม็ดเลือดและพลาสมา

รูปที่ 7 แสดงการเจาะและเก็บตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้วของคน



รูปที่ 8 แสดงการเจาะและเก็บตัวอย่างเลือดจากใบหูแมว

2. การทำ blood smear และการย้อมสีสไลด์ด้วย Giemsa

1. ฟิล์มบาง (Thin film)

1) หยิบแผ่นกระจกสไลด์ซึ่งทำความสะอาดด้วย Xylene ไว้แล้วอย่างดี โดยใช้วิธีจับสไลด์ด้วยนิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้หรือนิ้วกลางบีบขอบสไลด์ทางด้านยาวสองข้างตรงข้ามกัน วางราบลงบนโต๊ะ

2) เตรียมแผ่นกระจกสไลด์อีก 1 แผ่น ในลักษณะที่หยิบฉวยได้สะดวก โดยระวังไม่แตะต้องขอบด้านปลายของสไลด์

3) หัก capillary tube ออกและเคาะบนสไลด์เบาๆให้เลือดไหลออกจาก tube ให้หมด โดยให้หยดเลือดห่างจากปลายสไลด์ราวครึ่งนิ้ว

4) นำแผ่นสไลด์ในข้อที่ ii จรดขอบด้านปลายสไลด์บนแผ่นแรกให้เลยหยดเลือดไปเล็กน้อย โดยเอียงทำมุมประมาณ 30-45 องศา

5) ลากสไลด์แผ่นที่ ii ถอยหลังกลับให้แตะหยดเลือด โดยยึดสไลด์แผ่นแรกไว้ด้วยปลายนิ้วมืออีกข้าง

6) เมื่อเลือดแผ่ออกตามของสไลด์ดีแล้ว ไถสไลด์แผ่นที่ ii ไปข้างหน้าตามแนวสไลด์ และทำให้เกิดเป็นฟิล์มบางๆจนหมดเลือด

7) ปล่อยไว้ให้แห้ง เพื่อนำไปย้อมสีต่อไป

2. ฟิล์มหนา (Thick film)

1) เตรียมสไลด์เช่นเดียวกับการทำ thin film

2) หยดเลือดที่ใช้จะต้องมีปริมาณมากกว่าใน thin film

3) หลังจากหยดเลือดแล้ว ใช้มุมสไลด์แผ่นที่ 2 กวนหยดเลือดให้แผ่เป็นวงเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร (รูปที่9) และทิ้งไว้ให้แห้ง

4) เมื่อแห้งดีแล้ว นำสไลด์ไปแช่ลงในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที แล้วนำขึ้นวางผึ่งให้แห้ง ซึ่งพร้อมจะนำไปย้อมสีต่อไป

หมายเหตุ: ข้อควรคำนึงในการทำฟิล์มโลหิตหนา

- *การใช้มุมสไลด์เกลี่ยโลหิต ต้องแน่ใจว่ามุมสไลด์นั้นสะอาด ไม่มีโลหิตของคนที่เจาะโลหิตก่อนติดอยู่ วิธีที่ดีที่สุดคืออย่าใช้มุมสไลด์เกลี่ยโลหิตซ้ำมุมกันในการเจาะโลหิตของแต่ละคน*
- *สไลด์ฟิล์มโลหิตหนาไม่ควรเก็บไว้เกิน 1 สัปดาห์ หลังจากที่เจาะให้รีบส่งไปยัง หน่วยงานที่รับผิดชอบเพื่อทำการย้อมด้วย Giemsa ต่อไป*
- *ในการเกลี่ยฟิล์มโลหิตหนาให้เกลี่ยโลหิตให้มีความหนาบางเท่ากัน ประมาณการว่า เมื่อวางฟิล์มโลหิตลงบนกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วสามารถมองเห็นตัวอักษรได้ชัดเจนพอสมควร*

3. การย้อม smear ของเลือดด้วยวิธีของ Giemsa (Giemsa's stain)

1) จุ่มสไลด์ที่ทำ smear ดังกล่าวข้างต้นลงใน absolute alcohol ครึ่งถึง 1 นาที

2) ผสมสี stock Giemsa เข้มข้นกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 50

3) แช่สไลด์ที่ fix เรียบร้อยแล้วตามข้อที่ 1 ลงในน้ำสีตามข้อ 2 เป็นเวลา 45-50 นาที

4) นำสไลด์มาล้างน้ำประปาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น และผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยหัว oil หรือถ้าต้องการเก็บไว้ ควรหยอด permount แล้วปิดทับด้วย cover glass

รูปที่ 9 แสดงการทำ blood smear บนแผ่นสไลด์หลังจากการเก็บตัวอย่างเลือดแล้ว

3. การสกัด DNA จากเลือดของผู้ป่วยและแมวด้วยวิธี phenol/chloroform

1) เตรียมชุดกรองซึ่งประกอบด้วยกรวยขนาดเล็ก microfilter ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml และ syringeขนาด 1 ml นำมาประกอบกันดังรูปที่ 10
2) เทเลือดจากหลอดเคลือบ heparin ลงใน syringe ประกอบก้านฉีดเข้ากับ syringe แล้วค่อยๆดันก้านฉีดลงไป จากนั้นจึงค่อยๆดึง syringe ออกจากตัวกรองช้าๆ เพื่อป้องกันการดูดเอาแผ่น microfilter ติดขึ้นมาด้วย
3) ดึงก้านฉีดออกจากตัว syringe แล้วเติมสารละลาย normal saline ลงไปประมาณครึ่งหลอด แล้วทำเช่นเดียวกับในข้อ 2 ประมาณ 3-5 ครั้ง หรือจนกว่าสารละลายที่ผ่านตัวกรองออกมาใสไม่มีสีเลือดปน
4) ถอดชุดอุปกรณ์ออก แล้วนำแผ่น microfilter ไปใส่ใน sterile tube 10 ml จากนั้นเติม PSG buffer 300 µl 10%SDS 200 µl และ proteinase K (10 mg/ml) 10 µl ตามลำดับ
5) incubate ค้างคืนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
6) เติมสารละลายผสม phenol/chloroform เพื่อทำการสกัด DNA และตกตะกอน protein จาก Phenol/chloroform extraction kit 700 µl ผสมให้เข้ากันด้วยวิธี flip-flop เป็นเวลา 5 นาที
7) นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลาย 2 ชั้น โดยสารละลายชั้นบนมีลักษณะใส และชั้นล่างมีลักษณะขุ่น
8) ดูดเอาสารละลายชั้นบนออกใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วทำซ้ำขั้นตอนที่ 6-8 อีกครั้งหนึ่ง
9) เติม isopropanol ที่แช่เย็นไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณ 2 เท่าของสารละลายใน microcentrifuge tube เพื่อทำการตกตะกอน DNA
10) นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol เย็น (4 องศาเซลเซียส)
11) centrifuge ที่ 10,000 rpm 10 นาที แล้วดูดเอาส่วนสารละลายทิ้งไป เหลือเพียงตะกอนของ DNA
12) ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วทำการละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหรือ TE buffer 20 µl

ภูปที่ 10 แสดงชุดอุปกรณ์การกรองเลือด

4. การตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง *B. malayi* และ *B. pahangi* ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และการวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

เทคนิคการทำ PCR เพื่อเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสามารถกระทำได้ในหลอดทดลองซึ่งจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template), *Taq* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูงได้, Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP), Oligonucleotide primers และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาจะเกิดต่อเนื่องเป็นวงจรลูกโซ่ โดยที่ในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นการแยก DNA สายคู่ (double strand)ในสภาพปกติออกจากกันให้กลายเป็น DNA สายเดี่ยว (single strand) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing ในขั้นตอนนี้จะมีการลดอุณหภูมิลงตามความเหมาะสมเพื่อให้ primers จับกับ DNA template ที่เป็นสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม
3. Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสาย DNA สายใหม่ต่อจาก primers ในทิศทาง 5' ไป 3' โดยลดอุณหภูมิลงที่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์ DNA จะเป็นไปตามขั้นตอนทั้ง 3 นี้ เป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ PCR product เพิ่มขึ้นจากเดิมเป็นจำนวนมาก

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทำ PCR โดยทั่วไปจะประกอบด้วย

1. 5x Amplification buffer :

   500 mM KCl

   100 mM Tris+HCl pH 8.3 (ที่อุณหภูมิห้อง)

   15 mM $MgCl_2$

   1 mg/ml Autoclaved gelatin หรือ Nuclease free bovine serum albumin (BSA)

สูตรบัฟเฟอร์นี้ใช้กับงาน PCR ทั่วๆไป แต่อาจไม่เหมาะสมกับงานบางอย่าง ซึ่งก็สามารถปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารต่างๆได้

