Comparative Study of the Effectiveness of the PCR-based Assay and the Dissection Technique in Detecting Filarial Worms in Wild-caught Mosquitoes

Kobkan Kanjanopas[1], Suwich Thammapalo[1], Sumas Loymak[2]

[1] Vector-Borne Disease Office, Disease Control Department, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000, Thailand
[2]Filariasis Project Pikulthong Development Center, Tambon Pikulthong, Amphoe Muang, Narathiwat 96000, Thailand

Abstract

A PCR-based assay was developed in the laboratory by using DNAzol reagent to extract *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* DNA, and the primers *Hha*I and *Ssp*I for their specific amplifications respectively, which was also applied to detect a single L3 larva in pools of 10, 20, 40, 60, 75 and 100 uninfected mosquitoes. The satisfied PCR was compared with the standard dissection technique in a field situation, with mosquitoes collected from Narathiwat, Tak and Ranong provinces every month from December 2000 to August 2001. The study showed that the PCR assay could detect a single L3 in the largest pool of up to 100 uninfected mosquitoes. The precision rates of detecting one L3 in 20 and 100 uninfected mosquitoes were 96.3 and 85.7%, respectively. The accuracy and the specificity between *B. malayi* and *B. pahangi* were 100%. The PCR assay was also 2 times more effective in detecting filarial worms in wild-caught mosquitoes than the dissection technique. Only the data for negative or positive wild-caught mosquitoes infected with *B. malayi* or *W. bancrofti* are enough to assess the efficiency of mass drug treatment in transmission areas. Therefore, the policy on entomological surveillance of the Lymphatic Filariasis Elimination Programme in Thailand (2001-2006), by the Vector-Borne Disease Office, Disease Control Department, is to use the PCR technique to detect filarial worms in mosquitoes collected from index areas and to confirm the species of parasites by the dissection technique.

Keywords: PCR, dissection technique, *B. malayi*, *W. bancrofti*, mosquitoes, Lymphatic Filariasis Elimination Programme in Thailand

บทนำ

โรคเท้าช้างในระบบทางเดินน้ำเหลืองเป็นโรคติดต่อนำโดยยุงที่พบได้ใน 112 ประเทศ ส่วนใหญ่พบในประเทศเขตร้อนและร้อนชื้น (73 ประเทศ) ซึ่งประมาณการประชากรเสี่ยงต่อโรคนี้ 120 ล้านคน [1] สำหรับโรคเท้าช้างในประเทศไทยมีสาเหตุจากพยาธิสายพันธุ์ชนบท (rural type) 2 ชนิด คือ *Brugia malayi* และ *Wuchereria bancrofti* ชนิดแรกมีแหล่งแพร่เชื้อในบางพื้นที่ของ 4 จังหวัดทางภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนราธิวาส สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และกระบี่ โดยเชื้อพยาธิชนิดนี้มีแมวเป็นรังโรค [2-3] เช่นเดียวกับประเทศมาเลเซีย [4] ชนิดหลังมีแหล่งแพร่เชื้อในพื้นที่ 6 จังหวัดบริเวณชายแดนติดกับประเทศพม่า ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ตาก ลำพูน กาญจนบุรี ระนอง และราชบุรี ประชากรเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *B. malayi* ประมาณ 3.5 ล้านคน และ *W. bancrofti* ประมาณ 2.9 ล้านคน

ประเทศไทย ภายใต้การดำเนินงานของสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข มีโครงการกำจัดโรคเท้าช้างตามคำประกาศเชิญชวนขององค์การอนามัยโลก โดยทำ mass treatment ด้วยยา DEC + Albendazole แก่ประชากรในแหล่งแพร่โรคแบบ annual single dose ทุกปีอย่างต่อเนื่องจนครบ 5 ปี

[5-6] ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2549 (ค.ศ. 2002-2006) มีการประเมินผลการควบคุมโรคด้วยยาดังกล่าวทุกปี นอกจากการใช้ข้อมูลการสุ่มสำรวจเจาะโลหิตประชากรแล้ว ข้อมูลการสำรวจทางกีฏวิทยามีความสำคัญต่อการวางแผน (monitoring transmission) ระหว่างดำเนินโครงการด้วย [7]

