

ผลงานวิชาการอันดับที่ 2

ประกอบคำขอประเมินผลงาน

ของ

นายธีระยศ กอบอาษา

นักวิชาการสาธารณสุขชำนาญการ

เรื่อง

การจำแนกเชื้อชนิด *Brugia malayi* จากไมโครฟิลาเรียในแมวที่จังหวัดนราธิวาส

(Identification of *Brugia malayi*-like Microfilariae in Naturally-infected Cats

from Narathiwat Province, Southern Thailand)

## การจำแนกเชื้อชนิด *Brugia malayi* จากไมโครฟิลาเรียในแมวที่จังหวัดนราธิวาส

ธีระยศ กอบอาษา<sup>1</sup>, สุวิษ ธรรมปาโล<sup>1</sup>, สราวุธ สุวรรณทัตพะพะ<sup>1</sup>,  
 เอมอร อมิสมบูรณ<sup>2</sup>, สุมาศ ลอยเมฆ<sup>1</sup>, สมใจ ลีมีงสวัสดิ์<sup>3</sup>,  
 เวช ชูโชติ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี

<sup>2</sup> แผนกพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>3</sup> แผนกกี้ฎวิทยาการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>4</sup> ภาควิชาเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เชียงใหม่

### บทคัดย่อ

ไมโครฟิลาเรียจากแมวที่ติดเชื้อในธรรมชาติจำนวน 21 ตัว ตรวจพบว่าเป็นเชื้อชนิด *Brugia malayi* จากการจำแนกชนิดด้วยวิธี Microfilarial mirphometry และตรวจหาคำแหน่งที่มี acid phosphatase พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวของ Innenkorper  $28.56 \pm 6.08 \mu\text{m}$  และที่ตำแหน่ง excretory vesicles, anal vesicles, plasmid ที่มีความหนาแน่นเอนไซม์ acid phosphatase สอดคล้องกับลักษณะที่มีของไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia malayi* ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าแมวเป็นสัตว์รังโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ที่สำคัญของจังหวัดนราธิวาส ซึ่งอยู่ภาคใต้ของประเทศไทย

**Identification of *Brugia malayi*-like  
Microfilariae in Naturally-infected Cats from  
Narathiwat Province, Southern Thailand**

**Theerayot Kobasa<sup>1</sup>, Suwich Thammapalo<sup>1</sup>, Saravudh Suvannadabba<sup>1</sup>,  
Ameon Armesombun<sup>2</sup>, Sumart Loymak<sup>1</sup>, Somjai Leemingsawat<sup>3</sup>,  
Wej Choochote<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Bureau of Vector-borne Disease, Disease Control Department, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000, Thailand, <sup>2</sup>Department of pathology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand, <sup>3</sup>Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Abstract**

*Brugia malayi*-like microfilariae from 21 naturally infected cats were identified by microfilarial morphometric and acid phosphatase activity. The results revealed that the average inner body length of  $28.56 \pm 6.08 \mu\text{m}$  and phasmids were compatible with *B. malayi* microfilariae, thus emphasizing the important role of cats as a reservoir host of *B. malayi* in Narathiwat province, southern Thailand.

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จเพราะได้รับความร่วมมืออย่างดียิ่งจากเจ้าหน้าที่  
ห้องปฏิบัติการแผนกพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล  
แผนกกีฏวิทยาการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และภาควิชา  
เวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เชียงใหม่

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำย่อ.....	ช
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	26
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	31
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	34
เอกสารอ้างอิง.....	35
ภาคผนวก.....	38

## สารบัญตาราง

		หน้าที่
ตารางที่ 1	อัตราการตรวจพบเชื้อ <i>Brugia malayi</i> ในคน ม.5 ต.สุโหงปาตี ม.5 ต.ปุโย๊ะ อ.สุโหงปาตี จ.นราธิวาส ปี พศ. 2540-2546	2
ตารางที่ 2	การกระจายของผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทย รายเขต ปี 2546	6
ตารางที่ 3	จังหวัดที่พบผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทย ปี 2546	6
ตารางที่ 4	การตรวจพบหนอนพยาธิฟิลาเรียในสุนัขและแมว	8
ตารางที่ 5	การวินิจฉัยพยาธิโรคเท้าช้างในโลหิต (ไมโครฟิลาเรีย) ที่พบในประเทศไทย โดยการย้อมสียิมซ่า	15
ตารางที่ 6	การศึกษารังโรคในสัตว์ในประเทศมาเลเซียและประเทศไทย	16
ตารางที่ 7	ข้อแตกต่างระหว่างพยาธิไมโครฟิลาเรีย ชนิด <i>Brugia pahangi</i> <i>B. malayi</i> sub periodic โดยวิธีย้อมสี Innenkorper (วัดขนาดเป็นไมครอน : $\mu\text{m}$ )	23
ตารางที่ 8	ผลการเจาะเลือดสำรวจแมวในพื้นที่จังหวัดนราธิวาส ปีพ.ศ. 2546	26
ตารางที่ 9	ผลการติดตามการเจาะเลือดสำรวจแมว <i>Brugia</i> spp. positive ในพื้นที่ จังหวัดนราธิวาส ปีพ.ศ. 2547	27
ตารางที่ 10	ผลการวัดด้วยวิธี morphometric ไมโครฟิลาเรียจากแมวที่ติดเชื้อฟิลาเรีย ในธรรมชาติที่จังหวัดนราธิวาส	27
ตารางที่ 11	การย้อม acid phosphatase ในไมโครฟิลาเรียจากแมวที่ติดเชื้อฟิลาเรีย ในธรรมชาติที่จังหวัดนราธิวาส	30

## สารบัญภาพ

	หน้าที่
ภาพที่ 1	4
ภาพที่ 2	5
ภาพที่ 3	8
ภาพที่ 4	10
ภาพที่ 5	11
ภาพที่ 6	13
ภาพที่ 7	20
ภาพที่ 8	20
ภาพที่ 9	21
ภาพที่ 10	21
ภาพที่ 11	21
ภาพที่ 12	21
ภาพที่ 13	22
ภาพที่ 14	22
ภาพที่ 15	22
ภาพที่ 16	22
ภาพที่ 17	24
ภาพที่ 18	25
ภาพที่ 19	31
ภาพที่ 20	31

**คำย่อ**

<b>ACP</b>	= Acid phosphatase
<b>°C</b>	= degree Celsius
<b>DNA</b>	= deoxyribonucleic acid
<b>ml</b>	= milliliter
<b>PCR</b>	= polymerase chain reaction
<b>Spp.</b>	=Species
<b>µl</b>	= microlitre
<b>µm</b>	= micrometer
<b>mf</b>	= microfilaria
<b>M</b>	= microfilaria positive
<b>L</b>	= Lymphangitis
<b>E</b>	= Elephentiasis
<b>Ag+</b>	= antigen positive
<b>L1</b>	= Larva stage 1
<b>L2</b>	= Larva stage 2
<b>L3</b>	= Larva stage 3
<b>DEC</b>	= Diethylcarbamazine citrate



# บทที่ 1

## บทนำ

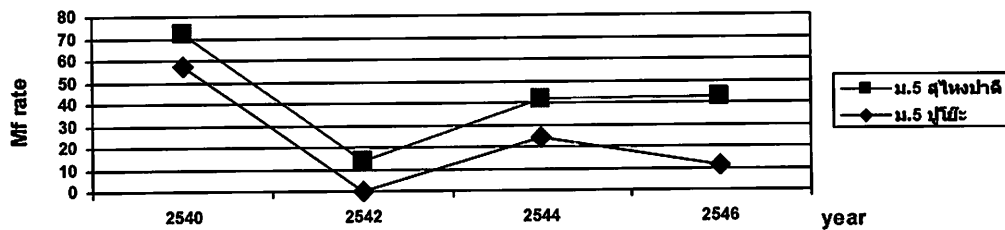
### 1.ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rational)

ประเทศไทยมีการระบาดของเชื้อเพียง 2 ชนิด คือ *W. bancrofti* และ *B. malayi* โดยในปี พ.ศ. 2547 พบว่ามีผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทย ขึ้นทะเบียน(สะสม) จำนวน 159 ราย เป็น ผู้ป่วยตรวจพบแอนติเจนเชื้อพยาธิในโลหิต 25 ราย ผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อพยาธิในโลหิต 125 ราย ผู้ป่วยระยะต่อมาหน้าเหลืองอีกเสบ 6 ราย และ ผู้ป่วยระยะอวัยวะบวมโต 3 ราย จังหวัดที่พบผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทยมากที่สุด คือ จังหวัดนราธิวาส คิดเป็นร้อยละ 83.65 รองลงมา จังหวัดตาก ร้อยละ 15.09

จังหวัดนราธิวาส เป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อโรคเท้าช้าง *B. malayi* ในหลายพื้นที่อัตราการตรวจพบเชื้อลดลงน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่อื่นที่มีผลการจ่ายยารักษาหมู่ ครอบคลุมใกล้เคียงกัน ซึ่งมาตรการนี้ที่มีประสิทธิภาพในการตัดวงจรการเกิดโรคเท้าช้าง มีข้อสันนิษฐานที่อัตราการตรวจเชื้อลดลง อาจเกิดจากเชื้อ *B. malayi* มีรังโรคในสัตว์ที่ยังไม่มีมาตรการควบคุม ซึ่งก็มีรายงานในหลายประเทศที่พบสัตว์ที่เป็นรังโรค เช่น แมว และลิงบางชนิด ในประเทศมาเลเซียที่มีการระบาดของเชื้อ *B. malayi* เหมือนกัน มีการสำรวจในแมวติดต่อกันหลายปี พบว่าส่วนใหญ่เชื้อในแมวคือ *B. pahungi* ซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรคในคน แต่ในประเทศไทยมีการสำรวจโรคเท้าช้างในแมว พบว่าแมวมีเชื้อ *Brugia* species แต่ไม่ได้จำแนกชนิด เชื้อของไมโครฟิลาเรียที่พบในแมวในทางระบาดวิทยา เนื่องจากไมโครฟิลาเรียของพยาธิของชนิด *B. malayi* และ *B. pahungi* มีลักษณะคล้ายกันมากยากแก่การจำแนก ในปี พ.ศ. 2543 กอบกาญจน์ กาญจนโณภส ร่วมกับคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้สุ่มเอาไมโครฟิลาเรียจากแมวที่พบเชื้อ ในจังหวัดนราธิวาส มาทำการจำแนกชนิดด้วยวิธี Morphometric พบว่าเป็นเชื้อ *B. malayi* และไม่ได้มีการสำรวจเพิ่มเติม ในขณะที่ปัญหาของการระบาดเชื้อนี้ในพื้นที่ยังมีอย่างต่อเนื่อง แม้ว่ากรมควบคุมโรค โดยสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา ได้ดำเนินการจ่ายยาบำบัดรักษาหมู่แก่ประชาชนทุกคนความครอบคลุมมากกว่าร้อยละ 90 หากแต่ยังไม่สามารถลดอัตราการตรวจพบเชื้อในคน ดังตัวอย่างข้อมูลกราฟที่ 1 ของพื้นที่ ม.5 ต.ปูลิยะ และ ม.5 ต.สุโหงปาตี อ.สุโหงปาตี จ.นราธิวาส (พ.ศ. 2544–2546) อัตราการตรวจพบเชื้อในคนลดลงอย่างช้ามากและในบางปีสูงขึ้น ทั้งที่ความครอบคลุมในการจ่ายยาและอัตราการเจาะเลือดที่สูง ปัจจัยการแพร่เชื้ออาจมาจากแหล่งเชื้ออื่นที่ไม่ใช่คน อาจจะมาจกสัตว์รังโรค โดยเฉพาะแมวที่มีอัตราการตรวจพบเชื้อมากกว่าคนหลายเท่า (ข้อมูลดังกราฟที่ 2) แต่ยังคงขาดข้อมูลชี้ชัดว่าไมโครฟิลาเรียที่พบในแมวในพื้นที่จากการสำรวจในจำนวนที่เพียงพอสำหรับประมาณการสถานการณ์ระบาดในแมวว่า

เป็นเชื้อ *B.malayi* หรือ *B.pahungi* และขนาดของปัญหาเป็นอย่างไร จำเป็นต้องศึกษาวิธีการจำแนกเชื้อทั้ง 2 ชนิด เพื่อให้ได้ข้อมูลพัฒนาห้องปฏิบัติการ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเข้าใจสถานการณ์การระบาดของโรคเท้าช้างในพื้นที่ และสามารถวางแผนการควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 1 อัตราการตรวจพบเชื้อ *Brugia malayi* ในคน ม.5 ต.สุโหงป่าตี ม.5 ต.ปู่โง๊ะ อ.สุโหงป่าตี จ.นราธิวาส ปี พ.ศ. 2540-2546



## 2. วัตถุประสงค์

- จำแนกชนิดเชื้อของไมโครฟิลาเรียที่พบในแมงที่จังหวัดนราธิวาสด้วยวิธี Microfilarial morphometric
- จำแนกชนิดเชื้อของไมโครฟิลาเรียที่พบในแมงที่จังหวัดนราธิวาสด้วยวิธี Acid phosphatase staining
- ความสัมพันธ์ในการแปรผลของการตรวจด้วยวิธี Microfilarial morphometric และ Acid phosphatase staining

## 3. ขอบเขตการศึกษา

- การใช้วิธี Microfilarial Morphometric และ Acid phosphatase staining มาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อของไมโครฟิลาเรียที่พบในแมงที่จังหวัดนราธิวาส