2. Stock dNTPs : 10mM dNTPs pH 7.0

3. Stock 20 µM ของแต่ละ primer ใน TE buffer (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8.0) หรือน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว

4. DNA template

5. *Taq* DNA polymerase: 1-2.5 unit ต่อ 100 µlของ reaction mixture

6. Thermal cycler ของ MJ Research

7. microcentrifuge

8. microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml

9. vortex mixture

10. adjustable automatic pipettes และ tips

สำหรับการทดลองนี้ ผู้ทดลองได้ใช้เทคนิค PCR ทั้งหมด 3 แบบ คือ

1) PCR แบบทั่วไปของยีน HhaI repeat โดยใช้ primers Bm1 และ Bm2, Sheath protein2 โดยใช้ primers Shp2R และ Shp2F, small subunit rDNA โดยใช้ primers Bmsr/R และ Bmsr/F และยีน Trans-spliced Leader Exon1 โดยใช้ primers SLX1 และ SLX2 จากนั้นจึงนำ PCR product ที่ได้จากยีน small subunit rDNA และ Trans-spliced Leader Exon1 ไปหาลำดับเบส
2) PCR–RAPD (Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA) ซึ่งเป็นการใช้ primers ที่ไม่จำเพาะเจาะจงเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่ให้ลักษณะ polymorphic ใช้สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ ในการทดลองนี้ได้ทำ PCR-RAPD ของยีน small subunit rDNA โดยใช้ universal primers B70-79
3) PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction–Restricted Fragment Length Polymorphism) ซึ่งเป็นการนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งจะสามารถบอกถึงความแตกต่างของ PCR product ที่มีขนาดเท่ากันได้ ในการทดลองนี้ได้ทำ PCR-RFLP ของยีน HhaI repeat โดยตัดด้วยเอนไซม์ AluI และยีน sheath protein2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ HaeIII

- PCR แบบทั่วไปของยีน HhaI repeat, sheath protein2, small subunit rDNA และ Trans-spliced Leader Exon1

1. เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

สารละลาย	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA template	1.00	
5xPCR buffer	5.00	1x
$MgCl_2$	0.75	1.5mM
dNTPs	0.50	100µl
primer 1	1.25	1µM
primer 2	1.25	1µM
Taq DNA polymerase	0.15	1U/µl
น้ำกลั่น	15.10	
ปริมาตรรวม	25.00	

โดย primers ที่ใช้ในการทดลองนี้มี 4 คู่ คือ

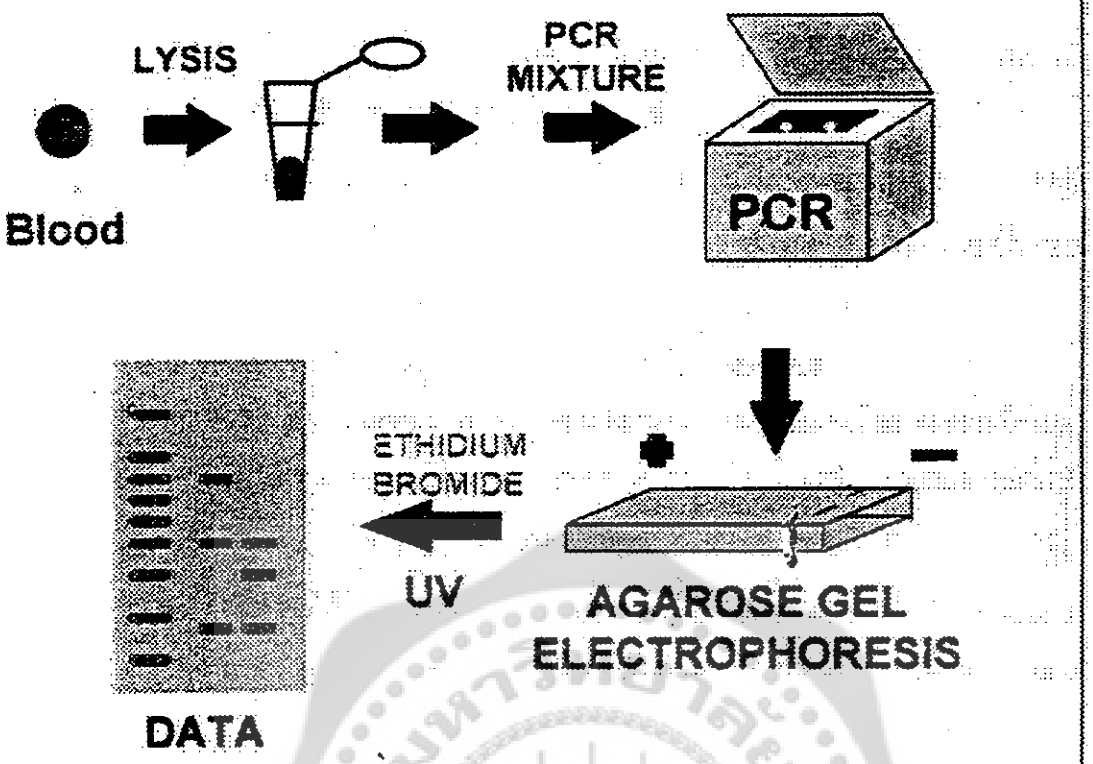
- Bm1/bm2 สำหรับยีน HhaI repeat ซึ่งจะให้แถบ DNA ที่ 294 คู่เบส (base pair)
- Shp2R/Shp2F สำหรับยีน sheath protein2 ซึ่งจะให้แถบ DNA ที่ 1,500 คู่เบส
- Bmsr/R และ Bmsr/F สำหรับยีน small subunit rDNA ซึ่งจะให้แถบ DNA ที่ 1,641 คู่เบส
- SLX1/SLX2 สำหรับยีน Trans-spliced Leader Exon1 ซึ่งจะให้แถบ DNA ที่ 294 คู่เบส

2. นำสารละลายมาผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture และปั่นให้สารละลายตกมารวมกันโดย microcentrifuge
3. นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง MJ Thermal cycler ที่ได้ทำการตั้งอุณหภูมิที่เครื่องไว้ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นการ pre-heat ก่อน PCR เพื่อทำให้เกิดการเสียสภาพของดีเอ็นเอเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยว และเพิ่มความจำเพาะและปริมาณของ PCR product ให้มากขึ้น
4. ตั้งอุณหภูมิที่เครื่อง Thermal cycler ดังนี้

- denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- annealing 58 องศาเซลเซียส สำหรับ primers Bm1/Bm2 , 55 องศาเซลเซียส primers Shp2/R และ Shp2/F และ primers Bmsr/F และ Bmsr/R, 37 องศาเซลเซียสสำหรับการทำ PCR-RAPD โดย universal primers B70-79 และ 59 องศาเซลเซียสสำหรับ primer SLX1/SLX2 เป็นเวลาอย่างละ 1 นาที
- extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ และ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่อง

5. เก็บสารละลายไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส สำหรับทำการวิเคราะห์ต่อโดย Gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 2% และนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนจะนำไปอ่านผลด้วยเครื่องฉายรังสี UV (รูปที่ 11) หรือนำไปหาลำดับเบส (sequencing)



รูปที่ 11 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเลือด การทำ PCR และการวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

- PCR-RFLP ของยีน *Hhal* repeat และยีน sheath protein2

1. PCR-RFLP ของยีน Hhal repeat

หลังจากการเพิ่มขยาย DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers Bm1 และ Bm2 แล้วจึงนำ PCR product ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *AluI* โดยมีวิธีการดังนี้

1) เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

สารละลาย	ปริมาตร(µl)
PCR product	10.0
10x PCR buffer B	2.0
BSA 10mg/µl	0.2
AluI	1.0
น้ำกลั่น	6.8
ปริมาตรรวม	20.0

2) incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

3) นำมาวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel

2. PCR-RFLP ของยีน sheath protein2

นำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ primers Shp2/R และ Shp2/F ไปตัดด้วย restriction enzyme 2 ชนิด คือ *HindIII* และ *HaeIII* โดยมีวิธีการดังนี้

1) เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

สารละลาย	ปริมาตร(µl)
PCR product	17.0
10x reaction buffer#2	2.0
HindIII หรือ *HaeIII*	1.0
ปริมาตรรวม	20.0

2) incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3) นำมาวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

PCR-RAPD ของ small subunit ribosomal RNA

หลังจากทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers Bmsr/R และ Bmsr/F แล้วจึงนำ PCR product ที่ได้ ไปทำ PCR ซ้ำอีกครั้งโดยใช้ universal primers B70-79 โดยมีวิธีการดังนี้

1. เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย

สารละลาย	ปริมาตร(µl)
PCR product	1.0
10x PCR buffer	2.5
25 mM MgCl2	1.5
2.5 mM dNTP	2.0
20µl primer 1 (B70-79)	1.0
Taq DNA polymerase	0.3
น้ำกลั่น	17.0
ปริมาตรรวม	25.0

2. กำหนดอุณหภูมิ Denaturation, Annealing และ Extention ที่ 94 –37 – 72 องศาเซลเซียสตามลำดับ นานอย่างละ 1 นาที จำนวน 25 รอบ
3. นำมาวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

3. ผลการทดลอง

1. <u>การเก็บตัวอย่างเลือดจากคนและแมว และการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการปั่นตกตะกอนเม็ดเลือด</u>

จากการออกภาคสนามเพื่อทำการสำรวจ ได้ผลซึ่งแสดงพื้นที่การสำรวจ ผลการสำรวจในคนและรังโรคในแมว โดยการเจาะเลือดและปั่นแยกส่วนเม็ดเลือดและพลาสมา แล้วใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจสอบเพื่อหาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ และแมวที่เป็นแหล่งสะสมของพยาธิโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ได้ผลการสำรวจดังข้อมูลดิบในภาคผนวกซึ่งสามารถนำมาสรุปได้ดังตาราง

ตารางสรุปผลการเก็บตัวอย่างสำรวจในเขตพื้นที่มีการระบาดของโรค

สถานที่	จำนวนประชากรที่ทำการเจาะเลือดตรวจพยาธิ		จำนวนประชากรที่ตรวจพบพยาธิในเลือด		หมายเหตุ
	คน	แมว	คน	แมว	
หมู่ที่ 3 ต.ประสง อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี	75	15	2	8	*Brugia* spp.
หมู่ที่ 4 ต.กุแบสาลอ อ.เมือง จ. นราธิวาส	149	35	0	1	*D.repens*
หมู่ที่ 6 ต.บาเระใต้ อ.บาเจาะ จ. นราธิวาส	92	3	0	2	*D.repens*
หมู่ที่ 1 ต.เคร็ง อ.ชะอวด จ. นครศรีธรรมราช	13	30	0	7	*Brugia* spp.
หมู่ที่ 2 ต.เคร็ง อ.ชะอวด จ. นครศรีธรรมราช	0	4	0	0	
หมู่ที่ 3 ต.เคร็ง อ.ชะอวด จ. นครศรีธรรมราช	0	1	0	0	

หมายเหตุ: พบแมวติดเชื้อ Brugia spp. *ในครอบครัวของผู้ป่วยโรคเท้าช้างชนิด Brugia malayi*

"ข้อมูลจากแฟ้มผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร"

2. การตรวจสอบพยาธิซนิด *Burgia* spp. จากคนและแมวด้วยวิธี Giemsa และ acid phosphatase

หลังจากการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการปั่นตกตะกอนและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแล้ว จากนั้นได้นำตัวอย่างเลือดที่ได้ไปย้อมสีด้วยวิธี Giemsa staining ได้ผลดังตัวอย่างในรูปที่ 12

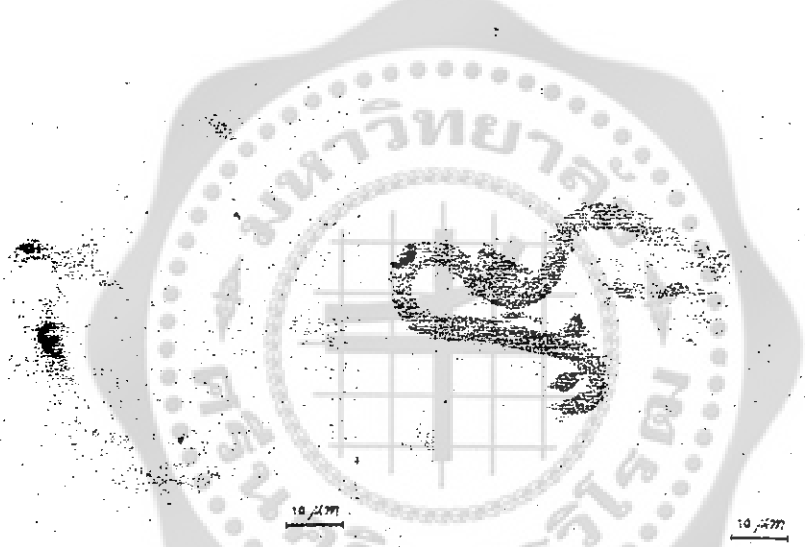
รูปที่ 12 *Brugia* spp. ที่ได้จากเลือดของแมวในการทดลอง

รูปที่ 13 *Brugia malayi* จากเลือดของคน (ซ้าย) และ *Brugia pahangi* จากเลือดแมว (ขวา)

จากการเปรียบเทียบรูปทั้ง 2 รูป พบว่า *Brugia* spp. ที่ตรวจพบในเลือดของแมวในการสำรวจตัวอย่างครั้งนี้ไม่แตกต่างจาก *Brugia malayi* ที่ได้จากตัวอย่างเลือดของคนในรูปที่ 13 และเมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Brugia malayi* และ *Brugia pahangi* ที่ทำการย้อมด้วยสี Geimsa ในรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *Brugia* spp. ทั้ง 2 สปีชีส์ได้

เมื่อนำไปย้อมดูด้วยสี acid phosphatase ซึ่งโดยปกติจะย้อมติดเฉพาะ *B. pahangi* ได้ผลดังตัวอย่างในรูปที่ 14

รูปที่ 14 *Brugia* spp. ในเลือดของแมว ย้อมด้วยสี acid phosphatase



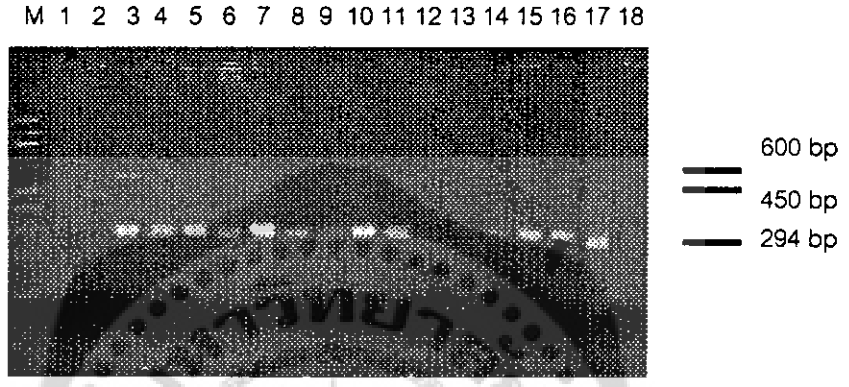
รูปที่ 15 *B. malayi* จากคน (ซ้าย) และ *B. pahangi* (ขวา) จากแมว ย้อมด้วยสี acid phosphatase

จากการเปรียบเทียบรูปที่ 14 และ รูปที่ 15 จะเห็นว่าไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิได้อย่างชัดเจนว่าพยาธิ *Brugia* spp. ที่ตรวจพบในเลือดของแมวนี้เป็น *B. malayi* หรือ *B. pahangi*

1. <u>การตรวจสอบพยาธิ *Brugia* spp. ด้วยวิธี PCR-RFLP</u>

1) PCR-RFLP ของยีน *Hhal* repeat โดยใช้ primers Bm1 และ Bm2

เมื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers Bm1 และ Bm2 เพื่อเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA สั้นๆในบริเวณของยีน *Hhal* repeat ซึ่งมีขนาดประมาณ 294 คู่เบส ดังรูปที่ 16