การผ่ายุงหาตัวอ่อนพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นเทคนิคมาตรฐานในการปฏิบัติงานเพื่อใช้ยืนยันการเป็นแหล่งแพร่เชื้อและประเมินผลการควบคุมโรคจนถึงปัจจุบัน แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดด้านการใช้ลักษณะรูปร่างอวัยวะภายนอก (morphology) เพื่อบ่งชี้พยาธิระยะ L3 ว่าเป็น *B. malayi* หรือ *B. pahangi* รวมทั้งไม่สามารถจำแนกชนิดพยาธิระยะ L1, L2 ได้ [8] อีกทั้งเสียเวลาและจำนวนผู้ปฏิบัติงานค่อนข้างมาก ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction - PCR) เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจนสามารถติดตามและตรวจสอบได้ง่าย เทคนิคนี้มีการพัฒนามาใช้ตรวจหา microfilaria ในกระแสโลหิต [9-12] และในเสมหะ [13] หรือระยะ L3 ของเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ในยุงจำนวนตั้งแต่ 10 ตัวจนถึง 100 ตัวได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม [14-16] นับเป็นเทคนิคที่มีความไวและจำเพาะต่อเชื้อพยาธิแต่ละชนิดค่อนข้างสูง [17-18] องค์การอนามัยโลกให้ความเห็นว่า ประเทศที่มีโครงการกำจัดโรคเท้าช้างควรพัฒนาเทคนิค PCR สำหรับใช้ประเมินผลการควบคุมโรคระหว่างดำเนินการควบคุมโรคของโครงการ [19]

สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค จึงพัฒนาเทคนิค PCR ทางห้องปฏิบัติการขึ้น พร้อมกับนำไปศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อพยาธิฟิลาเรียในยุง กับเทคนิคการผ่าภาคสนาม เพื่อพิจารณาประยุกต์เทคนิค PCR สำหรับใช้ในการสำรวจทางกีฏวิทยาอย่างเหมาะสมต่อไป งานศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแสดงขั้นตอนการพัฒนาเทคนิค PCR และหาค่าร้อยละของจำนวนชนิดยุงที่จับจากภาคสนามที่มีเชื้อพยาธิฟิลาเรียโดย 2 วิธีการ ดังกล่าวข้างต้น

วิธีศึกษา

1. พื้นที่ศึกษา

พื้นที่ศึกษาของเชื้อพยาธิ *B. malayi* ได้แก่ หมู่ 5 ต. ปูโยะ อ. สุไหงโกลก จ. นราธิวาส เนื่องจากเป็นพื้นที่เสี่ยงสูง (high risk area) ที่มีความพร้อมทางองค์ประกอบของการแพร่กระจายโรคหลายประการ จากรายงานของ ศูนย์ข้อมูลโรคเท้าช้าง สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง ปี 2543 พบอัตราผู้มีเชื้อ *B. malayi* (Microfilarial Positive Rate - MPR) 1.62% ประชากรส่วนใหญ่ตั้งบ้านเรือนอยู่ชิดติดกับป่าพรุโต๊ะแดงที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์สำคัญ (swamp forest) ของยุงพาหะ *Mansonia bonneae, Ma. dives, Ma. uniformis* (พาหะหลัก) *Ma. annulata, Ma. annulifera, Ma. indiana, Coquilletidia crassipes* และ *Cq. nigrosignata* (พาหะรอง) [20-21] รวมทั้งนิยมเลี้ยงแมวไว้ในบ้านด้วย

สำหรับโรคเท้าช้างชนิด *W. bancrofti* ในประเทศไทยส่วนใหญ่พบตามพื้นที่เขตชนบท (rural type) โดยมียุงลายป่าสกุล *Aedes* เป็นพาหะ ซึ่งได้แก่ *Ae. niveus* subgroup (พาหะหลัก) [22-23] *Ae. desmotes, Ae. annandalei* และ *Ae. imitator* (พาหะรอง) [24] ยุงเหล่านี้มีแหล่งเพาะพันธุ์เป็นภาชนะในป่าที่กักขังน้ำฝนได้ เช่น ตอไผ่ โพรงไม้ ซอกตามกิ่งก้านต้นไม้ [22] แต่ในปัจจุบันมีแรงงานพม่าจำนวนมากเข้ามาอยู่อาศัยในพื้นที่เขตเทศบาลแม่สอด จ. ตาก และเทศบาลเมือง จ. ระนอง ซึ่งการสุ่มสำรวจเจาะโลหิตด้วยเทคนิคทำฟิล์มโลหิตหนา พบ MPR ของเชื้อ *W. bancrofti* ชนิด urban type สูงถึง 2-5% [25-26] เชื้อพยาธิชนิดนี้มียุง *Culex quinquefasciatus* เป็นพาหะ ซึ่งพบในหลายประเทศแถบร้อนชื้นรวมทั้งแปซิฟิคตะวันตก [27] แหล่งเพาะพันธุ์เป็นแหล่งน้ำขังสกปรกตามเขตเมือง สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลงมีนโยบายให้ single dose DEC แก่แรงงานชาวพม่าทุกราย ทุก 6 เดือน จึงคัดเลือกพื้นที่ทั้ง 2 แห่ง เป็นพื้นที่ศึกษา เพื่อประเมินผลการเฝ้าระวังโรคเท้าช้างด้วย

