

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การสำรวจโรคที่เกิดจากเชื้อพยาธิในเลือดคนและสัตว์ใน
พื้นที่ อำเภอปากพลี จังหวัดนครนายก

10 ส.ค. 2542



ได้รับทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยและพัฒนาโครงการชนบทศึกษา
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

124031

แบบฟอร์มบทคัดย่อ

ส่วนที่ 1

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ การสำรวจโรคที่เกิดจากพยาธิในเลือดคนและสัตว์ในพื้นที่ อำเภอปากพลี จังหวัดนครนายก

ชื่อผู้วิจัย ผศ. ดร. โกศุม จันทรศิริ

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โทร 2602950 ต่อ 4605

โทรสาร 2600125

E-mail kosum@psm.swu.ac.th

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท โครงการชนบทศึกษา

จำนวนเงิน 40,000 บาท ระยะเวลาการทำวิจัย 10 เดือน

ประจำปี 2541-42 ตั้งแต่ สิงหาคม 2541-พฤษภาคม 2542

ส่วนที่ 2

บทคัดย่อ

ภาษาไทย จากผลการทดลองไม่พบการระบาดของเชื้อโรคเท้าช้างชนิด *W. bancrofti* และ *B. malayi* ในผู้ที่เข้ารับการตรวจในบริเวณพื้นที่อำเภอปากพลี จังหวัดนครนายก ซึ่งผลของ PCR และ การย้อมสี Giemsa - stained แสดงผลที่สอดคล้องกัน โดยมีการเทียบผลของ PCR กับผู้ป่วยแรงงานพม่าที่ติดเชื้อ *W. bancrofti* จาก อ. แม่สอด จ. ตาก และ ผู้ป่วยคนไทยที่ติดเชื้อ *B. malayi* จาก จ. นราธิวาส อย่างไรก็ตามหากจะสรุปผลให้แน่ชัดนั้นต้องทำการสำรวจเชือดังกล่าวในแรงงานพม่าของพื้นที่แถบนี้ ผลการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นนี้น่าจะเป็นข้อมูลที่น่าสนใจสำหรับการเฝ้าระวังไม่ให้โรคนี้แพร่ระบาดในกลุ่มคนไทย

นอกจากนี้พบว่าเชื้อพยาธิในเลือดที่พบบ่อยในไก่ได้แก่ พลาสโมเดียม ซึ่งไม่สามารถระบุปีชีส์ได้ในขณะนี้ อย่างไรก็ตามสันนิษฐานว่าเชือดังกล่าวไม่สามารถถ่ายทอดวงจรชีวิตไปสู่คนได้ เนื่องจากไม่เคยมีรายงานว่ามีการแพร่ระบาดของเชื้อพลาสโมเดียมชนิดที่พบในไก่ไปสู่คน อย่างไรก็ตามเชื้อพลาสโมเดียมที่พบในไก่นี้เป็นสาเหตุหนึ่ง

ที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ การควบคุมโดยใช้ยาหรือการพัฒนา
วัคซีนเพื่อป้องกันโรคนี้จึงเป็นแนวทางการศึกษาหนึ่งที่น่าสนใจ

การวิจัยนี้เป็นโครงการนำร่องที่จะไปสู่การพัฒนาชุดตรวจเชื้อพยาธิในเลือดด้วย
วิธี PCR ซึ่งจะช่วยวินิจฉัยโรคได้รวดเร็วและแม่นยำ ทำให้มีการรักษาได้อย่างทันท่วงที

ภาษาอังกฤษ The survey of Thai patients at Amphur Pakplee,
Nakhon nayok province using both PCR techniques and conventional
microscopic Giemsa-stained observation revealed that none of the patients
were infected with neither *W. bancrofti* nor *B. malayi*. The results were
compared to those of *W. bancrofti* infected blood specimens obtained from
Burmese workers at Amphur Maesod, Tak province. Similarly, the *B. malayi*
infected blood specimens obtained from Thai patients at Naratiwat province
were also used as the positive control of the experiments. However, we have
not examined the filaria infection in Burmese workers around Pakplee area.

We also have investigated the infection of *Plasmodium* spp. in
chicken by using the traditional microscopic Giemsa-stained technique.
However, we could not classify the specie of the parasite due to the lack of
time and budget. In addition, it seems that chicken is the definite host of this
Plasmodium parasite. The studies of drug treatment and development of
vaccine against *Plasmodium* spp. are important for eradication and protection
of this disease in the future.

In conclusion, this project is the preliminary study for establishment of
the detection kits of blood parasites in human and animals. The use of PCR
technique in this study will be benefit for the improvement of specificity,
sensitivity, reliability and rapidity of diagnostic kit to detect the parasites
infection.

แบบสรุปผลการวิจัย

ชื่อโครงการ	การสำรวจโรคที่เกิดจากพยาธิในเลือดคนและสัตว์ในพื้นที่ อำเภอปากพลี จังหวัดนครนายก
ผู้วิจัย	ผศ. ดร. โกศุม จันทรศิริ
ที่ทำงาน	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โทร 2602950 ต่อ 4605 โทรสาร 2600125 E-mail : kosum@psm.swu.ac.th
ผู้ร่วมวิจัย	นายสัตวแพทย์นพพร ศราภพันธุ์ ฝ่ายผลิต สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน โทร 5798908-14
ผู้ร่วมวิจัย	นายศิริชัย พรรณธนะ กองโรคเท้าช้าง กระทรวงสาธารณสุข ถ. ติวานนท์ อ. เมือง จ. นนทบุรี โทร 5903176