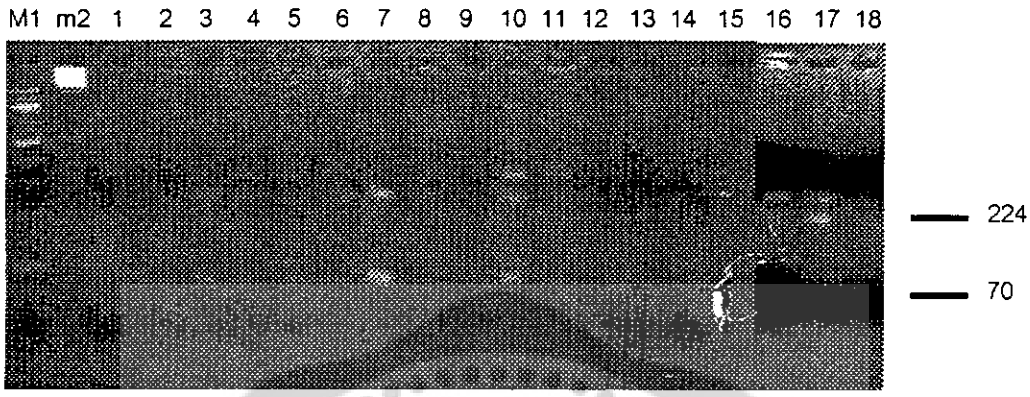


รูปที่ 16 การเพิ่มขยาย DNA ด้วยเทคนิค PCR ของ *Hhal* repeat โดย m = marker (100 bp Ladder) negative control ได้แก่หมายเลข 1 และ 2 (DNA ของแมว และ *D. repens* จากแมวเบงกอล และดำ ตามลำดับ) หมายเลข 3 ถึง 18 คือ DNA ของพยาธิ *Brugia* spp. ที่กรองและสกัด DNA จากเลือดของแมว 16 ตัว (ขาดรี, ขาวดำ, แมกซี่, คุด, นวล,นาก, เสือ, ยัยศรี, สีสวาท, แดดดี้, ไข่หลง, ตา, คุณชาย, ขุนแผน, แรมโบ้ และไข่แดงตามลำดับ)

จากรูปจะเห็นได้ว่า แมวทุกตัวติดเชื้อพยาธิเท้าช้างชนิด *Brugia* spp. ซึ่งทำให้ปรากฏแถบ DNA ที่บริเวณ 294 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่ามีแมว 6 ตัวที่ปรากฏแถบที่บริเวณใกล้เคียงกับ *D. repens* ที่ประมาณ 450 คู่เบส แมวจำนวน 9 ตัวปรากฏแถบ DNA ที่ประมาณ 600 คู่เบส ซึ่งไม่สามารถระบุที่มาของแถบได้

h # 151742

เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI* ผลการทดลองปรากฏดังรูปที่ 17

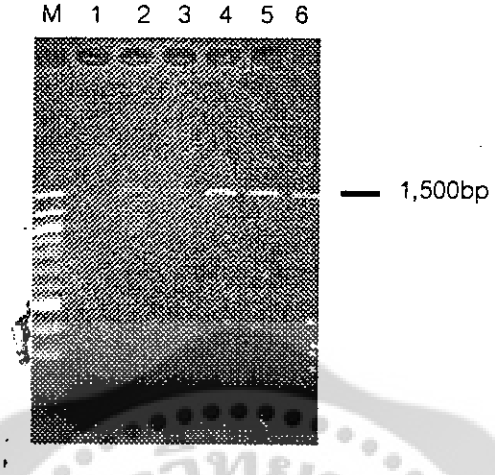


รูปที่ 17 PCR-RFLP ของยีน *HhaI* repeat เมื่อตัดด้วย *AluI* โดย m1 และ m 2 คือ marker (lambda *HindIII* และ 100 bp Ladder ตามลำดับ หมายเลข 1 และ 2 เป็น negative control และหมายเลข 3 ถึง 18 ได้แก่ตัวอย่างจากเลือดแมวดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

จากรูปจะเห็นว่า เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันเลย โดยจะพบแถบ DNA ที่บริเวณ 70 และ 224 คู่เบส ดังนั้นพยาธิที่พบในแมวทั้ง 16 ตัวนี้น่าจะเป็นพยาธิชนิดเดียวกันและจัดอยู่ในกลุ่ม *Brugia* spp.

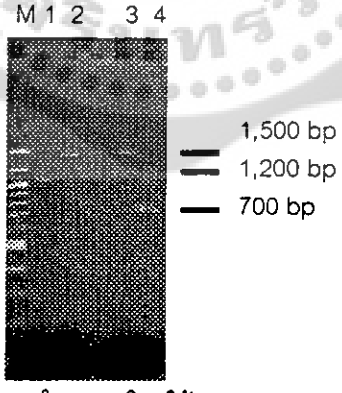
2) PCR-RFLP ของยีน sheath protein 2 โดยใช้ primers Shp2R/Shp2F

primers Shp2R/Shp2F สำหรับ sheath protein 2 ตัวนี้จะจับกับ DNA และปรากฏแถบที่ 1,500 คู่เบส เหมือนกันทั้งใน *B. malayi* และ *B. pahangi* ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 แสดงผลการทำ PCR โดยใช้ primers Shp2R/Shp2F ได้แถบ DNA ที่ 1,500 คู่เบส m=100 bp Ladder 1-3 = *B. malayi* 4-6 = *B. pahangi*

เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ซึ่งจะตัดเฉพาะ *B. malayi* ที่ประมาณ 1,200 คู่เบส และ *HaeIII* ที่ตัดเฉพาะ *B. pahangi* ที่ประมาณ 700 คู่เบส ได้ผลดังรูปที่ 19

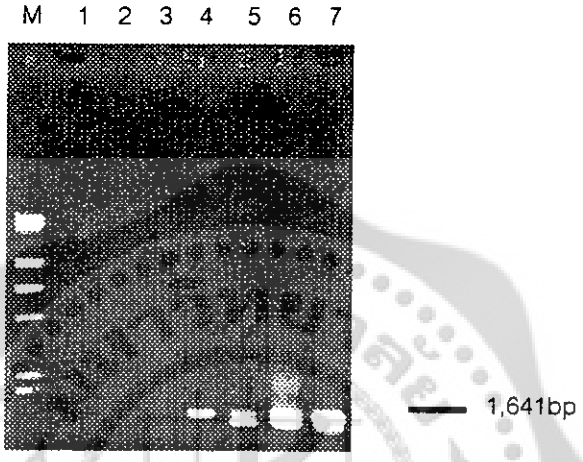


รูปที่ 19 แสดงการตัดชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ primers Shp2R/Shp2F ด้วย *HindIII* (1และ2) และ *HaeIII* (3 และ 4) หมายเลข 1 และ 3 เป็น *B .malayi* 2 และ 4 เป็น *B. pahangi*

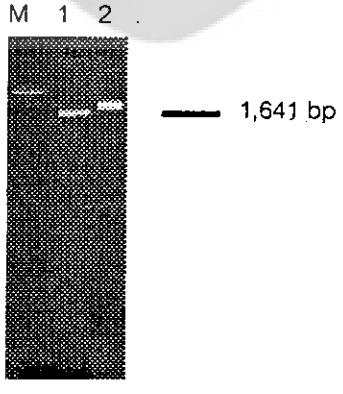
จากรูปทั้ง 2 แสดงให้เห็นว่าเกิดการตัดจำเพาะในจุดที่ต้องการ และสามารถบอกให้รู้ถึงความแตกต่างระหว่างพยาธิ *Brugia* spp. ทั้งสองชนิดได้เป็นอย่างดี

2. <u>การตรวจสอบพยาธิเท้าช้าง *Brugia spp.* ด้วยวิธี PCR-RAPD ของยีน *Brugia malayi* small subunit ribosomal DNA และการหาลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing</u>

การใช้เทคนิค PCR โดยใช้ primers Bmsr/F และ Bmsr/R ซึ่งเป็น primers เฉพาะสำหรับ small subunit rDNA ของ *B. malayi* จะปรากฏแถบ DNA ที่บริเวณ 1,641 คู่เบส (รูปที่ 20) ส่วนในตัวอื่นๆนั้นไม่ควรจะปรากฏแถบ DNA เลย หรือควรจะปรากฏที่บริเวณอื่น แต่จากผลการทดลองพบว่า นอกเหนือจาก *B. pahangi* และ *B. malayi* จะปรากฏแถบ DNA ที่บริเวณเดียวกันแล้ว *D. immitis* (พยาธิในหัวใจสุนัข) *D. repens* และ *Wuchereria bancrofti* ยังปรากฏแถบ DNA ที่บริเวณเดียวกับ *B. malayi* ด้วย ดังรูปที่ 20 และ 21

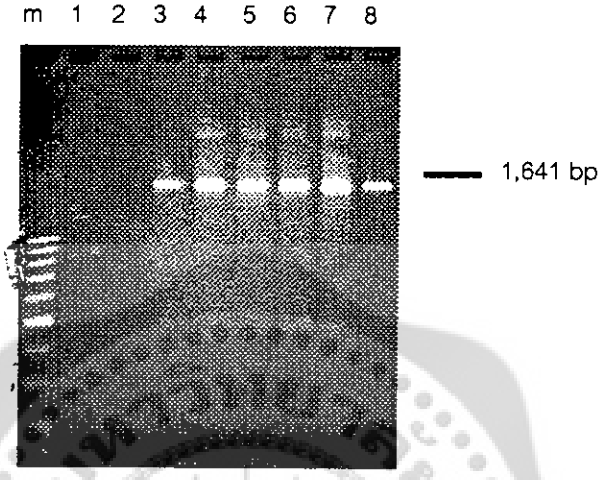


รูปที่ 20 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดย primers Bmsr/F และ Bmsr/R m = marker (Lambda *HindIII*) negative control = 1 และ 2 (DNA ของแมวและคนตามลำดับ) 3 ถึง 7 เป็นตัวอย่างในการทดลอง (*B. malayi* จากแมวไข่แดง, *B. malayi* จากคน, *B. pahangi* จากแมว *D. immitis* จากสุนัข และ *D. repens* จากแมวดำ)