2. การเก็บตัวอย่างและยุงที่ศึกษา

ยุงจับจากภาคสนามโดยใช้กับดักคนเป็นเหยื่อล่อ มุ้งครอบวัว และมุ้งครอบแมว กรณีที่ใช้คนเป็นเหยื่อล่อจะให้ประชาชนในหมู่บ้านจำนวน 10 คนจับยุงจากบ้านตนเอง โดยใช้เครื่องช็อตยุง (รูปที่ 1) ซึ่งมีถ่านไฟฉายเป็นแหล่งผลิตกระแสไฟ โดยจะเริ่มจับตั้งแต่เวลา 18.00-22.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยุง *Mansonia* มีความหนาแน่นสูง จับยุงทุกเดือน เดือนละ 5 วัน เจ้าหน้าที่สำนักงานโครงการงานควบคุมปราบปรามโรคติดต่อและการสาธารณสุข จ. นราธิวาส ทำการจำแนกชนิดยุง และแบ่งยุงแต่ละชนิดเป็น 2 ส่วนจำนวนใกล้เคียงกัน หนึ่งส่วนผ่าหาเชื้อพยาธิฟิลาเรีย อีกหนึ่งส่วนส่งสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลงดำเนินการทางเทคนิค PCR

2.1 การผ่ายุง

ผ่ายุงทีละตัวในน้ำเกลือโดยใช้เข็มฉีกยุงภายใต้กล้อง 3 มิติ (stereomicroscope) และจำแนกชนิดของเชื้อพยาธิในยุง โดยการพิจารณาลักษณะรูปร่างโครงสร้างอวัยวะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscope) พร้อมทั้งบันทึกจำนวนยุงแต่ละชนิด แยกตามระยะเชื้อพยาธิ L1, L2 และ L3

2.2 การเก็บตัวอย่างยุงเพื่อทำ PCR

ยุงจากภาคสนามแยกแต่ละชนิด เก็บแช่ ethanol ใน micro tube ขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 ตัว กำกับหมายเลขบนฝาปิดให้ตรงกับข้อมูลแสดงชนิดยุงตามหมายเลขดังกล่าวในรายงาน

รูปที่ 1 อุปกรณ์จับยุงที่มีถ่านไฟฉายเป็นแหล่งผลิตกระแสไฟ

3. การพัฒนาเทคนิค PCR

3.1 การสกัดสาร DNA เชื้อพยาธิในยุง

DNA เชื้อพยาธิ *B. malayi* หรือ *W. bancrofti* ในยุงจากภาคสนาม สกัดด้วย DNAzol reagent โดยใช้ยุง 100 ตัว ต่อหลอด ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง จากนั้นบดละเอียดด้วย pellet pestle แล้วเติม DNAzol reagent สำหรับสกัดสารพันธุกรรม DNA ลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ต่อมานำไปปั่นด้วยแรงหมุน 10,000x g นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ micro tube (1.5 ml) อันใหม่ แล้วเติม absolute ethanol ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ที่จำนวนรอบ 4,000x g นาน 2 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 75% ethanol 2 ครั้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายน้ำกลั่นเพื่อนำไปทำ PCR

3.2 การเพิ่มจำนวน DNA

primer ที่ใช้เพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อพยาธิ *B. malayi* คือ *Hha*IF (18-mer) 5´-GCGCATAAATTCATCAGC-3´ และ *Hha*IR (23-mer) 5´-GCGCAAAACTTAATTACAAAAGC-3´ ส่วน primer ของ *W. bancrofti* คือ NV1 (21-mer) 5´-CGTGATGGCATCAAAGTAGCG-3´ และ NV2 (22-mer) 5´-CCCTCACTTACCATAAGACAAC-3´ เช่นเดียวกันกับวิธีของ Hoti [16] และ Chanteau [15] ตามลำดับ

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่ปริมาตรสุทธิของส่วนผสม 50 µl ตามวิธีของ Hoti จะใช้องค์ประกอบ DNA ต้นแบบที่สกัดได้จากเชื้อพยาธิ *B. malayi* หรือ *W. bancrofti* ระยะที่ 3 (L3) จากการเลี้ยงยุงที่ให้กินเลือดผู้มี microfilaria เชื้อพยาธิทั้ง 2 ชนิด รวมทั้ง DNA ของยุงภาคสนามในปริมาณ 5 µl และใส่เอนไซม์ *Taq* polymerase ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ยูนิต และ primer ที่มีความจำเพาะกับเชื้อพยาธิแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 pmol ร่วมกับ dNTP แต่ละตัวที่มีความเข้มข้น 0.2 mM และ 1x buffer โดยมีการตั้งอุณหภูมิของปฏิกิริยา 90 องศาเซลเซียส 5 นาทีจำนวน 1 รอบ และตามด้วยการตั้งอุณหภูมิที่จำนวนรอบ 30 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และสิ้นสุดด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR product) ที่ได้มาวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอากาโรส (agarose gel) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.8 แล้วย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เพื่อให้เรืองแสง UV ตรวจหาชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาด 322 (*B. malayi*) และ 188 (*W. bancrofti*) bp โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker

3.3 การทดสอบความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง

ทดสอบความไวที่จำนวน L3 *B. malayi* หรือ *W. bancrofti* 1 ตัว ในกลุ่มยุงที่ไม่มีเชื้อพยาธิฟิลาเรีย (uninfected mosquitoes) จำนวน 10, 20, 40, 60, 75 และ 100 ตัว และเพื่อขจัดปัญหาผลบวกปลอมจึงมีกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นยุงที่ไม่ติดเชื้อพยาธิใด ๆลงไปทุกครั้งที่สกัด

ทดสอบความจำเพาะ และ ความถูกต้องของเทคนิค PCR ต่อเชื้อพยาธิฟิลาเรีย โดยใส่เชื้อพยาธิฟิลาเรีย 1 ตัว ในกลุ่มยุงที่ไม่มีเชื้อพยาธิ (uninfected mosquitoes) จำนวน 20 ตัว และ 100 ตัว กลุ่มละ 27 ตัวอย่าง และ 7 ตัวอย่าง ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละจำนวนชนิดยุงที่มี

เชื้อพยาธิ *B. malayi* หรือ *W. bancrofti* ระหว่างเทคนิค PCR กับเทคนิคการผ่า โดยทั้งนี้จำนวนชนิดยุงในเทคนิคการผ่าจะพิจารณาเฉพาะยุงที่มีพยาธิระยะ L3 เท่านั้น

ผลการศึกษา

1. การพัฒนา PCR ทางห้องปฏิบัติการ

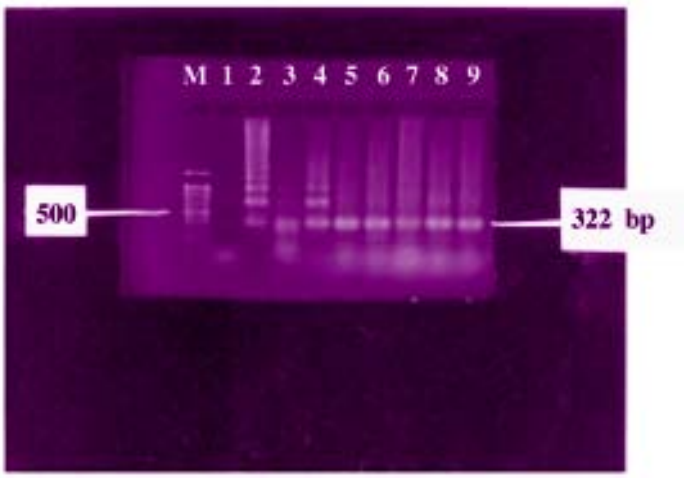
ความไวของ PCR assay สามารถตรวจหาเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง 1 ตัว ในยุงที่ไม่มีเชื้อพยาธิ (uninfected mosquitoes) จำนวน 20, 40, 60, 75 และ100 ตัว (รูปที่ 2) และสามารถตรวจในยุงที่กินเลือดผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (infected mosquitoes) ได้ (รูปที่ 3) ความถูกต้องและความจำเพาะของเทคนิค PCR จากตัวอย่างที่มีเชื้อพยาธิ 1 ตัวในกลุ่มยุงที่ไม่มีเชื้อพยาธิ 20 ตัว และ100 ตัวเท่ากับ 87.17 และ 85.71% ตามลำดับ

2. ประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อพยาธิในยุงของทั้ง 2 เทคนิค

เทคนิค PCR และเทคนิคการผ่า สามารถตรวจพบเชื้อพยาธิในยุงจากพื้นที่หมู่ที่ 5 ต. ปูโย๊ะ อ. สุไหงโกลก จ. นราธิวาส โดยค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนชนิดยุงที่มีเชื้อ *B. malayi* ของเทคนิค PCR (เฉลี่ย 30.43%) เป็น 2 เท่าของเทคนิคการผ่า (เฉลี่ย 15.17%) (ตารางที่ 1) ขณะที่ทั้ง 2 เทคนิคตรวจไม่พบเชื้อพยาธิ *W. bancrofti* ในยุงจากพื้นที่จังหวัดตาก และ จังหวัดระนอง (ตารางที่ 2 และ 3) นอกจากนี้เทคนิค PCR ใช้ตรวจพบเชื้อ *B. malayi* ในยุงได้หลากหลายถึง 10 ชนิด คือ *Ma. bonneae, Ma annulata, Ma. uniformis, Ma. annuliferra, Cq. crassipes, Cq. nigrosignata, Ar. subalbatus, Ae. dux, Aedes* sp และ *Cx. pseudosinensis* มากกว่าเทคนิคการผ่าซึ่งพบเฉพาะในยุง 7 ชนิดแรกของเทคนิค PCR เท่านั้น