ระยะเวลาการทำวิจัย 10 เดือน

ความเป็นมา/ปัญหาในการวิจัย

โรคพยาธิในเลือดที่พบในคนและสัตว์มักจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพในเลือดอันเป็นเหตุให้เกิดการเสียสุขภาพ โรคพยาธิในเลือดที่กำลังจะเป็นปัญหาสำหรับคนไทยในอนาคตได้แก่ โรคเท้าช้าง ซึ่งถูกแพร่กระจายโดยแรงงานข้ามชาติ การตรวจหาพยาธิในเลือดชนิดเท้าช้างสามารถกระทำได้โดยการส่องดูเชื้อที่ผ่านการย้อมสี Giemsa-stained ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง วิธีนี้เป็นวิธีที่แพร่หลายและใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ได้ถูกพัฒนาให้มีความไวและความจำเพาะมากขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาและตรวจหาพยาธิในเลือดชนิดเท้าช้างที่เรียกว่า

Polymerase chain reaction หรือ PCR ซึ่งเป็นวิธีที่แพร่หลายเฉพาะในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัย โรคติดเชื้อมีพบในสัตว์เศรษฐกิจโดยเฉพาะสัตว์ปีกเช่น ไก่ ที่มักจะนิยมเลี้ยงในหมู่เกษตรกรในพื้นที่ที่ศึกษา ได้แก่ เชื้อในกลุ่มของพลาสโมเดียม เป็นต้น

คณะผู้วิจัยจึงให้ความสนใจที่จะศึกษาสำรวจข้อมูลเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางนำร่องในการวิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อพยาธิในเลือดโดยใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการดำเนินงานวางแผนโครงการวิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อพยาธิในเลือดโดยใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐานในโอกาสต่อไป
2. เพื่อเป็นข้อมูลให้เกิดการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* และการย่อยด้วยเอ็นไซม์โปรตีนเค
2. การสกัดดีเอ็นเอ
3. การเก็บเลือดจากภาคสนาม
4. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR
5. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR

ผลการทดลอง/ข้อค้นพบ

1. จากการตรวจสอบเลือดผู้ป่วยคนไทยในพื้นที่บริเวณ อำเภอปากพลี ไม่พบการติดเชื้อเท้าช้างทั้งชนิดชนิด *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi*
2. พบว่ามีการติดเชื้อมีพยาธิในเลือดไก่ชนิด *Plasmodium* ในระดับต่ำ-ปานกลาง แต่ไม่สามารถระบุชนิดได้
3. วิธีการ PCR ตรวจหาเชื้อเท้าช้างและข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการขอโครงการวิจัยต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อพยาธิในเลือดคนและสัตว์โดยใช้เทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	2
วัตถุประสงค์	6
วิธีการทดลอง	7
• การเก็บเชื้อ <i>W. bancrofti</i> และ <i>B. malayi</i> และการย่อยด้วย เอ็นไซม์โปรตีนเอส เค	7
• การสกัดดีเอ็นเอ	7
• การเก็บเลือดจากภาคสนาม	8
• การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อ เท้าช้างด้วยวิธี PCR	9
• การทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้าง ด้วยวิธี PCR	10
ผลการทดลอง	11
• ความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR	11
• ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR	11
• การตรวจหาเชื้อเท้าช้างจากเลือดที่ได้จากภาคสนาม	11
• การตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมจากเลือดไก่ที่ได้จากภาคสนาม	12
วิจารณ์	15
สรุป	16
คำกล่าวขอบคุณ	16
เอกสารอ้างอิง	16

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1. วงจรชีวิตของ <i>Wucheria bancrofti</i> และ <i>Brugia malayi</i>	5
รูปที่ 2 เปรียบเทียบ microfilaria ของ A. <i>Wucheria bancrofti</i> และ B. <i>Brugia malayi</i>	6
รูปที่ 3 แสดงผล 1.5 % Agarose gel electrophoresis ของ PCR products ขนาด 400 และ 450 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ Wf-F และ Wf-2 สำหรับการตรวจหาเชื้อ <i>W. bancrofti</i>	12
รูปที่ 4 แสดงผล 3.0 % Agarose gel electrophoresis ของ PCR products ขนาด 280 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ Bm-1 และ Bm-2 สำหรับการตรวจหาเชื้อ <i>B. malayi</i>	13
รูปที่ 5 แสดงภาพย้อมสี Giemsa-stained ของเชื้อ <i>Plasmodium</i> <i>gallinaceum</i> ที่พบในเม็ดเลือดแดงของไก่	14

บทนำ

อำเภอปากพลีเป็นอำเภอหนึ่งใน 4 อำเภอ ของจังหวัดนครนายก ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะอยู่ในพื้นที่ ตำบลโคกกรวด ตำบลหินลาด ตำบลหนองแสง และตำบลปากพลี ทั้งนี้เพราะมีปัจจัยหลายอย่างที่เป็นส่วนส่งเสริมการแพร่ระบาดของโรค เช่น ภูมิประเทศที่อุดมสมบูรณ์ ดัดเขตนอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ และมีแหล่งน้ำจากเขาใหญ่คือคลองยาง ซึ่งเหมาะแก่การดำรงชีวิตและเพาะพันธุ์ของตัวกลางนำโรคต่างๆ โดยเฉพาะ ยุง ซึ่งเป็นพาหะสำคัญของโรคพยาธิในเลือด

