

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาเพื่อพิสูจน์ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *Brugia pahangi*



นางสาว ศิวะพร กล้าคล้าย

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE DEVELOPMENT OF A MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUE TO IDENTIFY
THE THIRD LARVAL STAGE OF *BRUGIA PAHANGI*



Miss Siwaporn Klamkhlai

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

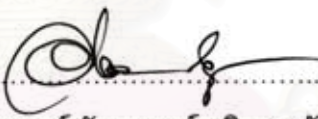
Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาเพื่อพิสูจน์ตัวอ่อน ระยะที่ 3 ของพยาธิ <i>Brugia pahangi</i>
โดย	นางสาวศิวะพร กล้าคล้าย
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทศิริ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นางสุดจิตต์ จุงพิวัฒน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....  คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัชญริยา ไสละสูต)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทศิริ)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นางสุดจิตต์ จุงพิวัฒน์)

.....  กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.มีนา สาริกะภูติ)

ศิวะพร กล้าคล้าย: การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางอนุชีววิทยาเพื่อพิสูจน์ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *Brugia pahangi*. (THE DEVELOPMENT OF A MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUE TO IDENTIFY THE THIRD LARVAL STAGE OF *BRUGIA PAHANGI*) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.สพ.ญ.ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ, นางสุดจิตต์ จุงพิวัฒน์, 84 หน้า.

Brugia pahangi เป็นหนึ่งในพยาธิฟิลาเรียที่ก่อให้เกิดโรค Lymphatic filariasis มีสุนัขเป็นโฮสต์แท้และแมวเป็นตัวกักเก็บโรค การระบาดของพยาธิชนิดนี้พบได้ในประชากรสุนัขและแมวของกรุงเทพมหานคร และจังหวัดภาคใต้ ที่มีการระบาดของโรคเท้าช้างในคนร่วมด้วย *B. pahangi* มียุงชนิดต่างๆเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ยุง *Aedes* spp. ยุง *Armigeres* spp. และยุง *Mansonia* spp. เนื่องจากตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) เป็นตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิฟิลาเรียชนิดนี้ และมีลักษณะคล้ายคลึงกับพยาธิ *Brugia malayi* (ที่ก่อโรคในคน) และ *Dirofilaria immitis* (ที่ก่อโรคพยาธิหนอนหัวใจในสุนัข) ดังนั้น เมื่อพบ L3 ของพยาธิฟิลาเรียเหล่านี้ให้ยุงชนิดเดียวกันเป็นพาหะ จึงเป็นการยากที่จะจำแนกชนิดตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียในยุง การศึกษาครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบระยะพัฒนาและลักษณะรูปร่างของตัวอ่อน L1, L2 และ L3 ของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ด้วยการย้อมเอ็นไซม์ acid phosphatase พบตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* ที่จัดว่าเป็น L1 ในวันที่ 1-5 หลังยุงได้รับไมโครฟิลาเรีย พบ L2 ในวันที่ 6-11 และ L3 ในวันที่ 12 เป็นต้นไป ในขณะที่พบ L1 ของ *D. immitis* ในวันที่ 5-9 พบ L2 ในวันที่ 10-14 และพบ L3 ตั้งแต่วันที่ 15 หลังได้รับเชื้อ งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินที่แสดงออกจำเพาะต่อระยะตัวอ่อนของพยาธิ *B. pahangi* ที่พัฒนาอยู่ในยุง *Aedes aegypti* (Thailand strain) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และทดสอบความไวเพื่อตรวจหาทรานสคริปใน L3 จำนวน 60 ตัว (เก็บตัวอ่อนในวันที่ 14 หลังจากยุงติดพยาธิ) พบผลิตภัณฑ์ RT-PCR (ขนาด 226 bp) ที่แสดงถึงการแสดงออกของยีนโทรโปไมโอซินที่มีมากกว่า การแสดงออกของยีนโทรโปนิน (221 bp) การศึกษานี้ ยังพบทรานสคริปของยีนโทรโปนินใน *B. pahangi* ในวันที่ 7-10 ซึ่งเป็นระยะ L2 และ ทรานสคริปของยีนโทรโปไมโอซิน ในวันที่ 7-8 และ 11-12 ซึ่งเป็นระยะ L2 ระยะปลาย และ L3 ระยะต้น ตามลำดับ แต่การทดสอบครั้งนี้พบปฏิกิริยาข้ามของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของ *B. malayi* ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า เทคนิค RT-PCR ถึงแม้จะมีปฏิกิริยาข้ามกับ L2 และ L3 ของ *B. pahangi* ก็ตาม แต่ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของการตรวจหาโทรโปไมโอซินของ L2 และ L3 (วันที่ 8-12 หลังได้รับเชื้อ) ได้

ภาควิชา พยาธิวิทยา
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต..... ศิวะพร กล้าคล้าย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... นารีรัตน์ วิเศษกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... โกสุม จันทร์ศิริ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... สุดจิตต์ จุงพิวัฒน์

4675577931 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEY WORD: THIRD STAGE LARVA / VECTOR / *BRUGIA PAHANGI*

SIWAPORN KLAMKHLAI : THE DEVELOPMENT OF A MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUE TO IDENTIFY THE THIRD LARVAL STAGE OF *BRUGIA PAHANGI*.
THESIS ADVISOR : NAREERAT VISESHAKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : KOSUM CHANSIRI, Ph.D., SUDCHIT CHUNGPIVAT, M.Sc., 84 pp.

Brugia pahangi is one of the filarial worms causing lymphatic filariasis in various mammals. For instance, dogs served as the final host for *B. pahangi* while cats were classified as a reservoir host. There were at least 3 species of filarial worms known to the veterinary and medical importance; *B. pahangi*, *B. malayi* and *D. immitis*. These species were transmitted by similar mosquitoes species; *Aedes* spp., *Armigeres* spp. and *Mansonia* spp.. When carried by the same mosquito species, these worms could not be differentiated easily by any means. In this study, the larval morphology and developmental stages using acid phosphatase staining technique of *B. pahangi* could slightly be separated from *D. immitis*. The studies of the larval developmental stages and morphological differentiation showed that L1 of *B. pahangi* could be found in mosquitoes at day 1 to 5 post infection (DPI). L2 was found in mosquitoes at 6-11 DPI and L3 was at 12-15 DPI. While L1 of *D. immitis* had an early development on 5-9 DPI, L2 was 10-14 DPI and L3 was on 15-20 DPI. The molecular technique of Reverse Transcription-PCR (RT-PCT) was developed to specifically identify L3 of *B. pahangi* using gene specific primers of *Troponin* and *Tropomyosin*. The RT-PCR primers were able to amplify the transcripts of the expressed *Troponin* (221 bp) and *Tropomyosin* (226 bp) derived from 60 larvae. The RT-PCR specific reaction revealed that *Tropomyosin* had expressed more than *Troponin* during the larval stage L3, at 14 DPI. *Troponin* expressed at the stage of L2 (7-10 DPI) while *Tropomyosin* expressed at 2 intervals, the middle L2 (7-8 DPI) and the early stage of L3 (11-12 DPI). However, there was a cross reaction occurred to *B. malayi* DNA (700 bp). It is concluded that the RT-PCR technique was able to determine the development of L2 and L3 of *B. pahangi* in mosquitoes. The expression of *Tropomyosin* and *Troponin* could be a preliminary approach as a specific marker to identify *B. pahangi* larval development in mosquitoes.

Department Pathology

Field of study Veterinary Pathology

Academic year 2006

Student's signature..... *Siwaporn Klamkhlai*

Advisor's signature..... *Nareerat Viseshakul*

Co-advisor's signature..... *Kosum Chansiri*

Co-advisor's signature..... *Sudchit Chungpivat*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.สพ.ญ.ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและความช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ และนางสุดจิตต์ จุงพิวัฒน์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ.สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำมาตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.น.สพ.ดร.สนธยา เตียวศิริทรัพย์ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณจุฑามาศ ดอนทอง คุณทุเรียน แก้วทอง คุณวินัย จันทร์หอมและคุณจรรยา ประภาส และบุคลากรในภาควิชาพยาธิวิทยาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง คุณวรรณภรณ์ จันทร์หอม คุณศุภรินทร์ จิรสขประเสริฐ คุณศิริลักษณ์ เจนช่างกล ที่ช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย และนิสิตปริญญาโททุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ บิดาและมารดาของข้าพเจ้า ที่ให้กำลังใจและความห่วงใย จนจบการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 <i>Brugia pahangi</i>	4
2.1.1 ลักษณะทั่วไป.....	4
2.1.2 วงชีวิตของหนอนพยาธิ <i>Brugia pahangi</i>	4
2.1.3 การก่อโรคของหนอนพยาธิ <i>Brugia pahangi</i>	6
2.1.4 การแพร่ระบาดของหนอนพยาธิ <i>Brugia pahangi</i>	7
2.2 หนอนพยาธิฟิลาเรียอื่นๆ.....	7
2.2.1 <i>Dirofilaria immitis</i>	7
2.2.2 <i>Brugia malayi</i>	8
2.3 ยุงพาหะนำโรคฟิลาเรียซิส.....	9
2.4 การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด.....	10
2.5 การตรวจวินิจฉัยโรคฟิลาเรียซิส.....	10
2.5.1 การตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด.....	11
2.5.1.1 การแยกชนิดไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิชนิดต่างๆ.....	11
2.5.2 การแยกชนิดของตัวอ่อนหนอนพยาธิฟิลาเรีย.....	12
2.6 การแสดงออกของยีนและการสังเคราะห์เอนไซม์.....	14

บทที่	หน้า
2.7 การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีนที่จำเพาะต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ <i>B. pahangi</i>	15
2.8 การตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ในยุงของพยาธิ <i>Brugia</i> spp.	16
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 การเตรียมแมวมและสุนัขทดลองเพื่อให้ไมโครฟิลาเรีย.....	17
3.1.1 แมวทดลอง.....	17
3.1.2 สุนัขทดลอง.....	17
3.2 การเตรียมยุงทดลองเพื่อศึกษาระยะของตัวอ่อนของหนอนพยาธิฟิลาเรีย.....	18
3.3 การทดลองเพื่อการจำแนกระยะตัวอ่อนและชนิดของตัวอ่อน.....	20
3.3.1 ศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิ <i>B. pahangi</i> เปรียบเทียบกับ <i>D. immitis</i> ระยะที่ 1, 2 และ 3 ในยุงทดลอง.....	20
3.3.2 ทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปชันกับทรานสคริป (mRNA) ของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินที่พบในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ <i>B. pahangi</i>	21
3.3.2.1 ทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน.....	21
3.3.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน.....	23
3.3.2.2.1 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับทรานสคริป.....	23
3.3.2.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับดีเอ็นเอ.....	24
3.4 การวิเคราะห์และประเมินผล.....	24
4. ผลการทดลอง.....	25
4.1 การศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะต่างๆของพยาธิ <i>B. pahangi</i> และ <i>D. immitis</i> ในยุง <i>Ae. aegypti</i> (Thailand strain).....	25
4.1.1 ความหนาแน่นของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด.....	25
4.1.2 การวัดขนาดตัวอ่อนของ <i>B. pahangi</i> และ <i>D. immitis</i>	25
4.1.3 การย้อมตัวอ่อนด้วยสียิมซ่าและ การย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase.....	26

4.2 ทดสอบปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปชันกับทรานสคริป (mRNA) ของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินที่พบในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ <i>B. pahangi</i>	48
4.2.1 ทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน.....	48
4.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน.....	49
4.2.2.1 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับทรานสคริป.....	49
4.2.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับดีเอ็นเอ.....	50
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	58
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	58
5.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	60
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	65
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	84

ตาราง	หน้า
1. การแยกชนิดไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ <i>Brugia</i> spp. และ <i>Dirofilaria</i> spp. ที่ได้จากการย้อมสี Acid Phosphatase activity.....	12
2. รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของหนอนพยาธิฟิลาเรีย.....	14
3. ยีนที่แสดงออกในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ <i>B. pahangi</i>	16
4. ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบตรวจหาทรานสคริปของยีน.....	22
5. เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะตัวอ่อนที่ย้อมด้วยสียิมซ่าและอีสโตเคมี (Acid phosphatase activity) บริเวณที่พบและขนาดของตัวอ่อนระยะต่างๆของ <i>B. pahangi</i> ในยุง <i>Ae. aegypti</i> (Thailand strain) (N=30) หลังจากได้รับเชื้อ 1 ชั่วโมงถึง 15 วัน.....	28
6. เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะตัวอ่อนที่ย้อมด้วยสียิมซ่าและอีสโตเคมี (Acid phosphatase activity) บริเวณที่พบและขนาดของตัวอ่อนระยะต่างๆของ <i>D. immitis</i> ในยุง <i>Ae. aegypti</i> (Thailand strain) (N=30) หลังจากได้รับเชื้อ 1 ชั่วโมงถึง 15 วัน.....	37
7. ตัวอ่อนระยะพัฒนาของพยาธิ <i>B. pahangi</i> ในยุง <i>Ae. aegypti</i> (Thailand strain)	46
8. ตัวอ่อนระยะพัฒนาของพยาธิ <i>D. immitis</i> ในยุง <i>Ae. aegypti</i> (Thailand strain).....	47
9. ความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 ของ <i>B. pahangi</i>	51
10. ความไวและความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของพยาธิ <i>B. pahangi</i> ด้วยวิธี One Step RT-PCR.....	52
11. ความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปไมโอซินของพยาธิ <i>B. pahangi</i>	53
12. ความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินของพยาธิ <i>D. immitis</i> ด้วยวิธี Two Step RT-PCR.....	54
13. ความจำเพาะของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินต่อพยาธิ <i>B. malayi</i>	55

สารบัญญภาพ

ฉ

ภาพประกอบ	หน้า
1. วงชีวิตของหนอนพยาธิ <i>Brugia pahangi</i>	6
2. ความแตกต่างของ ractal protrusion ระหว่างตัวอ่อนพยาธิ <i>Brugia malayi</i> กับ <i>Brugia pahangi</i>	13
3. ความแตกต่างของ caudal papillae ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิฟิลาเรียชนิดต่างๆ.....	13
4. ความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของพยาธิ <i>B. pahangi</i> ด้วยวิธี Two step RT-PCR เปรียบเทียบกับระยะพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิ <i>B. pahangi</i> ที่พบในยุง <i>Ae. aegypti</i> (thailand strain) ในแต่ละวัน	56
5. ความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของพยาธิ <i>D. immitis</i> ด้วยวิธี Two step RT-PCR เปรียบเทียบกับระยะพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิ <i>D. immitis</i> ที่พบในยุง <i>Ae. aegypti</i> (thailand strain) ในแต่ละวัน	57



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Brugia pahangi เป็นหนอนพยาธิฟิลาเรียชนิดหนึ่งในหลายชนิด ได้แก่ *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* และ *Brugia malayi* ที่สามารถพบได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าเช่น เสือและชะมด (Laing et al., 1960) ทำให้เกิดโรค Lymphatic filariasis แก่สัตว์เหล่านี้ สัตว์ที่ติดโรคจะมีการอักเสบและการขยายของต่อมและท่อน้ำเหลือง เช่นสุนัขที่ติดพยาธิ *B. pahangi* จะเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงและเร็วกว่าในแมว (Schacher and Sahyoun, 1967) นอกจากนี้จากการทดลองของ Edeson และคณะ (1960a) พบว่า *B. pahangi* สามารถทำให้เกิด Tropical pulmonary eosinophilia (TPE) ในคนได้ โดย Palmier และคณะ (1985) ได้ตรวจพบผู้ป่วย 1 ใน 9 คนที่มีไมโครฟิลาเรียของ *B. pahangi* และ 7 ใน 9 คนพบว่ามี ไมโครฟิลาเรียทั้ง *B. pahangi* และ *B. malayi* จากการทำแผ่นเลือดและย้อมสีฮีสโตเคมี Acid phosphatase ใน South Kalimantan (Borneo) ประเทศอินโดนีเซีย สำหรับการระบาดของพยาธิ *B. pahangi* ในสัตว์ของประเทศไทยได้มีรายงานการตรวจพบทั้งในแมวและสุนัข สุนัขจิ้งจอกและสุกัฏ (2536) พบแมวที่มีไมโครฟิลาเรียของ *B. pahangi* ที่เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร สุวรรณิและสุนจิตต์ (2535) รายงานการพบไมโครฟิลาเรียของ *B. pahangi* ในสุนัขจำนวน 10 ตัวจาก 240 ตัว (คิดเป็น 4.17%) ที่กรุงเทพมหานครและยังพบอุบัติการณ์ของ *B. pahangi* เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพียงแต่ยุงพาหะของ *B. pahangi* ในประเทศไทยยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นยุงชนิดใดบ้าง ดังนั้นการยืนยันว่ายุงชนิดใดสามารถเป็นพาหะนำโรคของ *B. pahangi* ในธรรมชาติได้ จำเป็นต้องตรวจพบตัวอ่อนระยะที่ 3 ในยุงชนิดนั้น

การศึกษาการพัฒนาระยะของหนอนพยาธิในยุงเป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้ทราบถึงชนิดของแมลงพาหะนำโรคตามธรรมชาติ (natural vector) และการระบาดของหนอนพยาธิในพื้นที่นั้น การศึกษาการเป็นยุงพาหะนำโรคตามธรรมชาติกระทำโดยการชำแหละ (dissection) ยุงเพื่อตรวจหาตัวอ่อนหนอนพยาธิระยะที่ 3 หรือระยะติดต่อกายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Vezzani et al., 2006) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้มาเป็นเวลานานและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวินิจฉัย เนื่องจากบางพื้นที่มีการระบาดของพยาธิฟิลาเรียหลายชนิดร่วมกันและยุงชนิดเดียวกันอาจเป็นพาหะนำหนอนพยาธิได้หลายชนิดเช่นยุง *Mansonia* spp., *Armigeres* spp. และ *Aedes* spp. ซึ่งเป็นยุง

นำโรคตามธรรมชาติของ *B. pahangi* แต่ยุงทั้ง 3 ชนิดนี้ก็สามารถนำหนอนพยาธิ *B. malayi* และ *D. immitis* ได้เช่นเดียวกัน (สุภัทร, 2531)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการจำแนกชนิดของหนอนพยาธิฟิลาเรียทั้งในโฮสต์และในยุงพาหะ เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะมากกว่าการตรวจหาตัวอ่อนโดยการ dissection (Singh, 1997) ซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้เช่น Polymerase chain reaction (PCR) (Fischer et al., 2002) ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจพบตัวอ่อนพยาธิ *Brugia timori* ได้ในยุงพาหะ แต่ไม่สามารถจำแนกระยะของตัวอ่อนได้ เนื่องจากยุงที่สามารถนำโรคได้จะต้องเป็นยุงที่มีการพัฒนาถึงตัวอ่อนระยะที่ 3 (ระยะติดต่อ) เท่านั้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้การตรวจหาทรานสคริปของโทรโปนิน (Troponin) และ โทรโปไมโอซิน (Tropomyosin) ที่แสดงออกเฉพาะในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* ที่เจริญพัฒนาในยุงพาหะ ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ดัดแปลงจาก Hunter และคณะ (1999) และทดสอบความจำเพาะของเทคนิคนี้กับพยาธิฟิลาเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *D. immitis* และ *B. malayi*

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบความไวในการตรวจหาการแสดงออกของยีนในระดับทรานสคริป (mRNA) ของโทรโปนินและโทรโปไมโอซินในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* ด้วยเทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบกับการพัฒนารูปร่างของตัวอ่อนแต่ละระยะในยุง
2. เพื่อทดสอบความจำเพาะในการตรวจหาการแสดงออกของยีนดังกล่าวต่อตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ระหว่างพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ที่พัฒนาในยุงด้วยวิธี RT-PCR
3. เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ระหว่างพยาธิ *B. pahangi*, *B. malayi* และ *D. immitis*

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ทรานสคริปของยีนโทรโปนิน และโทรโปไมโอซิน มีความจำเพาะต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* เท่านั้น
2. เทคนิค RT-PCR สามารถนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ในแมลงนำโรคของพยาธิ *B. pahangi* ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อใช้เทคนิค RT-PCR ในการทดสอบและตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินในตัวอย่างระยะที่ 3 ของ *B. pahangi*
2. เพื่อใช้ทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินเป็น molecular marker ของการตรวจตัวอย่างระยะที่ 3 ของ *B. pahangi* ในยุงพาหะ
3. เพื่อใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหายุงพาหะของโรคนี้ตามธรรมชาติ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หนอนพยาธิ *Brugia pahangi*

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

พยาธิ *Brugia* spp. เป็นพยาธิฟิลาเรียที่จัดทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Nematelminthes

Class Nematoda

Subclass Secernentea

Order Spirurida

Family Filariidae

Genus *Brugia*

หนอนพยาธิ *Brugia* spp. เช่น *B. malayi*, *B. pahangi*, *B. patei*, *B. (Brugiella) buckleyi*, *B. ceylonensis*, *B. beaveri*, *B. tupaiae* และ *B. timori* ก่อให้เกิดโรคในสัตว์หลายชนิด ในที่นี้ *B. malayi* และ *B. timori* เป็นหนอนพยาธิที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน ทำให้เกิดโรคทางระบบน้ำเหลืองได้ (สุภัทร, 2531; Ash and Little, 1964; Brug, 1927; Buckley and Edeson, 1956; Buckley et al., 1958; Dissanaik and Paramananathan, 1961; Orihel, 1964; Orihel, 1966; Partono et al., 1977)

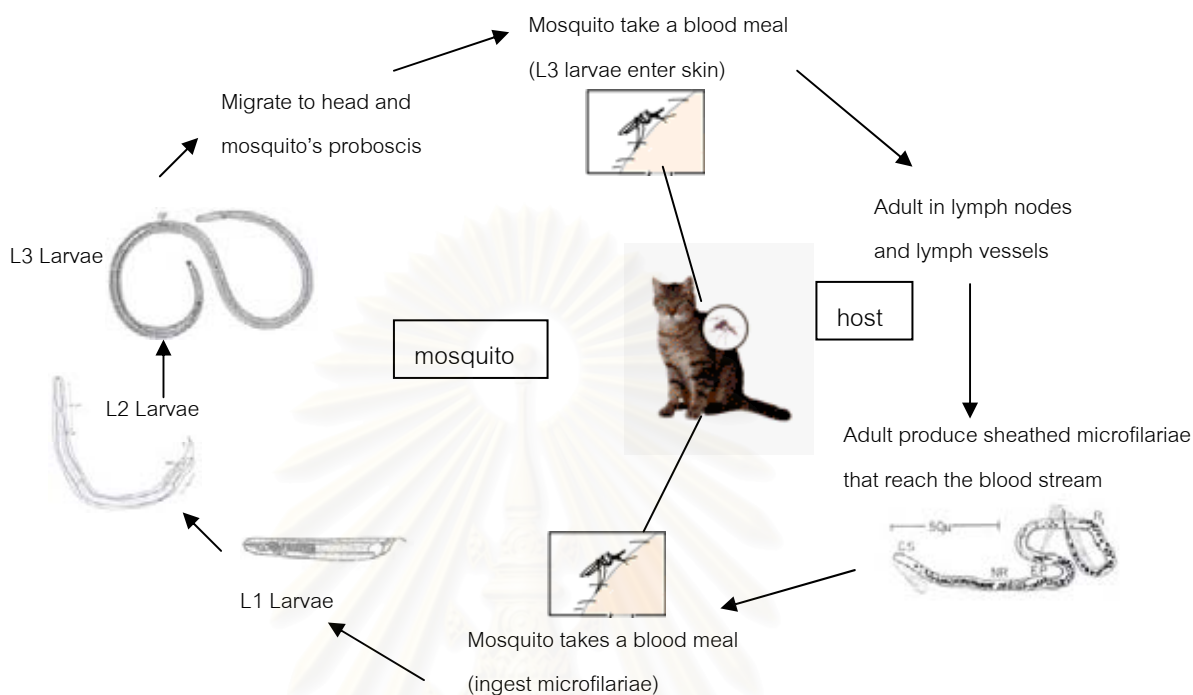
หนอนพยาธิ *B. pahangi* ที่พบในสุนัขและแมว มีลักษณะทั่วไปคือ ตัวเต็มวัยมีลักษณะเรียวยาว ผิวเรียบ หนอนพยาธิตัวผู้ มีความยาวโดยเฉลี่ย 17.4 – 20 มม. หางของอคล้ายสปริง มี spicules สองอันที่มีขนาดไม่เท่ากัน ส่วนตัวเมีย มีความยาวระหว่าง 38 – 63 มม. ขึ้นกับอายุของพยาธิตัวเมีย นอกจากนี้ยังมี vulva เปิดออกทางด้านหน้าของลำตัวอีกด้วย (Schacher, 1962b) ตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ที่ต่อมน้ำเหลืองและท่อน้ำเหลือง เมื่อตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์แล้ว ตัวเมียจะออกลูกเป็นตัวเรียกว่า “ไมโครฟิลาเรีย” (microfilaria) ปล่อยออกจากระบบน้ำเหลืองสู่กระแสเลือดของสัตว์ที่ติดโรค (Mak, 1983; Schacher and Sahyoun, 1967)

2.1.2 วงชีวิตของหนอนพยาธิ *B. pahangi*

วงชีวิตของพยาธิ *B. pahangi* เริ่มจากยุงพาหะนำโรค ดูดเลือดโฮสต์ที่มีไมโครพิลลาเรียอยู่ในกระแสเลือด (รูปที่ 1) ไมโครพิลลาเรียเหล่านี้จะเคลื่อนเข้าสู่กระเพาะอาหารของยุงและเริ่มขบวนการพัฒนาตัวอ่อนโดยออกจากชั้นหุ้มลำตัว (exsheathment) ภายในเวลา 5 นาที หลังจากยุงดูดเลือด ไมโครพิลลาเรียที่ไม่มีชั้นหุ้มลำตัวจะเคลื่อนที่ออกจากผนังกระเพาะอาหารไปยังกล้ามเนื้อช่องอกของยุง (thoracic muscle) (Esslinger, 1962) และเจริญพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 เรียกว่า “sausage larva” คือมีลักษณะลำตัวอ้วนสั้น มีการพัฒนาอวัยวะภายใน เช่น หลอดอาหาร (esophagus) ส่วนท้ายของทางเดินอาหารยื่นยาวออก (rectal protruding) ตัวอ่อนในระยะนี้เคลื่อนไหวได้เล็กน้อย ยกเว้นส่วนของตะขอที่มีลักษณะคล้ายหาง (Tail hook) ที่เคลื่อนไหวได้ในบางครั้ง