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

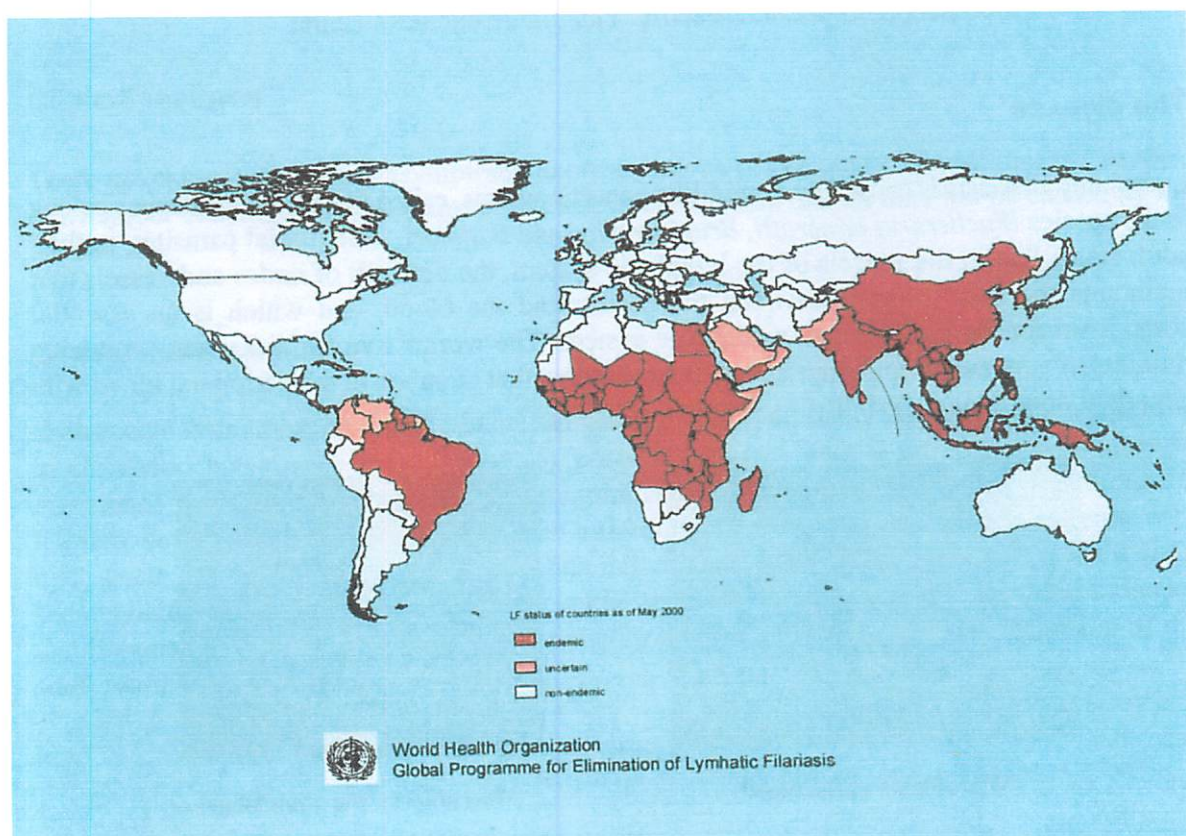
โดยทั่วไปเรามักจะรู้จักโรคเท้าช้างจากอาการ ขาบวมโต แต่กว่าที่จะรู้ว่าโรคเท้าช้างคืออะไร นั้น ในอดีตนักวิทยาศาสตร์หลายท่านต้องใช้ความพยายามติดตามสังเกตอย่างต่อเนื่อง เพื่อหาคำตอบ โดยในปี พ.ศ. 2406 Demarquay ได้พบ microfilaria ครั้งแรกในของเหลวจากอัมพาตผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดที่ปารีส ส่วนพยาธิตัวแก่พบโดย Lewis ในปี พ.ศ. 2420 และในปีเดียวกัน Patrick Manson ได้พบตัวอ่อนพยาธิโรคเท้าช้างในยุง ซึ่ง Manson ได้มีการพิสูจน์ว่าเชื้อโรคเท้าช้างติดต่อได้โดยยุง โดยจับยุงมาขังรวมไว้ในบ้านที่มีผู้ป่วย จากนั้นจับยุงมาฆ่าทุกวันเป็นเวลา 5 วัน พบเชื้อที่ท้องและกล้ามเนื้ออกและพบว่า เชื้อมีการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การที่ไม่พบเชื้อในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการกักกินเลือดของยุง ทำให้ Manson มีแนวคิดว่ายุงที่กินเลือด ผู้ป่วยแล้วบินไปตายในแหล่งน้ำ จากนั้นเชื้อจะออกมาจากซากยุงและปะปนอยู่ในน้ำ การติดต่อสู่คนโดยการกินน้ำที่ปนเปื้อน จนกระทั่งในปี พ.ศ.2443 Thomas Lane Bancroft ได้ทำการทดลองเหมือนกับ Manson แต่เลี้ยงยุงที่มีเชื้อเป็นเวลานาน 12 วัน ได้พบเชื้อพยาธิที่ปากยุงในส่วนของ probosis ในขณะที่จะมากัดคน จึงสรุปว่าเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างติดต่อโดยการถูกยุงที่มีเชื้อกัด จากการศึกษาที่ Manson พบว่ายุงซึ่งเป็นแมลงสามารถเป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง เป็นแรงบันดาลใจให้เกิดการค้นพบโรคติดต่อที่นำโดยแมลงอื่นๆ เช่น Onchocerciasis, Leishmania, Typhus และ Trypanosomiasis เป็นต้น นอกจากนี้ Manson ยังมีงานการศึกษาโรคติดต่อเขตร้อนอีกจำนวนมาก เป็นผู้ก่อตั้งสาขาวิชาโรคเขตร้อนที่ London School (พ.ศ. 2435) และเป็นอาจารย์ใหญ่คนแรกของ Society of Tropical Medicine and Hygiene (พ.ศ. 2450) ตลอดเวลากว่า 30 ปี ที่ Manson ได้เผยแพร่บรมคิษย์จำนวนมากและได้อุทิศเวลาให้กับการศึกษาโรคเขตร้อนอย่างต่อเนื่อง จนได้รับการยกย่องว่าเป็นบิดาแห่งโรคเขตร้อน (Father of Tropical Medicine) และตั้งชื่อยุงที่เป็นพาหะโรคเท้าช้างว่า *Mansonia spp.*

#### หนอนพยาธิตัวกลม

โรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis) เกิดจากหนอนพยาธิตัวกลมชนิดหนึ่ง พยาธิโรคเท้าช้างจัดอยู่ใน family *Filaridae* มีรายงานไว้มากกว่า 100 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นปรสิตในสัตว์ ซึ่งพยาธิตัวกลมเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายมากกลุ่มหนึ่ง ปัจจุบันการจัดหมวดหมู่ยังไม่สมบูรณ์นัก เพราะยังมีหนอนพยาธิจำนวนมากที่ยังไม่มีการจัดเข้าไว้ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง โรคนี้มียุงเป็นพาหะนำโรคพบมากในประเทศเขตร้อน แม้ว่าโรคเท้าช้างจะเป็นโรคที่ไม่เป็นอันตรายถึงชีวิต แต่พยาธิสภาพที่เกิดในผู้ป่วยระยะเรื้อรังทำให้เกิดภาวะทุพพลภาพ และความพิการอย่างถาวร หากแก่การฟื้นฟูสภาพร่างกายให้เป็น

ปกติ ดังนั้นโรคเท้าช้างถูกจัดให้เป็นสาเหตุระดับ 2 ของความพิการและทุพพลภาพถาวร<sup>(1)</sup> และก่อให้เกิดความสูญเสียด้านสังคมและเศรษฐกิจ เชื้อโรคเท้าช้าง ที่มีรายงานติดต่อถึงคนมีเพียง 9 ชนิด ได้แก่

1. *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877)
2. *Brugia malayi* (Buckley and Edeson, 1956)
3. *Brugia timori* (Partona et al.,1977)
4. *Loa loa* (Cobbold, 1877)
5. *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1758)
6. *Mansonella ozzadi* (Manson, 1987)
7. *Mansonella perstans*
8. *Mansonella simularum*
9. *Mansonella streptocerca* (Macfie and Corson,1922)

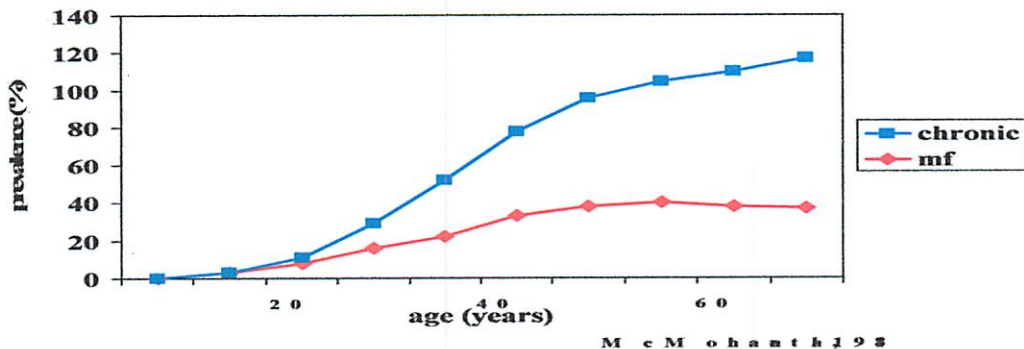


ภาพที่ 1 แผนที่ระบาดวิทยาโรคเท้าช้าง; WHO 2000

สถานการณ์โรคเท้าช้างทั่วโลก เกิดจากเชื้อ *W.bancrofti* ร้อยละ 90 และเกิดจากเชื้อ *B. malayi* ร้อยละ 10 ประชากรทั่วโลกร้อยละ 60 อาศัยอยู่ในพื้นที่เสี่ยงต่อการติดโรค ประชากร<sup>(2-3)</sup>

- 662 ล้านคน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดย 3 ใน 4 อยู่ในประเทศอินเดีย
- 328 ล้านคน ในแอฟริกา
- 50 ล้านคน ในประเทศทางตะวันออกของเมดิเตอร์เรเนียน
- 49 ล้านคน ในแปซิฟิกด้านตะวันออก
- 7 ล้านคน ในอเมริกา
- อัตราการตรวจพบไมโครฟิลาเรียและการพบผู้ปรากฏอาการโรคเท้าช้างมากขึ้นตามจำนวนอายุ ดังภาพที่ 2

ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ของอัตราการพบไมโครฟิลาเรีย การพิจารณาจากโรคเท้าช้างกับอายุของผู้ป่วย



ประเทศไทยมีการระบาดของเชื้อเพียง 2 ชนิด คือ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทย ปี 2546 มีขึ้นทะเบียน(สะสม) จำนวน 159 ราย เป็น เชื้อชนิด *W. bancrofti* จะพบในจังหวัดที่มีพื้นที่ติดชายแดนไทยพม่า ส่วนเชื้อ *B. malayi* พบมากทางภาคใต้ของประเทศไทย จังหวัดที่พบผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทยมากที่สุด คือ จังหวัดนราธิวาส คิดเป็นร้อยละ 83.65 รองลงมา จังหวัดตาก ร้อยละ 15.09 (ดังตารางที่ 2-3)<sup>(4)</sup>

สำหรับโครงการกำจัดโรคเท้าช้างซึ่งดำเนินการมาครบ 5 ปี ตั้งแต่ปี 2545-2549 มีจังหวัดที่หยุดจ่ายยารักษากลุ่มได้ จำนวน 10 จังหวัด ได้แก่ แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ตาก ลำพูน กาญจนบุรี ราชบุรี ระนอง สุราษฎร์ธานี กระบี่ และ นครศรีธรรมราช เหลือเพียงจังหวัดนราธิวาส ที่ต้อง

ดำเนินการจ่ายยารักษากลุ่มต่อ โดยสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 และสำนักงานสาธารณสุข  
จังหวัดนราธิวาส<sup>(5)</sup>

ตารางที่ 2 การกระจายของผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทย รายเขต ปี 2546

หน่วยงาน	จำนวนผู้ป่วย	ร้อยละ	อัตราความชุกต่อ แสนประชากร
สคร.9	24	15.09	0.70
สคร.11	2	1.26	0.05
สคร.12	133	83.65	2.97
รวม	159	100	0.32

ตารางที่ 3 จังหวัดที่พบผู้ป่วยโรคเท้าช้างคนไทย ปี 2546

อันดับที่	เขต	จังหวัด	ผู้ป่วยระยะ				รวม	อัตราความชุกต่อแสน ประชากร
			Ag+	M	L	E		
1	12	นราธิวาส	0	124	6	3	133	18.99
2	9	ตาก	24	0	0	0	24	4.60
3	11	สุราษฎร์ธานี	0	1	0	1	2	0.21
รวม			24	125	6	4	159	0.32

M = ผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อพยาธิในโลหิต

L = ผู้ป่วยระยะต่อมน้ำเหลืองอักเสบ

E = ผู้ป่วยระยะอวัยวะบวมโต

Ag+ = ผู้ป่วยตรวจพบแอนติเจนเชื้อพยาธิในโลหิต

#### วงจรชีวิตของพยาธิโรคเท้าช้าง (Life Cycle)

วงจรชีวิตของพยาธิโรคเท้าช้าง ทั้ง 2 ชนิด คล้ายกัน โดยแบ่งเป็น 2 ระยะคือ ระยะในยุงและ  
ระยะในคน

##### 1. ระยะในยุง

เริ่มจากยุงพาหะไปกัดคนที่มีเชื้อพยาธิไมโครฟิลาเรีย (microfilaria, mf) และดูดเลือดที่มี mf เข้าสู่ตัวยุง mf จะผ่านเข้าสู่กระเพาะยุง และสลัดปลอกหุ้มลำตัว (sheath) แล้วไซโทซูลกระเพาะของยุงเคลื่อนตัวไปสู่กล้ามเนื้อบริเวณส่วนอก มีการลอกคราบครั้งที่ 1 เปลี่ยนแปลงรูปร่างให้อ้วนสั้น คล้ายไส้กรอก (Sausage shape) โดยส่วนปลายด้านหนึ่งมีหางเรียวยาวแหลมยื่นออกมาเรียกกระษะนี้ว่า ตัวอ่อนระยะที่ 1 (L1) ระยะนี้มีการเคลื่อนไหวน้อย หลังจากนั้น L1 จะลอกคราบครั้งที่ 2 เปลี่ยนเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (L2) หรือตัวอ่อนระยะก่อนติดต่อก่อน (Pre-infective larvae) ซึ่งจะมีรูปร่างที่ยาวขึ้น มีหางสั้นและจะพบตุ่ม (papillae) ยื่นออกมาบริเวณปลายหาง 1-2 อัน ระยะ L2 นี้อาจมีการเคลื่อนไหวน้อยลงเล็กน้อย หลังจากนั้นจะลอกคราบครั้งที่ 3 เปลี่ยนเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) หรือตัวอ่อนระยะติดต่อก่อน (Infective larva) ซึ่งจะมีรูปร่างยาวขึ้นมีการเคลื่อนไหวไปสู่ปากยุง

*W. bancrofti* ใช้เวลาเปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก microfilaria จะเป็น L3 นาน 10-14 วัน

*B. malayi* ใช้เวลาเปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก microfilaria จนเป็น L3 นาน 7-14 วัน

ระยะเวลาตั้งแต่ mf เข้าสู่ร่างกายคนและเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อพยาธิ และอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิเหมาะก็จะเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ได้เร็วขึ้น

## 2.ระยะในคน

เมื่อยุงพาหะที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 มากัดคน ตัวอ่อนระยะที่ 3 จะออกมาจากส่วนปากของยุง (proboscis) และตกอยู่บริเวณผิวหนังของคนที่ถูกกัด ตัวอ่อนระยะที่ 3 จะรีบเคลื่อนมาบริเวณแผลที่ถูกกัด และไชผ่านรอยแผลนั้นเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองและมีการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 (L4) และตัวเต็มวัย (young adult) บางตำราเรียก L5 และตัวแก่ (adult) ตามลำดับ พยาธิตัวแก่เพศผู้และเพศเมียจะมีการผสมพันธุ์แล้วพยาธิตัวเมียจะปล่อย mf เข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตของคน

ระยะเวลาตั้งแต่ตัวอ่อนระยะที่ 3 เข้าสู่ร่างกายคนจนสามารถตรวจ mf ในกระแสโลหิตได้เรียก (pre-patent period) ในพยาธิชนิด *Brugia spp.* จะใช้เวลาประมาณ 3-6 เดือน และในพยาธิชนิด *W. bancrofti* จะใช้เวลาประมาณ 9-12 เดือน ส่วนอายุของ mf โดยทั่วไปจะมีอายุประมาณ 6-12 เดือน พยาธิตัวแก่มีอายุประมาณ 5-10 ปี เคยมีรายงานพบสูงสุดถึง 40 ปี

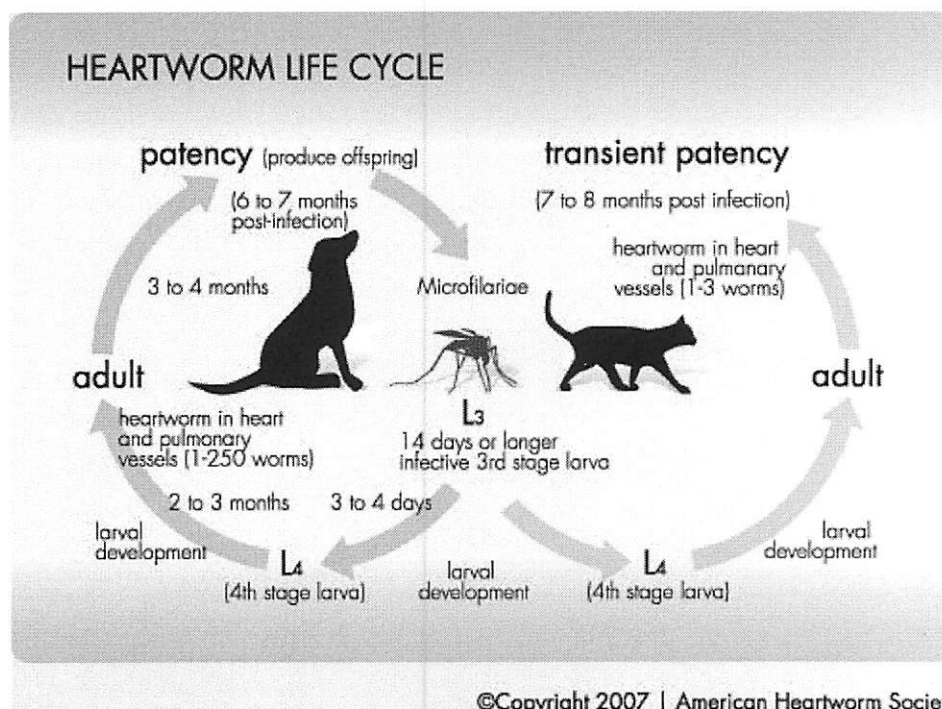
ตัวอ่อนพยาธิเท้าช้าง : ระหว่างที่หนอนพยาธิเจริญเติบโตตัวอ่อนจะมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ก่อนที่จะเจริญเป็นตัวเต็มวัย ทุกครั้งมีการลอกคราบผนังลำตัวใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาแทนที่ผนังลำตัวเก่าพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวอ่อน ตัวอ่อนของพยาธิเท้าช้างแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ตัวอ่อนระยะที่ 4 จะลอกคราบเป็นครั้งสุดท้ายเพื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยและสร้างไข่

## วงจรชีวิตพยาธิโรคเท้าช้างในแมว

ยุงพาหะที่มีพยาธิโรคเท้าช้างตัวอ่อนระยะที่ 3 ตัวอ่อนระยะที่ 3 เคลื่อนที่ไปเส้นเลือด arteries ที่ปอด และเจริญเติบโตจนเป็นตัวแก่ และแพร่พันธุ์ปล่อยไมโครฟิลาเรียออกสู่กระแสโลหิต รอขุมมารับไปเพื่อดำรงวงจรชีวิต นับระยะเวลาตั้งแต่แมวรับเชื้อระยะติดต่อก่อนจนสามารถตรวจ



พบไมโครฟิลาเรียใช้เวลาประมาณ 7-8 เดือน ไม่มีรายงานวาระเวลาที่แมวสามารถแพร่โรค (ระยะเวลาที่แมวมียไมโครฟิลาเรีย) และมีรายงานในสุนัขที่สามารถตรวจพบไมโครฟิลาเรียในสุนัขที่ติดเชื้อเป็นเวลานาน 5-8 เดือน มีรายงานการเก็บข้อมูลแมวจำนวน 9 ตัว ที่ได้รับการถ่ายเลือดจากแมวที่มีไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดพบว่าสามารถตรวจพบไมโครฟิลาเรียในแมวที่ได้รับเลือดตั้งแต่ 2 – 136 วัน<sup>(6)</sup> พยาธิโรคเท้าช้างเจริญเติบโตได้ไม่ดึกนักในแมวเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัข แมวที่ติดเชื้อเพียงประมาณร้อยละ 20 ที่เกิดพยาธิสภาพที่หัวใจและมักเกิดจากเชื้อชนิด *D.immitis*, *D.repens*



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตพยาธิโรคเท้าช้างในสุนัขและแมว

ตารางที่ 4 การตรวจพบหนอนพยาธิฟิลาเรียในสุนัขและแมว

Species	Host	Geographical distribution
<i>Acanthocheilonea dracunculoides</i>	Dog	Africa, Asia, Europe
<i>Acanthocheilonea reconditum</i>	Dog	Africa, America, Asia, Europe, Australia
<i>Brugia ceylonensis</i>	Dog, cat	Asia
<i>Brugia malayi</i>	Dog, cat	Asia
<i>Brugia pahangi</i>	Dog, cat	Asia
<i>Brugia patei</i>	Dog, cat	Africa
<i>Cercopithifilaria baineae</i>	Dog	South America
<i>Cercopithifilaria grassii</i>	Dog, cat	Europe
<i>Dirofilaria immitis</i>	Dog, cat	Africa, America, Asia, Europe, Australia
<i>Dirofilaria repens</i>	Dog, cat	Africa, Asia, Europe



## โครงสร้างของพยาธิโรคเท้าช้าง

พยาธิโรคเท้าช้าง ตัวแก่จะอาศัยอยู่ในระบบน้ำเหลือง หรือในต่อมน้ำเหลืองและออกลูกเป็นตัว (ovoviviparous) ซึ่งเมื่อตัวผู้ผสมพันธุ์กับตัวเมีย ตัวเมียจะออกไข่มีขนาด 30-40x0-25 ไมครอนและเมื่อไข่สุกเต็มที่จะพัฒนาตัวเองขณะที่อยู่ในมดลูกอย่างรวดเร็วโดยตัวอ่อนพยาธิจะขดในไข่ แล้วค่อยยืดตัวออกยาว ส่วนเปลือกไข่ (egg membrane) จะทำหน้าที่เป็น sheath หุ้มลำตัวพยาธิฯ จะว่ายเข้าสู่กระแสโลหิตต่อไปขนาดตัวผู้และตัวเมียของพยาธิ *W. bancrofti* จะมีขนาด 25-45x0.1-0.15 มม. และ 80-100 x 0.2-0.3 มม. ตามลำดับ ส่วนตัวผู้และตัวเมียของพยาธิ *B. malayi* จะมีขนาด 13-23 มม. X 130-170 ไมครอน และ 43-55 มม. และ 130x120 ไมครอนตามลำดับ

ผนังลำตัว ผนังภายนอกเรียกว่า cuticle มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นเกิดจากโครงสร้างตาข่ายของ collagen และ โปรตีน ทำหน้าที่ในการป้องกันการสูญเสียน้ำ การกระทบกระเทือนจากภายนอก และป้องกันลำตัวให้พ้นจากภูมิคุ้มกันและการย่อยโดยเอนไซม์ของโฮสต์ ผนังลำตัวเป็น cutical โดยทั่วไปสารต่างๆ ไม่สามารถผ่านเข้าออกได้ ยกเว้นน้ำและสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ดังนั้นพยาธิไม่สามารถดูดซึมสารอาหารผ่านลำตัว จำเป็นต้องกินอาหารทางปาก

ระบบทางเดินอาหาร ประกอบด้วยปาก (mouth) ริมฝีปาก (lip) ช่องปาก (buccal cavity) หลอดคอ (pharynx) อาหารจะถูกดูดผ่านปากโดยกล้ามเนื้อที่แข็งแรงของหลอดคอ อาหารจะผ่านมาที่หลอดอาหาร (esophagus) สู่อำไส้ อาหารที่ถูกย่อยแล้วจะถูกขับออกทางทวารหนัก อาหารของพยาธิเท้าช้างได้แก่โปรตีนในน้ำเหลือง

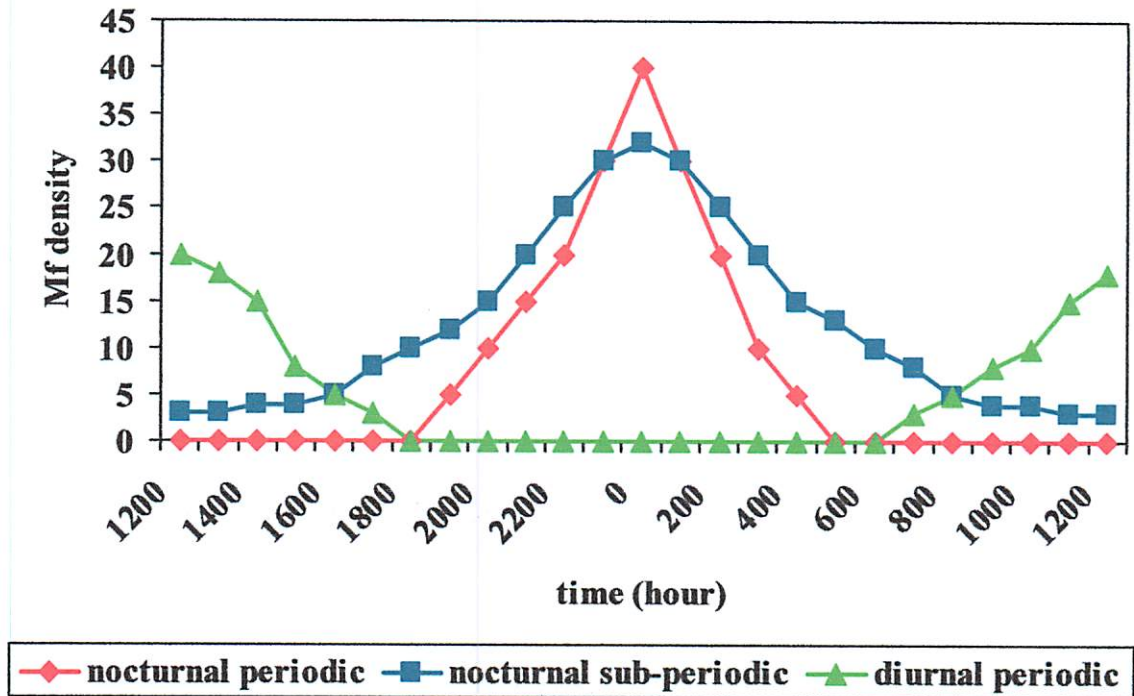
ระบบขับถ่าย ประกอบด้วยเซลล์ขับถ่าย (excretory cell) ทำหน้าที่ในการขับสารละลายและน้ำสู่ท่อขับถ่าย (excretory tube) 2 ท่อ เรียงขนานตามแนวยาวของลำตัว มีรูเปิดสู่ภายนอกทางด้านล่าง

ระบบสืบพันธุ์ หนอนพยาธิมี 2 เพศ แยกกันมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียประกอบด้วยรังไข่ลักษณะเป็นถุง 1 ถุง ยาวไปตามลำตัว ท่อนำไข่ ถุงรับน้ำเชื้อ อวัยวะสืบพันธุ์ที่อยู่ด้านล่างของลำตัว ส่วนอวัยวะเพศผู้ประกอบด้วย อัณฑะมีลักษณะเป็นสายขดไปมา สเปิร์มที่ถูกสร้างขึ้นมาจะถูกนำส่งไปท่อนำสเปิร์ม

## การปรากฏตัวของพยาธิไมโครฟิลาเรีย

ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคเท้าช้างมีงานที่เป็นส่วนสำคัญสำหรับการใช้ในการควบคุมโรคเท้าช้าง ได้แก่ การศึกษาการปรากฏตัวของพยาธิไมโครฟิลาเรีย (The periodicity of microfilaria) พยาธิฯ จะปรากฏตัวในกระแสโลหิตบริเวณผิว (peripheral blood) ในเวลาที่เหมาะสมซึ่งมีทั้งชนิดที่ปรากฏตัวสูงสุดในเวลาใดเวลาหนึ่ง (periodic) กับชนิดที่ปรากฏตัวทั้งกลางคืนและกลางวัน ถ้าช่วงเวลาที่ปรากฏตัวกลางคืนมีค่าสูงกว่ากลางวันเรียก Nocturnally subperiodic ส่วนพยาธิฯ ที่ปรากฏตัวกลางวันมี

ค่าสูงกว่ากลางคืนเรียก Diurnally subperiodic การได้ทราบเวลาปรากฏตัวพยาธิตัวช่วยทำให้การสำรวจเจาะโลหิตทำได้ถูกต้องและสามารถค้นหาผู้ป่วยได้มากขึ้น



ภาพที่ 4 Periodic Type (ชนิดการปรากฏตัว)

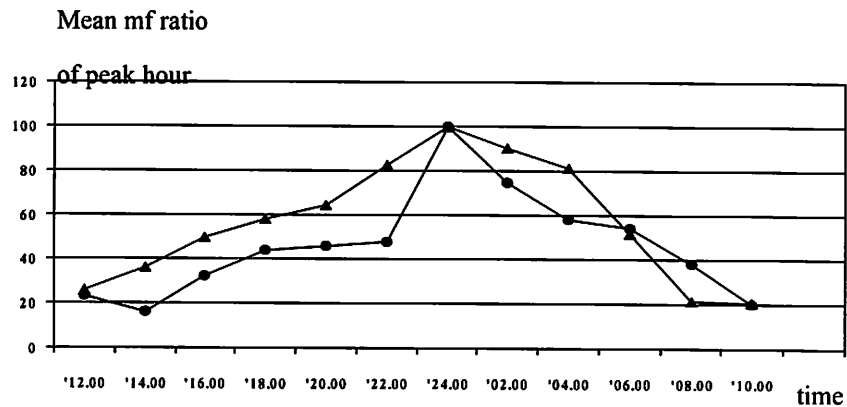
ผลการศึกษาลักษณะ periodic ที่พบในประเทศไทย