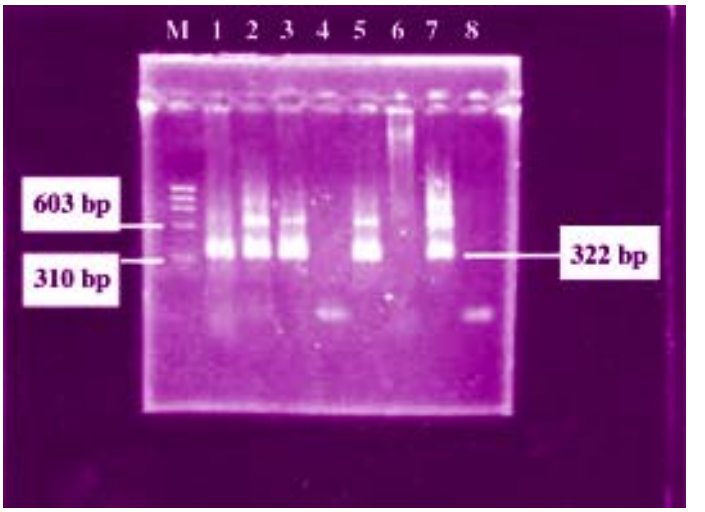
วิจารณ์

การพัฒนาเทคนิค PCR ทางห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่า DNAzol reagent สามารถสกัด DNA ของเชื้อพยาธิ *B. malayi* และ *W. bancrofti* ในยุงได้ และ



รูปที่ 2 ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเชื้อพยาธิ *B. malayi* ในกลุ่มยุงไม่มีเชื้อพยาธิจำนวนต่าง ๆ

M : 100 bp ladder (marker)
ช่องที่ 1 : ยุงไม่มีเชื้อพยาธิ (negative control)
ช่องที่ 2 : L3 *B. malayi* 1 ตัว (positive control)
ช่องที่ 3 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิ จำนวน 20 ตัว
ช่องที่ 4 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิ จำนวน 40 ตัว
ช่องที่ 5 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิ จำนวน 60 ตัว
ช่องที่ 6 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิ จำนวน 75 ตัว
ช่องที่ 7 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิ จำนวน 100 ตัว
ช่องที่ 8 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิ จำนวน 100 ตัว
ช่องที่ 9 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิ จำนวน 100 ตัว



รูปที่ 3 ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR product) เชื้อพยาธิในยุงที่กินเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อ *B. malayi*

M : ϕX174 DNA/*Hae*III Markers
แถบ 1 1,353 bp
แถบ 2 1,078 bp
แถบ 3 872 bp
แถบ 4 603 bp
แถบ 5 310 bp

ช่องที่ 1 : ยุงที่กินเลือดผู้มีเชื้อ *B. malayi* (infected mosquitoes) จำนวน 5 ตัว
ช่องที่ 2 : L3 *B. malayi* 1 ตัว (positive control)
ช่องที่ 3 : L3 *B. malayi* 1 ตัวในยุงไม่มีเชื้อพยาธิฟิลาเรีย (uninfected mosquitoes) จำนวน 10 ตัว
ช่องที่ 4 : ยุงไม่มีเชื้อพยาธิใด ๆ (negative control) จำนวน 5 ตัว
ช่องที่ 5 : infected *B. malayi* จำนวน 1 ตัว
ช่องที่ 6 : uninfected mosquito จำนวน 1 ตัว
ช่องที่ 7 : L3 *B. malayi* 20 ตัว
ช่องที่ 8 : น้ำ (blank)

