



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วเพื่อใช้ในภาคสนาม

Development of a Lateral flow test kit for rapid diagnosis of lymphatic filariasis

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. สิริจิต วงศ์กำชัยและคณะ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2553



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วเพื่อใช้ในภาคสนาม

Development of a Lateral flow test kit for rapid diagnosis of lymphatic filariasis

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. สิริจิต วงศ์กำชัย

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

นายแพทย์ วิชัย สติมัย

สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

นายแพทย์ สุวิษ ธรรมปาโล

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๒ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดสงขลา

นางสาว สุมาศ ลอยเมฆ

ศูนย์ศึกษาเพื่อการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ. นราธิวาส

นางชววิวรรณ จิระอมรมนิมิต

สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

ศาสตราจารย์ ดร. เวช ชูโชติ

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2553

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว เพื่อใช้ในภาคสนาม” ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2553 ขอขอบคุณผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่สำนักงานควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค ขอขอบคุณหัวหน้าและเจ้าหน้าที่ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลงที่ 4.4 จังหวัดราชบุรี กระทรวงสาธารณสุข ตลอดจนเจ้าหน้าที่โครงการงานควบคุมและปราบปรามโรคติดต่อและการสาธารณสุข ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทอง อันเนื่องมาจากพระราชดำริ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว จ. นราธิวาสและขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยคือคุณบังอร เสริมสาตร์และคุณหทัย โนโซติ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ม.มหิดล ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนโครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ และขอขอบพระคุณพระเจ้าผู้ทรงประทานสติปัญญา ความรู้และความสำเร็จ

บทคัดย่อ

สำนักงานคณะกรรมการแห่งชาติ

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว เพื่อใช้ในภาคสนาม

Development of a Lateral flow test kit for rapid diagnosis of lymphatic filariasis

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงิน 1,100,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 3 พฤศจิกายน 2553 ถึง 3 ธันวาคม 2554

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สิริจิต วงศ์กำชัย

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ม. มหิดล โทรศัพท์ 024196468

นายแพทย์ วิชัย สติมัย

สำนักโรคติดต่ออันตราย โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข โทรศัพท์ 025903115

นายแพทย์ สุวิทย์ ธรรมปาโล

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๒ จังหวัดสงขลา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข โทรศัพท์ 0870898866

นางสาว สุมาศ ลอยเมฆ

ศูนย์ศึกษาเพื่อการพัฒนาพิภพทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ จ. นราธิวาส, โทรศัพท์ 073950335

นางชวีวรรณ จิระอมรนิมิต

สำนักโรคติดต่ออันตราย โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข โทรศัพท์ 025903115

ศาสตราจารย์เวช ชูโชติ

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่ โทรศัพท์ 0539453425

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

โรคเท้าช้างมีสาเหตุจากพยาธิฟิลาเรีย โดยมียุงเป็นพาหะนำโรค พยาธิจะไปเจริญเติบโตในระบบน้ำเหลือง ทำให้ต่อมน้ำเหลืองอุดตันเรื้อรัง ส่งผลให้แขน ขา หรืออวัยวะเพศบวมโต ทำให้เกิดความพิการ ซึ่งก่อปัญหาทั้งด้านสังคมและเศรษฐกิจของประเทศในเขตร้อนและเขตร้อน

จุดประสงค์ของโครงการวิจัยคือการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วและศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในภาคสนามคือ จังหวัดนราธิวาส ราชบุรีและกรุงเทพมหานคร

ผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (FilariaDIAG_{RAPID}) ที่พัฒนาขึ้น มีประสิทธิภาพสูง โดยมี Sensitivity 97%, เมื่อใช้วิธีการตรวจหาไมโครฟิลาเรียโดยวิธี thick blood smear staining เป็น gold standard มี specificity 100% , positive predictive value (PV +VE) 100%, negative predictive value (PV -VE) 99.1% การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจในภาคสนามพบ ความชุกของโรคเท้าช้างที่มีสาเหตุจากพยาธิ *B. malayi* ในแหล่งระบาดในจังหวัดนราธิวาส 4.4%, ความชุกของโรคเท้าช้างที่มีสาเหตุจากพยาธิ *W. bancrofti* ซึ่งพบในชาวพม่าในจังหวัดราชบุรี และในแรงงานชาวพม่าในกัม 1.01% และ 2.93% ตามลำดับ

ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว ที่พัฒนาขึ้นนี้ สะดวกในการใช้งาน เพราะสามารถเจาะเลือดตรวจเวลาใดก็ได้ ใช้งานง่าย แปลผลง่าย จึงสามารถใช้งานโดยอาสาสมัครสาธารณสุขได้ และเนื่องจากทราบผลตรวจภายใน 15 นาที จึงสามารถจ่ายยารักษาได้ทันที เมื่อตรวจพบการติดเชื้อ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้างและมีราคาถูกกว่าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ และใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเท้าช้างทั้งชนิด *Wuchereria bancrofti* ซึ่งพบในแรงงานชาวพม่าและ *Brugia malayi* ซึ่งพบทางภาคใต้ของประเทศไทย

คำสำคัญ Lateral flow test, lymphatic filariasis, antifilarial IgG4, โรคเท้าช้าง

ABSTRACT

Lymphatic filariasis (LF) is caused by a Filarial nematode and transmitted by mosquitoes. This pathology (of the lymphatic system) is triggered by adult worms in the lymph vessels and nodes which may lead to a severe disfigurement and disability called elephantiasis.

We aimed to develop a lateral flow rapid test kit for the diagnosis of Lymphatic filariasis and to validate the efficiency of the test kit in the laboratory. Field evaluation was also performed in Narathiwat, Ratchaburi and Bangkok provinces.

The developed rapid test kit, “FilariaDIAG_{RAPID},” was effective for the diagnosis of bancroftian filariasis found among immigrant Myanmar workers and brugian filariasis found in southern Thailand. The sensitivity of the test kit was 97% when the thick blood smear staining method for microfilariae detection was used as the gold standard. The test kit showed 100% specificity, 100% positive predictive value (PV+VE) and 99.1% negative predictive value (PV-VE). For the field evaluations, the prevalence of LF infection in Narathiwat province was 4.4% while the prevalence of LF infection among the Myanmar workers in Ratchaburi and Bangkok provinces was 1.01% and 2.93%, respectively.

In conclusion, this rapid test kit is useful for the diagnosis of lymphatic filariasis caused by *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. The test kit is inexpensive and convenient, since it uses blood from finger pricks which can be collected at any time of the day. It is easy to perform, and thus, can be readily employed by minimally trained medical workers in the field. Moreover, the results may be obtained within 15 minutes, thereby, facilitating adequate treatment promptly. This will undoubtedly increase the efficacy of the elimination program.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ.....	1
บทคัดย่อ.....	2
สารบัญเรื่อง.....	5
สารบัญตาราง.....	6
สารบัญภาพ.....	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....	9
บทนำ.....	10
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	13
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย.....	22
ผลการศึกษา.....	39
อภิปรายและวิจารณ์ผล.....	81
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	86
บรรณานุกรม.....	88
ภาคผนวก.....	92
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	94

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	เปรียบเทียบคุณลักษณะของ FilariaDIAG _{RAPID} กับ test kit ของต่างประเทศ.....	63
ตารางที่ 2	แสดงรายละเอียดประชากรศึกษา ในจังหวัดนราธิวาส.....	70
ตารางที่ 3	แสดงผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจ FilariaDIAG _{RAPID} ในจังหวัดนราธิวาส.....	71
ตารางที่ 4	แสดงผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจ FilariaDIAG _{RAPID} ในจังหวัดราชบุรี.....	75
ตารางที่ 5	แสดงค่า Sensitivity, Specificity, Predictive value positive, Predictive value negative ของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (FilariaDIAG _{RAPID}).....	79
ตารางที่ 6	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG _{RAPID} ในประชากรศึกษากลุ่มต่างๆ.....	80

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	แสดงส่วนประกอบของ rapid test	24
ภาพที่ 2	แสดงหลักการ Lateral flow assay; positive result.....	27
ภาพที่ 3	แสดงหลักการของ Lateral flow assay; negative result.....	27
ภาพที่ 4	แสดงส่วนประกอบของ Lateral flow assay.....	30
ภาพที่ 5	วิธีการใช้งาน Lateral flow test kit โดยหยด พลาสมาลงบน sample pad.....	30
ภาพที่ 6	วิธีการใช้งาน Lateral flow test kit โดยหยด พลาสมาลงบน Membrane.....	30
ภาพที่ 7	ลักษณะของชุดตรวจ สำหรับใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (whole blood).....	34
ภาพที่ 8	แสดงหลักการของ Lateral flow สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (Whole blood).....	35
ภาพที่ 9	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 เมื่อใช้แอนติเจนที่เตรียมต่างกัน.....	43
ภาพที่ 10	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 เมื่อใช้ partial purified <i>B. malayi</i> Ag.....	46
ภาพที่ 11	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ตัวอย่างพลาสมา (Plasma).....	47
ภาพที่ 12	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ตัวอย่างเลือด (whole blood).....	49
ภาพที่ 13	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้พลาสมาของผู้ป่วยกลุ่มที่มีไมโครฟิลาเรีย.....	51
ภาพที่ 14	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้พลาสมาของคนปกติ.....	53
ภาพที่ 15	แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้พลาสมาของผู้ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นๆ.....	54
ภาพที่ 16	แสดง Rapid test kit สำหรับเป็นต้นแบบในการผลิต.....	56
ภาพที่ 17	แม่พิมพ์ (Mold) สำหรับผลิตกล่องชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว.....	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ 18	ภาพชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง FilariaDIAG _{RAPID}	58
ภาพที่ 19	Leaflet ของ ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง FilariaDIAG _{RAPID}	59
ภาพที่ 20	Leaflet ของ ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง FilariaDIAG _{RAPID}	60
ภาพที่ 21	ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ.....	61
ภาพที่ 22	Leaflet ของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว จากต่างประเทศ แผ่นที่ 1.....	64
ภาพที่ 23	Leaflet ของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว จากต่างประเทศ แผ่นที่ 2.....	65
ภาพที่ 24	ตัวอย่างผลการตรวจเลือดของแรงงานชาวพม่า โดยใช้ชุดตรวจ “FilariaDIAG _{RAPID}	66
ภาพที่ 25	ตัวอย่างผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยชุดตรวจที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	68
ภาพที่ 26	ตัวอย่างผลการตรวจเลือดของประชาชนที่อาศัยในแหล่งระบาด ของจังหวัดนราธิวาส โดยใช้ชุดตรวจ “FilariaDIAG _{RAPID}	72
ภาพที่ 27	ออกภาคสนามเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG _{RAPID} ในประชาชนผู้อาศัยในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis ในจังหวัดนราธิวาส.....	73
ภาพที่ 28	ตัวอย่างผลการตรวจเลือดของชาวพม่าในจังหวัดราชบุรี โดยใช้ชุดตรวจ FilariaDIAG _{RAPID}	76
ภาพที่ 29	ออกภาคสนามเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจ FilariaDIAG _{RAPID} ในจังหวัดราชบุรี.....	77
ภาพที่ 30	ผู้ร่วมวิจัยถวายรายงานเกี่ยวกับชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูป FilariaDIAG _{RAPID}	93

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ABTS = 2, 2-azino diethylbenzothiazoline sulfonic acid

ICT = Immunochromathography

mL = Mililiter

μg = Microgram

OD = Optical density

บทนำ

โรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) มีสาเหตุจากหนอนพยาธิตัวกลมคือ *Wuchereria bancrofti* *Brugia malayi* และ *Brugia timori* และมีผู้เป็นพาหะนำโรค ถึงแม้ว่าโรคเท้าช้างจะไม่ก่ออันตรายถึงชีวิต แต่ทำให้เกิดความพิการซึ่งก่อปัญหาทั้งทางด้านสังคมและเศรษฐกิจของประเทศในเขตร้อนและซีกเขตร้อน จากสถิติขององค์การอนามัยโลกพบว่ามีประชากรโลกกว่า 90.2 ล้านคนที่เป็นโรคเท้าช้างและ กว่า 40 ล้านคนที่พิการจากสาเหตุการติดเชื้อเท้าช้าง สองในสามของผู้ติดเชื้ออาศัยในอินเดีย หรือ อินโดนีเซีย ที่เหลืออาศัยในประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชียและแปซิฟิก^{1,2} โรคเท้าช้างเป็นโรคที่สามารถรักษาและควบคุมได้ เนื่องจากพยาธิไม่ติดต่อยุงที่ใช้รักษา องค์การอนามัยโลกได้เริ่มโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในแหล่งระบาดทั่วโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002 และตั้งเป้าไว้ว่าภายในปี ค.ศ. 2020 โรคเท้าช้าง (lymphatic filariasis) จะถูกควบคุมและกำจัดให้หมดไปหรือจำกัดให้เหลือจำนวนผู้ติดเชื้อน้อยที่สุด³ วิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไวและความจำเพาะสูง จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในทุกระยะของโครงการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการดำเนินของโรคในแหล่งระบาด⁴

ในการดำเนินโครงการป้องกันและกำจัดโรคเท้าช้าง ตั้งแต่เริ่มต้นโครงการ ช่วงการประเมินผลโครงการจนถึงการเฝ้าระวังและติดตามการดำเนินของโรคในแหล่งระบาดหรือพื้นที่ ที่เคยเป็นแหล่งระบาดต่างๆ จำเป็นต้องตรวจหาผู้ติดเชื้อโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับโรคเท้าช้างที่ใช้มานานและยังคงใช้อยู่ในปัจจุบันคือการตรวจหาพยาธิฟิลาเรียระยะไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดแบบหนา (Thick blood smear) ซึ่งมีความไวต่ำและจะต้องเจาะเลือดเวลากลางคืน เพราะพยาธิฟิลาเรียที่พบเป็นชนิด nocturnally periodicity ซึ่งพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียจะออกมาในกระแสเลือดในเวลากลางคืน

แม้ว่าประเทศไทย โดยสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับองค์การอนามัยโลก ได้เริ่มโครงการกำจัดโรคเท้าช้างตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002 โดยการให้ยารักษาประชาชนทุกคนที่อาศัยในแหล่งระบาดของโรค (Mass treatment) โดยให้ยา DEC ร่วมกับยา albendazole ทุกปี ติดต่อกันนาน 5 ปี ซึ่งขณะนี้เข้าสู่ระยะการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการดำเนินของโรคในแหล่งระบาดเกือบทุกแห่ง ก็ตาม แต่ปัญหาการแพร่ระบาดยังไม่หมด ที่จังหวัดนราธิวาส มีพื้นที่เป็นป่าพรุขนาดใหญ่อยู่ จึงเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงเสื่อซึ่งเป็นพาหะหลักของพยาธิเท้าช้าง อีกทั้ง สัตว์เลี้ยงที่นิยมของประชาชนที่อาศัยอยู่ในแหล่งระบาดคือแมว ซึ่งเป็นโฮสต์กักตุนเชื้อของพยาธิฟิลาเรีย ชนิด *Brugia malayi* จึงเป็นจังหวัดที่มีผู้ป่วยโรคเท้าช้างมากที่สุดในประเทศไทย จากเหตุการณ์ความไม่สงบในพื้นที่ ประกอบกับการเจาะเลือดเพื่อการตรวจวินิจฉัยหาพยาธิเท้าช้างระยะไมโครฟิลาเรียที่อยู่ในกระแสเลือด ต้องทำในเวลากลางคืน จึงจะตรวจพบเชื้อ และถ้าพยาธิในกระแสเลือดมีจำนวนน้อย ก็จะตรวจไม่พบ ทำให้เจ้าหน้าที่สาธารณสุขเข้าไปดำเนินการป้องกันควบคุมโรคได้ไม่เต็มที่ ทำให้โครงการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนี้ ไม่สามารถบรรลุเป้าหมาย

มีการศึกษาวิจัยพบว่าการตรวจหาแอนติบอดีชนิด antifilarial IgG₄ ของพยาธิฟิลาเรีย เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง และระดับของ antifilarial IgG₄ จะลดลงหลังการรักษา จึงสามารถใช้ในการติดตามผลการรักษาได้ด้วย^{6,7} ปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จรูปแบบรวดเร็วสำหรับตรวจหา antifilarial IgG₄ จำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งเป็นสินค้าจากต่างประเทศ ซึ่งปัญหาของชุดตรวจสำเร็จรูปก็จะมีราคาแพง

ศิริจิต วงศ์กำชัยและคณะ⁸ ได้พัฒนาวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจหา antifilarial IgG₄ เพื่อการวินิจฉัยการติดโรคเท้าช้างขึ้น และได้รับทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2551-2552 เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปต้นแบบขึ้นจนเป็นผลสำเร็จ โดยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น มีความไวและความจำเพาะสูง จึงเหมาะที่จะเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ใช้ในทุกระยะ

ของโครงการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง โดยเฉพาะในช่วงระยะการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการดำเนินของโรคในแหล่งระบาดหรือในพื้นที่ๆเคยเป็นแหล่งระบาด

เนื่องจากงานวิจัย “การพัฒนาชุดตรวจโรคเท้าช้างชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูป” ซึ่งเป็นชุดตรวจที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถตรวจได้ทั้งแบบปริมาณ (Quantitative assay) และ เชิงคุณภาพ (Qualitative assay) คณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายที่จะขยายผลการวิจัยโดยพัฒนาให้เป็นชุดตรวจสำเร็จรูปแบบรวดเร็ว รู้ผลภายใน 15 นาที เพื่อจะได้สามารถนำไปใช้ได้ในระดับชุมชน โดยเจ้าหน้าที่อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) สามารถดำเนินการตรวจด้วยตนเอง พร้อมกับศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้นนี้ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและนำไปใช้จริงในพื้นที่ๆเป็นแหล่งระบาดของโรคเท้าช้าง เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตชุดตรวจสำเร็จรูปในเชิงพาณิชย์ (commercial test kit) เพื่อใช้ในจังหวัดที่มีแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างอยู่ โดยเฉพาะจังหวัดนราธิวาส หรือใช้ในพื้นที่แหล่งระบาดที่อยู่ในระยะการเฝ้าระวังและติดตามการดำเนินของโรค ตลอดจนใช้การเฝ้าระวังในแรงงานต่างด้าวชาวพม่า

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (rapid test) เพื่อนำไปใช้งานในภาคสนาม
2. ศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (rapid test) ต้นแบบ
4. ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นในภาคสนาม ในแหล่งระบาดของจังหวัดนราธิวาส และในกลุ่มแรงงานชาวพม่าในจังหวัดราชบุรีและกทม.

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Filaria เป็นกลุ่มของหนอนพยาธิที่อยู่ใน Superfamily Filarioidea มีเพียง 8 species เท่านั้นที่ก่อโรคในคน^{1,9} พยาธิฟิลาเรียสามารถแบ่งตามที่อยู่ (Habitat) ของพยาธิตัวเต็มวัยออกเป็น 3 กลุ่มคือ (1) กลุ่มที่อาศัยอยู่ที่ผิวหนัง(cutaneous) ซึ่งประกอบด้วย *Loa Loa* *Onchocaria volvulus* *Mansonella perstans* และ *Dipetalonema streptocerca* (2) กลุ่มที่อาศัยในระบบน้ำเหลือง (lymphatic filaria) ได้แก่ *Wuchereria bancrofti* *Brugia malayi* และ *B. timori* (3) กลุ่มที่อาศัยอยู่ในช่องว่างลำตัว (body cavity) ได้แก่ *Mansonella ozzardi*¹⁰

Lymphatic filariasis เป็นโรคที่ถึงแม้ว่าจะไม่ก่ออันตรายถึงชีวิต แต่ทำให้เกิดความพิการซึ่งก่อปัญหาทั้งทางด้านสังคมและเศรษฐกิจของประเทศในเขตร้อนและซิดเขตร้อน จากสถิติขององค์การอนามัยโลกพบว่าประมาณ 90.2 ล้านคนที่เป็นโรค lymphatic filariasis ผู้เป็นโรคกว่า 81.6 ล้านคนมีสาเหตุจากพยาธิ *Wuchereria bancrofti* และประมาณ 8.6 ล้านคนมีสาเหตุจาก *B. malayi* และ *B. timori* โดยสองในสามของผู้ติดเชื้ออาศัยในอินเดีย อินโดนีเซีย ที่เหลืออาศัยในประเทศต่างๆในเอเชียและแปซิฟิก^{1,2} โรคฟิลาเรียเป็นโรคที่สามารถรักษาและควบคุมได้ เนื่องจากพยาธิไม่คือตัวยาที่ใช้รักษา ดังนั้นองค์การอนามัยโลกได้ตั้งเป้าไว้ว่าภายในปี ค.ศ. 2020 โรคฟิลาเรียจะถูกควบคุมและกำจัดให้หมดไปหรือจำกัดให้เหลือจำนวนผู้ติดเชื้อน้อยที่สุด³

สำหรับประเทศไทยปัจจุบันพบว่าความชุกของโรค lymphatic filariasis ลดลง โดยเหลือจังหวัดที่ยังเป็นแหล่งระบาดเหลือเพียง 7 จังหวัดได้แก่ แม่ฮ่องสอน ดาก กาญจนบุรี ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่และนราธิวาส¹¹

Periodicity ของไมโครฟิลาเรีย

ปรากฏการณ์ที่ไมโครฟิลาเรียออกมาปรากฏในกระแสเลือดในช่วงเวลาหนึ่งเรียก ‘Periodicity’ Lewis เป็นคนแรกที่อธิบาย periodicity ของไมโครฟิลาเรีย โดยพบว่าไมโครฟิลาเรียจะออกมาในกระแสเลือดใน