รูปที่ 21 แสดงผลการเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดย primers Bmsr/F และ Bmsr/R m = marker (Lambda *HindIII*) 1 = แมวอุ่นซึ่งพบในครอบครัวของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง 2 = *W. bancrofti* จากแรงงานชาวพม่า

ดังนั้นการทำ PCR เพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิและสปีชีส์ได้ จึงจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นเข้าช่วยโดยในการทดลองนี้ใช้ PCR-RAPD โดยใช้ primers B70 – 79 ซึ่งเป็น universal primers ผลที่ได้ปรากฏว่า primers ไม่จับกับชิ้นของ DNA เลย จึงพบแถบ DNA ที่บริเวณเดิม คือที่ 1,641 คู่เบสดังแสดงในรูปที่ 22

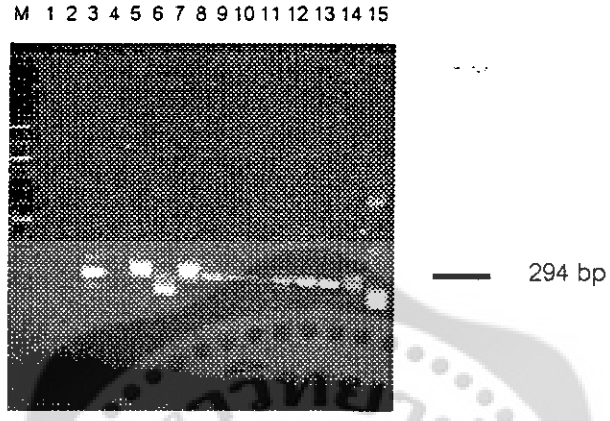


รูปที่ 22 แสดงผลการทำ PCR-RAPD ด้วย primers B 70-79 ซึ่งไม่สามารถจับกับชิ้นส่วนของ DNA ได้ ทำให้ปรากฏแถบ DNA ที่ 1,641 คู่เบสเช่นเดียวกับการทำ PCR ตามปกติ m = 100 bp Ladder 1 และ 2 เป็น negative control (DNA ของคนและแมวตามลำดับ) 3 ถึง 8 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (*B. malayi* ของคน, แมวอุ่น, *B. pahangi* ของแมว, *D. immitis*, *D. repens* และ *W. bancrofti*)

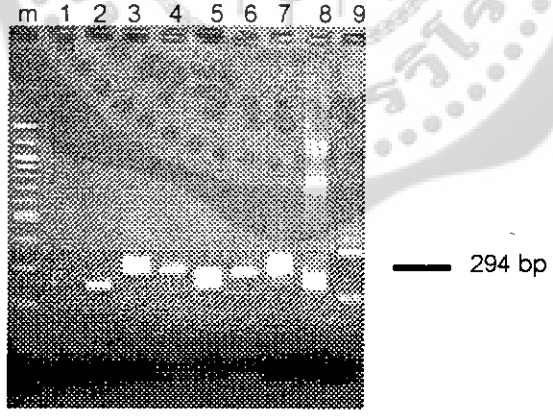
หลังจากที่ผลของ PCR-RAPD ไม่สามารถนำมาใช้ได้ จึงได้นำชิ้นส่วน DNA ของ small subunit rDNA ส่งไปหาลำดับเบสที่ Bioservice Unit โดยเลือกส่ง PCR product ไปเพียง 2 ตัว คือ *B. malayi* ของคน และ *Brugia* spp. ที่พบในแมวอุ่น เนื่องจาก *B. malayi* ของคนที่ใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้ คือผู้ป่วยที่เป็นเจ้าของแมวอุ่น และได้แปลผลออกมาเป็นดังกราฟที่ 1-4

3. <u>การตรวจสอบพยาธิเท้าช้าง *Brugia* spp. ด้วยวิธี PCR ของยีน Trans-spliced Leader Exon1 โดยใช้ primers SLX1/SLX2 และการหาลำดับ DNA</u>

เมื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ที่บริเวณยีน Trans-spliced Leader Exon 1 ด้วย primers SLX1/SLX2 แล้ว ตามข้อสันนิษฐานถ้าเป็นพยาธิเท้าช้างชนิด *B. malayi* จะพบแถบ DNA ที่บริเวณ 294 คู่เบส ส่วน *Brugia* spp. อื่นๆ และ *Dirofilaria* spp. จะพบแถบ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันไป ได้ผลที่เป็นไปตามข้อสันนิษฐานดังรูปที่ 23 และ 24



รูปที่ 23 แสดงผลจากการทำ PCR โดยใช้ primers SLX1/SLX2 m = marker (100 bp Ladder) 1 และ 2 เป็น negative control (DNA ของแมวและคนตามลำดับ) 3 ถึง 12 เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (ชาตรี, ขาวดำ, แมกซี่, คุด, ยัยศรี, ลีสวาท, ตา, คุณชาย, ขุนแผน และแรมโบ้) 13 ถึง 15 เป็น positive control (*B. malayi* ของคน, *B. pahangi* และ *D. immitis*) จะพบว่าแมวส่วนใหญ่ติดเชื้อ *B. malayi* เช่นเดียวกับในคน



รูปที่ 24 แสดงผลจากการทำ PCR โดยใช้ primers SLX1/SLX2 m = marker (100 bp Ladder) negative control หมายเลข 1 DNA ของแมว หมายเลข 2 ถึง 5 เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (แมวศรี, หญิงใหญ่, อุ่น และสุนัขที่คาดว่าติดเชื้อ *D. immitis*) หมายเลข 6 ถึง 9 เป็น positive control (*B. malayi* ของคน, *B. pahangi*, *D. immitis* และ *D. repens*)

จากรูปทั้ง 2 จะพบว่า SLX1/SLX2 สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *Brugia* แต่ละสปีชีส์ได้ และยังสามารถบอกความแตกต่างระหว่างชนิดของพยาธิ filaria เป็น *Brugia* spp. และ *Dirofilarai* spp. ได้อย่างชัดเจน เมื่อดูจากรูปจะพบว่า มีการติดพยาธิผสมในแมวบางตัว เช่น ในรูปที่ 24 แมวหมายเลข 5 มีการติดเชื้อผสมระหว่างพยาธิ *Brugia* spp. และ *D. immitis*

เพื่อยืนยันความแน่นอนในการใช้ primers SLX1/SLX2 จึงได้นำ PCR product ที่ได้จากตัวอย่างแมวอุ่น และ *B. malayi* ของคนส่งไปหาลำดับเบสได้ผลดังกราฟที่ 5-8 ซึ่งพบว่า ชิ้นส่วน DNA ใน PCR product ของ แมวอุ่นและเจ้าของที่เป็นโรคเท้าช้างมีความใกล้เคียงกันถึง 90%

4.สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การประเมินผลความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ *Brugia* spp. ในแมวและการกลับมาของโรคเท้าช้าง

จากการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ 3 จังหวัด โดยมีจำนวนประชากรที่ได้รับการเจาะเลือดโดยประมาณ 329 คน ตรวจพบประชากรเป็นโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* 2 คน คิดเป็นร้อยละ 0.6 ของประชากรทั้งหมด

การเจาะเลือดสำรวจในแมวจำนวน 88 ตัว ตรวจพบแมวติดพยาธิ filaria 18 ตัว คิดเป็นร้อยละ 20.5 ของจำนวนแมวทั้งหมด และจากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ยีน Trans-spliced Leader Exon1 พบว่าเป็นพยาธิ *Brugia malayi* ถึงร้อยละ 44 จากจำนวนแมวที่พบพยาธิ filaria 18 ตัว