ความไวในการตรวจพบเชื้อพยาธิเพียง 1 ตัว ในกลุ่มยุงที่ไม่มีเชื้อพยาธิจำนวนถึง 100 ตัว ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูง ส่วนความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pahangi* แม้ว่ากลุ่มตัวอย่างศึกษาค่อนข้างน้อยและไม่มีการทดสอบใส่เชื้อพยาธิจำนวน 1 ตัวในกลุ่มยุงจำนวนต่างๆ กันก็ตาม แต่มีการศึกษาวิจัยอื่นยืนยัน *Hha*I primer จำเพาะต่อ *B. malayi* แน่นอน [16-17] นอกจากนี้ การสำรวจเจาะโลหิตแมวตรวจด้วยเทคนิค acid phosphatase พบอัตราความชุกแมว มีเชื้อ *B. malayi* สูง (MPR 11%) โดยไม่พบแมวมี *B. pahangi* [28] จึงมั่นใจในการทดสอบนี้การทดสอบความถูกต้องเป็นการหาความเป็นจริงของชนิดเชื้อพยาธิที่ใส่ในหลอดยุง อันชี้ถึงความไม่ผิดพลาดที่อาจเกิดจากผู้ปฏิบัติงาน ส่วนค่าความแม่นยำในการหาเชื้อ *B. malayi* 1 ตัว ในกลุ่มยุงไม่มีเชื้อพยาธิ 20 และ100 ตัว เกินกว่า 80% ก็น่าจะยอมรับได้

การใช้เทคนิค PCR ตรวจหาเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างในยุงภาคสนาม จะทำให้ได้ข้อมูลทางกีฏวิทยาที่ถูกต้องและเป็นจริงมากกว่าเทคนิคการผ่า เทคนิคนี้เป็นวิธีการทางคุณภาพ แม้ว่าไม่อาจทราบอัตราการแพร่เชื้อพยาธิโรคเท้าช้างของยุงที่บอกถึงการแพร่กระจายโรค แต่โครงการกำจัดโรคเท้าช้างต้องการเพียงข้อมูลการพบกับไม่พบเชื้อ *B. malayi* หรือ *W. bancrofti* ในยุงเท่านั้น อันเป็นการเพียงพอต่อการประเมินประสิทธิผลการควบคุมโรคเท้าช้างด้วยยาในพื้นที่แหล่งแพร่โรค เนื่องจากมีรายงานการศึกษา

ตารางที่ 1 ร้อยละของจำนวนชนิดยุงที่มีเชื้อ *B. malayi* แต่ละเดือนในพื้นที่หมู่ 5 ต. ปูโย๊ะ อ. สุไหงโกลก จ. นราธิวาส

เดือน	จำนวนชนิดยุงภาคสนาม	จำนวนยุงทั้งหมด	จำนวนยุงแต่ละเทคนิค		ส่วนต่าง (%)	ร้อยละของชนิดยุงที่มีพยาธิฟิลาเรีย			
			PCR	ผ่า		PCR	(%)	ผ่า	(%)
ธค. 43	10	7,010	4,103	2,907	17.08	1	10	1 (L1)	0
มค. 44	10	5,657	2,829	2,828	0.02	3	30	1 (L2)	0
กพ. 44	11	8,020	4,267	3,753	6.41	4	6.36	2	18.18
มีค. 44	10	9,022	4,982	4,040	0.44	5	50	3	30
เมย. 44	10	9,537	5,161	4,376	8.23	5	50	4	40
พค. 44	11	7,102	4,047	3,055	13.97	2	20	2	20
มิย. 44	12	10,555	7,194	3,361	36.32	3	25	1	8.33
กค. 44	12	7,402	5,147	2,255	39.07	5	41.67	3	25
สค. 44	10	5,200	2,690	2,510	3.46	1	10	2 (L2)	0
					เฉลี่ย		30.43		15.17

ตารางที่ 2 ร้อยละของจำนวนชนิดยุงที่มีเชื้อ *W. bancrofti* แต่ละเดือนในพื้นที่เทศบาลแม่สอด จ. ตาก

เดือน	จำนวนชนิดยุงภาคสนาม	จำนวนยุงทั้งหมด	จำนวนยุงแต่ละเทคนิค		ส่วนต่าง (%)	ร้อยละของชนิดยุงที่มีพยาธิฟิลาเรีย			
			PCR	ผ่า		PCR	(%)	ผ่า	(%)
ธค. 43	8	8,991	5,482	3,509	21.94	0	0	0	0
มค. 44	10	10,632	5,321	5,311	0.09	0	0	0	0
กพ. 44	10	11,603	5,755	5,848	0.80	0	0	0	0
มีค. 44	8	12,325	6,158	6,167	0.07	0	0	0	0
เมย. 44	10	15,485	7,450	8,035	3.78	0	0	0	0
พค. 44	12	6,893	2,489	4,404	27.78	0	0	0	0
มิย. 44	13	5,663	2,821	2,842	0.37	0	0	0	0
กค. 44	11	4,032	2,015	2,017	0.05	0	0	0	0
สค. 44	13	7,496	4,099	3,397	9.36	0	0	0	0