ภายใน 4 – 5 วัน ตัวอ่อนระยะที่ 1 จะลอกคราบหนึ่งครั้งกลายเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ซึ่งมีความยาวและความกว้างเพิ่มมากขึ้น มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายในลำตัวอย่างรวดเร็ว และมีการพัฒนาของอวัยวะภายใน เช่น ช่องปาก (oral opening) หลอดอาหารและลำไส้ (intestinal canal) ส่วนหางหดสั้นลง เคลื่อนไหวช้าลง ต่อจากนั้นตัวอ่อนระยะที่ 2 จะลอกคราบครั้งที่ 2 เป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือตัวอ่อนระยะติดต่อก (infective larva) ในวันที่ 7 – 8 ตัวอ่อนส่วนใหญ่ที่ลอกคราบแล้วจะเคลื่อนที่ไปยังส่วนหัวและส่วนปาก (proboscis) ของยุง และพัฒนาเจริญเต็มที่ในวันที่ 11 – 12 ความยาวลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประมาณ 1.4 – 1.9 มม. หลอดอาหารและทางเดินอาหารจะยาวขึ้น ไม่ปรากฏส่วนของ rectal protrusion ปลายหางมี caudal papillae ปรากฏขึ้น 3 อันและเคลื่อนไหวได้ดี (Chungpivat, 1989; Schacher, 1962a) เมื่อยุงที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 อาศัยอยู่ที่ proboscis ดูดเลือดโฮสต์ ตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเคลื่อนที่ผ่านแผลยุงกัดหรือดูดเลือด (Ewert, 1967) จากนั้นภายในเวลา 2 – 3 ชั่วโมงตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบน้ำเหลืองของโฮสต์ที่อยู่ใกล้บริเวณกับแผลและเคลื่อนที่ไปยัง perinodal sinus ที่อยู่ใกล้ต่อมน้ำเหลืองมากที่สุด หลังจากนั้นอีกประมาณ 20 วัน ตัวอ่อนจะเคลื่อนย้ายกลับไปสู่ท่อน้ำเหลือง (afferent lymphatic duct) (Suswillo et al., 1982) และอีกประมาณ 8 – 9 วันตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 และเป็นตัวเต็มวัยในที่สุด ประมาณวันที่ 23 – 33 พยาธิตัวผู้และตัวเมียจะเริ่มผสมพันธุ์ในวันที่ 33 และเริ่มปล่อยไมโครพิลลาเรียจากตัวเมียสู่กระแสเลือดประมาณวันที่ 55 (Schacher, 1962b) และพบไมโครพิลลาเรียของหนอนพยาธิในกระแสเลือดของโฮสต์ ประมาณ 55 – 60 วัน หลังจากถูกยุงดูด

เลือด ไมโครฟิลาเรียเหล่านี้สามารถอยู่ในกระแสเลือดของโฮสต์ได้นานถึง 7-8 ปี (Wilson and Ramachandran, 1971)



รูปที่ 1 วงชีวิตของหนอนพยาธิ *B. pahangi*

2.1.3 การก่อโรคของหนอนพยาธิ *B. pahangi*

จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* ในแมว สามารถก่อโรคจากการอักเสบของ afferent sinus ของต่อมน้ำเหลืองที่ขาพับ (popliteal lymph node) ในวันที่ 14 - 15 หลังการรับเชื้อตัวอ่อนส่วนหนึ่งจะเคลื่อนที่ไปที่ afferent lymphatic ducts ทำให้เกิด proliferation ของต่อมน้ำเหลือง และมีการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลือง หลังจากนั้นเกิดการบวมน้ำที่ผนังต่อมน้ำเหลือง เกิดการอุดตันของต่อมน้ำเหลือง เกิดเนื้อตายและขบวนการ fibrosis (Rogers and Denham, 1974)

มีรายงานพบว่า *B. pahangi* สามารถเจริญได้ในคน โดยการทดลองฉีดตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* จำนวน 25 ตัวที่แยกได้จากยุงพาหะที่แขนซ้ายของอาสาสมัครคนหนึ่ง พบว่า มีการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลืองเกิดการอักเสบแบบ lymphangitis ที่บริเวณแขนซ้าย ซ้าย เม็ดเลือดขาว eosinophil มีระดับสูงขึ้นในช่วง prepatent period หลังจากนั้นพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของอาสาสมัครผู้นั้น และพบว่า ไมโครฟิลาเรียสามารถเจริญพัฒนาได้ในยุง และตัวอ่อนสามารถเจริญพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยต่อไปได้ในแมว (Edeson et al., 1960a)

2.1.4 การแพร่ระบาดของหนอนพยาธิ *B. pahangi*

รายงานการแพร่ระบาดของหนอนพยาธิ *B. pahangi* สำหรับในประเทศไทยนั้น พบทั้งในแมวและสุนัข โดยพบแมวที่ติดหนอนพยาธิ *B. pahangi* ตามบริเวณชานเมือง กรุงเทพมหานคร (พรพนจิตต์และอรุณรัตน์, 2528) และเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร โดยพบแมวที่มีไมโครฟิลาเรียของ *B. pahangi* จำนวน 21 ตัวจากแมวทั้งหมด 83 ตัว (คิดเป็น 25.30 %) (สุจิตต์และสุภัทร, 2536) ที่ตำบล อีปันและตำบล ไทรซิ่ง อำเภอ พระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบแมวที่มีไมโครฟิลาเรียจำนวน 4 ตัวจากแมวทั้งหมด 52 ตัว (คิดเป็น 7.6%) (Nuchprayoon et al., 2006) ขณะที่บางรายงาน พบสุนัขที่มีไมโครฟิลาเรียของ *B. pahangi* 2.01 % และสุนัขที่มีไมโครฟิลาเรียของ *B. pahangi* ร่วมกับ *D. immitis* 1.82 % จากสุนัข 496 ตัว ในเขตต่างๆ ของกรุงเทพมหานคร (สุวรรณีและสุจิตต์, 2535)

2.2 หนอนพยาธิฟิลาเรียอื่นๆ

2.2.1 หนอนพยาธิ *Dirofilaria immitis*

หนอนพยาธิหัวใจสุนัข หรือ *D. immitis* เป็นพยาธิฟิลาเรียที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สุนัขและแมว (คนมีโอกาสดูดโรคนี้ได้น้อยมาก, Abadie et al., 1965) ตัวเต็มวัยของพยาธิหัวใจมีรูปร่างเรียวยาว ตัวผู้มีความยาว 12 – 20 ซม. ส่วนหางขดงอ มี spicule 2 อัน ที่ความยาวไม่เท่ากัน และมี cloacal papillae ส่วนตัวเมียมีความยาว 25 – 31 ซม. หางตรงและทู่ มี vulva เปิดออกทางด้านส่วนหน้าบริเวณหลอดอาหาร ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในหัวใจห้องล่างขวา หรือในบางครั้งอาจพบอยู่ใน Pulmonary artery และ Posterior vena cava ซึ่งตัวเต็มวัยเหล่านี้ก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์เป็นอย่างมาก เนื่องจากหนอนพยาธิรบกวนระบบไหลเวียนเลือด ระบบการทำงานของหัวใจ และ ปอด นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อการทำงานของไตด้วย โดยอาการทางคลินิกอาจเป็นแบบเรื้อรังหรือรุนแรง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนหนอนพยาธิและระยะเวลาของการติดเชื้อ (Schaub and Rawlings, 1980; Chakrabarti and Chatterjee, 1982; Dalton et al., 1971)

การติดต่อของหนอนพยาธิหัวใจ หลังจากที่ยุงดูดเลือดสุนัขที่มีไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเข้าสู่กระเพาะยุงแล้ว ในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงมักพบว่าตัวอ่อนเคลื่อนที่เข้าไปยังท่อมัลพิกิเยน (malpighian tube) เจริญและพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 จากนั้นตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเคลื่อนที่จากท่อมัลพิกิเยนไปยังส่วนปากยุง และอาศัยที่โพรงเลเบียบริเวณปากจนติดต่อไปสู่โฮสต์แท้ การเจริญของตัวอ่อนพยาธิในยุง ใช้เวลาประมาณ 15 วัน

ตัวอ่อนระยะที่ 3 เมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 ประมาณ 6 – 8 เดือน จะพบตัวอ่อนระยะที่ 5 ที่หัวใจข้างขวา หรือที่เส้นเลือดแดงพัลโมนารี และอีกประมาณ 2 เดือนตัวอ่อนจะเจริญเป็นตัวเต็มวัยและสามารถผลิตไมโครฟิลาเรียออกสู่กระแสเลือด (Kartman, 1953; Lichtenfels et al., 1985)

ปัจจุบันโรคหนอนพยาธิหัวใจมีการระบาดทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่อยู่เขตร้อนและเขตร้อนชื้น รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีหลายรายงานการศึกษาความชุกของโรคพยาธิหัวใจ โดยได้ตรวจพบตัวเต็มวัยของพยาธิหัวใจในสุนัขจรจัดในพื้นที่ต่างๆ ของกรุงเทพมหานครสูงถึงร้อยละ 24.6 (อาคม, 2524) มีการตรวจพบไมโครฟิลาเรียจากเลือดของสุนัขเลี้ยงในจังหวัดสมุทรปราการสูงร้อยละ 25.2 (สถาพร, 2533) พบตัวเต็มวัยจากสุนัขเลี้ยงและสุนัขจรจัดในกรุงเทพมหานครและปริมณฑล (อาคม, 2535) และในปี 2000 - 2002 มีการสำรวจผลการตรวจเลือดสุนัขจากห้องทดลองที่รับบริการวินิจฉัยโรค 2 แห่งพบการติดเชื้อของพยาธิหัวใจสุนัข 29.2 % และยังพบว่าบริเวณที่มีจำนวนสุนัขที่พบการติดเชื้อมากคือ ผังธนบุรี หนองจอก มีนบุรี และลาดกระบัง (Nithiuthai, 2003) สำหรับการติดเชื้อในแมวเช่น ที่ตำบลอิปันและตำบลไทรซิง อำเภอพระแสง สุราษฎร์ธานีพบแมวที่มีไมโครฟิลาเรีย 1 ตัวจากแมวทั้งหมด 52 ตัว (คิดเป็น 1.9%) (Nuchprayoon et al., 2006) ดังได้กล่าวแล้วในหน้า 7 โดยแมวและสุนัขที่อาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกันสามารถพบอุบัติการณ์ควบคู่กันไป แต่ในแมวจะเป็นโรคนี้น้อยกว่าสุนัข 5 – 20 เปอร์เซ็นต์ของสุนัขที่เป็นโรค (Brown et al., 1999)

2.2.2 หนอนพยาธิ *Brugia malayi*

B. malayi เป็นหนอนพยาธิฟิลาเรียที่สำคัญในคนก่อให้เกิดโรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis, elephantiasis) ตัวเต็มวัยของหนอนพยาธิจะอาศัยอยู่ในระบบน้ำเหลือง ทำให้เกิดการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองและท่อน้ำเหลืองเช่นเดียวกับในสัตว์ เกิดการคั่งของน้ำเหลืองที่บริเวณอวัยวะส่วนปลายเช่น แขนและขา การพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของ *B. malayi* เป็นแบบ Nocturnal periodic type (พบเฉพาะเวลากลางคืน) มีรายงานพบที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ยะลา นราธิวาส และปัตตานี แต่ *B. malayi* ที่พบนั้นเป็นแบบไม่มีวัฏจักรในสัตว์ ส่วนการพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของ *B. malayi* แบบ Nocturnal subperiodic type (พบเวลากลางคืนมากกว่ากลางวัน) จะพบที่ จังหวัดนราธิวาส ชุมพร และนครศรีธรรมราช และมีวัฏจักรในแมว และ สุนัข ส่วน *B. malayi* ที่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดแบบ Diurnal periodic type (พบเฉพาะเวลากลางวัน) จะพบพยาธิชนิดนี้ที่ จ. สุราษฎร์ธานี และมีวัฏจักรในสัตว์ โดยมีเยุงเป็นพาหะนำโรคซึ่งตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 1, 2 และ 3

จะมีการเจริญและพัฒนาในกล้ามเนื้อบริเวณส่วนอกของตัวยุง ก่อนที่จะเคลื่อนมายัง proboscis และติดต่อสู่โฮสต์ (Kim and Seo, 1968; Cross et al., 1980)

2.3 ยุงพาหะนำโรคฟิลาเรียซิส

ยุงที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตามธรรมชาติของ *B. pahangi* สำหรับในประเทศไทยยุง *Mansonia* spp. *Aedes* spp. และ *Armigeres* spp. (สุภัทธร, 2531) นับว่าเป็นพาหะนำโรคฟิลาเรียซิสที่สำคัญ การที่ยุงจะเป็นแมลงนำโรคที่ดีของพยาธิ *B. pahangi* หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ของยุง ทำให้ยุงแต่ละชนิดมีการรับและติดพยาธิ (susceptibility) ต่อปรสิตที่แตกต่างกัน เช่น *Armigeres obturbans* และ *Mansonia annulata* เป็นยุงที่มีประสิทธิภาพในการนำพยาธิ *B. pahangi* ได้ดีมาก *Ae. aegypti* และ *Ma. uniformis* ตัวอ่อนพยาธิสามารถเจริญพัฒนาเป็นระยะติดต่อบ้าง ขณะที่ *Cx. quinquefasciatus* มีการรับและติดพยาธิ ต่อ *B. pahangi* ต่ำ (Choochote et al., 1986; Ewert, 1965a,b; Edeson et al., 1960b) ยุงพาหะที่นำพยาธิ *B. malayi* คือ *Anopheles* spp. และ *Mansonia* spp. (สุภัทธร, 2531) Guptavanij และคณะ (1978) พบว่ายุง *Ma. uniformis* ในจังหวัดปัตตานี และ *Ma. bonnea* และ *Ma. dives* ในจังหวัดนราธิวาสสามารถนำโรคได้ตามธรรมชาติ

ส่วนยุงพาหะของหนอนพยาธิหัวใจสุนัขมีประมาณ 70 ชนิดทั่วโลก (Marquardt et al., 2000) ในหลายสกุล เช่น *Culex* spp., *Aedes* spp., *Armigeres* spp., *Anopheles* spp. และ *Mansonia* spp. แต่มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับชนิดของยุงที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิหัวใจสุนัขน้อย เช่น Surathint และคณะ (1985) พบว่า *Ma. uniformis*, *Ma. indiana* และ *Ma. annulifera* เป็นยุงนำโรคที่สำคัญในประเทศ จากการสำรวจชนิดของยุงที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่พบว่า ยุง *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* และ *Ae. albopictus* เป็นยุงที่นำโรคได้ในธรรมชาติ (Choochote et al., 1992) และในเขตพื้นที่ชนบทของจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ายุง *Ma. uniformis* เป็นยุงที่นำโรคได้ในธรรมชาติ (Choochote et al., 1987)

ยุง *Ae. aegypti* ถูกนำมาเลี้ยงในห้องทดลองเพื่อใช้ในการศึกษาต่างๆ รวมถึงการศึกษาพยาธิวิทยาในยุงด้วย เช่น มีการศึกษาความไวต่อการติดหนอนพยาธิของยุงในการเป็นแมลงนำโรค โดยพบ *Ae. aegypti* ที่มีอัตราการติดตัวอ่อนระยะที่ 3 ถึง 35 % ซึ่งยุง 1 ตัวจะพบตัวอ่อนระยะที่ 3 เฉลี่ย 3.3 ตัว (Ewert et al., 1987) และในยุง *Ae. aegypti* สามารถพบยุงที่มีตัวอ่อนพัฒนาจนกลายเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 95% ขณะที่บางสายพันธุ์อาจไม่พบตัวอ่อนระยะที่ 3 ในยุงเลยหรือพบประมาณ 2 % (Rodriguez, 1973; Ewert, 1965a)

การที่ยุงแต่ละชนิดมีความไวต่อพยาธิฟิลาเรียที่แตกต่างกัน เป็นปัจจัยหนึ่งของการเป็นพาหะนำโรค เนื่องจากสรีรวิทยาของยุงที่มีอวัยวะสำหรับป้องกันอันตราย (mosquito armature) ลักษณะเป็นหนาม อยู่ในส่วนต้นของทางเดินอาหาร ซึ่งจะทำอันตรายต่อไมโครฟิลาเรีย ขณะถูกดูดผ่านส่วนปากเข้าสู่ภายในตัวยุง โดยมีอยู่ 2 ส่วนคือ cibarial armature และ pharyngeal armature ยุง *Anopheles* spp. มี armature ทั้ง 2 ส่วน จึงสามารถทำลายไมโครฟิลาเรียได้ตั้งแต่ 36 – 96% ขณะที่ยุง *Culex pipiens fatigans* มี armature ทั้ง 2 ส่วนแต่ cibarial armature เจริญไม่ดีทำให้ทำลายไมโครฟิลาเรียได้เพียง 6 % แต่ยุง *Ma. uniformis* และยุง *Aedes* spp. มี pharyngeal armature เพียงอย่างเดียว ซึ่ง *Aedes* spp.สามารถทำลายไมโครฟิลาเรียได้ 2 – 22 % (Bryan et al., 1974, McGreevy et al., 1978)

2.4 การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด

ปรากฏการณ์ของ biting cycle ของยุงนำโรคและการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (periodicity) ทำให้เกิดความสัมพันธ์ที่ส่งผลต่อการแพร่ระบาดของพยาธิ การที่ยุงมีช่วงเวลาในการออกหากินช่วงเดียวกับที่มีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียสูงสุด จะทำให้ยุงนำโรครับเชื้อได้มากที่สุด โอกาสการแพร่เชื้อจึงมีมากที่สุดด้วย (สุภัทร, 2531) จากการศึกษา microfilaria periodicity ในแมวที่ติดพยาธิ *B. pahangi* ในกรุงเทพมหานคร พบว่า การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดแมวเป็นแบบ Nocturnal subperiodic โดยมีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดสูงที่สุด คือ 23.16 น. (สุตจิตต์ และ สุภัทร, 2533) พยาธิ *D. immitis* มีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียแบบ Nocturnal subperiodic (สุวรรณณี และ สุตจิตต์, 2534; Nogami et al., 2000) ขณะที่ *B. malayi* ที่พบในไทยมีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรีย 3 แบบคือ 1) Nocturnal periodic type 2) Nocturnal subperiodic type และ 3) Diurnal periodic type นอกจากนี้การเจริญของปรสิตยังขึ้นกับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมด้วย ในบรรยากาศเย็นการเจริญของตัวอ่อนในยุงจะเป็นไปได้ช้า ขณะที่ในเขตอากาศอบอุ่นหนอนพยาธิปรสิตจะเจริญได้รวดเร็วกว่า (Rodriguez and Thompson, 1974)

2.5 การตรวจวินิจฉัยโรคฟิลาเรียซิส

เนื่องจากพยาธิฟิลาเรียแต่ละชนิดจะมีรูปร่างลักษณะของไมโครฟิลาเรียที่ถูกปล่อยในกระแสเลือดคล้ายคลึงกันมาก เช่น *B. pahangi* กับ *B. malayi* และอาจพบการติดต่อร่วมกันของพยาธิฟิลาเรียในโฮสต์ตัวเดียวกัน เช่น การพบ *B. pahangi* ร่วมกับ *D. immitis* (สุวรรณณี และ สุตจิตต์, 2535) การตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญในการตรวจหา

และระบุชนิดของพยาธิพลาเรีย วิธีการตรวจวินิจฉัยพยาธิพลาเรียในโฮสต์ มีเป้าหมายในการตรวจแตกต่างกัน คือ 1) ตรวจหาตัวปรสิตหรือหาผลิตภัณฑ์ของหนอนพยาธิ เช่น circulating antigen หรือ สารพันธุกรรม DNA 2) ตรวจหาการตอบสนองของทางระบบภูมิคุ้มกันที่มีต่อปรสิต (immune response) 3) ตรวจวินิจฉัยทางพยาธิคลินิก Clinical pathology (Nutman, 2000)

2.5.1 การตรวจหาไมโครพลาเรียในกระแสเลือด

การตรวจหาไมโครพลาเรียในกระแสเลือด เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการหรือในคลินิกที่ต้องการระบุชนิดหรือนับจำนวนของไมโครพลาเรีย ด้วยการนำเลือดไปทำเป็นแผ่นเลือดหนาและแผ่นเลือดบาง จากนั้นทำการย้อมสีแผ่นเลือดด้วยสียิมซ่า 3% (Sucharit et al., 1975) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการจำแนกชนิดของไมโครพลาเรียดังนี้

2.5.1.1 การแยกชนิดไมโครพลาเรียของหนอนพยาธิชนิดต่างๆ

จากการศึกษาไมโครพลาเรียในกระแสเลือดของ *B. pahangi* พบว่า การทำแผ่นเลือดแล้วย้อมสีทางฮีสโตเคมี สามารถแยกชนิดของไมโครพลาเรียของ *B. pahangi* จากพยาธิพลาเรียชนิดอื่นๆ ได้เนื่องจากการย้อมสีทาง Acid phosphatase activity จะทำให้ไมโครพลาเรียติดสีแดงชัดเจนบริเวณที่มี Acid phosphatase activity เกิดขึ้นคือบริเวณ amphids, excretory vesicle, anal vesical และ phasmids และลำตัวติดสีแดงทั้งตัว (สุดจิตต์และสุวรรณณี, 2543; Redington et al., 1975) ขณะที่ไมโครพลาเรียของ *B. malayi* จะติดสีแดงจางๆ ที่บริเวณ amphids, excretory vesicle, anal vesical และ phasmids แต่ลำตัวไม่ติดสีแดง ส่วน *D. immitis* ติดสีแดงเข้มที่บริเวณ excretory vesicle และ anal vesical (ตารางที่ 1)

สำหรับ ไมโครพลาเรีย *B. pahangi* ที่ได้จากการย้อมสียิมซ่าจะมีความคล้ายคลึงกับ ไมโครพลาเรียของ *B. malayi* มาก ทำให้ต้องแยกจากความยาวของ inner body เท่านั้น โดย inner body ของ *B. pahangi* จะมีความยาว 21.7 % ของความยาวลำตัวทั้งหมด (44 – 63 μm) และ ความยาว inner body ของ *B. malayi* เท่ากับ 13.8 % ของความยาวลำตัวทั้งหมด (24 – 35 μm) ขณะเดียวกันสามารถแยกไมโครพลาเรียของพยาธิ *Brugia* และ *D. immitis* ออกจากกันได้ง่าย เนื่องจากไมโครพลาเรียของ *D. immitis* ไม่มี sheath ส่วน cephalic space มีความยาวมากกว่าความกว้าง และภายในมีนิวเคลียสอยู่ 1 อัน (สุดจิตต์ และสุภัทร, 2536; Sucharit et al., 1975; Sivanandam and Fredericks, 1966)

ตารางที่ 1 การแยกชนิดไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. ที่ได้จากการย้อมเอ็นไซม์ Acid Phosphatase

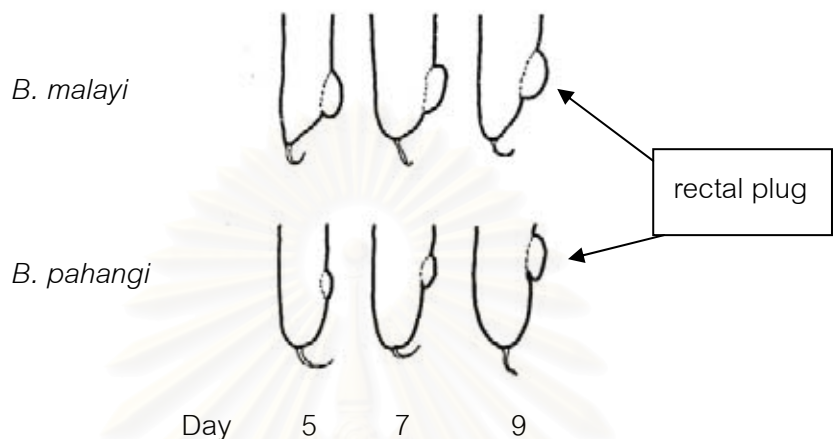
<i>B. malayi</i>	<i>B. pahangi</i>	<i>D. immitis</i>	<i>D. repens</i>	อ้างอิง
- ติดสีแดงบริเวณ amphids	- ติดสีแดงทั่วทั้งลำตัว - ติดสีแดงเข็มบริเวณ amphids	- ติดสีแดงเข็มบริเวณ excretory vesicle	- ติดสีแดงบริเวณ Inner body	Yen and Mak, 1978
phasmids	phasmids	anal vesicle	anal vesicle	
excretory vesicle	phasmids			
anal vesicle	excretory vesicle			
	anal vesicle			

2.5.2 การแยกชนิดของตัวอ่อนหนอนพยาธิฟิลาเรีย

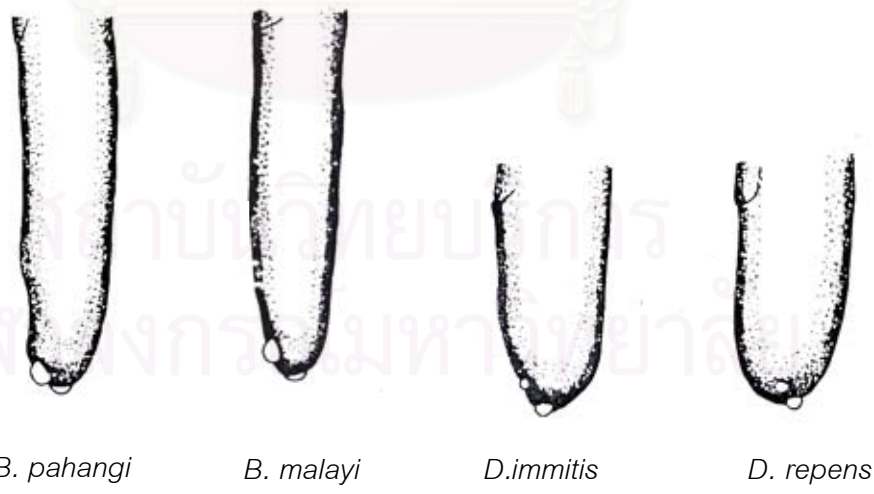
การศึกษาระบาดวิทยาของ *B. pahangi* นอกจากทำการตรวจหาไมโครฟิลาเรียจากโฮสต์โดยตรงแล้ว ยังสามารถทำการตรวจหาตัวอ่อนพยาธิในยุงได้ โดยการดักยุงจากธรรมชาติ ทำให้สลบหยุดนิ่ง จากนั้นทำการชำแหละยุง และตรวจหาตัวอ่อนพยาธิในตัวยุง เนื่องจากตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียแต่ละชนิดและแต่ละระยะจะอาศัยอยู่ในอวัยวะของยุงที่แตกต่างกัน เช่น ตัวอ่อนของ *B. pahangi* จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่ออาศัยในบริเวณ thoracic muscle (Esslinger, 1962) โดยลักษณะรูปร่างของตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 จะมี rectal protrusion ขนาดเล็กกว่าของ *B. malayi* และอยู่ห่างจากส่วนท้ายลำตัวของตัวอ่อนมากกว่า *B. malayi* (รูปที่ 2) (Chungpivat, 1989; Beckett and Macdonald, 1971, 1972) สำหรับตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *B. pahangi* สามารถแยกจากพยาธิฟิลาเรียชนิดอื่นโดยตรวจสอบจากความยาวและความกว้างของลำตัว anal ratio และลักษณะรูปร่างและตำแหน่งของ caudal papillae

เมื่อเปรียบเทียบตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *B. pahangi* กับ *B. malayi* พบว่า *B. pahangi* มีลำตัวเรียวยาวกว่า *B. malayi* และ anal ratio มีขนาดใหญ่กว่า *B. malayi* caudal papillae มีความคล้ายคลึงกันมาก ทำให้ไม่สามารถแยกลักษณะและตำแหน่งของ caudal papillae จากพยาธิทั้งสองชนิดจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยายสูงได้ (ตารางที่ 2) (Chungpivat, 1989; Yen et al., 1982) ดังนั้นการตรวจหาตัวอ่อนด้วยวิธีนี้ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจ เนื่องจากตัวอ่อนของพยาธิฟิลาเรียแต่ละชนิดในระยะเดียวกันมีลักษณะที่

คล้ายกัน ประกอบกับหากมีตัวอย่างจำนวนมากผู้วิจัยจึงใช้เวลาในการตรวจนาน ในปัจจุบัน จึงมีการพัฒนาการตรวจด้วยวิธีอื่น เช่น การตรวจหาตัวอ่อนพยาธิปลาเรียในยุงโดยใช้เทคนิคทาง อณูชีววิทยา เป็นต้น



รูปที่ 2 ความแตกต่างของ ractal protrusion ระหว่างตัวอ่อนพยาธิ *B. malayi* กับ *B. pahangi* (Beckett and Macdonald, 1971)



รูปที่ 3 ความแตกต่างของ caudal papillae ของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิปลาเรียชนิดต่างๆ (Yen et al., 1982)

ตารางที่ 2 รูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของหนอนพยาธิฟิลาเรีย (Yen et al., 1982)