ช่วงเวลากลางคืน ส่วนช่วงเวลากลางวัน ไมโครฟิลาเรียจะอยู่บริเวณเส้นเลือดที่ปอด ปัจจุบันก็ยังไม่มีการสามารถอธิบายสาเหตุของปรากฏการณ์นี้ได้แน่ชัด แต่มีบางทฤษฎีอธิบายว่าการ migrate ของไมโครฟิลาเรียจากปอดไปเลือดนั้น ขึ้นกับระดับออกซิเจนในปอด (pulmonary pO₂) อย่างไรก็ตามพบว่าการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดจะสัมพันธ์กับช่วงเวลาการกัดของยุงที่เป็นพาหะหลัก¹²⁻¹⁵

ในแหล่งระบาดของ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ที่พบทั่วโลกมี periodicity เป็นแบบ Nocturnally subperiodicity โดยไมโครฟิลาเรียจะปรากฏตัวในกระแสเลือดตลอดเวลา แต่กลางคืนจะพบมากกว่ากลางวัน และมีระดับสูงสุด (Peak) ในช่วงเวลาระหว่าง 22.00 -02.00 น.¹⁶⁻¹⁸

วงจรชีวิต

พยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในระบบน้ำเหลืองของโฮสต์เฉพาะ หลังการผสมพันธุ์ เพศเมียจะผลิตไมโครฟิลาเรียนับล้านตัว ไมโครฟิลาเรียจะไชออกจากกระบบน้ำเหลืองเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด โดยจะอยู่บริเวณเส้นเลือดของปอดและจะปรากฏตัวในกระแสเลือด (peripheral blood) เป็นช่วงเวลาตาม periodicity ยุงซึ่งเป็นโฮสต์กลางของพยาธิได้รับไมโครฟิลาเรียจากการดูดเลือดโฮสต์เฉพาะ ภายในกระเพาะอาหารของยุง ไมโครฟิลาเรียจะออกจากเปลือก ไชไปยังกล้ามเนื้อส่วนอก (thoracic muscle) ของยุง เจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่หนึ่ง (L1) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายไส้กรอก หลังจากนั้น 5 วัน ตัวอ่อนระยะที่หนึ่ง จะลอกคราบแล้วเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ซึ่งจะลอกคราบในอีก 10 วันต่อมา เจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อสู่คน จากนั้นตัวอ่อนระยะที่ 3 จะไชไปอยู่บริเวณส่วนปาก (proboscis) ของยุง รวมเวลาดังแต่ไมโครฟิลาเรียเข้าไปในยุงจนเจริญเป็นระยะติดต่อประมาณ 10-14 วัน ตัวอ่อนระยะติดต่อ (L3) จะไชเข้าไปในโฮสต์เฉพาะทางแผลที่ถูกยุงกัดแล้วเข้าสู่ระบบน้ำเหลือง เจริญเป็นระยะตัวเต็มวัยต่อไป¹⁹

Pre-patent period (ระยะเวลาตั้งแต่ถูกยุงกัดจนตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด) ของ *W. bancrofti* ประมาณ 8-12 เดือน อายุขัย (Life span) ของระยะตัวเต็มวัยประมาณ 7-10 ปี เคยมีรายงานพบพยาธิอยู่

ในโฮสต์เฉพาะนานถึง 40 ปี นอกจากคนแล้ว *W. bancrofti* ไม่พบสัตว์อื่นเป็นโฮสต์สะสมเชื้อ (reservoir host).^{1, 20-21}

วงจรชีวิตของ *B. malayi* จะคล้ายคลึงกับของ *W. bancrofti* ต่างกันที่ *B. malayi* มีสัตว์อื่นเช่นแมว เป็นโฮสต์สะสมเชื้อ (reservoir host) ซึ่ง Pre-patent period ในสัตว์เหล่านี้ประมาณ 2 เดือน สำหรับ Pre-patent period ในคนประมาณ 3-5 เดือน

ระบาดวิทยา

พื้นที่ซึ่งเป็นแหล่งระบาดของ *W. bancrofti* จะกระจายอยู่ในแถบเขตร้อนและเขตเขตร้อนของทวีปเอเชีย ออฟริกา อเมริกากลาง อเมริกาใต้ และแถบหมู่เกาะแปซิฟิก เป็นต้น มีจำนวนผู้ติดเชื้อทั่วโลกประมาณ 115 ล้านคน โดยมียุงพาหะหลักคือยุงรำคาญ (*Culex* spp.) นอกนั้นได้แก่ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) และยุงลาย (*Aedes* spp.) สายพันธุ์ของ *W. bancrofti* ที่พบในประเทศไทยเป็นชนิด nocturnal subperiodicity โดยพบอยู่ 2 strains คือ long strain (rural strain) ซึ่งมีแหล่งระบาดอยู่ทางภาคตะวันตกได้แก่จังหวัดตาก กาญจนบุรี และชนิด short strain (rural strain) ซึ่งมีแหล่งระบาดอยู่ทางภาคเหนือได้แก่จังหวัดแม่ฮ่องสอน ยุงที่เป็นโฮสต์กลางของ *W. bancrofti* สายพันธุ์ของไทยได้แก่ยุงลายป่า เนื่องจากพื้นที่ในแหล่งระบาดเป็นป่าไฟ จึงเหมาะเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายป่า (*Aedes*) ได้แก่ *Aedes niveus*, *Ae. annandalei*, *Ae. desmotes* และ *Ae. imitator*²²

สำหรับ *B. malayi* ชนิด nocturnally subperiodicity ซึ่งมีสัตว์เช่น หมา แมว ลิง เป็นโฮสต์สะสมเชื้อพบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่นไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย เป็นต้น สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยได้แก่ *B. malayi* ชนิดที่มี nocturnally subperiodicity ซึ่งพบทางภาคใต้ของประเทศ นอกจากนี้ยังพบ *B. malayi* ชนิดที่มี diurnally subperiodicity ซึ่งพบในแหล่งระบาดในหมู่บ้านที่อยู่ในบริเวณพรมที่ติดต่อระหว่างจังหวัดสุราษฎร์ธานีและนครศรีธรรมราช

ยุงที่เป็นโฮสต์กลางของ *B. malayi* ในประเทศไทย ได้แก่ยุงเสือ (*Mansonia*) ชนิดต่างๆเช่น *Mansonia bonneae*, *M. dives*, *M. uniformis*, *M. indiana*, *M. annulata* เป็นต้น เนื่องจากแหล่งระบาดของ *B. malayi* ซึ่งอยู่ทางตอนใต้ของประเทศไทยเป็นที่ตั้งของป่าพรุขนาดใหญ่ ได้แก่ป่าพรุโต๊ะแดง ลักษณะของป่าพรุ (swamp forest) จะมีพี้น้ำขึ้นอยู่เป็นจำนวนมากจึงเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ที่สำคัญของยุงเสือ¹¹

พยาธิกำเนิดพยาธิสภาพและการแสดง

กลไกที่ทำให้เกิดการอักเสบของต่อมและท่อน้ำเหลืองซึ่งนำไปสู่ภาวะ ต่อมน้ำเหลืองอักเสบเรื้อรังและภาวะเท้าช้าง (elephantiasis) เกิดจากตัวต่อมน้ำเหลืองถูกกระตุ้นโดยตัวพยาธิที่อยู่ในระบบน้ำเหลือง เช่น กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ผนังต่อมน้ำเหลือง (lymphatic endothelium) ผนังของหลอดน้ำเหลืองบวมหนา (lymphoedema) และจากการตอบสนองของร่างกายโฮสต์ (granulomatous inflammatory responses) คือมีเซลล์ชนิดต่างๆมาล้อมพยาธิไว้โดยเฉพาะพยาธิที่ตายแล้ว เช่น lymphocyte, eosinophil, histiocyte, epithelioid cell giant cell และ fibroblasts ซึ่งมีผลทำให้เกิดการทำลาย การอุดตันและการเสียสภาพของระบบน้ำเหลือง สุดท้ายนำไปสู่ภาวะเท้าช้าง (elephantiasis)^{21, 23, 24}

ลักษณะอาการที่พบจากการติดเชื้อฟิลาเรียในประชากรที่อาศัยในแหล่งระบาดของโรคฟิลาเรียมีหลายๆลักษณะ ได้แก่ผู้ได้รับเชื้อที่ไม่ปรากฏอาการและตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย (endemic normal) แต่ตรวจพบแอนติเจนของพยาธิ (circulating antigen) อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาวิจัยพบว่าประมาณร้อยละ 40 ของผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้อาจตรวจพบ haematuria หรือ proteinuria และถ้าได้รับการรักษา อาการเหล่านี้ก็จะหายไป²⁵ ผู้ติดเชื้อที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดแต่ไม่มีอาการใดๆเลย (asymptomatic microfilaremia)^{1,26} กลุ่มผู้ติดเชื้อที่มีอาการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองแต่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย (amicrofilaremia)¹⁰

สำหรับผู้ติดเชื้อที่มีอาการต่อมน้ำเหลืองอักเสบนั้น สามารถแบ่งลักษณะอาการตามระยะเวลาของการติดเชื้อได้ดังนี้คือ

1. ระยะที่พบการอักเสบและการอุดตันของต่อมและท่อน้ำเหลือง ในช่วงแรกของการติดเชื้อ ผู้ป่วยจะมีอาการใช้ร่วมกับการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองและท่อน้ำเหลือง ตำแหน่งการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองมักจะอยู่บริเวณต้นขาและขาหนีบ มักจะเริ่มด้วยอาการคันตามด้วยไข้สูง 1-2 วันแล้วไข้ก็ลดไปเองภายใน 2-5 วัน โดยอาการอักเสบนี้จะเป็นอย่างๆซ้ำหลายครั้ง จนในที่สุดจะเกิดการอุดตันของต่อมน้ำเหลืองและท่อน้ำเหลืองซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกายต่อพยาธิที่กำลังตายหรือตายแล้ว ทำให้ต่อมและท่อน้ำเหลืองบวมโต หลอดน้ำเหลืองโป่งพอง (lymph varices) มักพบบริเวณต้นขา ขาหนีบ และอวัยวะเพศ โรค filariasis ที่มีสาเหตุจาก *W. bancrofti* มักจะพบการอักเสบของอวัยวะเพศ (orchitis) เนื่องจากต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงขาหนีบแตก น้ำเหลืองจึงไหลเข้าไปอยู่ในถุงอวัยวะเพศ ทำให้เกิดการบวมโตของถุงอวัยวะเพศ (lymphocele หรือ hydrocele) ถ้า น้ำเหลืองที่แตกไหลเข้ากระเพาะปัสสาวะ จะทำให้ปัสสาวะมีสีขุ่น (chyluria)²⁵ และพบการอุดตันของต่อมน้ำเหลืองตั้งแต่ต้นขาลงไป¹

อาการทางคลินิกที่พบใน *B. malayi* จะเหมือนกับใน *W. bancrofti* ยกเว้นจะไม่พบภาวะอุดตันของต่อมน้ำเหลืองของระบบสืบพันธุ์และไม่พบ hydrocoele หรือ Chyluria ภาวะการอุดตันของท่อและต่อมน้ำเหลืองที่เกิดจาก *B. malayi* มักเกิดกับต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาตั้งแต่ได้ขาลงไป¹

2. ภาวะเท้าช้าง (Elephantiasis) เกิดจากการอักเสบของต่อมน้ำเหลืองซ้ำๆ หลายๆครั้ง เป็นเวลานานหลายปี โดยเฉลี่ยประมาณ 10 ปี ทำให้ต่อมและท่อน้ำเหลืองเสียสภาพ ไม่ยืดหยุ่น เพราะมีพังพืดเกิดขึ้น ทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นหนา แข็ง ขรุขระและในที่สุดการบวมโตของต่อมน้ำเหลืองก็ไม่ยุบ ถ้าเกิดกับต่อมและท่อน้ำเหลืองบริเวณขา จะทำให้มีลักษณะคล้ายเท้าช้าง ถ้าต่อมและท่อน้ำเหลืองของอวัยวะเพศเสียสภาพ จะทำให้ถุงอวัยวะเพศใหญ่ มีน้ำหนักหลายกิโลกรัม²⁷ มีลักษณะคล้ายไข่ช้าง

การวินิจฉัย

ผู้ป่วยที่มาด้วยอาการบวมและการอักเสบของต่อมน้ำเหลือง ประวัติการอาศัยในที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคฟิลาเรียมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่จะตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในเลือด สำหรับการวินิจฉัยทางปรสิตวิทยาโดยการตรวจหาไมโครฟิลาเรียจากเลือด จาก hydrocoele fluid หรือ chylous urine ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคฟิลาเรีย แต่ข้อควรระวังคือการเจาะเลือดควรเจาะตาม periodicity ของไมโครฟิลาเรีย เพื่อให้มีโอกาสตรวจพบไมโครฟิลาเรียได้มากที่สุด

ในแหล่งระบาดของ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ที่พบทั่วโลกมี periodicity เป็นแบบ Nocturnally subperiodicity โดยจะพบเชื้อในเวลากลางคืน และพบไมโครฟิลาเรียจำนวนสูงที่สุด (Peak) ในช่วงเวลาระหว่าง 22.00-02.00 น.²⁸ สำหรับพยาธิสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยเป็นชนิด nocturnally subperiodicity จึงต้องเจาะเลือดในเวลากลางคืน วิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ใช้มานานและยังคงใช้อยู่ในปัจจุบันได้แก่วิธีการตรวจทางปรสิตวิทยาเพื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดได้แก่ วิธีย้อมฟิล์มเลือดแบบหนา (Thick blood smear) วิธีนี้มีความไวต่ำ ดังนั้นถ้าปริมาณไมโครฟิลาเรียในเลือดต่ำ อาจตรวจไม่พบ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครฟิลาเรียอาจหลุดออกจากฟิล์มเลือดได้ในระหว่างขั้นตอนการย้อม^{2,3} นอกจากวิธี Thick blood smear แล้ว ก็มีวิธี Knott 's technique ซึ่งสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ และพบว่ามีความไวสูงขึ้นคือสามารถตรวจพบไมโครฟิลาเรียได้ต่ำสุดคือ 1 ตัว / เลือด 1 มิลลิลิตร แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ถ้าเลือดของผู้ติดเชื้อมีปริมาณ plasma gamma globulin สูง (ซึ่งเป็นภาวะที่มักพบในประชากรที่อยู่ในประเทศกำลังพัฒนา) น้ำยา formalin ที่ใช้ในการตรวจจะไปตกตะกอนโปรตีน ทำให้มองเห็นไมโครฟิลาเรียไม่ชัดเจน ซึ่ง Melrose และคณะได้พัฒนาวิธี Knott ให้ดีขึ้นโดยการเติมน้ำยา Triton X-100 ลงไปในน้ำยาที่ใช้ตรวจเล็กน้อยเพื่อละลายตะกอนโปรตีน ทำให้มองเห็นไมโครฟิลาเรียได้ชัดเจนขึ้น²⁹ นอกจากวิธีข้างต้นแล้ว ยังมีวิธี membrane filter technique¹

ความจำกัดของวิธีการตรวจวินิจฉัยทางปรสิตวิทยาคือมีความไวต่ำ (sensitivity) ต้องเจาะเลือดตามช่วงเวลาที่ไม่โครฟีลาเรียปรากฏตัวในกระแสเลือด (Periodicity of Filaria) ซึ่งมักจะต้องเจาะเลือดเวลากลางคืน เพราะพยาธิฟีลาเรียที่พบทั่วโลก ส่วนใหญ่เป็นชนิด Nocturnally periodicity นอกจากนี้วิธีนี้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือดได้³² จากความจำกัดเหล่านี้ทำให้ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา มีความพยายามในการนำวิธีอื่นๆ ซึ่งได้แก่วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology) และชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) รวมถึงวิธีการแพทย์อื่นๆ มาพัฒนาเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค lymphatic filariasis

วิธีการตรวจหา filarial antigen ได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่มีสาเหตุจาก *W. bancrofti* ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถเจาะเลือดผู้ป่วยเวลาใดก็ได้ เนื่องจากผลการตรวจไม่ได้ขึ้นอยู่กับปรากฏตัวของไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือด และสามารถวินิจฉัยผู้ติดเชื้อกลุ่มที่ไม่มีไมโครฟีลาเรียในกระแสเลือดได้ด้วย (amicrofilaremic cases) ปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จรูปจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งเป็น monoclonal antibody-based ELISA assay สำหรับตรวจหา circulating antigen ของ ได้แก่ Og4C3 assay ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงถึง 100% และสามารถวัดปริมาณของ circulating antigen ได้ด้วยและชนิด rapid test (ICT) แต่แม้ว่าจะมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการตรวจหา antigen ของ *B. malayi* แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่มี antigen detection assay ที่มีความไวและความจำเพาะสูงเทียบเท่ากับของ *W. Bancrofti*² ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ใช้มานานและยังคงใช้อยู่ในปัจจุบันสำหรับโรคเท้าช้างที่มีสาเหตุจากพยาธิ *Brugia malayi* คือวิธีการย้อมฟิล์มเลือดแบบหนา (Thick blood smear) ซึ่งมีความไวต่ำและต้องเจาะเลือดเวลากลางคืน³

วิธีการตรวจหาแอนติบอดีของพยาธิฟีลาเรีย (Antibody detection assay) ได้มีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1960 แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในแง่ความจำเพาะ (specificity) เพราะแอนติเจนที่ใช้จะเตรียมจากพยาธิทั้งตัว (crude filarial extract) ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น⁶ ต่อมามีการพัฒนาวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สำหรับตรวจหาแอนติบอดีของพยาธิฟีลาเรียทั้งชนิด *W. Bancrofti* และ *B. malayi* โดยใช้

recombinant antigen ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ผลิตขึ้นด้วยวิธีเทคโนโลยีชีวภาพทำให้ได้แอนติเจนมีความบริสุทธิ์และจำเพาะสูงขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มความจำเพาะ ของวิธีทดสอบ^{12,13}

นอกจากการตรวจหาแอนติบอดีชนิดต่างๆ (Specific IgG, M, E, A) ของพยาธิฟิลาเรียดังกล่าวข้างต้นแล้ว มีการตรวจหาแอนติบอดีชนิด subclass แทน ซึ่งพบว่าการตรวจหา subclass IgG₄ ของพยาธิฟิลาเรียสามารถเพิ่มความจำเพาะของการทดสอบ โดยสามารถลดผลบวกปลอมที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นลงได้ แม้ว่าจะใช้แอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิทั้งตัวก็ตาม^{14,15,16,17} นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ IgG₄ จะลดลงหลังการรักษา จึงใช้ในการติดตามผลการรักษาได้ด้วย¹⁸ มีงานวิจัยจากทั่วโลก ที่ใช้วิธีนี้ในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างชนิด lymphatic filariasis ทั้งที่มีสาเหตุจากพยาธิ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* และใช้ศึกษาวิจัยในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้าง ตลอดจนใช้ติดตามผลการรักษา¹¹

การรักษา

ปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคฟิลาเรียยังคงเป็น diethylcarbamazine citrate (DEC) ซึ่งเป็นยาที่ฆ่าไมโครฟิลาเรีย แต่ไม่ค่อยมีผลต่อพยาธิตัวเต็มวัย ยา DEC ออกฤทธิ์โดยไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ในการทำลายพยาธิ ขนาดของยาที่องค์การอนามัยโลกแนะนำคือ ให้ยาขนาด 6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 12 วัน อาการข้างเคียงที่เกิดจากยาดังนี้ได้แก่ผู้ป่วยอาจมีไข้ ปวดศีรษะ ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากการกำจัดไมโครฟิลาเรียที่ตายแล้วออกจากร่างกายของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ ดังนั้นถ้าผู้ติดเชื้อมีจำนวนไมโครฟิลาเรียในเลือดสูงก็อาจเกิดอาการข้างเคียงที่รุนแรงได้ ในการให้ยาในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ควรอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ นอกจาก DEC แล้วยังมียา Ivermectin ที่ใช้ในการรักษาและควบคุมโรคฟิลาเรีย^{6, 7, 8}

สำหรับผู้ป่วยที่เข้าสู่ภาวะเท้าช้างแล้ว การรักษาใช้เพียงการผ่าตัดแก้ไขสภาพความพิการเท่านั้น การรับประทานยา DEC ไม่ค่อยมีประโยชน์ในการรักษา เพราะพยาธิอาจตายหมดแล้ว¹

การป้องกัน

โดยการตัดวงจรการแพร่พันธุ์ของยุงพาหะเช่นกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ป้องกันการถูกยุงกัดเช่นนอนในมุ้งหรือมุ้งลวด ทายากันยุง ควรให้การรักษามีเชื้อและผู้ที่มีอาศัยในแหล่งระบาด โดยให้ยา DEC (single dose) และ albendazole ปีละครั้ง ติดต่อกัน 5-7 ปี (mass treatment) เพื่อตัดวงจรการแพร่เชื้อ⁷

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมแอนติเจน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

1.1 การเพาะเลี้ยงยุง *Aedes togoi*

เพื่อตั้ง Colony ของยุง *Aedes togoi* ในห้องเลี้ยงแมลง (insectarium) เพื่อใช้เป็นโฮสต์กลางในวงจรชีวิตของพยาธิ *B. malayi* เริ่มจากนำไข่ของยุง *Aedes togoi* มาแช่ในภาชนะสี่เหลี่ยมขนาด กว้าง x ยาว x สูง = 10 x 30 x 30 ซม. ซึ่งมีน้ำ (น้ำประปาที่ดั่งทิ้งไว้นาน 5 วัน) บรรจุอยู่ 2 ใน 3 ของปริมาตรของภาชนะวันต่อมาเมื่อลูกน้ำของยุง *Aedes togoi* พักออกจากไข่ เริ่มให้อาหารลูกน้ำ วันละ 2 ครั้ง เวลาเช้า และเย็น สำหรับอาหารของลูกน้ำจะใช้อาหารหนูที่มบดละเอียด (Rat chaw) เมื่อลูกน้ำเจริญจนเป็นระยะตัวโม่ง (pupae) ให้ดูดตัวโม่งออกมาใส่ในน้ำสะอาด วางในกรงเลี้ยงยุง เมื่อตัวโม่งเจริญจนเป็นตัวเต็มวัยให้นำ ขวดบรรจุน้ำตาล (10% sugar) และ ขวดบรรจุวิตามิน B (10% Vitamin B) ใส่ในกรงเลี้ยงยุงเพื่อเป็นอาหารของยุงตัวเต็มวัย เมื่อยุงมีอายุประมาณ 20 วัน ให้ยุงตัวเมียกินเลือด ก่อนการวางไข่