โรคพยาธิในเลือดที่พบในคนมักจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพในเลือดอันเป็นเหตุให้เกิดการเสียสุขภาพของผู้ป่วย โรคพยาธิในเลือดที่กำลังจะเป็นปัญหาสำหรับคนไทยในอนาคตได้แก่ โรคเท้าช้าง ซึ่งถูกแพร่กระจายโดยแรงงานข้ามชาติ โดยทั่วไปแล้วเชื้อโรคเท้าช้างซึ่งมียุงเป็นพาหะมักจะพบมากตามบริเวณชายแดนไทย-พม่า ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Wuchereria bancrofti* และ บริเวณชายแดนไทย-มาเลเซีย ได้แก่จังหวัดนราธิวาส ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Brugia malayi* อย่างไรก็ตามในบริเวณพื้นที่จังหวัดนครนายกซึ่งปัจจุบันมีการก่อสร้างเป็นจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นการสร้างถนน สถานที่ราชการ อาคารพาณิชย์ และบ้านพักอาศัย เนื่องจากเป็นบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับสถานที่ท่องเที่ยวอันมีชื่อ เช่นเขาใหญ่ และเป็นทางผ่านไปสู่จังหวัดในเขตภาคตะวันออก การนำเข้าแรงงานข้ามชาติ สิ่งต่าง ๆ เหล่านี้อาจมีผลกระทบต่อสุขภาพของคนที่ย้ายอยู่เดิม คณะผู้วิจัยจึงให้ความสนใจที่จะศึกษาสำรวจข้อมูลเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางนำร่องในการวิจัยศึกษาขั้นต่อไป อันจะเป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของประชาชนในพื้นที่ จังหวัดนครนายก โดยคณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะสำรวจข้อมูลผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อโรคเท้าช้างในพื้นที่ อ.ปากพลี และบริเวณใกล้เคียงใน จ.นครนายก

การตรวจหาพยาธิในเลือดชนิดเท้าช้างสามารถกระทำได้โดยการส่องดูเชื้อที่ผ่านการย้อมสี Giemsa-stained ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง วิธีนี้เป็นวิธีที่แพร่หลายและใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ได้ถูกพัฒนาให้มีความไวและความจำเพาะมากขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาและตรวจหาพยาธิในเลือดชนิดเท้าช้างที่เรียกว่า Polymerase chain reaction หรือ PCR ซึ่งเป็นวิธีที่แพร่หลายเฉพาะในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัย วิธี PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อต่างๆอย่างแพร่หลาย เช่น มาเลเรีย (Tirasophon et al, 1991; Wooden, et al, 1992) เท้าช้าง (Williams,

et al 1996; Singh, et al 1996; Singh, et al, 1999) และ ปรสิตอื่นๆ (Singh, et al 1997) เป็นต้น

Wuchereria bancrofti หรือ Bancroft's filarial worm ทำให้เกิด Bancroft's filariasis และ *Brugia malayi* หรือ Malayan filarial worm ทำให้เกิด Malayan filariasis

Wuchereria bancrofti พบมากในเขตร้อนและเขตเขตร้อน ได้แก่อินเดีย พม่า มาเลเซีย อินโดจีน จีนตอนใต้ ญี่ปุ่น เกาหลี หมู่เกาะแปซิฟิก แอฟริกาส่วนกลางและ ตะวันออก สเปน อเมริกาใต้ และหมู่เกาะอินเดียตะวันตก ประเทศไทย พบ *W. bancrofti*. ที่จังหวัดนราธิวาส ร่วมกับ *Brugia malayi* และที่อำเภอสังขละบุรี จังหวัด กาญจนบุรี แถบชายแดนใกล้พม่า ประเทศไทย พบ *B.malayi* บริเวณฝั่งทะเลด้าน ตะวันออกของภาคใต้ คือ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ปัตตานี และ นราธิวาส

ลักษณะรูปร่าง ซีววิทยา และ วงจรชีวิตเป็นพยาธิตัวกลม สีขาว ปลายทั้งสอง เรียว หัวโตเล็กน้อย

<i>W. bancrofti</i>	<i>B. malayi</i>
ตัวผู้ ขนาด 40x0.1 มิลลิเมตร	22x0.08 มิลลิเมตร
ตัวเมีย ขนาด 80-100x0.2 มิลลิเมตร	38-55x0.16 มิลลิเมตร

ปลายหางของตัวผู้ม้วน 360 องศา ตัวเมียมีรูเปิด vulva ห่างจากหัวประมาณ 5.8 มิลลิเมตร พยาธิตัวแก่อาศัยในระบบน้ำเหลืองของคน คนเป็นโฮสต์เฉพาะ (definitive host) เมื่อตัวผู้ ตัวเมีย ผสมพันธุ์กัน ตัวเมียออกลูกเป็น microfilaria, microfilaria ออกมาระยะแรกอยู่ใน lymphatic system ก่อน ต่อมาจะเข้าไปอยู่ใน กระแสเลือดและออกสู่ peripheral blood การปรากฏตัวของ microfilaria ใน peripheral blood มักเป็นระยะ (periodicity) ส่วนมากมักจะเป็นตอนกลางคืน ประมาณ 22.00-02.00 น. จึงเรียก nocturnal periodicity เวลากลางวันเชื่อว่า microfilaria จะเข้าไปอยู่ในหลอดเลือดเล็กๆ ของปอดและอวัยวะภายในต่าง ๆ *W.bancrofti* ที่พบแถวจังหวัดกาญจนบุรี มี nocturnal subperiodicity คือมี microfilaria ออกมาอยู่ใน peripheral blood มากระหว่าง 18.00-24.00 น. Microfilaria บางชนิดจะอยู่ใน peripheral blood ตลอดเวลาเรียก non-periodicity

Microfilaria มีขนาดประมาณ 244×10 ไมครอน เคลื่อนไหวได้รวดเร็วในกระแสเลือด รูปร่างคล้ายงู มี sheath หุ้ม ข้างในไม่มี digestive organ แต่จะมีเซลล์เรียงตัวกันอยู่เป็น column และมี nuclei ติดสลับตำแหน่งของ nuclei ใน microfilaria ใช้เป็น anatomical land mark ในการแยก species ของ microfilaria ของ *B. malayi* ที่ปลายหาง (tip of tail) มี 2 nuclei, *W. bancrofti* ที่ปลายหางไม่มี nucleus