จากการเปรียบเทียบพบว่า แม้ว่าจำนวนประชากรที่เป็นโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* จะลดน้อยลงกว่าในอดีต แต่เมื่อคำนึงถึงประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในการรักษา (diethylcarbamazine Citrate และ ivermectin) รวมถึงประสิทธิภาพในการควบคุมและการกำจัดลูกน้ำยุงพาหะแล้ว ไม่ควรจะพบประชากรที่เป็นโรคนี้เลย แต่เมื่อพิจารณาจำนวนของแมวสัตว์เลี้ยงประจำถิ่นที่พบพยาธิ *Brugia malayi* จำนวนมาก ซึ่งไม่แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด ทำให้แมวเป็นแหล่งสะสมพยาธิที่ดีชนิดหนึ่ง การกำจัดพยาธิ *Brugia malayi* ให้หมดไปจึงเป็นไปได้ยาก แม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับการรักษาจนหายแล้วก็ตาม แต่พยาธินำโรคยังคงอยู่ในสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์เลี้ยงประจำถิ่นเช่นแมว เมื่อเข้าสู่ฤดูฝน ซึ่งเป็นฤดูที่มีการระบาดหนักของยุงพาหะทำให้พยาธินี้กลับมาระบาดหนักอีกครั้ง

ดังนั้นการรักษาและป้องกันการติดพยาธิเท้าช้าง รวมทั้งการควบคุมการระบาดของโรคที่มีประสิทธิภาพควรจะกระทำทั้งในคนและแมว กล่าวคือควรทำการเจาะเลือดเพื่อตรวจหา microfilaria ของพยาธิ *B. malayi* ทั้งในคนและแมวพร้อมทั้งให้การบำบัดรักษาร่วมกัน

2. การตรวจสอบพยาธิ *Brugia malayi* ในแมว

จากการทดลองพบว่า การย้อมสี Giemsa ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง *B. malayi* และ *B. pahangi* ได้ เนื่องจากพยาธิทั้ง 2 สปีชีส์นี้มีโครงสร้างและรูปร่างคล้ายคลึงกันมาก วิธีย้อมสี acid phosphatase นั้น แม้ว่าจะได้รับการยืนยันว่า สามารถบอกความแตกต่างได้ดีเนื่องจาก *B. pahangi* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ตัวนี้สูงกว่า *B. malayi* แต่เนื่องจากการย้อมสี acid phosphatase นั้นทำได้ยาก โดยในการย้อมแต่ละครั้งมีน้อยครั้งที่จะประสบความสำเร็จ ดังนั้นการย้อมสี acid phosphataseจึงไม่ใช่วิธีการที่สะดวกในการแยกความแตกต่างระหว่างพยาธิทั้งสองชนิด ทางออกอีกทางหนึ่งที่เป็นไปได้คือการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์เช่น เทคนิค PCR เข้าช่วย เนื่องจากการทำ PCR นั้นสามารถให้ผลที่ชัดเจนว่าเป็นพยาธิเท้าช้างชนิดใด

ในการทดลองนี้ใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนจำนวน 4 ยีน คือ *Hhal* repeat (Bm1/Bm2) ซึ่งยีนตัวนี้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพยาธิ filaria ชนิดอื่นๆ กับ *Brugia* spp. ได้ การใช้ *Hhal* repeat สามารถยืนยันการติดเชื้อเท้าช้างชนิด *Brugia* spp. ได้

ยีนตัวที่ 2 ที่ใช้ คือ small subunit rDNA (Bmsr/R และ Bmsr/F) ของพยาธิ *B. malayi* โดยปกติแล้ว primers ที่ใช้จะจับกับ DNA ของ *B. malayi* แต่ในการทดลองนี้พบว่าสามารถจับกับพยาธิในกลุ่ม filaria ได้ทุกชนิด ดังนั้นน่าจะเป็นไปได้ว่าพยาธิในกลุ่ม filaria เหล่านี้มีบรรพบุรุษร่วมกัน จึงมียีน small subunit ใกล้เคียงกัน และเมื่อทำการตรวจสอบด้วย PCR-RAPD โดยใช้ universal primers B70-79 ไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากไม่เกิดการจับกันระหว่าง primers และชิ้นส่วน DNA และผลจากการหาลำดับเบสโดยใช้ PCR product

ไม่สามารถอ่านค่าได้อย่างชัดเจน ทำให้ไม่สามารถสรุปความแตกต่างระหว่างพยาธิ filaria โดยใช้ยีน small subunit rDNA ได้

ยีน Trans-Spliced Leader Exon1 (SLX1/SLX2) เป็นยีนที่น่าสนใจในการตรวจสอบการติดพยาธิเท้าช้างในแมว เนื่องจากยีนตัวนี้สามารถบอกความแตกต่างของพยาธิ filaria แต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน และยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *B. malayi* และ *B. pahangi* ได้ดีอีกด้วย นอกจากนี้จากการส่ง PCR product ของแมวอุ่นและเจ้าของที่ติดเชื้อพยาธิเท้าช้างไปหาลำดับเบส พบว่ามีความใกล้เคียงกันสูงมากและเป็นไปได้ว่าจะเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน

ยีนตัวสุดท้ายที่ใช้ คือ ยีน sheath protein 2 (Shp2R/Shp2F) ในการทำ PCR-RFLP โดยตัดด้วย *HindIII* และ *HaeIII* สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง *B. malayi* และ *B. pahangi* ได้ จึงเป็นอีกยีนหนึ่งที่น่าจะนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาใช้ต่อไป นอกจากนี้ PCR-RFLP ของยีน Sheath protien2 ยังช่วยยืนยันว่า *Brugia* spp. ที่พบในแมวจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีซึ่งเป็นแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างที่สำคัญแหล่งหนึ่งในประเทศไทยรองจากจังหวัดนราธิวาสไม่ใช่ *Brugia pahangi* อย่างแน่นอน และควรจะเป็น *B. malayi* เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ตัดชิ้นส่วน DNA จาก PCR product ของแมวที่ประมาณ 750 คู่เบสซึ่งตรงกับตำแหน่งของ *B. malayi*

เมื่อพิจารณาผลที่ได้ทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลที่ได้จากการทำ PCR ของยีน Trans-spliced Leader Exon1 ของ *Brugia* spp. ในคนและแมวอุ่นซึ่งอาศัยอยู่ในครอบครัวเดียวกันพบว่ามีความใกล้เคียงกันถึง 90% ดังนั้น *Brugia* spp. ที่พบในแมวอุ่นนี้น่าจะเป็น *Brugia malayi* เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการทำ PCR ของยีน Trans-spliced Leader Exon1 ของแมวตัวอื่นๆนำไปสู่ข้อสรุปว่า น่าจะเป็นไปได้ที่พบพยาธิ filaria ชนิด *Brugia malayi* ในแมว ซึ่งสนับสนุนสมมติฐานว่า แมวเป็นสัตว์ที่เป็นแหล่งสะสมของพยาธิโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi*

ข้อเสนอแนะจากการทดลอง

จากการทดลองนี้พบปัญหาในเรื่องของ DNA ซึ่งมีความไวสูงมาก เมื่อเปลี่ยน reagent mixture ที่ใช้เพียงเล็กน้อยจะทำให้เกิดปัญหาในการเพิ่มขยายจำนวน DNA ทันที ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องควบคุมสภาพของ reagent mixture ที่ใช้ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมตลอดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Blexter, M. L., Raghavan, N., Ghosh, I., Guiliano, D., Lu, W., illiams, S.A., Slatko, B. and scott, A.L. 1996. Genes expressed in *Brugia malayi* infective third stage larvae. **Molec. Biochem. Parasitol.** 77:77-93.
2. Cox-Singh, J., Pomrehn, A.S., Rahman, H. A. Zakaria, R., Miller. A.O. and Singh, B. 1999. Simple blood-spot sampling with nested polymerase chain reaction for epidemiology on Brugia malayi. **Int. J. Parasitol.** 29: 717-721.
3. Harasawa, R., Maeda,K., Nogami, S, Nakagaki, K., Yoshida, M. Kataoka,Y., kobayashi, H., Katae, H. and Hayashi, Y. 1997. Characteristics of nucleitide sequences flanking the trans-spliced leader SL1 exon in *Dirofilaria immitis, Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. **J. Vet. Med.** Sci. 59:1149-1152.
4. Lizotte,M.R., Supali, T., Partono, F. and Williams, S.A. 1994. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. **Am J. Trop. Med. Hyg.**51, 314-321.
5. McReynolds, L., Desimone, S. M. and Williams, S. A. 1986. Cloning and comparison of repeated DNA sequence from the human filarial parasite *Brugia malayi* and the animal parasite *Brugia pahangi*. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA.** 83:797-801.
6. Singh, B. 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **Int. J. Parasitol.** 27:1135-1145.
7. Xie, H., Bain, O. and Williamson, S. A. 1994. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. **Parasite** 1:141-151.

ประวัติส่วนตัว
รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ
สังกัด ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....