1. เชื้อนำเข้าจากพม่าเป็นชนิด Nocturnal periodic *W. bancrofti*
2. เชื้อที่พบในคนกระเหรี่ยงอำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี Nocturnal subperiodic *W. bancrofti*
3. เชื้อที่พบในอำเภอพระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี Diurnal subperiodic *B. malayi*
4. เชื้อที่พบในจังหวัดนราธิวาส Nocturnal subperiodic *B. malayi*

การแบ่งลักษณะพื้นที่การเกิดโรค คือ แบบเขตเมือง และชนบท จะดูว่าเชื้อมาจากแหล่งระบาด ชนิดชนบทหรือเขตเมือง ให้พิจารณาจากชนิดของยุงพาหะ เช่น

1. เชื้อสายพันธุ์พม่า ชนิด Nocturnal periodic *W. bancrofti* มียุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* เป็นพาหะซึ่งยุงดังกล่าวเป็นยุงพาหะในเขตเมือง จึงพิจารณาว่าเชื้อชนิดนี้เป็น rural type (เขตชนบท)

2. เชื้อสายพันธุ์กะเหรี่ยงในเขตแม่ฮ่องสอน หรือ ตำบลสามหมื่น, แม่ระมาด จังหวัดตาก มียุงลายชนิด *Aedes niveus* group เป็นพาหะซึ่งยุงดังกล่าวเป็นยุงตามคางไผ่ ในป่า จึงพิจารณาว่าเป็นเชื้อชนิด Rural type (เขตชนบท)



ภาพที่ 5 แสดงช่วงเวลาการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียชนิด *B. malayi* ของแมว \* จังหวัดนราธิวาส ● สุราษฎร์ธานี โดยเปรียบเทียบเป็นร้อยละกับความหนาแน่นของเชื้อในช่วงเวลาการปรากฏตัวของเชื้อสูงสุด

การศึกษาการปรากฏตัวของพยาธิไมโครฟิลาเรีย อาจจะทำได้โดยนำผู้ป่วยที่อยู่ในระยะแพร่เชื้อมาเจาะโลหิตทำฟิล์มโลหิตหนาทุก ๆ 2 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง ย้อมสีฟิล์มเลือด ตรวจนับจำนวนพยาธิในแต่ละช่วงเวลาแล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณตามสูตร “Modification of the harmonic equation” ตามวิธีของ Aikat และ Das (1976)<sup>(7-8)</sup> ทำให้ทราบลักษณะการปรากฏตัวของพยาธิ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการเจาะโลหิต

เหตุผลของการปรากฏตัวของพยาธิไมโครฟิลาเรียในกระแสโลหิตในเวลาที่แตกต่างกัน

1. ปริมาณออกซิเจน-คาร์บอนไดออกไซด์ในเส้นโลหิตมีระดับแตกต่างกันคือ (The oxygen tension increase steeply และ The carbondioxide diminishes less steeply) หรือเรียกว่า Oxygen tension (Oxygen barrier) ซึ่ง Oxygen จะมีปริมาณลดลงมาที่ระดับ 40 มม.ปรอทในเวลากลางคืนและจะสูงขึ้นถึงระดับ 55 มม.ปรอทในเวลากลางวัน โดยเฉพาะเมื่อ Oxygen มีค่าต่ำจะช่วยให้พยาธิฯ ออกมาสู่กระแสโลหิตบริเวณผิวมากขึ้น

2. พยาธิไมโครฟิลาเรียบางชนิดจะไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในร่างกายที่พยาธิอาศัยอยู่ เช่น พยาธิไมโครฟิลาเรียในสัตว์ *Dirofilaria* ในสุนัข ถ้าอุณหภูมิของร่างกายในเวลากลางวันลดลงมาที่ 35 องศาเซลเซียส พยาธิไมโครฟิลาเรียจะออกมาจากปอด และถ้าอุณหภูมิของร่างกายในเวลากลางคืน

สูงขึ้นไปถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งปกติจะมีอุณหภูมิต่ำ จะมีผลทำให้พยาธิเก็บตัวอยู่ในปอดได้ ดังนั้น เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไป 1-2 องศาเซลเซียสก็มีผลต่อพยาธิไมโครฟิลาเรีย

3. พยาธิไมโครฟิลาเรียบางชนิดจะมีมากในกระแสโลหิต ในบางฤดูกาล เช่น กรกฎาคม – กันยายน ซึ่งเป็นช่วงที่มีฝนมาก

4. การปรับตัวของ Parasite ต่อ vector

5. การเปลี่ยน cycle ของพยาธิไมโครฟิลาเรียไปตามกระบวนการทำงานของคน เช่น การนอนในเวลากลางวันและตื่นในเวลากลางคืน พยาธิฯ จะปรับเปลี่ยนตัวเองให้สอดคล้องภายใน 10 – 14 วัน

6. การปรับตัวของพยาธิฯ ในกระแสโลหิตเพื่อให้สอดคล้องกับ Biting cycle ของยุงพาหะในบริเวณนั้น

7. เพื่อการดำรงชีวิตให้อยู่รอดสืบพันธุ์ต่อไป พยาธิไมโครฟิลาเรียจะต้องพยายามปรากฏตัวในกระแสโลหิตบริเวณผิว เพื่อรอให้ vector นำไปแล้วเปลี่ยนเป็นลาร์วาระยะที่ 3 เพื่อรอให้ infect ใน host รายใหม่ไม่เช่นนั้นพยาธิฯ จะหมดอายุไขไปเองใน host นั้น ๆ

8. เหตุผลสำคัญและน่าสนใจล่าสุดคือ genetic variation ซึ่งอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงของยีนส์ที่ควบคุมในร่างกายของ host – parasitic มีผลกระทบโดยตรงคือการปรากฏตัวของพยาธิฯ ในกระแสโลหิตและการคัดเลือกยุงพาหะที่เหมาะสมหรือแม้แต่การปรับตัวของยุงพาหะในการเลือกยอมรับพยาธิไมโครฟิลาเรีย

ยุงพาหะ

- ยุงพาหะที่สามารถนำเชื้อ *B.malayi* ในแมงคือ *Mansonia uniformis* <sup>(9)</sup>

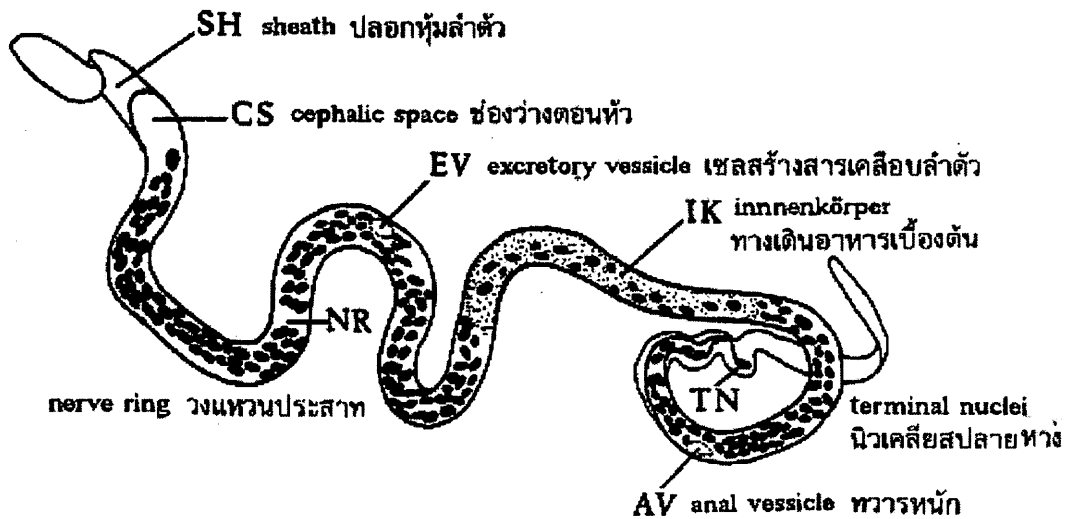
- ยุงพาหะที่สามารถนำเชื้อ *D.immitis* ในแมงคือ *Aedes albopictus*

จากรายงานการพบในอิตาลี <sup>(10)</sup>

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ มีหลายวิธี แต่ที่นิยมนำมาใช้ในทางปฏิบัติ คือ <sup>(11-13)</sup>

- การตรวจวินิจฉัยจากฟิล์มโลหิต เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ประหยัด และสามารถจำแนกชนิดพยาธิได้ ซึ่งจำเป็นมากสำหรับพื้นที่ที่มีการติดเชื้อปรสิตมากกว่า 1 ชนิด โดยทั่วไปใช้เจาะโลหิตจากปลายนิ้วในการทำฟิล์มโลหิต แล้วจึงนำมาย้อมด้วย Gimsa stain แล้วตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ การตรวจหาไมโครฟิลาเรีย มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ความถูกต้องของการตรวจขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่ไมโครฟิลาเรียปรากฏตัวในกระแสโลหิตในช่วงเวลา 20.00-23.00 น. รายละเอียดดังตารางที่ 2 และสามารถหลีกเลี่ยงจากการเจาะมาทำการตรวจ CBC ได้ หากเจาะช่วงเวลาที่เหมาะสม และฟิล์มโลหิตที่เตรียมต้องฟิล์มโลหิตหนาที่ใช้โลหิตประมาณ 60 ลบ.มม. เพราะการใช้ปริมาณโลหิตที่น้อยกว่า 60. ลบ.มม. จะทำให้ความถูกต้องของการตรวจลดลง การตรวจวินิจฉัย มีการศึกษาใช้ยา DEC ในผู้มารับการตรวจโรครับประทานเป็นการกระตุ้นไมโครฟิลาเรียให้ออกมาสู่

กระแสโลหิตในเวลากลางวัน (DEC provocative) เพื่อให้สะดวกสามารถเจาะตรวจหาไมโครฟิลาเรียในเวลากลางวัน วิธีนี้จะใช้เฉพาะในกรณีและผู้มาตรวจไม่สามารถที่จะอยู่รอเจาะเลือดในเวลากลางวันได้ โดยทั่วไปไม่นิยมใช้เพราะผลจากการศึกษาการใช้ยากระตุ้นการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในรายที่เชื่อ มีความหนาแน่นสูงโอกาสตรวจพบไมโครฟิลาเรียร้อยละ 80 ในรายที่มีความหนาแน่นของเชื้อต่ำโอกาสตรวจพบไมโครฟิลาเรียลดลงเหลือเพียงร้อยละ 50 เท่านั้น



ภาพที่ 6 ลักษณะไมโครฟิลาเรียของพยาธิโรคเท้าช้าง

ส่วนต่าง ๆ ของพยาธิไมโครฟิลาเรีย

1. Sheath เป็นเนื้อเยื่อชนิด Hyaline ใสไม่มีสี ความยาวประมาณ 390 ไมครอน หัวท้าย ปิด แต่ไมโครฟิลาเรียสามารถขยับเขยื้อนตัวไปมาได้ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เสมือนเปลือกไข่ การตรวจพบ-ไม่พบ Sheath เคยใช้ในการแยกข้อแตกต่างระหว่างชนิด Periodic-Subperiodic ของพยาธิ *B. malayi* ส่วน Sheath ของพยาธิ *W. bancrofti* จะข้อมไม้ติดสีแต่ของพยาธิ *B. malayi* ข้อมติดสีชมพูอมม่วง (Pink หรือ Purplish)
2. Cuticle เป็นเนื้อเยื่อขวงลำตัวบาง ๆ พบได้ตลอดลำตัวของพยาธิ
3. Cephalic space เป็นช่องว่างส่วนหัวของพยาธิ บริเวณนี้จะไม่มินิกเลียสอยู่ อาจมองเห็น

Stylet มีลักษณะเป็น “ขอ” ซึ่งตัวอ่อนจะใช้เป็นเครื่องช่วยทำให้ตัวหลุด ออกจากปลอกหุ้มลำตัว (Sheath) ในพยาธิชนิด *B. malayi* อัตราส่วน ความกว้าง:ยาว เท่ากับ 1:2 ส่วน *W. bancrofti* มีอัตราส่วนความกว้าง: ยาว เท่ากับ 1:1

4. **Nuclear column** เป็นกลุ่มนิวเคลียสเรียงตัวตั้งแต่บริเวณ Cephalic space จนถึงหางใน พยาธิชนิด *B. malayi* เมื่อย้อมสียิมซ่าจะเห็นนิวเคลียสซ้อนทับกันเป็น สีนํ้าเงินเข้ม ส่วน *W. bancrofti* นิวเคลียสจะแยกออกจากกันเป็นเม็ด เดี่ยวมองเห็นชัดเจน
5. **Nerve ring** เป็นส่วนของกล้ามเนื้อประสาท พาดขวางลำตัวซึ่งจะอยู่ห่างจากตอน หัวสุดของพยาธิประมาณ 20% ของความยาวลำตัว เมื่อย้อมสียิมซ่าจะ มองเห็นเป็นช่องว่างสีขาวสังเกตได้ชัดเจนเป็นรูขนาดเล็กอยู่ถัดจาก Nerve ring ลงมาเล็กน้อยประมาณ 30% ของความยาวลำตัวเมื่อย้อมสีจะพบว่าบริเวณนี้จะ เว้าแหว่งคล้ายอักษร “v” ตะแคงอยู่จึงเรียก V shaped มองเห็นได้ชัดเจนอาจเรียก ได้อีกว่า Anterior v-spot
7. **Excretory cell** เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียส ทำหน้าที่สร้างเมือกแล้วปล่อยออก ทาง Excretory pore (บริเวณนี้อาจเรียกรวม ๆ ว่า Excretory vesicle)
8. **Genital cells** เป็นเซลล์ขนาดใหญ่มีทั้งหมด 4 เซลล์ โดย G1 จะอยู่เหนือ G2 G3 G4 ซึ่ง 3 เซลล์หลังนี้จะอยู่ติดกันใกล้รูขับถ่าย (anal pore)
9. **Anal pore** มองเห็นได้ชัดเจนในพยาธิชนิด *B. malayi* มีรูปร่างเว้าคล้ายอักษร (Anal vesicle) “V” เช่นกัน จึงอาจเรียกว่า posterior v-spot ตำแหน่งนี้อยู่ห่างจากส่วน หัวของพยาธิประมาณ 80% ของความยาวลำตัวในพยาธิชนิด *W. bancrofti* จะมองเห็นตำแหน่งนี้ไม่ชัดเจน
10. **Innenkorper (innerbody)** เป็นอวัยวะภายในลำตัวเมื่อย้อมสี Azur II eosin หรือ Leishmans stain จะติดสีแดงเป็นแถบยาว 1/70 ส่วนของความยาวลำตัวมองเห็นได้ ชัดเจนในพยาธิชนิด *Brugia spp.* อวัยวะนี้คือท่อทางเดินอาหารเบื้องต้น (rudimentary alimentary canal) อาจเรียกว่า Innerbody ซึ่งเป็นที่รวม ของเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้นจำนวน 4 เซลล์ ส่วนในพยาธิ *W. bancrofti* จะมองเห็นบริเวณนี้ไม่ชัดเจนและจะไม่พบในพยาธิชนิด *Loa loa*
11. **Caudal space** ช่องว่างบริเวณปลายหาง พบได้ในพยาธิชนิด *W. bancrofti* มีลักษณะ เรียวแหลม (tapering) ส่วน *B. malayi* จะพบมีนิวเคลียสที่ปลายหางแยก ออกไปจากกลุ่ม 1-2 เม็ด (terminal nuclei)