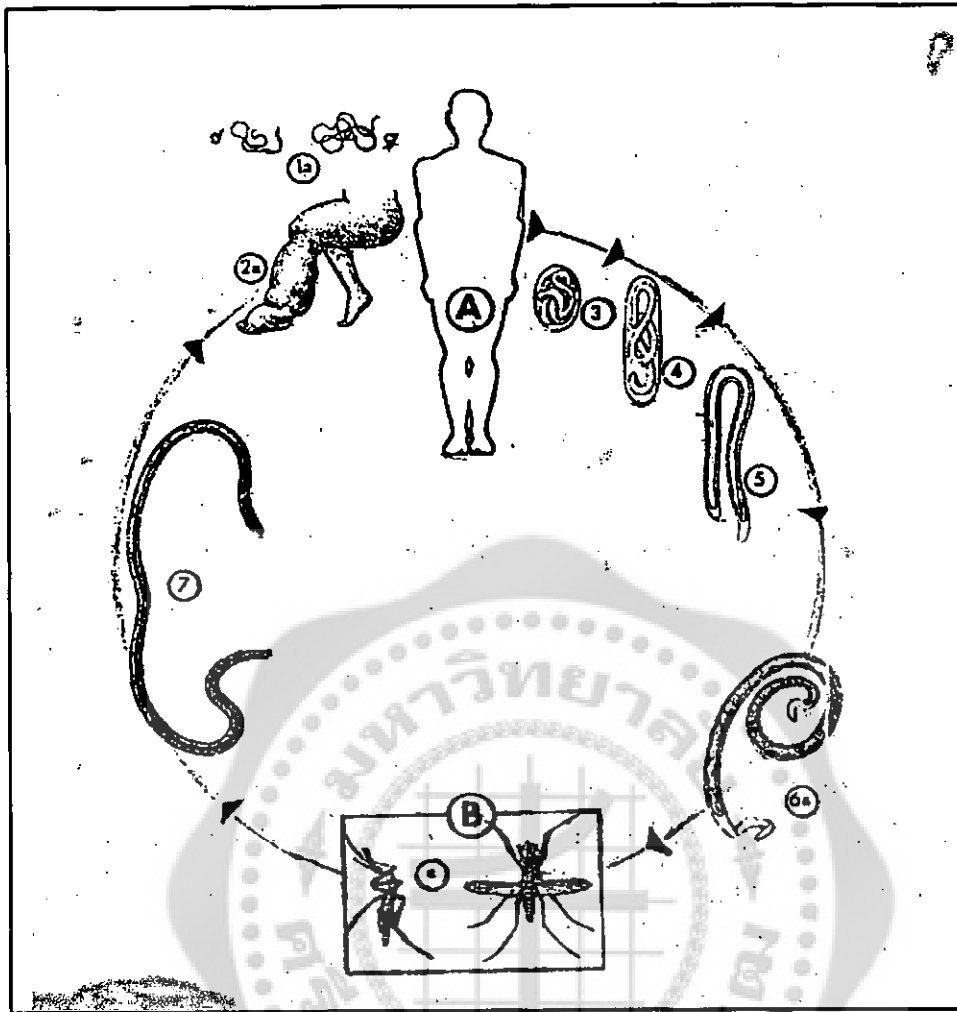
Microfilaria ในคนจะเข้าสู่ยุงเมื่อถูกยุงกัด ยุงนั้นจะต้องเป็นพาหะที่เหมาะสม (proper หรือ suitable vector) จากการสำรวจโดยกองควบคุมโรคเท้าช้างในประเทศไทย พบว่ายุงลายพวก *Aedes niveus* group เป็นพาหะของ *W. bancrofti* ในประเทศไทย ส่วน *B. malayi* นั้น พาหะที่สำคัญ คือ ยุงเสือ (Mansonia) 4 species ได้แก่ *M. uniformis*, *M. indiana*, *M. annulata* และ *M. bonnea* และยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) 5 species, Infection rate ในยุงในประเทศไทย เป็นร้อยละ 0.1-0.3

เมื่อยุงดูดเลือดคน microfilaria ก็จะเข้าไปด้วย ภายใน 1-2 ชั่วโมง microfilaria จะออกจาก sheaths และไชผ่านผนังกระเพาะยุง แล้วเดินทางไปอยู่ที่กล้ามเนื้อหน้าอกของยุง และจะเปลี่ยนเป็นรูปลักษณ์รูปไส้กรอก เป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (first stage larva) ต่อมาจะเจริญเติบโตลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (second stage larva) และตัวอ่อนระยะที่สาม (third stage larva) ซึ่งเป็นระยะติดต่อ เรียก infective larva แล้วจะเดินทางไปอยู่ที่ส่วนปาก (proboscis) ของยุง เตรียมพร้อมที่จะเข้าสู่คนต่อไป เมื่อยุงดูดเลือดคนอีก และปล่อยระยะติดต่อ (infective larva) เข้าสู่กระแสเลือด infective larva จะเข้าสู่ lymph vessels แล้วค่อยๆ เจริญเติบโตจนเป็นตัวแก่อยู่ตามที่ต่างๆ ดังนี้

W. bancrofti นอนพยาธิตัวแก่จะไปอยู่บริเวณ groin glands, epididymis ของผู้ชาย labial glands ของผู้หญิง บางครั้งที่หลอดน้ำเหลืองของขา

B. malayi นอนพยาธิตัวแก่จะไปอยู่ที่หลอดน้ำเหลืองของขา

การเจริญของ microfilaria ในยุง จนถึงขึ้นเป็นระยะติดต่อ กินเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ และตั้งแต่ infective larva เข้าสู่คนจนเจริญเป็นตัวแก่สืบพันธุ์ได้กินเวลาประมาณ 1 ปี