1. ชื่อ รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ

2. ตำแหน่ง

2.1 ตำแหน่งก่อนหน้า

- อาจารย์ (1 พ.ค.2529 -4 ก.ค. 2538)
- ผู้ช่วยศาสตราจารย์ (4 กค. 2538 - 12 เม.ย. 2542)

2.2 **ตำแหน่งปัจจุบัน**

- รองศาสตราจารย์ (12 เม.ย.2542 - ปัจจุบัน)
- หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี (2538 - ปัจจุบัน)

3. วัน เดือน ปี 23 สิงหาคม 2504

4. ที่อยู่ 468 หมู่ 8 ถนนรามอินทรา แขวงท่าแร้ง เขตบางเขน กรุงเทพฯ 10230

5. การศึกษาระดับอุดมศึกษา (เรียงจากคุณวุฒิสูงตามลำดับ)

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
Ph.D. (Biochemistry)	2536	University of New South Wales
วท.ม.(ชีวเคมี)	2528	มหาวิทยาลัยมหิดล
วท.บ.(เคมี)	2526	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ประสบการณ์งานวิจัยในอดีต

6.1 การวิจัยเกี่ยวกับการแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ Dihydrofolate reductase - Thymidylate synthetase ในเชื้อ *Babesia bovis* และ *Theileria* sp. โดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี 2540 และจากสภาวิจัยแห่งชาติประจำปี 2539-2541 รวมระยะเวลา 2 ปี

6.2 การวิจัยเกี่ยวกับการตรวจหาเชื้อพยาธิในเลือดโคด้วยวิธี Multiplex polymerase chain reaction (ปี พ.ศ. 2538-39) ระยะเวลา 1 ปี

6.3 การวิจัยเกี่ยวกับการแยกชนิดของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ด้วยวิธี RAPD-PCR (พ.ศ. 2538-2539) ระยะเวลา 1 ปี

6.4 การวิจัยจำแนกชนิดของเชื้อ *Theileria* ที่พบในประเทศไทยโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนที่ควบคุมการสร้าง small subunit ribosomal RNA (พ.ศ. 2539-2540) ระยะเวลา 1 ปี

6.5 การวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ที่เป็นสาเหตุ ให้เกิดโรคเท้าช้างในคนไทยและแรงงานพม่า ยุงพาหะและสัตว์ที่เป็นรังโรค ร่วมกับกองเท้าช้าง กระทรวงสาธารณสุขและ ฝ่ายปรสิต สถาบันสุขภาพสัตว์ แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ (พ.ศ. 2540)

6.6 การวิจัยเกี่ยวกับโรคพยาธิในปอด (พ.ศ. 2541)

6.7 การวิจัยเกี่ยวกับ DNA Fingerprinting ของโคนม ร่วมกับองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (พ.ศ. 2541)

6.8 การวิจัยเกี่ยวกับโรคพยาธิที่ติดต่อจากสัตว์สู่คน, พาหะและรังโรค ของชุมชนในแถบลุ่มแม่น้ำโขงและชายแดน (พ.ศ. 2541)

7. ประสบการณ์งานวิจัยในปัจจุบัน

7.1 การวิจัยทางอณูชีววิทยาของพยาธิเท้าช้าง

7.2 การวิจัยทางอณูชีววิทยาของยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ทนความร้อน

Presentations:

1. Chansiri, K., Charoennan, P. and Boonsaeng, V. 1984, Comparative studies of cervical mucal protiens during menstrual cycle, 10th Conference of Science and Technology of Thailand, Chiangmai, Thailand, B-11.
2. Chansiri, K., Charoennan, P. and Boonsaeng, V. 1995, Effect of Human seminal protease on human cervical mucal proteins, 11th Conference of Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, B-18.
3. Chansiri, K., Vilasineekul, P., Wilairat, P., Boonsaeng, V. and Panyim, S. 1986. A simple technique for detection of *Plasmodium falciparum* DNA. 5th Genetic Gengineering Conference, Shogkhla, Thailand.
4. Chansiri, K., Vilasineekul, P., Wilairat, P., Boonsaeng, V. and Panyim, S. 1986.The use of DNA probe for the detection of *Plasmodium falciparum.*2nd Malaria Research Conference, Pattaya, Thailand.
5. Chansiri, K., Boonsaeng, V., Wilairat, P. and Panyim, S. 1988. Simple detection of *Plasmodium falciparum* using a cloned DNA probe. 7th FAOB Congress, malaysia.
6. Chansiri, K., 1988, DNA-DNA Hybridization. In. DNA Probe for diagnosis and detection of disease carrier. (Ed: Tungpradubkul, S), Center for Molecular genetic-Genetic Engineering.
7. Chansiri, K, Dawes, I. W., Sullivan, W. O'J. and Bagnara, A. S. 1992. Isolation of the gene coding for carbamoyl phosphate synthetase from *Babesia bovis* using the technique of polymerase chain reaction Parasitology Conference, Lorne, Victoria, Australia.
8. Chansiri, K, Sullivan, W. O'J. and Bagnara, A. S. 1994. Structural organization of the gene encoding carbamoyl phosphate synthetase II (CPSII) from *Babesia bovis.* 11th FAOBMB Sympasium, Bangkok, Thailand.
9. Chansiri, K, Sullivan, W. O'J. and Bagnara, A. S. 1994. Structural organization of the gene encoding carbamoyl phosphate synthetase II (CPSII) from *Babesia bovis.* In: Advance in Biochemistry and Molecular Biology, Proceeding of the 11th FAOBMB Symposium (IUBMB Symposium no 239) on Biopolymers and Bioproducts, 15-18 november 1994, Bangkok, Thailand.
10. Chansiri, K. Petchpoo, W., Uthaisang W., Onuma, M. and Sarataphan, N. 1996, Studies of gene encoding for thymidylate synthetase in *Theileria* found in Thailand. 22nd Congress in Science and Technology of Thailand, 16-18 October, p.404.

11. Sarataphan, N., Petchpoo, W., Uthaisang, W., Onuma, M. and Chansiri, K. 1996. Identification of bovine *Theileria* parasite found in Thailand be PCR amplification of the gene encoding for the surface protein. 22nd Congress on Science and Technology of Thailand, 16-18 October, p.405.

12. Chansiri, K., Tananyutthawongese, C., Seangsombat, K., Sukhumsirichart, W., Uthaisang, W. and Sarataphan, N. 1998. Detection of bovine hemoparasites DNAs using multiplex polymerase chain reaction. VM012PRE (CD-ROM). Annual Conference of Kasetsart University 36th, 3-5 Feb.

13. Sarataphan, N., Nilwarangkoon, S., Tananyutthawongese, C., Mungmuang, T.,Onuma, M. and Chansiri, K. 1998. Allelic analysis of immunodominant major piroplasm surface protein genes of *Theileria* parasite in Thai cattle. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. B54.

14. Sarataphan, N., Kerdmanee, C., Chansiri, K., Tan-ariya, P., Nokdhes, C. and Chansiri, G.1998. The efficacy of medicinal plants as anti-parasitic drugs against *Theielria* sp. in in vitro culture of infected bovine erythrocytes. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. B 23.

15. Chansiri, K., Nilwarangkoon, S., Sarataphan, N., Bhantana, S. and Thanomsap, B.1998. Application of PCR for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* in Myanmar workers and mosquitoes. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. C23.

16. Thanomsap, B., Sarataphan, N., Bhantana, S. and Chansiri, K. 1998. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP techniques. 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 19-21 October, p. C22.

17. Chansiri, K., , Bhantana, S., Thanomsap and B. Sarataphan, N.1999. PCR-RFLP Detection of Brugia malayi in feline blood specimend and mosquitoes. 17th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAVVP). Copenhegen, Denmark, 15-19 August, 1999.

18. Tananyutthawongese, C., Sukhumsirichart, W., Phantana, S., Sarataphan, N. and Chansiri, K. Discrimination of filarial *Brugia* sp. based on the comparison of *Hha*I repeat, SL1 exon and GP29 PCR-RFLP profile. Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologist 14th Symposium (FAOBMB) Dunedin, New Zealand, November 27- December 3, 1999.

19. Phantana, S., Chansiri, K and Sarataphan, N. Microfilarial effect of ivermectin on *Brugia malayi* in cats. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.

20. Sarataphan, N., Phantana, S., and Chansiri, K . Susceptibility of *Mansonia indiana* (Diptera: Culicidae) to nocturnally subperiodic *Brugia malayi* in Thailand. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.

21. Kovit Nittichai, Tananyutthawongese, C., Pojana-aree, K., Sarataphan, N. and Chansiri, K. DNA fingerprinting for parternity test in cattle. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.