ตารางที่ 5 การวินิจฉัยพยาธิโรคเท้าช้างในโลหิต (ไมโครฟิลาเรีย) ที่พบในประเทศไทยโดยการย้อมสียิมซ่า

รายละเอียด	<i>Brugia malayi</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>
1. ความยาว (Length)	177-230 ไมครอน	210-359 ไมครอน(ในผู้ป่วยกะเหรี่ยง) 210-320 ไมครอน(ในผู้ป่วยพม่า)
2. ช่องว่างตอนหัว (Cephalic space)	ความยาวเป็นสองเท่าของ ความกว้าง 2:1	ความยาวเท่ากับความกว้าง 1:1
3. นิวเคลียส (Nucleus)	ติดสีม่วงและซ้อนทับกัน ไม่เป็นระเบียบ	ติดสีน้ำเงินและแยกกันอยู่อย่างมี ระเบียบ
4. ลักษณะลำตัว (Figure)	มักจะบิดงอและพับไปมา (Secondary kinds)	จะโค้งงอเป็นระเบียบ (Smooth curve)
5. รูปร่างถ่ายของเสีย (Anal pore)	โดยทั่วไปจะมองเห็นชัดเจน เป็นรอยเว้า เห็นในนิวเคลียส	มองไม่ค่อยเห็น
6. หาง (Tail)	มีนิวเคลียสถึงปลายหางและ แยกออกมาจากตอนปลาย 1-2 เม็ด เรียก Terminal Nuclei	นิวเคลียสไม่ถึงปลายหางมีช่องว่าง เรียกว่า Caudal space
7. ปลอกหุ้มลำตัว (Sheath)	สีชมพูอมแดง (Pink or Purpish)	ไม่ติดสี (Colorless) แต่บางครั้งอาจ ติดสีชมพูบาง ๆ เนื่องจาก PH ของสี ย้อมเปลี่ยนไปจาก pH 7.2 หรือใช้ สีมาก/ย้อมนานเกินไป

รังโรคในสัตว์ (animal reservoirs)

โรคเท้าช้างชนิด subperiodic *Brugia malayi* นอกจากจะอาศัยอยู่ในคนซึ่งเป็น definite host แล้ว ยังพบว่าพยาธิดังกล่าวสามารถเข้าไปเจริญอยู่ในสัตว์ได้หลายชนิด ซึ่งสัตว์เหล่านั้นจะทำหน้าที่เป็น

reservior host ขอมให้พยาธิอาศัยอยู่ สัตว์เหล่านั้น ได้แก่ ค่าง (leaf monkey) ชนิดต่าง ๆ ในตระกูล

*Presbytis spp.* แมวป่า ชะมด นางอาย แมวบ้าน และนึ่งเป็นต้น จึงทำให้เป็นปัญหาในการควบคุมโรคฯ

ได้มีการศึกษาพบว่า *Brugia pahangi* เป็นพยาธิฟิลาเรียที่พบได้เสมอ ๆ ในแมว สุนัข ค่าง แมวป่า ชะมด นาค นึ่งและสัตว์ป่าจำพวกกัณฑ์และสามารถแพร่สู่คนได้เช่นกัน ปัญหาที่พบในปัจจุบันคือการจำแนกพยาธิไมโครฟิลาเรีย *Brugia malayi* และ *B. pahangi* ในโลหิตสัตว์ เพราะเมื่อนำมาข้อมลิ้มชิมจะพบรูปร่างลักษณะคล้ายกันมาก ซึ่งเป็นการยากที่จะแยกได้ว่าเป็นพยาธิชนิดใด ส่วนผลการสำรวจสัตว์รังโรคดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การศึกษารังโรคในสัตว์ในประเทศมาเลเซียและประเทศไทย

ชนิดของสัตว์ ตรวจสอบ	จำนวน	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบ			
		<i>B. malayi</i>	<i>B. pahangi</i>	<i>B. tupaiae</i>	Other <i>Brugia spp.</i>
<i>Presbytis melalophos</i>	92	62(67.4)	0	0	0
<i>Presbytis obscure</i>	150	107(71.3)	4(2.7)	0	0
<i>Presbytis cristat</i>	13	7(53.8)	0	0	0
<i>Macaca fascicularis</i>	150	4(2.7)	0	0	0
<i>Tupaia glis</i>	285	0	0	9(3.2)	17(6.0)
<i>Nycticebus concang</i>	199	0	10(5.0)	0	0
Cat	447	31(6.9)	59(13.2)	0	0
Dog	68	0	7(10.3)	0	0

#### การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียของเชื้อ *B. malayi* ในแมว

การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดส่วนปลายในแมวติดเชื้อ *B. malayi* ในจังหวัดนราธิวาสพบว่าไมโครฟิลาเรียจะปรากฏตัวตลอดวันแต่พบมากในเวลากลางคืนไมโครฟิลาเรียจะปรากฏตัวสูงสุดที่เวลา 00.21 น. การปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในแมวที่ติดเชื้อ *B. malayi* ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่าไมโครฟิลาเรียสามารถตรวจพบได้ตลอดวัน มีลักษณะใกล้เคียงกับจังหวัดนราธิวาส โดยปรากฏตัวสูงสุดที่เวลา .054 น. ซึ่งต่างจากคน ส่วนสาเหตุยุงหาเหตุผลที่ชัดเจนไม่ได้

พยาธิโรคเท้าช้างที่มีรายงานการพบในแมว ได้แก่ *B. malayi*, *B. pahangi*, *B. ceylonensis*, *B. buckleyi*, *D. immitis*, *D. repens*, *D. tenuis*, *W. pateri*<sup>(14-17)</sup> แต่ที่เป็นที่สามารถแพร่มาสู่คนที่มีการศึกษารองรับคือ *B. malayi* ไม่ใช่เป็น accidental host แต่ไมโครฟิลาเรียของ *B. malayi* จะเหมือนกับของ



*B.pahungi* จะต่างกันว่า เชื้อ *B.malaria* พบทั้งในคนและแมว ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในคนทำให้เป็นโรคเท้าช้าง โดยมียุง *Mansonia uniformis* เป็นพาหะนำโรค ส่วนเชื้อ *B.pahungi* พบในแมวไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในคน มียุง *Armigeris subarbatus* เป็นพาหะนำโรค ได้มีการศึกษาด้วย Microfilarial morphometric<sup>(18)</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างทาง Histochemical ที่ใช้ Acid phosphatase staining<sup>(19)</sup>

Morphometric เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ใช้การเก็บข้อมูลขนาด รูปร่าง ของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่าง หรือวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเก็บข้อมูลจากซากฟอสซิลหรือซากกระดูก เมื่อนำมาใช้กับไมโครฟิลาเรีย เรียกว่า Microfilarial morphometric

Acid phosphatase staining เป็นการย้อมเนื้อเยื่อหาว่าบริเวณส่วนใดที่มีเอนไซม์ Acid phosphatase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม Phosphatase มีสารพวก hydrolase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะของสารประกอบอินทรีย์ Acyl ester และ phosphoryl ester เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาและสลายพันธะระหว่าง H และ O ในโมเลกุลของน้ำจะแยกออกจากกันด้วยแอลกอฮอล์และฟอสเฟตไอออน

Phosphatase ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ มีอยู่ 2 ชนิด คือ

1. Alkaline phosphatase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสภาวะเป็นด่าง (pH 8.4 - 10.5)

2. Acid phosphatase (ACP) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสภาวะเป็นกรด (pH 4.8 - 6.0)

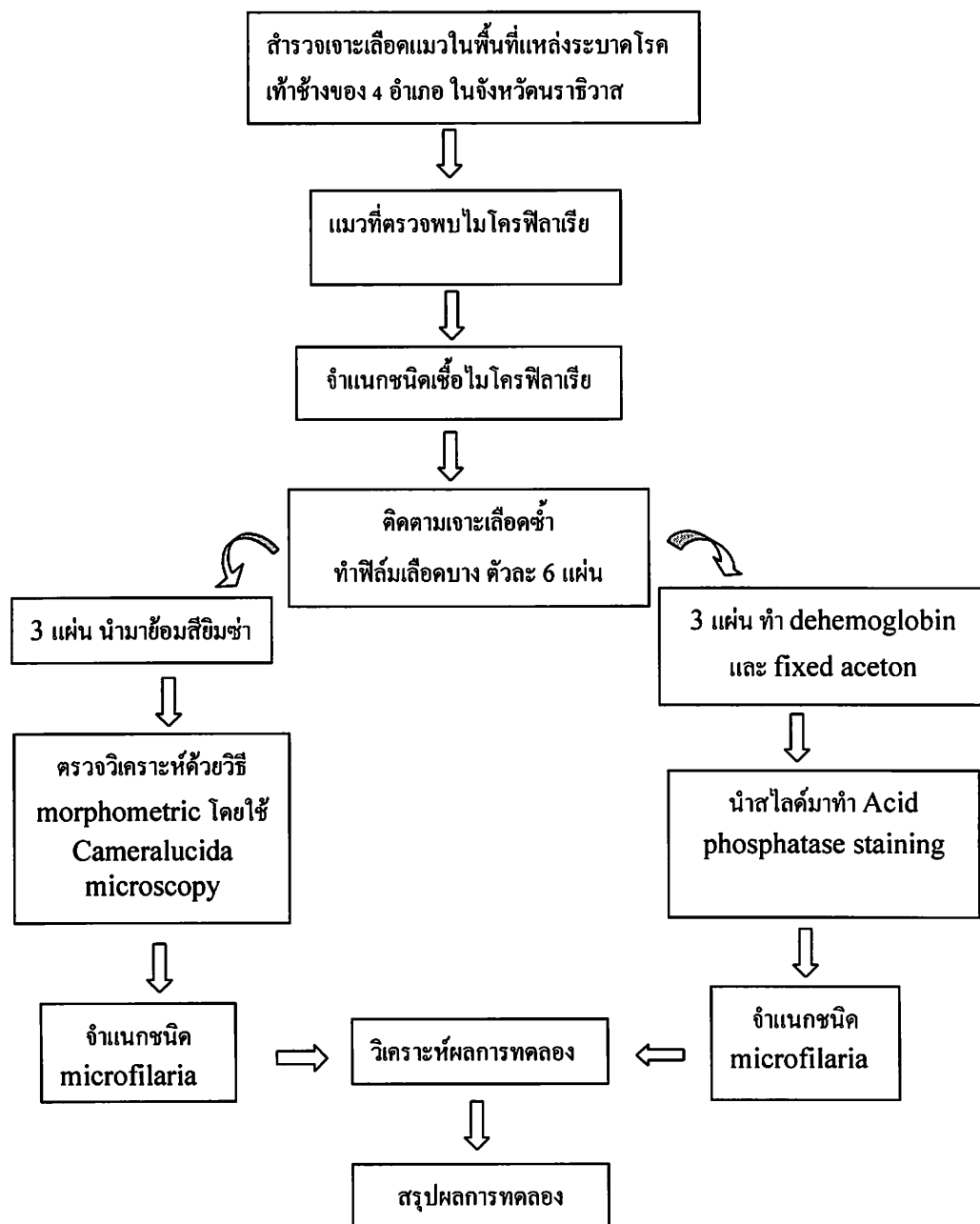
ACP เป็นชนิดของเอนไซม์ที่ผลิตโดยร่างกาย ประกอบด้วยโปรตีนเฉพาะที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการยึดเหนี่ยวของโมเลกุลของฟอสเฟตกลุ่มมีหลายประเภทของ โดยทั่วไป ACP สามารถพบได้ในอวัยวะและเนื้อเยื่อบางอย่างรวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดไขกระดูก, ม้าม, ตับ, ตับอ่อนและไต ในต่อมลูกหมากจะมีสารนี้ความเข้มข้นมากกว่าอื่นถึง 1,000 เท่า พบมากในน้ำอสุจิกว่าของเหลวในร่างกายอื่น ๆ ถูกนำมาใช้จะเป็นประโยชน์ในด้านวิทยาศาสตร์ของสถาบันนิติเวชตั้งแต่การตรวจสอบของกรด phosphatase ต่อมลูกหมากโต (PAP) ในระดับเนื้อเยื่อช่องคลอดวัดมากกว่า 3 U / ml (หน่วยต่อมิลลิเมตร) ใช้เป็นหลักฐานสนับสนุนว่าการข่มขืนเกิดขึ้น หลักฐานเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าการปรากฏตัวของเอนไซม์นี้มาจากน้ำอสุจิมากกว่าของเหลวในช่องคลอดจะถูกรวบรวมจากการทดสอบ ซึ่งเป็นวัดเชิงปริมาณของ isoenzymes ต่างๆที่พบใน ACP สร้างขึ้น โดยเฉพาะใช้ทดสอบการทำงานของต่อมลูกหมากโดยการตรวจหาแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงการทดสอบใช้ยืนยันการปรากฏตัวของสเปิร์ม<sup>(20)</sup> การวัดระดับซีรัมของ APC จะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยของความหลากหลายของเงื่อนไขทางการแพทย์ตัวอย่างเช่นในระดับที่ผิดปกติอาจบ่งบอกถึงการปรากฏตัวของสารติดเชื้อในระบบโลหิตจาง hepatitis, thrombophlebitis หรือ hyperparathyroidism ระดับสูงของ PAP โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของต่อมลูกหมากเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากที่มีการแพร่กระจายไปที่กระดูก การทดสอบ phosphatase ยังใช้ในการประเมินความเสียหายที่เกิดจากเอนไซม์โรคไต โรคตับหรือโรคหัวใจวาย การทดสอบนี้จะยังดำเนินการเมื่อมีการเผาผลาญอาหารบางอย่าง การทดสอบเลือดที่เรียบง่ายจากการกำหนดระดับของเอนไซม์นี้ ตัวอย่างเลือดสัมพันธ์กับหนึ่งในตัวแทนหลายอย่างจากปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ 4 aminoantipyrine เพื่อวัดระดับของการ PAP, tartrate ที่ถูกนำมาใช้ โดยการสังเกตปฏิกิริยากับตัวแทนที่แตกต่างกันเหล่านี้