	<i>B. pahangi</i>	<i>B. malayi</i>	<i>D. immitis</i>	<i>D. repens</i>
ความยาว (μm)	1360 - 1850	1220 - 1730	820 - 1120	790 - 1020
ความกว้าง (μm)	27.1	29.86	25.94	28.85
ความยาว/ head ratio	13.06	13.57	11.2	10.4
หลอดอาหาร	-	-	มากกว่า 300 μm	น้อยกว่า 300 μm
anal ratio	4.01	3.53	1.99	1.94

2.6 การแสดงออกของยีนและการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA)

ยีน เป็นสายดีเอ็นเอที่สามารถถ่ายทอดลักษณะทางกรรมพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตสู่การสร้างโปรตีน โดยประกอบด้วยส่วนที่มีการถอดรหัส (Transcribed region) และส่วนที่มี Promotor และ Terminator ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่เกิดการแสดงออกของยีน การแสดงออกของยีนคือการที่ดีเอ็นเอทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์สำหรับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ด้วยกระบวนการถอดรหัส (Transcription) ถ้าอาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นเป็นอาร์เอ็นเอส่งข่าว (messenger RNA หรือ mRNA) จะถูกแปลรหัส (Translation) ให้เป็นลำดับของกรดอะมิโนในการสร้างโปรตีน โดยการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอจะเกิดขึ้นในนิวเคลียส แต่การแปลรหัสจะเกิดในไซโตพลาสซึม

การทดลองนี้ใช้ mRNA ของยีน Troponin และ Tropomyosin เป็น molecular marker เพื่อตรวจสอบระยะตัวอ่อนของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ที่พัฒนาอยู่ในยุงพาหะ การประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยานี้เป็นการลดอุปสรรคและความยุ่งยากในการชำแหละยุงและเพื่อส่งเสริมและยืนยันการตรวจและสำรวจการพัฒนาในระยะในยุง ที่นำไปสู่การสำรวจยุงที่เป็นพาหะตามธรรมชาติของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ได้ในกรุงเทพและเมืองใหญ่อื่นๆต่อไป

2.7 การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีนที่จำเพาะต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *B. pahangi*

Actin และ Tropomyosin เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของสายบาง (thin filament) ในกล้ามเนื้อ โดย Troponin เป็นโปรตีนที่เกาะอยู่บน actin (Kimura et al., 1987; Harris et al., 1977) Troponin และ Tropomyosin มีหน้าที่ในการควบคุมการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อ ซึ่งจะพบได้ที่ผนังลำตัวและทางเดินอาหาร (Terami et al., 1999) และจากการที่ตัวอ่อนระยะที่ 3 เป็นตัวอ่อนระยะเดียวในยุงที่มีทางเดินอาหารที่สมบูรณ์ (Schacher,

1962a) จึงพบการแสดงออกของยีน Tropomyosin และ Troponin ในตัวอ่อนระยะที่ 3 ในยุง (Hunter et al., 1999) ในขณะที่ cuticular collagen เป็นส่วนประกอบของผนังลำตัวของพยาธิทุกระยะ โดยเฉพาะในช่วงระหว่างที่พยาธิมีการลอกคราบจะพบว่าการแสดงออกของยีน collagen สูงที่สุด (Johnstone and Barry, 1996) ดังนั้นจึงเลือกยีน Tropomyosin และ Troponin มาใช้เป็น stage specific marker ของการทดลองนี้

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สนใจจากอาร์เอ็นเอแม่แบบ ประกอบด้วย 2 ปฏิกริยา คือ reverse transcription เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA-cDNA) จากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอ โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) และปฏิกริยา PCR มาตรฐาน โดยใช้ cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์ที่จำเพาะต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 (Hunter et al., 1999) ได้แก่ ยีน Cuticular collagen, Tropomyosin และ Troponin (ตารางที่ 3)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 รายละเอียดของขนาดและลำดับเบสของยีนที่พบในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *B. pahangi* เมื่อเปรียบเทียบกับ *B. malayi* (อ้างอิงจาก Hunter et al., 1999)

ยีน	รหัส Accession	ขนาดของยีนที่ โคลนได้/ขนาด ของ Transcript	ความคลึงกับยีน อื่นๆ	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง
SJ1	AJ224966	303/2.3	Tropomyosin	<i>B. malayi</i> (EST L3) AA585557 98% <i>A. viteae</i> (cds) AF000607 86% <i>T. colubriformis</i> (cds) JO4669 80%
SJ5	AJ224967	404/1.84	Troponin	<i>B. malayi</i> (cds) AI234402 93% <i>O. volvulus</i> (EST L3) AI205465 81% <i>C. elegans</i> (cds) U44759 60%
A	AJ130821	700/N.D.	24kDa secreted protein	<i>B. malayi</i> (cds L3) AF072679 95% <i>D. immitis</i> (cds) U29533 72%
C	AJ224968	294/1.7	P22U P22U mRNA Collagen 12/13	<i>O. volvulus</i> (cds) U77675 70% <i>B. malayi</i> (EST L3) U80975 99% <i>C. elegans</i> (12) (cds) X51622 63% <i>C. elegans</i> (13) (cds) X51623 63% <i>O. circumcincta</i> (cds) X96732 63%
F	AJ224969	436/2.0	Collagen1	<i>B. malayi</i> (EST L3) AA280451 96% <i>C. elegans</i> (cds) J01047 76%

N.D., Not determined.

EST, expressed sequence tags; cds, coding sequence.

2.8 การตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ในอุ้งของพยาธิ *Brugia* spp.

การตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ในอุ้งส่วนมากใช้วิธีชำแหละอุ้งเพื่อตรวจหาตัวอ่อน เนื่องจากอุ้งจะมีความสามารถในการนำโรคได้หรือไม่ขึ้น ขึ้นกับความไวต่อการติดโรคของพยาธิ *Brugia* และการเจริญพัฒนาของไมโครฟิลาเรียจนถึงตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะที่พร้อมจะติดต่อสู่โฮสต์ขณะที่อุ้งเพศเมียดูดเลือดโฮสต์ ดังนั้นการตรวจหาพยาธิ *Brugia* โดยเฉพาะตัวอ่อนระยะที่ 3 จึงเป็นมูลเหตุจูงใจสำคัญของงานวิจัยนี้ โดยจะทำการแสดงออกของยีนโทรโปนิน และโทรโปไมโอซินในการตรวจหาทรานสคริปของยีนเหล่านี้ในอุ้งที่ติดเชื้อพยาธิและใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจวินิจฉัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- 3.1 การเตรียมแมวและสุนัขทดลองเพื่อให้ไมโครพลาเรียแก่ยุ่ง
 - 3.1.1 แมวทดลอง
 - 3.1.2 สุนัขทดลอง
- 3.2 การเตรียมยุงทดลองเพื่อศึกษาตัวอ่อนระยะต่างๆของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis*
 - 3.2.1 ยุงทดลอง
 - 3.2.2 การเพาะเลี้ยงยุงทดลอง
 - 3.2.3 การเตรียมตัวอ่อนของหนอนพยาธิพลาเรียในยุง
- 3.3 การทดลองเพื่อจำแนกระยะและชนิดของตัวอ่อน
 - 3.3.1 ศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* กับ *D. immitis* ในยุงทดลอง
 - 3.3.2 ทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปชันกับทรานสคริป (mRNA) ของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินที่พบในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi*
 - 3.3.2.1 ทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน
 - 3.3.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน
 - 3.3.2.2.1 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับทรานสคริป
 - 3.3.2.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับดีเอ็นเอ
 - 3.3.3 การวิเคราะห์และประเมินผล

3.1 การเตรียมแมวและสุนัขทดลองเพื่อให้ไมโครพลาเรียแก่ยุ่ง

3.1.1 แมวทดลอง

แมวทดลองที่มีไมโครพลาเรียของพยาธิ *B. pahangi* ในกระแสเลือด จำนวน 2 ตัว นำมาใช้เป็นตัวให้ไมโครพลาเรียแก่ยุ่ง (donor) ซึ่งแมวที่ติดพยาธินี้จะถูกเลี้ยงไว้ที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีการควบคุมฝูงลวดรอบห้อง 2 ชั้นเพื่อป้องกันยุง ที่ชั้น 5 อาคาร 60 ปี หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547

3.1.2 สุนัขทดลอง

สุนัขทดลองที่มีไมโครฟิลาเรียของพยาธิ *D. immitis* ในกระแสเลือด จำนวน 1 ตัว นำมาใช้เป็นตัวให้ไมโครฟิลาเรีย (donor) ซึ่งสุนัขที่ติดพยาธินี้จะถูกเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ชั้น 5 อาคาร 60 ปี หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545

3.2 การเตรียมยุงทดลองเพื่อศึกษาตัวอ่อนระยะต่างๆของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis*

3.2.1 ยุงทดลอง

ยุงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ ยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) ที่เพาะเลี้ยงไว้อย่างต่อเนื่อง ที่ห้องเลี้ยงยุงหน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548

3.2.2 การเพาะเลี้ยงยุงทดลอง

3.2.2.1 ห้องสำหรับเพาะเลี้ยงยุงทดลอง

ห้องสำหรับเพาะเลี้ยงยุงทดลอง (insectarium room) ที่หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นห้องที่มีมุ้งลวด มีกับดักยุง และประตูกัน 2 ชั้น เพื่อป้องกันการหลุดรอดของยุงทดลองออกสู่สิ่งแวดล้อม ควบคุมที่อุณหภูมิห้อง ที่ 25 – 27 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 80 – 90 %

3.2.2.2 อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงยุงระยะตัวอ่อน ตัวกลางวัยและตัวเต็มวัย

อุปกรณ์สำหรับระยะตัวอ่อน

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงระยะตัวอ่อนคือ ถาดพลาสติกขนาด 7x12x3 นิ้ว ตาข่ายสำหรับปิดบนถาดพลาสติก น้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเป็นน้ำที่ไม่มีคลอรีน โดยจะกักน้ำทิ้งไว้ในถังอย่างน้อย 1 วันก่อนนำมาใช้

อุปกรณ์สำหรับระยะตัวกลางวัยและตัวเต็มวัย

อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงยุงระยะตัวกลางวัย ได้แก่ ถ้วยพลาสติกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 นิ้ว และปิเปตพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร สำหรับยุงตัวเต็มวัยมีอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงคือกรงเลี้ยงยุงที่กรุด้วยมุ้งลวด 4 ด้านขนาด 32.5x33.5x32.5 เซนติเมตร (รูปภาคผนวกที่ 1) กล่องพลาสติกแบบใสพร้อมฝาปิด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว ด้านข้างกล่องเจาะรูขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตรจำนวน 1 ฐ ส่วนตรงกลางของฝาดัดออกให้เหลือแต่ขอบฝาและ
ฝาโปร่งสีเหลี่ยมจัตุรัสขนาด 7x7 นิ้ว (รูปภาคผนวกที่ 2)

อุปกรณ์ที่ใช้เสร็จแล้วทุกชิ้นต้องนำไปต้มหรือลวกด้วยน้ำร้อนก่อนนำมาล้างด้วย
น้ำประปา เพื่อป้องกันไม่ให้ไข่และตัวอ่อนของยุงตกลงไปเจริญในสิ่งแวดล้อมภายนอก

3.2.2.3 อาหารสำหรับเลี้ยงยุง

อาหารสำหรับเลี้ยงยุงตัวอ่อนจะใช้อาหารหนูปดละเอียดผสมกับตับหมูอบแห้ง
บด ปั่นให้เป็นก้อนเล็กๆใส่ลงในภาดพลาสติกที่มีตัวอ่อนอยู่ สำหรับยุงตัวเต็มวัยจะเลี้ยงด้วย
น้ำตาล (10% sugar solution) และวิตามินรวม โดยการนำสำลีที่พันไม้ไว้ชุบน้ำหวานพอ
หมาดๆใส่ในขวดที่มีน้ำตาลอยู่ วางไว้ในกรง เปลี่ยนน้ำตาลและวิตามินทุก ๆ 2 วัน

3.2.2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain)

ไข่ยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) ที่อยู่บนกระดาษกรอง ได้จากหน่วยปรสิต
วิทยา นำมาแช่ในน้ำที่ปราศจากคลอรีน ภายใน 1 ชั่วโมงตัวอ่อนจะฟักออกมาจากไข่ ทำการ
แยกตัวอ่อนใส่ในภาดพลาสติกที่มีน้ำอยู่ 1.5 ลิตร ภาดละ 200 ตัว ให้อาหารทุกวัน ปิดภาดเลี้ยงตัว
อ่อนด้วยตาข่าย เปลี่ยนน้ำวันเว้นวันเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเน่าเสีย เมื่อตัวอ่อนลอกคราบครั้งสุดท้าย
กลายเป็นตัวกลางวัย ใช้ปิเปตพลาสติกดูดตัวกลางวัยใส่ในถ้วยพลาสติกถ้วยละ 200 ตัว แล้ว
นำไปใส่ไว้ในกรงเลี้ยงยุงเพื่อให้ตัวกลางวัยฟักเป็นยุงตัวเต็มวัยภายในกรง แต่ละกรงจะมียุงตัวเต็ม
วัย 2000 ตัว ให้น้ำหวาน (10% sugar solution) และวิตามินรวมเป็นอาหาร เมื่อยุงอายุ 3 – 5
วันจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.3 การเตรียมตัวอ่อนของหนอนพยาธิปลาเรียในยุง

นำยุงทดลองที่มีอายุ 3 – 5 วัน จากข้อ 3.2.2.4 อดน้ำตาล อย่างน้อย 6 ชั่วโมง
อดอาหารและน้ำของสุนัขหรือแมวที่มีไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนการ
ทดลอง ก่อนให้ยุงทดลองดูดเลือดนำสุนัขหรือแมวมาทำการตรวจสอบความหนาแน่นของไมโครฟิ
ลาเรีย (microfilaria density) โดยสะกิดใบหูสัตว์ทดลองให้เป็นแผลเล็กน้อย แล้วใช้ Sahli
pipette ดูดเลือด 20 μ l ทำฟิล์มเลือดหนา (three line thick smear) จำนวน 3 แผ่น รวม 60 μ l
เพื่อนับจำนวนไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด จากนั้นทำให้สัตว์สลบตามเทคนิคการวางยาสลบของ
มาริชคักร์ (2544) วางตัวสัตว์ที่สลบแล้วให้นอนตะแคงด้านใดด้านหนึ่งลงบนกรงเลี้ยงยุง ปล่อยให้
ให้ยุงดูดเลือดสัตว์ทดลองเป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง (รูปภาคผนวกที่ 3) เลี้ยงยุงด้วยน้ำตาลและ
วิตามินรวมตลอดการทดลอง ยุงทั้งหมดจะถูกแบ่งใช้ 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ดูดแยกยุงตัวเมียที่ดูดเลือดอิมเต็มที่ (engorged female) ด้วย aspirator ใส่ในกรงใหม่กรงละ 2000 ตัว ตั้งแต่วันที่ 1 หลังยุงได้รับไมโครพลาเรียดูดแยกยุงใส่กล่องพลาสติกวันละ 2 กล่อง ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน กล่องที่ 1 มียุง 30 ตัว ทำให้อายุสลบด้วย ether นำไปฆ่าและเพื่อตรวจนับจำนวนและศึกษาลักษณะของตัวอ่อน กล่องที่ 2 มียุง 100 ตัว นำไปทำให้สลบด้วยความเย็นจัด กำจัดปีกและขาออก แบ่งเก็บในหลอดทดลองหลอดละ 20 ตัว เก็บในตู้-80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้สำหรับการสกัด RNA

ส่วนที่ 2 ดูดแยกยุงตัวเมียใส่กล่องพลาสติกวันละ 1 กล่องๆละ 80 ตัว นำไปสกัด RNA (ข้อ 3.3.2.1.1) ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบ 14 วัน นำยุงที่เหลือในกรงทั้งหมดมาทำ mass dissection โดยการทำให้ยุงสลบด้วยความเย็นจัด นำยุงทั้งหมดใส่ในถุงพลาสติก แล้วใช้หลอดแก้วกดบดตัวยุงให้พองแตก ใส่ PBS (Phosphate buffer saline) ลงในถุงยุงที่บดแล้ว และกรองผ่านตะแกรง (รูที่ภาคผนวกที่ 4) ลงในจานแก้วขนาดใหญ่ที่มี PBS แช่ตะแกรงไว้ในจานแก้วปล่อยทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเคลื่อนที่ออกมาจากตัวยุงและลอดผ่านตะแกรงลงมาอยู่ในจานแก้ว ตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ แล้วใช้ปิเปตดูดเก็บตัวอ่อนระยะที่ 3 ใส่ใน 1.5 microcentrifuge tube หลอดละ 600 ตัว นำตัวอ่อนระยะที่ 3 นี้ไปสกัด RNA ในขั้นตอน 3.3.2.1.1

3.3 การทดลองเพื่อการจำแนกระยะและชนิดของตัวอ่อน

3.3.1 ศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* กับ *D. immitis* ในยุงทดลอง

3.3.1.1 การวัดขนาดและลักษณะรูปร่างของตัวอ่อน

นำยุงจากข้อ 3.2.3 ที่ดูดแยกใส่กล่องพลาสติก กล่องที่ 1 จำนวน 30 ตัว ทำให้อายุสลบด้วย ether กำจัดปีกและขาของยุง และใช้ dissecting needle ฆ่าและยุงได้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอออกเป็น 3 ส่วนคือส่วนหัว ออกและท้อง นำยุงแต่ละส่วนวางลงใน normal saline แต่ละหยดบน แผ่นกระจกสไลด์ ฆ่าและยุงแต่ละส่วนต่อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ นำไปตรวจหาตัวอ่อนด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Compound light microscope) ศึกษารูปร่างลักษณะ บริเวณที่พบ นับจำนวนตัวอ่อนที่พบ ถ่ายรูป วาดรูปและวัดขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่ติดตั้ง camera lucida บันทึกผลการทดลอง

3.3.1.2 การย้อมสีฮีมาและคาร์บอกซีไมโคร Acid phosphatase

นำตัวอ่อนที่ตรวจพบไปย้อมสี 3% ยิมซ่า นาน 45 นาทีและย้อมสีทางฮีสโตเคมี Acid phosphatase activity โดยใช้ Naphaol AS-TR Phosphate เป็นสับสเตรท และ Pararosaniline hydrochloride (Sigma) เป็นตัวย้อมสีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Chungpivat (1989) (วิธีย้อมอยู่ในภาคผนวก) บันทึกรูป ถ่ายรูป ทำเช่นนี้ทุกวันจนครบ 14 วัน โดยใช้สไลด์แผ่น เลือดที่มีไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* เป็นตัวควบคุมการย้อม สียิมซ่าและปฏิกิริยาของ Acid phosphatase activity

3.3.2 ทดสอบปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปชันกับทรานสคริป (mRNA) ของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินที่พบในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi*

3.3.2.1 ทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน

การทดสอบความไวนั้นดำเนินการทดลองสองวิธี เพื่อหาสภาพที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการตรวจหาทรานสคริปของยีน มีดังนี้

3.3.2.1.1 เทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปชันแบบขั้น เดียว (One Step RT-PCR)

สกัด RNA ของยุงตัวเมียที่ดูดแยกมา 80 ตัวหลังจากยุงได้รับเชื้อทุกวันและสกัด RNA จากตัวอ่อนระยะที่ 3 จำนวน 600 ตัว (ตามข้อ 3.2.3 ส่วนที่ 2) โดยใช้ NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เก็บ RNA ไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

ปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสมีดังต่อไปนี้ ใช้ 10x RobusT™ Reaction Buffer 2.5 ไมโครลิตร, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, Forward primer 0.2 μM, Reverse primer 0.2 μM, M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase H⁻ 10 ยูนิต (5 units/μl), DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase 1 ยูนิต (1 unit/μl), RNA 6 μl และ RNase free water รวมทั้งหมดใน 1 ปฏิกิริยา เท่ากับ 50 μl negative control (Template free control) ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ RNase free water และเมื่อผสมสารทั้งหมดใส่ในหลอด PCR แล้ว นำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ cDNA synthesis: 37 องศาเซลเซียส 60 นาที 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบของปฏิกิริยาโพลีเมอเรส ประกอบด้วย Denaturing step 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing step 40 องศาเซลเซียส/37 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension step 72 องศาเซลเซียส 3 นาที Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วคงอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ไว้ที่

4 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์มาวิเคราะห์ด้วยการทำ 2% agarose gel electrophoresis โดยใช้ ethidium bromide เป็นสีย้อม และ TAE buffer (Tris-acetic-EDTA buffer) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 60 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR มาดูภายใต้แสง ultraviolet และถ่ายรูปเก็บไว้สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อยีนที่พบในตัวอ่อนระยะที่ 3 (Hunter et al., 1999) รายละเอียดการใช้ชุดหมุ่ที่เหมาะสมกับขั้นตอน annealing step มีดังนี้ ตารางที่ 4 แสดงชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบตรวจหาทรานสคริปของยีน

ยีน	ไพรเมอร์		Tm °C	Annea- ling Temp °C	ผลิต ภัณฑ์ PCR Bp
Tropomyosin (AJ224966)	TR1F	5'CTAAAGCAAAAATGGATGCGATCAAG3'	59	40	226
	TR3R	5'TCCAAATTAGTATTTGCAACAGC3'	51	40	
Troponin (AJ224967)	ER1F	5' GATTGCATAGAGAGAATGGC 3'	58	37	221
	ER3R	5' GCTTCAGTTTGTTCAGCCGG 3'	62	37	

3.3.2.1.2 เทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปชันแบบสองขั้น (Two Step RT-PCR)

เมื่อเก็บตัวอย่างครบ 14 วัน แบ่งลงในหลอดทดลองที่เก็บไว้ที่ - 80 องศาเซลเซียส (ตามข้อ 3.2.3 ส่วนที่ 1) ใส่หลอดใหม่หลอดละ 10 ตัวแช่ในไนโตรเจนเหลว 10 – 15 วินาที เพื่อให้ง่ายต่อการทำให้เซลล์ของยุงแตกแล้ว ใช้ pestle บดให้ละเอียดก่อนนำไปสกัด RNA ด้วย NucleoSpin[®] RNA II Kit หรือสกัด RNA โดยใช้ TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) มีวิธีการดังนี้ เติม TRIzol 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วน supernatant ใส่ในหลอดใหม่ วางหลอดไว้ที่อุณหภูมิ 15 – 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม chloroform 100 µl เขย่าด้วยมือ 15 วินาทีและวางหลอดไว้ที่อุณหภูมิ 15 – 30 องศาเซลเซียส 2 – 3 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนที่ใสไม่มีสีใสในหลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย isopropyl alcohol 250 µl วางหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15 – 30 องศาเซลเซียสและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายออก ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอน RNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลาย RNA ใน RNase free water 50 µl และเติม RNase inhibitor 0.5 µl (20 units) แบ่งใส่ในหลอดๆละ 10 µl เก็บไว้ที่ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน การปั่นเหวี่ยงทุกครั้งต้องทำที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส นำ RNA ที่สกัดจากวันที่ 1-14 มาทำ Two Step RT-PCR โดยขั้นตอนที่ 1 เป็นการสังเคราะห์ cDNA และขั้นตอนที่ 2 เป็นการ

เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR การสังเคราะห์ cDNA เริ่มจากผสม M-MuLV Buffer 2 μ l (ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 30 mM KCl, 8 mM $MgCl_2$ และ 10 mM dithiothreitol (DTT)) กับ 0.5 mM dNTP, Random hexamer หรือ Oligo d(T) 1 μ M, RNase inhibitor 0.5 μ l (20 units), RNA 5 μ l และ RNase free water รวม 18 μ l ใส่ในหลอด PCR แล้วนำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นในน้ำแข็ง 5 นาที ก่อนเติม M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase H⁻ 20 units (200 units/ μ l) และแช่หลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ cDNA รวม 20 μ l

ขั้นตอนที่ 2 เทคนิค PCR มีส่วนประกอบคือ 10x Mg^{2+} -free DyNAzyme™ EXT Buffer (ที่ความเข้มข้น 1x ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25 °C), 15 mM $(NH_4)_2SO_4$ และ 0.1 % Triton X-100), $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, Forward primer 0.4 μ M, Reverse primer 0.4 μ M, DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase 1 unit (1 units/ μ l), cDNA 5 μ l และ RNase free water รวมทั้งหมดใน 1 ปฏิกริยาเท่ากับ 25 μ l negative control ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ RNase free water positive control คือ cDNA ของ ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *B. pahangi* และเมื่อผสมสารทั้งหมดใส่ในหลอด PCR แล้ว นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ จำนวน 30 รอบของปฏิกริยา ถูกใช้โพลีเมอเรส มีดังนี้ Denaturing step 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที Annealing step 30 วินาที Extension step 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และคงอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 2% agarose gel electrophoresis โดยใช้ ethidium bromide เป็นสีย้อม และ TAE buffer (Tris-acetic-EDTA buffer) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 60 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจดูภายใต้แสง ultraviolet และถ่ายรูปเก็บไว้

3.3.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปโมไอซิน

3.3.2.2.1 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับทรานสคริป

การทดสอบความจำเพาะนี้ทั้งหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* จะทำเหมือนกันทุกขั้นตอนดังนี้ เมื่อเก็บตัวอย่างครบ 14 วัน แบ่งลงในหลอดทดลองที่เก็บไว้ในตู้ - 80 องศาเซลเซียส ตามข้อ 3.2.3 ใส่หลอดใหม่หลอดละ 10 ตัวแช่ในไนโตรเจนเหลว 10 - 15 วินาที เพื่อให้ง่ายต่อการทำให้เซลล์ของยุงแตกแล้ว ใช้ pestle บดให้ละเอียดก่อนนำไปสกัด RNA ด้วย NucleoSpin® RNA II Kit หรือสกัด RNA โดยใช้ TRIzol® Reagent (Invitrogen) (ตามข้อ 3.3.2.1.2) นำ RNA ไปทดสอบความจำเพาะของยีนโทรโปนินและโทรโปโมไอซิน ด้วยการทำ RT-PCR (เหมือนข้อ 3.3.2.1) ใช้ตัวควบคุม คือ RNase free water และ cDNA ของตัวอ่อนระยะที่ 3

ของ *B. pahangi* วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 2% agarose gel electrophoresis และถ่ายภาพเก็บไว้

3.3.2.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* 200 ตัว ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube แล้วนำมาสกัด DNA ด้วยวิธี lysis buffer-CTAB (Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide) โดยการเติม lysis buffer (660 mM EDTA, 1.3% N-laurylsarcosine, pH 8.9) 60 μ l และ 2 mg/ml proteinase K 3 μ l vortex ก่อนนำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เติม CTAB 350 μ l vortex และแช่หลอดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายใส่ในหลอดใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) เพื่อสกัด DNA ปริมาตรเท่ากับที่ดูดสารละลายมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายไม่มีสีส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง นำ DNA ที่ได้ตกตะกอนด้วย 100% cold ethanol 1 ml และเติม 4 M NaCl 40 μ l แช่หลอดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ต่อจากนั้นนำหลอดที่มีตะกอน DNA นี้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ทิ้งส่วน ethanol ไป ปั่นล้างตะกอนด้วย 70% cold ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งก่อนละลายตะกอน DNA ด้วย RNase free water 200 μ l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับ DNA ของไมโครฟิลาเรีย *B. malayi* ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.โกสุม จันทรศิริ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ซึ่งเป็น DNA ที่สกัดมาจากไมโครฟิลาเรียในเลือดแมว แล้วจึงนำ DNA ของ *B. pahangi* และ *B. malayi* มาทำ PCR ตามขั้นตอนที่ 2 ของข้อ 3.3.2.1.2 โดยใช้ RNase free water และ cDNA ของตัวอย่างระยะที่ 3 ของ *B. pahangi* เป็นตัวควบคุม วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการทำ 2% agarose gel electrophoresis และถ่ายภาพเก็บไว้