(A) Final host: man

1.a Sexually mature stage male and female of *Wuchereria bancrofti*

2.a Characteristic symptom of an infection of *W. bancrofti*: elephantiasis

3. Egg containing a microfilaria

4. Commencing elongation of the egg

5. "Sheathed" microfilaria

6.a Microfilaria *W. bancrofti*

(B) Intermediate host and vector: Diptera

a Species of *Aedes* and *Culex*

7. Metacyclic, infective microfilaria

Development of
the microfilaria
in the uterus

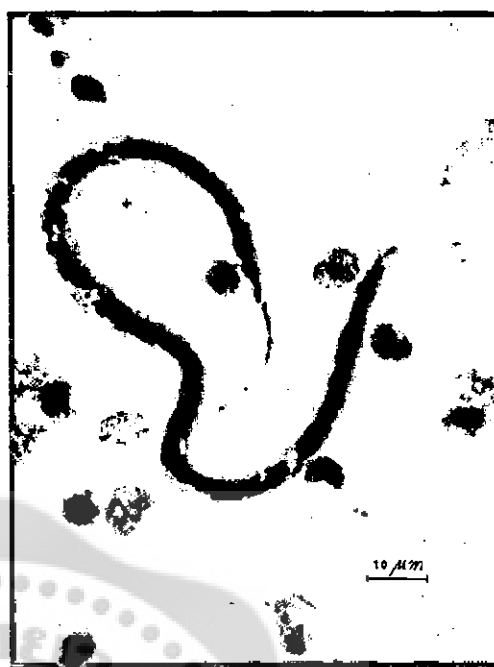
รูปที่ 1. วงจรชีวิตของ *Wucheria bancrofti* และ *Brugia malayi*

(รูปคัดลอกจากตำรา ปาราสิตสาธารณสุข โดย คณาจารย์ภาควิชาปรสิต

วิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 101 ปี 2528)



A.



B.

ภาพลำดับ

รูปที่ 2 เปรียบเทียบ microfilaria ของ A. *Wuchereria bancrofti* และ B. *Brugia malayi* (ภาพได้รับการอนุเคราะห์จากกองโรคเท้าช้าง กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข)

สำหรับโรคพยาธิในเลือดที่พบมากในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค ไก่ และหมู มักจะทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรในด้านผลผลิต เชื้อพยาธิในเลือดที่มักจะพบได้แก่ *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Trypanosoma evansi*, *Anaplasma marginale*, *Theileria* sp. และ *Plasmodium gallinaceum* เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการดำเนินงานวางแผนโครงการในโอกาสต่อไป
2. เพื่อเป็นข้อมูลให้เกิดการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

วิธีการทดลอง

1. การเก็บเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* และการย่อยด้วยเอ็นไซม์โปรตีนเค

เชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* สามารถเก็บได้จากผู้ป่วยที่ทราบว่าติดเชื้อมีระดับสูง ทำการดูดเลือดมา ประมาณ 5 ml หลังจากนั้นนำมากรองเก็บเชื้อโดยกรองผ่านเมมเบรนชนิด Polycarbonate ของ Millipore® ที่มีขนาดของการกรอง 0.5 micron มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2.5 ซม. เชื้อที่เข้าข้างจะติดอยู่บนเมมเบรนในขณะที่เม็ดเลือดแดงจะผ่านตัวกรองออกมาหมดและเม็ดเลือดขาวจะผ่านออกมาบางส่วน

นำเมมเบรนที่มีเชื้ออยู่มาใส่ลงใน test tube สะอาดขนาด 15 ml ที่มี บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1 ml หลังจากนั้นปั่นผสมด้วย Vortex นาน 1 นาที เป็นการทำให้เชื้อหลุดออกจากเมมเบรน ปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนแล้วเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 800 μ l และ 10% SDS ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นเติม 100 mg/ml ของเอ็นไซม์โปรตีนเค และทำการย่อยที่ 42 °C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อที่ถูกย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์โปรตีนเค แล้วมาสกัดเอาดีเอ็นเอออกโดยการเติม 1 volume ของ สารละลาย phenol/chloroform ผสมสารละลาย หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบน (aqueous phase) ที่มีดีเอ็นเออยู่และถ่ายสู่หลอดใหม่ ทำการสกัดด้วย chloroform อีกครั้งในปริมาณที่เท่ากัน แยกเอาสารละลายชั้นบนออกมาใส่หลอดทดลองอันใหม่ เติม 1/10 volume ของ 3M โซเดียม อะซิเตต จากนั้นเติม 2 ปริมาตร ของ cold absolute ethanol ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทอัลกอฮอล์ทิ้งไป นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ทำให้แห้ง และละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE (0.01 M Tris-HCl + 0.01 M EDTA)

3. การเก็บเลือดจากภาคสนาม

3.1 การเก็บเลือดผู้ป่วยจากภาคสนาม

ทำการเก็บเลือดผู้ป่วยในเวลาประมาณ 21.00 น ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อพยาธิเท้าช้างจะมีปริมาณมากในกระแสเลือด โดยการเจาะเลือดที่ปลายนิ้ว และ เก็บเลือดปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย 0.002% SDS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการตามวิธีในข้อ 3.3-3.11

หมายเหตุ แบ่งเลือด 20 ไมโครลิตรมาทำ Thick-film slide เพื่อย้อมสี Giemsa-stained สำหรับเทียบผลกับวิธี PCR

3.2 การเก็บเลือดจากสัตว์

ทำการเก็บเลือดไก่ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย 0.002% SDS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการตามวิธีในข้อ 3.3-3.11

3.3 ทำการต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที

3.4 ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.5 ดูดสารละลายส่วนบนปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตรดังในส่วนผสมข้างล่าง และ ผสมให้เข้ากัน

สารละลาย PCR สำหรับ 100 ไมโครลิตร PCR reaction ประกอบด้วย

10x PCR buffer	10 ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50 mM)	2 ไมโครลิตร
dNTPs (10 mM)	8 ไมโครลิตร
Primer (Forward, 20 μ M)	5 ไมโครลิตร
Primer (Reverse, 20 μ M)	5 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (2 unit)	1 ไมโครลิตร
Sterile water	19 ไมโครลิตร
รวม	50 ไมโครลิตร