แพทย์จะสามารถตรวจสอบที่เนื้อเยื่อที่มีการปล่อยเอนไซม์ phosphatase เข้าสู่กระแสเลือด <sup>(21)</sup> ส่วนเอนไซม์นี้มักพบมากในระบบทางเดินอาหารของไมโครฟิลเรียที่แต่ละชนิดจะมีมากหรือน้อยและตำแหน่งที่ต่างกัน จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดไมโครฟิลเรีย

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ผลการจำแนกชนิดเชื้อของไมโครฟิลาเรียด้วยวิธี Microfilarial morphometric และ Acid phosphatase staining



พื้นที่ศึกษา : เลือการศึกษาในประชากรแมวในพื้นที่ แหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด B.malaria ของ 4 อำเภอของจังหวัดนราธิวาส

### การเจาะเลือดแมว

การเจาะเลือดแมวในการสำรวจโรคเท้าช้างนิยมเจาะที่ปลายหูของแมว เพราะผิวหนังบาง สามารถมองเห็นเส้นเลือดชัดเจน ง่ายต่อการจับแมว การเจาะเลือดแมวและการทำฟิล์มเลือดหนามีขั้นตอนดังต่อไปนี้

#### 1. เตรียมบุคคล อุปกรณ์ที่จำเป็นในการเจาะเลือด

- การเจาะเลือดต้องใช้เจ้าหน้าที่ 2 คน ในการเจาะเลือด คือ ผู้เจาะเลือดที่ทำหน้าที่เจาะเลือด ทำฟิล์มเลือด และผู้ช่วยจับยัดซึ่งเป็นเจ้าหน้าที่หรือเจ้าของแมว ถ้าเป็นเจ้าของแมว เจ้าหน้าที่ควรแนะนำวิธีการจับแมวเพื่อเตรียมเจาะเลือด

- ถุงมือ 2 คู่ สำหรับผู้เจาะเลือดและผู้ช่วยจับยัดแมว
- เข็มเจาะเลือด
- สำลี
- แอลกอฮอล์ 70 %
- แผ่นสไลด์แก้ว
- ปากกาเขียนสไลด์
- แบบรายงาน

2. ตรวจสอบใบหูของแมว เพื่อดูตำแหน่งที่จะเจาะเลือด แต่หากพบว่าที่ใบหูมีแผลหรือการติดเชื้อ ให้พิจารณาเลือกเจาะหูข้างที่มีสภาพดีที่สุดระหว่าง 2 ข้าง บริเวณที่เจาะเลือดจะเป็นเส้นเลือดที่ทอดยาวตามแนวใกล้ขอบใบหูที่ได้ใช้ปากกาชี้ตำแหน่งดังภาพที่ 2



ภาพที่ 7 ใบหูแมว



ภาพที่ 8 ชี้ตำแหน่งเส้นเลือดในหูของแมว

3. ผู้ช่วยทำหน้าที่ในการจับยึดแมว โดยมือข้างหนึ่งจับยึดหนังที่คอแมวชิดท้ายทอยให้แน่น (ไม่กำรอบคอแมว) ส่วนมืออีกข้างกางออกและจับด้านท้ายแมวป้องกันแมวถอยหลังดังภาพที่ 3

4. ทำความสะอาดหูแมว โดยการใช้สำลีชุบด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ที่ปลายใบหูทั้งด้านในและนอกดังภาพที่ 4



ภาพที่ 9 การจับแมว



ภาพที่ 10 ทำความสะอาดหูแมว

5. เตรียมเข็มเจาะเลือด ดังภาพที่ 5

6. สังเกตจุดที่จะเจาะเลือดและใช้มือซ้ายจับใบหูแมวจับพับแบ่งครึ่งตามยาวของใบหูด้านปลาย โดยไม่บังคับตำแหน่งที่จะเจาะ มือขวาใช้เข็มเจาะเลือด ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 11 การเตรียมเข็มเจาะเลือดแมว

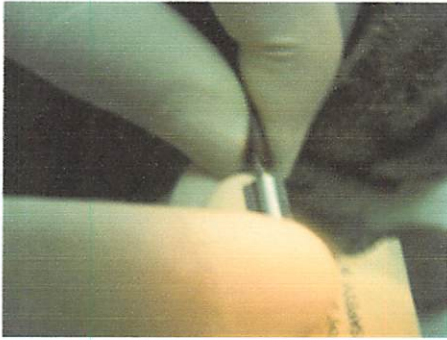


ภาพที่ 12 การจับใบหูแมวเพื่อเจาะเลือด

7. เจาะเลือดที่ปลายหูบริเวณเส้นเลือด การลงเข็มให้เจาะลงตามแนวยาวของใบหู

8. การบีบเลือด ใช้มือจับที่กลางใบหูและรูดไปด้านปลายเบาๆ เลือดจะไหลออกมาเป็นหยด



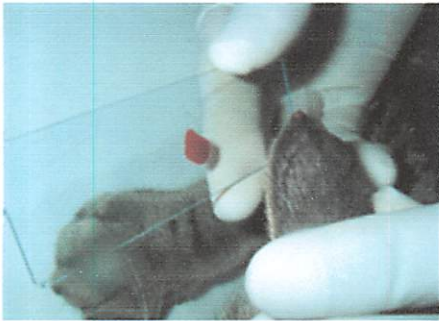


ภาพที่ 13 การเจาะเลือดแมว



ภาพที่ 14 การบีบเลือดแมว

9. หยดเลือดลงบนแผ่นสไลด์ใช้เลือด 2 หยด (ประมาณ 30 ไมโครลิตร) และวางแผ่นสไลด์ลง
10. ควรถัดเลือดและทำความสะอาดใบหุแมวก่อนเกลี่ยเลือด เพราะแมวอาจสะบัดหัวทำให้เลือดกระเด็นเปื้อนคนรอบข้าง



ภาพที่ 15 การหยดเลือดลงสไลด์



ภาพที่ 16 ทำความสะอาดหลังเจาะหู

11. การเกลี่ยฟิล์มเลือดแนะนำให้ใช้มุมแผ่นสไลด์ ปริมาตรเลือด 10 ไมโครลิตร เกลี่ยเป็นฟิล์มบางจะให้ฟิล์มเลือด พื้นที่วงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 2 เซนติเมตร (ไม่ควรใช้ปลายเข็มเพราะอาจทำให้ตัวเชื้อพยาธิขาด การใช้มุมสไลด์ ทำให้ได้ฟิล์มเลือดที่หนาเสมอกัน ง่ายกับการตรวจและช้อม)
12. เขียนรหัสฟิล์มเลือด ประกอบด้วย อันดับของฟิล์มเลือดหมู่บ้านที่ วันที่ เวลา และควรระบุว่าเป็นเลือดจากแมว

### การย้อมสียิมซ่า

1. เมื่อฟิล์มโลหิตแห้งสนิท ย้อมสียิมซ่า ความเข้มข้น 1 : 20 (สี 1 ส่วน + บัฟเฟอร์ PH 7.2 จำนวน 19 ส่วน) ย้อมนาน 10-15 นาที
2. การตรวจหาพยาธิฯ ให้ใช้ Objective 4x หรือ 10x โดยดูจกทั่วสไลด์ เมื่อพบพยาธิฯ ให้ นับจำนวนทั้งหมด หากสงสัยชนิดของพยาธิฯ อาจใช้ Object 100x พร้อมหยด immersion oil ลงไปเพื่อวินิจฉัยชนิดพยาธิฯ

### การวิเคราะห์ผล

**Microfilarial morphometric** : การจำแนกชนิดความแตกต่างระหว่าง *B.malayi* กับ *B.pahangi* ด้วยวิธี Morphometric พิจารณาจากความยาวของอวัยวะส่วนต่างๆของไมโครฟิลาเรีย ตามที่มีการศึกษาดังตารางที่

ตารางที่ 7 ข้อแตกต่างระหว่างพยาธิไมโครฟิลาเรีย ชนิด *Brugia pahangi* *B.malayi* sub periodic โดยวิธีย้อมสี Innenkorper (วัดขนาดเป็นไมครอน :  $\mu\text{m}$ )<sup>(22)</sup>

รายละเอียด	มาเลเซีย	
	<i>B. pahangi</i> ค่าเฉลี่ย (%) ช่วงระหว่าง	<i>B.malayi(subperiodic)</i> ค่าเฉลี่ย (%) ช่วงระหว่าง
จำนวนพยาธิที่ศึกษา	15	15
ความยาวลำตัว	244.3(235-260)	222.0 (205-240)
ความกว้างบริเวณนิวเคลียส เม็ดที่ 1	4.4	4.0
ความยาวบริเวณนิวเคลียส เม็ดที่ 1	9.0(3.7)	7.5(3.4)
อัตราส่วน ยาว : กว้าง	2.1 : 1	1.9 : 1
วงแหวนประสาท	55.9(22.8) 53.60	48.3(21.8) 44 – 56
ช่องขับถ่าย (Excretory pore)	76.5(31.3) 72.82	67.0(30.2) 61.76
จุดเริ่มต้นท่อทางเดินอาหาร	123.5(50.6) 117-135	115.5(52.0) 107-125
จุดสิ้นสุดท่อทางเดินอาหาร	176.6(50.6) 117-135	146.2(65.9) 146.2-158
ทวารหนัก	204(83.5) 195-215	181.6 (81.8) 168-197
รวมความยาวสุทธิทางเดินอาหาร	53.1(21.7) 44.63	30.7 (13.8) 24-34
การติดสีของ Innenkorper	++	+

### การย้อมสี Acid phosphatase

1. วิธีการขจัดฮีโมโกลบิน (Dehaemoglobinization) วิธีนี้จะต้องทำการย้อมสียิมช้า เพราะสไลด์ที่ผ่านขบวนการนี้จะทำให้พื้นกระจกสะอาดกว่าปกติเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกขจัดไป นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาสไลด์ไว้ได้นาน โดยยังไม่ย้อมสี ขึ้นตอนมีดังนี้

- จุ่มสไลด์ที่เลือดแห้งสนิทลงในน้ำสะอาดนาน 2 นาที หรือจนกว่าฮีโมโกลบินจะหมด

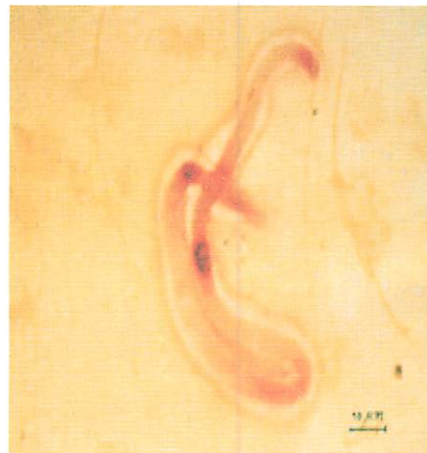
ไป

- นำสไลด์จุ่มสไลด์ลงใน acetone นาน 1 นาทีผึ่งให้แห้งสนิทเก็บไว้ใช้งานต่อไป

### 2. วิธีการย้อม Acid phosphatase

#### การแปลผล <sup>(23-24)</sup>

- บริเวณที่ Acid phosphatase activity จะติดสีแดง โดย
  - *Brugia malayi* จะติดสีที่ excretory vesical, anal vesical, plasmids
  - *Brugia pahungi* จะติดสีเกือบตลอดลำตัว



ภาพที่ 17 *Brugia malayi* ย้อม acid phosphatase





ภาพที่ 18 *Brugia pahungi* ซ้อม acid phosphatase

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

ผลดำเนินการสำรวจรังโรคเท้าช้างในแมวในจังหวัดนราธิวาส สามารถแมวจำนวน 2,515 ตัว ในเขต 4 อำเภอ ของจังหวัดนราธิวาสได้แก่ สุโหงปาดี ระแงะ เมือง และตากใบ ผลการตรวจฟิล์มเลือดพบ เชื้อพยาธิ *Brugia spp.* จำนวน 104 ตัว (4.13%) *Dirofilaria repens* 76 ตัว (3.02%) และ *Dirofilaria immitis* 2 ตัว (0.2%) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการเจาะเลือดสำรวจแมวในพื้นที่จังหวัดนราธิวาส ปีพ.ศ. 2546

จังหวัด	อำเภอ	จำนวนเจาะเลือด (ตัว)	<i>Brugia Spp.</i>	<i>B.repens</i>	<i>D.immitis</i>	รวม
			ตัว (%)	ตัว (%)	ตัว (%)	ตัว (%)
นราธิวาส	สุโหงปาดี	792	82(10.35)	29(3.66)	0	111(14.01)
	ตากใบ	758	14(1.85)	21(2.77)	0	35(4.62)
	ระแงะ	621	16(2.58)	19(3.06)	0	35(5.62)
	เมือง	344	1(0.29)	7(2.03)	2(0.58)	10(2.91)
รวม	4 อำเภอ	2,515	104(4.13%)	76 (3.02%)	2 (0.2%)	182 (7.24)

ผลการติดตามการเจาะเลือดสำรวจแมว *Brugia spp.* positive 104 ตัวในพื้นที่ 4 อำเภอ ของจังหวัดนราธิวาส สามารถติดตามเจาะเลือดได้ 27 ตัว เนื่องจากเป็นการเลี้ยงปล่อย แมวไม่ชินกับการถูก ล่าม จึงไม่สามารถติดตามได้ทุกตัวและเหตุการณ์ความไม่สงบในพื้นที่ทำให้องค์การดำเนินงาน ผลการดำเนินงานดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการติดตามการเจาะเลือดสำรวจแมว *Brugia* spp. positive ในพื้นที่  
จังหวัดนราธิวาส ปีพ.ศ. 2547

จังหวัด	อำเภอ	แมว <i>Brugia</i> spp. Positive (ตัว)	แมวที่สามารถติดตามเจาะเลือด (ตัว)
นราธิวาส	สุไหงปาดี	81	19
	ตากใบ	14	4
	ระแงะ	16	4
รวม	3 อำเภอ	111	27

จากการติดตามเจาะเลือดแมวและนำฟิล์มเลือดมาข้อมจำนวน 27 ตัว และจำนวนฟิล์มเลือดที่สามารถนำมาทำฟิล์มเลือดและตรวจพบไมโครฟิลาเรียจากแมวจำนวน 24 ตัวแต่มีฟิล์มเลือดจากแมวเพียงจำนวน 21 ที่สามารถข้อมสี acid phosphatase สำเร็จ ปัญหาที่พบคือเอนไซม์นี้จะสลายตัวง่ายเมื่อสัมผัสความร้อน สไลด์ที่ไม่สามารถข้อมติดสีอาจเป็นผลมาจากการสัมผัสกับความร้อนระหว่างการขนส่งนานเกินไป ส่วนฟิล์มเลือดจากแมวจำนวน 21 ตัวเมื่อนำมาตรวจวัด morphometric ในไมโครฟิลาเรียจำนวน 313 ตัว และผลการข้อมหาเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของไมโครฟิลาเรียที่มีเอนไซม์ acid phosphatase ที่จะข้อมติดสีแดง-ส้ม รายละเอียดดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการวัดด้วยวิธี Microfilarial morphometric ไมโครฟิลาเรียจากแมวที่ติดเชื้อฟิลาเรียในธรรมชาติที่  
จังหวัดนราธิวาส

No. cat	Measurements*			
	No. microfilariae examined	Body length	Body width at nerve ring	Innenkorper length
1	20	169.70±9.45 (144.43-183.32)	5.34±0.68 (4.36-6.54)	25.27±4.93 (11.11-33.33)
2	11	204.02±11.68 (183.32-222.20)	5.30±1.01 (3.82-7.63)	30.80±7.18 (22.22-44.44)
3	13	207.24±10.73 (188.87-222.20)	4.91±0.70 (4.36-6.54)	23.50±5.63 (16.66-33.33)

ตารางที่ 10 ผลการวัดด้วยวิธี Microfilarial morphometric ไมโครฟิลาเรียจากแมวที่ติดเชื้อฟิลาเรียในธรรมชาติที่  
จังหวัดนราธิวาส (ต่อ)

No. cat	Measurements*			
	No. microfilariae examined	Body length	Body width at nerve ring	Innenkorper length
4	2	202.75±11.79 (194.42-211.09)	4.91±0.77 (4.36-5.45)	27.77±7.86 (22.22-33.33)
5	20	196.92±17.70 (172.20-233.31)	4.66±0.62 (3.27-5.45)	30.55±4.60 (22.22-38.88)
6	3	214.79±12.83 (199.98-222.20)	4.72±0.63 (4.36-5.45)	35.18±6.41 (27.77-38.88)
7	5	211.09±14.16 (194.42-227.75)	5.23±0.49 (4.36-5.45)	31.10±4.97 (27.77-38.88)
8	15	197.02±11.85 (172.20-216.64)	5.27±0.67 (4.36-6.54)	28.88±4.30 (22.22-33.33)
9	20	195.81±13.95 (172.20-216.64)	4.69±0.57 (3.27-5.45)	25.27±3.36 (22.22-33.33)
10	11	194.93±9.44 (183.32-211.09)	4.66±0.51 (3.82-5.45)	27.27±3.89 (22.22-33.33)
11	13	207.04±10.49 (183.32-216.64)	5.16±0.61 (4.36-6.54)	31.62±4.17 (27.77-38.88)
12	20	191.37±10.27 (177.76-211.09)	4.33±0.45 (3.27-4.91)	30.83±4.93 (16.66-38.88)
13	20	175.54±10.88 (155.54-194.42)	5.32±0.63 (4.36-6.54)	27.77±4.77 (16.66-38.88)
14	20	176.93±11.58 (161.09-199.98)	6.30±0.41 (5.45-7.09)	23.33±4.26 (16.66-27.77)
15	20	193.04±23.35 (144.43-227.75)	5.91±0.71 (4.39-7.09)	24.72±5.25 (16.66-38.88)
16	20	197.20±11.04 (177.76-216.64)	6.16±0.75 (4.36-7.63)	29.16±6.95 (16.66-44.44)

ตารางที่ 10 ผลการวัดด้วยวิธี Microfilarial morphometric ไมโครฟิลาเรียจากแมวที่ติดเชื้อฟิลาเรียในธรรมชาติที่  
จังหวัดนราธิวาส (ต่อ)

No. cat	Measurements*			
	No. microfilariae examined	Body length	Body width at nerve ring	Innenkorper length
17	20	208.03±16.57 (177.76-249.98)	5.45±0.75 (4.36-6.54)	34.16±6.57 (22.22-44.44)
18	13	223.91±17.18 (177.76-249.98)	5.87±0.89 (4.36-7.63)	30.34±5.83 (16.66-38.88)
19	14	209.90±20.34 (166.65-227.75)	6.27±0.63 (5.45-7.09)	27.38±7.69 (11.11-38.88)
20	20	202±12.15 (188.87-233.31)	5.53±0.54 (4.36-6.54)	30.83±4.93 (22.22-38.88)
21	13	185.88±12.95 (166.65-211.09)	4.91±0.55 (4.36-5.45)	29.48±6.95 (16.66-44.44)
Total	313	195.91±18.92 (144.43-249.98)	5.25±0.85 (3.21-7.49)	28.56±6.08 (11.11-44.44)

ตารางที่ 11 การย้อม acid phosphatase ในไมโครฟิลาเรียจากแมวที่ติดเชื้อฟิลาเรียในธรรมชาติที่  
จังหวัดนครราชสีมา

No. cats	บริเวณที่ตรวจพบ Acid phosphatase activities				
	No. microfilariae	Amphid	Excretory vesical	Anal vesical	Plasmid
1	20	+	+	+	+
2	11	+	+	+	+
3	13	+	+	+	+
4	2	+	+	+	+
5	20	+	+	+	+
6	3	+	+	+	+
7	5	+	+	+	+
8	15	+	+	+	+
9	20	+	+	+	+
10	11	+	+	+	+
11	13	+	+	+	+
12	20	+	+	+	+
13	20	+	+	+	+
14	20	+	+	+	+
15	20	+	+	+	+
16	20	+	+	+	+
17	20	+	+	+	+
18	13	+	+	+	+
19	14	+	+	+	+
20	20	+	+	+	+
21	13	+	+	+	+

## บทที่ 5

### วิจารณ์

#### พยาธิโรคเท้าช้างที่พบในแมว

จากผลการศึกษาพบพยาธิโรคเท้าช้างในแมวของจังหวัดนครราชสีมา พบชนิด *B.malayi*, *D.repens* และ *D.immitis* ร้อยละ 4.13, 3.02 และ 0.2 ตามลำดับ พบแมวที่ติดเชื้อ *B.malayi* ร่วมกับ *B.pahungi* 6 ตัว การใช้วิธี morphometric แล้วใช้ผลจากการติดสีของ acid phosphatase ช่วยยืนยันความถูกต้องอีกครั้ง ช่วยในการจำแนกชนิดของไมโครฟิลาเรียได้เป็นอย่างดี เพราะไมโครฟิลาเรียบางชนิดสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถระบุชนิดได้ บางชนิดไมโครฟิลาเรียก็ติดสี acid phosphatase คล้ายกัน เช่น *D.immitis* คล้ายกับ *B.malayi* และ *Dipelalonema reconditum* คล้ายกับ *B.pahungi* และจากทั่วโลกพยาธิโรคเท้าช้างที่มีรายงานการพบในแมว 8 ชนิด ได้แก่ *B.malayi*, *B.pahungi*, *B.ceylonensis*, *B. buckleyi*, *D.immitis*, *D.repens*, *D.tenuis*, *W.patei* <sup>(24-25)</sup>



ภาพที่ 19 *Dirofilaria immitis* ย้อม acid phosphatase จุดที่ถูกครีซึบเอนไซม์ acid phosphatase



ภาพที่ 20 *Dipelatonema reconditum* ย้อมด้วย acid phosphatase จุดที่ถูกครีซึบเอนไซม์ acid phosphatase

แนวโน้มการเกิดโรคในกลุ่มฟิลาเรียจากแมวสู่คน

*B. malayi* ในแมวเป็นที่ทราบชัดเจนว่าสามารถแพร่มาสู่คนคนได้ ส่วน *B. pahungi* ไม่มีกิจการงานการติดเชื้อชนิดนี้กับในธรรมชาติ แต่จากรายงานการศึกษาในปี 1960 ที่ประเทศมาเลเซีย ทำการทดลอง direct feeding L3 เข้าสู่คน พบว่าเชื้อนี้สามารถเข้าไปเจริญเติบโตในคน และตรวจพบไมโครฟิลาเรียในเวลาต่อมาส่วนรายงานการก่อเกิดโรคในกลุ่มฟิลาเรียจากแมวสู่คน ในปี 2000 Pampiglione S. และ Rivasi F ได้ดำเนินการทบทวนวรรณกรรมการศึกษาเชื้อ *D. repens* ในคนที่เกิดขึ้นในช่วงปี 1995 – 2000 ในช่วงเวลา 5 ปี มีรายงานผู้ป่วยรายใหม่ที่มีการยืนยันแล้วว่าเป็นเชื้อ *D. repens* จำนวน 372 ราย ใน 25 ประเทศ เกิดในผู้ป่วยในช่วงอายุ 4 เดือน – 100 ปี พบมากในช่วงอายุมากกว่า 40 ปี พบในชายและหญิงไม่แตกต่างกัน มักเกิดพยาธิสภาพกับร่างกายในส่วนของครึ่งบน มีบ้างที่พบในอวัยวะภายใน เช่น ปอด เต้านม หากรายงานการพบการติดเชื้อ *D. repens* ในช่วง 1990-2000 มีรายงานผู้ป่วยมากถึง 782 ราย

- รายงาน Meningitis ปี 1974 ในรัฐแคลิฟอร์เนีย นับเป็นการพบการติดเชื้อ *D. immitis* รายที่ 4 ของรัฐนี้ มีอาการหลากหลายแต่เกี่ยวข้องกับ spermatic cord เกิดพังผืดและมีอาการ hernia หลังผ่าตัดเอาพังผืดออกของผู้ป่วยรายนี้ นำไปตรวจพบ immature male *D. immitis* ใน spermatic artery และพบ Extrapulmonary lesions รวมทั้ง Meningitis ร่วมกับระดับ Eosinophil สูง<sup>(26)</sup>

- รายงานพบ Intra-ocular ติดเชื้อ *D. immitis* ในคน ปี 1978<sup>(27)</sup>

- รายงานพบ *Dirofilaria* ในช่องท้องรายแรก ปี 1979 ในการผ่าศพชายชาวญี่ปุ่นที่เสียชีวิตจากมะเร็งปอด<sup>(28)</sup>

- รายงานการพบ immature male *Dirofilaria repens* ในก้อนเนื้อจากผู้ป่วยหญิงชาวไทย อายุ 51 ปี ที่จังหวัดพังงา<sup>(29)</sup>

- รายงาน Pulmonary dirofilariasis ปี 1989 ในเด็กชายชาวอินเดีย<sup>(30)</sup>

- รายงานการพบพยาธิตัวเต็มวัย *B. ceylonensis* ที่เปลือกตา (conjunctiva) ของผู้ป่วยชาวศรีลังกา ในปี 2000 พยาธิชนิดนี้มักพบในสุนัข ซึ่งพยาธิตัวเต็มวัยชนิดนี้มีความเหมือนกันชนิด *W. bancrofti* แยกความแตกต่างด้วย DNA prob และ IFAT<sup>(31)</sup>

- รายงาน human hepatic dirofilariasis รายแรก ปี 2002 ในผู้ป่วยชายชาวเกาหลี ผู้ป่วยรายนี้ไม่มีอาการแสดงผิดปกติ แต่ตรวจก้อนเนื้อที่ตับจากการตรวจร่างกายประจำปี หลังการผ่าตัดนำก้อนเนื้อนี้ออกและดำเนินการผ่าพิสูจน์ชิ้นเนื้อ พบที่ส่วนกลางของเนื้อมีเนื้อตาย และพบพยาธิตัวกลมยาว และเมื่อตรวจด้วยวิธี ELISA พบ anti ของ Dirofilariasis<sup>(32)</sup>

- รายงาน Pulmonary dirofilariasis ปี 2005 ชายชาวมาเลเซีย อายุ 55 ปี ที่เข้ารับการรักษาด้วยอาการปอดอักเสบ หลังการตรวจพบเนื้องอกในปอด หลังการผ่าตัดตรวจชิ้นเนื้อพบไมโครฟิลาเรียในกลุ่ม *Dirofilaria*<sup>(33)</sup>

การเกิดโรคในกลุ่มฟิลาเรียจากแมวสู่คน คนมักเป็น accidental host ของเชื้อจากแมว ยกเว้น *B. malayi* ที่เป็น zoonotic disease แต่จากการรวบรวมเอกสารจะพบว่าแนวโน้มการเกิดโรคที่มีเชื้อจากแมว



มาสู่คนสูงชัน แต่เชื้อเหล่านี้มักไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพแก่แมว มีเพียงบางชนิดที่ทำให้เกิดผิวหนังอักเสบ แต่เมื่อเชื้อสามารถเข้าสู่คนก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงมากขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เชื้อไปอาศัย ดังนั้นในการควบคุมโรคเท้าช้างจำเป็นต้องดำเนินการทั้งในคนและสัตว์ และสำรวจเพิ่มชนิดสัตว์ที่มีศักยภาพเป็นรังโรคในการศึกษา

### ปัญหาในการควบคุมโรค

Diethylcarbamazine citrate (DEC) เป็นยารักษาโรคเท้าช้าง (Drug of choice for Lymphatic Filariasis) ในคนมานานกว่า 50 ปี Standard recommend dose 6 mg/kg/day (WHO, 1992)<sup>(11)</sup> สำหรับเชื้อ *B. malayi* รับประทานยาติดต่อกัน 6 วัน เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของ dihydrogen citrate สำหรับรับประทาน ละลายน้ำได้ดี ดูดซึมเร็ว สามารถกระจายไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ดี ยาจะออกฤทธิ์ร่วมกับ Reticuloendothelial cell มีประสิทธิภาพในการกำจัดไมโครฟิลาเรีย และยาจะถูกขับออกทางไต แต่ประสิทธิภาพของยาต่อพยาธิตัวแก่ไม่ชัดเจน การนำ DEC มาใช้กับรังโรคในสัตว์เช่น หนู (jird) ต้องใช้ในขนาด 300 mg/kg ส่วนแมว 100 mg/kg ต่างกับในคนที่ใช้ในขนาด 6 mg/kg ก็สามารถกำจัดไมโครฟิลาเรียได้ในระดับเดียวกัน<sup>(12)</sup> เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันที่ต่างกัน นอกจากนี้แมวมักจะขย้อน อาเจียนยา ออกมาหากแก่การควบคุมปริมาณยาที่แมวจะได้รับและสิ่งที่จะต้องระวังอย่างยิ่งในการกำหนดมาตรการการรักษาในแมวที่เป็นสัตว์เลี้ยง คือจะต้องเป็นวิธีปลอดภัยและประชาชนยอมรับ เนื่องจากบางครั้งพยาธิตัวแก่อาจจะอาศัยอยู่ที่เส้นเลือด Pulmonary artery และถ้ามีการใช้ยาที่มีฤทธิ์ฆ่าตัวแก่ทันทีที่ครวละจำนวนมาก ตัวแก่จะตายลอบไปอุดตันใน หัวใจทำให้แมวตายได้

## บทที่ 6

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผล

1. ผลการตรวจวัดทาง Microfilarial morphometric จากไมโครฟิลาเรียจำนวน 313 ตัวจากแมว 21 ตัว พบว่า ความยาวลำตัวเฉลี่ย  $195 \pm 18.92$  ( $144.33 - 249.98$ )  $\mu\text{m}$  ความกว้างของลำตัวที่ระดับ nerve ring เฉลี่ย  $5.25 \pm 0.85$  ( $3.21 - 7.49$ )  $\mu\text{m}$  ความ innenkorper เฉลี่ย  $28.56 \pm 6.08$  ( $11.11 - 44.44$ )  $\mu\text{m}$  เปรียบเทียบกับข้อมูลตารางที่ 9 พบว่าไมโครฟิลาเรียสมควรจัดอยู่ในชนิด *B. malayi* จากไมโครฟิลาเรียจำนวน 313 ตัว และมีไมโครฟิลาเรียจำนวน 6 ตัว (แมว No.1 ไมโครฟิลาเรีย 1/20 ตัว, แมว No.16 ไมโครฟิลาเรีย 1/20 ตัว, แมว No.17 ไมโครฟิลาเรีย 3/20 ตัว, แมว No.21 ไมโครฟิลาเรีย 1/13 ตัว) ที่มี innenkor ยาว  $\geq 44 \mu\text{m}$  ที่จัดอยู่ในชนิด *B.pahungi* (สัดส่วนร้อยละ 1.92)

2. ผลการตรวจย้อม acid phosphatase พบว่าทุกตัวติดสีเหมือนกับไมโครฟิลาเรียของ *B.malayi* ที่ติดสีที่ตำแหน่ง amphids, excretory vesicles, anal vesicles, plasmids หากเป็นชนิด *B.pahungi* จะติดสีเกือบตลอดลำตัว

3. ผลการศึกษาว่าวิธี Microfilarial morphometric และ acid phosphatase staining พบว่ามีความสอดคล้องกันในการแปลผลการจำแนกชนิดเชื้อโรคเท้าช้างระยะไมโครฟิลาเรียร้อยละ 98.1 ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าแมวเป็นสัตว์รังโรคเท้าช้างชนิด *B. malayi* ที่สำคัญของจังหวัดนราธิวาส ซึ่งอยู่ภาคใต้ของประเทศไทย

#### ข้อเสนอแนะ

1. ควรจัดให้มีการสำรวจเจาะเลือดแมวเป็นระยะ พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเท้าช้างและไม่มีรายงานโรค โดยพื้นที่ที่มีรายงานให้มีความถี่ในการสำรวจมากกว่าที่ไม่มีรายงานโรค
2. ควรมีการสำรวจรังโรคในสัตว์ชนิดอื่นๆ
3. พัฒนารูปแบบการควบคุมรักษาโรค ในสัตว์ที่เป็นรังโรคเท้าช้าง

## เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. The state of world health . World health report-Bridging the gaps. Geneva: World Health Organization; 1995.
2. WHO. Filariasis; The Disease and Its Control. Fifth Report of WHO Expert Committee on Filariasis. Geneva, World Health Organization, 1992 (WHO Technical Report Series, No.821)
3. WHO. Basic laboratory methods in medical parasitology. 1990 Geneva, World Health Organization
4. Division of Filariasis, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health 1998:1-33
5. World Health Organization. Epidemiologic approaches to lymphatic filariasis elimination: initial assessment, monitoring and certification. World Health Organization, Atlanta, Georgia, USA. WHO/FIL/99.195;1998:1-35.
6. Junhom W., Chungpivat S. and Viseshakul N. The observation of microfilarial rate and density in cats inoculated with increasing numbers of *Brugia pahungi* infective larvae. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006; 37(suppl 3):40-42.
7. Hawking F. The Periodicity of Microfilariae Wld Hlth Org 1967. WHO/Fil/66.67 1967; 1-17.
8. Aikat Tk, Das M. A modified statistical method for analysis of periodicity of microfilariae. WHO/Fil/76. 142, 1967: 1-12
9. Lak-Uthai U. and Tomoen W. Susceptibility of *Mansonia uniformos* to *Brugia malayi* microfilariae from infected domestic cat. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 2005; 36(2)434-441.
10. Cancrini G., Frangipane di Regalbono A., Ricci I., Tessarin C., Gabrielli S., et al. *Aedes albopictus* is natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. Vet Parasitol 2003; 118(3-4) 195-202
11. Miyazaki I. Helminthic Zoonoses. 1991 Internationa; Medical Foundation of Japan, Shukosha Printing, Fukuoka, Japan.
12. Ramachandran, C.P. A GUIDE TO METHODS AND TECHNIQUES INFILARIASIS INVESTIGATIONS 1970 Bulletin No.15, Institue for Medical Research Malaysia.

13. Cheesbrough, M. Medical Laboratory manual for tropical countries. 1981 Vol 1. Sephen Austin and Sons Ltd. Hertford, England.
14. Dissanaiké AS. Zoonotic aspects of filarial infection in man. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 1975; 6:654-658.
15. Dissanaiké AS., Bandara CD., Padmini HH., Ithalamulla RL. and Naotunne TS. Recovery of a species of *Brugia*, probably, from the conjunctiva of a patient in Sri Lanka. Ann Trop Med Parasitol 2000; 94(1)83-86.
16. Buckley JJC., Nelson GS. and Heisch RB. On *Wuchereria pateri* n.sp. from the Lymphatic of Cats Dogs and Genet Gats on Pate Island, Kenya. Bull WHO 1979; 1 57 ( 3 ) 197-9.
17. Rishniw M., Barr SC., Simpson KW., Fronggillo MF., Franz M., et al. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. Vet Parasitol 2006; 18(135) 3-4.
18. Sivanandam S. and Fredericks HJ. The “innenkorper” in differentiation between the microfilariae of *Brugia pahangi* and *B.malayi* (sub-periodic form. Med J Malaya 1966; 20:337-338
19. Yen PK. And Mak JW. Histochemical differentiation of *Brugia*, *Wuchereria*, *Dirofilaria* and *Breinfilaria* microfilariae. Ann Trop Med Parasitol 1978; 72: 157-162.
20. วิฑูรย์ อึ้งประพันธ์. คู่มือการชันสูตรพืคิตพ. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา-ศิริราช ,2524.
21. Barka T, Anderson PJ. Histochemistry, Theory, Practice and Bibliography. New York: Hoeber Medical Division, 1963: 242-6
22. Sivanandam S, Fredericks HJ. The “innenkorper” in differentiation between The microfilariae of *Brugia pahangi* and *B. malayi* (sub-periodic form). Med J Malaya 1966; 20:337-8
23. Mak JW. & Sivanandam “Laboratory Procedure” 1984 Filariasis Research Division, Institute for Medical Research
24. Mak JW “FILARIASIS” 1983 Bulletin No. 19, Institute for Medical Research Malaysia Sartono E,Purnomo, Bahang Z.B and Partono F. Experimental infection and periodicity studies of *Brugia timori* in the silvered leaf monkey, Mosquito – Borne Dieases Bulletin 1987; 6: (3); 65-67.
25. Buckley JJ, Edeson JF. 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. J Helminthol 1956;30:1-20

26. Theis JH., Gilson A., Simon GE., Bradshaw B. and Clark D. *Dirofilaria* as a case of eosinophilic meningitis in man diagnosed by immunofluorescence and Arthus hypersensitivity. 1974; 68(3): 223-228.
27. Moorhouse DE. *Dirofilaria immitis*: a case of human intra-ocular infection. *Infection* 1978; 6(4):192-3.
28. Tada I., Sakaguchi Y. and Eto K. *Dirofilaria* in abdominal cavity of a man in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28(6): 988-990.
29. Jariya P. and Sucharit S. *Dirofilaria repens* from the eyelid of a woman in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 Nov;32(6):1456-7.
30. Badha BP. and Sane SY. Human pulmonary dirofilariasis in India: a case report. *J Trop Med Hyg*. 1989; 92(6): 425-426.
31. Dissanaikie AS., Bandara CD., Padmini HH., Ihhalamulla RL. and Naotunne TS. Recovery of a species of *Brugia*, probably *B. ceylonensis*, from the conjunctiva of a patient in Sri Lanka. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94(1): 83-86.
32. Kim MK., Kom CH., Yeom BW., Choi SY. and Choi JS. The first human case of hepatic dirofilariasis. *J Korean Med Sci*. 2002; 17(5): 686-690.
33. Foroulis CN., Khaldi L., Desimonas N. and Kalafati G. Pulmonary dirofilariasis mimicking lung tumor with chest wall and mediastinal invasion. *Thorac Cardiovas Surg* 2005; 53(3)173-5.

## ภาคผนวก

### STAINING METHODS FOR MICROFILARIA

#### 1. Giemsa stain (standard method)

- Dry the blood film (not less than 3 hours)
- Dehaemoglobinized for 2 minutes in tap water and allow to dry thoroughly.
- Fix the slide in methanol for 30 seconds.
- Add 2 ml of Giemsa stain to 100 ml of phosphate buffered solution, pH 7.2 (the amount of Giemsa may be increased depending on the batch of stain prepared).
- Pour the stain onto the slide and leave it for 1 hour.
- Wash the slide by pouring water to float the scum and continue until the stain is replaced with water.
- Stand the slide on one end to dry.

#### 2. Giemsa stain (rapid method)

- Dry the blood film (for at least 30 minutes).
- Dehaemoglobinized for 2 minutes in tap water and allow to dry thoroughly.
- Re-wet the slide by dipping into water and place it flat on staining rack.
- Pour immediately a few drops of undiluted stain over the film to cover them for 30 seconds.
- Wash the films and decolourised with methanol for 30 seconds, and wash again.
- Re-stain the slide with undiluted stain for 90 minutes.
- Wash the slide under running water, dry it and mount in immersion oil.

#### 3. Giemsa stain for innenkorper.

- Air-dry the slides for 24 - 48 hours.
- Dehaemoglobinized in water for 45 seconds to 1 minute and let it dry.
- Fix the slide in methanol for 30 seconds.
- Stain the slide with 3% Giemsa (3 ml Giemsa in 100 PBS pH 7.2) for 1 hour.
- Wash the slide as in Method 1.

#### 4. Haematoxylin stain

- Dry the blood film (for at least 30 minutes).

- Dehaemoglobinized the film in water for 2 minutes and let it dry.
- Fix the film in methanol for 30 seconds and pour a few drops of concentrated Haematoxylin stain before the methanol dries up.
- Immediately warm the slide over a flame, without boiling, for 2 minutes.
- Wash with tap water, dry and mount in immersion oil.

## **ACID PHOSPHATASE**

**Slide : fixed**

**Stock solutions**

### **A) Pararosanilin-HCL Stock**

- Pararosanilin 1g
- Distilled water 20ml
- HCl Conc 5ml

The pararosanilin is dissolved in the distilled water and the hydrochloric acid is added. The solution is heated gently, cooled, filtered and stored in aliquots in a refrigerator.

### **B) Sodium Nitrite**

- Sodium nitrite 2g
- Distilled water 50ml

This solution has to be prepared Fresh or made into 0.4ml aliquots and stored in the deep freeze.

### **C) Veronal-Acetate Buffer Stock**

- Sodium Acetate (3H<sub>2</sub>O) 3.88g
- Sodium Barbitone 5.88g
- Distilled water 200ml

### **D) Naphthol ASB1 Phosphate Stock**

- Naphthol ASB1 Phosphate 50mg
- Dimethyl formamide 5ml

This is put into 0.5ml aliquots and stored in the deep freeze.

**Preparation of incubating solution**

- Pararosanilin - HCL (A) 0.4ml
- Sodium nitrite (40mg/ml) (B) 0.4ml

Add the pararosanilin drop by drop to the thawed sodium nitrite, shaking well after each addition until the solution is corn-coloured (leave to stand for at least 30 seconds).

- Naphthol ASB1 phosphate (D) 0.5ml
- Veronal Acetate Buffer Stock (C) 2.5ml
- Distilled water 6.5ml ,Mix these together well and then add the pararosanilin/sodium nitrite solution. Adjust the pH to 4.7-5.0, filter and use immediately.

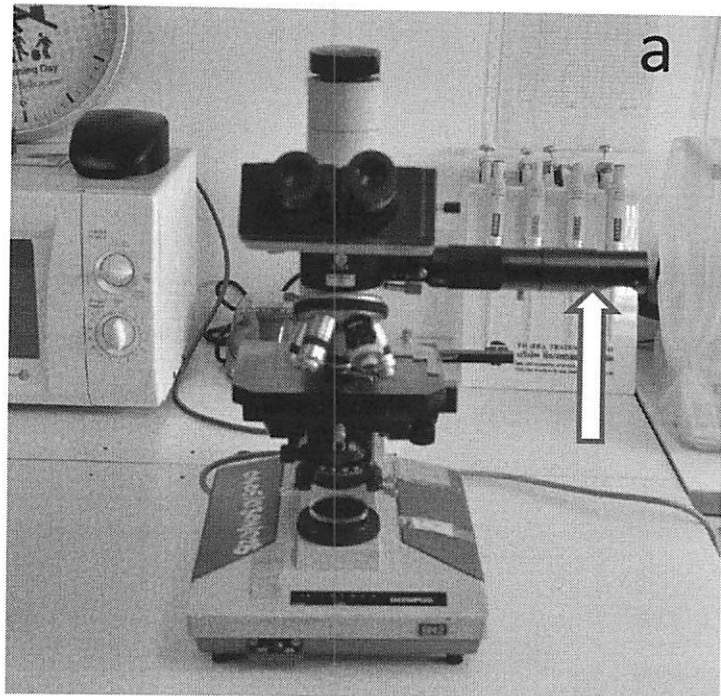
#### **Method**

1. Incubate sections for 10-60 minutes at 37C
2. Wash well in distilled and then tap water
3. Counterstain, with 2% Methyl green for 15-30 seconds (haematoxylin can be used as an alternative)
4. Wash
5. Dehydrate, clear . Mount sections in DPX

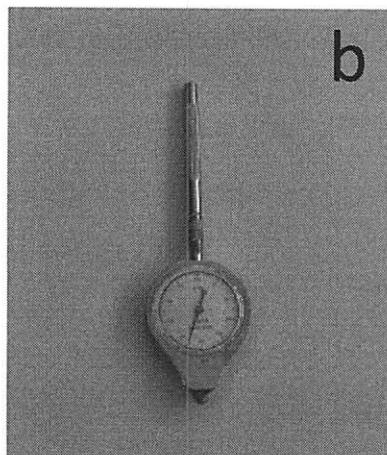
#### **Results**

- Acid phosphatase activity - Red





ภาพ a : กล้องจุลทรรศน์ติด camera lucida เพื่อใช้วาดพิกัดตำแหน่งอวัยวะของไมโครพิลารีย



ภาพ b : Curvimeter เพื่อคำนวณระยะทาง

- 0 -