3.4 การวิเคราะห์และประเมินผล

เปรียบเทียบกับจำนวนและลักษณะรูปร่างของตัวอย่าง *B. pahangi* และ *D. immitis* ที่พบในแต่ละวัน และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโทรโปไมโอซินและโทรโปโรนินต่อพยาธิ *B. pahangi*, *D. immitis* และ *B. malayi* ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR หรือ PCR จากรูปถ่าย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain)

4.1.1 ความหนาแน่นของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด (microfilaria density)

ให้ยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) ดูดเลือดแมวและสุนัขเวลา 14.00 น. ผลการตรวจนับความหนาแน่นของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด จากการทำ 3-line thick smear พบว่า แมวมีไมโครฟิลาเรียของพยาธิ *B. pahangi* ในกระแสเลือดเท่ากับ 6250 ตัว/มิลลิลิตร และสุนัขที่มีไมโครฟิลาเรียของพยาธิ *D. immitis* ในกระแสเลือดเท่ากับ 1021 ตัว/มิลลิลิตร

4.1.2 การวัดขนาดตัวอ่อนของ *B. pahangi* และ *D. immitis*

ผลการศึกษารูปร่างลักษณะและวัดขนาดของตัวอ่อนของพยาธิ *B. pahangi* (รายละเอียดดังตารางที่ 5 และ 7; รูปที่ 4) พบว่า หลังจาก 1 ชั่วโมงที่ยุงทดลองดูดเลือดแมว ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระเพาะอาหารของยุง มีรูปร่างลักษณะเรียวยาวคล้ายไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด ขนาดความยาวเฉลี่ย $217.4 \pm 25.23 \mu\text{m}$ และเริ่มเห็นไมโครฟิลาเรียออกจากปลอกหุ้ม (exsheath) ในวันที่ 1 หลังได้รับเชื้อตรวจพบตัวอ่อนอยู่ที่กล้ามเนื้อส่วนอก (thoracic muscle) ลักษณะของตัวอ่อนจะหดสั้นขึ้น มีความยาวเฉลี่ย $164.7 \pm 25.28 \mu\text{m}$ และความกว้างเฉลี่ย $8.26 \pm 1.1 \mu\text{m}$ เคลื่อนไหวช้า บริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีส่วนหาง (hook like tail) ยาว และมี rectal plug เกิดขึ้น ในวันที่ 2 หลังได้รับเชื้อความยาวลำตัวจะลดต่ำลงเฉลี่ย $88.74 \pm 15.15 \mu\text{m}$ แต่ความกว้างเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นเป็น $9.78 \pm 2.02 \mu\text{m}$ ตัวอ่อนจะเคลื่อนไหวเฉพาะทางส่วนหางที่มีลักษณะคล้ายตะขอ วันที่ 5 หลังได้รับเชื้อ ตัวอ่อนเริ่มมีการพัฒนาของทางเดินอาหาร ความยาวเฉลี่ยของลำตัวเพิ่มมากขึ้นเป็น $310.42 \pm 68.52 \mu\text{m}$ และกว้างเฉลี่ย $23.02 \pm 7.37 \mu\text{m}$ จากลักษณะตัวอ่อนที่พบตั้งแต่วันที่ 1 – 5 หลังได้รับเชื้อเป็นลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 1 วันที่ 6 หลังได้รับเชื้อ ตัวอ่อนจะลอกคราบครั้งที่ 1 เจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 มีความยาวเฉลี่ย $433.96 \pm 82.65 \mu\text{m}$ และความกว้างเฉลี่ย $28.02 \pm 6.38 \mu\text{m}$ เห็นส่วนหลอดอาหาร ลำไส้และrectal plug มีขนาดเล็กลง ตัวอ่อนมีการเคลื่อนไหวมากขึ้น และวันที่ 12 หลังได้รับเชื้อ พบตัวอ่อนที่บริเวณส่วนหัวในโพรงโพรบอสซิสและในช่องว่างส่วนท้อง ลำตัวมีลักษณะเรียวยาว เคลื่อนไหวตลอดเวลา มีความยาวเฉลี่ย $1305.4 \pm 180.3 \mu\text{m}$ และกว้างเฉลี่ย $26.6 \pm 3.45 \mu\text{m}$ ปลายหางทู่

ไม่พบส่วน rectal plug ซึ่งเป็นลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 3 และหลังจากวันที่ 15 เป็นต้นไป ตรวจพบตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่ส่วนหัวของยุง

ผลจากการชำแหละยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) หลังจากดูดเลือดสุนัขที่มีไมโครฟิลาเรียของ *D. immitis* ในกระแสเลือด (ตารางที่ 6 และ 8; รูปที่ 5) พบว่า 1 ชั่วโมงหลังจากดูดเลือดพบไมโครฟิลาเรียในกระเพาะอาหารของยุง มีลักษณะเรียวยาวคล้ายกับไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด มีขนาดความยาวเฉลี่ย $213.8 \pm 25.30 \mu\text{m}$ ความกว้างเฉลี่ย $5.26 \pm 0.95 \mu\text{m}$ ในวันที่ 1 - 4 หลังได้รับเชื้อ ไมโครฟิลาเรียจะเคลื่อนที่สู่ท่อมัลพิเจียน (malpighian tubule) ตัวอ่อนที่พบยังคงมีลักษณะคล้ายไมโครฟิลาเรีย ในวันที่ 5 ถึงวันที่ 9 หลังจากได้รับไมโครฟิลาเรียตรวจพบตัวอ่อนอยู่ในท่อมัลพิเจียน เคลื่อนไหวน้อยมาก มีลักษณะลำตัวหด อ้วน สั้น ส่วนท้ายมี rectal plug และปลายหางยาว ความยาวตั้งแต่ $80 - 222.5 \mu\text{m}$ และกว้าง $15 - 37.5 \mu\text{m}$ ซึ่งเป็นลักษณะของตัวอ่อนระยะที่ 1 ตัวอ่อนมีการลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ประมาณวันที่ 10 หลังจากได้รับเชื้อ มีลักษณะของลำตัวยาวเฉลี่ยเพิ่มมากขึ้นเป็น $382.19 \pm 73.38 \mu\text{m}$ และกว้างเฉลี่ย $33.75 \pm 7.07 \mu\text{m}$ ผนังลำตัวหนา ทางเดินอาหารพัฒนามากขึ้น เห็น intestinal canal ทางหดสั้นเป็นรูปกรวย และตัวอ่อนขดตัวอยู่ในท่อมัลพิเจียนเห็นได้ชัดเจน ประมาณวันที่ 15 หลังได้รับเชื้อตัวอ่อนมีการลอกคราบครั้งที่ 2 เป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 มีลำตัวเรียวยาวเฉลี่ย $984.67 \pm 132.59 \mu\text{m}$ กว้างเฉลี่ย $25 \pm 2.67 \mu\text{m}$ ปลายหางชู ตัวอ่อนเคลื่อนไหวเร็วมาก พบตัวอ่อนระยะนี้ที่บริเวณส่วนหัวและท่อมัลพิเจียนของยุง

จากการทดสอบค่าทางสถิติ (ANOVA Test) พบว่า ตัวอ่อนทั้ง 3 ระยะของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* มีความยาวและความกว้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลจากการชำแหละยุงเพื่อตรวจหาตัวอ่อนระยะต่างๆของ *B. pahangi* และ *D. immitis* บริเวณที่พบและจำนวนตัวอ่อนที่พบในแต่ละวันแสดงไว้ในภาคผนวกตารางที่ 1 และ 2

4.1.3 การย้อมตัวอ่อนด้วยสียิมซ้าและการย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase ก. การย้อมสียิมซ้า

ผลการย้อมสียิมซ้าของตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ตั้งแต่ 1 ชั่วโมงจนถึงวันที่ 15 หลังจากได้รับเชื้อ พบว่าตัวอ่อนทุกระยะจะติดสีน้ำเงินเข้มตลอดทั้งตัว ไม่สามารถใช้แยกระยะของตัวอ่อนและระบุวัยวุฒิภายในส่วนต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดที่ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมในการย้อมสีครั้งนี้ (ตารางที่ 5)

ข. การย้อมสีฟอสโตเคมิ (Acid phosphatase activity)


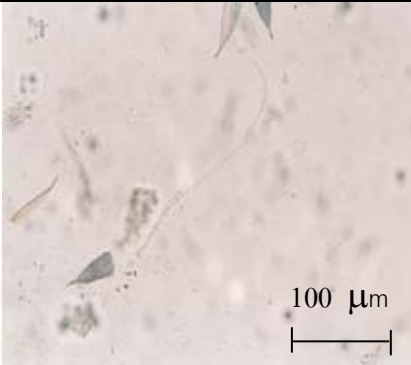
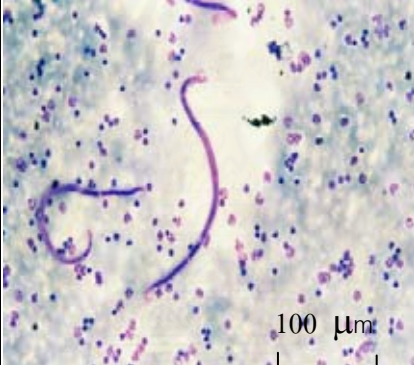
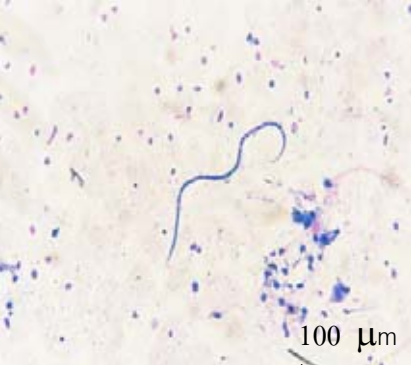
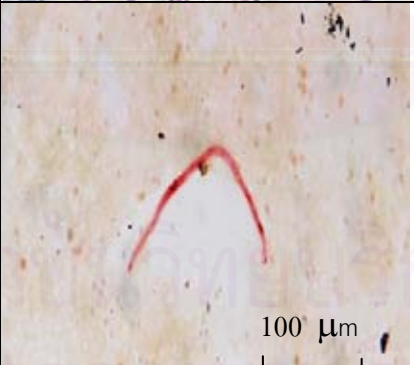

โดยผลการย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase ของตัวอ่อนหนอนพยาธิ *B. pahangi* พบว่า ไมโครพลาเรียในกระเพาะอาหารของยุงหลังคูดเลือดแมว 1 ชั่วโมงและตัวอ่อนระยะที่ 1 ที่พบในวันที่ 1 หลังได้รับเชื้อ ลำตัวติดสีแดงตลอดทั้งตัวและติดสีแดงเข้มบริเวณ amphid, excretory vesicle, anal vesicle และ plasmid ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุมมาตรฐานคือไมโครพลาเรียของ *B. pahangi* วันที่ 2 – 5 หลังได้รับเชื้อพบลำตัวของตัวอ่อนติดสีแดงและติดสีแดงเข้มที่บริเวณทางเดินอาหารและ rectal plug วันที่ 6 – 7 หลังได้รับเชื้อตัวอ่อนติดสีแดงตลอดทั้งลำตัวยกเว้นบริเวณ rectal plug ที่ติดสีแดงเข้ม และตั้งแต่วันที่ 8 – 15 หลังได้รับเชื้อตัวอ่อนจะติดสีแดงเข้มตลอดทั้งตัว ทำให้ไม่สามารถแยกการติดสีของอวัยวะภายในได้

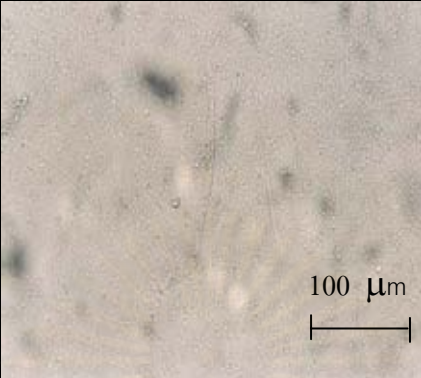

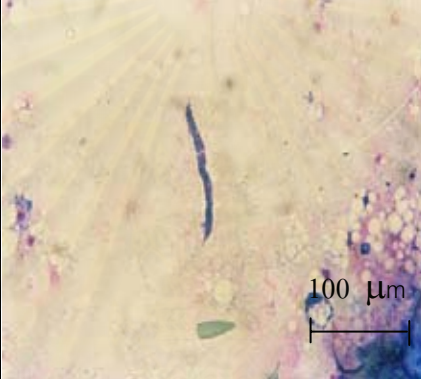
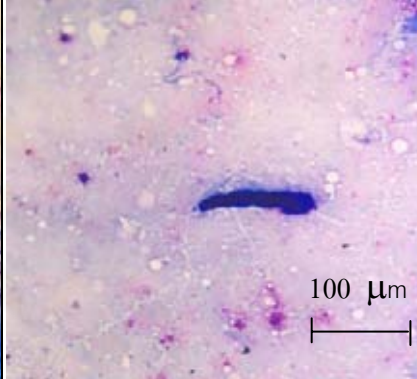
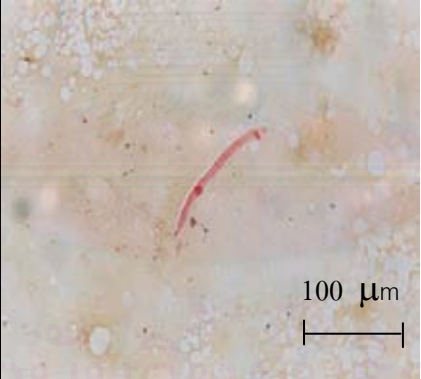
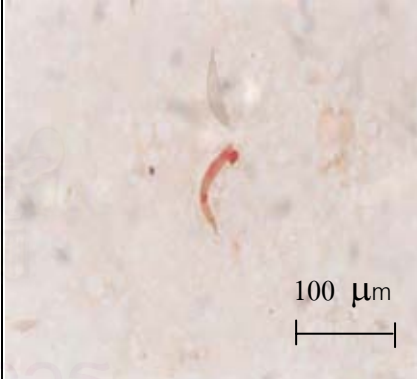
สำหรับผลการย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase ของตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* พบว่าวันที่ 1 – 4 หลังได้รับเชื้อ ไมโครพลาเรียติดสีแดงที่บริเวณ excretory vesicle และ anal vesicle เหมือนกับไมโครพลาเรีย *D. immitis* ที่พบในกระเพาะเลือด วันที่ 5 – 7 หลังได้รับเชื้อตัวอ่อนจะติดสีแดงเข้มตลอดทั้งตัวรวมทั้งทางเดินอาหาร ทำให้ไม่สามารถแยกการติดสีของอวัยวะภายในได้ ยกเว้นส่วน rectal plug ที่ติดสีแดงเข้มมาก และตัวอ่อนที่พบตั้งแต่วันที่ 8 – 20 ลำตัวจะติดสีแดงเข้มตลอดทั้งตัวเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 5)

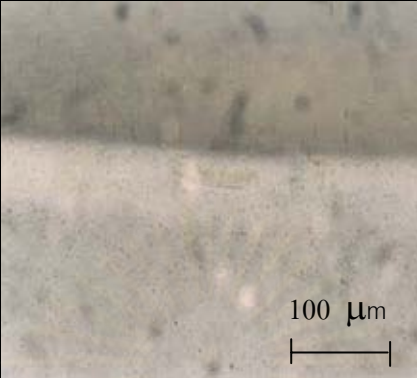

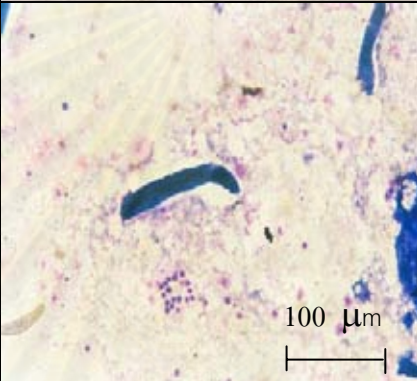


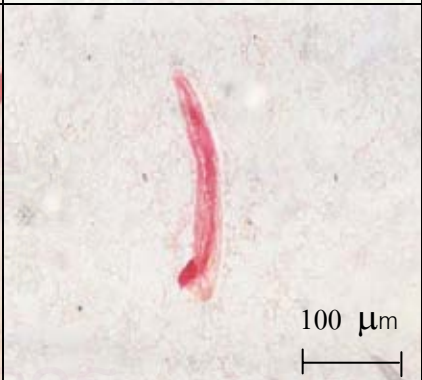
การย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase ตัวอ่อนระยะต่างๆของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ที่ตรวจพบในตัวยุงได้ใช้ไมโครพลาเรียของ *B. pahangi* และ *D. immitis* เป็นตัวควบคุมมาตรฐานในการย้อมสีครั้งนี้ จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าทั้งตัวอ่อนระยะต่างๆของ *B. pahangi* และ *D. immitis* มี Acid phosphatase โดยการย้อมติดสีแดงเกิดขึ้นบริเวณต่างๆของลำตัว

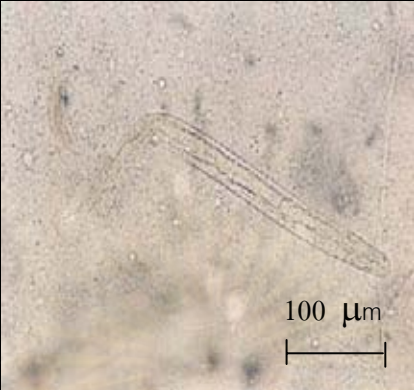


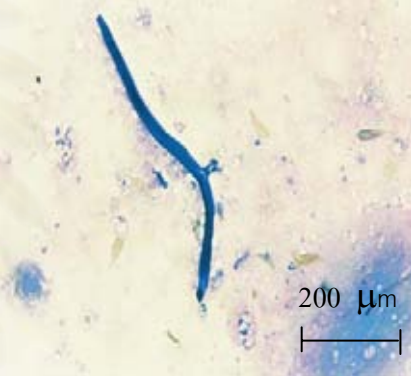
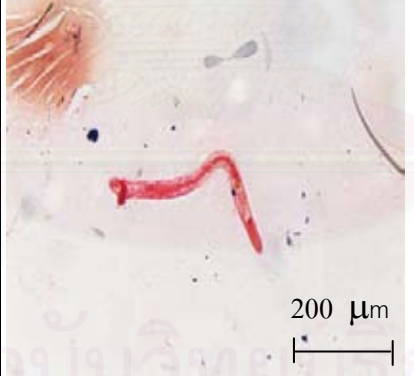

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

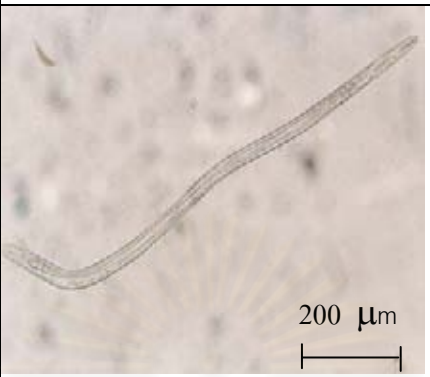
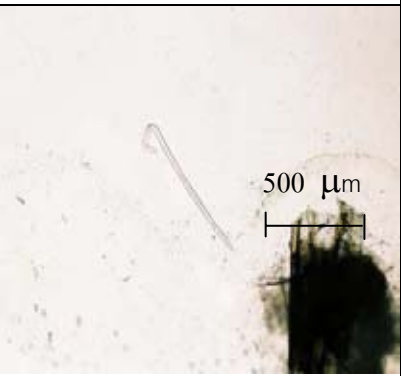
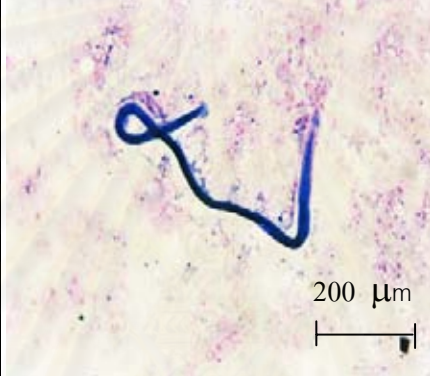
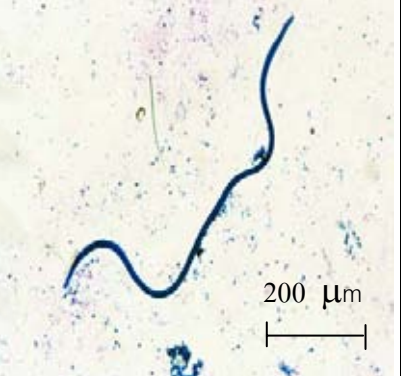

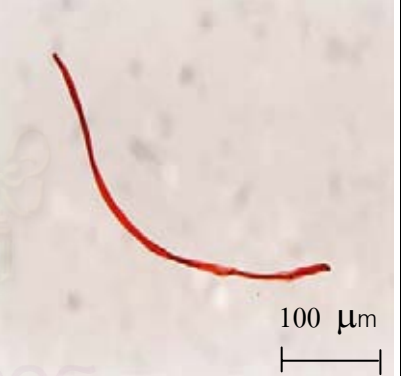
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะตัวอ่อนที่ข้อมด้วยสียิมซ่าและอีสโตเคมี (Acid phosphatase activity) บริเวณที่พบและขนาดของตัวอ่อนระยะต่างๆของ *B. pahangi* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) (N=30) หลังจากได้รับเชื้อ 1 ชั่วโมงถึง 15 วัน

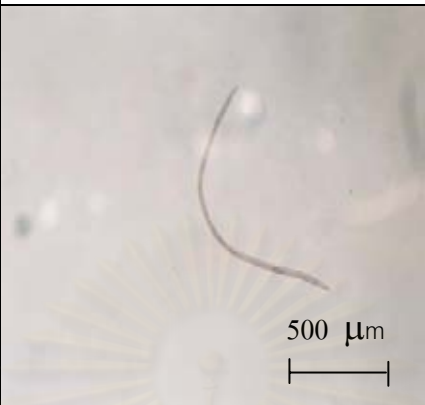

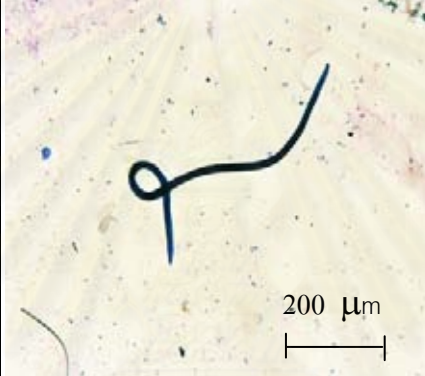
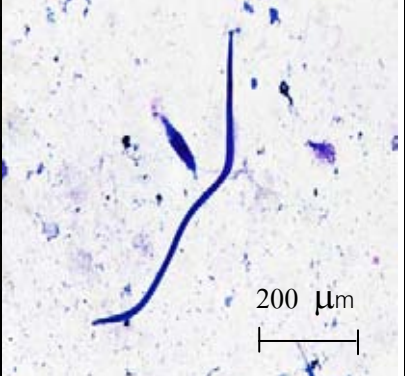

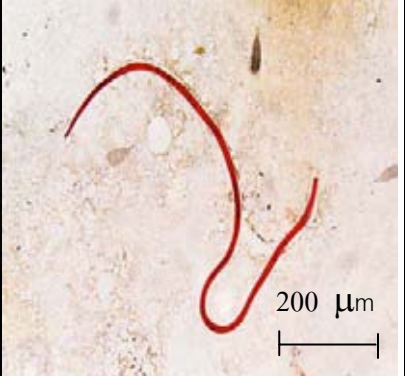
ตัวอ่อน	ไมโครฟิลลาเรียในกระแสดเลือดของแมง	1 ชั่วโมง หลังยุงดูดเลือด
กระเพาะอาหาร		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว	-	23.87
ความยาว (mean± SD)	273 ± 30.14 μm	217.4 ± 25.23 μm
ความกว้าง (mean± SD)	5.23 ± 2.56 μm	5.75 ± 1.61 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในยุง	-	กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อส่วนนอก


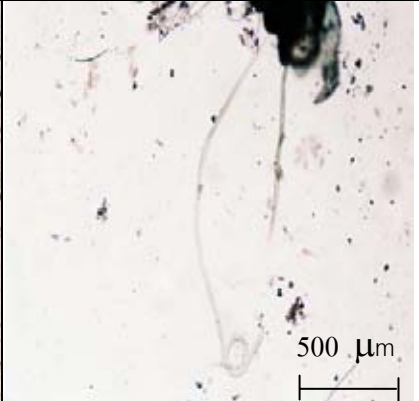
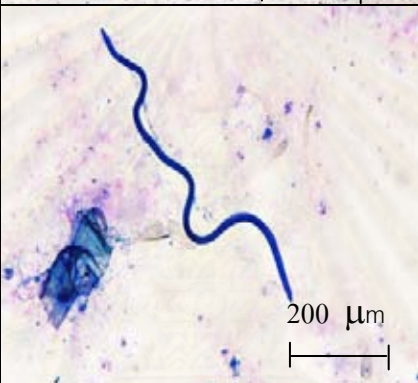
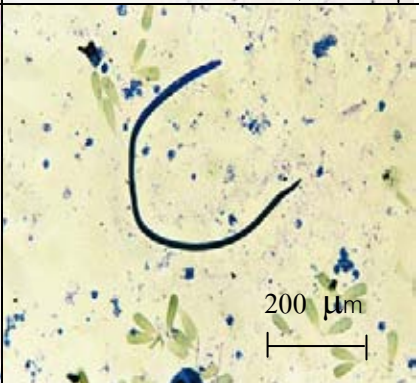
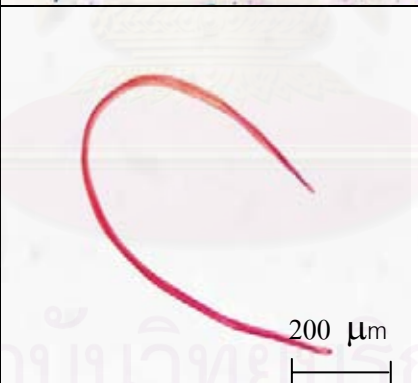

ตัวอย่าง	วันที่ 1 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 2 หลังได้รับเชื้อ
กล้ามเนื้อส่วนนอก	 100 μ m	 100 μ m
ย้อมสี 3%Giemsa	 100 μ m	 100 μ m
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase	 100 μ m	 100 μ m
จำนวนตัวอย่างต่อขุม 1 ตัว	21	14.13
ความยาว (mean \pm SD)	164.7 \pm 25.28 μ m	88.74 \pm 15.15 μ m
ความกว้าง (mean \pm SD)	8.26 \pm 1.10 μ m	9.78 \pm 2.02 μ m
อวัยวะที่พบตัวอย่างในขุม	กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อส่วนนอก	กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อส่วนนอก