3.6 ดำเนินการ PCR โดยใช้เครื่อง Thermal cycler ของ Perkin Elmer ดังนี้

Denaturation 95°C นาน 1 นาที

Annealing 50°C นาน 1 นาที

Polymerization 72°C นาน 1 นาที

ดำเนินการจำนวน 30 รอบ

- 3.7 หลังจากนั้นแบ่งสารละลาย 20 µl มาตรวจหาชิ้น PCR product โดยแยกผ่าน 1.5-3.0% (w/v) ของวุ้นตัวกลางที่มีกระแสผ่านขนาด 80 Volts นาน 1-2 ชั่วโมงโดยใช้ Bromphenol blue เป็น Dye marker
- 3.8 ทำการย้อมแผ่นวุ้นด้วยสารละลาย Ethidium bromide นาน 1 นาที
- 3.9 ล้างแผ่นวุ้นในน้ำเพื่อกำจัด Ethidium bromide ที่มากเกินไป
- 3.10 ส่องดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต
- 3.11 บันทึกภาพเป็นไฟล์ารอยด์และแปลผล

4. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ *W. bancrofti* คือ Wf-F ซึ่งเป็น Sense strand มีทิศทางการสังเคราะห์จาก 5' ไป 3' ดังนี้ CACCGGTATCAGAGATTAATT และ Wf-2 ซึ่งเป็น Antisense strand มีทิศทางการสังเคราะห์จาก 5' ไป 3' ดังนี้ TGGATGTATGTCAAAAAGCA ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 400 และ 450 bp สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *B. malayi* คือ Bm-1 ซึ่งเป็น Sense strand มีทิศทางการสังเคราะห์จาก 5' ไป 3' ดังนี้ GCGCATAAATTCATCAGCAA และ Bm-2 ซึ่งเป็น Antisense strand มีทิศทางการสังเคราะห์จาก 5' ไป 3' ดังนี้ ATGACAACACAATACACGAC ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 280 bp

ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์แต่ละคู่โดยการทำ PCR ของ ดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จากคนและเชื้อเท้าช้างทั้งสองชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 10 ng / 50 µl หลังจากนั้นดำเนินการตามข้อ 3.5-3.11

5. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR

ทำการทดสอบความไวของไพรเมอร์ Wf-F/Wf-2 และ Bm-1/Bm-2 โดยการทำให้ PCR ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 ng ตามลำดับ หลังจากนั้นดำเนินการตามข้อ 3.5-3.11



ผลการทดลอง

1. ความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR

จากการใช้ไพรเมอร์ Wf-F/Wf-2 สำหรับหาความไวตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *W. bancrofti* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ไพรเมอร์ Wf-F/Wf-2 สามารถตรวจหาดีเอ็นเอได้ในระดับ 0.01 ng หรือ 10 pg ซึ่งเทียบเท่ากับเชื้อไม่ถึง 1 ตัว (รูปที่ 3a)

ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ไพรเมอร์ Bm-1/Bm-2 สำหรับหาความไวของการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *B. malayi* ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไพรเมอร์ Bm-1/Bm-2 สามารถตรวจหาดีเอ็นเอได้ในระดับ 0.001 ng หรือ 1 pg ซึ่งเทียบเท่ากับเชื้อไม่ถึง 1 ตัวเช่นกัน (รูปที่ 4a)

2. ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อเท้าช้างด้วยวิธี PCR

จากการใช้ไพรเมอร์ Wf-F/Wf-2 สำหรับตรวจหาเชื้อ *W. bancrofti* โดยมี ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเม็ดเลือดขาวของคน และ เชื้อ *B. malayi* เป็น negative control พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวจำเพาะต่อเชื้อ *W. bancrofti* เท่านั้น (รูปที่ 3b)

ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ไพรเมอร์ Bm-1/Bm-2 สำหรับตรวจหาเชื้อ *B. malayi* โดยมี ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเม็ดเลือดขาวของคน และ เชื้อ *W. bancrofti* เป็น negative control พบว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวจำเพาะต่อเชื้อ *B. malayi* เท่านั้น (รูปที่ 4b)

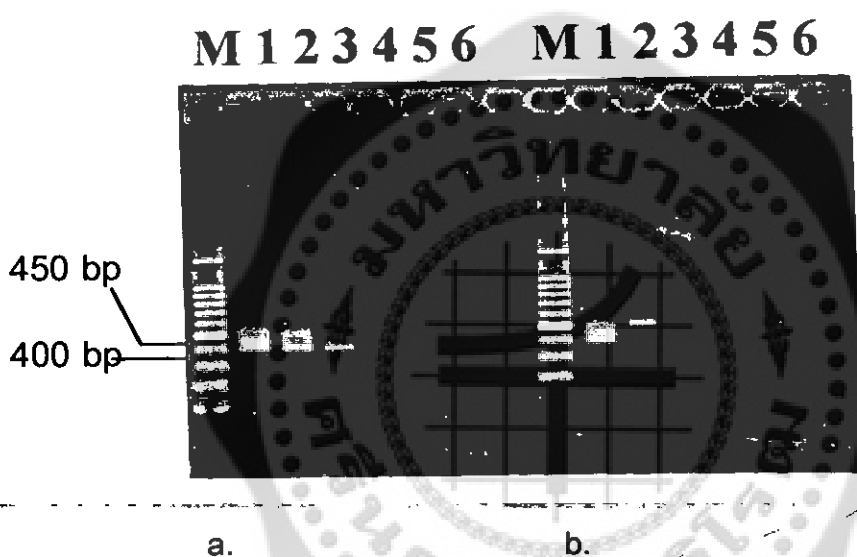
3. การตรวจหาเชื้อเท้าช้างจากเลือดที่ได้จากภาคสนาม