22. Sukhumsirichart, W., Tananyutthawongese, C., Phantana, S., Sarataphan, N. and Chansiri, K. Discrimination of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* using PCR-RFLP. Annual Conference of Kasetsart University 38th, 3-5 Feb 2000.

23. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Sarataphan, N. and Phantana, S. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. Annual Conference of Ministry of Public Health, August 23-25, 2000. Sonkhla.

24. Sarataphan, N., Phantana, S. and Chansiri, K. Infection of Mansonia indiana (Diptera: Culicidae) with nocternally subperiodic *Brugia malayi* in Thailand. Annual Conference of Ministry of Public Health. Annual Conference of Ministry of Public Health, August 23-25, 2000. Sonkhla.

25. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Sarataphan, N. and Phantana, S. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. Annual Conference of Ministry of Public Health, August 23-25, 2000. September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.

26. Thanomsup, B., Chansiri, K., Sarataphan, N and Phantana, S. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.

27. Phantana, S., Chansiri, K. and Sarataphan, N. Microfilaricidal effect of ivermectin on *Brugia malayi* in cats. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.

28. Sarataphan, N., Phantana, S. and Chansiri, K. Infection of Mansonia indiana (Diptera: Culicidae) with nocternally subperiodic *Brugia malayi* in Thailand.

Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.

29. Sukhumsirichart, W., Tananyuthawongese, C., Phantana, S. Sarataphan, N. and Chansiri, K. Differentiation of microfilariae of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* using PCR-RFLP. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.

30. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Sarataphan, N. and Phantana, S. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples using multiplex PCR. Annual Conference of Ministry of Public Health, September 6-8, 2000. Ambassador Jomtein Pattaya, Chonburi.

31. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W. and Sarataphan, N. Molecular phylogenetic studies of *Theileria* type Thung Song based on thymidylate synthetase gene. Symposium on Tick and Tick-borne diseases, September 12-16, 2000. Shanghi, People Republic of China.

32. Phantana, S., Tejangkura, T., Khuchareontaworn, S., Chansiri, K. and Sarataphan, N. Heart failure in cat due to infection of *Dirifilaria immitis*. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October, p. 319.

33. Tejangkura, T., Sukhumsirichart, W., Phantana, S., Sarataphan, N. and Chansiri, K. Determination of human *Brugia malayi* in cat reservoir. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October, p.320.

34. Pakpitchareon, A., Ketudat, P., Khawsak, P. and Chansiri. K. Molecular phylogenetic studies of lung flukes using internal transcriped spacer 2 sequence. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October, p. 446.

35. Sarataphan, N., Khuchareontaworn, S., Chompoochan, T. and Chansiri, K. DNA fingerprints of *Trypanosoma evansi* isolates of domestic animals. 26th Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October, p. 471.

36. Chansiri, K., Potivejkul, K, Santiwatanakul. S., Matsui, K. and Kajiwara, T. Survey of thermotolerant microorganisms for the production of lipases and related enzymes from hot spring water resources in Thailand. 2nd Joint Seminar on Microbial Resources and Their Applications. Organized by Kasetsart University and Yamaguchi University under the support of JSPS-NRCT. November 22-24, 2000. p.135.

37. Chansiri, K, Phantana, S., Sarataphan, N. and Sukhumsirichart, W. Multiplex PCR detection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* infected blood samples. 1St Asian Conference on Medical Sciences, University Sains Malysia, Kelantan, Malaysia, 18-21 May 2001.

Publications

1. Boonsaeng, V., Chansiri, K., Vilasineekul, P., Wilairat, P. and Panyim, S.1989. Detection of *Plasmodium falciparum* using a cloned DNA probe, a simple proeedure suitable for field application. **J. Trop. Med. Pub. Heath**. 20, 519-522.
2. Chansiri, K. 1994. The biochemical markers for ovulation and infertility in women. **Srinakharinwirot Medical Journal**. 2, 49-56.
3. Chansiri, K. 1994. The effect of seminal plasma proteases to cervical mucal proteins. **Srinakharinwirot Medical Journal**. 2, 57-61.
4. Chansiri, K. 1994. The infrastructure of disulfides bonds cervical mucus. **Srinakharinwirot Medical Journal**. 2, 1-5.
5. Chansiri, K. and Bagnara, A. S. 1995. The structural gene for carbamoyl phosphate synthetase from the protozoan parasite *Babesia bovis*. **Molec. Biochem. Parasitol**. 74: 239-243.
6. Bagnara, A. S. and Chansiri, K. 1996. Sequence upstream and downstream from the glutamine-dependent carbamoyl phoshpate synthetase-encoding gene from the protozoan *Babesia bovis*. **Gene**. 172(1): 173-4.
7. Sarataphan, N., Uthaisang, W., Petchpoo, W., Watanapokhasin, Y., Tananyutthawongese, Onuma, M. and Chansiri, K. 1997. Antigenic differences between Thai *Theileria* species and other benign *Theileria* species based on gene encoding immunodominant piroplasm surface proteins. **J. Protozool. Res.** 7: 36-42.
8. Watanapokasin, Y., Tananyutthawongese, C., Uthaisang, W., Chansiri, K., Boonmatit,C., and Sarataphan, N. 1998. Intra-species differentiation of *Trypanosoma evansi* with arbitrary primers -polymerase chain reaction. **Vet. Parasitol.** 78: 259-264.

9. Chansiri, K., Kawazu, S., Kamio, T., Fujisaki, K., Panchadcharam, C.,Watanopokasin, Y., Uthaisang, W., Tananyuttawongese, C. and Sarataphan, N.1998. Inter-species differentiation of benign *Theilerias* by genomic fingerprinting with arbitrary primers. **Vet. Parasitol.** 79:143-149.

10. Kakuda, T., Shiki, M., Kubota, S., Sugimoto, C., Brown. W. C., Chansiri, K., Sarataphan, N. and Onuma, M. 1998. Molecular characterization and phylogeny of benign *Theileria* species isolated from cattle in Thailand, China and USA based on the major piroplasm surface protein and small subunit ribosomal RNA genes. **Int. J. Parasitol**. 28: 1261-9.

11. Sarataphan, N. and Chansiri, K. 1998. The biological basis of bovine Theileriosis. **J. Trop. Med. Parasitol.** 21: 1-10.

12. Chansiri, K., Kawazu, S., Kamio,T., Terada, Y., Fujisaki, K., Philippe, H. and Sarataphan, N 1999. Molecular Phylogenetic studies on *Theileria* Parasites based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Vet. Parasitol.** 83: 99-105.

13. Sarataphan, N., Kerdmanee, C., Chansiri, K., Tan-ariya, P., Nokdhes, C. and Chansiri, G. 1999.The efficacy of medicinal plants as anti-parasitic drugs agianst *Theielria* sp. in *in vitro* culture of infected bovine erythrocytes. **Silapakorn Pharmacy Journal.** 18 (1): 39-50.

14. Sarataphan, N., Nilwarangkoon, S., Tanayutthawongese, C., Onuma, M. and Chansiri, K. 1999. Genetic diversity of major piroplasm surface protein genes and their allelic variant of *Theileria* parasites in Thai cattle. **J. Vet. Med. Sci.** 61: 991-994.

15. Tananytthawongese, C., Saengsombat, K., Sukhumsirichart, W., Uthaisang, W., Sarataphan, N. and Chansiri, K. 1999. Detection of bovine hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. **Science Asia** 25:85-90.

16. Lertlit, P., Choopayak, C., Udomsangpetch, R., Chansiri, K. and Mungkornkarn, C. 1999. The mitichondrial cytochrome oxidase subunit III gene and protein sequence analysis in chloroquin-resistant Plasmodium falciparum. **J. Biochem. Molec. Biol. Biophy.** 3: 161-170.

17. Thanomsab, B., Chansiri, K., Sarataphan, N. and Phantana, S. 2000. Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. **Molec. Cell. Probes** 14: 41-46.

18. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W., Tananyutthawongese, C., Sarataphan, N. and Phantana, S. 2001. Multiplex PCR detection of *Wuchereria bancrofti* and *Plasmodium falciparum* in crude blood specimens. **Molec. Cell. Probes** 15:201-207.

19. Sarataphan, N., Phantana, S., and Chansiri, K. 2002. Susceptibility of *Mansonia indiana* (Diptera: *Culicidae*) to nocturnally subperiodic *Brugia malayi*. **Journal of Medical Entomology** (In press).

20. Chansiri, K., Sukhumsirichart, W. and Sarataphan, N. 2002. Molecular phylogenetic studies of *Theileria* sp. (Thung Song) based on thymidylate synthetase gene. **Parasitology Research** (In press)