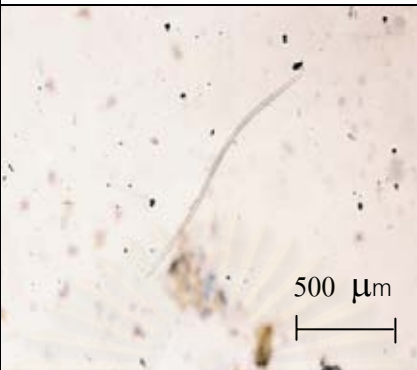
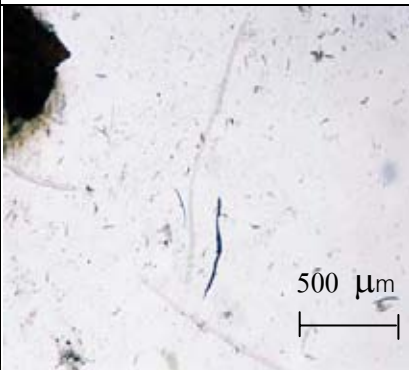
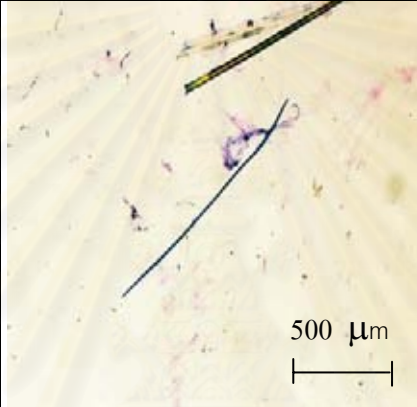
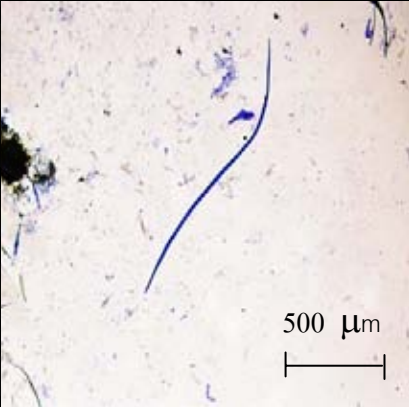
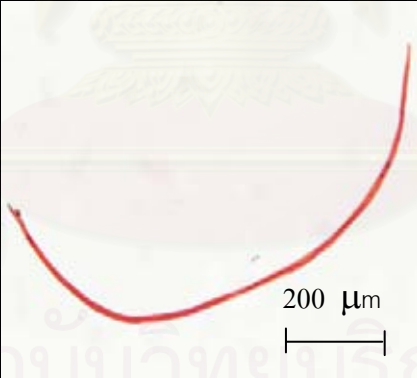
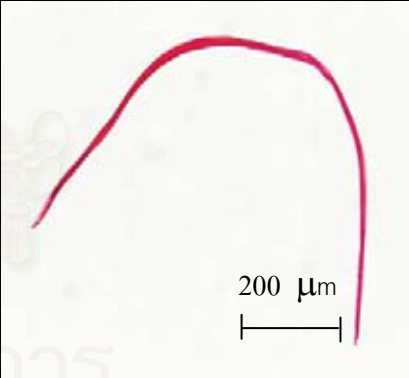
ตัวอย่าง	วันที่ 3 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 4 หลังได้รับเชื้อ
กล้ามเนื้อส่วนนอก		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอย่างต่อขุม 1 ตัว	6.76	3.23
ความยาว (mean ± SD)	102.2 ± 17.90 μm	157.7 ± 21.37 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	13.8 ± 5.21 μm	17.2 ± 3.77 μm
อวัยวะที่พบตัวอย่างในขุม	กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อส่วนนอก	กล้ามเนื้อส่วนนอก

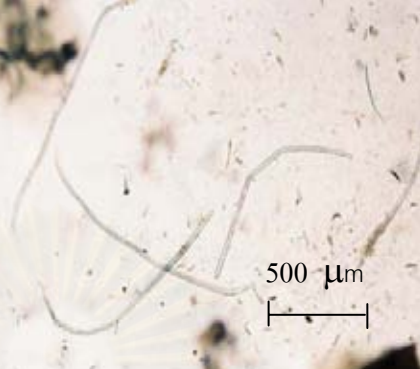
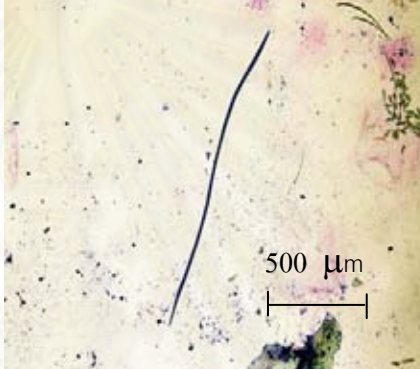
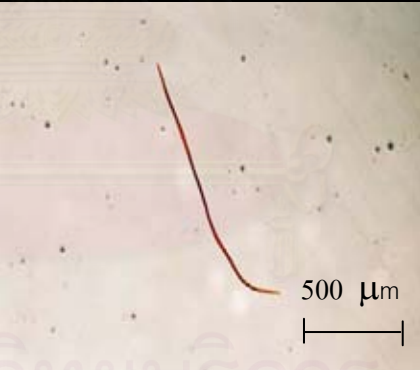
ตัวอ่อน	วันที่ 5 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 6 หลังได้รับเชื้อ
กล้ามเนื้อส่วนนอก		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อขง 1 ตัว	2.17	1.23
ความยาว (mean ± SD)	310.42 ± 68.52 μm	433.96 ± 82.65 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	23.02 ± 7.37 μm	28.02 ± 6.38 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในขง	กล้ามเนื้อส่วนนอก	กล้ามเนื้อส่วนนอก

ตัวอ่อน	วันที่ 7 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 8 หลังได้รับเชื้อ
กล้ามเนื้อส่วนนอก		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อขง 1 ตัว	0.6	0.53
ความยาว (mean± SD)	595.1 ± 181.06 μm	1036.20 ± 235.13 μm
ความกว้าง (mean± SD)	29.5 ± 10.53 μm	28.20 ± 5.93 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในขง	กล้ามเนื้อส่วนนอก	กล้ามเนื้อส่วนนอก

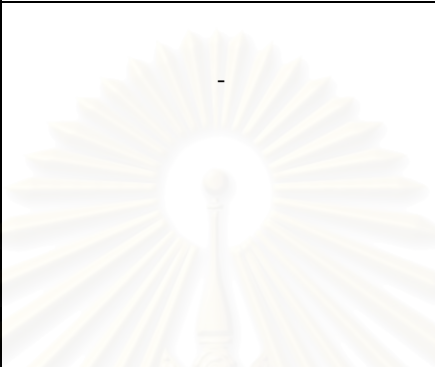
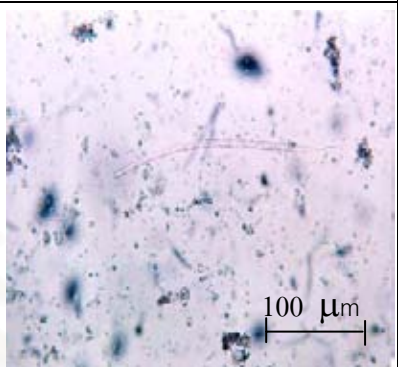
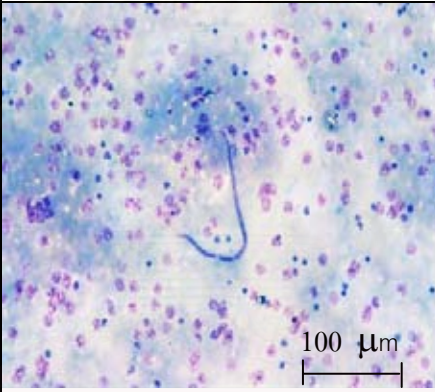
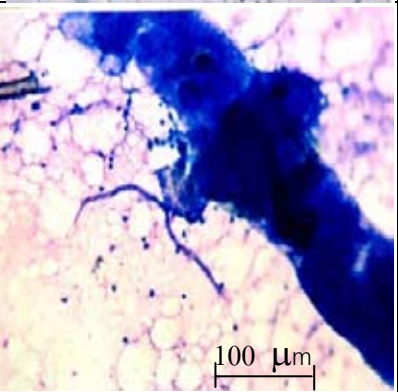
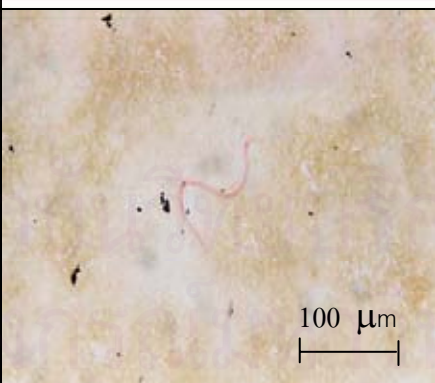
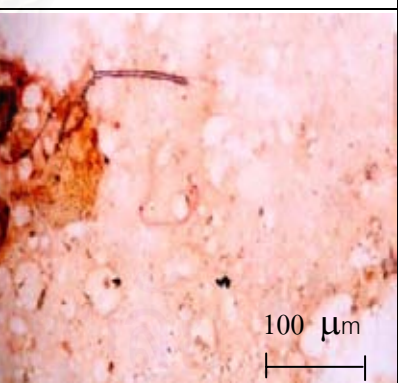
ตัวอ่อน	วันที่ 9 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 10 หลังได้รับเชื้อ
Proboscis		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อขยง 1 ตัว	0.87	0.63
ความยาว (mean± SD)	1091.4 ± 281.69 μm	1183.8 ± 268.87 μm
ความกว้าง (mean± SD)	29.8 ± 6.16 μm	26.8 ± 6.67 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในขยง	กล้ามเนื้อส่วนอก ส่วนหัว	กล้ามเนื้อส่วนอก ส่วนหัว

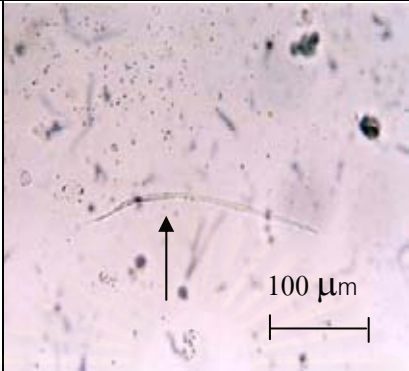
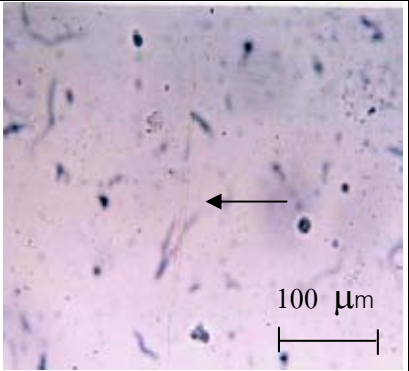
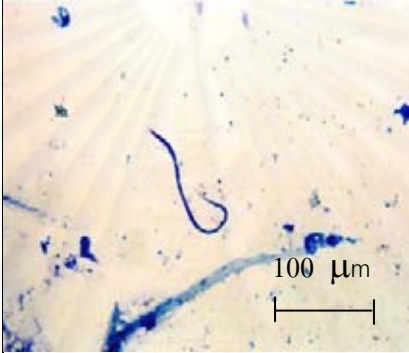
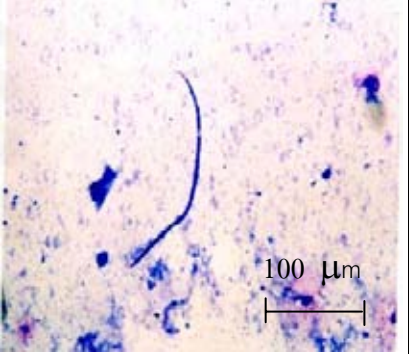
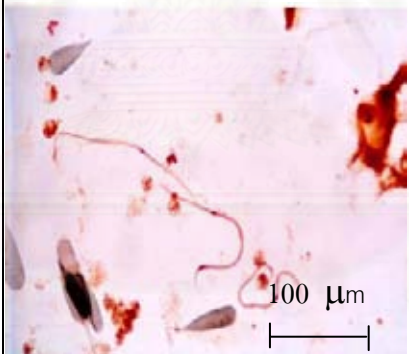

ตัวอ่อน	วันที่ 11 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 12 หลังได้รับเชื้อ
Proboscis		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่ออูง 1 ตัว	0.7	0.47
ความยาว (mean± SD)	1122.8 ± 187.61 μm	1305.4 ± 180.30 μm
ความกว้าง (mean± SD)	26.8 ± 4.12 μm	26.6 ± 3.45 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในอูง	กล้ามเนื้อส่วนนอก ส่วนหัว	กล้ามเนื้อส่วนนอก ส่วนหัว

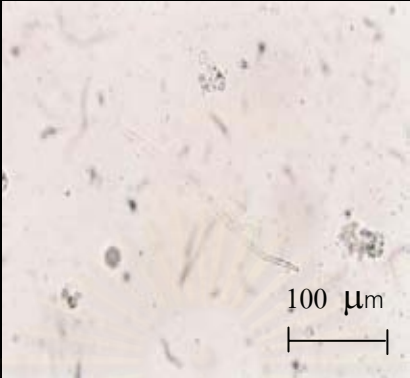

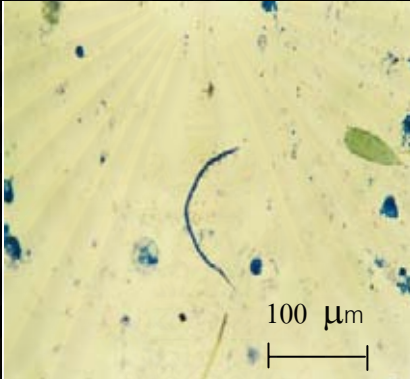
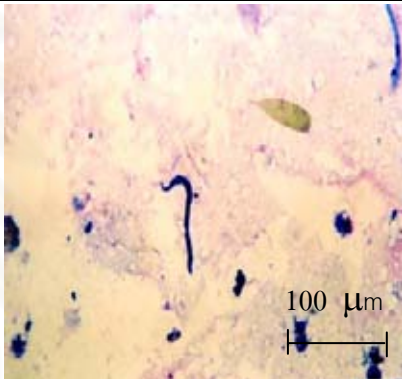

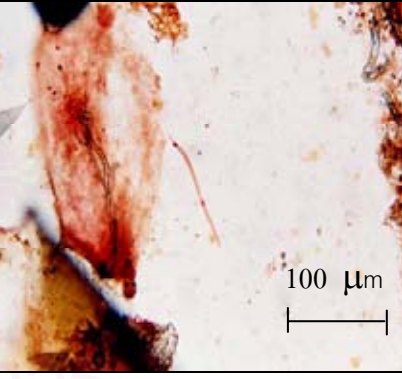
ตัวอย่าง	วันที่ 13 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ
Proboscis	 500 μ m	 500 μ m
ย้อมสี 3%Giemsa	 500 μ m	 500 μ m
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase	 200 μ m	 200 μ m
จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว	0.33	0.63
ความยาว (mean \pm SD)	1328.4 \pm 150.57 μ m	1311.2 \pm 198.82 μ m
ความกว้าง (mean \pm SD)	27.7 \pm 3.38 μ m	26.7 \pm 4.06 μ m
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในยุง	กล้ามเนื้อส่วนนอก ส่วนหัว	กล้ามเนื้อส่วนนอก ส่วนหัว

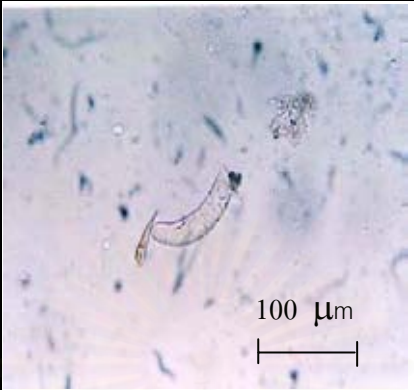

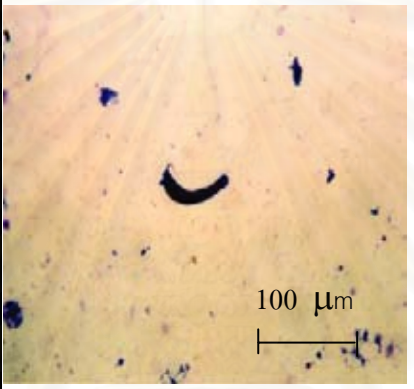
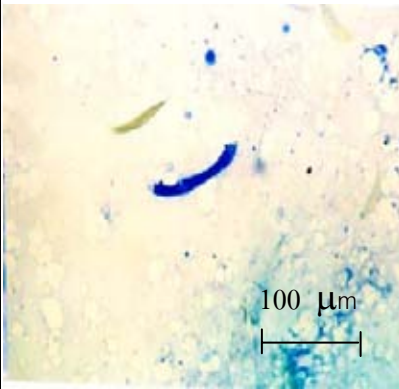
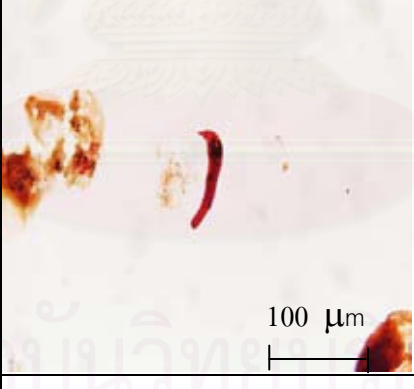
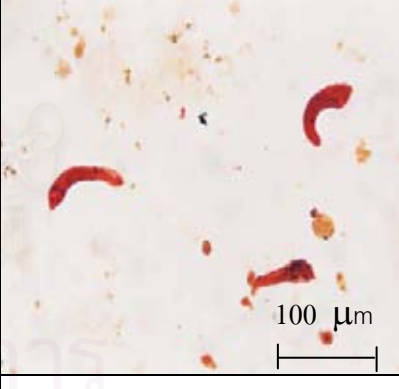
ตัวอ่อน	วันที่ 15 หลังได้รับเชื้อ
Proboscis	
ย้อมสี 3%Giemsa	
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase	
จำนวนตัวอ่อนต่อเยุง 1 ตัว	0.23
ความยาว (mean± SD)	1268.8 ± 167.04 μm
ความกว้าง (mean± SD)	25.8 ± 4.25 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในเยุง	กล้ามเนื้อส่วนนอก ส่วนหัว



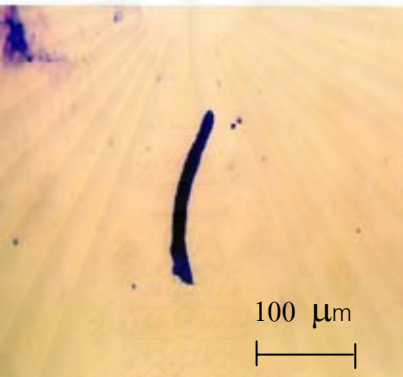
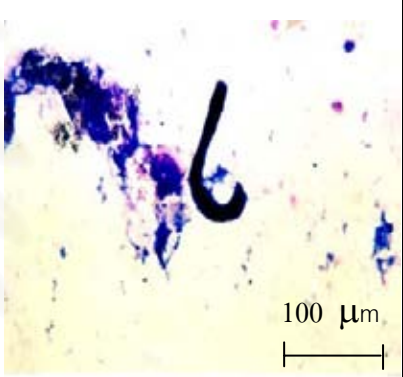
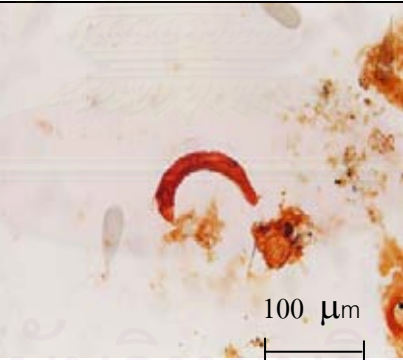

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะตัวอ่อนที่ย้อมด้วยสียิมซ่าและอีสโตเคมี (Acid phosphatase activity) บริเวณที่พบและขนาดของตัวอ่อนระยะต่างๆของ *D. immitis* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) (N=30) หลังจากได้รับเชื้อ 1 ชั่วโมงถึง 15 วัน



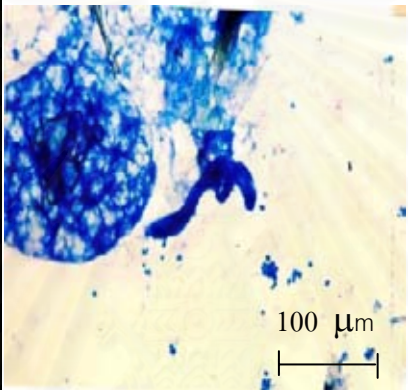
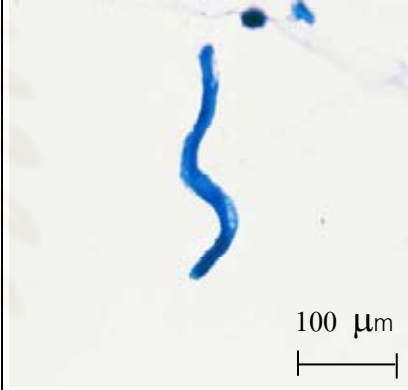

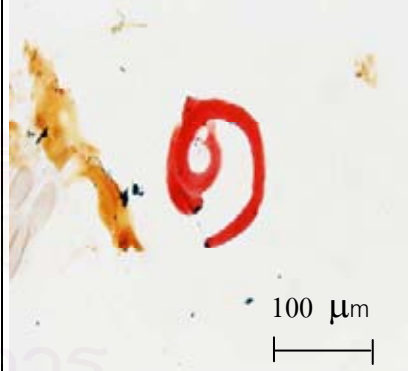
ตัวอ่อน	ไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดสุนัข	1 ชั่วโมง หลังได้รับเชื้อ
กระเพาะอาหาร		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว	-	6.7
ความยาว (mean± SD)	284.3 ± 25.11 μm	213.8 ± 25.30 μm
ความกว้าง (mean± SD)	5.6 ± 1.78 μm	5.26 ± 0.95 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในยุง	-	กระเพาะอาหาร ท่อมัลพิเจียน

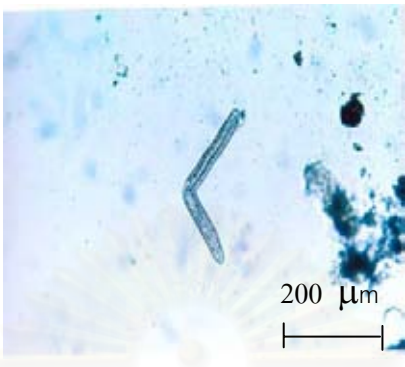

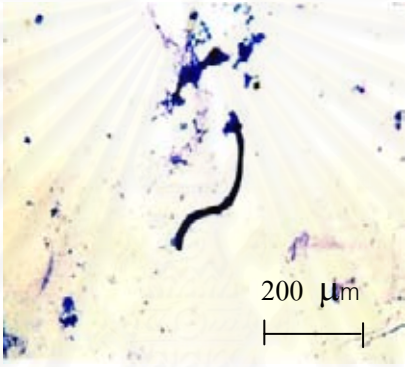
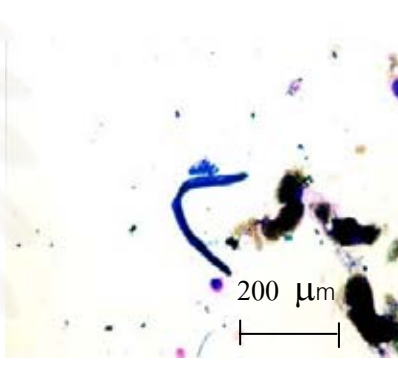
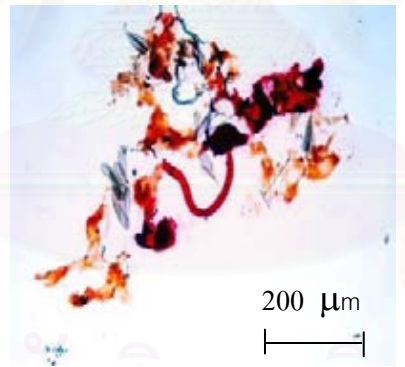
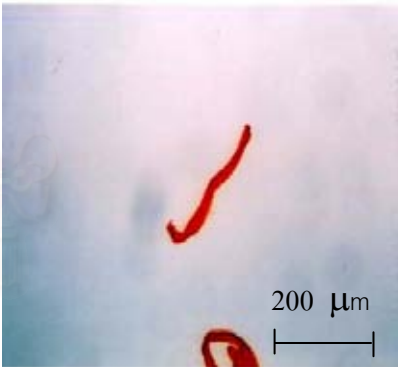
ตัวอ่อน	วันที่ 1 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 2 หลังได้รับเชื้อ
กระเพาะอาหาร		
ย้อมสี 3%Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อถุง 1 ตัว	19.6	4.83
ความยาว (mean ± SD)	197.9 ± 25.06 μm	212.6 ± 23.77 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	4.42 ± 0.76 μm	4.9 ± 1.10 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในถุง	กระเพาะอาหาร ท่อมัลพิเจียน	กระเพาะอาหาร ท่อมัลพิเจียน

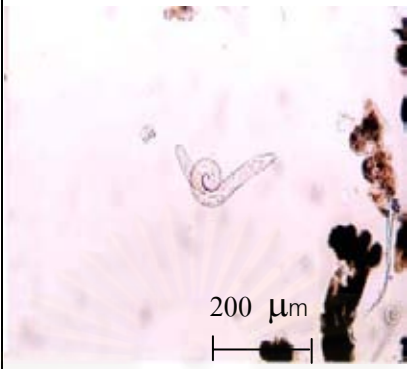

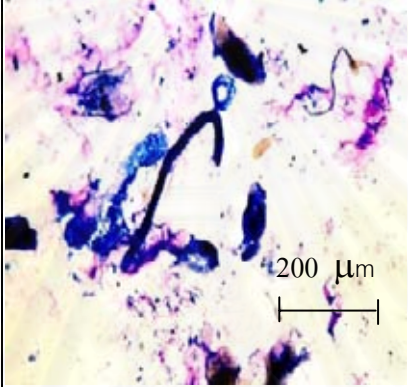
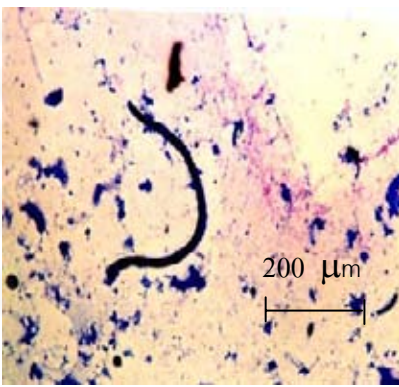
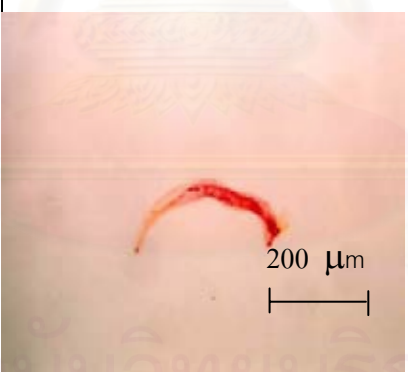

ตัวอ่อน	วันที่ 3 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 4 หลังได้รับเชื้อ
กระเพาะอาหาร	 100 μ m	 100 μ m
ย้อมสี 3%Giemsa	 100 μ m	 100 μ m
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase	 100 μ m	 100 μ m
จำนวนตัวอ่อนต่อถุง 1 ตัว	4.76	5.2
ความยาว (mean \pm SD)	229.4 \pm 25.36 μ m	232.48 \pm 25.73 μ m
ความกว้าง (mean \pm SD)	5.68 \pm 1.16 μ m	6.4 \pm 1.32 μ m
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในถุง	กระเพาะอาหาร ท่อมัลพิเจียน	กล้ามเนื้อส่วนนอก ท่อมัลพิเจียน