นำจำนวนตัวอย่างเลือด 46 ตัวอย่างเพื่อตรวจหาโรคเท้าช้างที่เกิดจากเชื้อ *Wuchereria bancrofti* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อดังกล่าวคือ WbF และ Wb2 ซึ่งจะให้ PCR products ที่มีขนาด ประมาณ 400 และ 450 bp และตรวจหาเชื้อเท้าช้างชนิด *B. malayi* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อดังกล่าวคือ Bm1 และ Bm2 ซึ่งจะให้ PCR products ที่มีขนาด ประมาณ 280 bp เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้นอากาโรส และย้อมด้วย Ethidium Bromide เพื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ผลการตรวจ ไม่พบผู้ที่ติดเชื้อ

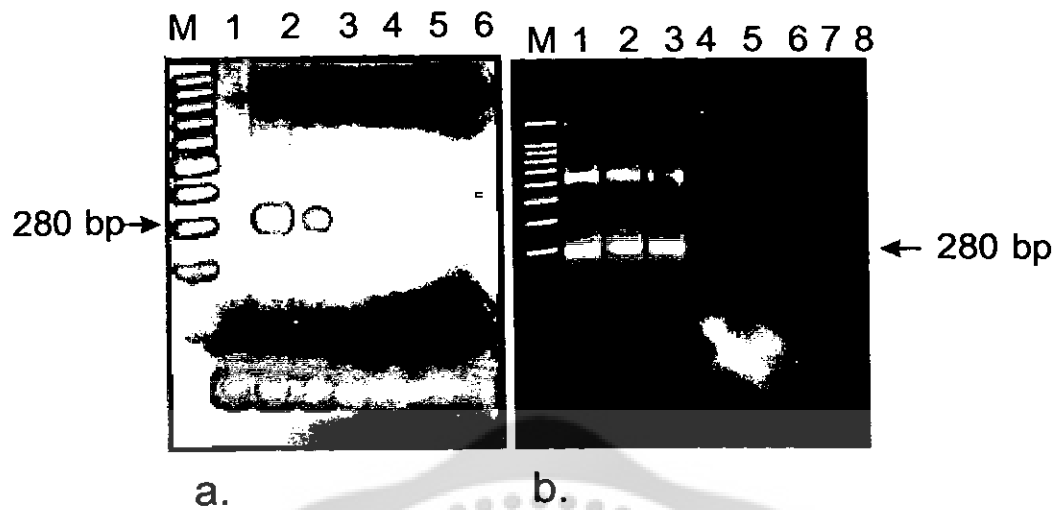
4.3. การตรวจหาเชื้อพลาสโมเดียมเดียมจากเลือดไก่ที่ได้จากภาคสนาม

พบว่าสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ การเลี้ยงไก่ จากการเจาะเลือดสุ่มสำรวจไก่จำนวน 100 ตัว เพื่อนำมาตรวจเบื้องต้นด้วยการทำ Thin smear-Giemsa stained พบว่ามีไก่ที่ติดเชื้อพยาธิในเลือดในกลุ่มของ *Plasmodium* sp. จำนวน 35 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 5 อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบ่งชี้ได้แน่ชัดว่าเชื้อ *Plasmodium* ที่พบนั้นเป็นชนิดใด



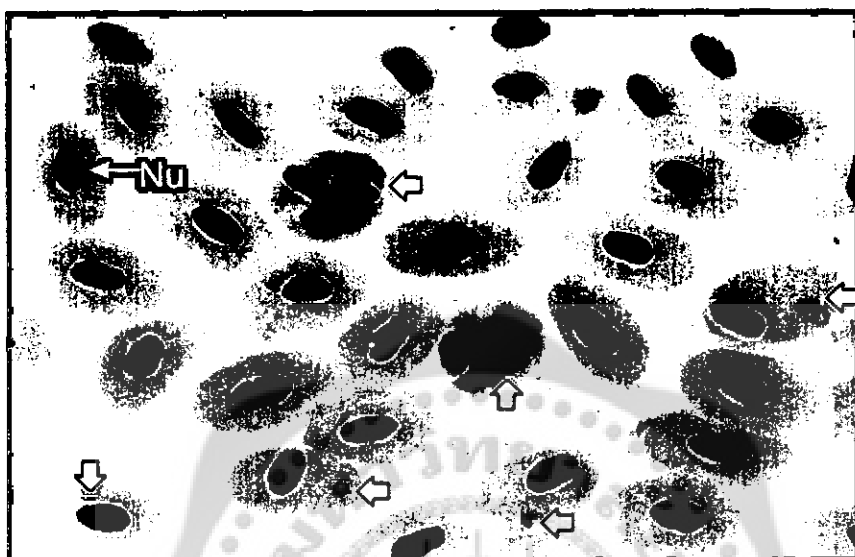
รูปที่ 3 แสดงผล 1.5 % Agarose gel electrophoresis ของ PCR products ขนาด 400 และ 450 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ Wf-F และ Wf-2 สำหรับการตรวจหาเชื้อ *W. bancrofti*

- a.) Sensitivity ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระดับ 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 ng (Lanes 1-6 ตามลำดับ) และ
- b.) Specificity ของไพรเมอร์โดยการทดสอบกับดีเอ็นเอที่ได้จาก *W. bancrofti*, *B. Pahangi*, *Dirofilaria repens*, *D. immitis*, Human DNA , Negative control (Lanes 1-6 ตามลำดับ)



รูปที่ 4 แสดงผล 3.0 % Agarose gel electrophoresis ของ PCR products ขนาด 280 bp ที่ได้จากไพรเมอร์ Bm-1 และ Bm-2 สำหรับการตรวจหาเชื้อ *B. malayi*

- a.) Sensitivity ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระดับ 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 ng (Lanes 1-6 ตามลำดับ) และ
- b.) Specificity ของไพรเมอร์โดยการทดสอบกับดีเอ็นเอที่ได้จาก *B. malayi* ที่ได้จากผู้ป่วยจาก จ. นราธิวาส (Lane 1-3), *W. bancrofti* (Lane 4), *Dirofilaria repens* (Lane 5), *D. immitis* (Lane 6), Human DNA (Lane 7) และ Negative control (Lane 8)