ตารางที่ 3 ร้อยละของจำนวนชนิดยุงที่มีเชื้อ *W. bancrofti* แต่ละเดือนในพื้นที่เทศบาลเมือง จ. ระนอง

เดือน	จำนวนชนิดยุงภาคสนาม	จำนวนยุงทั้งหมด	จำนวนยุงแต่ละเทคนิค		ส่วนต่าง (%)	ร้อยละของชนิดยุงที่มีพยาธิฟิลาเรีย			
			PCR	ผ่า		PCR	(%)	ผ่า	(%)
ธค. 43	6	746	365	381	2.14	0	0	0	0
มค. 44	9	1,782	1,061	721	19.08	0	0	0	0
กพ. 44	5	2,687	1,182	1,505	12.02	0	0	0	0
มีค. 44	7	2,096	1,437	659	37.12	0	0	0	0
เมย. 44	4	1,776	1,045	731	17.68	0	0	0	0
พค. 44	5	1,268	686	582	8.20	0	0	0	0
มิย. 44	4	902	500	402	10.86	0	0	0	0
กค. 44	7	2,154	1,038	1,116	3.62	0	0	0	0
สค. 44	8	2,975	1,860	1,115	25.04	0	0	0	0

วิจัยภาคสนามที่พบว่า ผู้มีเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างเมื่อรับประทานยา DEC + Albendazole ครั้งเดียวแล้วจะไม่พบ microfilaria ในกระแสเลือด นานถึง 1 ปี คิดเป็นอัตรา 99.99% ของผู้มีเชื้อพยาธิทั้งหมด [6] ดังนั้น เมื่อจ่ายยาแบบกลุ่มครอบคลุมประชากรทั้งหมดแล้ว จึงไม่น่าจะมีโอกาสพบเชื้อพยาธิในยุงและปรากฏผู้ป่วยรายใหม่ในที่สุด

เทคนิคการผ่าที่สามารถพบเชื้อ *B. malayi* ในยุง *Aedes* sp ครั้งนี้นำไปสู่การศึกษาและวิจัยความเป็นไปได้ในการเป็นพาหะชนิดใหม่ของยุงภาคสนามเนื่องจากยุงชนิดนี้มีรายงานนำเชื้อพยาธิดังกล่าวได้ทางห้องปฏิบัติการ [29]

การพัฒนาเทคนิค PCR ทางห้องปฏิบัติการครั้งนี้อยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจ และเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเทคนิคการผ่า ข้อมูลทางชันสูตรได้ชี้ชัดเจนว่า ปัจจุบันผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อในประเทศไทยมีความหนาแน่นของ microfilaria ในกระแสโลหิตค่อนข้างต่ำมาก (1-3 ตัว/60 µl) เทคนิค PCR ซึ่งมีความไวค่อนข้างสูงจะมีความเหมาะสมมากต่อการใช้ตรวจหาเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างในยุงภาคสนาม ดังนั้น สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค จึงกำหนดนโยบายให้ใช้เทคนิคนี้กับยุงที่จับได้ในพื้นที่ดัชนี (index areas) ซึ่งเป็นตัวแทนพื้นที่อื่นๆ ที่มีลักษณะของการเกิด และการแพร่กระจายโรคที่คล้ายคลึงกัน เพื่อใช้อธิบายประสิทธิผลของการควบคุมโรคด้วยยาแต่ละปี ภายใต้โครงการกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปจากประเทศไทย รวมทั้งตรวจสอบซ้ำ (confirm) ชนิดพยาธิทุกระยะที่พบในยุงภาคสนามจากเทคนิคการผ่า