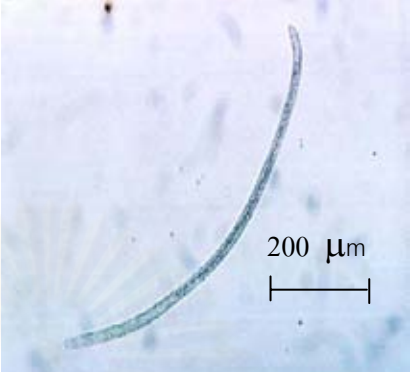
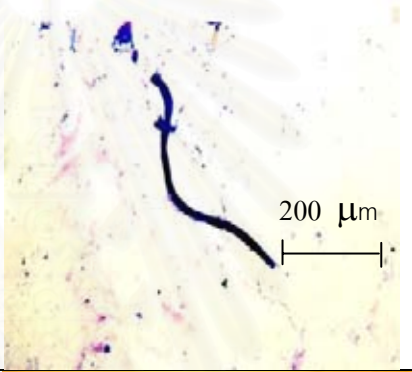
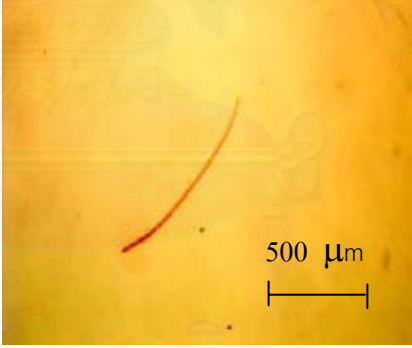
ตัวอย่าง	วันที่ 5 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 6 หลังได้รับเชื้อ
ท่อมัลพิเจียน		
ย้อมสี 3% Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอย่างต่อถุง 1 ตัว	3.5	1.36
ความยาว (mean ± SD)	110.83 ± 10.90 μm	132.12 ± 19.81 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	23.61 ± 3.77 μm	22.5 ± 3.06 μm
อวัยวะที่พบตัวอย่างในถุง	ท่อมัลพิเจียน	ท่อมัลพิเจียน

ตัวอ่อน	วันที่ 7 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 8 หลังได้รับเชื้อ
ท่อมัลพิเจียน		
ย้อมสี 3% Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อถุง 1 ตัว	1.73	1.5
ความยาว (mean ± SD)	155.83 ± 45 μm	167.75 ± 43.76 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	27.17 ± 5.89 μm	31.5 ± 2.42 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในถุง	ท่อมัลพิเจียน	ท่อมัลพิเจียน

ตัวอย่าง	วันที่ 9 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 10 หลังได้รับเชื้อ
ตัวอย่างฟิเจียน		
ย้อมสี 3% Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอย่างต่อช่อง 1 ตัว	2.73	1.63
ความยาว (mean ± SD)	191.25 ± 55.6 μm	382.19 ± 73.38 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	29.69 ± 4.11 μm	33.75 ± 7.07 μm
อวัยวะที่พบตัวอย่างในช่อง	ตัวอย่างฟิเจียน	ตัวอย่างฟิเจียน

ตัวอ่อน	วันที่ 11 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 12 หลังได้รับเชื้อ
ท่อมัลพิเจียน		
ย้อมสี 3% Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อถุง 1 ตัว	2.1	2.1
ความยาว (mean ± SD)	422.5 ± 89.05 μm	437.14 ± 137.56 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	42 ± 8.23 μm	32.14 ± 2.67 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในถุง	ท่อมัลพิเจียน	ท่อมัลพิเจียน

ตัวอ่อน	วันที่ 13 หลังได้รับเชื้อ	วันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ
ท่อมัลพิเจียน		
ย้อมสี 3% Giemsa		
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase		
จำนวนตัวอ่อนต่อถุง 1 ตัว	1.33	1.73
ความยาว (mean ± SD)	475 ± 136.72 μm	571.5 ± 172.41 μm
ความกว้าง (mean ± SD)	36.79 ± 3.13 μm	34.5 ± 3.87 μm
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในถุง	ท่อมัลพิเจียน	ท่อมัลพิเจียน

ตัวอ่อน	วันที่ 15 หลังได้รับเชื้อ
Proboscis	
ย้อมสี 3% Giemsa	
ย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase	
จำนวนตัวอ่อนต่อถุง 1 ตัว	2.33
ความยาว (mean ± SD) ความกว้าง (mean ± SD)	$948.67 \pm 132.59 \mu\text{m}$ $25 \pm 2.67 \mu\text{m}$
อวัยวะที่พบตัวอ่อนในถุง	ท่อมัลพิเจียน ส่วนหัว

ตารางที่ 7 ตัวอ่อนระยะพัฒนาของพยาธิ *B. pahangi* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain)

วันที่	ระยะของ ตัวอ่อน	N	ค่าเฉลี่ยความยาว (μm)	ช่วงความยาว (μm)	ค่าเฉลี่ยความ กว้าง (μm)	ช่วงความ กว้าง (μm)
0	ไม่ใคร					
(1 ชม.)	ฟิลาเรีย	26	217.4 ± 25.23	182.5 - 270	5.75 ± 1.61	3 - 8.5
1	↑ ตัวอ่อน ระยะที่ 1 ↓	25	164.7 ± 25.28	100 - 197.5	8.26 ± 1.10	7 - 10
2		25	88.74 ± 15.15	45 - 120	9.78 ± 2.02	7 - 12.5
3		25	102.2 ± 17.90	77.5 - 150	13.8 ± 5.21	7.5 - 27.5
4		25	157.7 ± 21.37	130 - 202.5	17.2 ± 3.77	10 - 25
5		24	310.42 ± 68.52	200 - 450	23.02 ± 7.37	15 - 50
6	↑ ตัวอ่อน ระยะที่ 2 ↓	24	433.96 ± 82.65	340 - 630	28.02 ± 6.38	20 - 40
7		25	595.1 ± 181.06	305 - 1010	29.5 ± 10.53	17.5 - 55
8		26	1036.20 ± 235.13	630 - 1540	28.20 ± 5.93	17.5 - 37.5
9		25	1091.4 ± 281.69	660 - 1550	29.8 ± 6.16	20 - 45
10		25	1183.8 ± 268.87	770 - 1650	26.8 ± 6.67	12.5 - 42.5
11	↓ ตัวอ่อน ระยะที่ 3 ↓	25	1122.8 ± 187.61	770 - 1490	26.8 ± 4.12	20 - 37.5
12		25	1305.4 ± 180.30	805 - 1540	26.6 ± 3.45	20 - 35
13		25	1328.4 ± 150.57	1080 - 1580	27.7 ± 3.38	20 - 32.5
14		25	1311.2 ± 198.82	880 - 1650	26.7 ± 4.06	20 - 37.5
15		25	1268.8 ± 167.04	980 - 1580	25.8 ± 4.25	20 - 35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ตัวอ่อนระยะพัฒนาของพยาธิ *D. immitis* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain)

วันที่	ระยะ ของ ตัวอ่อน	N	ค่าเฉลี่ยความยาว (μm)	ช่วงความยาว (μm)	ค่าเฉลี่ยความ กว้าง (μm)	ช่วงความ กว้าง (μm)
0 (1 ชม.)	↑	25	213.8 \pm 25.30	135 - 250	5.26 \pm 0.95	2.5 - 7
1	ไม่ใคร	25	197.9 \pm 25.06	135 - 235	4.42 \pm 0.76	2.5 - 5
2	ฟิลาเรีย	25	212.6 \pm 23.77	157.5 - 252.5	4.9 \pm 1.10	3 - 7.5
3	↓	25	229.4 \pm 25.36	175 - 270	5.68 \pm 1.16	3 - 7.5
4	↓	25	232.48 \pm 25.73	170 - 280	6.4 \pm 1.32	4 - 8
5	↑	9	110.83 \pm 10.90	100 - 130	23.61 \pm 3.77	20 - 30
6	↑	13	132.12 \pm 19.81	105 - 160	22.5 \pm 3.06	20 - 30
7	ตัวอ่อน ระยะที่	15	155.83 \pm 45	80 - 202.5	27.17 \pm 5.89	15 - 37.5
8	↓ ¹	9	159.44 \pm 37.12	100 - 222.5	31.39 \pm 2.53	27.5 - 35
9	↓ ¹	7	167.97 \pm 40.11	100 - 212.5	30 \pm 4.18	25 - 35
10	↑	8	382.19 \pm 73.38	270 - 465	33.75 \pm 7.07	25 - 45
11	↑	10	422.5 \pm 89.05	300 - 595	42 \pm 8.23	30 - 55
12	ตัวอ่อน ระยะที่	7	437.14 \pm 137.56	230 - 615	32.14 \pm 2.67	30 - 35
13	↓ ²	7	475 \pm 136.72	260 - 635	36.79 \pm 3.13	32.5 - 40
14	↓ ²	10	571.5 \pm 172.41	342.5 - 780	34.5 \pm 3.87	30 - 40
15	↑	15	948.67 \pm 132.59	605 - 1080	25 \pm 2.67	20 - 30
16	↑	19	1009.74 \pm 110.59	700 - 1155	26.58 \pm 2.91	20 - 30
17	ตัวอ่อน ระยะที่	12	982.08 \pm 108.41	700 - 1100	27.5 \pm 3.99	20 - 30
18	↓ ³	12	1011.67 \pm 49.14	910 - 1070	27.08 \pm 3.96	20 - 35
19	↓ ³	6	1013.33 \pm 123.56	790 - 1120	25.83 \pm 3.76	20 - 30
20	↓ ³	10	1009.5 \pm 57.76	890 - 1100	28 \pm 4.83	20 - 35

4.2 ทดสอบปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปชันกับทรานสคริป (mRNA) ของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินที่พบในตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi*

4.2.1 ทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน

ผลจากการทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน ด้วยวิธี One Step RT-PCR จากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* โดยการเจือจาง RNA ที่สกัดจากตัวอ่อนสิบเท่า พบว่า ความไวของการตรวจพบการแสดงออกของยีนโทรโปไมโอซิน หรือ mRNA ต้องใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ถึง 60 ตัว โดยมีผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 226 bp เช่นเดียวกับความไวของการตรวจพบการแสดงออกของยีนโทรโปนินที่ต้องใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 จำนวน 60 ตัวเท่ากัน กลับให้ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 221 bp ที่น้อยกว่า (Lane 2; ตารางที่ 9) และผลการทดสอบความไวในการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินในยุง หลังจากได้รับเชื้อ 1 – 15 วันด้วยวิธี One Step RT-PCR พบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 221 bp และ 226 bp ตามลำดับ ในวันที่ 1 – 3, 6 – 9 และ 13 – 15 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (Lane 3–4, 8–11 และ 15–17; ตารางที่ 10) จากอัตราการติดพยาธิ *B. pahangi* ในยุง *Ae. aegypti* (ตารางภาคผนวกที่ 1) พบว่าวันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ มีตัวอ่อนระยะที่ 3 50.4 ตัวจากยุง 80 ตัว

จากการทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปที่สังเคราะห์จากยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน ด้วยวิธี Two Step RT-PCR จาก RNA ที่สกัดด้วย TRIzol reagent โดยเปรียบเทียบการใช้ Random hexamer และ Oligod(T) เป็นไพรเมอร์ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA ทั้งใน พยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* พบว่ามีเพียงการแสดงออกของยีนโทรโปไมโอซินต่อพยาธิ *B. pahangi* โดยใช้ Random hexamer เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA เท่านั้นที่พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 226 bp ในวันที่ 12 หลังได้รับเชื้อ (Lane 7; ตารางที่ 11) และจาก RNA ที่สกัดด้วย Nucleospin RNA II kit นำไปตรวจหาทรานสคริปที่สังเคราะห์จากยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน ด้วยวิธี Two Step RT-PCR และใช้ Random hexamer เป็นไพรเมอร์ในขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA พบการแสดงออกทั้งยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินในพยาธิ *B. pahangi* เทียบเท่ากับตัวอ่อนจำนวน 5 ตัวและ *D. immitis* เทียบเท่ากับตัวอ่อนจำนวน 22 ตัว (รูปที่ 4 และ 5)

4.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน

4.2.2.1 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับทรานสคริป

จากการทดสอบความจำเพาะในการแสดงออกของยีนโทรโปไมโอซินต่อตัวอ่อนระยะต่างๆของ *B. pahangi* พบว่าวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อ มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 226 bp ในปริมาณไม่มาก (Lane 8; รูปที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับผลของการพบตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ที่พบในวันต่างๆหลังได้รับเชื้อ จากข้อ 4.1.2 พบว่าวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2 และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำ PCR ครั้งที่ 2 จึงพบว่าวันที่ 7, 8 และ 11 หลังได้รับเชื้อซึ่งเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2 และวันที่ 12 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งเป็นวันแรกที่พบตัวอ่อนระยะที่ 3 มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 226 bp โดยวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อเป็นวันที่พบผลิตภัณฑ์ PCR ได้ชัดเจนที่สุด (Lane 7 – 8 และ 11 – 12; รูปที่ 4) ขณะที่วันที่ 8 หลังได้รับเชื้อสามารถพบการแสดงออกของยีนโทรโปนินจากการทำ PCR ครั้งที่ 1 ได้เช่นกันโดยมีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 221 bp (Lane 8; รูปที่ 4) แต่เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโทรโปนินมาทำ PCR ครั้งที่ 2 พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 221 bp ในวันที่ 7, 8, 9 และ 10 หลังการได้รับเชื้อ (Lane 7 – 10; รูปที่ 4) ซึ่งเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2 นอกจากนี้จากการทำ PCR ครั้งที่ 2 พบว่าในวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อพบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโทรโปไมโอซินมีปริมาณมากกว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโทรโปนิน และเมื่อเทียบกับอัตราการติดเชื้อพบว่าในวันที่ 8 นี้ใช้ตัวอ่อนเพียง 5 ตัวเท่านั้น (รูปที่ 4; ตารางภาคผนวกที่ 1)

ผลการทดสอบความจำเพาะในการแสดงออกของยีนโทรโปไมโอซินต่อตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีนโทรโปไมโอซินต่อตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 แต่เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งกลับพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 226 bp ตั้งแต่วันที่ 6 - 12 หลังได้รับเชื้อ (Lane 6 – 12; รูปที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบการพบตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ในวันต่างๆ ตามข้อ 4.1.2 แล้วพบว่า สามารถพบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโทรโปไมโอซินในตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 สำหรับการแสดงออกของยีนโทรโปนินต่อตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* ในยุง พบว่าจากการทำ Two Step RT-PCR มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 221 bp ในวันที่ 12 และ 13 หลังการได้รับเชื้อ ซึ่งเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2 (ตารางที่ 12) และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปเพิ่มปริมาณอีกครั้งพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 221 bp ในวันที่ 12 และ 13 หลังได้รับเชื้อซึ่งเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2 และวันที่ 15 และ 16 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งเป็นวันที่เริ่มพบตัวอ่อนระยะที่ 3 โดยพบผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุดในวันที่ 15 หลังได้รับเชื้อ เมื่อเทียบกับอัตราการติดเชื้อของ *D. immitis* ในยุง *Ae. aegypti* พบว่าวันที่ 15 นี้ใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 จำนวน 22 ตัว (Lane

12-13 และ 15-16; รูปที่ 5)

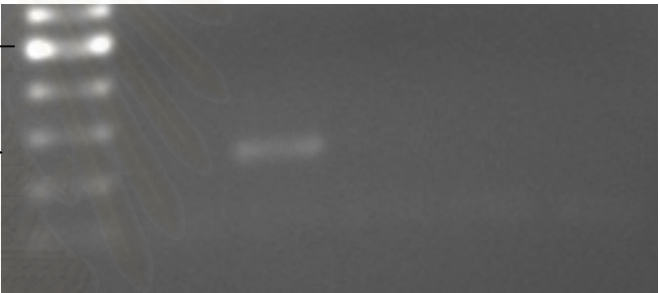
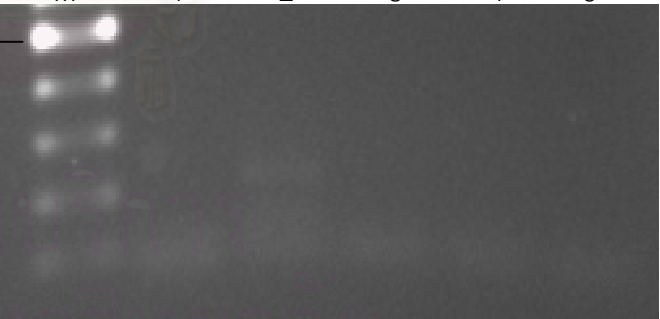
4.2.2.2 ทดสอบความจำเพาะของการทดสอบในระดับดีเอ็นเอ

ผลการใช้ไพรเมอร์โทรโปนินในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 700 bp ที่ดีเอ็นเอของพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi* (Lane 2 และ 5; ตารางที่ 13) ขณะที่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ไพรเมอร์โทรโปไมโอซินทดสอบความจำเพาะจากดีเอ็นเอของ *B. pahangi* และ *B. malayi* ดังนั้นไพรเมอร์ของยีนโทรโปไมโอซินไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับดีเอ็นเอของพยาธิ *B. malayi*



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของตัวอย่างพยาธิระยะที่ 3 ของ *B. pahangi*

ยีน	ตัวอย่าง	ผลการทดลอง
โทรโปไมโอซิน	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: Template free control Lane 2: ตัวอย่างระยะที่ 3 60 ตัว Lane 3: ตัวอย่างระยะที่ 3 6 ตัว Lane 4: ตัวอย่างระยะที่ 3 0.6 ตัว Lane 5: ตัวอย่างระยะที่ 3 0.06 ตัว	
โทรโปนิน	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: Template free control Lane 2: ตัวอย่างระยะที่ 3 60 ตัว Lane 3: ตัวอย่างระยะที่ 3 6 ตัว Lane 4: ตัวอย่างระยะที่ 3 0.6 ตัว Lane 5: ตัวอย่างระยะที่ 3 0.06 ตัว	

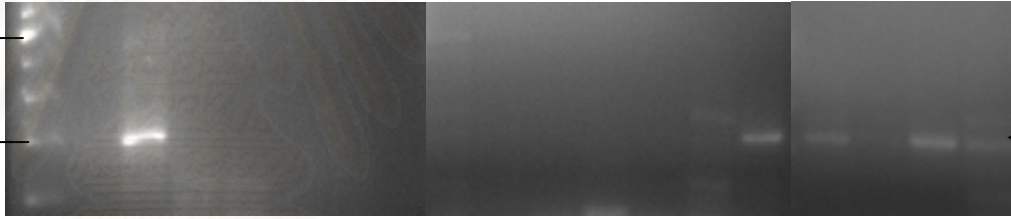
ตารางที่ 10 ความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของพยาธิ *B. pahangi* ด้วยวิธี One Step RT-PCR

ยีน	RT-PCR	ตัวอย่าง	ผลการทดลอง
โทรโปนิน	One-Step RT-PCR (total 50 μ l) ใช้ RNA 8 μ l = ยุง 10.67 ตัว	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: Template free control Lane 2: negative reverse transcriptase Lane 3 – 17: ตัวอย่างของ <i>B. pahangi</i> ในวันที่ 1 – 15 หลังได้รับเชื้อ	<p>M - -RT 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15</p> <p>400 200</p> <p>221 bp</p>
โทรโปไมโอซิน	One-Step RT-PCR (total 50 μ l) ใช้ RNA 8 μ l = ยุง 10.67 ตัว	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: Template free control Lane 2: negative reverse transcriptase Lane 3 – 17: ตัวอย่างของ <i>B. pahangi</i> ในวันที่ 1 – 15 หลังได้รับเชื้อ	<p>M - -RT 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15</p> <p>500 200</p> <p>226 bp</p>

ตารางที่ 11 ความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปไมโอซินของพยาธิ *B. pahangi*

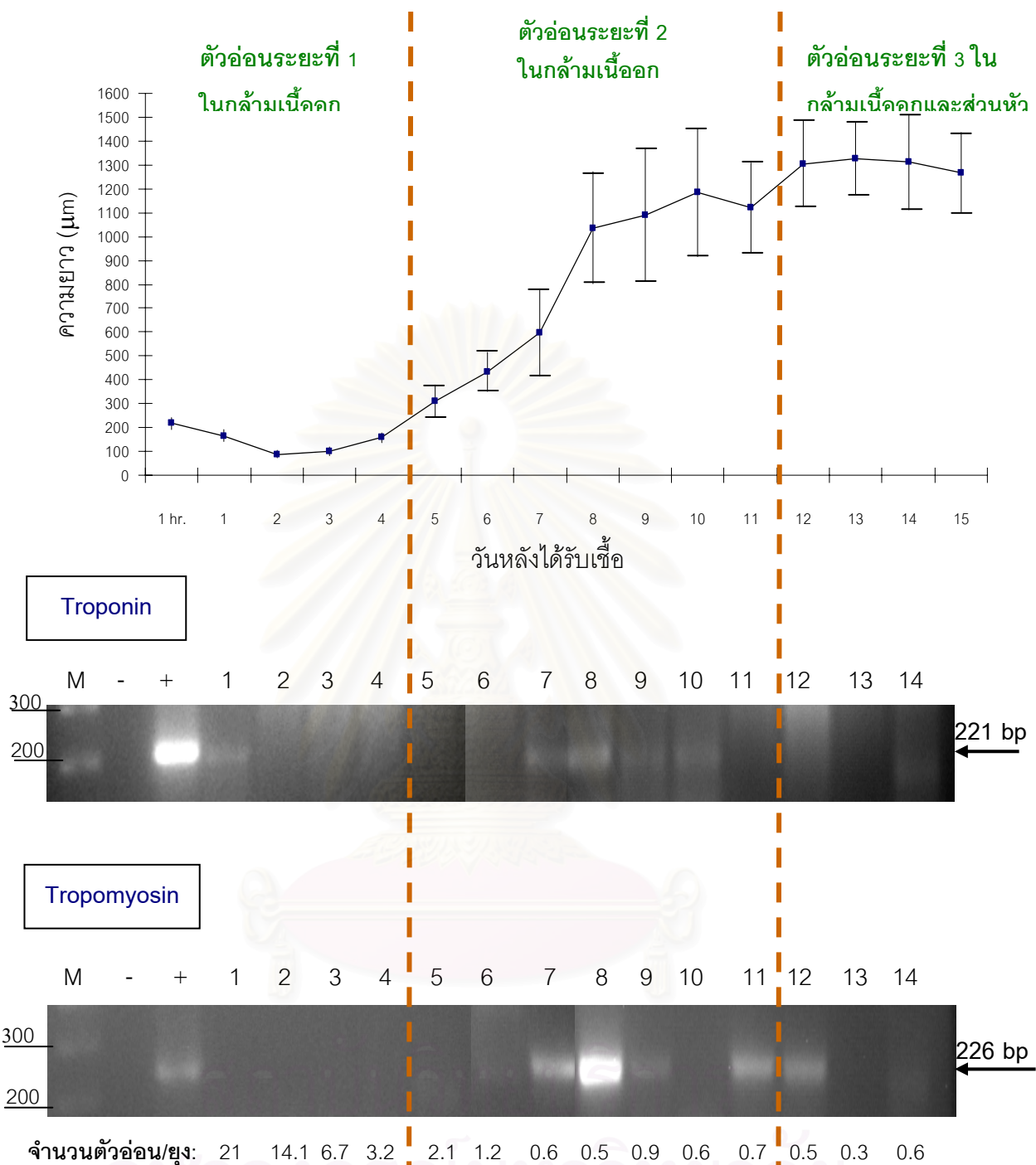
ยีน	RT-PCR	ตัวอย่าง	ผลการทดลอง
โทรโปไมโอซิน	- Two-Step RT-PCR ใช้ RNA 5 µl = ยุง 1 ตัว/cDNA 20 µl - PCR (total 25 µl) ใช้ cDNA 5 µl = ยุง 0.25 ตัว	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: Template free control Lane 2 - 9: ตัวอย่างของ <i>B. pahangi</i> ใน วันที่ 7 - 14 หลังได้รับเชื้อ	<p>สกัด RNA ด้วย TRIzol reagent</p> <p>- Random hexamer</p> <p>500 200</p> <p>M - 7 8 9 10 11 12 13 14</p> <p>← 226 bp</p>

ตารางที่ 12 ความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินของพยาธิ *D. immitis* ด้วยวิธี Two Step RT-PCR

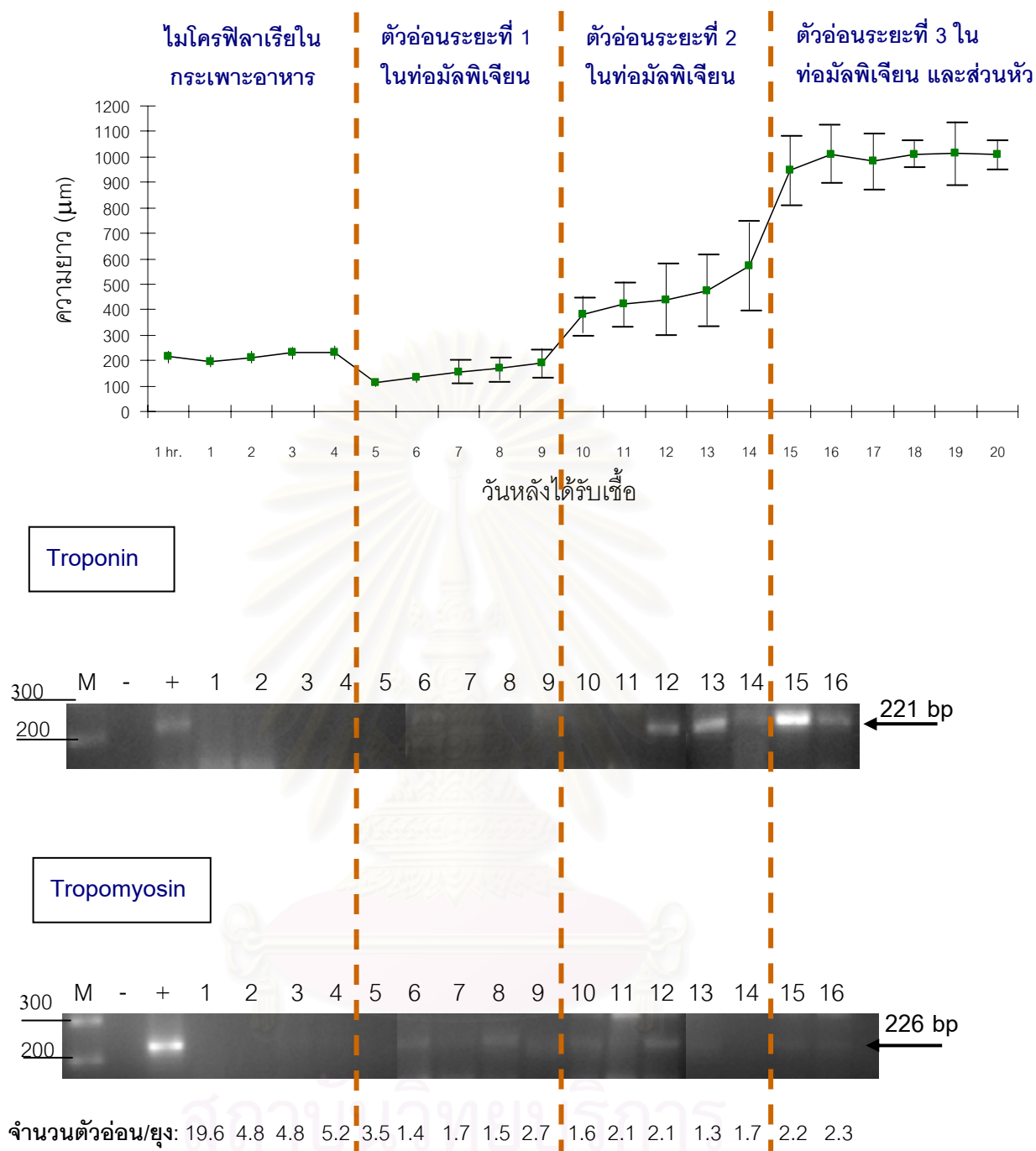
ยีน	ตัวอย่าง	ผลการทดลอง
โทรโปนิน	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: Template free control Lane 2: positive control Lane 3 - 18: ตัวอย่างของพยาธิ <i>D. immitis</i> ในวันที่ 1 - 16 หลังได้รับเชื้อ	สกัด RNA ด้วย Nucleospin RNA II kit ปฏิบัติการลูกโซ่ครั้งที่ 1 M - + 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16  500 bp 200 bp 221 bp