รูปที่ 5

แสดงภาพย้อมสี Giemsa-stained ของเชื้อ *Plasmodium gallinaceum* ที่พบในเม็ดเลือดแดงของไก่ ลูกครีขาว (Nu) แสดงถึงนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงไก่ และ ลูกครีเหลืองแสดงถึงเชื้อ *P. gallinaceum* ในระยะต่างๆ

วิจารณ์

จากผลการทดลองไม่พบการระบาดของเชื้อโรคเท้าช้างชนิด *W. bancrofti* และ *B. malayi* ในผู้ที่เข้ารับการตรวจ ซึ่งผลของ PCR และ การย้อมสี Giemsa stain แสดงผลที่สอดคล้องกัน โดยมีการเทียบผลของ PCR กับผู้ป่วยแรงงานพม่าที่ติดเชื้อ *W. bancrofti* จาก อ. แม่สอด จ. ตาก และ ผู้ป่วยคนไทยที่ติดเชื้อ *B. malayi* จาก จ. นราธิวาส ทั้งนี้อาจเป็นด้วยสาเหตุหลัก 2 ประการคือ 1) เชื้อทั้งสองชนิดยังไม่แพร่ระบาดในกลุ่มของคนไทยบริเวณ อ. ปากพลี เนื่องจากอาจมีการเฝ้าระวังของกระทรวงสาธารณสุขเป็นอย่างดี 2) คนงานพม่าที่ทำงานในพื้นที่บริเวณนี้อาจได้รับการรักษาโดยการให้ยาจากกระทรวงสาธารณสุขมาแล้วก่อนที่จะเข้าประเทศทำให้ลดการแพร่ระบาดของโรคนี้ อย่างไรก็ตามหากจะสรุปผลให้แน่ชัดนั้นต้องทำการสำรวจเชือดังกล่าวในแรงงานพม่าของพื้นที่แถบนี้ ผลการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นนี้น่าจะเป็นข้อมูลที่น่าสนใจสำหรับการเฝ้าระวังไม่ให้โรคนี้แพร่ระบาดในกลุ่มคนไทย

จากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นจากปศุสัตว์ อำเภอปากพลี พบว่า เกษตรกรได้ทำการเลี้ยงไก่เป็นจำนวนมาก จากการทดลองพบว่าเชื้อพยาธิในเลือดที่พบบ่อยในไก่ได้แก่ พลาสโมเดียม ซึ่งไม่ระบุปีซีส์ ผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการแยกชนิดได้เนื่องจากเวลาและเงินทุนที่จำกัด อย่างไรก็ตามสันนิษฐานว่าเชือดังกล่าวไม่สามารถถ่ายทอดวงจรชีวิตไปสู่คนได้ เนื่องจากไม่เคยมีรายงานว่ามีการแพร่ระบาดของเชื้อพลาสโมเดียมชนิดที่พบในไก่ไปสู่คน อย่างไรก็ตามเชื้อพลาสโมเดียมที่พบในไก่นี้เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ การควบคุมโดยใช้ยาหรือการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคนี้จึงเป็นแนวทางการศึกษาหนึ่งที่น่าสนใจ นอกจากนี้การพัฒนาชุดตรวจเชือดังกล่าวด้วยวิธี PCR จะช่วยวินิจฉัยโรคได้รวดเร็วและแม่นยำ ทำให้มีการรักษาได้อย่างทันทั่วทั้งที่เป็นการลดอัตราการตายของไก่ที่ติดเชือดังกล่าวได้

สรุป

1. จากการตรวจสอบเลือดผู้ป่วยคนไทยในพื้นที่บริเวณ อำเภอปากพลี ไม่พบการติดเชื้อเท้าช้างทั้งชนิดชนิด *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi*
2. พบว่ามีการติดเชื้อพยาธิในเลือดไก่ชนิด *Plasmodium* ในระดับต่ำ-ปานกลาง แต่ไม่สามารถระบุปีซีส์ได้
3. วิธีการ PCR ตรวจหาเชื้อเท้าช้างและข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการขอโครงการวิจัยต่อไป

คำกล่าวขอบคุณ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คณะเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลปากพลีและ ปศุสัตว์อำเภอปากพลี ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อมูลบางส่วนของพื้นที่ในความรับผิดชอบ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. ปาราสิตสาธารณสุข 2528. คณะจารย์ภาควิชาปาราสิตวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. Tirasophon , W., Ponglikitmongkol, M., Wilairat, P., Boonsaeng, V. and Panyim, S. 1991. A novel detection of a single *Plasmodium falciparum* in infected blood. Biochem. Biophys. Res. Comm. 175: 179-184.
3. Wooden, J., Gould, E. E., Paull, A. and Sibley, C. H. 1992. *Plasmodium falciparum*: a simple polymerase chain reaction method for differentiating strains. Exp. Parasitol. 75: 207-212.
4. Williams, S., Nicolas, L., Lizotte-Waniewski, M., Plichart, C., Luquiaud, P., Ngugen, L. N. and Moulia-Palat J. P. 1996. A polymearse chain reaction

- assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 90: 384-387.
5. Singh, B., Cox-Singh, J., Miller, A. O., Abdullah, M. S. and Rahman, A. O. 1996. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 90: 519-521.
 6. Singh, B. 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Int. J. Parasitol. 27: 1135-1145.
 7. Singh, J-CoX., Pomreh, A. S. Rahman, H. A., Zakaria, R., Miller, A. O. and Singh, B. 1999. Simple blood-sampling with nested polymerase chain reaction detection for epidemiology studies on *Brugia malayi*. Int. J. Parasitol. 29: 717-722.