1.2 การเพาะเลี้ยงพยาธิ *Brugia malayi* ในหนูเจอร์บิล

ดูดยุง *Aedes togoi* ตัวเมียอายุประมาณ 5 วัน ใส่ในถ้วยกระดาษที่มีผ้าไนลอนตาถี่ปิดบริเวณปากถ้วย นำสำลัซึบน้ำสะอาดหมาดๆ วางที่ด้านบนของถ้วย ซึ่งปิดด้วยผ้าไนลอนตาถี่ ตั้งไว้ค้างคืนวันรุ่งขึ้น นำไมโครฟิลาเรียของ *B. malayi* ที่ harvest ได้จาก intraperitoneal cavity ของหนูเจอร์บิล ใส่ในเลือดคน โดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว จากนั้น นำเลือดไปใส่ใน cup ใส่เลือดของ membrane feeder machine ซึ่งควบคุมอุณหภูมิของเลือดให้ได้ 37°C ตลอดเวลา นำยุงที่อยู่ถ้วยกระดาษ วางใต้ cup เมื่อยุงดูดเลือด จะได้รับพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียเข้าไปในกระเพาะอาหารของยุง ไมโครฟิลาเรียภายในยุงจะเจริญต่อจนเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ภายใน 14 วัน เมื่อครบ 14 วัน ทำการผ่าเอา

ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ *B. malayi* จากถุง แล้วฉีดเข้าไปใน peritoneal ของหนูเจอร์บิล โดยใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ประมาณ 100 ตัว/หนูเจอร์บิล 1 ตัว เลี้ยงหนูไว้ 3-4 เดือน จึง harvest พยาธิระยะตัวเต็มวัยของ *B. malayi* จาก intra-peritoneal cavity หนูเจอร์บิล

1.3 การเตรียมแอนติเจนจากพยาธิระยะตัวเต็มวัย

นำพยาธิ *B. malayi* ระยะตัวเต็มวัยมาบดให้ละเอียดในโกรกซึ่งมีสารเคมีป้องกันการสูญเสียสภาพโปรตีนบรรจุอยู่ จากนั้นนำไปทำให้แตกละเอียดด้วยเครื่อง ultra-sonicator จนพยาธิละเอียด หาค่าโปรตีนของแอนติเจน แล้วแบ่งเก็บเป็นขวดเล็กๆ เก็บไว้ที่ -40°C เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบต่อไป

1.4 การหาค่าโปรตีนของแอนติเจน

การหาค่าของโปรตีนในแอนติเจนที่เตรียมได้ โดย ดูดตัวอย่างแอนติเจนที่จะหาค่าโปรตีนและ ดูดโปรตีนมาตรฐาน (Standard protein) ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลุมพลาสติกหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำยา Bradford dye (protein assay, Bio-Rad, USA) ลงไปในทุกหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่า OD ที่ 595 nm

นำค่า OD ของ standard protein ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟ แล้วคำนวณค่าโปรตีนของตัวอย่างแอนติเจนโดยเทียบกับกราฟที่สร้างขึ้น

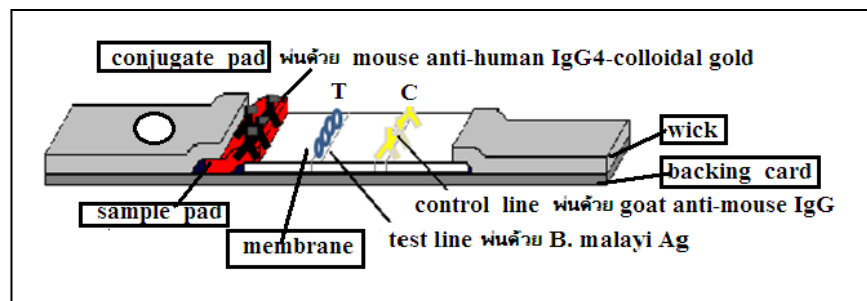
2. การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (Lateral flow rapid test)

2.1 คุณสมบัติของ Test kit (Test Format)

- เป็นวิธี qualitative สำหรับตรวจหา antifilarial IgG4 เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเท้าช้าง
- สิ่งส่งตรวจที่สามารถใช้คือ whole blood, serum หรือ plasma
- จำนวนสิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการทดสอบคือเลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว
- เวลาในการตรวจ 10-15 นาที

2.2 ส่วนประกอบของ test kit (ภาพที่ 1)

- Membrane วัสดุสำหรับจับแอนติเจน
- Conjugate pad วัสดุที่รองรับ gold colloid conjugate
- Sample pad วัสดุสำหรับรองรับสิ่งส่งตรวจ
- Wick วัสดุสำหรับดูดซับสารน้ำที่เกิน
- Backing Card วัสดุสำหรับเป็นฐานรองรับส่วนต่างๆข้างต้น
- Assay buffer น้ำยาสำหรับกำจัดผลบวกปลอม (blocking of non-specific binding)



ภาพที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ rapid test

2.3 หลักการของวิธี Immubochromatography (Lateral flow assay)

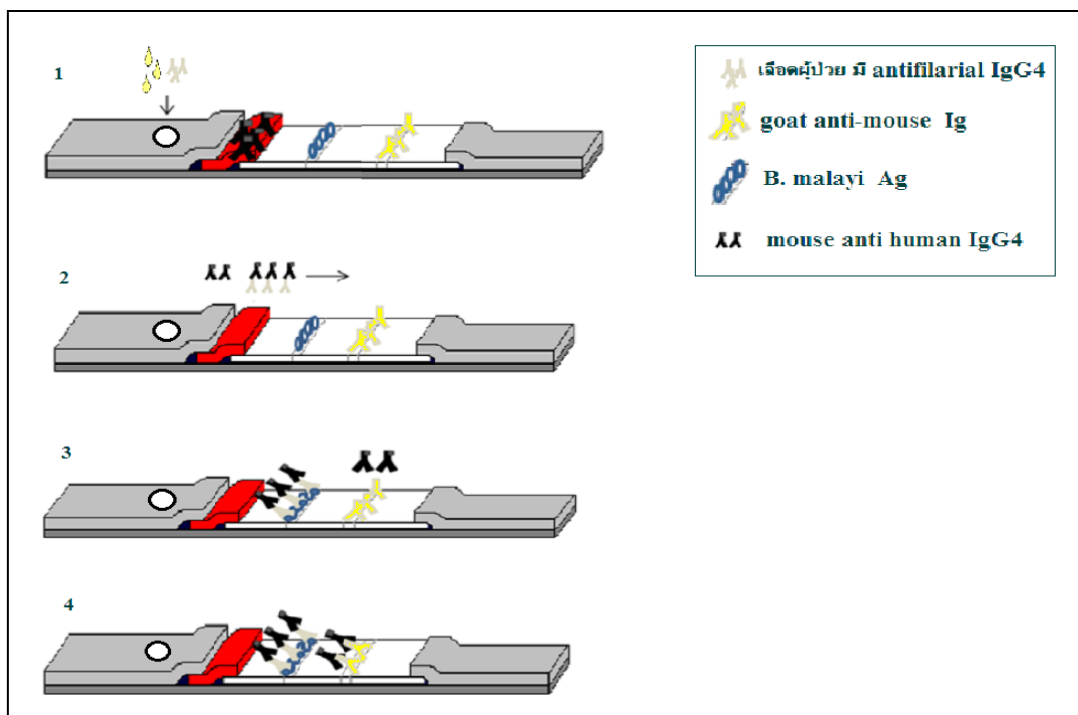
2.3.1 ถ้าสิ่งส่งตรวจมี antifilarial IgG4 antibody (POSITIVE) (ภาพที่ 2)

1. หยดสิ่งส่งตรวจลงบน sample pad
2. หยด Sample buffer ตามลงไป conjugate-colloidal gold บน conjugate pad จะถูกละลายออกมา ถ้าใน sample มี antifilarial IgG4 Ab จะจับกับ conjugate-colloidal gold เกิดเป็น complex ทั้งส่วน complex และ conjugate-colloidal gold ที่เป็นอิสระ จะเคลื่อนต่อมาด้วย capillaries flow
3. เมื่อ complex เคลื่อนมาถึงบริเวณ membrane ที่มี *B. malayi* Ag ตรึงอยู่ (Test line) ส่วน complex จะจับกับแอนติเจน ทำให้ colloidal gold ถูกตรึงไว้บริเวณนั้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นสีชมพู
4. ส่วน conjugate-colloidal gold อิสระ จะ flow ต่อไปจนถึงบริเวณ membrane ที่มี goat anti-mouse IgG ตรึงอยู่ (control line) ส่วน conjugate-colloidal gold อิสระจะจับกับ goat anti-mouse IgG ทำให้ colloidal gold ถูกตรึงไว้บริเวณนั้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นสีชมพู

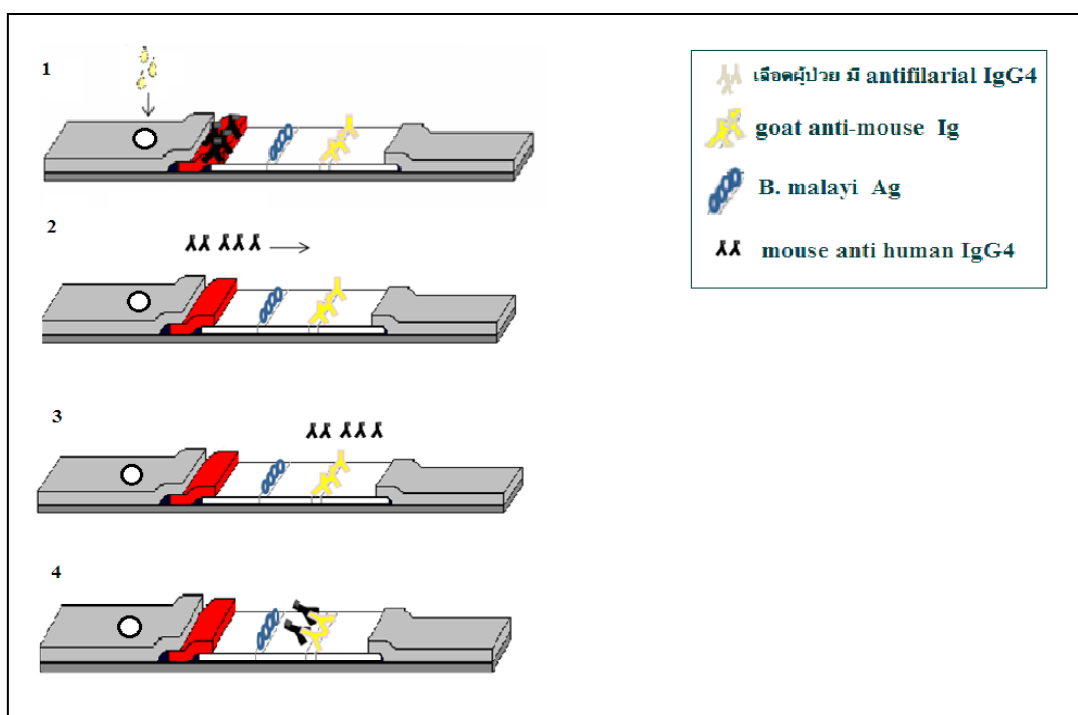
2.3.2 ถ้าสิ่งส่งตรวจไม่มี antifilarial IgG4 antibody (NEGATIVE) (ภาพที่ 3)

- เมื่อหยดสิ่งส่งตรวจลงบนกระดาษกรองส่วน sample pad
- หยด sample buffer ตามลงไป conjugate-colloidal gold บน conjugate pad จะถูกละลายออกมา แต่ใน sample ไม่มี antifilarial IgG4 antibody อยู่ จึงมีแต่ conjugate-colloidal gold ที่เป็นอิสระ ซึ่งจะเคลื่อนต่อมาด้วย capillaries flow
- Conjugate-colloidal gold ที่เป็นอิสระ จะเคลื่อนผ่านบริเวณ membrane ที่มี *B. malayi* Ag ตรึงอยู่ (Test line) จึงไม่มีแถบสีชมพู บน Test line (T)

- ส่วน conjugate-colloidal gold อีตสระ จะ flow ต่อไปจนถึงบริเวณ membrane ที่มี goat anti-mouse IgG ตรึงอยู่ (control line) ส่วน conjugate-colloidal gold อีตสระจะจับกับ goat anti-mouse IgG ทำให้ colloidal gold ถูกตรึงไว้บริเวณนั้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นสีชมพู บน control line (C)



ภาพที่ 2 แสดงหลักการ Lateral flow assay; positive result



ภาพที่ 3 แสดงหลักการของ Lateral flow assay; negative result

2.4 การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็น พลาสมาหรือซีรัม

2.4.1 การศึกษาเพื่อหา reagent สำหรับใช้เป็น control line

2.4.1.1 ใช้ Protein A เป็น control line

หยดสิ่งส่งตรวจลงไปใน sample pad จากนั้น หยด Sample buffer ตามลงไป conjugate-colloidal gold บน conjugate pad จะถูกละลายออกมา ถ้าใน sample มี antifilarial IgG4 Ab แอนติบอดี จะจับกับ conjugate-colloidal gold เกิดเป็น complex ทั้งส่วน complex และ conjugate-colloidal gold ที่เป็นอิสระ จะเคลื่อนต่อมาด้วย capillaries flow เมื่อ complex เคลื่อนมาถึงบริเวณ membrane ที่มี *B. malayi* Ag ตรึงอยู่ (Test line) ส่วน complex จะจับกับแอนติเจน ทำให้ colloidal gold ถูกตรึงไว้บริเวณนั้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นสีชมพู

ส่วน Conjugate-colloidal gold อิสระ จะ flow ต่อไปจนถึงบริเวณ membrane ที่มี protein A ตรึงอยู่ (control line) ส่วน conjugate-colloidal gold อิสระจะจับกับ protein A ทำให้ colloidal gold ถูกตรึงไว้บริเวณนั้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นสีชมพู

2.4.1.2 ใช้ Goat anti-mouse Immunoglobulin (Ig) เป็น control line

หยดสิ่งส่งตรวจลงไปใน sample pad จากนั้น หยด Sample buffer ตามลงไป conjugate-colloidal gold บน conjugate pad จะถูกละลายออกมา ถ้าใน sample มี antifilarial IgG4 Ab แอนติบอดี จะจับกับ conjugate-colloidal gold เกิดเป็น complex ทั้งส่วน complex และ conjugate-colloidal gold ที่เป็นอิสระ จะเคลื่อนต่อมาด้วย capillaries flow เมื่อ complex เคลื่อนมาถึงบริเวณ membrane ที่มี *B. malayi* Ag ตรึงอยู่ (Test line) ส่วน complex จะจับกับแอนติเจน ทำให้ colloidal gold ถูกตรึงไว้บริเวณนั้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นสีชมพู ที่บริเวณ Test line (T)

ส่วน conjugate-colloidal gold อิสระ จะ flow ต่อไปจนถึงบริเวณ membrane ที่มี goat anti-mouse Ig ตรึงอยู่ (control line) ส่วน conjugate-colloidal gold อิสระจะจับกับ goat anti-mouse Ig ทำให้ colloidal gold ถูกตรึงไว้บริเวณนั้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นสีชมพู ที่ Control line (C)

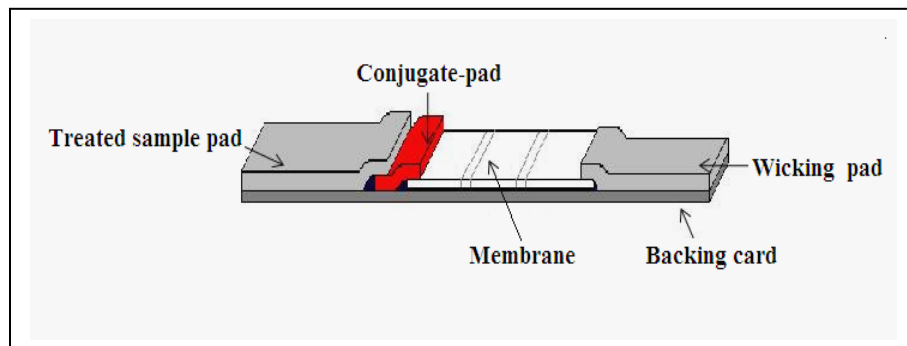
2.4.2 การศึกษาเพื่อหา วิธีการทดสอบที่เหมาะสม สำหรับ Lateral flow test kit

2.4.2.1 วิธีการทดสอบแบบที่ 1 (ภาพที่ 5)

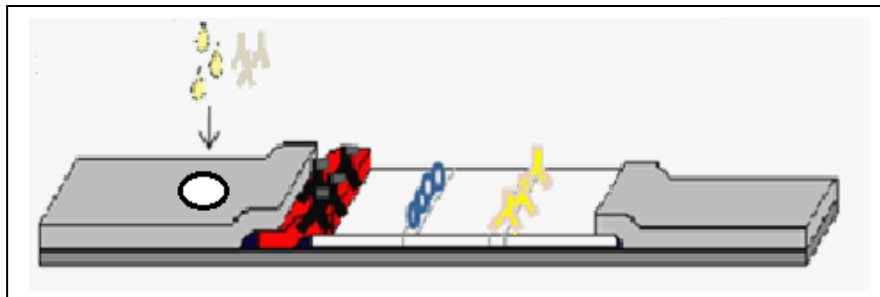
ประกอบ Lateral flow test kit (ภาพที่ 4) แล้วหยดสิ่งส่งตรวจลงไป (serum หรือ plasma) บน sample pad แล้ว หยด Sample buffer ตามลงไป จับเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 5) ทำการทดสอบโดยใช้พลาสมา ปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10 และ 20 ไมโครลิตร

2.4.2.2 วิธีการทดสอบแบบที่ 2 (ภาพที่ 6)

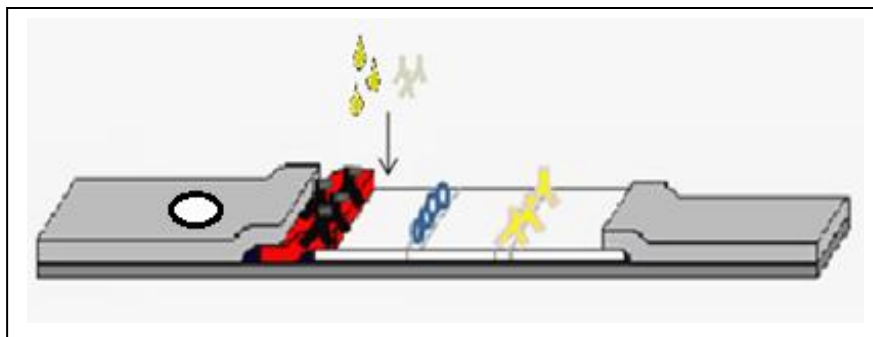
ประกอบ Lateral flow test kit (ภาพที่ 4) แล้ว หยดสิ่งส่งตรวจลงไป (serum หรือ plasma) บน Nitrocellulose membrane บริเวณตำแหน่งที่ติดกับ conjugate pad แล้ว หยด Sample buffer บน sample pad ตามลงไป จับเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 6) ทำการทดสอบโดยใช้พลาสมา ปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10 และ 20 ไมโครลิตร



ภาพที่ 4 แสดงส่วนประกอบของ Lateral flow assay



ภาพที่ 5 วิธีการใช้งาน Lateral flow test kit โดยหยด พลาสมาลงบน sample pad



ภาพที่ 6 วิธีการใช้งาน Lateral flow test kit โดยหยด พลาสมาลงบน Membrane

2.4.3 การศึกษาเพื่อหา membrane ที่เหมาะสม สำหรับ test kit

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือก Membrane ชนิดต่างๆจำนวน 8 ชนิดมาศึกษาวิจัยเพื่อใช้เป็น ส่วนที่รองรับแอนติเจน ได้แก่

- Whatman FF85/100
- PE 66/100
- Whatman AE99
- UniSart CN-140
- Ahlstrom 319
- High Flow Plus 180UB
- UniSart CN-95
- AE100

โดยนำแอนติเจน (*B. malayi* antigen) มาพ่นบน membrane ชนิดต่างๆเหล่านี้ แล้ว นำ membrane แต่ละชนิด มาประกอบเป็น Lateral flow test kit (ภาพที่ 4) จากนั้น ทำการทดสอบด้วย plasma กลุ่มต่างๆ คือกลุ่มที่มี antifilarial IgG4 antibody (positive) กลุ่มที่ไม่มี antifilarial IgG4 antibody (negative) กลุ่มคนปกติที่อาศัยอยู่นอกแหล่งระบาดและกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิอื่นๆ

2.4.4 การศึกษาเพื่อเลือกชนิดของ Assay buffer ที่เหมาะสม

เนื่องจาก Assay buffer มีความสำคัญต่อความจำเพาะของการทดสอบ ช่วย block การเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะและกำจัดผลบวกปลอม ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เตรียม Assay buffer สูตรต่างๆ โดยใช้สารเคมีที่มีความสามารถใช้เป็นตัว non-specific binding blocker จากนั้นนำมาใช้เป็น Assay buffer สำหรับ Lateral flow test kit

2.4.5 การศึกษาเพื่อเลือกชนิดของ แอนติเจน ที่เหมาะสม

2.4.5.1 การใช้ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) สำหรับ เป็นแอนติเจนสำหรับ Lateral flow test kit

นำ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.4 ซึ่งวัดค่าความเข้มข้นแล้ว มาพ่นบน membrane แล้วนำมาประกอบเป็น test kit ตามภาพที่ 4 โดยใช้ชนิดของ membrane, sample pad, conjugate pad, wick และ sample buffer ที่ได้จากข้อ 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4 จากนั้น นำมาทดสอบกับตัวอย่างศึกษา (Study samples)

B. malayi adult soluble Ag ที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาพ่นบน membrane แล้วนำมาประกอบแล้วทำการศึกษาดังที่กล่าวข้างต้น

2.4.5.2 การ characterization *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) โดย SDS-PAGE

เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสม จึงนำ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.4 มาซึ่งวัดค่าความเข้มข้นแล้ว มา run gel โดยใช้ 12% SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis จากนั้น นำมาย้อมด้วยสี Cromassi brilliant blue เพื่อดู pattern ของ *B. malayi* adult soluble antigen

2.4.5.3 การศึกษาลักษณะของการทำปฏิกิริยาระหว่าง *B. malayi* adult soluble antigen กับ ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยโรคเท้าช้างโดยวิธี Immunoblot

เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสม จึงนำ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.4 มาซึ่งวัดค่าความเข้มข้นแล้ว มา run gel โดยใช้ 12% SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis จากนั้น นำมา blot บน nitrocellulose membrane (NC) จากนั้น นำมา block ด้วย blocking buffer แล้วนำตัวอย่างพลาสมา ผู้ป่วยโรคเท้าช้าง มาทำ

ปฏิกิริยากับแอนติเจนบน NC ตามด้วย conjugate และ substrate ศึกษาลักษณะและตำแหน่งของปฏิกิริยาเกิดขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลขนาดโมเลกุลของแอนติเจนของ soluble *B. malayi* ต่างๆซึ่งทำปฏิกิริยากับ specific antifilarial IgG4

2.4.5.4 การเตรียม partial purified *B. malayi* Ag

นำ *B. malayi* adult soluble antigen มา purified โดยใช้ Vivaspine column โดยทำตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้คือ soluble *B. malayi* antigen จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงไป ใน Vivaspine column นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 RPM นาน 15 นาที จากนั้น แยกเอาแอนติเจนส่วนที่ต้องการซึ่งอยู่ด้านบนของ column นำมาหาค่าโปรตีนโดยวิธีในข้อ 1.4 จากนั้น เก็บไว้ที่ -40°C เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับ rapid test ต่อไป (partial purified *B. malayi* Ag)

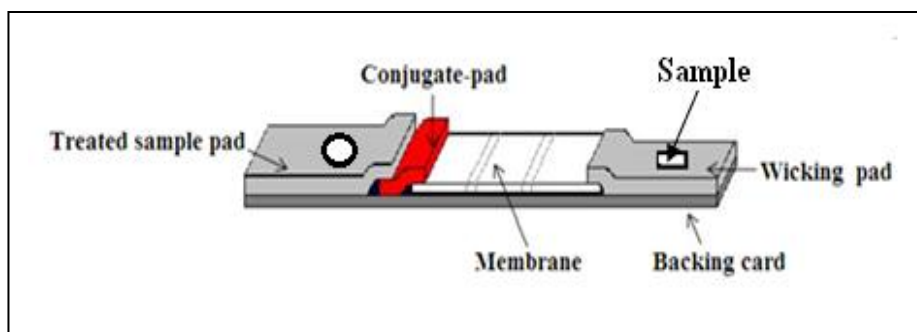
2.4.5.5 การใช้ Partial purified *B. malayi* Ag สำหรับ เป็นแอนติเจนสำหรับ Lateral flow test kit

นำ Partial purified *B. malayi* Ag ที่เตรียมได้ในข้อ 2.4.5.4 มาพ่นบน membrane แล้วนำมาประกอบเป็น test kit (ภาพที่ 4) โดยใช้ชนิดของ membrane, sample pad, conjugate pad, wick และ sample buffer ที่ได้จากข้อ 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4 จากนั้น นำมาทดสอบกับตัวอย่างศึกษา (Study samples)

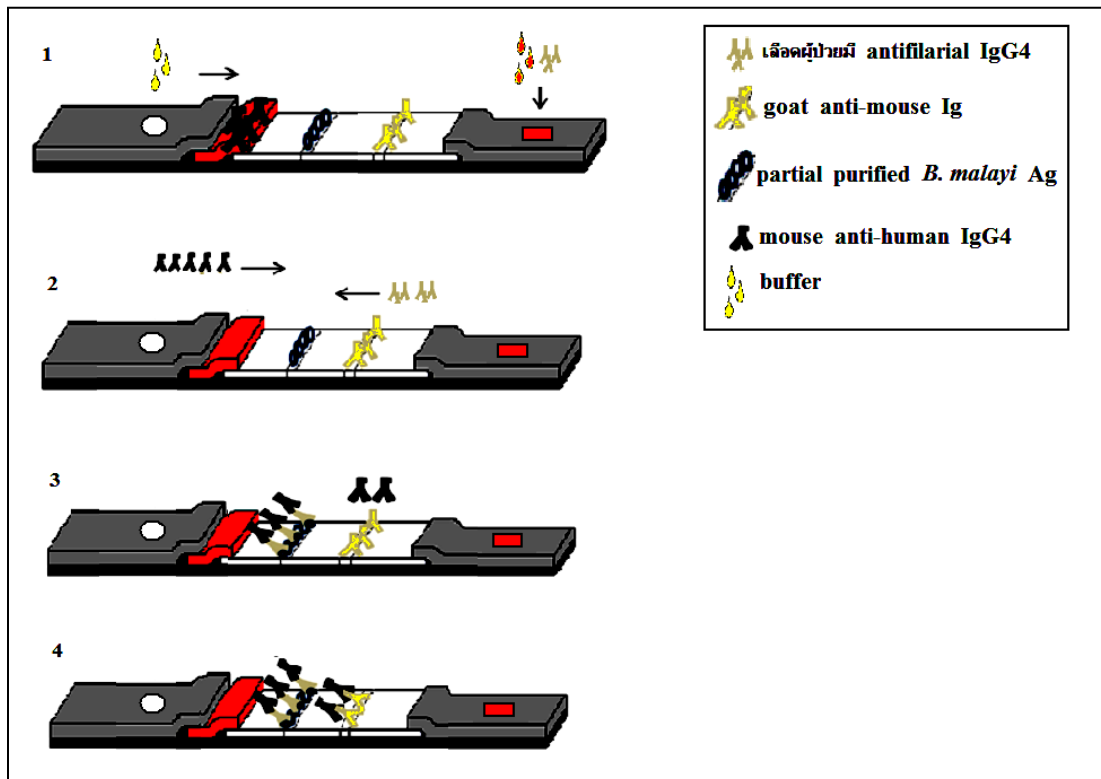
นำ Partial purified *B. malayi* Ag ที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาพ่นบน membrane แล้วนำมาประกอบ แล้วทำการศึกษาดังที่กล่าวข้างต้น (ภาพที่ 4, ภาพที่ 5, ภาพที่ 6)

2.5 การศึกษาเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (Whole blood)

เนื่องจาก Pattern การ flow แบบที่ใช้ได้ผลสำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำเหลือง/พลาสมานั้น ไม่สามารถใช้กับตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ จึงได้ปรับเปลี่ยน pattern การ flow โดยเพิ่มช่องสำหรับหยดตัวอย่างเลือด (ภาพที่ 7 และ 8)



ภาพที่ 7 ลักษณะของชุดตรวจ สำหรับใช้กับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (whole blood)



ภาพที่ 8 แสดงหลักการของ Lateral flow assay สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (Whole blood)

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการ

- 3.1 สำหรับโรคเท้าช้างชนิด malayan filariasis ซึ่งมีสาเหตุจากพยาธิ *Brugia malayi* จะใช้วิธีการตรวจหาไมโครฟิลาเรียโดยการย้อมฟิล์มเลือดหนา (thick blood smear) ของประชากรศึกษาเป็น gold standard ในการคำนวณค่า sensitivity ของชุดตรวจสำเร็จรูปต้นแบบ
- 3.2 สำหรับโรคเท้าช้างชนิด bancroftian filariasis ซึ่งมีสาเหตุจากพยาธิ *Wuchereria bancrofti* จะใช้วิธีการตรวจหาไมโครฟิลาเรียโดยการย้อมฟิล์มเลือดหนา (thick blood smear) ของประชากรศึกษาและการตรวจหาแอนติเจนต่อตัวเชื้อโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปจากต่างประเทศคือ ICT เป็น gold standard
- 3.3 เปรียบเทียบผลของชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้น กับผลการตรวจของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบ ELISA (FilariaDIAG test kit) (ทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติในปี 2551-2552)
- 3.4 การศึกษาความจำเพาะของวิธีตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้น จะใช้เลือดจากคนปกติที่อาศัยนอกแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างและเลือดจากผู้อาศัยนอกแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างที่ติดเชื้อปรสิตอื่นๆ

4. ผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (Filaria Rapid test kit)

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (Lateral flow test) ที่ได้พัฒนาเสร็จแล้ว จะถูกนำมาผลิตเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (FilariaDIAG_{RAPID}) โดยผลิตชุดตรวจต้นแบบจำนวน 2000 ชุด เพื่อนำไปศึกษา stability ของชุดตรวจในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพในภาคสนามและเพื่อส่งมอบให้คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

5. การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วในประชากรศึกษาในภาคสนาม

ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วที่ผลิตขึ้น (จากข้อ 4) จะนำไปประเมินประสิทธิภาพในภาคสนาม ในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis และ bancroftian filariasis

5.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size) ที่ใช้ในการศึกษา จากสูตร

$$N = Z_{\alpha/2} pq / d^2$$

$$n = \text{จำนวนตัวอย่าง}$$

$$\alpha = \text{Probability of type I error} = 0.05 \text{ (2-sided)}$$

$$p = \text{Sensitivity หรือ specificity}$$

$$q = 1 - p$$

$$d = \text{allowable error}$$

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่า Sensitivity 97% และ specificity 98% ถ้ากำหนด 95 % CI ของ sensitivity และ specificity เท่ากับ $98 \% \pm 5\%$ และ $97 \% \pm 5\%$ จะต้องใช้กลุ่มศึกษา (study group) และกลุ่มควบคุม (control group) อย่างน้อยกลุ่มละ 75 คน ตามลำดับ

5.2 แหล่งที่มาของประชากรศึกษา

ออกเจาะเลือดจากปลายนิ้ว ของประชาชนที่อาศัยอยู่ในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างในจังหวัดนราธิวาส และแรงงานชาวพม่าในจังหวัดราชบุรีและกทม รวมทั้งสิ้น 1500 คน

6. ศึกษา stability ของ test kit

6.1 ศึกษา Heat stress condition ตามรายละเอียดดังนี้

- เก็บ test kit ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) ระยะเวลาตั้งแต่ผลิตเสร็จ
- เก็บ test kit ที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 30 วัน
- เก็บ test kit ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 7 วัน

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

- การหาความค่า Sensitivity, specificity, Positive predictive value, negative predictive value ของชุดตรวจ เมื่อใช้ในแหล่งระบาดของเชื้อ *Brugia malayi*

การหาความค่าความไว โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Sensitivity} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$$

การหาความค่าความจำเพาะ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Specificity} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$$

การหาความค่า Positive predictive value โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Positive predictive value} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FP})$$

การหาความค่า Negative predictive value โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Negative predictive value} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FN})$$

เมื่อ TP = True positive, TN = True negative, FP = False positive, FN = False negative

- การศึกษา Prevalence ของ IgG4 ในกลุ่มประชากรศึกษาโดยใช้สูตร

$$\text{Prevalence} = \% \text{ positive cases} / \text{total studied population}$$

ผลการศึกษา

1. การเตรียมแอนติเจน

1.1 การเพาะเลี้ยงพยาธิ *Brugia malayi* ในหนูเจอร์บิล

ผลการศึกษาพบว่าหนู 1 ตัวจะ harvest พยาธิ *B. malayi* ตัวเต็มวัยประมาณ 50-100 ตัว

1.2 การเตรียมแอนติเจนจากพยาธิระยะตัวเต็มวัย

ผลการหาค่าโปรตีน พบว่า soluble antigen จากพยาธิระยะตัวเต็มวัย 628 ตัว มีค่าโปรตีนทั้งสิ้น 28 มิลลิกรัม หรือ 22.4 มิลลิกรัม/พยาธิ 1 ตัว

2. การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคทำข้างแบบรวดเร็ว (Lateral flow rapid test)

2.1 การศึกษาเพื่อหาสถานะที่เหมาะสม (Optimization) สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นพลาสมาหรือซีรัม

2.1.1 การศึกษาเพื่อหา reagent สำหรับใช้เป็น control line

2.1.1.1 ใช้ Protein A เป็น control line

ผลการศึกษาพบว่า ถ้าใช้ Protein A ในส่วนของ control line จะไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่

Test line เพราะ protein A จะจับแอนติบอดีทั้งหมด ไม่เหลือแอนติบอดี ที่จะจับกับแอนติเจน

2.1.1.2 ใช้ Goat anti-mouse Immunoglobulin (Ig) เป็น control line

ผลการศึกษาพบว่า ถ้าใช้ Goat anti-mouse Immunoglobulin (Ig) ในส่วนของ control line ได้ผลการทดลองที่ดี

2.1.2 การศึกษาเพื่อหา วิธีการทดสอบที่เหมาะสม สำหรับ Lateral flow test kit

2.1.2.1 วิธีการทดสอบแบบที่ 1

ประกอบ Lateral flow test kit (ภาพที่ 4) แล้วหยดสิ่งส่งตรวจลงไป (serum หรือ plasma) บน sample pad แล้ว หยด Sample buffer ตามลงไป จับเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 5)

ทำการทดสอบโดยใช้พลาสมา ปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10 และ 20 ไมโครลิตร

ผลการศึกษาพบว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น

2.1.2.2 วิธีการทดสอบแบบที่ 2

ประกอบ Lateral flow test kit ดังรูปที่ 4 แล้ว หยดสิ่งส่งตรวจลงไป (serum หรือ plasma) บน Nitrocellulose membrane บริเวณตำแหน่งที่ติดกับ conjugate pad แล้ว หยด Sample buffer บน sample pad ตามลงไป จับเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 6)

ทำการทดสอบโดยใช้พลาสมา ปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 2, 5, 10 และ 20 ไมโครลิตร

ผลการศึกษาพบว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น ทั้งที่ Test line และ Control line

2.1.3 การศึกษาเพื่อหา membrane ที่เหมาะสม สำหรับ test kit

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือก Membrane ชนิดต่างๆจำนวน 8 ชนิดมาศึกษาวิจัยเพื่อใช้เป็น ส่วนที่รองรับแอนติเจน ได้แก่

- Whatman FF85/100
- PE 66/100
- Whatman AE99
- UniSart CN-140
- Ahlstrom 319
- High Flow Plus 180UB
- UniSart CN-95
- AE100

โดยนำแอนติเจน (*B. malayi* antigen) มาพ่นบน membrane ชนิดต่างๆเหล่านี้ แล้ว นำ membrane แต่ละชนิด มาประกอบเป็น Lateral flow test kit (ภาพที่ 4) จากนั้น ทำการทดสอบด้วย plasma กลุ่มต่างๆ คือกลุ่มที่มี antifilarial IgG4 antibody (positive samples) กลุ่มที่ไม่มี antifilarial IgG4 antibody (negative samples)

ผลการศึกษาพบว่า มี Membrane 1 ชนิด ที่ให้ผลการทดสอบที่ดี คือ เห็นความแตกต่างระหว่าง Positive samples และ Negative samples

2.1.4 การศึกษาเพื่อเลือกชนิดของ Assay buffer ที่เหมาะสม

เนื่องจาก Assay buffer มีความสำคัญต่อความจำเพาะของการทดสอบ ช่วย block การเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะและกำจัดผลบวกปลอม ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เตรียม Assay buffer สูตรต่างๆ โดยใช้สารเคมีที่มีความสามารถใช้เป็นตัว non-specific binding blocker จากนั้นนำมาใช้เป็น Assay buffer สำหรับ Lateral flow test kit จากนั้น ทำการทดสอบด้วย plasma กลุ่มต่างๆ คือกลุ่มที่มี antifilarial IgG4 antibody (positive samples), กลุ่มที่ไม่มี antifilarial IgG4 antibody (negative samples) กลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่นอกแหล่งระบาดของโรคเท้าช้าง

ผลการศึกษาพบว่า มี Assay buffer 1 ชนิด ที่ให้ผลการทดสอบที่ดี

2.1.5 การศึกษาเพื่อเลือกชนิดของ แอนติเจน ที่เหมาะสม

2.1.5.1 การใช้ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) สำหรับ เป็นแอนติเจนสำหรับ Lateral flow test kit

นำ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) ซึ่งวัดค่าความเข้มข้นแล้ว มาพ่นบน membrane แล้วนำมาประกอบเป็น test kit ตามภาพที่ 4 โดยใช้ชนิดของ membrane, sample pad, conjugate pad, wick และ sample buffer ที่ได้จากข้อ 2.1.3, 2.1.4 จากนั้น นำมาทดสอบกับตัวอย่างศึกษา (Study samples)

B. malayi adult soluble Ag ที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาพ่นบน membrane แล้วนำมาประกอบแล้วทำการศึกษาดังที่กล่าวข้างต้น

ผลการศึกษาพบว่า Lateral flow test kit ที่ประกอบขึ้น มีความไวและความจำเพาะดี แต่ เส้นของ Test line จะจาง ไม่คมชัด ทำให้อ่านผลยาก (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ตัวอย่างพลาสมา (Plasma); เมื่อใช้แอนติเจนที่เตรียมต่างกัน; C = Control line, T = Test line; Bm1 = *B. malayi* adult soluble antigen (Ag), Bm2 = *B. malayi* adult soluble Ag,

2.1.5.2 การ characterization *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) โดย SDS-PAGE

เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสม จึงนำ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) ซึ่งวัดค่าความเข้มข้นแล้ว มา run gel โดยใช้ 12% SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis จากนั้น นำมาย้อมด้วยสี Cromassie brilliant blue เพื่อดู pattern ของ *B. malayi* adult soluble antigen

2.1.5.3 การศึกษาลักษณะของการทำปฏิกิริยาระหว่าง *B. malayi* adult soluble antigen กับ ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยโรคเท้าช้างโดยวิธี Immunoblot

เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสม จึงนำ *B. malayi* adult soluble antigen (Ag) ซึ่งวัดค่าความเข้มข้นแล้ว มา run gel โดยใช้ 12% SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis จากนั้น นำมา blot บน nitrocellulose membrane (NC) จากนั้น นำมา block ด้วย blocking buffer แล้วนำตัวอย่างพลาสมา ผู้ป่วยโรคเท้าช้าง มาทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบน NC ตามด้วย conjugate และ substrate ศึกษาลักษณะและตำแหน่งของของปฏิกิริยาเกิดขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลขนาดโมเลกุลของแอนติเจนของ soluble *B. malayi* ต่างๆซึ่งทำปฏิกิริยากับ specific antifilarial IgG4

2.1.5.4 การเตรียม partial purified *B. malayi* Ag

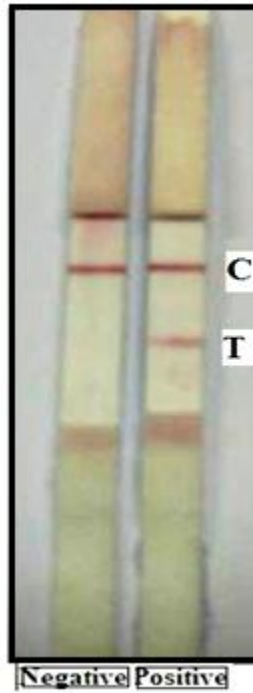
นำ *B. malayi* adult soluble antigen มา purified โดยใช้ Spine column โดยทำตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับ rapid test ต่อไป (partial purified antigen)

ผลการหาค่าโปรตีนพบว่า Crude soluble antigen 28 มิลลิกรัม ได้ purified antigen 10 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถเตรียม rapid test ได้ 10,000 tests (1 ไมโครกรัม/ test)

2.1.5.5 การใช้ Partial purified *B. malayi* Ag สำหรับ เป็นแอนติเจนสำหรับ Lateral flow test kit

นำ Partial purified *B. malayi* Ag มาพ่นบน membrane แล้วนำมาประกอบเป็น test kit ตามภาพที่ 4 โดยใช้ชนิดของ membrane, sample pad, conjugate pad, wick และ sample buffer ที่ได้จากข้อ 2.1.3, 2.1.4 จากนั้น นำมาทดสอบกับตัวอย่างศึกษา

ผลการศึกษา พบว่า Lateral flow test kit ที่ประกอบขึ้น มีความไวและความจำเพาะ ดี ได้เส้นของ Test line ที่คมชัด (ภาพที่ 10, 11)



ภาพที่ 10 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ตัวอย่างพลาสมา (Plasma);

C = Control line , T = Test line; (Test kit ที่ใช้ partial purified *B. malayi* Ag)

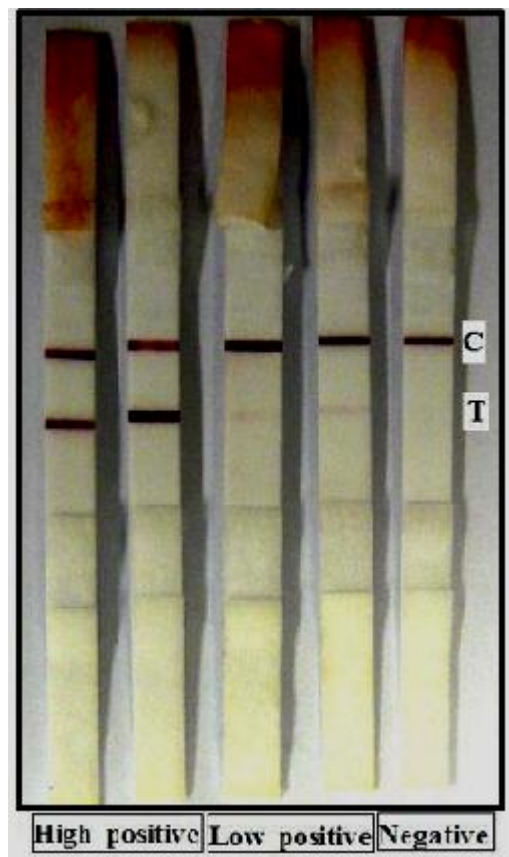


ภาพที่ 11 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ตัวอย่างพลาสมา (Plasma); เมื่อใช้ แอนติเจนที่เตรียมต่างกัน; C = Control line, T = Test line; Bm1 = *B. malayi* adult soluble antigen (Ag), Bm2 = *B. malayi* adult soluble Ag, pBm1 = partial purified *B. malayi* Ag, pBm2 = partial purified *B. malayi* Ag

2.5 การศึกษาเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (Whole blood)

เนื่องจาก pattern การ flow แบบที่ใช้ได้ผลสำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำเหลือง/พลาสมานั้น ไม่สามารถใช้กับตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ จึงได้ปรับเปลี่ยน pattern การ flow โดยเพิ่มช่องสำหรับหยดตัวอย่างเลือด (ภาพที่ 7, 8)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ Pattern ลักษณะนี้ (ภาพที่ 7, 8) จะได้ชุดตรวจสำเร็จรูปที่สามารถใช้ตัวอย่างที่เป็นเลือด (whole blood) ได้ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ตัวอย่างเลือด (whole blood);

C = Control line , T = Test line; (ใช้ partial purified *B. malayi* Ag)

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้น ในระดับห้องปฏิบัติการ

3.1 ศึกษาความไว (Sensitivity) ของ Lateral flow test ที่พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบวิธีการ

ตรวจหาไมโครฟิลาเรียโดยการย้อมฟิล์มเลือดหนา (thick blood smear) (gold standard)

3.1.1 สำหรับโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis ซึ่งมีสาเหตุจากพยาธิ *Brugia malayi* จะใช้

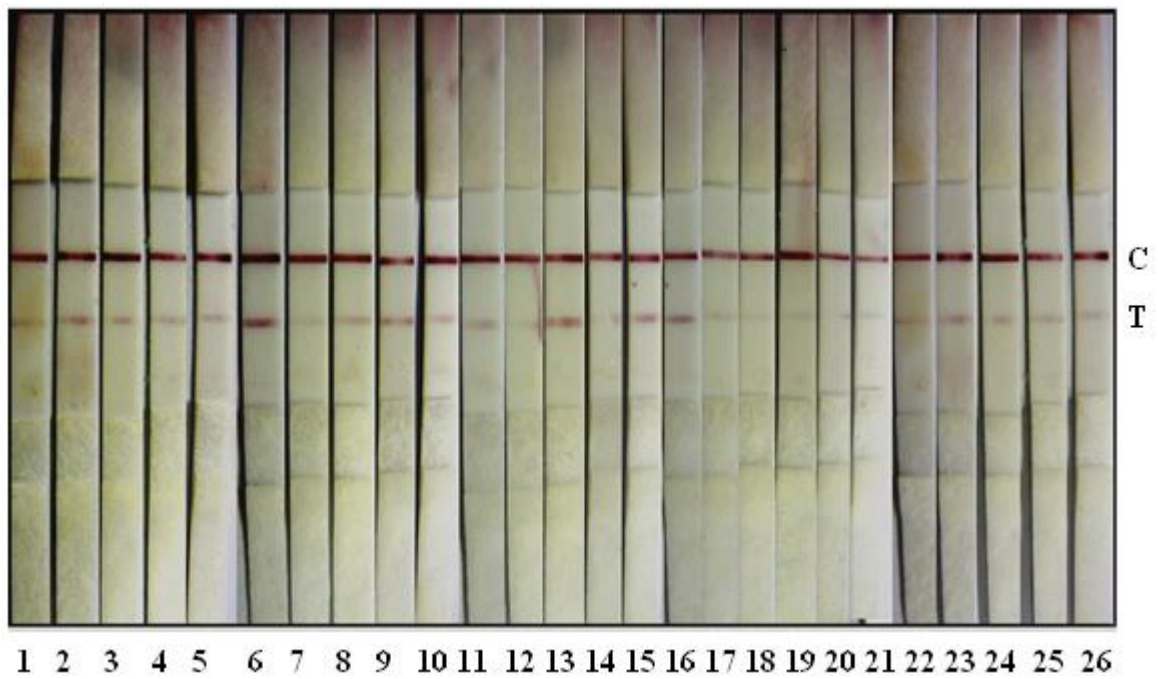
วิธีการตรวจหาไมโครฟิลาเรียโดยการย้อมฟิล์มเลือดหนา (thick blood smear) ของประชากร

ศึกษาเป็น gold standard ในการคำนวณค่า sensitivity ของชุดตรวจสำเร็จรูปต้นแบบ

ผลการศึกษาพบว่าพลาสมาจากผู้ติดเชื้อพยาธิเท้าช้างชนิด *B. malayi* ที่มีไมโครฟิ

ลาเรียในเลือดจำนวน 30 ราย ให้ผลบวกโดยวิธี Lateral flow test ที่พัฒนาขึ้น จำนวน 29 ราย

(ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ตัวอย่างผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้พลาสมาของผู้ป่วยกลุ่มที่มีไมโครฟิลาเรียในเลือด; C = Control line, T = Test line

3.2 ศึกษาความจำเพาะโดยใช้พลาสมาของคนปกติและผู้ป่วยติดเชื้อปรสิตชนิดอื่นๆ

สิ่งส่งตรวจที่ใช้คือพลาสมาของคนปกติจำนวน 50 ราย และพลาสมาจากผู้ติดเชื้อพยาธิอื่นๆ

ได้แก่ *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, Hookworm, *Strongyloides stercoralis*,

Giardia lamblia, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis hominis* จำนวน 63 ราย

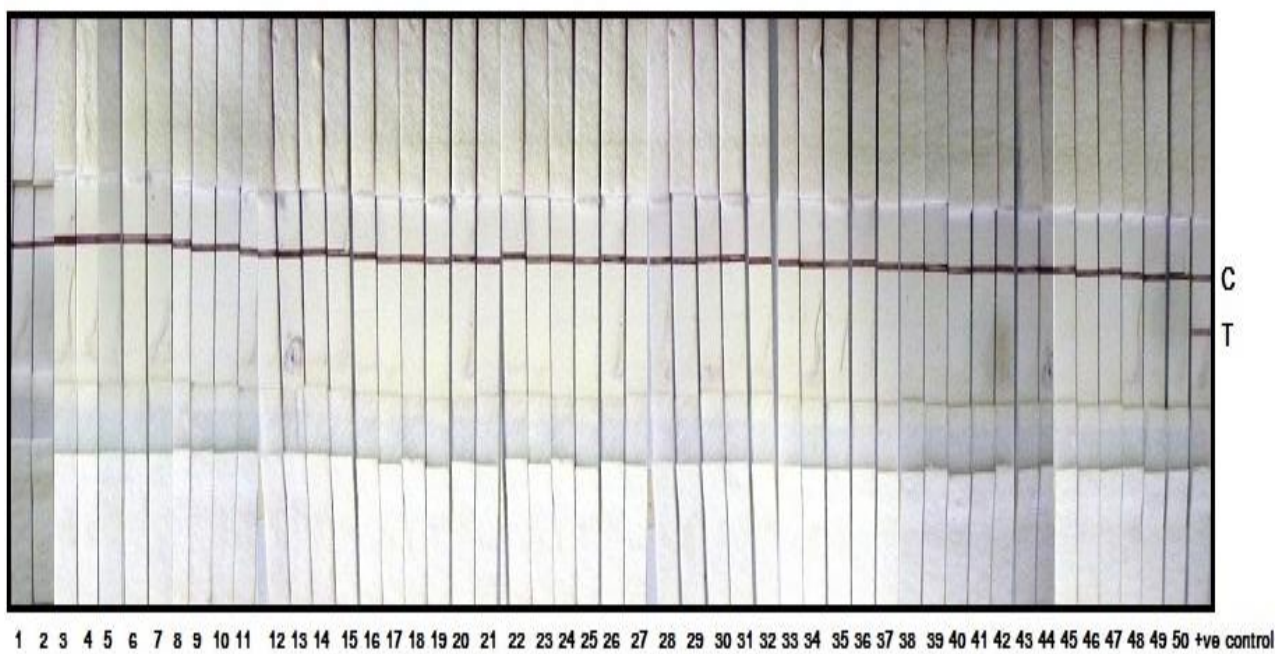
ผลการศึกษาพบว่าพลาสมาจากคนปกติที่อาศัยใน กทม. จำนวน 50 ราย ให้ผลลบ

โดยวิธี Lateral flow test kit ที่พัฒนาขึ้น (ภาพที่ 14)

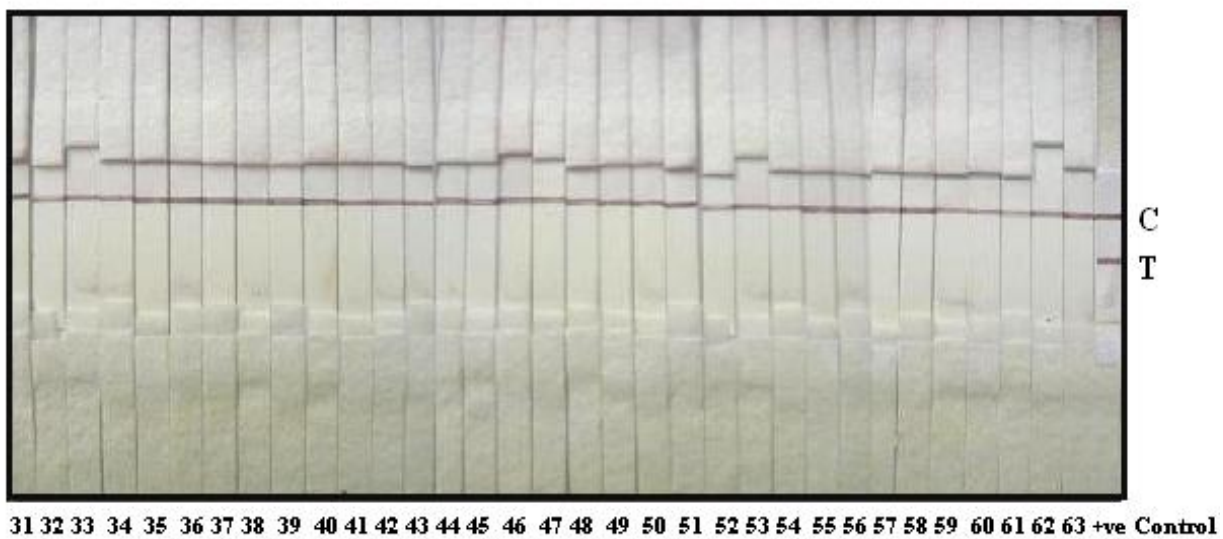
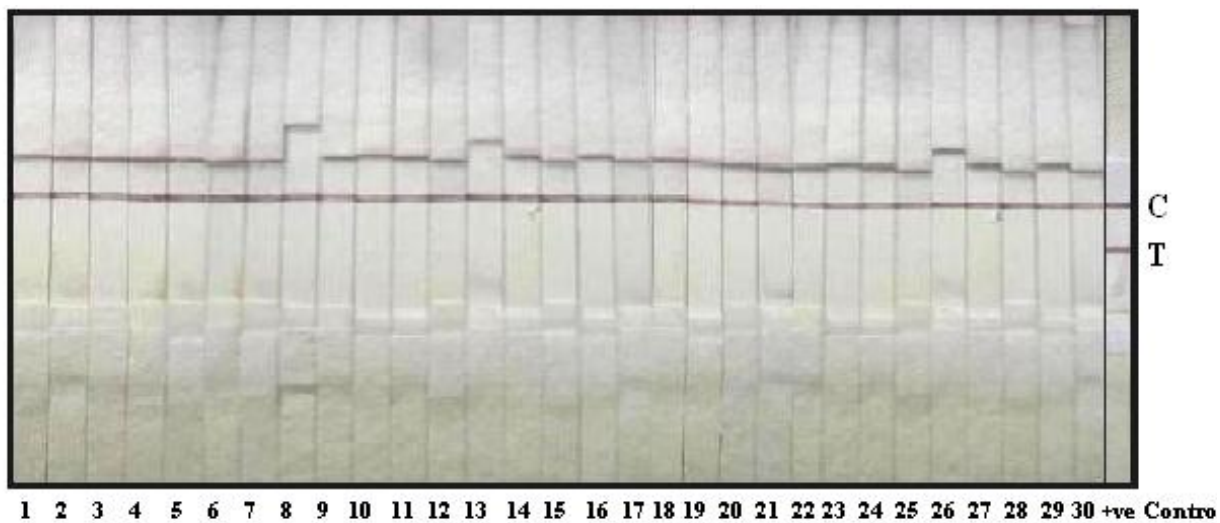
พลาสมาจากผู้ติดเชื้อพยาธิอื่นๆได้แก่ *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*,

Hookworm, *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba*

coli, เป็นต้น จำนวน 63 ราย ให้ผลลบโดยวิธี Lateral flow test kit ที่พัฒนาขึ้น (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้พลาสมา ของคนปกติ (1-50) ให้ผล negative
 ทั้ง 50 ราย C = Control line, T = Test line



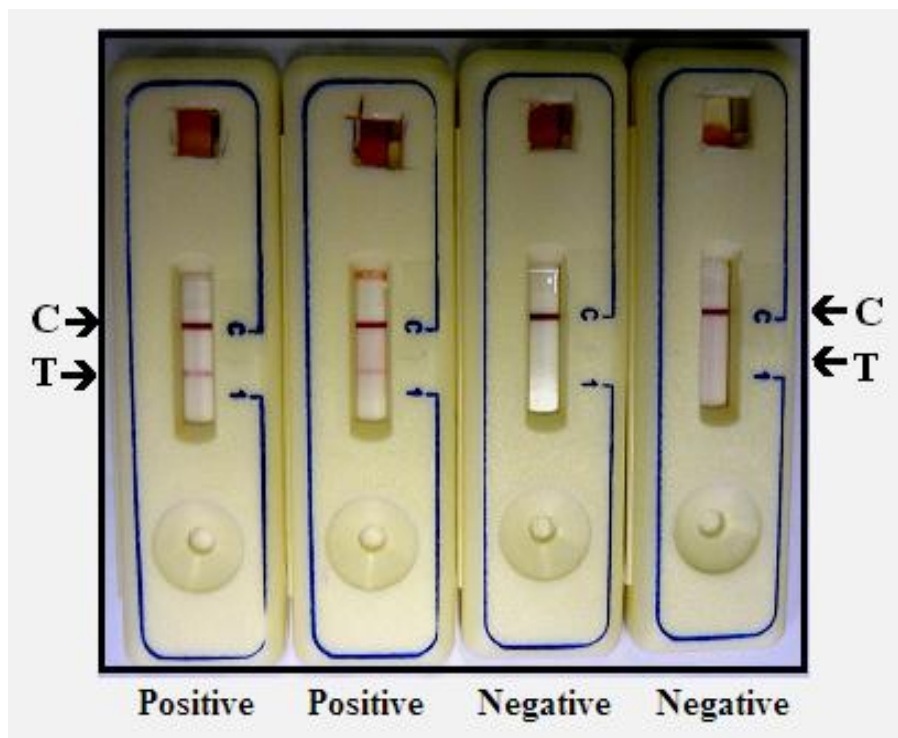
ภาพที่ 15 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้พลาสมาของผู้ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นๆ (1-63)
ให้ผล negative ทั้งหมด; C = Control line, T = Test line

4. การผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว

จากผลการศึกษา ทำให้ได้ต้นแบบของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (Rapid Test) (ภาพที่ 16) ในการผลิตชุดตรวจโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} จำนวน 2000 ชุด (ภาพที่ 17, 18, 19, 20, 21)

.1 ส่วนประกอบของชุดตรวจโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} 1 กล่อง

- ซองฟลอยด์บรรจุชุดตรวจโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} จำนวน 25 ชุด พร้อม
ไปแปดพลาสติกสำหรับดูดเลือดจากปลายนิ้วจำนวน 25 อัน
- น้ำยา Assay Buffer 1 ขวด
- เอกสารกำกับผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 16 แสดงลักษณะของ Rapid test kit สำหรับเป็นต้นแบบในการผลิตชุดตรวจแบบ

รวดเร็ว; C = Control line, T = Test line

ภาพแม่พิมพ์ตลับชุดทดสอบ PP แบบมีบานพับ



ภาพที่ 17 แม่พิมพ์ (Mold) สำหรับผลิตกล่องชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID}

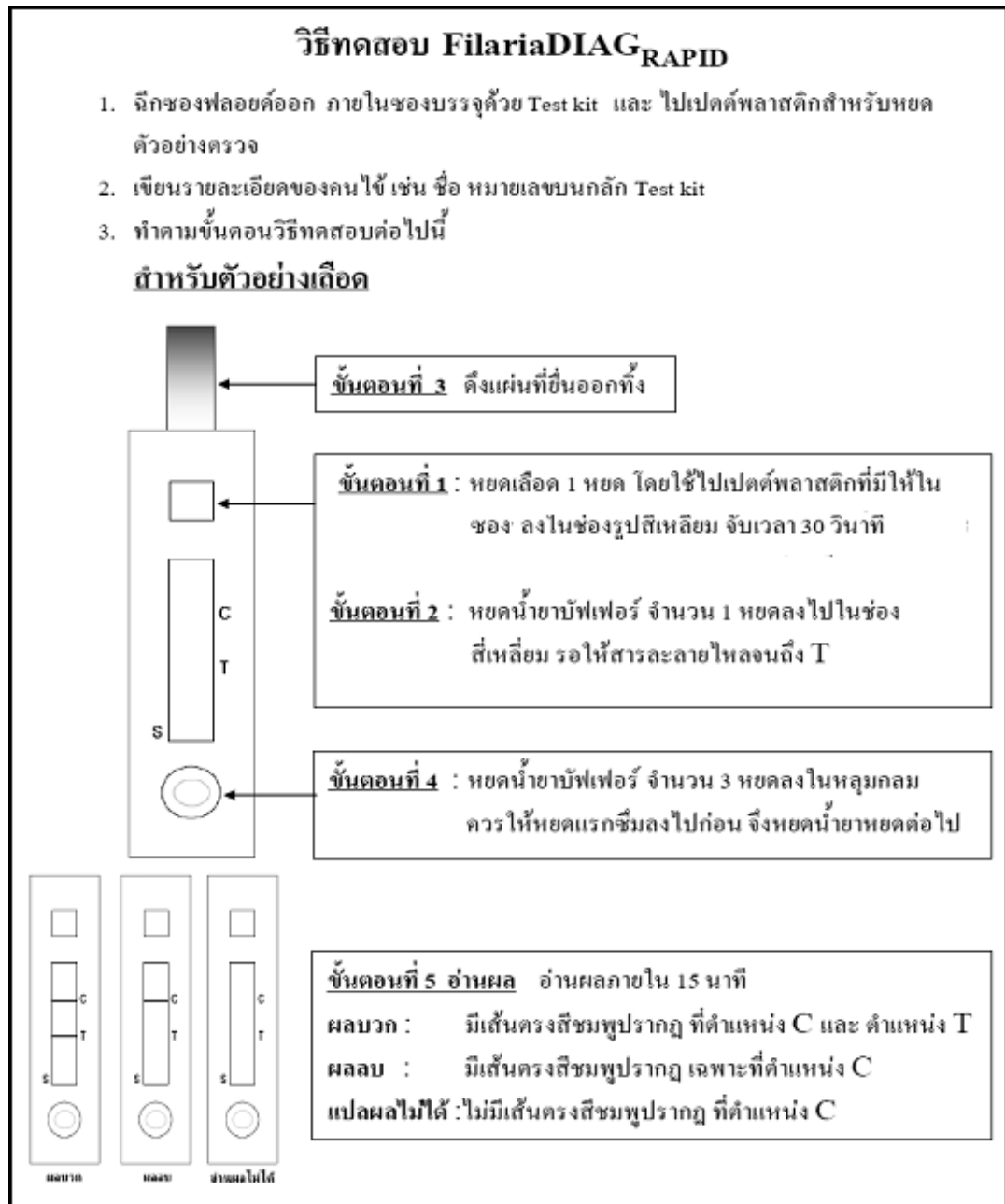
ตามต้นแบบที่ได้จากการศึกษา



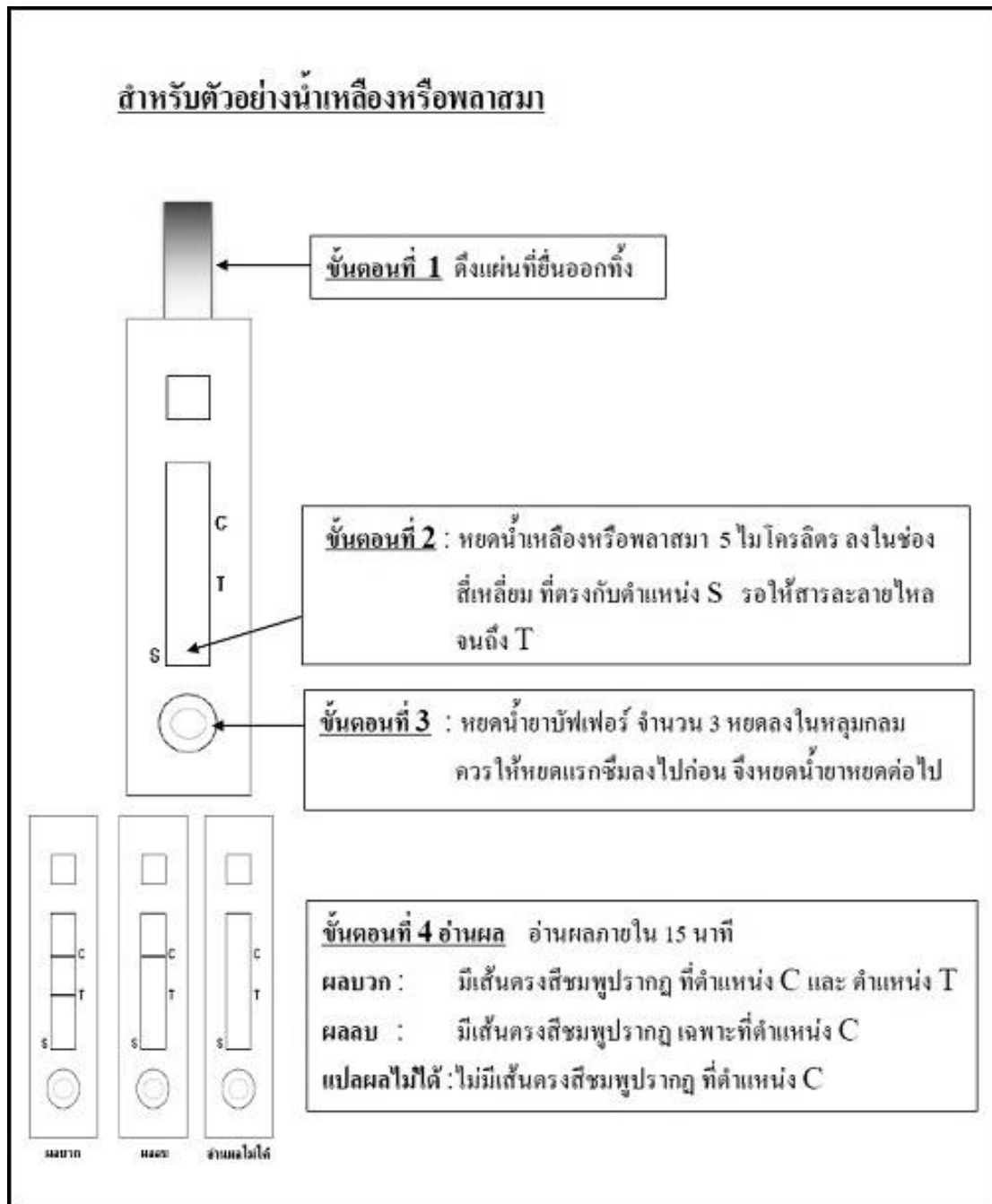
ภาพที่ 18 ภาพกล่องชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID}

ซึ่งประกอบด้วย ชุดตรวจในซองฟลอยด์ จำนวน 25 ชุด (1, 2) ปีเปตต์พลาสติก

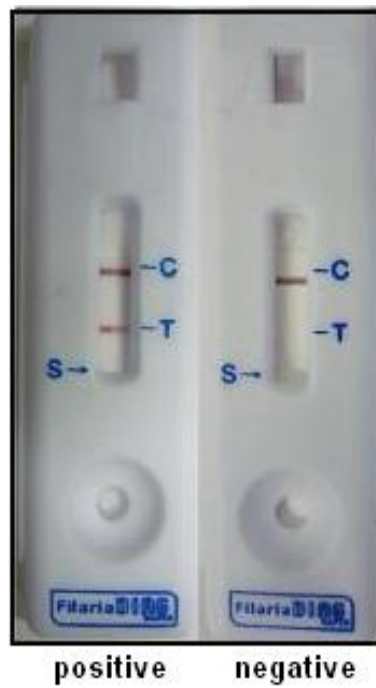
จำนวน 25 อัน (3) และน้ำยา assay buffer 1 ขวด (4)



ภาพที่ 19 เอกสารกำกับผลิตภัณฑ์ (Leaflet) ของ ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} (แผ่นที่ 1)



ภาพที่ 20 เอกสารกำกับผลิตภัณฑ์ (Leaflet) ของ ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} (แผ่นที่ 2)



ภาพที่ 21 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 ด้วยชุดตรวจแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อเท้าช้างและตัวอย่างเลือดของคนปกติ; C = Control line , T = Test line; Positive จะขึ้นแถบชมพูทั้งที่ C และ T; Negative จะขึ้นแถบสีชมพูเฉพาะที่ C

4.2 เปรียบเทียบคุณลักษณะของ Test kit ที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นกับ test kit ที่จำหน่ายใน ท้องตลาด ซึ่งผลิตจากต่างประเทศ

คณะผู้วิจัยได้เปรียบเทียบคุณลักษณะของ Test kit ที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นกับ rapid test kit ของ
ต่างประเทศ (panLFRAPID) จากคู่มือการใช้งาน (ตารางที่ 1, ภาพที่ 22, 23)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณลักษณะของ FilariaDIAG_{RAPID} กับ test kit ของต่างประเทศ (panLFRAPID)

Test kit ที่พัฒนาขึ้น (FilariaDIAG _{RAPID})	Test kit ของต่างประเทศ (panLFRAPID)
■ ใช้งานง่าย แผลผล่ง่าย สะดวกในการนำไปใช้ในภาคสนาม เพราะสามารถเก็บชุดตรวจที่อุณหภูมิห้อง และใช้เลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว*	■ ใช้งานง่าย แผลผล่ง่าย แต่อาจยังไม่สะดวกในการนำไปใช้ในภาคสนาม เนื่องจากต้องปั่นแยกน้ำเหลืองหรือพลาสมาเพื่อนำมาทดสอบ
■ เวลาในการตรวจ 15 นาที	■ เวลาในการตรวจ 15 นาที
■ สิ่งส่งตรวจที่สามารถใช้คือ ☒ serum หรือ plasma จำนวน 5 ไมโครลิตร* ☒ เลือด (whole blood) จำนวน 1 หยด (20-25 ไมโครลิตร)*	■ สิ่งส่งตรวจที่สามารถใช้คือ ☒ serum หรือ plasma จำนวน 25 ไมโครลิตร
■ สำหรับตรวจหา antifilarial IgG4 เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเท้าช้างทั้งชนิด <i>Brugia malayi</i> และ <i>Wuchereria bancrofti</i>	■ สำหรับตรวจหา antifilarial IgG4 เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเท้าช้างชนิด <i>Brugia malayi</i>, <i>Brugia timori</i> และ <i>Wuchereria bancrofti</i>
■ เจาะเลือดเวลาใดก็ได้	■ เจาะเลือดเวลาใดก็ได้
■ ราคา 65 บาท / ชุด*	■ ราคา 150 บาท / ชุด



ภาพที่ 22 ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ ยี่ห้อ panLFRAPID



MALAYSIAN BIO-DIAGNOSTICS RESEARCH SDN. BHD.
Block Intron-Ekson, UKM-MTDC
Smart Technology Centre
43650 Bangi, Selangor
Malaysia

panLF_{rapid}
(A NEW INNOVATIVE TEST FOR DIAGNOSIS OF
LYMPHATIC FILARIASIS)

INTENDED USE

For the detection of specific IgG₄ antibodies to *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and/or *Brugia timori* in **human serum or plasma**. It is intended to be used as *in vitro* diagnostic of lymphatic filariasis. The results obtained should only be interpreted in conjunction with other diagnostic results and clinical information.

INTRODUCTION

Lymphatic filariasis is caused by three species of blood worms: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori*. One hundred and twenty million people in 83 countries of the world are infected with lymphatic filarial parasites, and it is estimated that more than 1 billion (20% of the world's population) are at risk of acquiring the infection. Ninety percent of these infections are caused by *Wuchereria bancrofti* (<http://www.filaria.org>).

The disease is transmitted by several species of mosquitoes. Infective larvae from the mosquito enter the human through the puncture wound made by the insect. The larvae then travel to lymphatic channels and lymph nodes and develop into adult worms.

Infection with *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori* will result in symptoms and manifestations that may include recurrent fever, lymphatic damage, renal damage, adenolymphangitis, lymphoedema, hydrocoele (only in *W. bancrofti* infection), elephantiasis and pulmonary disease.

Specific recombinant filarial genes have been expressed, purified and incorporated into an immunochromatography-based rapid test in a cassette format called panLF_{rapid} for the detection of specific IgG₄ to *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and/or *Brugia timori*.

PRINCIPLE OF TEST

panLF_{rapid} is an indirect solid-phase immunochromatographic assay. Specific recombinant antigens are immobilized on cellulose nitrate membrane strip (at B and C). When the test sample is added to the sample pad, it migrates upwards. If specific antibodies are present in the test sample (serum/plasma), it forms an antibody-antigen complex with the immobilized antigen(s) at the test window zone(s). The bound antibody-antigen complexes are subsequently detected by a dye conjugated anti-human IgG₄ when the chase buffer is added and it migrates downward, giving a pink-purple colour. The control line (at A) contains goat anti-mouse IgG antibody which binds with the mouse anti-human IgG₄-dye conjugate. The control band serves as an indication of proper migration plus reagent (mouse anti-human IgG₄-dye conjugate) control.

KIT COMPONENTS

1. panLF_{rapid} cassettes (25 pcs). Each test is packed in individually sealed aluminum pouch. Store at 2°C-25°C.
2. Chase buffer. Store at 2°C-25°C.
3. Instruction manual - 1 copy.

STORAGE INSTRUCTIONS

1. Store test cassettes at 2°C-25°C. The test cassettes should be kept sealed until use.

SAFETY PRECAUTIONS

1. Autoclave all used and contaminated materials at 121°C, 15 p.s.i. for 30 minutes before disposal. Alternatively, decontaminate materials in 5% sodium hypochlorite solution for 30-60 minutes before disposal in biohazard waste-bags.
2. Wipe any spills of sera or plasma promptly with 1% sodium hypochlorite solution.

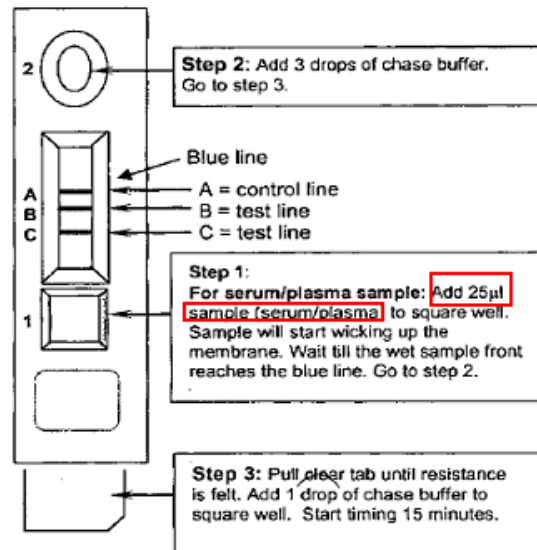
ASSAY PROCEDURE

Important : Strict adherence to the assay procedure will ensure optimal assay performance. Deviations from the procedure may lead to aberrant results.

Note : Allow the test cassettes to warm to room temperature before use. If precipitates are noted in the chase buffer reagent, shake the bottle vigorously and allow the reagent to warm up further.

1. Open the pouch by cutting the sealed side of the pouch.
2. Label the test device with the sample name.
3. Proceed with the assay procedures as diagrammed below.

Diagrammatic Representation of Assay Procedure

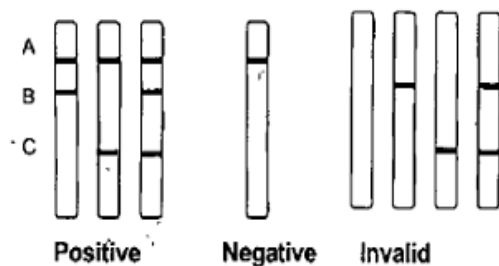


QUALITY CONTROL

1. Positive and negative controls are not included.
2. Blue line contains a blue dye which is the only line visible before running the assay. The line will disappear at the end of the assay.
3. If the control line at position A does not become visible, the test is invalid. Positive samples will have additional coloured band(s) at positions B and/or C.

ภาพที่ 23 เอกสารประกอบ (Leaflet) ของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว จากต่างประเทศ ซึ่งเป็นการตรวจหา antifilarial IgG4 เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Brugia malayi*, *Brugia timori* และ *Wuchereria bancrofti* โดยใช้สิ่งส่งตรวจคือซีรัมหรือพลาสมา (แผ่นที่ 1)

INTERPRETATION OF RESULTS



1. **Positive** for either or/and *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori* specific antibodies if coloured bands appear at the Control line (A) and Test line(s) at B, C or both B & C as shown in the diagram above. Any intensity of band should be considered as positive
2. **Negative** for *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori* specific antibodies if only the Control line (A) is visible through the viewing window.
3. **Invalid** if the Control line (A) is absent. If this occurs, the assay should be repeated using a new test cassette.

TECHNICAL NOTES

Performing the test procedure

When serum or plasma sample is added to the square well of the test cassette, usually the sample will start wicking up the membrane almost immediately. However, if the sample is not flowing smoothly up the membrane, it is suggested that the cassette be tapped gently on the table/bench to assist the sample in flowing up the membrane.

Benefits:

- Results in 15 minutes
- No special equipment is needed
- Results are easy to interpret
- Sample collected any time of the day can be used
- No sample preparation
- Small volume (25 µl) of sample used
- 95-100% sensitivity
- 100% specificity

Acknowledgement:

Device and methods covered under U.S. Patent 6316205 owned by Genelabs Diagnostics Pte. Ltd.

REFERENCES

1. Lammie PJ *et al.* Recombinant antigen-based antibody assays for the diagnosis and surveillance of lymphatic filariasis – a multicenter trial. *Filaria Journal* 2004, 3:9
<http://www.filariajournal.com/content/3/1/9>
2. P. Fischer *et al.* Detection of filarial-specific IgG4 antibodies and filarial DNA, for the screening of blood spots for *Brugia timori*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2005;99(1): 53-60
3. Jamail M *et al.* Field validation of sensitivity and specificity of rapid test for the detection of *Brugia malayi* infection. *Tropical Medicine and International Health* 2005; 10(1):99-104
4. T. Supali *et al.* Detection of IgG4 antibodies using Brugia Rapid test in individuals from an area highly endemic for *Brugia timori*. *Acta Tropica* 2004;90 (3): 255-261
5. Rahmah, N *et al.* Multicentre laboratory evaluation of Brugia Rapid dipstick test for the detection of brugian filariasis. *Tropical Medicine and International Health* 2003; 8 : 895-900
6. N. Rahmah *et al.* Specificity and sensitivity of a rapid test (Brugia Rapid) in the detection of *Brugia malayi* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*; 2001, 95: 601-604.

TECHNICAL CONSULTATION

Call or write:
Malaysian Bio-Diagnostics Research Sdn. Bhd
Block Intron-Ekson, UKM-MTDC
Smart Technology Centre
43650 Bangi, Selangor
Malaysia

Tel : 603-89261205/06/07
Fax : 603-89261810
Email : info@mbdr.com.my
Website : www.mbdr.com.my

ภาพที่ 24 เอกสารประกอบ (Leaflet) ของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว จากต่างประเทศ ซึ่งเป็นการตรวจหา antifilarial IgG4 เพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Brugia malayi*, *Brugia timori* และ *Wuchereria bancrofti* โดยใช้สิ่งส่งตรวจคือซีรัมหรือพลาสมา (แผ่นที่ 2)

4.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยชุดตรวจ FilariaDIAG (ELISA) และ FilariaDIAG_{RAPID} (Lateral Flow)

จากการเปรียบเทียบผลของชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้น กับผลการตรวจของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบ ELISA (FilariaDIAG) ในพลาสมาของประชากรศึกษาที่อาศัยในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด *Brugia malayi* ในจังหวัดนราธิวาส และแรงงานชาวพม่า จำนวน 216 ราย ซึ่งให้ผลบวกโดย FilariaDIAG จำนวน 48 รายและให้ผลลบจำนวน 168 ราย พบว่าให้ผลบวกโดย FilariaDIAG_{RAPID} 48 ราย และให้ผลลบจำนวน 168 ราย (ตารางที่ 6)

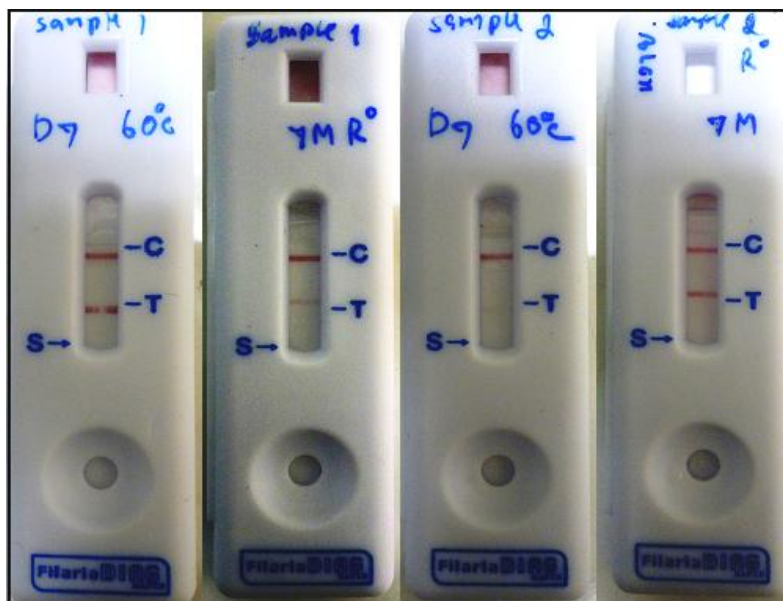
4.4 ศึกษา stability ของ test kit

4.4.1 เก็บ test kit ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) ระยะเวลาตั้งแต่ผลิตเสร็จจนถึงสิ้นสุดโครงการ เป็นเวลานาน 11 เดือน (มิถุนายน 2554 – ธันวาคม 2555)

ผลการทดสอบพบว่า test kit ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องยังมีสภาพดีและให้ผลการตรวจวินิจฉัยและความเข้มของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 25)

4.4.2 เก็บ test kit ที่อุณหภูมิ 60°C ระยะเวลา 7 วัน

ผลการทดสอบพบว่า test kit ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องยังมีสภาพดีและให้ผลการตรวจวินิจฉัยและความเข้มของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ชุดตรวจ FilariaDIAG_{RAPID} ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆคือ ที่ 60°C จำนวน 7 วัน และเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 7 เดือน

5 การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วในภาคสนาม

ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็วที่ผลิตขึ้น จะนำไปประเมินประสิทธิภาพในภาคสนาม ในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis คือแหล่งระบาดในจังหวัดนราธิวาส และ bancroftian filariasis ได้แก่ชาวพม่าที่อาศัยอยู่ในจังหวัดราชบุรีและกทม.

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} ในประชากรศึกษากลุ่มต่างๆ

5.1 การศึกษา Prevalence ของ antifilarial IgG4 ในกลุ่มประชากรศึกษาคือประชาชนที่อาศัยในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis โดยใช้สูตร $\text{Prevalence} = \% \text{ positive cases} / \text{total studied population}$

เจ้าหน้าที่ของโครงการปราบปรามโรคติดต่อและการสาธารณสุข ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ จังหวัดนราธิวาส เป็นผู้รับผิดชอบนำชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว “FilariaDIAG_{RAPID}” ไปใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเท้าช้าง ในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis ในกลุ่มบ้านต่างๆ ในอำเภอตากใบ อำเภอสุนทรวิชัย และอำเภอเจาะไอร้อง (ตารางที่ 3, ภาพที่ 26)

ผลการศึกษาพบว่า Prevalence ของ antifilarial IgG4 ในกลุ่มประชากรศึกษาคือประชาชนที่อาศัยในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis จังหวัดนราธิวาส จำนวน 540 ราย พบ positive อยู่ 24 ราย ซึ่งคิดเป็น 4.4% (24/540) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดประชากรศึกษา ในจังหวัดนราธิวาส

อำเภอ	ตำบล	กลุ่มบ้าน	ประชากรศึกษา (ราย)	เพศ	
				ชาย	หญิง
ตากใบ	บางขุนทอง	บางขุนทอง หมู่ 1	171	32	139
ตากใบ	บางขุนทอง	โคกหมบก หมู่ 5	137	45	92
ตากใบ	บางขุนทอง	ยูโย หมู่ 6	134	50	84
สุไหงโกทก	ปูโยะ	โต๊ะแดง หมู่ 5	38	21	17
เจาะไอร้อง	มะรือโบออก	มะรือโบออก	60	32	28
รวม			540	180	360

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดย FilariaDIAG_{DIAG} ในประชากร

ศึกษา ในจังหวัดนราธิวาส

ช่วงอายุ (ปี)	เพศ		จำนวนรวม	Antifilarial IgG4 (FilariaDIAG _{RAPID})	
	ชาย	หญิง		บวก	ลบ
1-10	53	49	102	1	101
11-20	8	34	42	1	41
21-30	12	48	60	3	57
31-40	23	70	93	2	91
41-50	19	61	80	3	77
51-60	26	60	86	7	79
61-70	19	30	49	4	45
>70	11	17	28	3	25
Total	171	369	540	24	516



ภาพที่ 26 ตัวอย่างผลการตรวจเลือดของประชาชนที่อาศัยในแหล่งระบาด ของจังหวัดนราธิวาส โดยใช้ชุดตรวจ “FilariaDIAG_{RAPID}” ที่ผลิตขึ้น (C = Control line , T = Test line) A) ตัวอย่าง positive result; B) ตัวอย่าง negative result



ภาพที่ 27 ออกภาคสนามเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว

FilariaDIAG_{RAPID} ในประชาชนผู้อาศัยในแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างชนิด *brugian*

filariasis ในจังหวัดนราธิวาส

5.2 การศึกษา Prevalence ของ antifilarial IgG4 ในกลุ่มประชากรศึกษาคือชาวพม่าที่อาศัยใน

จังหวัดราชบุรี โดยใช้สูตร $\text{Prevalence} = \% \text{ positive cases} / \text{total studied population}$

คณะผู้วิจัยร่วมกับสคร จังหวัดราชบุรี นำชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว

FilariaDIAG_{RAPID} ไปใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเท้าช้าง ในชุมชนชาวพม่า ที่อาศัยใน

ตำบลสวนผึ้งและถ้ำหิน อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี

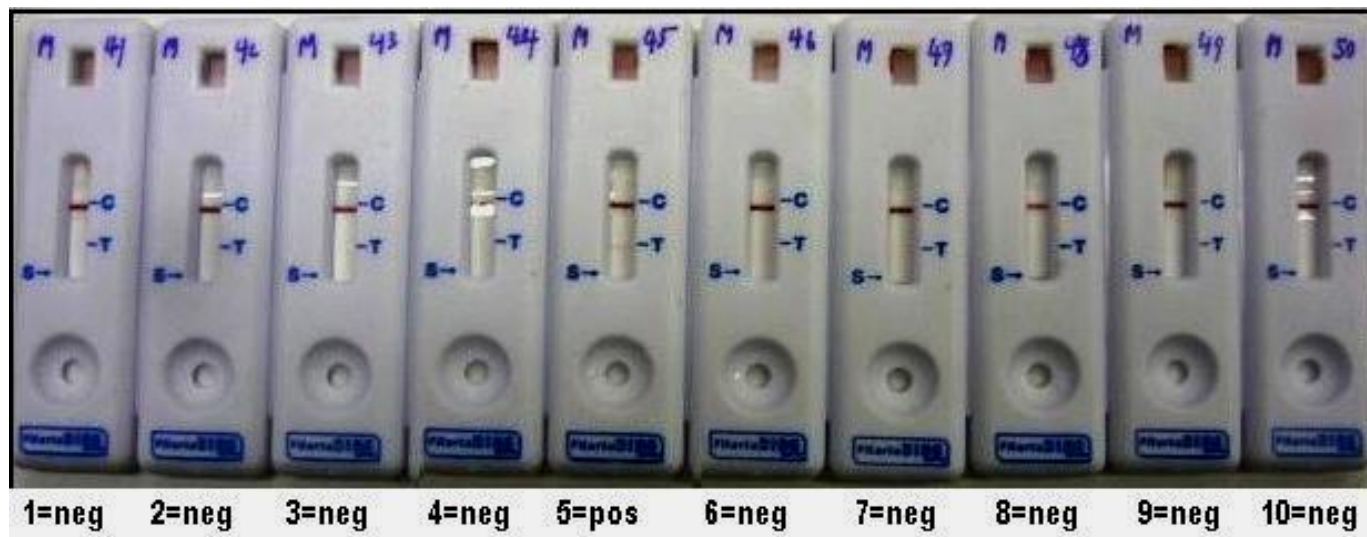
ผลการศึกษาพบว่า Prevalence ของ antifilarial IgG4 ในกลุ่มประชากรศึกษาคือชุมชน

ชาวพม่าในจังหวัดราชบุรี จำนวน 493 ราย พบ positive อยู่ 5 ราย ซึ่งคิดเป็น 1.01% (5/493)

(ตารางที่ 4, ภาพที่ 28, 29)

ตารางที่ 4 ข้อมูลเกี่ยวกับช่วงอายุและเพศและผลการตรวจแรงงานชาวพม่าที่ ตำบลสวนผึ้งและ
ถ้ำหิน อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี

ช่วงอายุ (ปี)	เพศ		จำนวนรวม	Antifilarial IgG4 (FilariaDIAG _{RAPID})	
	ชาย	หญิง		บวก	ลบ
1-10	36	36	72	0	72
11-20	36	50	86	0	86
21-30	40	62	102	1	101
31-40	36	43	79	0	79
41-50	21	39	60	0	60
51-60	24	33	57	2	55
61-70	11	10	21	2	19
>70	6	10	16	0	16
Total	210	283	493	5	488



ภาพที่ 28 ตัวอย่างผลการตรวจเลือดของชาวพม่าในจังหวัดราชบุรี โดยใช้ชุดตรวจ FilariaDIAG_{RAPID} (C = Control line , T = Test line); 1-10 = ตัวอย่างเลือด (whole blood)



ภาพที่ 29 ออกภาคสนามเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว “FilariaDIAG_{RAPID}” ในชาวพม่าที่อาศัยอยู่อำเภอสวนผึ้งและอำเภอลำหิน จังหวัดราชบุรี

**5.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเท้าช้างในผู้ใช้แรงงานชาวพม่า
จำนวน 205 คนที่อาศัยในกทม. โดยเปรียบเทียบผลการตรวจโดยวิธี knott concentration
technique และการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยชุดตรวจ FilariaDIAG_{RAPID}**

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเท้าช้างชนิด *Wuchereria bancrofti* ในแรงงานชาวพม่า
จำนวน 205 คน ซึ่งอาศัยในกรุงเทพมหานคร โดยการตรวจหาไมโครฟิลาเรียของพยาธิเท้าช้าง
ในเลือดโดยวิธี Knott concentration technique และตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ชุดตรวจ
FilariaDIAG_{RAPID}

ผลการศึกษาพบว่ามีแรงงานชาวพม่าจำนวน 6 รายซึ่งตรวจพบ antifilarial IgG4 ซึ่งคิด
เป็น 2.93% (6/205) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่า Sensitivity, Specificity, Predictive value positive, Predictive value negative ของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว (FilariaDIAG_{RAPID}) เมื่อเทียบกับ Gold standard คือวิธี thick blood smear

FilariaDIAG _{RAPID}	Thick blood smear	
	+	-
+	33	0
-	1	113
รวม	34	113

Sensitivity	=	$33/34 \times 100\%$	=	97%
Specificity	=	$113/113 \times 100\%$	=	100%
Predictive Value +VE	=	$113/113 \times 100\%$	=	100%
Predictive Value –VE	=	$113/114 \times 100\%$	=	99.1%

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจหา antifilarial IgG4 โดยใช้ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} ในประชากรศึกษากลุ่มต่างๆ

FilariaDIAG _{RAPID}	ประชากรศึกษา								รวม
	เลือดชาวพม่า ในจังหวัด ราชบุรี	เลือดแรงงาน พม่าใน กทม	ICT <i>W. bancroft</i> Ag +	เลือดที่พบไมโครฟิ ลาเรีย ของ <i>W. bancrofti</i>	เลือดผู้อาศัยใน แหล่งระบาด จังหวัดนราธิวาส	เลือดที่พบไมโครฟิ ลาเรีย ของ <i>B. malayi</i>	FilariaDIAG (ELISA) +	FilariaDIAG (ELISA) -	
+	5 (1.01%)	6 (2.93%)	6 (100%)	4 (100%)	24 (4.4%)	29 (97%)	48 (100%)	0 (0%)	122
-	488	205	0	0	516	1	0	168	1378
รวม	493	211	6	4	540	30	48	168	1500

อภิปรายและวิจารณ์ผล

ประเทศไทย โดยสำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับองค์การอนามัยโลก ได้เริ่มโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในปีค.ศ. 2002 โดยการให้ยารักษาประชาชนทุกคนที่อาศัยในแหล่งระบาดของโรค (Mass treatment) โดยให้ยา DEC ร่วมกับยา albendazole ทุกปี ติดต่อกันนาน 5 ปี ซึ่งขณะนี้เข้าสู่ระยะการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการดำเนินของโรคในแหล่งระบาดเกือบทุกแห่งยกเว้นที่จังหวัดนราธิวาส ซึ่งเป็นจังหวัดที่มี อัตราความชุกของโรคเท้าช้างสูงสุดในประเทศไทย เนื่องจากในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาด มีป่าพรุขนาดใหญ่ อยู่จึงเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงเสื่อซึ่งเป็นพาหะหลักของพยาธิ อีกทั้ง สัตว์เลี้ยงที่นิยมของประชาชนที่อาศัยอยู่ในแหล่งระบาดคือแมว ซึ่งเป็นโฮสต์กักตุนเชื้อของพยาธิฟิลาเรียชนิด *Brugia malayi* ทำให้การควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง ยังไม่บรรลุเป้าหมาย

วิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับโรคเท้าช้างชนิด brugian filariasis ที่ใช้มานานและยังคงใช้อยู่ในปัจจุบันคือการตรวจหาพยาธิฟิลาเรียระยะไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดด้วยวิธีย้อมฟิล์มเลือดแบบหนา ซึ่งมีความไวต่ำและจะต้องเจาะเลือดเวลากลางคืน เพราะพยาธิฟิลาเรียที่พบเป็นชนิด Nocturnally subperiodicity ซึ่งพยาธิระยะไมโครฟิลาเรียจะออกมาในกระแสเลือดในเวลากลางคืน ซึ่งจากสถานการณ์ความไม่สงบในจังหวัดนราธิวาส ในปัจจุบัน จึงเป็นอุปสรรคในการออกเจาะเลือดในเวลากลางคืน ทำให้โครงการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้างในจังหวัดนี้ ไม่สามารถบรรลุเป้าหมาย

จากการที่ สิริจิต วงศ์กำชัยและคณะ (Wongkamchai et al; 2006; Jiraamonnimit et al., 2009) ได้พัฒนาวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจหา antifilarial IgG4 เพื่อการวินิจฉัยการติดโรคเท้าช้างขึ้น ซึ่งสามารถตรวจทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีมีความไวและความจำเพาะสูง และใช้เลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว (finger prick blood) จึงสามารถเจาะเลือดโดยอาสาสมัครในพื้นที่ที่ผ่านการฝึกฝนได้

และที่สำคัญคือสามารถเจาะเลือดเวลากลางวันก็ได้ และงานวิจัยดังกล่าวได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติซึ่งมีค่าการอ้างอิงสูง และได้นำผลผลิตที่ได้จากการศึกษาวิจัย มาต่อยอดโดยพัฒนาให้เป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปต้นแบบขึ้น (FilariaDIAG) พร้อมกับศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูป FilariaDIAG ที่พัฒนาขึ้น อย่างไรก็ตาม "ชุดตรวจโรคเท้าช้าง FilariaDIAG ที่พัฒนาสำเร็จแล้ว เป็นชุดตรวจที่เหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถตรวจได้ทั้งเชิงปริมาณ (Quantitative) และเชิงคุณภาพ (Qualitative)

คณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายที่จะขยายผลการวิจัยต่อ โดยพัฒนาให้เป็นชุดตรวจสำเร็จรูปแบบรวดเร็ว รู้ผลภายใน 15 นาที เพื่อจะได้สามารถนำไปใช้ได้ในระดับชุมชน โดยเจ้าหน้าที่อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) สามารถดำเนินการตรวจด้วยตนเอง พร้อมกับศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นนี้ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและนำไปใช้จริงในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคเท้าช้าง เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตชุดตรวจสำเร็จรูปในเชิงพาณิชย์ (commercial test kit) เพื่อใช้ในจังหวัดที่มีแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างอยู่ โดยเฉพาะจังหวัดนครราชสีมา หรือใช้ในพื้นที่แหล่งระบาดที่อยู่ในระยะการเฝ้าระวังและติดตามการดำเนินของโรค ตลอดจนใช้การเฝ้าระวังในแรงงานต่างด้าวชาวพม่า

จากการศึกษาความไวของชุดตรวจ โดยใช้การตรวจหาไมโครฟิลาเรีย เป็น Gold standard พบว่า ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} ที่พัฒนาขึ้นมีความไวสูง (ความไว 97%) และจากการศึกษาความจำเพาะของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น ในผู้ป่วยที่ติดโรคพยาธิชนิดอื่นๆ ซึ่งอาศัยอยู่นอกแหล่งระบาดของโรคเท้าช้าง พบว่ามีความจำเพาะสูง (100%)

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี FilariaDIAG (ELISA version) กับ FilariaDIAG_{RAPID} พบว่าให้ผลการตรวจวินิจฉัยตรงกัน และเมื่อนำพลาสมาของผู้ที่มีแอนติเจนต่อ *Wuchereria bancrofti* โดยวิธี ICT

card test พบว่า ตรวจพบ antifilarial IgG4 ด้วย แสดงว่าชุดตรวจ FilariaDIAG_{RAPID} มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ ELISA และสามารถชี้แทนการตรวจหาแอนติเจน ในผู้ติดเชื้อเท้าช้างชนิด *Wuchereria bancrofti* ได้

ดังนั้นชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้น จึงสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในการติดเชื้อพยาธิ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi*

จากการออกประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} ในแหล่งระบาด ในจังหวัดนราธิวาส พบว่าประชาชนให้ความสนใจที่จะตรวจ เพราะสามารถทราบผลการตรวจทันที และเห็นด้วยตนเองว่าติดเชื้อหรือไม่ โดยสังเกตว่ามีแถบสีชมพูขึ้น 1 หรือ 2 แถบ (ข้อมูลจากเจ้าหน้าที่ศูนย์ศึกษาเพื่อการพัฒนาพิกุลทอง อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ) จึงมีผลต่อความสำเร็จของโครงการควบคุมและปราบปรามโรคเท้าช้าง

ข้อดีของชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปแบบรวดเร็ว (FilariaDIAG_{RAPID}) ที่พัฒนาขึ้นนี้ คือสามารถตรวจวินิจฉัยโดยเจาะเลือดตรวจเวลาใดก็ได้ ตามความสะดวกของผู้ใช้งาน ไม่ว่าจะเป็นเวลากลางวันหรือกลางคืนก็ได้ การที่ใช้เลือดจำนวนน้อยในการตรวจวินิจฉัย จึงสามารถเจาะจากปลายนิ้ว วิธีใช้งานง่าย รู้ผลตรวจภายใน 15 นาที จึงสะดวก และมีข้อดีคือ เมื่อตรวจพบการติดเชื้อ ก็ให้ยารักษาได้ทันที (one stop service) แต่ถ้าใช้วิธี thick blood smear staining หรือ FilariaDIAG ต้องนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ เมื่อพบผู้ติดเชื้อ เจ้าหน้าที่ต้องตามไปจ่ายยารักษาในภายหลัง และเนื่องจากชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้ เก็บที่อุณหภูมิห้อง จึงสะดวกในการขนส่ง การนำไปใช้ในภาคสนาม หรือในที่ๆ ไม่มีตู้เย็นสำหรับเก็บน้ำยา

นอกจากนี้ ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปแบบรวดเร็ว (FilariaDIAG_{RAPID}) สามารถตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยกลุ่มติดเชื้อที่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย (amicrofilaremic cases) ได้ด้วย ซึ่งถ้าใช้วิธีการตรวจหาตัวเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะตรวจไม่พบ และการที่ชุดตรวจแบบรวดเร็ว ใช้งานง่ายและอ่านผลง่าย จึงสามารถฝึกฝนให้อาสาสมัครสาธารณสุข ประจำหมู่บ้าน เป็นผู้ดำเนินการตรวจวินิจฉัยเอง โดยเลือกดำเนินการในช่วงเวลาที่

อสม. และประชาชนสะดวก ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพของให้โครงการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง โดยเฉพาะของจังหวัดนราธิวาส ซึ่งยังมีเหตุการณ์ความไม่สงบอยู่

ปัจจุบันแม้มีชุดตรวจสำเร็จรูปแบบรวดเร็วสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อเท้าช้าง จำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งสามารถตรวจในเวลากลางวันได้แต่เป็นสินค้าจากต่างประเทศ ปัญหาของชุดตรวจสำเร็จรูปคือมีราคาแพง นอกจากนี้ ชุดตรวจสำเร็จรูปแบบรวดเร็วสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อเท้าช้างซึ่งเป็นสินค้าจากต่างประเทศที่ใช้ในงานในลักษณะเดียวกัน คือสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเท้าช้างทั้งชนิด *Wuchereria bancrofti* หรือ *Brugia malayi* จะต้องใช้สิ่งส่งตรวจคือซีรัมหรือพลาสมา ซึ่งทำให้ยังไม่สะดวกในการนำไปใช้ในภาคสนาม เนื่องจากหลังเจาะเลือดแล้ว ต้องนำเลือดมาปั่นแยกซีรัมหรือพลาสมา ในขณะที่ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างแบบรวดเร็ว FilariaDIAG_{RAPID} ที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นนั้น สามารถใช้กับสิ่งส่งตรวจทั้งชนิดที่เป็นเลือด หรือซีรัม หรือพลาสมาได้ ทำให้สะดวก เหมาะที่จะนำไปใช้ในภาคสนาม เพราะสามารถตรวจได้จากเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วโดยตรง

ในด้านราคา ชุดตรวจสำเร็จรูป FilariaDIAG_{RAPID} ที่พัฒนาขึ้นนี้จะมีราคาถูกกว่าชุดตรวจสำเร็จรูปจากต่างประเทศที่จำหน่ายในท้องตลาด และเป็นผลิตภัณฑ์ของต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพงมาก

กองโรคเท้าช้าง กระทรวงสาธารณสุขโดยความร่วมมือจากองค์การอนามัยโลก มีภารกิจเร่งด่วนในการควบคุมกำจัดโรคพยาธิฟิลาเรียให้หมดไปจากประเทศ โดยให้การรักษาประชาชนทุกคนในหมู่บ้านที่เป็นแหล่งการระบาดของโรค โดยการรักษาประชาชนในแหล่งระบาดด้วยยา DEC และ albendazole (Mass treatment) ทุกปีต่อเนื่องนาน 5 ปี ซึ่งในการควบคุมกำจัดนี้ จำเป็นจะต้องมีการประเมินผลของโครงการฯ และการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการดำเนินของโรคในแหล่งระบาด ดังนั้นชุดตรวจสำเร็จรูปต้นแบบที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงมีประโยชน์ในการ ตรวจค้นหาผู้ติดเชื้อ ใช้ประเมิน ติดตามผลการควบคุมและการกำจัดโรคเท้าช้างในแหล่งระบาดทางภาคใต้ของไทยได้ โดยเฉพาะในจังหวัดนราธิวาสซึ่งมีอุปสรรคจากปัญหาเหตุการณ์ความไม่สงบ ทั้งนี้เพื่อให้

บรรลุวัตถุประสงค์ในการควบคุมกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปจากประเทศไทย นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปต้นแบบ สามารถนำไปเป็นแนวทางในการผลิตชุดตรวจสำเร็จรูปในเชิงพาณิชย์ (commercial test kit) เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียได้จริง โดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง ในจังหวัดที่มีแหล่งระบาดของโรคเท้าช้างอยู่ อันจะช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชากรที่อาศัยในแหล่งระบาดต่อไป อีกทั้งยังสามารถประหยัดงบประมาณในการนำเข้าชุดตรวจสำเร็จรูปจากต่างประเทศ และเป็นการเสริมสร้างความแข็งแกร่งและพัฒนาศักยภาพของงานวิจัยของประเทศไทย เพื่อให้สอดคล้องกับแนวทางเศรษฐกิจแบบพึ่งพาตนเอง ซึ่งเป็นความจำเป็นเร่งด่วนสำหรับประเทศไทยในขณะนี้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดีคือ

1. มีประสิทธิภาพสูง โดยมี Sensitivity 97%, Specificity 100% , Positive Predictive Value 100%, Negative Predictive Value 99.1%
2. Prevalence ของ brugian filariasis ในแหล่งระบาดในจังหวัดนราธิวาส = 4.4%, prevalence ของ bancroftian filariasis ในชาวพม่าในจังหวัดราชบุรี = 1.01%, prevalence ของ bancroftian filariasis ในแรงงานชาวพม่าในกทม. = 2.93%
3. สามารถตรวจวินิจฉัยโดยเจาะเลือดตรวจเวลาใดก็ได้ ตามความสะดวกของผู้ใช้งาน ไม่ว่าจะเป็นเวลากลางวันหรือกลางคืนก็ได้
4. วิธีการตรวจวินิจฉัยไม่ยุ่งยาก อ่านผลง่าย ใช้เลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว ซึ่งเจาะได้ง่าย สะดวกสามารถใช้งานโดยอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านได้
5. สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ และเนื่องจากทราบผลการตรวจภายใน 15 นาที ดังนั้น จึงสามารถให้การรักษาได้ทันที เมื่อตรวจพบการติดเชื้อ (one stop service) จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง
6. สามารถตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อเท้าช้างได้ แม้จะมีจำนวนเชื้อในกระแสเลือดน้อย ซึ่งตรวจไม่พบด้วยวิธีการย้อมสีฟิล์มเลือดหนา
7. สามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อโรคเท้าช้างได้ทั้งในการติดเชื้อพยาธิ *Wuchereria bancrofti* ซึ่งพบในแรงงานชาวพม่าและ *Brugia malayi* ซึ่งพบแหล่งระบาดทางภาคใต้ของประเทศไทย
8. กำลังดำเนินการจดสิทธิบัตร

หน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. กระทรวงสาธารณสุข เพื่อนำไปใช้โดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการปราบปรามและควบคุมโรค
เท้าช้าง
2. โรงพยาบาลต่างๆที่รับผิดชอบตรวจสอบสุขภาพแรงงานต่างด้าวชาวพม่า
3. ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลศิริราช เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างในผู้ป่วยทั้งในและนอก
โรงพยาบาล
4. ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อใช้สนับสนุนการเรียนการสอนนักศึกษาหลักสูตรก่อน
ปริญญาเช่นนักศึกษาแพทย์ นักศึกษาอายุรเวช หลักสูตรหลังปริญญา เช่นแพทย์ประจำบ้าน แพทย์
ต่อยอด นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอก ตลอดจนการฝึกอบรมบุคลากรจากทั้งในและ
ต่างประเทศ

ข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจสำเร็จรูปต้นแบบนี้ สามารถนำไปผลิตเชิงพาณิชย์ เพื่อให้ได้ชุดตรวจสำเร็จรูปที่ราคาถูกลงกว่าชุด
ตรวจสำเร็จรูปที่นำเข้าจากต่างประเทศ

บรรณานุกรม

1. Tsieh S. Lymphatic filariasis In: Parasitic disorders: Pathology, diagnosis and management.-2nd ed. William & Wilkins Publishing; USA 1998; 265-72.
2. <http://www.filariasis.org>. Lymphatic filariasis.
3. <http://www.who.int/ctd>. Eliminating lymphatic filariasis.
4. Weil GJ, Ramzy RM. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. *Trends Parasitol* 2007; 23: 78-82.
5. Annual Report, Bureau of Vector Borne Diseases, Ministry of Public Health, 2001.
6. Wamae CN, Robert JM, Eberhard ML, Lam,ie PJ. Kinetics of circulating human IgG4 after diethylcarbamazine and ivermectin treatment of bancroftian filariasis. *J Infect Dis* 1992; 165: 1158-60.
7. Atmadja AK, Atkinson R, Sartono F, Yazdanbakhsh M, Maizels RM. Differential decline in filaria-specific IgG1, IgG4 and IgE antibodies in *Brugia malayi* infected patients after diethylcarbamazine chemotherapy. *J Infectious Dis* 1995; 172: 1567-72.
8. Wongkamchai S, Rochjanawatsiriroj C, Monkong N, Nochot H, Loymek S, Jiraamornnimit C, Hunnangkul S, Choochote W. Diagnostic value of IgG isotype responses against *Brugia malayi* antifilarial antibodies in the clinical spectrum of brugian filariasis. *J Helminthol*. 2006; 80:363-7.
9. Chaubaud AG, Anderson RC. Nouvel essai de classification des filaries (Superfamilies des filarioidea) II. *Annals de Parasitologie* 1959; 34: 64-87.

10. WHO Technical Report Series: No. 603. Geographical distribution of major filariasis. 1977.
11. เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ ใน ‘การประชุมเชิงปฏิบัติการเพื่อกำหนดแนวทางในการดำเนินงานกำจัดโรคเท้าช้าง’ จัดโดยกองโรคเท้าช้าง, 2544
12. Annual Report, Filaria Division, 2000.
13. Hawking F. The 24-hour periodicity of microfilaria biological mechanisms responsible for its production and control. Proc R Soc London Ser B 1967; 169: 56-76.
14. Hawking F, Pattanayak S, Sharma HL. The periodicity of microfilariae. XI. The effect of body temperature and other stimuli upon the cycles of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. ceylonensis* and *Dirofilaria repens*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1966;60(4):497-513.
15. Cook GC. ‘Filariasis’ In: Manson’s Tropical diseases 20th ed. WB Saunders Company Publish, London, Philadelphia 1996; 1321-1328.
16. Wang EJ, Saz HJ. Comparative biochemical studies of *Litomosoides carinii*, *Dipetalonema viteae*, and *Brugia pahangi* adults. J Parasitol 1974; 60: 316-321.
17. Dondero TJ, Jr, Sivanandam S. Diurnally sub-periodic microfilarial pattern in *Brugia malayi* in West Malaysia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1971; 65: 691-693.
18. Guptavanij P, Harinasuta C, Sucharit S, Vutikes S. Studies on sub-periodic *Brugia malayi* in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1971; 2: 44-50.
19. Faust E, Russell P. ‘Phasmid nematode parasites of man’ In: Craig and Faust's clinical parasitology 1964; 451-454.

20. Edward KM, Marietta V, David TJ. 'The blood and tissue dwelling nematodes' In: Medical Parasitology 7th ed. W.B. Saunders Company Publish 1992; 294-298.
21. Nanduri J, Kazura JW. Clinical and Laboratory Aspects of Filariasis. Clin Micro Reviews 1989; 2: 39-50.
22. Leeuwin RS 1962. Microfilaremia in Surinamese living in Amsterdam. Trop Geogr Med 14: 355-60.
23. Vickery AC, Albertine KH, Nayar JK, Kwa BH. Histopathology of *Brugia malayi*-infected nude mice after immune-reconstitution. Acta Trop 1991; 49: 45-55.
24. Von-Lichtenberg F. the Wellcome Trust Lecture. Inflammatory responses to filarial connective tissue parasites. Parasitology 1987; 94 (Suppl) S101-22.
25. Dreyer G, Ottesen EA, Galdino E, Andrade L, Rocha A, Medeiros Z, Moura I, Cassimiro MI, Beliz MF, Coutinho A. Renal abnormalities in microfilaremic patients with bancroftian filariasis. Am J Trop Med Hyg 1992; 46: 745-751.
26. Dissanayake S. In *Wuchereria bancrofti* filariasis, asymptomatic microfilaraemia does not progress to amicrofilaraemic lymphatic disease. Int J Epidemiol 2001; 30: 394-399.
27. กวีเจริญลาก “โรคพยาธิฟิลาเรีย” ใน โรคเมืองร้อน นิภา จรุงเวสม์ บรรณาธิการ พิมพ์ครั้งที่ 2 พิมพ์ที่ โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์, 2534.
28. Lal R, Ottesen E. Enhanced diagnostic specificity in human filariasis by IgG4 antibody assessment. J Infect Dis 1988; 158: 1034-8.
29. Melrose W, P. Turner P, P. Pisters P, Turner B. An improved Knott's concentration test for the detection of microfilariae. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 176.

30. Chanteau S, Glaziou P, Plichart C, Luquiaux P, Moulia-Pelat J, Cartel J. *Wuchereria bancrofti* filariasis in French Polynesia: age-specific patterns of microfilaraemia, circulating antigen, specific IgG and IgG4 responses according to transmission level. *Int J Parasitol* 1995; 25: 81–5.
31. Terhell AJ, Haarbrink M, Abadi K, Bronneberg D, Tieleman M, Asri M, Yazdanbakhsh M. A filter paper technique for the detection of anti-filarial IgG4 in lymphatic filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 196–8.
32. Turner P, Copeman D, Gerisi D, Speare R. A comparison of the Og4C3 antigen capture ELISA, the Knott test, and IgG4 test and clinical signs in the diagnosis of Bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol* 1993; 44: 45–8.
33. Dreyer G, Noroes J, Amaral F, Nen A, Medeiros Z, Coutinho A, Addiss D. Direct assessment of the adulticidal efficacy of a single dose of ivermectin in bancroftian filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 441-443.
34. WHO Lymphatic filariasis: the disease and control 1992.
35. Ottesen EA, Vijayasekaran V, Kumaraswami V, Perumal Pillai SV, Sadanandam A, Frederick S, Prabhakar R, Tripathy SPA. Controlled trial of ivermectin and diethylcarbamazine in lymphatic filariasis. *N Engl J Med* 1990; 322: 1113-1117.
36. Ottesens EA, Campbell WC. Ivermectin in human medicine. *J Antimicrob Chemotherapy* 1994; 34: 195-203.

ภาคผนวก

กิจกรรมที่ได้ดำเนินการระหว่างการรับทุนวิจัยได้แก่

นพ. สุวิทย์ ธรรมปาโล ผู้ร่วมโครงการวิจัย ถวายรายงานสมเด็จพระเทพรัตนราชกุมารี เรื่อง “ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปแบบรวดเร็ว” วันที่ 21 กันยายน 2554 เนื่องในวโรกาสที่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จพระราชดำเนินทรงติดตามงานควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง ณ สำนักงานโครงการงานควบคุมปราบปรามโรคติดต่อและการสาธารณสุข ศูนย์ศึกษาเพื่อการพัฒนา พิภูลทอง อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดนราธิวาส (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 30 นพ. สุวิช ธรรมปาโล ผู้ร่วมโครงการวิจัย ถวายรายงานสมเด็จพระเทพรัตนราชกุมารี เรื่อง
“ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสำเร็จรูปแบบรวดเร็ว” วันที่ 21 กันยายน 2554

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ - นามสกุล	(ภาษาไทย)	ดร. สิริจิต วงศ์กำชัย
	(ภาษาอังกฤษ)	Dr. Sirichit Wongkamchai
ตำแหน่งปัจจุบัน		รองศาสตราจารย์
		หัวหน้าสาขาวิชาพยาธิตัวกลม
		ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ม. มหิดล

2 ถนนพหลโยธิน บางกอกน้อย กทม. 10700

โทรศัพท์ 024196468 โทรสาร 024112084

E-mail : siswk@mahidol.ac.th

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่สำเร็จการศึกษา	ชื่อสถาบันศึกษา
PhD.	2546	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม. มหิดล
MSc.	2528	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม. มหิดล
BSc.	2526	คณะเทคนิคการแพทย์ ม. มหิดล
DAP & E (Distinction)	2538	Institute of Medical Research , Malaysia

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Immunology and molecular biology of parasite and arthropods

ผลงานวิจัยตีพิมพ์

1. **Wongkamchai S**, Chiangjong W, Sinchaikul S, Chen ST, Choochote W, Thongboonkerd V. Identification of *Brugia malayi* immunogens by an immunoproteomics approach. *J Proteomics*. 2011; 74:1607-13.
2. Satimai W, Jiraamonnimit C, Thammapalo S, Choochote W, Luene P, Boitano JJ, **Wongkamchai S.*** The impact of a national program to eliminate lymphatic filariasis in selected Myanmar immigrant communities in Bangkok and Ranong province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011; 42: 1054-64.
3. **Wongkamchai S**, Khongtak P, Leemingsawat S, Komalamisra N, Junsong N, Kulthanan K, Wisuthsarewong W, Boitano JJ. Comparative identification of protein profiles and major allergens of saliva, salivary gland and whole body extracts of mosquito species in Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2010 Jun-Sep; 28 (2-3): 162-9.
4. Kulthanan K, **Wongkamchai S**, Triwongwaranat D. Mosquito allergy: Clinical features and natural course. *J Dermatol*. 2010; 37: 1025-31.
5. Jiraamonnimit C, **Wongkamchai S,*** Boitano J, Nochot H, Loymek S, Chujun S, Yodmek S. A cohort study on anti-filarial IgG4 and its assessment in good and uncertain MDA-compliant subjects in brugian filariasis endemic areas in southern Thailand. *J Helminthol*. 2009; 83:351-60.
6. **Wongkamchai S**, Vaiyavatjamai P, Wanachiwanawin D, Wisuthsarewong W, Kulthanan K, Eakpo P. A dot-blot and immuno-blot assay for the detection of mosquito saliva specific IgE in mosquito bite allergic subjects. *J Dermatol Sci*. 2009; 53: 155-7.

7. **Wongkamchai S**, Techasintana P, Wisuthsarewon W, Kulthanan K, Suthipinittharm P, Eakpo P. Analyzing of IgE-binding allergens in *Cx. quinquefasciatus* saliva protein in mosquito bite allergic subjects. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2007; 98: 200-1.
8. **Wongkamchai S**, Rochjanawatsiriroj C, Monkong N, Nochot H, Loymek S, Jiraamornnimit C, Hunnangkul S, Choochote W. Diagnostic value of IgG isotype responses against *Brugia malayi* anti-filarial antibodies in the clinical spectrum of brugian filariasis. *Journal of Helminthology* 2006; 80: 363-7.
9. **Wongkamchai S**, Rongsriyam K, Mahakittikun V, Nochot H, Sermsart B, Choochote C, Kanjanopart K. Efficacy of various synthetic pyrethroid impregnated fabrics against house dust mite under laboratory conditions. *Experimental and applied acarology* 2005; 35: 293-300.
10. Wanachiwanawin D, **Wongkamchai S**, Loymek S, Suvutho S, Monkong N, Chinabutra P, Eamsobhana P. Determination of fecal occult blood in primary schoolchildren infected with *Trichuris trichiura*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 1110-3.
11. Loymek S, **Wongkamchai S**, Kob-asa T, Choochote W, Monkong N, Chitnabut P, Onrochanakul J, Suvutho S, Sermsart B. Impact of filariasis control programme on intestinal helminthic infection, A pilot study in Narathiwat province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004; 35: 65-70.

ประวัติผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-นามสกุล	(ภาษาไทย)	นพ. วิชัย สติมัย
	(ภาษาอังกฤษ)	Dr. Wichai Satimai
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้อำนวยการ สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง	
สถานที่ทำงาน	สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข	
โทรศัพท์/โทรสาร	0 2590 3115/ 0 2591 8434	
e-mail address		
ชื่อ-นามสกุล	(ภาษาไทย)	นพ. สุวิธ ธรรมปาโล
	(ภาษาอังกฤษ)	Dr. Suvit Thammapalo
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๒	
สถานที่ทำงาน	สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๒ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข อ. เมือง จังหวัดสงขลา	
โทรศัพท์	0870898866	
e-mail address	sthammapalo@yagoo.com	

ชื่อ-นามสกุล	(ภาษาไทย)	นางสาว สุมาศ ลอยเมฆ
	(ภาษาอังกฤษ)	Miss Sumas Loymek
ตำแหน่งปัจจุบัน		หัวหน้าโครงการงานควบคุมปราบปรามโรคติดต่อและการสาธารณสุข
สถานที่ทำงาน		ศูนย์ศึกษาเพื่อการพัฒนาพิภพทองอันเนื่องมาจาก พระราชดำริ ตำบลกะรุณเหนือ อ. เมือง จ. นราธิวาส
โทรศัพท์/โทรสาร		073950335
e-mail address		sumark23@yahoo.co.th
ชื่อ-นามสกุล	(ภาษาไทย)	นางชูวิวรรณ จิระอมรนิมิต
	(ภาษาอังกฤษ)	Mrs. Chuvevan Jiraamonnimit
ตำแหน่งปัจจุบัน		นักวิชาการ 8
สถานที่ทำงาน		สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวง สาธารณสุข
โทรศัพท์/โทรสาร		0 2590 3115 / 0 2591 8434
e-mail address		Chuvy12@yahoo.com
ที่อยู่ (ที่บ้าน)		56/47 ถ.ติวานนท์ 32 อ. เมือง จ. นนทบุรี
โทรศัพท์		0 2950 6566

ชื่อ-นามสกุล	(ภาษาไทย)	ศ. เวช ชูโชติ
	(ภาษาอังกฤษ)	Professor Wej Choochote
ตำแหน่งปัจจุบัน		ศาสตราจารย์
สถานที่ทำงาน		ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
โทรศัพท์/โทรสาร		053-945342-5/ 053-217144
e-mail address		wchoocho@mail.med.cmu.ac.th
ผลงานวิจัยตีพิมพ์		

1. Joshi D, Kim JY, **Choochote W**, Park MH, Min GS. Preliminary vivax malaria vector competence for three members of the Anopheles hyrcanus group in the Republic of Korea. J Am Mosq Control Assoc. 2011 Sep;27(3):312-4.
2. Wongkamchai S, Chiangjong W, Sinchaikul S, Chen ST, **Choochote W**, Thongboonkerd V. Identification of Brugia malayi immunogens by an immunoproteomics approach. J Proteomics. 2011 Aug 24;74(9):1607-13.
3. Joshi D, Park MH, Saeung A, **Choochote W**, Min GS. Multiplex assay to identify Korean vectors of malaria. Mol Ecol Resour. 2010 Jul;10(4):748-50.
4. **Choochote W**. Evidence to support karyotypic variation of the mosquito, Anopheles pedtaeniatus in Thailand. J Insect Sci. 2011;11:10.
5. Thongsahuan S, Baimai V, Junkum A, Saeung A, Min GS, Joshi D, Park MH, Somboon P, Suwonkerd W, Tippawangkosol P, Jariyapan N, **Choochote W**. Susceptibility of Anopheles campestris-like and

- Anopheles barbirostris species complexes to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in Thailand. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Feb;106(1):105-12.
6. Sutthanont N, **Choochote W**, Tuetun B, Junkum A, Jitpakdi A, Chaithong U, Riyong D, Pitasawat B. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and -resistant strains of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol. 2010 Jun;35(1):106-15.
 7. Riyong D, Waikagul J, Panasoponkul C, **Choochote W**, Ito A, Dekumyoy P. Size and charge antigens of Dirofilaria immitis adult worm for IgG-ELISA diagnosis of bancroftian filariasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010 Mar;41(2):285-97.
 8. Jariyapan N, Baimai V, Poovorawan Y, Roytrakul S, Saeung A, Thongsahuan S, Suwannamit S, Otsuka Y, **Choochote W**. Analysis of female salivary gland proteins of the Anopheles barbirostris complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. Parasitol Res. 2010 Aug;107(3):509-16.
 9. Thanchomnang T, Intapan PM, Lulitanond V, Sangmaneeet S, Chungpivat S, Taweethavonsawat P, **Choochote W**, Maleewong W. Rapid detection of Dirofilaria immitis in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. Vet Parasitol. 2010 Mar 25;168(3-4):255-60.
 10. Joshi D, **Choochote W**, Min GS. Short report: Natural hybrid between Anopheles kleini and Anopheles sinensis. Am J Trop Med Hyg. 2009 Dec;81(6):1020-2.

11. Thongsahuan S, Baimai V, Otsuka Y, Saeung A, Tuetun B, Jariyapan N, Suwannamit S, Somboon P, Jitpakdi A, Takaoka H, **Choochote W**. Karyotypic variation and geographic distribution of *Anopheles campestris*-like (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(4):558-66.
12. Joshi D, **Choochote W**, Park MH, Kim JY, Kim TS, Suwonkerd W, Min GS. The susceptibility of *Anopheles lesteri* to infection with Korean strain of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2009 Mar 12;8:42.
13. Park MH, **Choochote W**, Kim SJ, Somboon P, Saeung A, Tuetan B, Tsuda Y, Takagi M, Joshi D, Ma Y, Min GS. Nonreproductive isolation among four allopatric strains of *Anopheles sinensis* in Asia. *J Am Mosq Control Assoc*. 2008 Dec;24(4):489-95.
14. Suwannamit S, Baimai V, Otsuka Y, Saeung A, Thongsahuan S, Tuetun B, Apiwathnasorn C, Jariyapan N, Somboon P, Takaoka H, **Choochote W**. Cytogenetic and molecular evidence for an additional new species within the taxon *Anopheles barbirostris* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Parasitol Res*. 2009 Mar;104(4):905-18. Epub 2008 Nov 29.
15. Tuetun B, **Choochote W**, Pongpaibul Y, Junkum A, Kanjanapothi D, Chaithong U, Jitpakdi A, Riyong D, Wannasan A, Pitasawat B. Field evaluation of G10, a celery (*Apium graveolens*)-based topical repellent, against mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Chiang Mai province, northern Thailand. *Parasitol Res*. 2009 Feb;104(3):515-21.
16. Tuetun B, **Choochote W**, Pongpaibul Y, Junkum A, Kanjanapothi D, Chaithong U, Jitpakdi A, Riyong D, Pitasawat B. Celery-based topical repellents as a potential natural alternative for personal protection against mosquitoes. *Parasitol Res*. 2008 Dec;104(1):107-15.

17. Thongwat D, Morgan K, O'Loughlin SM, Walton C, **Choochote W**, Somboon P. Crossing experiments supporting the specific status of *Anopheles maculatus* chromosomal form K. J Am Mosq Control Assoc. 2008 Jun;24(2):194-202.
18. Ishii Y, **Choochote W**, Bain O, Fukuda M, Otsuka Y, Takaoka H. Seasonal and diurnal biting activities and zoonotic filarial infections of two *Simulium* species (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand. Parasite. 2008 Jun;15(2):121-9.
19. Thanchomnang T, Intapan PM, Lulitanond V, **Choochote W**, Manjai A, Prasongdee TK, Maleewong W. Rapid detection of *Brugia malayi* in mosquito vectors using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. Am J Trop Med Hyg. 2008 Mar;78(3):509-13.
20. Saeung A, Baimai V, Otsuka Y, Rattanarithikul R, Somboon P, Junkum A, Tuetun B, Takaoka H, **Choochote W**. Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* Form A (Diptera:Culicidae) in Thailand. Parasitol Res. 2008;102:499-507.
21. Saeung A, Otsuka Y, Baimai V, Somboon P, Pitasawat B, Tuetun B, Junkum A, Takaoka H, **Choochote W**. Cytogenetic and molecular evidence for two species in the *Anopheles barbirostris* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. Parasitol Res. 2007; 101:1337-44.
22. **Choochote W**, Chaithong U, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Tuetun B, Champakaew D, Pitasawat B. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. Fitoterapia. 2007; 78:359-64.

23. Jariyapan N, **Choochote W**, Jitpakdi A, Harnnoi T, Siriyasatein P, Wilkinson MC, Junkum A, Bates PA. Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles dirus B* (Diptera: Culicidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007 49:5-10.
24. Pitasawat B, Champakaew D, **Choochote W**, Jitpakdi A, Chaithong U, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Tippawangkosol P, Riyong D, Tuetun B, Chaiyasit D. Aromatic plant-derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*. 2007;78:205-10.
25. Jariyapan N, Takaoka H, **Choochote W**, Poovorawan Y, Otsuka Y, Jitpakdi A, Junkum A. Morphology and electrophoretic protein profiles of female salivary glands in four Oriental black fly species (Diptera: Simuliidae). *J Vector Ecol*. 2006;31:406-11.
26. Wongkamchai S, Rochjanawatsiriroj C, Monkong N, Nochot H, Loymek S, Jiraamornnimit C, Hunnangkul S, **Choochote W**. Diagnostic value of IgG isotype responses against *Brugia malayi* antifilarial antibodies in the clinical spectrum of brugian filariasis. *J Helminthol*. 2006; 80:363-7.
27. Jariyapan N, **Choochote W**, Jitpakdi A, Harnnoi T, Siriyasatein P, Wilkinson MC, Bates PA. A glycine- and glutamate-rich protein is female salivary gland-specific and abundant in the malaria vector *Anopheles dirus B* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2006;;43:867-74.
28. Kamsuk K, **Choochote W**, Chaithong U, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Riyong D, Pitasawat B. Effectiveness of *Zanthoxylum piperitum*-derived essential oil as an alternative repellent under laboratory and field applications. *Parasitol Res*. 2007;100:339-45.

29. Chaithong U, **Choochote W**, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Chaiyasit D, Champakaew D, Tuetun B, Pitasawat B. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol. 2006 ;31:138-44.
30. Chaiyasit D, **Choochote W**, Rattanachanpichai E, Chaithong U, Chaiwong P, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Riyong D, Pitasawat B. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. Parasitol Res. 2006 ;99:715-21.
31. **Choochote W**, Chaiyasit D, Kanjanapothi D, Rattanachanpichai E, Jitpakdi A, Tuetun B, Pitasawat B. Chemical composition and anti-mosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol. 2005;30:302-9.