ตารางที่ 13 ความจำเพาะของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินต่อพยาธิ *B. malayi*

ยีน	ตัวอย่าง	ผลการทดลอง
โทรโปนิน	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: Template free control Lane 2 - 3: ดีเอ็นเอตัวอ่อนระยะที่ 3 <i>B. pahangi</i> Lane 4: cDNA ที่ได้จากตัวอ่อน <i>B. pahangi</i> วันที่ 8 Lane 5: ดีเอ็นเอของไมโครฟิลาเรีย <i>B. malayi</i>	<p>ผลการทดลอง</p> <p>M 1 2 3 4 5</p> <p>1000 bp</p> <p>500 bp</p> <p>200 bp</p> <p>700 bp</p> <p>221 bp</p>
โทรโปไมโอซิน	Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker Lane 1: ดีเอ็นเอตัวอ่อนระยะที่ 3 <i>B. pahangi</i> Lane 2 - 4: ดีเอ็นเอไมโครฟิลาเรีย <i>B. pahangi</i> Lane 5: ดีเอ็นเอไมโครฟิลาเรีย <i>B. malayi</i>	<p>M 1 2 3 4 5</p> <p>1000 bp</p> <p>500 bp</p> <p>700 bp</p> <p>221 bp</p>



รูปที่ 4 ความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของพยาธิ *B. pahangi* ด้วยวิธี Two Step RT-PCR เปรียบเทียบกับระยะพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* ที่พบในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) ในแต่ละวัน และรายละเอียดในภาคผนวกหน้า 81 จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว



รูปที่ 5 ความจำเพาะของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินของพยาธิ *D. immitis* ด้วยวิธี Two Step RT-PCR เปรียบเทียบกับระยะพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* ที่พบในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) ในแต่ละวัน และรายละเอียดในภาคผนวกหน้า 81 จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษารูปร่างลักษณะตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) พบว่า ตัวอ่อนระยะที่ 1 อาศัยอยู่ที่กล้ามเนื้อส่วนนอก มีลักษณะลำตัวป้อมและสั้น เคลื่อนไหวเฉพาะส่วนหาง บริเวณส่วนท้ายของลำตัวปรากฏ rectal plug ชัดเจน มีความยาว 45 – 395 μm และความกว้าง 7 – 27.5 μm พบได้ตั้งแต่วันที่ 1 – 5 หลังจากยุงได้รับเชื้อ หลังจากนั้นตัวอ่อนจะลอกคราบครั้งที่ 1 เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ในวันที่ 6 – 11 หลังได้รับเชื้อ มีความยาวเพิ่มขึ้นเป็น 400 – 1280 μm และความกว้าง 17.5 – 55 μm อวัยวะภายในพบการเจริญของหลอดอาหารและลำไส้ และพบตัวอ่อนระยะที่ 3 ในวันที่ 12 – 15 หลังได้รับเชื้อ ตัวอ่อนมีลักษณะลำตัวเรียวยาว โดยมีความยาว 1300 – 1650 μm และความกว้าง 20 – 35 μm ไม่พบ rectal plug หางทู่และมี caudal papillae ตัวอ่อนจะเคลื่อนไหวตลอดเวลา

สำหรับรูปร่างลักษณะของตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* ที่พบในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) จะมีลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกับตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* แต่สามารถแยกตัวอ่อนทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้จากบริเวณที่พบตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 โดยตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* จะพบในท่อมัดพินเจียนที่อยู่ในส่วนท้องของยุง ขณะที่พบตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 ของพยาธิ *B. pahangi* ที่บริเวณกล้ามเนื้อส่วนนอก และสามารถแยกตัวอ่อนพยาธิทั้งสองชนิดนี้ได้จากขนาดของตัวอ่อน โดยตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 ของ *D. immitis* จะมีความกว้างมากกว่าตัวอ่อนของพยาธิ *B. pahangi* แต่ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *D. immitis* จะมีความยาวลำตัวสั้นกว่าตัวอ่อนของ *B. pahangi* โดยตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิ *D. immitis* จะพบตั้งแต่วันที่ 5 – 9 หลังจากยุงได้รับเชื้อและตัวอ่อนมีความยาว 100 – 277.5 μm และความกว้าง 15 – 37.5 μm ตัวอ่อนระยะที่ 2 พบตั้งแต่วันที่ 10 – 14 หลังได้รับเชื้อ มีความยาว 352.5 – 780 μm และความกว้าง 25 – 55 μm และตั้งแต่วันที่ 15 หลังได้รับเชื้อจะพบตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่บริเวณส่วนหัวของยุง ซึ่งตัวอ่อนมีความยาว 890 – 1155 μm และความกว้าง 20 – 35 μm

จากอัตราการติดพยาธิฟีลาเรียในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) พบว่า ตัวอ่อนพยาธิทั้ง *B. pahangi* และ *D. immitis* จะมีจำนวนลดน้อยลงเมื่อพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 โดยพบตัวอ่อนระยะที่ 1 ของ *B. pahangi* เฉลี่ยต่อยุง 1 ตัว เท่ากับ 9.45 ตัว จำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 เฉลี่ยต่อยุง 1 ตัว เท่ากับ 1.71 ตัว และจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 3 เฉลี่ยต่อยุง 1 ตัว

เท่ากับ 0.410 ตัว และตัวอ่อนของพยาธิ *D. immitis* ตัวอ่อนระยะที่ 1 มีจำนวนเฉลี่ยต่อถุง 1 ตัว เท่ากับ 2.17 ตัว จำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 เฉลี่ยต่อถุง 1 ตัวเท่ากับ 0.76 ตัวและจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 3 เฉลี่ยต่อถุง 1 ตัว เท่ากับ 0.405 ตัว

การแยกลักษณะตัวอ่อนพยาธิโดยการย้อมสี 3% ยิมซ่า พบว่าไม่สามารถแยกลักษณะการติดสีของตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ในที่อยู่ระยะเดียวกันได้ เนื่องจากตัวอ่อนจะติดสีน้ำเงินเข้มตลอดทั้งตัว ขณะที่การย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase ไม่สามารถแยกลักษณะการติดสีของตัวอ่อนทั้ง 2 ชนิดในระยะที่ 2 และ 3 ได้ แต่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ได้ เนื่องจากตัวอ่อนของพยาธิ *B. pahangi* ลำตัวติดสีแดงและติดสีแดงเข้มบริเวณทางเดินอาหารและ rectal plug แต่ตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* ลำตัวจะติดสีแดงเข้มตลอดทั้งลำตัวและส่วน rectal plug ติดสีแดงเข้มมาก ดังนั้นการย้อมสี 3% ยิมซ่า และการย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase ไม่สามารถแยกชนิดของตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ออกจากกันได้

จากการทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบยีนทั้งสองชนิดนี้ได้จากวิธี Two Step RT-PCR โดยใช้ถุงเพียง 0.25 ตัว จากการสกัด RNA ด้วย Nucleospin RNA II kit และพบว่าต้องใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* อย่างน้อย 24.6 ตัว จึงจะสามารถพบการแสดงออกของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซิน ขณะที่ใช้ตัวอ่อนระยะที่ 2 จำนวน 5 ตัว ก็สามารถพบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิดได้ใน *B. pahangi* นอกจากนี้จะพบว่ายีนโทรโปไมโอซินมีการแสดงออกมากกว่ายีนโทรโปนินด้วย

จากการศึกษาความจำเพาะของการแสดงออกของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินต่อตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* สามารถพบผลิตภัณฑ์ PCR ได้จากการสกัด RNA ด้วย Nucleospin RNA II kit และทำ Two Step RT-PCR โดยใช้ Random hexamer ในการสังเคราะห์ cDNA โดยใน *B. pahangi* ตรวจพบทรานสคริปของยีนทั้งสองชนิดมากที่สุดในวันที่ 8 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับลักษณะตัวอ่อนที่พบจากการชำแหละถุงพบว่าเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2 โดยพบว่ายีนโทรโปไมโอซินมีทรานสคริปปริมาณมากกว่ายีนโทรโปนิน โดยพบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโทรโปไมโอซินในวันที่ 7 – 8 หลังได้รับเชื้อ และวันที่ 11 – 12 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งวันที่ 12 หลังได้รับเชื้อเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 3 เป็นวันแรก และพบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนโทรโปนินในวันที่ 7 – 10 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งตรงกับวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2

สำหรับการทดสอบความจำเพาะของยีนทั้งสองชนิดนี้ต่อพยาธิ *D. immitis* พบว่าการใช้ไพรเมอร์ของยีนโทรโปไมโอซินไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ในการทำ Two Step RT-PCR ขณะที่พบทรานสคริปของยีนโทรโปนิน ในวันที่ 12 และ 13 หลังได้รับเชื้อ โดยเป็นวันที่พบตัวอ่อนระยะที่ 2 และวันที่ 15 – 16 หลังได้รับเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่พบจากการฆ่าและยุงพบว่า เป็นวันที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3

ผลการทดสอบความจำเพาะของยีนโทรโปไมโอซินและโทรโปนินต่อพยาธิ *B. malayi* ด้วยวิธี PCR พบว่ามาสามารถพบผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ของยีนโทรโปไมโอซิน แต่พบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 700 bp จากไพรเมอร์ของยีนโทรโปนินทั้งจากดีเอ็นเอของ *B. pahangi* และ *B. malayi*

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษารูปร่างลักษณะตัวอ่อนพยาธิฟิลาเรียที่อยู่ในยุงพาหะโดยการฆ่าและยุง เพื่อแยกชนิดของพยาธิ สามารถตรวจสอบได้จากขนาดของลำตัว ขนาดของ rectal plug และระยะห่างระหว่าง rectal plug กับส่วนท้ายของลำตัวพยาธิ ซึ่งจะพบได้ในตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 anal ratio (ความกว้างของส่วนหาง: ความยาวจาก anal ถึงส่วนท้ายลำตัว) หรือรูปร่างลักษณะของ caudal papillae จำนวน 3 อัน โดย 2 อันอยู่ทางด้าน lateroventral และอีกหนึ่งอันอยู่ทางด้าน dorsoterminal ซึ่งจะพบในตัวอ่อนระยะที่ 3 เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเฉพาะขนาดของลำตัวของตัวอ่อนพยาธิเท่านั้น เนื่องจากการวัดความกว้างของ rectal plug อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้มากเนื่องจากตัวอ่อนที่พบมีการวางตัวแตกต่างกัน ทำให้พบทั้งตัวอ่อนที่มีและไม่มี rectal plug ทำให้การวัดขนาดที่ต้องวัดส่วนของ rectum ที่ยื่นออกไปจากผนังลำตัวเกิดความคลาดเคลื่อนได้ (Beckett and Macdonald, 1971, 1972; Chungpivat, 1989) และในการศึกษารูปร่างลักษณะของ caudal papillae ไม่สามารถทำการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยายสูงได้ การตรวจสอบต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) เนื่องจาก caudal papillae ของพยาธิฟิลาเรียมีขนาดและลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก เช่น caudal papillae ของตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* มีลักษณะคล้ายกับ *B. malayi* แต่จะมีขนาดเล็กกว่าของ *W. bancrofti* (Schacher, 1962a)

จากขนาดของตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ที่พบในงานวิจัยนี้ พบว่า สามารถแยกลักษณะตัวอ่อนระยะต่างๆออกจากกันได้จากรูปร่างของตัวอ่อน โดยจะพบว่า

ตัวอ่อนระยะที่ 1 ถ้าตัวจะหดสั้นที่สุดก่อนตัวอ่อนจะเจริญเพิ่มขนาดความยาว ถึงแม้ว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 จะมีความยาวมากที่สุดแต่จะมีรูปร่างเรียวต่างกับตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่มีรูปร่างยาวแต่จะมีความกว้างมากกว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 ความยาวของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* ที่พบในงานวิจัยนี้คือ 1300 – 1650 μm มีค่าใกล้เคียงกับ Yen และคณะ (1982) ที่พบตัวอ่อนระยะที่ 3 มีความยาว 1360 – 1850 μm ขณะที่ความยาวของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ *D. immitis* ที่วัดได้คือ 890- 1150 μm ใกล้เคียงกับ Lichtenfels และ คณะ (1985) ที่พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 มีความยาว 700 – 1000 μm

สำหรับวันที่พบตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ในแต่ละระยะของการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างจากการศึกษาในอดีตโดย จากการตรวจหาตัวอ่อน *B. pahangi* ในยุง *An. quadrimaculatus* พบตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 เร็วกว่าการทดลองนี้ โดยจะพบตัวอ่อนระยะที่ 2 ตั้งแต่วันที่ 4 และ 5 หลังได้รับเชื้อ และพบตัวอ่อนระยะที่ 3 ตั้งแต่วันที่ 8 หลังได้รับเชื้อ (Aoki et al., 1980) และจากการหาตัวอ่อนพยาธิ *D. immitis* ในยุง *An. quadrimaculatus*, *Ae. albopictus*, *Ma. uniformis*, *Ma. indiana* และ *Ma. annulifera* พบตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 เร็วกว่างานวิจัยนี้ โดยในยุง *An. Quadrimaculatus* และ *Ae. albopictus* จะพบตัวอ่อนระยะที่ 1 ในวันที่ 3 – 6 หลังได้รับเชื้อ ตัวอ่อนระยะที่ 2 วันที่ 7- 11 หลังได้รับเชื้อ และตัวอ่อนระยะที่ 3 ตั้งแต่วันที่ 12 หลังได้รับเชื้อ และในยุง *Ma. uniformis*, *Ma. indiana* และ *Ma. annulifera* พบตัวอ่อนระยะที่ 1 วันที่ 3 – 8 หลังได้รับเชื้อ และตัวอ่อนระยะที่ 3 ในวันที่ 14 – 16 หลังได้รับเชื้อ แต่ในยุง *Ae. aegypti* พบตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 ช้ากว่างานวิจัยนี้ โดยตัวอ่อนระยะที่ 1 พบในวันที่ 7 – 8 หลังได้รับเชื้อ และตัวอ่อนระยะที่ 2 พบในวันที่ 14 – 16 หลังได้รับเชื้อ (Kartman, 1953; Surathint et al., 1985)

จากจำนวนตัวอ่อนพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ที่พบในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) ถึงแม้จะมีจำนวนแตกต่างกันในแต่ละวันแต่เมื่อคำนวณตามวันที่พบตัวอ่อนแต่ละระยะจะพบว่าตัวอ่อนมีจำนวนลดน้อยลง และจำนวนตัวอ่อนเฉลี่ยของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* และ *D. immitis* ต่อยุง 1 ตัวมีค่าใกล้เคียงกันมาก แม้ว่าความหนาแน่นของไมโครฟิลาเรียขณะที่ยุงดูดเลือดโฮสต์ทั้ง 2 ชนิดจะมีความแตกต่างกันมากซึ่งสอดคล้องกับ Lai และ คณะ (2000) พบว่า ความหนาแน่นของไมโครฟิลาเรียไม่มีผลต่อจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 3 นอกจากจำนวนไมโครฟิลาเรียที่ยุงรับ ถ้ามีปริมาณมากจะทำให้ยุงมีอัตราการตายสูง เนื่องจากตัวอ่อนจะใช้สารอาหารจากยุง ซึ่งตัวอ่อน *B. pahangi* และ *B. malayi* จะใช้สารอาหารที่กล้ามเนื้อของยุง

หากมีตัวอ่อนมากเกินไปจะมีผลต่อการบินของยุง ทำให้ยุงหาอาหารไม่ได้ (Beckett and Boothroyd, 1969; Berry et al., 1987)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่ทำให้จำนวนตัวอ่อนลดน้อยลงและทำให้พบตัวอ่อนระยะต่างๆในวันที่แตกต่างจากผู้ศึกษาท่านอื่น เช่นชนิดและสายพันธุ์ของยุงที่นำมาใช้ในการทดลอง ที่มีสรีระที่เหมาะสมต่อการเจริญของตัวอ่อน ขณะเดียวกันภายในร่างกายยุงแต่ละชนิดจะมีอวัยวะสำหรับป้องกันภายในร่างกายที่แตกต่างกันด้วย การป้องกันไม่โคโรฟิลาเรียจะมีอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายฟันซึ่งใน *Ae. aegypti* จะมี 1 อัน เรียกว่า pharyngeal armature ที่อยู่ส่วนท้ายของคอหอย ทำให้ปลอกหุ้มของ *B. pahangi* ฉีกขาดทำให้ลำตัวไม่โคโรฟิลาเรียแตก (Bryan et al., 1974; McGreevy et al., 1978) นอกจากนี้ส่วนของผนังกระเพาะ (peritrophic matrix: PM) จะหนามากขึ้นหลังจากที่ยุงดูดเลือดเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในกระแสเลือดไฮสโตทำอันตรายต่อยุง โดย PM จะหนาที่สุด 24 ชั่วโมงหลังจากยุงดูดเลือด (Pascoa et al., 2002) ซึ่งจะสังเกตได้ว่าไม่โคโรฟิลาเรียที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะที่เหมาะสมต่อการเจริญได้จะถูกย่อยสลายอยู่ในกระเพาะตั้งแต่วันที่ 1 หลังได้รับเชื้อ และอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมขณะที่ทำการเลี้ยงยุงที่ควรจะมีอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส แต่ในขณะที่ทำการเลี้ยงยุงมีอุณหภูมิห้องเฉลี่ยเพียง 21 องศาเซลเซียสเท่านั้น ขณะที่ Rodriguez และ Thompson (1974) พบว่าถ้ามีอุณหภูมิสูงจะทำให้ได้ตัวอ่อนระยะที่ 3 น้อย

ผลการย้อมสีตัวอ่อน *B. pahangi* และ *D. immitis* ด้วย Acid phosphatase activity โดยใช้ Naphthol AS-TR phosphate เป็นสับสเตรท ตัวอ่อนติดสีแตกต่างจากการย้อมโดยใช้ Naphthol AS-TR hexazonium เป็นสับสเตรท (Omar, 1977) ที่พบส่วน excretory cell complex ของ *B. pahangi*, *B. malayi* และ *W. bancrofti* ไม่ติดสีแดง ขณะที่บริเวณนี้ของ *D. immitis* ติดสีแดงเข้ม ทำให้สามารถใช้บริเวณแยกชนิดของพยาธิ 2 กลุ่มนี้ได้ ในการย้อมค่า pH เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการติดสีที่แตกต่างกัน การมีกลุ่มควบคุมในการย้อมด้วยทุกครั้งจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยการย้อมสีได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ถ้าค่า pH แตกต่างออกไปมากกว่าหรือน้อยกว่า 0.5 จะทำให้สีที่ปรากฏแตกต่างออกไปมาก (Redington et al., 1975) แตกต่างจาก Maki และ Yanagisawa (1980) ที่พบว่าค่า pH ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีที่สุดใน *D. immitis* ตั้งแต่ 3.8 – 5.8 นอกจากนี้ควรทำการย้อมสีทันทีหลังจากที่ได้ตัวอย่างและหลังจาก fix ทันที ซึ่งถ้าเก็บตัวอย่างไว้นานจะให้ตัวอย่างติดสีจางลงหรือไม่ติดสี ถึงแม้ว่าจะเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสก็ตาม เนื่องจากพบว่าสไลด์แผ่นเลือดหนาที่ใช้เป็นตัวควบคุมสีที่ย้อมในแต่ละวัน แยกการติดสีในบริเวณ

ต่างๆของไมโครพิวลาเรียได้ยาก โดยเฉพาะไมโครพิวลาเรียของ *D. immitis* ส่วนใหญ่ที่ส่วน excretory vesical และ anal vesical ติดสีแดงจางมากหรือไม่ติดสีเลย

งานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้เทคนิค RT-PCR 2 แบบคือ One Step RT-PCR และ Two Step RT-PCR ซึ่งการใช้ One Step RT-PCR ถึงแม้ว่าจะข้อดีคือมีความจำเพาะต่อ mRNA ใช้ระยะเวลาในการทำน้อยและลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน แต่ความไวในการเกิดปฏิกิริยายังไม่น่าพอใจ

การเลี้ยงยุงและตัวอ่อนหนอนพยาธิในยุง 1 ครั้ง จะใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน จึงจะสามารถเก็บตัวอย่างมาสกัด RNA ได้ การใช้วิธี Two Step RT-PCR จึงเหมาะต่อการวิจัยนี้มากกว่าวิธี One Step RT-PCR เนื่องจาก สามารถลดปัญหาการมี RNA จำนวนน้อยได้และลดการสลายไปของ RNA เมื่อเก็บเป็นเวลานานได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการทำวิจัยด้วย นอกจากนี้ได้ทดลองใช้ไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA 2 ชนิดคือ Oligod(T) และ Random hexamer ซึ่งพบว่าการใช้ Random hexamer สามารถนำไปตรวจหาทรานสคริปทั้งหมดของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินได้ดีกว่าการใช้ Oligod(T) อาจเนื่องมาจาก Oligod(T) จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอที่มี poly (A) ประมาณ 1 – 4% ของอาร์เอ็นเอทั้งหมด ทำให้ได้ปริมาณ cDNA น้อยกว่าการใช้ Random hexamer

จากการทดสอบความไวของการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินในตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เจริญสมบูรณ์ ของ *B. pahangi* (วันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ) จะพบว่าต้องใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 จำนวน 60 ตัวจึงจะพบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดนี้ เนื่องจากยีนทั้งสองชนิดนี้ไม่มีความจำเพาะต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เจริญสมบูรณ์ แต่มีความจำเพาะกับตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่กำลังพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ระยะต้น

และจากผลการทดสอบความจำเพาะของยีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินต่อตัวอ่อนระยะต่างๆของ *B. pahangi* พบว่าไม่สอดคล้องกับ Hunter และคณะ (1999) ที่พบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดมากที่สุดในตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เจริญสมบูรณ์ และ มีการแสดงออกของยีนโทรโปนินมากกว่าโทรโปไมโอซิน แต่จากการทดลองจะพบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดสูงที่สุดในตัวอ่อนระยะที่ 2 (วันที่ 8 หลังได้รับเชื้อ) และไม่พบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดในตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เจริญสมบูรณ์แต่จะพบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิดนี้ในตัวอ่อนระยะที่ 3 ระยะต้น นอกจากนี้ยังพบว่ายีนโทรโปไมโอซินมีการแสดงออกมากกว่ายีนโทรโปนิน โทรโปไมโอซินพบได้ที่กล้ามเนื้อผนังลำตัวของ *Caenorhabditis elegans* (Robinson and Soichiro,

2006) พบ TroponinC ที่ผนังกล้ามเนื้อลำตัวและกล้ามเนื้อบริเวณคอหอยของ *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974) โดย Tropomyosin จะทำงานร่วมกับ TroponinT และ TroponinI ที่เกาะอยู่บน actin ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อ ขณะที่ TroponinC จะจับกับแคลเซียมเพื่อให้ TroponinI เปลี่ยนแปลงรูปร่างแล้ว myosin มาจับกับ actin ได้ ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Gordon et al., 2000) จากการที่ Schacher (1962) พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 2 ของพยาธิ *B. pahangi* ที่พบในยุงตั้งแต่วันที่ 6 - 7 หลังได้รับเชื้อ เริ่มพบกล้ามเนื้อที่บริเวณรอยต่อของหลอดอาหารและมีกล้ามเนื้อผนังลำตัวทำให้ตัวอ่อนเคลื่อนไหว ไค้งงอได้ แต่ยังคงเคลื่อนไหวช้าเมื่อเทียบกับตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เคลื่อนไหวได้ดีมาก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ายีนโทรโปนินและโทรโปไมโอซินจะมีการแสดงออกยีนในช่วงที่ตัวอ่อนกำลังเจริญพัฒนาจากระยะที่ 2 เป็นระยะที่ 3 ทั้งใน *B. pahangi* และ *D. immitis*

การเกิดปฏิกิริยาข้ามจากการใช้ไพรเมอร์โทรโปนินทดสอบความจำเพาะของดีเอ็นเอหนอนพยาธิ *B. pahangi* และ *B. malayi* อาจเนื่องมาจากลำดับเบสของยีนโทรโปนินของ *B. pahangi* มีความคล้ายคลึงกับหนอนพยาธิ *B. malayi* ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3, Hunter et al., 1999) ขณะที่ลำดับเบสของยีนโทรโปไมโอซินของ *B. pahangi* มีความคล้ายคลึงกับ *B. malayi* สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบปฏิกิริยาข้ามจากไพรเมอร์นี้อาจเกิดจากสภาวะการทำกาารเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่เหมาะสมหรือเกิดจากดีเอ็นเอมีการสลายตัว

จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจหาทรานสคริปของยีนโทรโปนินและยีนโทรโปไมโอซิน ซึ่งสามารถพบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดได้ตั้งแต่ในตัวอ่อนระยะที่ 2 ของพยาธิ *B. pahangi* เป็นต้นไป โดยมีการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดมากที่สุดในตัวอ่อนระยะที่ 2 (วันที่ 8 หลังได้รับเชื้อ) และยีนโทรโปไมโอซินจะมีการแสดงออกมากกว่ายีนโทรโปนิน ขณะเดียวกันสามารถพบยีนทั้งสองชนิดนี้ได้จากตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 ของ *D. immitis* เช่นเดียวกัน โดยยีนโทรโปนินมีการแสดงออกมากกว่ายีนโทรโปไมโอซินและพบปฏิกิริยาข้ามของไพรเมอร์โทรโปนินใน *B. malayi* แม้ว่าจะมีการเกิดปฏิกิริยาข้ามของยีนทั้งสองชนิดกับพยาธิฟิลาเรียชนิดอื่น แต่ความไวและความจำเพาะในการตรวจพบทรานสคริปของยีนทั้งสองชนิดใน *B. pahangi* และ *D. immitis* มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้โทรโปไมโอซินในการตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 ของ *B. pahangi* ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบ่งชนิดของยุงพาหะนำโรคได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาครั้งต่อไปควรทดสอบความไวของเทคนิค RT-PCR ต่อการแสดงออกของยีนโทรโปนินและโทรโปโมโอซินต่อตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 ของพยาธิ *B. pahangi* ในยุงหลังจากได้รับไมโครฟิลาเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อให้ทราบจำนวนตัวอ่อนที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้
2. การศึกษาครั้งต่อไปควรทดลองออกแบบไพรเมอร์ใหม่และปรับสภาวะการทดลอง เพื่อให้ยีนทั้งสองชนิดนี้มีความจำเพาะต่อ *B. pahangi* มากยิ่งขึ้น
3. การศึกษาครั้งต่อไปควรทดสอบความจำเพาะของยีนโทรโปนินและโทรโปโมโอซินต่อปรสิตชนิดอื่นที่สามารถพบได้ในยุง เพื่อให้ทราบถึงรูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดนี้
4. คำนคว้าหายีนตัวอื่นที่มีความจำเพาะต่อตัวอ่อนระยะที่ 3 พยาธิ *B. pahangi* เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ตัวอ่อนระยะที่ 3 *B. pahangi* ในยุงนำโรค

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พรรณจิตต์ นิลกำแหง และ อรุณรัตน์ โชคฉายชัย. 2528. พิลาริโอซิสในแมว: รายงานสัตว์ป่วย.

วารสารชมรมผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์. 7(3):145 – 148.

มาริษศักร์ กัลล์ประวิทย์. 2544. การวางยาสลบสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาพร จิตตपालพงศ์. 2533. การศึกษาการระบาดของพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขเลี้ยงในจังหวัดสมุทรปราการ. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์. 2: 265-275.

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ และ สุภัทร สุจริต. 2533. การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิ *Brugia pahangi* ในกระแสน้ำเลือดแมวในกรุงเทพมหานคร. วารสารเวชศาสตร์สัตวแพทย์. 20: 238 – 245.

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ และ สุภัทร สุจริต. 2536. ไมโครฟิลาเรียของแมวในเขตกรุงเทพมหานคร. วารสารเวชศาสตร์สัตวแพทย์. 23(2):75 – 87.