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ศึกษาวิจัยขอขอบคุณ นายแพทย์สราวุธ สุวัณณทัพพะ ผู้ทรงคุณวุฒิ กรมควบคุมโรค อดีตผู้อำนวยการกองโรคเท้าช้าง ที่เห็นชอบในหลักการให้มีการศึกษาวิจัยนี้ขึ้น ขอขอบคุณ รศ. สมใจ ลิ้มิ่งสวัสดิ์ หัวหน้าภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้ให้คำปรึกษาและชี้แนะเกี่ยวกับการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการ และ นางรวีวรรณ ศรีสวัสดิ์ นักวิทยาศาสตร์ในหน่วยงานเดียวกันที่ให้ความช่วยเหลือการทำ PCR ตลอดจนขอขอบคุณคณะเจ้าหน้าที่ของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่ 8.3 แม่สอด จังหวัดตาก และที่ 11.5 จังหวัดระนอง รวมทั้งสำนักงานโครงการงานควบคุมปราบปรามโรคติดต่อและการสาธารณสุข ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทอง จังหวัดนราธิวาส ที่ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามเป็นอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Building partnerships for lymphatic filariasis: Strategic plan: Working version: September 1999.
2. Phantana S, Chutidamrong C, Chusattayanond W. *Brugia malayi* in a cat from southern Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:173-4.
3. Kanjanopas K, Choochote W, Jitpadi A, Suvanadabba S, Loymak S, Chungpivat S, *et al*. *Brugia malayi* in a naturally infected cat from Narathiwat province, southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:585-7.
4. Mak JW, Yen PKF, Lim KC, Ramaih N. Zoonotic implication of cats and dogs in filarial transmission in Peninsular Malaysia. *Trop Geogr Med* 1980;32:259-64.
5. WHA 50.29. Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem. Resolution 50.29 of the World Health Assembly, May 1997.
6. Ottesen EA, Duke BOL, Karam M, Behbehani K. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bull World Health Organ* 1997;75:491-503.
7. World Health Organization. Defining the roles of vector control and xenomonitoring in the global programme to eliminate lymphatic filariasis. Report of the informal consultation WHO/HQ; 2002 Jan 29-31; Geneva.
8. Mak JW, Yong HS. The identification of infective larvae: control of brugian filariasis. Proceedings of the WHO Regional Seminar; 1985 Jul 1-5; Kuala Lumpur, Malaysia.
9. Zhong M, McCarthy J, Bierwert L, Lizotte WM, Chanteau S, Nutman TB, *et al*. A polymerase chain reaction assay for the detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:357-63.
10. Pool CB, William SA. A rapid DNA assay for the identification of *Brugia* in blood samples. *Mol Biochem Parasitol* 1990;40:129-36.
11. Lizotte MR, Supali T, Partono F, William SA. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:314-21.
12. William SA, Nicolas L, Waniewski ML, Plichart C, Luquiaud P, Nguyen LN, *et al*. A polymerase chain reaction assay for the

detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:384-7.

13. Abbasi I, Hamburger J, Githure J, Ochola JJ, Agure R, Koech DK, *et al*. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in patients' sputum by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:531- 2.
14. Nicolas L, Luquiaud P, Lardeux F, Mercer DR. A polymerase chain reaction assay to determine infection of *Aedes polynesiensis* by *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:136-9.
15. Chanteau S, Luquiaud P, Failloux AB, Willliam SA. Detection of *Wuchereria bancrofti* larvae in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:665-6.
16. Hoti SL, Vasuki V, Lizotte MW, Patra G, Ravi G, Vanamail P, *et al*. Detection of *Brugia malayi* laboratory and wild-caught *Mansonioides* mosquitoes (Diptera: Culicidae) using *Hha* I PCR assay. *Bull Entomol Res* 2001;91:87-92.
17. William SA, De Simone SM, McReynolds LA. Species-specific oligonucleotide probes for the identification of human filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1988;28:163-70.
18. McReynolds LA, Poole CB, Hong Y, Williams SA, Partono F, Bradley J. Recent advances in the application of molecular biology in filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;2:1-12.
19. World Health Organization. Workshop on DNA diagnositic and filariasis and symposium on filariasis and onchocerciasis. 1989 Dec 18-20; Jakarta, Indonesia.
20. Gass RP. Observation on the feeding habits of four species of *Mansonia* (*Mansonioides*) mosquitoes in southern Thailand. *J Med Entomol* 1983;20:288-93.
21. Charoenlarp P, Sucharit S, Harinasuta C. Aquatic plants as hosts of *Mansonia* larvae in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964;58:580.
22. Gould DJ. Implication of forest mosquitoes in the transmission of *Wuchereria bancrofti* in Thailand. *Mosq News* 1982;42:562-4.
23. Sucharit S, Harinasuta C, Vutikes S. Studies on the biting cycle of the natural and potential vectors of *Wuchereria bancrofti* in west Thailand. *J Med Ass Thailand* 1968; 20:288-93.
24. Kanjanopas K. The new mosquito vector of lymphatic filariasis in Thailand. *Commun Dis J* 1995;21:128-32.
25. Filariasis Division. Lymphatic filariasis: Annual Report. Filariasis Division, CDC Department, Ministry of Public Health, Thailand; 2001.
26. Triteeraprapab S, Songtrus J. High prevalence of bancroftian filariasis in Myanmar-migrant workers: a study in Mae Sot District, Tak Province, Thailand. *J Med Assoc Thai* 1999;82:734-9.
27. World Health Organization. Urban vector and pest control. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1988;767:1-80.
28. Filariasis Division. Lymphatic filariasis: Annual Report. Filariasis Division, CDC Department, Ministry of Public Health, Thailand; 2002.
29. Ramachandran CP, Edeson JFB, Kershaw WE. *Aedes aegypti* as an experimental vector of *Brugia malayi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1960;54:371-5.