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์, สุวรรณิ นิธิอุทัย, เบ็ญจวรรณ สีขณาสัย และ ธานินทร์ สันติวัฒน์ธรรม. การตรวจวินิจฉัยไมโครฟิลาเรียของหนอนพยาธิหัวใจสุนัขด้วยวิธีทางฮีสโตเคมี “Acid phosphatase activity”. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์. 2(3):195 – 203.

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ และ สุวรรณิ นิธิอุทัย. 2543. การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างของไมโครฟิลาเรียของพยาธิ *Dirofilaria repens* และไมโครฟิลาเรียของพยาธิฟิลาเรียชนิดอื่นที่พบได้ในสุนัขและแมว. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38.

สุภัทร สุจริต. 2531. โรคเท้าช้างพิลาริโอซิสในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์. หน้า 44.

สุวรรณิ นิธิอุทัย และ สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์. 2534. การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียของพยาธิหัวใจในกระแสน้ำเลือดสุนัข. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์. 3: 241 - 247.

สุวรรณิ นิธิอุทัย และ สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์. 2535. พยาธิฟิลาเรียในระบบน้ำเหลือง (*Brugia pahangi*) ของสุนัข. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์. 4:123 – 133.

อาคม สังข์วรานนท์. 2524. การระบาดของพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขจรจัดในเขตกรุงเทพมหานคร ขนาดของการติดพยาธิและ อัตราส่วนระหว่างเพศของพยาธิ. วารสารสัตวแพทย์. 2:185-199.

อาคม สังข์วรานนท์. 2535. พยาธิภายในของสุนัขและแมวในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล.
วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์. 6(1):21 – 31.

ภาษาอังกฤษ

- Abadie SH, Swartzwelder JC, Holman RL. 1965. A Human Case of *Dirofilaria immitis* infection. The American journal of tropical medicine and hygiene. 14:117 - 118.
- Ash, R. and Little D. 1964. *Brugia beaveri* sp. n. (Nematode: Filarioidea) from the raccoon (*Procyon lotor*) in Louisiana. The Journal of Parasitology. 50:119 - 123.
- Beckett, E. 1971. A method of differentiating *Brugia pahangi* larvae from *B. malayi* larvae. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 65: 271 – 272.
- Beckett, E. 1972. The morphology of the rectal protrusion of *B. pahangi* and subperiodic *B. malayi* larvae as a method of differentiating between the two species. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 66:135 – 141.
- Beckett, E. and Boothroyd, B. 1970. Mode of nutrition of the larvae of the filarial nematode *Brugia pahangi*. Parasitology. 60(1):21 - 26.
- Berry, W.J., Rowley W.A. and Christensen, B.M. 1987. Influence of developing *Dirofilaria immitis* on the Spontaneous fight activity of *Aedes aegypti*. Journal of Medical Entomology. 24:699 – 701.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics77: 71 - 94.
- Brown, W., Paul, A., Venco, L., Mccall, J. and Brunt, J. 1999. Roundtable discussion feline heartworm disease part1. Feline Practice. 27: 6 – 9.
- Bryan, J.H., Oothman, P., Andrews, B.J. and McGreevy, P.B. 1974. Effects of pharyngeal armature of mosquitoes on microfilariae of *Brugia pahangi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 68:14. _
- Buckley J.J. and Edeson, J.F. 1956. On the adult morphology of *Wuchereria* sp. (*malayi*?) from a monkey (*Macaca irus*) and from cats in Malaya, and on *Wuchereria pahangi* n.sp. from a dog and a cat. Journal of Helminthology.30(1):1 - 20.

- Buckley, J.J., Nelson, G.S. and Hensch, R.B. 1958. On *Wuchereria patei* n. sp. from the lymphatics of cats, dogs and Genet Cats on Pate Island, Kenya. Journal of Helminthology. 32:73 - 80.
- Chakrabarti, A. and Chatterjee, A.1982. Dirofilarial dermatitis in dogs. Veterinary Parasitology. 9: 277 - 280.
- Choochote, W., Sucharit, S., Kamboonruang, C., Somboon, P. and Suwanpanit, P. 1986. Susceptibility of *Mansonia* mosquitoes to subperiodic *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*.The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 17(1):144 – 145.
- Choochote, W., Sukhavat, K., Keha, P., Somboon, P., Khamboonruang, C. and Suwanpanit, P. 1987. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs and its potential vector in Amphur Muang Chiang Mai, Northern Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 18 :131-134.
- Choochote, W., Suttajit, P., Rongsriyam Y., Likitvong, K., Tookyang, B., Pakdicharoen, A., Siriprasert, V. and Sukontasan, K. 1992. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs and their natural vectors in Amphur Muang Chiang Mai, Northern Thailand. The Journal of Tropical Medicine and Parasitology. 15 :11 - 17.
- Chungpivat, S. 1989. Studies on *Brugia* species in natural reservoir host in Bangkok. M.Sc.(TropMed) Thesis. Faculty of Trop Med, Mahidol University. Bangkok.
- Cross, J.H., Hsu, M.Y., Lien, J.C. 1980. Preliminary observations on the development of larval filariae in Toxorhynchites species. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 29(1):46 - 49.
- Dalton, G.O. Jr., Bruce, L.A., Huber, T.L. 1971. Effect of *Dirofilaria immitis* on renal function in the dog. American Journal of Veterinary Research . 32:2087 - 2089.
- Dissanaike, A.S. and Paramanathan, D.C. 1961. On *Brugia* (*Brugiella* subgen. nov.) *buckelyi* n.sp., from the heart and blood vessels of the Ceylon hare. Journal of Helminthology. 35:209 - 220.

- Edeson, J.F.B., Wilson, T., Wharton, R.H. and Laing, A.B.G. 1960a. Experimental transmission of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* to man. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 54(3):239 – 234. _
- Edeson, J.F.B., Wharton, R.H. and Laing, A.B.G. 1960b. A preliminary account of the transmission, maintenance and laboratory vectors of *Brugia pahangi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 54(5):439 – 449. _
- Esslinger, J.H. 1962. Behavior of microfilariae of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 14:260.
- Ewert, A. 1965a. Comparative migration of microfilariae and development of *Brugia pahangi* in various mosquitoes. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 14:254 – 259.
- Ewert, A. 1965b. Exsheathment of the microfilariae of *Brugia pahangi* in susceptible and refractory mosquitoes. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 14:260 – 262.
- Ewert, A. 1967. Studies on the transfer of infective *Brugia pahangi* larvae from vector mosquitoes to the mammalian host. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 61(1):110 - 113.
- Ewert, A., Wu, C.C. and Fan, P.C. 1987. Laboratory transmission of lymphatic filariasis by vector mosquitoes. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 18(1):73 - 78.
- Fischer, P., et al. 2002. PCR-based detection and identification of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor Island, Indonesia. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 96: 809 - 821.
- Gordon, A.M., Homsher, E. and Regnier, M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. Physiological Review. 80:853 – 924.
- Guptavanij, P., Chamlong, C., Vutikes, S., Deesin, T. and Surathin, K. 1978. The vectors of *Brugia malayi* in southern thailand. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 9: 543 – 548.

- Harris, H., Tso, M.Y.W. and Epstein, H. 1977. Actin and myosin-linked calcium regulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and structural properties of native filaments and purified proteins. Biochemistry.16:859 – 865.
- Hunter, S.J., Martin, S.A., Thompson, F.J., Tetley, L. and Devaney, E. 1999. The isolation of differentially expressed cDNA clones from the filarial nematode *Brugia pahangi*. Parasitology.119:189 – 198.
- Johnstone, I.L. and Barry, J.D. 1996. Temporal reiteration of a precise gene expression pattern during nematode development. The EMBO journal. 15:3633 – 3639.
- Kartman, L. 1953. On the growth of *Dirofilaria immitis* in the mosquito. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.2:1062 – 1069.
- Kim, H.K, Seo, B.S. 1968. Studies on filariasis in Korea: On the morphology and development of larvae of *Brugia malayi* in *Aedes togoi*. Kisaengchunghak Chapchi. 1968 Jun;6(1):1-13.
- Kimura, K., tanaka, T., Nakae, H. and Obinata, T. 1987. Troponin from nematode: purification and characterization of troponin from *Ascaris* body wall muscle. Comparative Biochemistry and Physiology.88B:399 – 407.
- Laing, A.B.G., Edeson, J.F.B. and Wharton, R.H. 1960. Studies on filariasis in malaya: the vertebrate hosts of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 54:92 – 99.
- Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Kotani, T. and Powers, K.G. 1985. Morphogenesis of developmental stages of *Dirofilaria immitis* (Nematode) in the dog. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 52:93 – 113.
- Mak, J.W. 1983. Filariasis. Bulletin No.19 from the Institute for Medical Research Kuala Lumpur Malaysia.
- Maki, J. and Yanagisawa, T. 1980. Acid phosphatase activity demonstrated in the nematodes, *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus cantonensis* with special reference to the characters and distribution. Parasitology. 80(1):23 - 38.
- Marquardt, W.C., Demaree, R.S., Grieve, R.B. (Eds.). 2000. Parasitology and vector biology. New York: Academic Press.

- Mcgreevy, P.B., Bryan, J.H., Oothuman, P. and Kolstrup, N. 1978. The lethal effects of the cibarial and pharyngeal armatures of mosquitoes on microfilariae. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 72(4):361 – 368.
- McReynolds, L.A., Poole, C., Hong, Y., Williams, S.A., Partono, F. and Bradley, J. 1993. Recent advances in the application of molecular biology in filariasis. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 24:55 – 63.
- Nithiuthai, S. 2003. Risk of canine heartworm infection in Thailand. WSAVA 2003 congress proceeding. 53 - 57.
- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Nithiuthai, S., Chungpivat, S., Suvannadabba, S. and Poovorawan, Y. 2006. Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. Veterinary parasitology. 140: 366 – 372.
- Nutman, B. 2000. Lymphatic filariasis. London:Imperial College Press. pp.127 – 150.
- Orihel, T.C. 1966. *Brugia tupaiae* spn. n. (Nematoda: Filarioidea) in tree shrews (*Tupaia glis*) from Malaysia. The Journal of Parasitology. 52(1):162 - 165.
- Palmier, J.R., Ratiwayanto, S., Masbar, S., Tirtokusumo, S., Rusch, J. and Marwoto, H.A. 1985. Evidence of possible natural infections of man with *Brugia pahangi* in South Kalimantan (Borneo), Indonesia. Tropical and Geographical Medicine. 37:239 – 244.
- Partono, F., Dennis, D.T., Atmosoedjono, S., Oemijati, S. and Cross, J.H. 1977. *Brugia timori* sp. n. (nematoda: filarioidea) from Flores Island, Indonesia. The Journal of Parasitology. 63(3):540 - 546.
- Pascoa, V., et al. 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. Insect Biochemistry Molecular Biology. 32(5):517 - 523.
- Redington, B.C., Montgomery, C.A., Jervis, H.R. and Hockmeyer, W.T. 1975. Histochemical differentiation of the microfilariae of *Brugia pahangi* and sub-periodic *Brugia malayi*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 69(4):489 – 492.
- Robinson, Y. and Shoichiro O. 2006. Dual Roles of Tropomyosin as an F-Actin Stabilizer and a Regulator of Muscle Contraction in *Caenorhabditis Elegans* Body Wall Muscle. Cell Motil Cytoskeleton. 63(11): 659 – 672.

- Rodriguez, P.H. 1973. Differential development of *Brugia pahangi* in laboratory strains of *Aedes aegypti*. Journal of Medical Entomology. 10(2):194 – 197.
- Rodriguez, P.H. and Thompson, P.A. 1974. Effects of temperature on development of *Brugia pahangi* in a susceptible strain of *Aedes aegypti*. The Journal of Parasitology. 60(6):1060 – 1061.
- Rogers, R. and Denham, D.A. 1974. Studies with *Brugia pahangi* 7. Changes in lymphatics of injected cat. Journal of Helminthology. 48:213 – 219.
- Schacher, J.F. and Sahyoun, P.F. 1967. A chronological study of the histopathology of filaria disease in cats and dogs caused by *Brugia pahangi* (Buckley and Edeson, 1956). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 61(2):234 – 243.
- Schacher, J.F. 1962a. Morphology of the microfilariae of *Brugia pahangi* and of the larval stages in the mosquitoes. The Journal of Parasitology. 48(5):679 – 692.
- Schacher, J.F. 1962b. Development stages of *Brugia pahangi* in the final host.. The Journal of Parasitology. 48(5):693 – 706.
- Schaub, R.G. and Rawlings, C.A. 1980. Pulmonary vascular response during phases of canine heartworm disease: scanning electron microscopic study. American Journal of Veterinary Research. 41:1082 - 1089.
- Singh, B. 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. International Journal for Parasitology. 27(10):1135 – 1145.
- Sivanandam, S. and Fredericks, H.J. 1966. The innenkorper differentiation between the microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* (subperiodic form). The Medical Journal of Malaya. 20:337 – 338.
- Sucharit, S., Harinasuta, C., Viraboonchai, S. and Smithanonda, S. 1975. The differentiation of *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*, *Brugia Tupaiae* and *Wuchereria bancrofti*. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 6(4):549 – 553.
- Surathint, K., Leemingsawat, S., Tumrasvin, W., Deesin, T., Sucharit, S. and Panvuth, N. 1985. Experimental study on the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Thailand. Journal of Parasitology Tropical Medicine Association Thailand. 8(2): 40 – 43.

- Suswillo, R.R., Denham, D.A. and McGreevy, P.B. 1982. The number and distribution of *Brugia pahangi* in cats at different times after a primary infection. Acta Tropica. 39:151 – 156.
- Terami, H., William, B.D., Kitamura, S., Sakube, Y., Matsumoto, S., Doi, S., Obinata, T. and Kagawa, H. 1999. Genomic organization, expression and analysis of the troponin C gene *pat-10* of *Caenorhabditis elegans*. The journal of cell biology. 146:193 – 202.
- Vezzani, D., Eiras, D.F., Wisnivesky, C. 2006. Dirofilariasis in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. Veterinary parasitology. 136: 259 – 273.
- Wilson, T. and Ramachandran, C.P. 1971. *Brugia* infections in man and animals : long-term observations on microfilariaemia and estimates of the efficiency of transmission from mosquito vector to definitive host. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 65(4):525 – 546.
- Yen, P., Zaman, V. and Mak, J. 1982. Identification of some common infective filarial larvae in Malaysia. Journal of Helminthology. 56:69 – 80.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียม 50x Tris-acetate EDTA (TAE)

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
EDTA	100	มิลลิลิตร
เติม sterile water จนครบ 1000 มิลลิลิตร		

การเตรียม 1x TAE

นำ 50x TAE 10 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียม Cetyl - Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

CTAB	2	กรัม
NaCl	8.2	กรัม
β -Mercapto-ethanol	0.2	มิลลิลิตร
EDTA	0.74	กรัม
Tris	1.214	กรัม
เติม sterile water จนครบ 1000 มิลลิลิตร		

การเตรียม lysis buffer

EDTA	24.6	กรัม
N-laurylsarcosine	1.3	กรัม
เติม NaOH เพื่อปรับค่า pH=9		
เติม sterile water จนครบ 1000 มิลลิลิตร		

การเตรียม Phenol/Chloroform/isoamyl alcohol

Saturated Phenol	25	มิลลิลิตร
Chloroform	24	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	1	มิลลิลิตร

การเตรียม 2% Agarose gel

ซึ่ง agarose 0.6 กรัม ละลายใน 1x TAE ให้ได้ปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร

การเตรียม Phosphate buffered saline (PBS) (0.01 M, pH 7.2)

สารละลาย A

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.38	กรัม
NaCl	8.50	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

สารละลาย B

NA ₂ HPO ₄	1.42	กรัม
NaCl	8.50	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 280 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 720 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีและแหล่งที่มา

สารเคมี	แหล่ง
CTAB	Sigma
N-laurolsarcosine	Amresco
β -Mercapto-ethanol	Pharmacia Biotech
TRIzol reagent	Invitogen
Proteinese K	USB
Tris base	Amresco
EDTA	Pharmacia Biotech
Ethidium bromide	Bio-rad
Agarose	USB
1.5 Kbp DNA ladder	Pacific science
Phenol	Amresco
Chloroform	Merck
dNTP	eppendorf
Taq DNA Polymerase	Finnyme
M-MULV reverse transcriptase	Finnyme
Oligod(T)	Pacific science
Random hexamer	Pacific science
Gene specific primer	Proligo
Naphthol AS-TR phosphate sodium salt	Sigma
Pararosaniline hydrochloride	Sigma

การย้อมเอ็นไซม์ Acid phosphatase

1. หลังจากทำ 3-line thick smear จากเลือดของสุนัขหรือแมวที่มีไมโครพลาเรีย ทิ้งสไลด์ให้แห้ง อย่างน้อย 3 ชั่วโมงล้างฮีโมโกลบินในน้ำกลั่น 1 – 2 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง
2. วางสไลด์ที่มีตัวอ่อนพยาธิพลาเรียที่ได้จากการฆ่าเหาะไว้ให้แห้ง
3. นำ absolute acetone ไปแช่ในเครื่องทำความเย็นที่ 4°C หรือต่ำกว่า จนกว่าจะนำแผ่นเลือด มา fix
4. ตั้งเครื่อง incubator ไว้ที่ 37°C
5. เตรียมน้ำยาย้อมสี ดังนี้

Solution 1: Michaelis veronal acetate buffer, pH 10.0

Sodium acetate	9.714	กรัม
Sodium barbital	14.714	กรัม
น้ำกลั่น	500	ซีซี

Solution 2: Nephthol AS-TR phosphate

Naphthol AS-TR phosphate sodium salt	0.05	กรัม
N – N dimethyl formamide	5.0	มล.

Sodium 3: Pararosaniline

Pararosaniline hydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	20.0	ซีซี
HCl เข้มข้น	5.0	ซีซี

ใส่ pararosaniline hydrochloride ในน้ำกลั่นแล้วต้มให้เดือดเมื่อละลายแล้ว ใส HCl ลงไป ทิ้งไว้ให้เย็น

Solution 4: Sodium nitrite, 4%

Sodium nitrite	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	ซีซี

6. นำสารละลายทั้ง 4 ชนิด ไปเตรียมเป็น incubating medium โดยการ ผสม solution 1 จำนวน 25 ซีซี กับน้ำกลั่น 62.5 ซีซี แล้วเติม solution 2 จำนวน 5 ซีซี solution 3 และ solution 4 อย่างละ 4 ซีซี เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดความเป็นกรด-ด่าง และปรับค่า pH ให้เป็น 5 ด้วย 0.1N NaOH
7. fix สไลด์ด้วย cold absolute acetone 1 นาที
8. นำสไลด์ไปย้อมสีใน incubating medium ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง

อัตราการติดพยาธิพลาเรียในยุง *Aedes aegypti* (Thailand strain)

อัตราการติดไมโครพลาเรียในยุง *Ae. aegypti* จำนวน 30 ตัวที่ดูดเลือดแมวที่มีไมโครพลาเรียของพยาธิ *B. pahangi* จำนวน 6250 ตัว/มิลลิลิตร ตั้งแต่เวลา 14.00 – 15.30 น. พบว่า อัตราการติดพยาธิในยุงคิดเป็น 100% (30/30) ในจำนวนนี้โดยเฉลี่ย มีไมโครพลาเรีย 24 ตัวต่อยุง 1 ตัว หลังจากการติดเชื้อในวันที่ 1 อัตราการติดพยาธิในยุงลดต่ำลงและจำนวนเฉลี่ยของไมโครพลาเรียหรือตัวอ่อนที่พบต่อยุง 1 ตัวมีปริมาณน้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยในวันที่ 14 หลังได้รับเชื้อ อัตราการติดตัวอ่อนคิดเป็น 13.33% (4/30) และมีตัวอ่อนรวมทั้งสิ้น 7 ตัวเท่านั้น (ตารางภาคผนวกที่ 1) บริเวณที่พบตัวอ่อนในวันที่ 1, 2, 3 และ 7 คือส่วนอกและท้อง ส่วนวันที่ 4, 5, 6 และ 8 หลังได้รับเชื้อพบตัวอ่อนเฉพาะในส่วนอกของยุง และตั้งแต่วันที่ 9 หลังได้รับเชื้อจะเริ่มพบตัวอ่อนในส่วนหัวของยุง

เมื่อศึกษาอัตราการติดพยาธิในยุงเปรียบเทียบกับตัวอ่อนของพยาธิ *D. immitis* โดยสุนัขมีความหนาแน่นของไมโครพลาเรียเท่ากับ 1021 ตัว/มิลลิลิตร ที่เวลา 14.00 น. พบว่าวันที่ 1 หลังได้รับเชื้อ อัตราการติดพยาธิในยุงคิดเป็น 100 % โดยยุง 1 เช่นเดียวกับพยาธิ *Brugia* มีตัวอ่อน 19.6 ตัวต่อยุง 1 ตัว ตั้งแต่วันที่ 2 - 20 ยุงมีอัตราการติดพยาธิลดน้อยลง และค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอ่อนที่พบในยุงก็ลดต่ำลงด้วย โดยในวันที่ 20 หลังการติดเชื้อ พบตัวอ่อนเฉลี่ย 1.2 ตัวต่อยุง 1 ตัว และยุงมีอัตราการติดตัวอ่อนคิดเป็น 53% (ตารางภาคผนวกที่ 2) ตัวอ่อนที่พบในวันที่ 1 – 4 หลังได้รับเชื้อจะพบในท่อมัลพิเจียนและส่วนท้องของยุง ตั้งแต่วันที่ 5 หลังได้รับเชื้อจะไม่พบตัวอ่อนในส่วนท้องอีก ยกเว้นวันที่ 15 หลังได้เชื้อและวันนี้เป็นวันแรกที่พบตัวอ่อนในส่วนหัวของยุง ถึงแม้ว่าตั้งแต่วันที่ 4 หลังได้รับเชื้อจะพบจำนวนตัวอ่อนในยุง 1 ตัวของ *D. immitis* มากกว่าจำนวนตัวอ่อนที่พบในยุง 1 ตัวของพยาธิ *B. pahangi* แต่ตัวอ่อนที่พบใน *D. immitis* ส่วนใหญ่เป็นไมโครพลาเรียที่กำลังเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 ที่ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ในท่อมัลพิเจียน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางภาคผนวกที่ 1 อัตราการติดหนอนพยาธิ *B. pahangi* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) จำนวน 30 ตัว

(microfilaremia = 6250/ml ที่เวลา 14.00 – 15.30 น.)

วันที่	1 ชม.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
จำนวนยุงที่พบตัวอ่อน	30	30	24	26	14	13	10	10	6	7	5	2	7	2	4	4
อัตราการติดตัวอ่อน	100%	100%	80%	87%	47%	43%	33%	33%	20%	23%	17%	7%	23%	7%	13%	13%
จำนวนตัวอ่อนที่พบ:																
ส่วนหัว	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5	7	5	8	12	6
ส่วนอก	59	161	306	190	97	65	37	17	16	14	7	6	7	2	3	-
ส่วนท้อง	657	469	118	13	-	-	-	1	-	8	7	8	2	-	4	1
รวม	716	630	424	202	97	65	37	18	16	26	19	21	14	10	19	7
จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว	23.87	21	14.13	6.73	3.23	2.17	1.23	0.6	0.53	0.87	0.63	0.7	0.47	0.33	0.63	0.23

อัตราการพบตัวอ่อนในยุง = $\frac{\text{จำนวนยุงที่มีตัวอ่อน}}{\text{จำนวนยุงทั้งหมด}} \times 100$ (N=30)

จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว = $\frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่พบทั้งหมด}}{\text{จำนวนยุงทั้งหมด}}$

ตารางภาคผนวกที่ 2 อัตราการติดหนอนพยาธิ *D. immitis* ในยุง *Ae. aegypti* (Thailand strain) จำนวน 30 ตัว

(microfilaremia = 1021/ml ที่เวลา 14.00 – 15.00 น.)

วันที่	1 hr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
จำนวนยุงที่พบตัวอ่อน	23	30	28	18	20	14	7	14	14	16	15	15	18	16	19	21	26	18	17	20	16	
อัตราการติดตัวอ่อน	77%	100	93%	60%	67%	47%	23%	47%	47%	57%	50%	50%	60%	53%	63%	70%	86%	60%	57%	67%	53%	
		%																				
จำนวนตัวอ่อนที่พบ :																						
ส่วนหัว	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	19	12	12	6	9
ส่วนอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ส่วนท้อง	201	233	286	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
ท่อมัลพิเจียน	-	355	159	133	136	105	41	52	45	82	49	63	53	40	52	51	51	23	25	40	27	
รวม	201	588	445	143	156	105	41	52	45	82	49	63	63	40	52	67	70	35	37	46	36	
จำนวนตัวอ่อนต่อยุง 1 ตัว	6.7	19.6	4.83	4.76	5.2	3.5	1.36	1.73	1.5	2.73	1.63	2.1	2.1	1.33	1.73	2.23	2.33	1.16	1.23	1.53	1.2	

อัตราการพบตัวอ่อนของยุง = จำนวนยุงที่มีตัวอ่อน X 100 (N=30)

จำนวนเฉลี่ยของตัวอ่อนที่พบในยุง 1 ตัว = $\frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่พบทั้งหมด}}{\text{จำนวนยุงทั้งหมด}}$

สัตวแพทย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



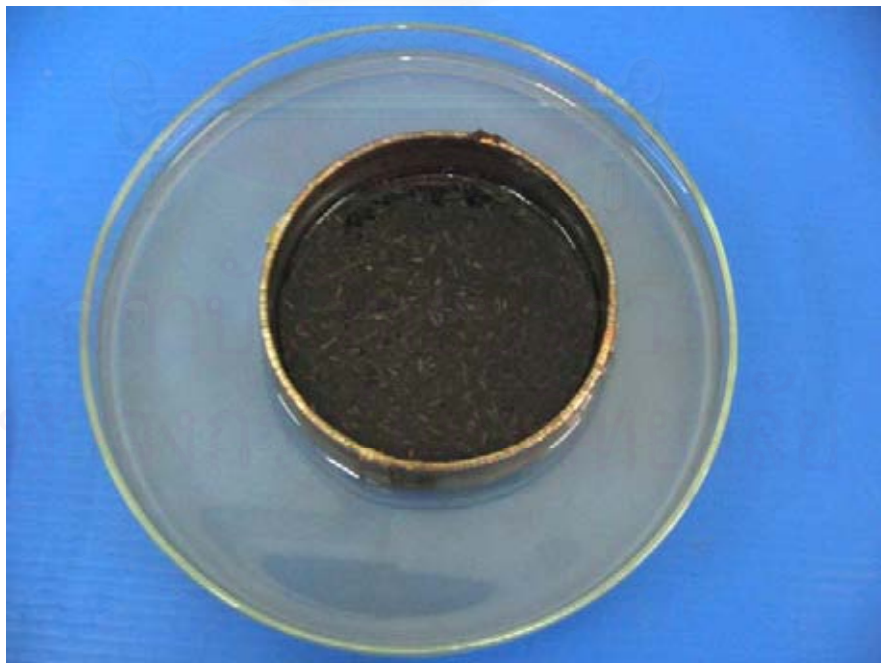
รูปภาพผนวกที่ 1 กรงสำหรับเลี้ยงยุงตัวเต็มวัย



รูปภาพผนวกที่ 2 ถังสำหรับใส่ยุงตัวเต็มวัย



รูปภาพผนวกที่ 3 แสดงยุงดูดเลือดสัตว์ทดลองที่มีไมโครพลาเรียในกระแสเลือด



รูปภาพผนวกที่ 4 mass dissection

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิวะพร กล้าคล้าย เกิดวันที่ 10 พฤศจิกายน พ.ศ.2524 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต(ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2546 และในปีเดียวกันได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์(ปรสิตวิทยา) ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตว แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย