

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างด้วยวิธีนาโนเทคโนโลยี
(Nanodetection of lymphatic filariasis)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2557

โดย

อาจารย์ ดร. วิวรรณ ธรรมประเสริฐ

ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง สุรางค์ นุชประยูร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เจริญผพันธุ์

หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง และโรคเขตร้อน

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557 ขอขอบคุณ ผู้ใหญ่บ้านในพื้นที่ต่างๆ ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือด และขอขอบคุณ นางสาวอุทัยทิพย์ บุญเกษม นางสาวสิริพร ศรีรุ่งเรือง นางสาวรุ่งฟ้า บุญเสริม นางสาวนิตยา ศรีไชยพล นางสาวราตรี ชูอ่อน นางสาวปนัดดา จินตะน้อย นางสาวนฤมล ชัยพัฒน์ นางสาววรรณ ชูศรีจันทร์ นางสาวอุทัยรัตน์เกิดแก้ว เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างภาคสนามและการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ

บทคัดย่อ

โรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis) เกิดจากหนอนพยาธิ 2 ชนิดหลัก คือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ทางองค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไปภายในปี พ.ศ. 2563 โดยมีแนวทางหลักในการควบคุมและป้องกันโรคเท้าช้างคือการทำให้มีโปรแกรมการรักษาแบบหมุนเวียนประชากรในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคสูง และการควบคุมพยาธิภาวะ ทั้งนี้ โครงการกำจัดโรคเท้าช้างขององค์การอนามัยโลกได้กำหนดเป้าหมายในการควบคุมโรคให้มีอัตราความชุกของการติดเชื้อเหลืออยู่ร้อยละ 1 จากการตรวจแอนติเจนที่จำเพาะหรือร้อยละ 0.2 เมื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการประเมินผลการสำเร็จของโครงการจำเป็นต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่มีความไวสูง เพื่อสามารถประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของโรคได้ ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่มีขายในปัจจุบัน สามารถวินิจฉัยได้เฉพาะโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* ยังไม่มีชุดตรวจที่มีความไวสูงสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก *B. malayi* การศึกษานี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง โดยตรวจหาแอนติเจนและ/หรือแอนติบอดีต่อแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ตรวจพบได้ในพยาธิฟิลาเรียเท่านั้น และตรวจพบทั้งในพยาธิ *W. bancrofti* และ *B. malayi* เพื่อนำมาพัฒนาชุดตรวจที่สามารถวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้ทั้งสองชนิด และไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตชนิดอื่นๆ ทั้งนี้จากการทบทวนวรรณกรรมผู้วิจัยได้คัดเลือกแอนติเจน 2 ชนิด ซึ่งเป็นแอนติเจนที่มีปริมาณมากที่สุดของแบคทีเรีย และมีความเป็นแอนติเจนสูง ได้แก่ *Wolbachia* Surface Protein (WSP) และ peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) โดยผลการศึกษาในปีแรกนี้ ได้ทำการสกัด โปรตีนจากแบคทีเรียโวลบาเซียที่แยกจากหนอนพยาธิหัวใจสุนัข และผลิต recombinant antigen ทั้งสองชนิด ตลอดจนผลิต polyclonal anti-*Wolbachia* antibodies, polyclonal anti-rWSP antibodies และ polyclonal anti-rPAL antibodies พร้อมทั้งทำการแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ เพื่อทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโน (AuNPs) และนำมาติดกับแอนติบอดีเพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง ชนิด lateral flow strip ต่อไป

นอกจากนี้ ยังได้ทำการสำรวจโรคเท้าช้างในแรงงานชาวพม่า ในจังหวัดสมุทรสาคร และชาวกะเหรี่ยงกับชาวมอญในจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเป็นแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง โดยการเจาะเลือดในเวลากลางวัน สามารถรวบรวมอาสาสมัครได้จำนวนทั้งสิ้น 142 ราย อย่างไรก็ตาม จากการตรวจวินิจฉัยโดยชุดตรวจวินิจฉัย Og4C3 ELISA และตรวจหาไมโครฟิลาเรียกระแสเลือด ไม่พบการติดเชื้อโรคเท้าช้างในอาสาสมัครทั้ง 142 ราย ผู้วิจัยจึงได้รวบรวมตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคเท้าช้างจากโครงการก่อนหน้า ซึ่งสามารถรวบรวมได้ทั้งสิ้น 195 ตัวอย่าง ขณะนี้ผู้วิจัยอยู่ระหว่างการรวบรวมตัวอย่างผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น เพื่อนำตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคเท้าช้าง คนปกติในพื้นที่ชุกชุมของโรค และผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น มาทดสอบความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ lateral flow strip ต่อไป

Abstract

Lymphatic filariasis, caused by *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*, is targeted to be eliminated globally as a public health problem by the year 2020. The main intervention tool employed by the national elimination program is mass drug administration (MDA) to endemic populations, and control of morbidity. The criterion for elimination program was set at a prevalence rate below 1% antigenemia (Ag), or below 0.2% microfilaraemia. However, diagnostic tools with high sensitivity are needed to evaluate the real situation of the disease to sustain success in lymphatic filariasis elimination. Diagnostic test kits are available only for lymphatic filariasis caused by *W. bancrofti*. There are no diagnostic kits commercially available for *B. malayi* infection. In this study, we developed a diagnostic test kit by detecting *Wolbachia* antigen and/or specific antibodies against *Wolbachia* antigens. *Wolbachia* is bacterium found only in filarial nematodes (both *W. bancrofti* and *B. malayi*). Therefore, this test kit can be used in diagnosis for both *W. bancrofti* and *B. malayi* infections without cross-reaction with other parasites. We selected 2 candidate *Wolbachia* antigens to develop the diagnostic test kit, including *Wolbachia* Surfactant Protein (WSP) and peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL). From a proteomic study of *Wolbachia* of *B. malayi*, WSP and PAL are the most abundant and highly immunogenic antigens. In the first year of the study, we extracted *Wolbachia* from *Dirofilaria immitis*, and prepared *Wolbachia* crude antigen. Moreover, we prepared recombinant WSP and rPAL. Polyclonal anti-*Wolbachia* antibodies, polyclonal anti-rWSP antibodies and polyclonal anti-rPAL antibodies were produced and purified. These antibodies will be conjugated to gold nanoparticles (AuNPs) and develop the later flow strip for diagnosis of lymphatic filariasis.

Moreover, we collected night blood samples from Myanmar migrant workers in Samut Sakorn province, Thai Karens and Thai Mon in Kanchanaburi province which are the endemic areas of lymphatic filariasis in Thailand. All of 142 night blood samples were examined for microfilaraemia and circulating filarial antigens by Og4C3 ELISA. However, all of them were negative. Therefore, we recruited 195 serum samples of patients with lymphatic filariasis from the previous studies. Blood samples from patients with other parasitic infections will be collected. Evaluation of sensitivity and specificity of the lateral flow strip will be performed.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	9
วัตถุประสงค์	11
ขอบเขตการวิจัย	12
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	12
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	13
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	22
วิธีดำเนินการวิจัย	
ขั้นตอนการดำเนินงาน	23
สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	28
ผลการวิจัย	29
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	44
บรรณานุกรม	47
ประวัตินักวิจัยและคณะ	50

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	
อัตราความชุกของโรคเท้าช้างโดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง จำแนกตามพื้นที่ที่สำรวจ	34
ตารางที่ 2	
อัตราความชุกของโรคเท้าช้างโดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง จำแนกตามอำเภอที่สำรวจ	35
ตารางที่ 3	
ข้อมูลพื้นฐาน ของผู้ป่วยที่ตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง	36
ตารางที่ 4	
ข้อมูลพื้นฐาน ของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ที่ตรวจพบพยาธิสภาพ	36
ตารางที่ 5	
การจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างจากการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง	37

สารบัญภาพ

		หน้า
<u>รูปที่ 1</u>	การสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl ₄ และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม	17
<u>รูปที่ 2</u>	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	18
<u>รูปที่ 3</u>	การนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและการแพทย์ โดยการนำสารชีวโมเลกุลต่างๆ ไปติดบนพื้นผิวของ AuNPs	19
<u>รูปที่ 4</u>	ส่วนประกอบและการแปลผล ของ Lateral flow strip test	20
<u>รูปที่ 5</u>	<i>Wolbachia</i> crude antigen ที่สกัดแยกได้จากหนอนพยาธิหัวใจสุนัข	28
<u>รูปที่ 6</u>	การผลิตโปรตีน WSP โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	29
<u>รูปที่ 7</u>	โปรตีน <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) ที่แยกให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin	30
<u>รูปที่ 8</u>	การผลิตโปรตีน PAL โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	31
<u>รูปที่ 9</u>	Peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin	32
<u>รูปที่ 10</u>	โปรตีน <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) และ โปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin	33
<u>รูปที่ 11</u>	Antibody titers ของ anti- <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ indirect ELISA	38
<u>รูปที่ 12</u>	Antibody purification ของ polyclonal anti- <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads [®] Magnetic Beads)	39

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 13	การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal anti- <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) antibodies โดยวิธี Western blot analysis	40
รูปที่ 14	Antibody titers ของ anti-peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) antibodies โดยใช้ indirect ELISA	41
รูปที่ 15	Antibody purification ของ polyclonal anti-peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads [®] Magnetic Beads)	42

□ ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเท้าช้างเป็นโรคที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไปเป็นโรคแรกภายในปี พ.ศ. 2563 ในประเทศไทยเองโดยกระทรวงสาธารณสุขได้จัดให้มีโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในปี พ.ศ. 2545-2549 อย่างไรก็ตาม ยังคงตรวจพบโรคเท้าช้างอยู่ในจังหวัดต่างๆ ที่เป็นแหล่งซุกซ่อนของโรคด้วยอัตราไม่สูง ปัญหาที่สำคัญและควรสร้างความตระหนักแก่คนไทยคือ แรงงานต่างด้าวชาวพม่าที่เข้ามาทำงานในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าแรงงานพม่ามีอัตราการติดเชื้อโรคเท้าช้างสูงถึง 3.3-19.5% แม้ว่าข้อมูลของประเทศไทยจะไม่เคยมีรายงานว่าการนำโรคได้ตามธรรมชาติ แต่พบว่ามีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าในห้องปฏิบัติการได้สูงถึง 94% จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้คนไทยต้องมีมาตรการเฝ้าระวังในการเฝ้าระวังโรคอย่างใกล้ชิด เพื่อวางแผนควบคุมป้องกันโรคเท้าช้างอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างในปัจจุบันอาศัยการตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด ซึ่งมักตรวจพบได้ในเวลากลางคืน สำหรับชุดตรวจวินิจฉัยที่มีจำหน่ายอยู่ปัจจุบันที่วินิจฉัยได้เฉพาะการติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างชนิด *Wuchereria bancrofti* และใช้หลักการของ sandwich ELISA มีราคาแพง ขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลาในการทดสอบนาน และต้องใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ชุดตรวจวินิจฉัยโดยวิธี immunochromatographic test (ICT) แม้ว่าจะทดสอบได้ง่าย ใช้เวลาน้อย แต่สามารถวินิจฉัยได้เฉพาะการติดเชื้อ *W. bancrofti* และไม่มีจำหน่ายในประเทศ แม้จะมีการนำเข้าจากต่างประเทศโดยกระทรวงสาธารณสุขเพื่อการสำรวจโรคในแหล่งซุกซ่อนของโรคเท่านั้น โดยประมาณความสูญเสียจากโรคเท้าช้างไม่ต่ำกว่าแสนล้านบาทต่อปี ในขณะที่ความสูญเสียในการนำเข้าชุดทดสอบไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปีเพื่อให้ครอบคลุมประชากรกลุ่มเสี่ยงทั้งหมด

โครงการนี้จึงมุ่งมั่นที่จะใช้นวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีในการวินิจฉัยโรคเท้าช้างซึ่งจัดเป็นโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำ เพื่อป้องกันการเกิดภาวะเท้าช้างในคนไทย ทั้งนี้ถ้าโรคไม่ได้รับการวินิจฉัยและการรักษาในระยะแรก จะทำให้ผู้ป่วยเข้าสู่ภาวะระยะเรื้อรังซึ่งยังไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาดในปัจจุบัน โดยใช้นาโนเทคโนโลยีในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง โดยการนำอนุภาคทองคำมาทำปฏิกิริยาเคมีให้มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร อนุภาคทองคำจะเปลี่ยนรูปเป็นสารละลายสีแดงใส จากนั้นนำมาผสมกับแอนติบอดีที่จับตัวแน่นกับแอนติเจนของแบคทีเรีย *Volvella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในพยาธิโรคเท้าช้างอย่างจำเพาะ พบได้ในทุกระยะของพยาธิโรคเท้าช้างและมีปริมาณมาก ดังนั้นจึงมีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อใช้เป็นตัววินิจฉัยโรคเท้าช้าง หาก

ตัวอย่างเลือดหรือซีรัมมีแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซีย สีแดงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะสามารถเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือดำและตกตะกอนในที่สุด สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถใช้ตรวจได้ง่าย แม่นยำ ในเวลาไม่ถึง 5 นาที และวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้ทั้งการติดเชื้อโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* และ *Brugia malayi* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโรคติดเชื้ออื่น ซึ่งชุดตรวจวินิจฉัยที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถผลิตได้เองในประเทศด้วยต้นทุนต่ำกว่าชุดทดสอบต่างประเทศกว่า 100 เท่า และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ง่าย ทำให้สามารถเฝ้าระวังโรคได้อย่างใกล้ชิดและประเมินสถานการณ์ของโรคได้อย่างแท้จริง และเป็นการเฝ้าระวังโรคเท้าช้างไม่ให้อุบัติซ้ำในคนไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการวางแผนมาตรการการกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปได้อย่างเป็นรูปธรรมและยั่งยืน อีกทั้งสามารถนำไปจดสิทธิบัตรและใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ในการจำหน่ายชุดตรวจวินิจฉัยต้นทุนต่ำสำหรับประชากรกลุ่มเสี่ยงกว่าพันล้านคนในกว่า 80 ประเทศทั่วโลกซึ่งเป็นแหล่งซุกซมของโรคเท้าช้าง

❑ วัตถุประสงค์

- 1) ศึกษาโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเซียที่สามารถใช้เป็น candidate antigen ในการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้ด้วยควมไวความจำเพาะสูง และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโรคพยาธิอื่นๆ
- 2) เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้อย่างแท้จริง และสามารถประยุกต์ใช้ในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้ออื่นๆ
- 3) เพื่อส่งเสริมการวิจัยประยุกต์เกี่ยวกับโรคเท้าช้างโดยมุ่งเน้นงานวิจัยระดับโมเลกุล ที่สามารถนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ และก่อให้เกิดประโยชน์ในระดับชุมชนและสาธารณสุขของประเทศได้
- 4) สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท-เอกที่มีความรู้ ความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก ซึ่งจะเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ เทคโนโลยีการแพทย์อื่นๆ ต่อไปในอนาคตอันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติ ในการพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณภาพ
- 5) เพื่อผลิตผลงานวิชาการ ตลอดจนเป็นแหล่งความรู้และเป็นที่ยอ้างอิงงานด้านโรคเท้าช้างทั้งระดับชาติและนานาชาติ

❑ ขอบเขตการวิจัย

การศึกษานี้จะทำการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดยใช้นาโนเทคโนโลยี โดยทำการคัดเลือกแอนติเจนของแบคทีเรีย *ไวลบาเซีย* แล้วนำมาผลิตเป็น recombinant antigen จากนั้นนำไปผลิต polyclonal antibody ในกระต่าย แล้วจึงนำแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัย กับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคเท้าช้างและคนปกติที่อยู่ในพื้นที่ชุกชุมของโรค ตลอดจนผู้ติดเชื้อปรสิตอื่นที่พบบ่อยในประเทศไทย แอนติบอดีใดที่ให้ผลการวินิจฉัยที่ดี ให้ความไวและความจำเพาะสูง และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับผู้ติดเชื้อปรสิตอื่น จะนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดยใช้นาโนเทคโนโลยี

❑ ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การใช้นาโนเทคโนโลยีในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง โดยการนำอนุภาคทองคำมาทำปฏิกิริยาเคมีให้มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร อนุภาคทองคำจะเปลี่ยนรูปเป็นสารละลายสีแดง จากนั้นนำมาผสมกับแอนติบอดีที่จับตัวแน่นกับแอนติเจนของแบคทีเรีย *ไวลบาเซีย* หากตัวอย่างเลือดหรือซีรัมมีแอนติเจนของแบคทีเรีย *ไวลบาเซีย* สีแดงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือดำและตกตะกอนในที่สุด สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ทำได้ง่าย แม่นยำ ใช้เวลาไม่ถึง 5 นาที และวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้ทั้งการติดเชื้อ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ซึ่งดีกว่าชุดตรวจวินิจฉัยที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันที่วินิจฉัยได้เพียงการติดเชื้อ *W. bancrofti* และใช้หลักการของ sandwich ELISA ซึ่งมีราคาแพง ขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลาในการทดสอบนาน และต้องใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ชุดตรวจวินิจฉัยโดยวิธี immunochromatographic test (ICT) แม้ว่าจะทดสอบได้ง่าย ใช้เวลาน้อย แต่สามารถวินิจฉัยได้เฉพาะการติดเชื้อ *W. bancrofti* และไม่มีจำหน่ายในประเทศ มีการนำเข้าจากต่างประเทศโดยกระทรวงสาธารณสุขเพื่อการสำรวจโรคใน endemic area เท่านั้น

❑ การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคเท้าช้างเป็นปัญหาระดับชาติและนานาชาติ

โรคเท้าช้างยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขทั่วโลก ประชากรทั่วโลกกว่า 1.2 พันล้านคนเสี่ยงต่อการเกิดโรค และกว่า 120 ล้านคนที่ติดเชื้อและมีภาวะทุพพลภาพ⁽¹⁾ ถ้าคาดการณ์จากอัตราการตรวจพบเชื้อสูงในแรงงานพม่าล้านๆ คนที่ทำงานในเมืองใหญ่ของประเทศไทย อีกทั้งจำนวนยุงรำคาญที่พบได้ทั่วไป ก็อาจจะประมาณได้ว่าคนไทยหลายล้านที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคเท้าช้าง โรคเท้าช้างเกิดจากพยาธิหลัก 2 ชนิด คือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* เป็นปัญหาระดับชาติและนานาชาติ ผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างส่วนมากจะไม่ปรากฏอาการ แต่จะมีพยาธิโรคเท้าช้างตัวแก่อยู่ในระบบทางเดินน้ำเหลือง และปล่อยตัวอ่อนไมโครฟิลาเรีย (microfilaria) ออกมาสู่กระแสเลือด ทำให้สามารถแพร่เชื้อสู่ผู้อื่นได้โดยมียุงเป็นพาหะ จากการไม่ปรากฏอาการของโรค ผู้ป่วยจึงไม่ได้รับการวินิจฉัย และการรักษาตั้งแต่ระยะแรก จนกระทั่งเกิดพยาธิสภาพจะก่อให้เกิดความพิการและทุพพลภาพอย่างถาวรไม่สามารถกลับสู่สภาวะปกติได้ จึงไม่สามารถดำเนินกิจกรรมประจำวันได้เป็นปกติ ก่อให้เกิดการว่างงาน และการสูญเสียรายได้ทั้งในระดับบุคคล ครอบครัว และชุมชน เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและสังคม และส่งผลกระทบต่อพัฒนาความเจริญและเศรษฐกิจของประเทศชาติและประชาคมโลก องค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไปเป็นโรคแรกภายในปี พ.ศ. 2563 ในประเทศไทยเองโดยกระทรวงสาธารณสุขได้จัดให้มีโครงการการกำจัดโรคเท้าช้างในปี พ.ศ. 2545-2549 แม้ว่าการตรวจพบโรคเท้าช้างในประเทศไทยจะอยู่ในอัตราที่ต่ำ 1.62 คนต่อประชากรแสนคน⁽²⁾ อย่างไรก็ตาม ในบริเวณ endemic area ของโรค ยังคงพบอัตราการติดเชื้อสูง 5-10%⁽³⁻⁶⁾ โดยรายงานล่าสุดจากกระทรวงสาธารณสุขพบผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* rural strain 16 คนในจังหวัดตาก และพบผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ถึง 98 คนในจังหวัดนราธิวาส นอกจากนี้ ในปีพ.ศ. 2554 ยังมีการตรวจพบผู้ติดเชื้อเพิ่มจำนวน 2 คนในเขตพื้นที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี และกระบี่

ปัญหาแรงงานต่างด้าว โดยเฉพาะแรงงานพม่าที่มีอัตราการตรวจพบพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* (urban strain) ซึ่งมียุงรำคาญเป็นยุงพาหะ แม้ว่ายุงรำคาญของไทยจะไม่เคยมีรายงานรายงานว่าโรคได้ตามธรรมชาติ แต่พบว่ามีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าในห้องปฏิบัติการ จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้คนไทยต้องมีมาตรการเฝ้าระวังในการควบคุมป้องกันโรคเท้าช้างอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากตามธรรมชาติพยาธิจะมีการปรับตัวให้อาศัยอยู่ได้ในยุงพาหะเพื่อคงวงชีวิตและแพร่สู่คนต่อไป โดยเฉพาะตามเมืองใหญ่ เช่น กรุงเทพฯ มักมีแหล่งน้ำเสีย

ที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงรำคาญ ทำให้คนไทยมีความเสี่ยงที่จะติดโรคเท้าช้างจากพยาธิสายพันธุ์พม่าได้ (re-emerging disease) หากไม่มีมาตรการการเฝ้าระวัง และป้องกันโรคที่ดี

ปัญหาการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคเท้าช้าง

การตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างนั้น จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลหลายส่วนประกอบกัน ทั้งจากประวัติ การตรวจร่างกาย และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งมีอยู่หลายวิธี การวินิจฉัยที่น่าเชื่อถือที่สุด (definitive diagnosis) ของโรคเท้าช้าง คือการตรวจพบตัวพยาธิโรคเท้าช้างระยะไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดของผู้ป่วย ซึ่งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญแยกชนิดของเชื้อพยาธิในการวินิจฉัย และยังเป็นวิธีที่มีความไวต่ำมาก เนื่องจากเวลาที่ไมโครฟิลาเรียปรากฏเป็นระยะในกระแสเลือด (periodicity) แตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ของพยาธิโรคเท้าช้าง โดยทั่วไปช่วงเวลาที่ไมโครฟิลาเรียปรากฏตัวในกระแสเลือดมากมักเป็นเวลากลางคืนเป็นบางช่วงเวลาเท่านั้น จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญของทั้งเจ้าหน้าที่และผู้ป่วยที่มารับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีเจาะเลือดเพื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียจึงได้มีการพัฒนาการวินิจฉัยโรคให้มีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถตรวจได้ง่ายและสะดวกขึ้น เช่น การตรวจหาแอนติเจน การตรวจหาแอนติบอดี และการตรวจหาสารพันธุกรรมของพยาธิ

การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง ได้มีการนำ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างมาใช้ ปัจจุบันมี monoclonal antibody 2 ชนิด ที่ใช้กันแพร่หลายและผลิตเป็นชุดตรวจวินิจฉัยซึ่งมีความไวและความจำเพาะต่อการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเท้าช้างจาก *W. bancrofti* สูงคือ monoclonal antibody AD12.1 และ Og4C3

การตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด AD12.1 ใช้วิธีที่อาศัยหลักการโครมาโตกราฟีด้านภูมิคุ้มกันวิทยา (immunochromatographic test; ICT) การทดสอบทำได้โดยการหยดเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วประมาณ 100 ไมโครลิตรในบริเวณที่กำหนดบนแผ่นทดสอบด้วยวิธีนี้ และอ่านผลจากแถบการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น วิธีนี้เหมาะสมในการตรวจภาคสนามเพราะทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว รู้ผลการตรวจได้ภายในเวลาประมาณ 10-15 นาที และไม่ต้องอาศัยความชำนาญหรือเครื่องมือเป็นพิเศษ อีกทั้งมีความไวและความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 95.7-97 และร้อยละ 99-100 ตามลำดับ

สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ *B. malayi* ชื่อ 17E10 ซึ่งให้ความไวในการตรวจวินิจฉัยถึงร้อยละ 93.3 อย่างไรก็ตาม ยังคงพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับพยาธิหัวใจสุนัข (*Dirofilaria immitis*) ได้ การตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของ

พยาธิโรคเท้าช้างทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสะดวกขึ้น เนื่องจากไม่ต้องเจาะเลือดในช่วงเวลากลางคืน อีกทั้งสามารถบอกภาวะการติดเชื้อในปัจจุบันและยังสามารถใช้ติดตามผลการรักษาได้อีกด้วย เนื่องจากระดับของแอนติเจนจะลดลงภายหลังการรักษา อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างคือราคาที่ค่อนข้างสูงสำหรับประเทศกำลังพัฒนาที่เป็นแหล่งชุกชุมของโรค

การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดยการตรวจแอนติบอดีนั้นมีรายงานพบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ระหว่างพยาธิโรคเท้าช้างกับพยาธิชนิดอื่น เช่น พยาธิปากขอหรือพยาธิไส้เดือน⁽⁷⁾ เป็นต้น เนื่องจากกลุ่มพยาธิเหล่านี้มีโครงสร้างของแอนติเจนหลักร่วมกันอยู่ ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ และเป็นผลทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดขึ้น นอกจากนี้ การตรวจหาแอนติบอดียังไม่สามารถแยกภาวะการติดเชื้อในปัจจุบัน (active infection) กับภาวะที่เคยติดเชื้อ จึงไม่สามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพผลการรักษาว่าโรคได้หายขาดได้ แม้ว่าจะมีการศึกษาพบว่า การตรวจหา anti-filarial IgG4 antibodies จะเพิ่มความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยได้ และสัมพันธ์กับการติดเชื้อปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจโดยวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ crude antigen ที่เตรียมจากพยาธิฟิลาเรีย จึงต้องใช้สัตว์ทดลองและยุ่งในการคงวงจรชีวิตของพยาธิฟิลาเรียเพื่อสกัดแอนติเจนมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี นอกจากนี้ใช้หลักการของ indirect ELISA ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลาในการทดสอบนาน และต้องใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการ

ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของพยาธิ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งพบว่ามีค่าใช้จ่ายเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจหาแอนติเจน⁽⁸⁻⁹⁾ นอกจากนี้ จากข้อจำกัดในการตรวจและจากความจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง ตลอดจนผู้ทำการทดสอบต้องได้รับการอบรมให้สามารถปฏิบัติงานได้ถูกต้อง และเข้าใจถึงหลักการแปลผล ตลอดจนการควบคุมคุณภาพของการทดสอบการตรวจด้วยวิธี PCR จึงไม่สะดวกในการที่จะนำไปใช้ในการตรวจทั่วไปแม้จะนิยมใช้กันในงานวิจัย

อนึ่ง แม้ว่าปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยที่มีความไวสูง อย่างไรก็ตามชุดตรวจวินิจฉัยดังกล่าวยังคงมีราคาสูง และต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งยังไม่สามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพผลการรักษาว่าโรคได้หายขาด ทำให้การประเมินผลการควบคุมโรคในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างเป็นไปได้ยาก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งนอกจากจะสามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และความไวสูงแล้ว ยังจำเป็นต้องสามารถติดตาม และประเมินการรักษาได้ด้วย อีกทั้งยังสามารถผลิตใช้ได้เองภายในประเทศในราคาที่เหมาะสม เพื่อลดการนำเข้าของผลิตภัณฑ์ราคาแพงได้

ความสำคัญของแบคทีเรียโวลบาเซียต่อหนองพยาธิโรคเท้าช้าง

แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์ (intracellular bacteria) ที่พบได้เฉพาะในสัตว์ขาข้อและหนองพยาธิฟิลาเรียเท่านั้น จึงเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันอย่างยิ่ง ซึ่งจากการศึกษาโดยวิธีทางอณูชีววิทยาพบว่าแบคทีเรียโวลบาเซียในสัตว์ขาข้อ และแบคทีเรียโวลบาเซียในหนองพยาธิฟิลาเรีย มีลักษณะลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน⁽¹⁰⁻¹¹⁾ โดยแบคทีเรียโวลบาเซียในสัตว์ขาข้อเป็นสาเหตุทำให้สัตว์ขาข้อมีการสืบพันธุ์ที่ผิดปกติไป⁽¹²⁾ การศึกษาถึงบทบาทหน้าที่และความสำคัญของแบคทีเรียโวลบาเซียในหนองพยาธิฟิลาเรียพบความสำคัญของแบคทีเรียโวลบาเซียต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของหนองพยาธิฟิลาเรีย และบทบาทของแบคทีเรียถูกกำจัดไป เมื่อให้ยาปฏิชีวนะที่ทำลายแบคทีเรียโวลบาเซีย⁽¹³⁻¹⁶⁾ แสดงถึงความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualism) ระหว่างแบคทีเรียโวลบาเซียในหนองพยาธิฟิลาเรีย จึงนำมาซึ่งความสนใจในการศึกษาบทบาทต่างๆ ของแบคทีเรียโวลบาเซียในหนองพยาธิฟิลาเรีย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาและควบคุมโรคติดต่อหนองพยาธิโรคเท้าช้างต่อไป

โปรตีนจากแบคทีเรียโวลบาเซียช่วยในการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

จากปัญหาในการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง ซึ่งแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเพื่อตรวจหาแอนติเจนของหนองพยาธิโรคเท้าช้างที่มีความไวในการตรวจวินิจฉัยสูง แต่ชุดตรวจวินิจฉัยที่ตรวจหาแอนติเจนที่มีจำหน่ายในปัจจุบันสามารถวินิจฉัยได้เฉพาะโรคเท้าช้างจากพยาธิ *W. bancrofti* เท่านั้น ยังไม่มีชุดตรวจหาแอนติเจนเพื่อการวินิจฉัยโรคเท้าช้างจากพยาธิ *B. malayi* จึงนำไปสู่แนวความคิดการตรวจหาแอนติเจนจากแบคทีเรียโวลบาเซียเพื่อตรวจวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคเท้าช้าง เนื่องจากสามารถตรวจพบแบคทีเรียโวลบาเซียจำนวนมากทั้งในพยาธิ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ทุกระยะ อีกทั้งยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อแบคทีเรียโวลบาเซียได้ในคนไข้โรคเท้าช้าง ซึ่งแสดงว่ามีการหลั่งแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซียออกมาสู่กระแสเลือดในคนไข้โรคเท้าช้าง ดังนั้นการวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดยการตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซีย จึงน่าจะมีประสิทธิภาพ มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการตรวจหาแอนติเจนของหนองพยาธิโรคเท้าช้างที่มีอยู่เดิม โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโรคปรสิตอื่นๆ

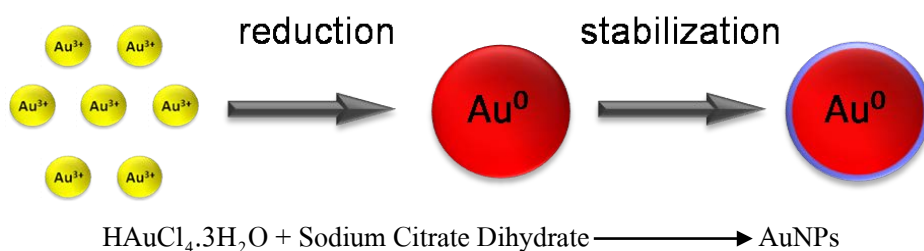
ในการศึกษาโปรตีนต่างๆ ของแบคทีเรียโวลบาเซีย ทางกลุ่มผู้วิจัยโดยได้พัฒนาและปรับปรุงวิธีการสกัดแบคทีเรียโวลบาเซียจากหนองพยาธิให้ได้โปรตีนที่มีคุณภาพและมีปริมาณเพียงพอในการวิจัยโปรตีนในระดับสูง ซึ่งผลจากการแยกโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเซีย โดยวิธี 2-dimensional gel electrophoresis และตรวจหาโปรตีนที่จำเพาะของแบคทีเรียโวลบาเซีย โดยใช้ anti-*Wolbachia* antibodies และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่จำเพาะ โดยวิธี MALDI-TOF mass

spectrometry พบว่าโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเซียที่มีปริมาณมากและความเป็นแอนติเจนสูง คือ *Wolbachia* surface protein (WSP)⁽¹⁶⁾ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ WSP ยังความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Dirofilaria immitis* ในคน⁽¹⁷⁾ และในแมว⁽¹⁸⁾ และสัมพันธ์กับการเกิดการบวมของต่อมน้ำเหลืองในลิงที่ติดเชื้อ *B. malayi*⁽¹⁹⁾ ดังนั้น WSP จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาเพื่อนำมาเป็น โปรตีนเป้าหมายของการสร้างระบบการตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซีย ซึ่งระบบการตรวจหาแอนติเจนที่สร้างขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาระดับแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซียในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง อันจะเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการวินิจฉัย และติดตามประสิทธิภาพการรักษา ซึ่งจะส่งผลให้สามารถวางแผนการรักษาโรคได้ดียิ่งขึ้น เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดของการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง ตามนโยบายระดับประเทศและสอดคล้องกับนโยบายขององค์การอนามัยโลก

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

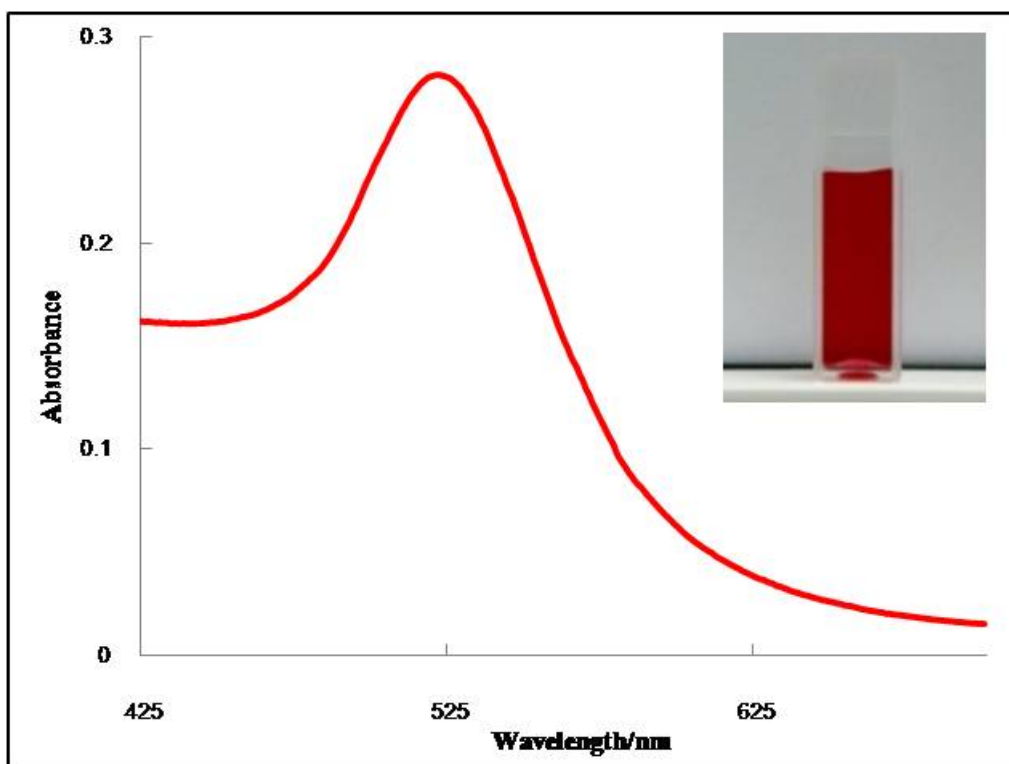
นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้างการวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ซึ่งเทียบเท่ากับระดับอะตอมหรือโมเลกุล⁽²⁰⁾ รวมถึงการออกแบบหรือการประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อใช้สร้างหรือ วิเคราะห์ วัสดุในระดับที่เล็กมากๆ เช่น วัสดุนาโน (ท่อนาโน เส้นใยนาโน และอนุภาคนาโน) ซึ่งมีโครงสร้างของ วัสดุที่มีคุณสมบัติพิเศษ ทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพ ต่างไปจากสารเดิมที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้น ในปัจจุบัน จึงมีการนำนาโนเทคโนโลยี มาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา เช่น ด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพ และทางการแพทย์ เป็นต้น

อนุภาทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโน ที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง⁽²¹⁾ ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายคอลลอยด์สีแดง ในการสังเคราะห์ AuNPs นั้นสามารถทำได้โดยการนำสารละลายของ HAuCl_4 ที่มีทองคำประจุ 3^+ (Au^{3+}) ทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ได้ AuNPs ที่มีทองคำประจุเป็น 0 (Au^0) ซึ่งยังไม่มีเสถียร จึงต้องเติมสารช่วยทำให้เสถียร (Stabilizer) โดยสารนี้จะมาล้อมรอบบนอนุภาค ป้องกันการรวมตัวหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน ทำให้ AuNPs นั้นสามารถคงขนาดและรูปร่างอยู่ในระดับนาโนได้ สารที่นิยมใช้เป็นตัวรีดิวซ์และช่วยทำให้อนุภาทองคำ เกิดความเสถียร ได้แก่ sodium citrate⁽²²⁾ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์และทำให้ AuNPs มีความเสถียรในคราวเดียวกัน (รูปที่ 1)



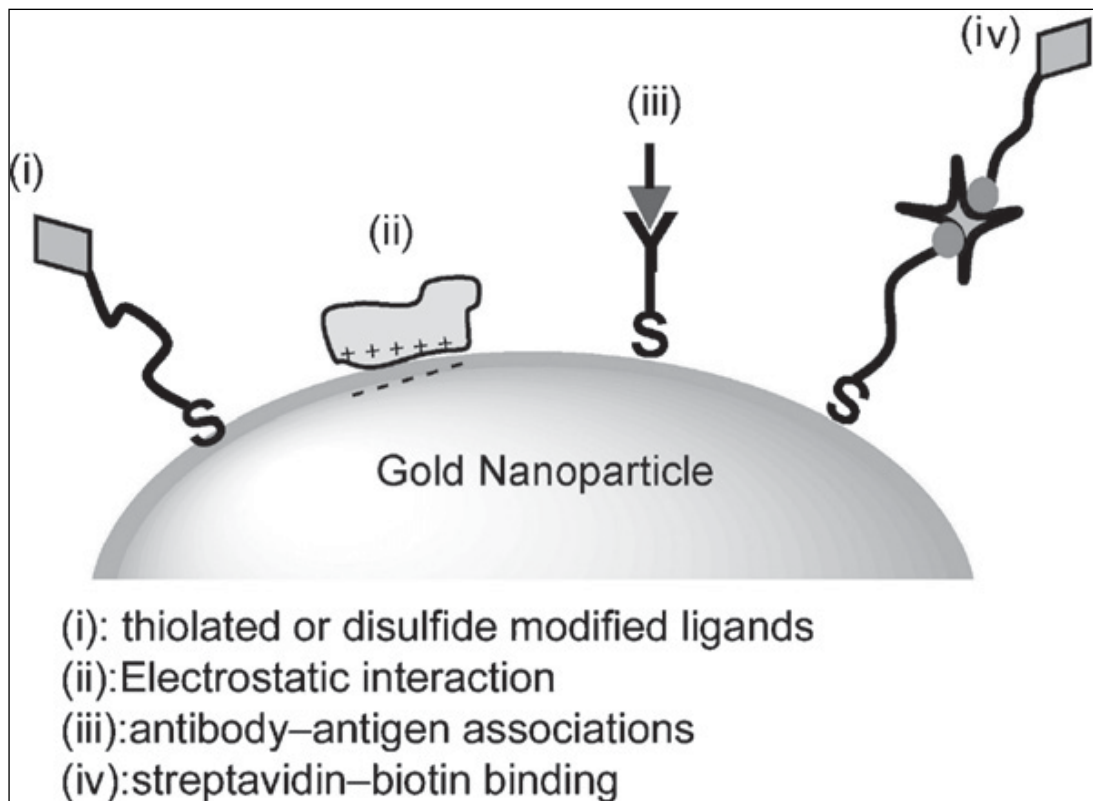
รูปที่ 1 การสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl_4 และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม⁽²³⁾

AuNPs มีคุณสมบัติเชิงแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวซึ่งต่างจากทองคำแบบก้อนทั่วไป เมื่อขนาดอนุภาคทองคำเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มากกระทบมากๆ จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า เซอร์เฟซ พลาสมอน เรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) ซึ่งเป็นคลื่นความหนาแน่นของประจุ ที่เกิดจากการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระ ที่มีลักษณะการสั่นพร้อมเพรียงกัน เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยผิวต่อของ AuNPs กับสารใดก็ตาม ทำให้ AuNPs สามารถดูดกลืนแสงสีเขียว ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ซึ่งจะส่งผลให้ AuNPs มีสีแดงทับทิม (ruby red)⁽²⁴⁾ ดังรูปที่



รูปที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และ
สารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (ภาพเล็ก)

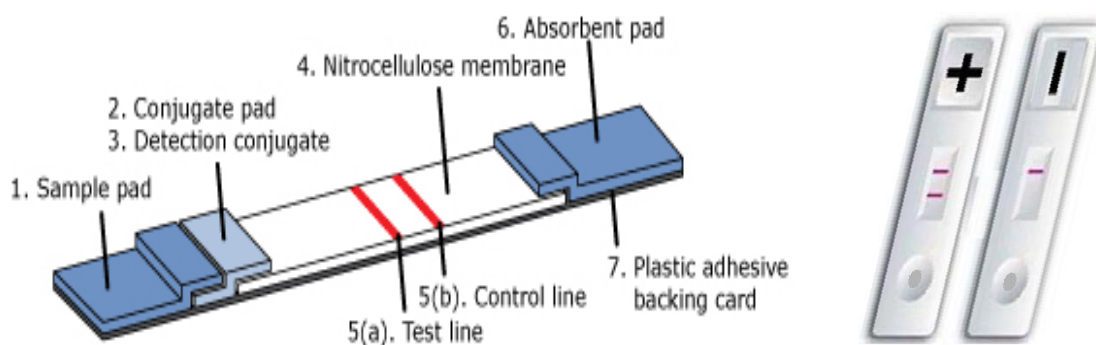
บนพื้นผิวของ AuNPs สามารถปรับปรุงให้มีโมเลกุลต่างๆที่ต้องการมาเคลือบอยู่บนผิวของอนุภาค และนำ AuNPs ที่ปรับปรุงพื้นผิวแล้ว มาใช้เป็นตัวติดตามหรือตัวตรวจจับสารชีวโมเลกุลเป้าหมายได้ เช่น DNA⁽²⁵⁾, โปรตีน⁽²⁶⁾, คาร์โบไฮเดรต⁽²⁷⁾, ยา⁽²⁸⁾ หรือสี fluorescent⁽²⁵⁾ ดังรูปที่ 3 ด้วยเหตุนี้ จึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างอุปกรณ์ตรวจจับสารทางชีวภาพ (Biosensor)⁽²⁹⁾ ที่มีความจำเพาะหลากหลาย โดยการปรับปรุงพื้นผิวของ AuNPs ด้วยสารที่มีความสามารถในการเลือกจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หา โดยคอลลอยด์ของ AuNPs จะเปลี่ยนสีเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก จึงเปรียบได้ว่า AuNPs ทำหน้าที่เป็นตัวรายงานผล (reporter) สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ



รูปที่ 3 การนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและการแพทย์
โดยการนำสารชีวโมเลกุลต่างๆ ไปติดบนพื้นผิวของ AuNPs

การประยุกต์ใช้ AuNPs ใน Lateral flow strip test

การประยุกต์ใช้ AuNPs เป็นตัวรายงาน (reporter) ใน Lateral flow strip test ซึ่งเป็นชุดตรวจคัดกรองโรคที่ใช้ทั่วไป โดยอาศัยหลักการ immunochromatography สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากแถบสีชมพูของ AuNPs ที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งควบคุม (control line) และตำแหน่งทดสอบ (test line) โดยถ้าแถบสีชมพูเกิดขึ้น ที่ตำแหน่งทดสอบและตำแหน่งควบคุมเท่ากับผลเป็นบวก แต่หากมีแถบสีชมพูเกิดขึ้นที่ตำแหน่งควบคุมเพียง ตำแหน่งเดียว เท่ากับผลเป็นลบ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ส่วนประกอบ (A) และการแปลผล (B) ของ Lateral flow strip test

□ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่สามารถนำไปจดเป็นสิทธิบัตรและใช้ให้เกิดประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้อย่างแท้จริง
- 2) งานวิจัยระดับลึกเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงในระดับนานาชาติ และประยุกต์ใช้ได้กับงานสาธารณสุขของประเทศ
- 3) เพื่อผลิตผลงานตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการอย่างน้อย 1-2 เรื่อง
- 4) ผลงานวิชาการเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ 1-2 เรื่องตลอดโครงการ
- 5) นักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโทที่มีความรู้คุณธรรม มีความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก ซึ่งจะเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ เทคโนโลยีทางการแพทย์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต อันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติ ในการพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณธรรมและความรู้
- 6) เจ้าหน้าที่สาธารณสุข อาสาสมัคร มีความรู้และเทคโนโลยีที่ทันสมัย สามารถเฝ้าระวังควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างยั่งยืนแท้จริง และสามารถประยุกต์ใช้กับโรคติดต่ออื่นได้

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1) ประชากรไทยได้รับการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างด้วยวิธีที่มีความไวสูง และชุดตรวจวินิจฉัยที่มีราคาถูก ทำให้ประชากรไทยได้รับโอกาสในการตรวจวินิจฉัยได้ทั่วถึง และสามารถป้องกันการอุบัติซ้ำของโรคเท้าช้างในคนไทยได้
- 2) ประเทศประหยัดงบประมาณในการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี
- 3) ประเทศได้พัฒนานักวิจัยที่มีศักยภาพมีความรู้ ความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียม crude *Wolbachia* antigen

ทำการสกัดแบคทีเรีย *Wolbachia* จากหนอนพยาธิหัวใจสุนัข โดยวิธี fractionated centrifugation แล้วนำมาเตรียมเป็น crude *Wolbachia* antigen โดยวิธี sonication⁽²⁹⁾ โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1.1 นำหนอนพยาธิหัวใจสุนัขมาล้างด้วย normal saline ให้สะอาด แล้วจึงสับด้วย sterile scalpel blade ให้ละเอียด จากนั้นนำ 200 mg ของชิ้นหนอนที่ได้บดใน 1.2 ml 0.85% NaCl ที่ผสมด้วย 0.08% NP-40 จนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที บนน้ำแข็ง
- 1.2 นำไปปั่นที่ความเร็ว 350 xg ที่ 4°C เป็นเวลา 40 นาที เพื่อตกตะกอนเศษเนื้อเยื่อของหนอนพยาธิ
- 1.3 นำส่วนใสมาปั่นตกตะกอนแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ความเร็ว 16,000 xg ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที
- 1.4 นำตะกอนแบคทีเรีย *Wolbachia* มาปั่นล้างอีก 3 ครั้ง ด้วย 1.2 ml 0.85% NaCl ที่ผสมด้วย 0.08% NP-40 ที่ความเร็ว 16,000 xg ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที
- 1.5 เตรียม crude *Wolbachia* antigen โดยวิธี sonication
- 1.6 ตรวจสอบโปรตีนที่สกัดได้โดย SDS-PAGE analysis

2. การเตรียม recombinant antigens ของแบคทีเรียโวลบาเซีย

นำโคลนของยีนที่สนใจซึ่งอยู่ใน pET100/D-TOP0 expression vector มา transform ใส่ใน *E. coli* BL21 แล้วกระตุ้นให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG จากนั้นสกัดแยก inclusion bodies โดยวิธี sonication แล้วทำ protein purification โดยใช้ Ni-NTA spin column (QIAGEN) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 เพิ่มจำนวน clone ที่มียีน *wsp*-pET 100 ใน BL21

- 2.1.1 นำ clone *wsp*-pET 100 in BL21 ที่มี ยีน WSP มา inoculate ใน LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ chloramphenicol 35 µg/ml

- 2.1.2 บ่มเชื้อใน incubator ที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 2.1.3 ถ่ายเชื้อ clone pRset/BL21 ที่มี ยีน *wsp* ลง LB broth ที่มี ampicillin 50 µg/ml และ chloramphenicol 35 µg/ml
- 2.1.4 บ่มเชื้อใน incubator ที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 2.1.5 นำเชื้อไปวัด OD600 ให้ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.35-0.40
- 2.1.6 กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน WSP ด้วย 1 mM IPTG แล้วบ่ม ใน shaking incubator เขย่าด้วยความเร็ว 180 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- 2.1.7 เก็บเซลล์โดยปั่น 10,000 xg ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

2.2 สกัดแยกโปรตีน WSP โดย sonication

- 2.2.1 นำตะกอนของเซลล์ที่เก็บได้มาล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer ปริมาตร 100 ml
- 2.2.2 ปั่นเซลล์ 12,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
- 2.2.3 ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1X PBS pH 7.4 ปริมาตร 100 ml อีก 1 รอบ
- 2.2.4 นำตะกอนเซลล์มาละลายใน 1x PBS pH 7.4 ปริมาตร 20 ml
- 2.2.5 ทำให้เซลล์แตกโดยการ sonicate ด้วย เครื่อง sonicator จากนั้นปั่นเซลล์ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °C
- 2.2.6 แยกเก็บส่วนต่าง ได้แก่ ส่วน supernate และส่วน cell pellet ไว้ที่ -80 °C จนกว่าจะใช้เพื่อตรวจหาโปรตีน WSP ต่อไป

2.3 ตรวจหาโปรตีน WSP

- 2.3.1 เตรียม 12% acylamide gel จำนวน 2 gels สำหรับ run SDS-PAGE
- 2.3.2 นำโปรตีนทั้งหมด (crude antigen), ส่วน supernate (ส่วน soluble โปรตีน) และส่วนตะกอน (ส่วน insoluble โปรตีนผสมกับ loading dry ให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที
- 2.3.3 run SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 120 volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2.3.4 นำ gel ไปย้อม Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 15 นาที แล้ว destain ด้วย destain solution เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- 2.3.5 นำ gel ที่ 2 ไป ทำ western blot โดยวิธีดังนี้
 - 2.3.5.1 นำ gel, nitrocellulose membrane, และ filter paper แช่ลงใน blotting buffer

- 2.3.5.2 transfer ตัวอย่างโปรตีนใน gel ลงบน nitrocellulose membrane โดยเครื่อง semi-dry transfer ที่กระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที
- 2.3.5.3 นำแผ่น membrane ที่ transfer แล้ว แช่ใน 3 % blocking solution (skim milk + 1X TBS + 0.1%Tween 20)
- 2.3.5.4 นำไป incubate บน shaker, ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น เท 10% blocking solution ออก
- 2.3.5.5 ล้าง membrane ด้วย 1X TBS + 0.1%Tween 20 ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 15 นาที (ทำ 3 รอบ)
- 2.3.5.6 นำ membrane มาแช่ใน primary antibody (Anti His+ 5% blocking solution, dilute 1:3,000) แล้วนำไป incubate บน shaker, ที่ อุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชั่วโมง
- 2.3.5.7 ล้าง membrane ด้วย 1X TBS + 0.1%Tween 20 ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 15 นาที (ทำ 3 รอบ)
- 2.3.5.8 นำ membrane มาแช่ใน secondary antibody (goat anti-mouse conjugate horseradish peroxidase + 5% blocking solution, dilute 1:3,000) แล้วนำไป incubate บน shaker, ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชั่วโมง
- 2.3.5.9 ล้าง membrane ด้วย 1X TBS + 0.1%Tween 20 ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 15 นาที (ทำ 3 รอบ)
- 2.3.5.10 นำ membrane มาแช่ใน DAP substrate
- 2.3.5.11 เมื่อ membrane เกิดสีแล้วให้แช่ membrane ในน้ำกลั่นเพื่อหยุด ปฏิกิริยา

2.4 WSP purification โดยใช้ Ni-NTA spin column (QIAGEN)

- 2.4.1 ละลาย inclusion bodies (insoluble protein) โดยใช้ 8M urea แช่ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมงจากนั้นจากนั้นปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °C
- 2.4.2 นำสารละลาย มาสกัดโปรตีน ผ่าน Ni-NTA spin column (QIAGEN) 600 µl
- 2.4.3 ล้างคอลัมน์ 2 ครั้งด้วย washing buffer 500 µl
- 2.4.4 Elution 200 µl ด้วย elution buffer
- 2.4.5 นำโปรตีนที่ได้มา refold โดยวิธี dialysis

3. การเตรียม polyclonal antibodies ต่อ recombinant antigens

3.1 Polyclonal anti-*Wolbachia* antibodies

นำ *Wolbachia* crude antigen 500 ug ใน 500 ul PBS ผสมกับ 500 ul ของ complete Freund's adjuvant ให้เข้ากันจนเป็น emulsion แล้วฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย กระตุ้นซ้ำด้วย *Wolbachia* crude antigen 250 ug ใน 500 ul PBS ผสมกับ 500 ul ของ incomplete Freund's adjuvant ที่วันที่ 21, 42 และ 63 หลังการกระตุ้นครั้งแรก เจาะเก็บซีรัมจากกระต่าย ตรวจวัด antibody titers ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี dot blot และจากนั้นจึงทำการแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ (antibody purification) โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads® Magnetic Beads)

3.2 Polyclonal anti-rWSP antibodies

นำ rWSP 500 ug ใน 500 ul PBS ผสมกับ 500 ul ของ complete Freund's adjuvant ให้เข้ากันจนเป็น emulsion แล้วฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย กระตุ้นซ้ำด้วย rWSP 250 ug ใน 500 ul PBS ผสมกับ 500 ul ของ incomplete Freund's adjuvant ที่วันที่ 21, 42 และ 63 หลังการกระตุ้นครั้งแรก เจาะเก็บซีรัมจากกระต่าย ตรวจวัด antibody titers ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี dot blot และจากนั้นจึงทำการแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ (antibody purification) โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads® Magnetic Beads)

3.2 Polyclonal anti-rPAL antibodies

ทำการคัดเลือก antigenic peptides ซึ่งเป็น antibody epitopes โดยนำลำดับอะมิโนของโปรตีน PAL ของ *B.malayi Wolbachia* (GenBank Accession Number AAW70743) มาทำ antigenic plot ได้ antibody epitopes 3 สาย ได้แก่ บริเวณ N-terminus ที่ amino acids 47-55 (DYDKSDISE) และ amino acids 81-91 (HTDNRGSYEYN) และบริเวณ C-terminus ที่ amino acids 134-145 (DSKNSKYEKEHA) นำสาย peptide ที่สังเคราะห์ได้ ติดด้วย keyhole limpet hemocyanin (KLH) ฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย กระตุ้นซ้ำด้วย peptides ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ที่วันที่ 21, 42 และ 63 หลังการกระตุ้นครั้งแรก เจาะเก็บซีรัมจากกระต่าย ตรวจวัด antibody titers ด้วยวิธี indirect

ELISA และทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี dot blot และจากนั้นจึงทำการแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ (antibody purification) โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads® Magnetic Beads)

4. การเตรียมชุด lateral flow strip

สังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโน แล้วติดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรบนแอนติบอดี และเตรียมและประกอบชุด Lateral flow strip แล้วทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้แอนติเจนของพยาธิโรคเท้าช้าง พยาธิอื่นๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

5. การสำรวจและจัดจำแนกกลุ่มประชากร

ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะได้รับการเจาะเลือดจากปลายนิ้วประมาณ 60 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์เพื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยผู้ตรวจ 2 คน เพื่อรวบรวมผู้ตรวจพบพยาธิโรคเท้าช้าง 45 ราย โดยคำนวณจากโดยใช้สูตรในการคำนวณขนาดของประชากรตัวอย่าง (sample size) สำหรับการศึกษาดิagnostic test ดังนี้

$$n = Z_{\alpha}^2(PQ)/d^2$$

Z_{α} = 1.96 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

P = Proportion of positive event คิดเป็น 3% = 0.03

Q = 1-P = 0.90

D = acceptable error กำหนดให้ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ไม่เกิน 5% = 0.05

6. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณข้อพับแขน ประมาณ 5 มิลลิลิตร ใน

Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด และทำปฏิกิริยาแยกเลือดเก็บ plasma

7. การตรวจหาไมโครฟิลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำเลือดประมาณ 60 μ l มาทำฟิล์มเลือดหนา (Thick blood film) และฟิล์มเลือดบาง (Thin blood film) อย่างละ 2 สไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง 24 ชั่วโมง นำมาทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการแช่ฟิล์มเลือดในน้ำกลั่น 1-2 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปย้อมสี Giemsa และตรวจนับจำนวนไมโครฟิลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์⁽³¹⁾

8. การตรวจหาแอนติเจนของหนองพยาธิในกระแสเลือด

ตรวจหาแอนติเจนของหนองพยาธิในกระแสเลือดโดยใช้ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง Og4C3 ELISA (TropBio Pty Ltd, Townsville, Australia) ⁽³²⁾

9. การทดสอบความสามารถของชุด Lateral flow strip ที่ได้พัฒนาขึ้นในการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

นำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ ผู้ป่วยโรคแบคทีเรียอื่นๆ และคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุกชุมของโรค มาทดสอบกับชุด Lateral flow strip แล้ววิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยโรคเท้าช้างเปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิโรคเท้าช้างโดยวิธี Og4C3 ELISA

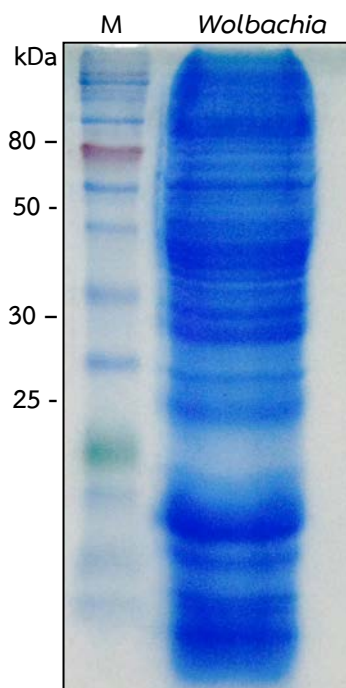
□ สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

- หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน ศูนย์วิจัย (CHULA-MRC) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พื้นที่ภาคสนาม: จังหวัด กาญจนบุรี และสมุทรสาคร

ผลการวิจัย

1. การเตรียม crude *Wolbachia* antigen

แบคทีเรีย *Wolbachia* ถูกสกัดแยกออกจากหนองพยาธิหัวใจสุนัข ด้วยวิธีปั่นลำดับชั้น (Fractionated centrifugation) โดยใช้ 0.85% NaCl ผสมด้วย Nonidet P-40 (NP-40) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารบัฟเฟอร์ ความบริสุทธิ์ของโปรตีนแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่สกัดแยกได้ (*Wolbachia* crude antigen) ถูกวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นว่าผู้วิจัยสามารถแยกแบคทีเรีย *Wolbachia* จากหนองพยาธิหัวใจสุนัขได้ด้วยความบริสุทธิ์สูง โดยความเข้มข้นของ NP-40 ที่เพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่แยกได้เพิ่มขึ้น และสามารถลดการปนเปื้อนจากหนองพยาธิซึ่งเป็นโฮสต์ได้ โดยสารบัฟเฟอร์ที่ให้ความเข้มข้นของโปรตีนของแบคทีเรีย *Wolbachia* มากที่สุดแต่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนของหนองพยาธิน้อยที่สุดคือ 0.85% NaCl + 0.08% NP-40

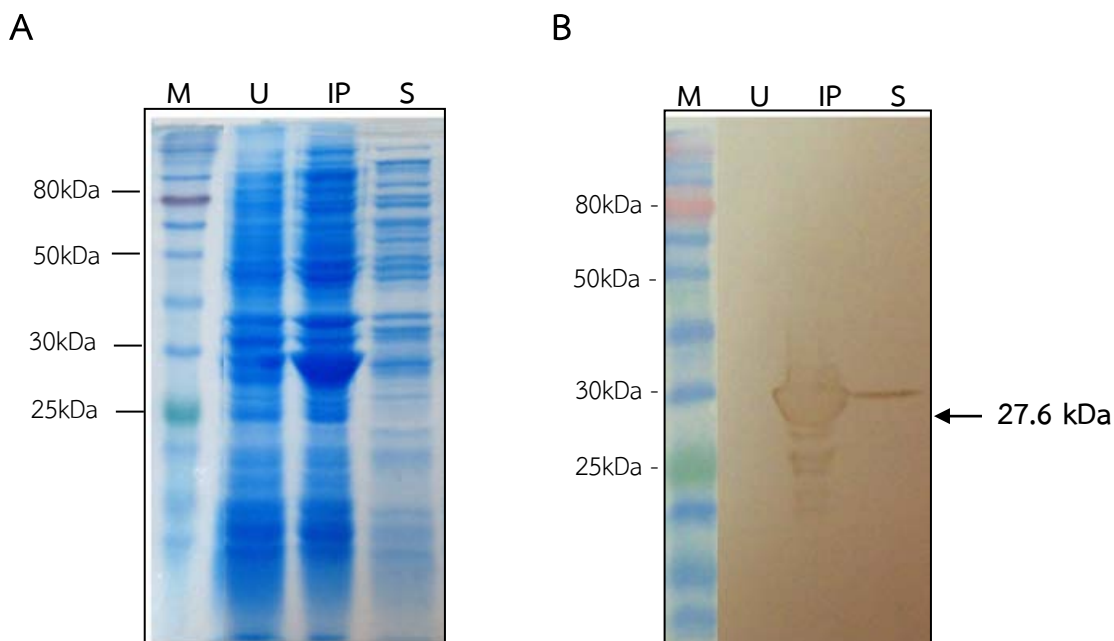


รูปที่ 5 *Wolbachia* crude antigen ที่สกัดแยกได้จากหนองพยาธิหัวใจสุนัข

2. ผลิต recombinant antigens ของแบคทีเรียโวลบาเซีย

2.1 การผลิตโปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP)

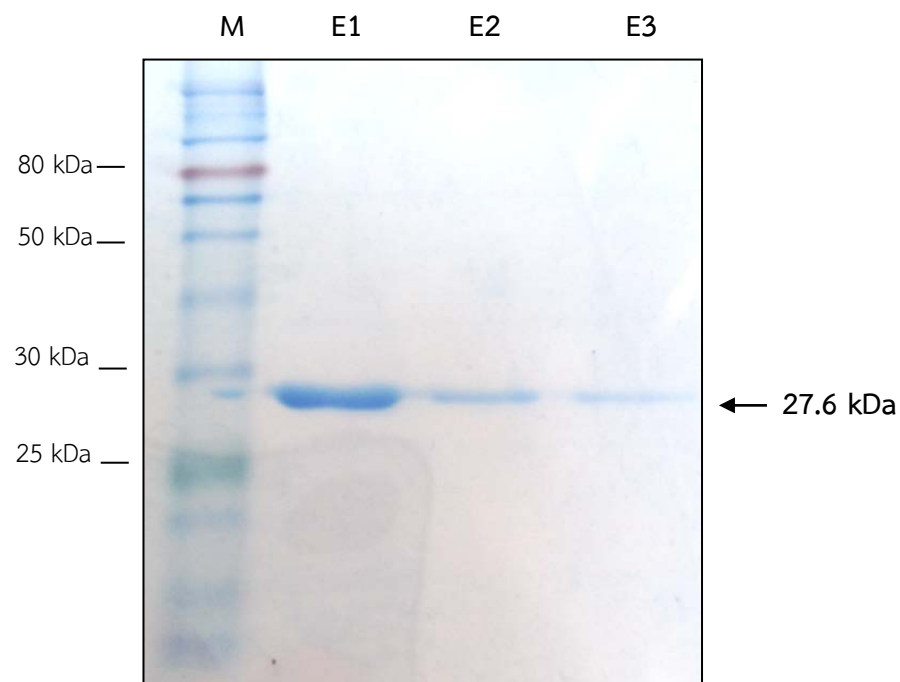
Recombinant *wsp* clone ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ได้ถูกนำมาทำการทดสอบเพื่อหาเวลาและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโปรตีน WSP โดยทำการเลี้ยง *E. coli* ที่มี *wsp* gene ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG แล้วทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่เวลาต่างๆ เก็บส่วนน้ำใส และส่วนตะกอน พบว่ามีการสร้างโปรตีน rWSP อยู่ในรูป inclusion bodies (รูปที่ 6) และมีการสร้างโปรตีนในปริมาณมากที่สุดแต่มีโปรตีนของแบคทีเรียปนเปื้อนน้อยที่สุดที่ 4 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างโปรตีนแล้ว ได้ทำการสร้างโปรตีนจำนวนมากและแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin สามารถแยกโปรตีน WSP ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* ได้ (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 การผลิตโปรตีน WSP โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

(U= uninduce, IP= Insoluble Protein, S= Soluble Protein) แล้วย้อมด้วย

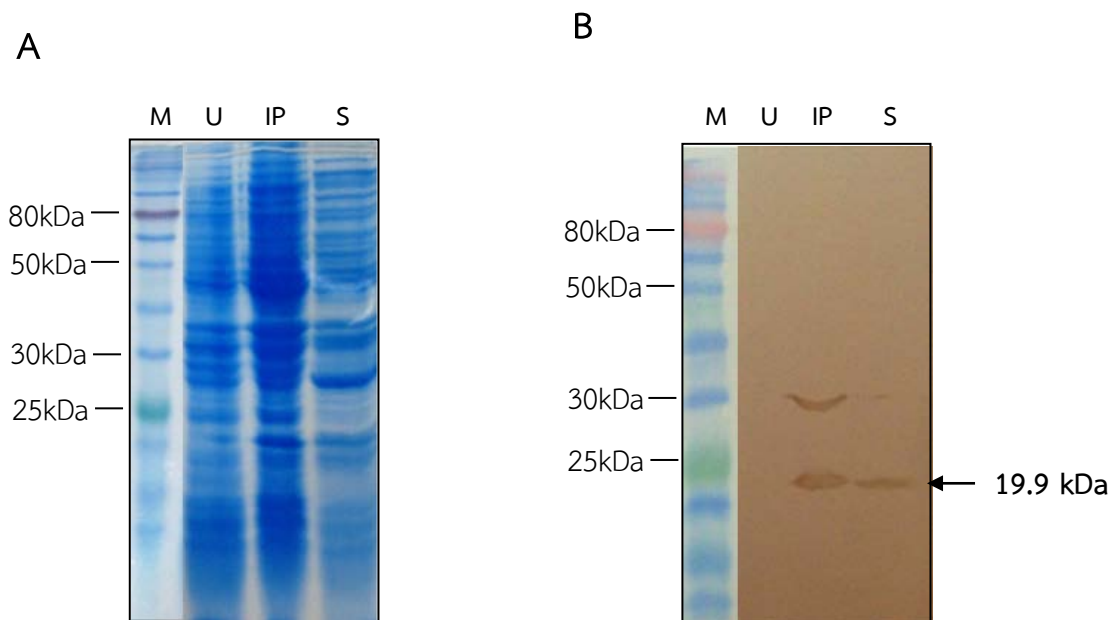
Coomassie blue staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B)



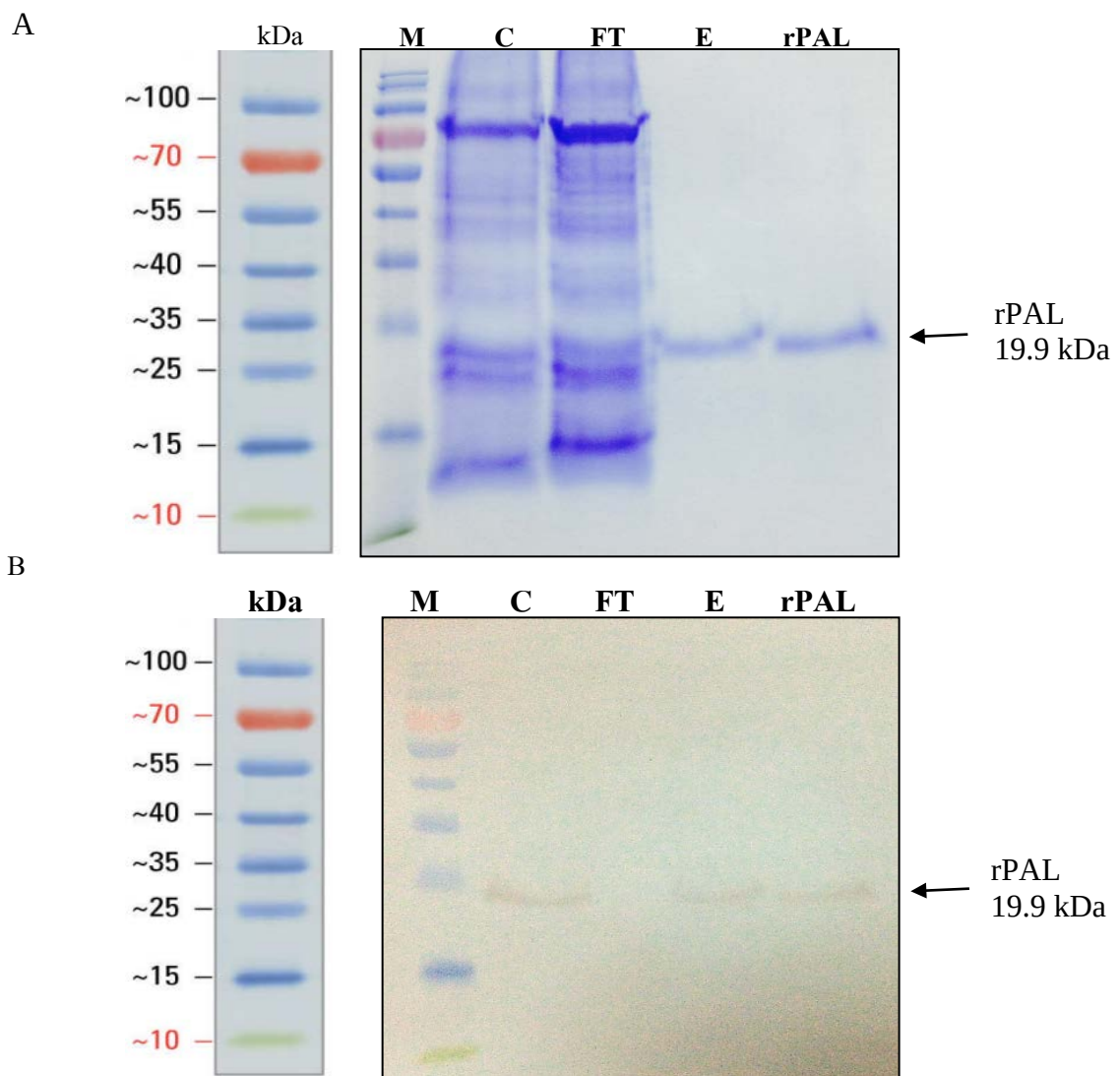
รูปที่ 7 โปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP) ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin นำมาแยกโดย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B) พบโปรตีน WSP ที่ 27.6 kDa
M: Molecular weight marker; E1:Elution 1; E2: Elution 2; E3:Elution 3

2.2 การผลิตโปรตีน peptidoclycan associated lipoprotein (PAL)

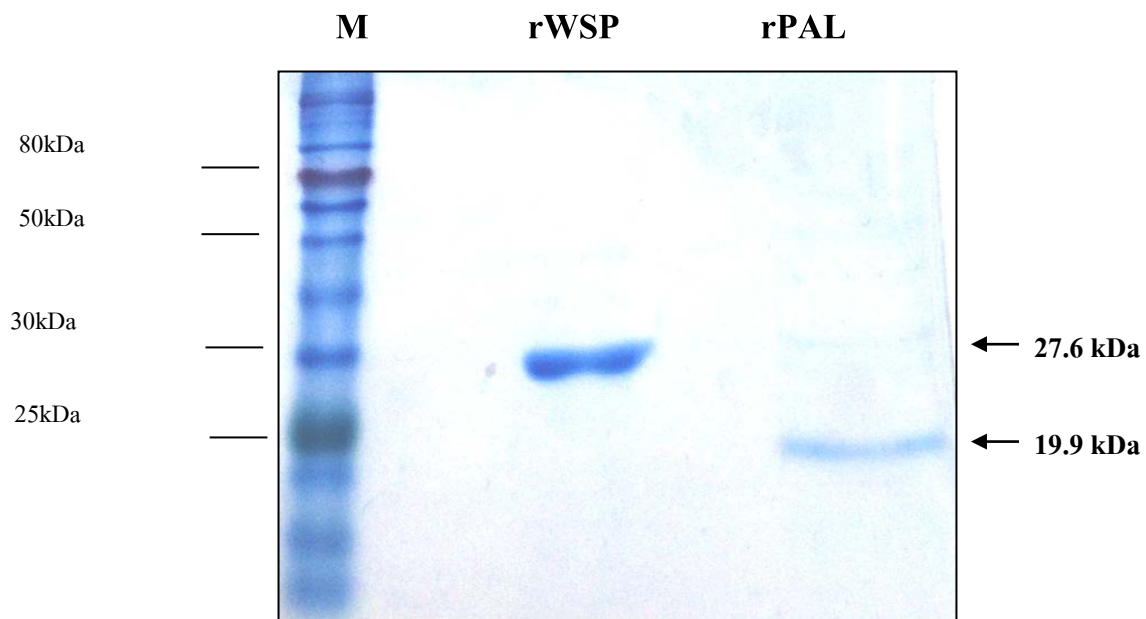
การผลิตโปรตีน PAL ทำเช่นเดียวกับการผลิตโปรตีน WSP ดังวิธีที่กล่าวข้างต้น โดยสรุปคือ Recombinant *pal* clone ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ได้ถูกนำเหนี่ยวนำ (induction) ให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG แล้วทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ โดยเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) และส่วนตะกอน (pellet) เมื่อตรวจโปรตีนในส่วนต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งมีการสร้างโปรตีน PAL อยู่ในรูป inclusion bodies (รูปที่ 8) และมีการผลิตโปรตีนในปริมาณมากที่สุดที่ 4 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำ แล้วได้ทำการสร้างโปรตีนจำนวนมากและแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA column ทำให้สามารถแยกโปรตีน PAL ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* ได้ (รูปที่ 9)



รูปที่ 8 การผลิตโปรตีน PAL โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (U= uninduce, IP= Insoluble Protein, S= Soluble Protein) แล้วย้อมด้วย coomassie blue staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B)



รูปที่ 9 โปรตีน Peptidoglycan associated lioprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์
 ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin นำมาแยกโดย
 SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining (A) และ Western blot
 analysis by anti-His-HRP (B) พบโปรตีน PAL ที่ 19.9 kDa
 M: Molecular weight marker; C: Crude protein; FT: flow through; E: Elute



รูปที่ 10 โปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP) และโปรตีน peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin นำมาแยกโดย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B) พบโปรตีน WSP ที่ 27.6 kDa และ โปรตีน PAL ขนาด 19.9 kDa; M: Molecular weight marker

3. เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ รวมทั้งคนปกติที่อาศัยอยู่ใน แหล่งชุมชนของโรคเท้าช้าง

ได้ทำการสำรวจโรคเท้าช้างในแรงงานชาวพม่าโดยการเจาะเลือดในเวลากลางคืนในหมู่บ้านคลองซื่อ จังหวัดสมุทรสาคร สามารถรวบรวมอาสาสมัครได้จำนวนทั้งสิ้น 40 คน เป็นเพศชาย 18 คน เพศหญิง 22 คน อายุระหว่าง 17-52 ปี และสำรวจโรคเท้าช้างในชาวไทยกะเหรี่ยง ในอำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี โดยการเจาะเลือดในเวลากลางคืน สามารถรวบรวมอาสาสมัครได้จำนวนทั้งสิ้น 51 คน เป็นเพศชาย 21 คน เพศหญิง 30 คน อายุระหว่าง 18-65 ปีและในชาวไทยมอญในหมู่บ้านมอญ ในอำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี โดยการเจาะเลือดในเวลากลางคืน สามารถรวบรวมอาสาสมัครได้จำนวนทั้งสิ้น 51 คนเป็นเพศชาย 23 คน เพศหญิง 28 คน อายุระหว่าง 16-62 ปี (ตารางที่ 1) และได้ทำการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างจากการทำฟิล์มเลือดหนา และฟิล์มเลือดบางเพื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียในเลือดและตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างโดยชุดตรวจวินิจฉัย Og4C3 ELISA อย่างไรก็ตาม ไม่พบผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างจากการวินิจฉัยทั้ง 3 วิธี ในอาสาสมัครทั้ง 142 คน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราความชุกของโรคเท้าช้างโดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิ
โรคเท้าช้าง จำแนกตามพื้นที่ที่สำรวจ

พื้นที่		ประชากรที่สำรวจ (ราย)				จำนวนผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (ราย)
จังหวัด	หมู่บ้าน	ชาย	หญิง	รวม	ช่วงอายุ	
สมุทรสาคร	คลองซื่อ	18	22	40	17-52 ปี	0
กาญจนบุรี	หมู่บ้าน กะเหรี่ยง อ.สังขละบุรี	21	30	51	18-65 ปี	0
	หมู่บ้านมอญ อ.สังขละบุรี	23	28	51	16-62 ปี	0
รวม		62	80	142	16-65 ปี	0

จึงได้ทำการรวบรวมตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคเท้าช้างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ จากการสำรวจโรคเท้าช้างในประชากรจำนวน 7,898 ราย ที่อาศัยอยู่ใน 6 อำเภอซึ่งเป็นแหล่งชุกชุมของโรคเท้าช้าง ได้แก่ อำเภอแม่สอด พบพระ ท่าสองยาง แม่ระมาด อุ่มผาง ในจังหวัดตาก และอำเภอสังขละบุรี ในจังหวัดกาญจนบุรี โดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง โดยวิธี immunochromatographic test (ICT) พบผู้ติดพยาธิโรคเท้าช้างจำนวน 49 ราย คิดเป็นอัตราความชุกของโรคเท้าช้างร้อยละ 0.62 (ตารางที่ 2) มีอายุเฉลี่ย 32.6 ± 17.0 ปี (อายุระหว่าง 4-80 ปี) (ตารางที่ 3) โดยเป็นเพศชาย 36 ราย (73.5%) อายุเฉลี่ย 32.22 ± 17.47 ปี (4-80 ปี) เพศหญิง 13 ราย (26.5%) อายุเฉลี่ย 33.54 ± 16.28 ปี (13-60 ปี) และพบผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพจำนวน 4 ราย คิดเป็นอัตราร้อยละ 0.05 (ตารางที่ 4) อายุเฉลี่ย 57.50 ± 15.55 (อายุระหว่าง 45-80 ปี) เป็นเพศชาย 3 ราย (75%) และเพศหญิง 1 ราย (25%) โดยเป็นผู้มีขาโต 3 ราย และอัมพาตขา 1 ราย รวมตัวอย่างสำหรับการศึกษารังนี้จำนวน 195 ราย แบ่งเป็น ผู้ป่วยโรคเท้าช้างจำนวน 53 ราย และผู้ไม่ติดโรคเท้าช้างจำนวน 142 ราย (ตารางที่ 5) ทั้งนี้อยู่ในระหว่างรวบรวมตัวอย่างผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ

ตารางที่ 2 อัตราความชุกของโรคเท้าช้างโดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง จำแนกตามอำเภอที่สำรวจ

พื้นที่		ประชากรที่สำรวจ (ราย)	จำนวนคนที่ตรวจพบแอนติเจน (ราย)	อัตราความชุก (%)	จำนวนผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพ (ราย)(%)
จังหวัด	อำเภอ				
ตาก	แม่สอด	2,693	29	1.08	2 (0.07)
	ท่าสองยาง	1,984	11	0.55	0
	พบพระ	1,621	0	0	0
	อุ่มผาง	1,133	2	0.18	1 (0.09)
	แม่ระมาด	217	0	0	0
กาญจนบุรี	สังขละบุรี	250	7	2.80	1 (0.4)
รวม		7,898	49	0.62	4 (0.05)

ตารางที่ 3 ข้อมูลพื้นฐาน ของผู้ป่วยที่ตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง

พื้นที่		จำนวนคน ที่ตรวจพบ แอนติเจน (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย $\pm$ SD (ช่วงอายุ)
จังหวัด	อำเภอ		ชาย (%)	หญิง (%)	
ตาก	แม่สอด	29	22 (75.9)	7 (24.1)	24.5 $\pm$ 13.89 (4-55)
	ท่าสองยาง	11	7 (63.6)	4 (36.4)	43.0 $\pm$ 12.53 (22-60)
	อุ้มผาง	2	2 (100)	0	40.5 $\pm$ 17.68 (28-53)
กาญจนบุรี	สังขละบุรี	7	5 (71.4)	2 (28.6)	47.3 $\pm$ 17.69 (28-80)
รวม		49	36 (73.5)	13 (26.5)	32.6 $\pm$ 17.0 (4-80)

ตารางที่ 4 ข้อมูลพื้นฐาน ของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ที่ตรวจพบพยาธิสภาพ

จังหวัด	จำนวนผู้ป่วยที่มี พยาธิสภาพ (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย $\pm$ SD (ช่วงอายุ)	พยาธิสภาพ ที่ตรวจพบ
		ชาย (%)	หญิง (%)		
ตาก	3	2 (66.7)	1 (33.3)	50.0 $\pm$ 5.0 (45-55)	ขาโต
กาญจนบุรี	1	1 (100)	0	80	อัมพาต
รวม	4	3 (75)	1 (25)	57.5 $\pm$ 15.55 (45-80)	

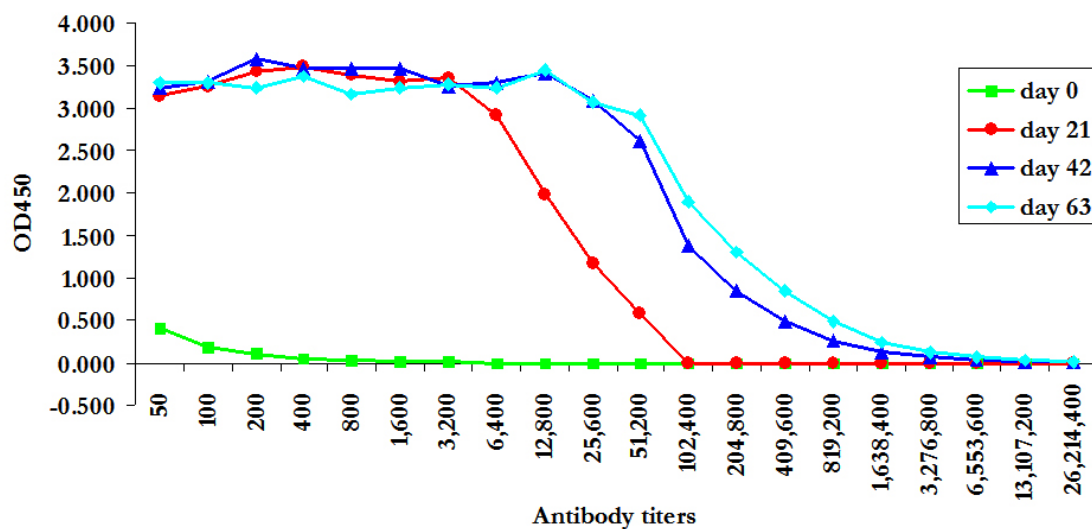
ตารางที่ 5 การจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างจากการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

การเกิด พยาธิสภาพ	การตรวจ แอนติเจน	การตรวจหา ไมโครฟิลาเรีย	จำนวน ไมโครฟิลาเรีย (ตัว/เลือด 1 มล.)	จำนวน (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย $\pm$ SD (ช่วงอายุ)
					ชาย (%)	หญิง (%)	
ไม่มี พยาธิสภาพ	Ag +ve	Mf+ve	17-2,133	16	12 (75.0)	4 (25.0)	26.75 $\pm$ 15.96 (10-55 ปี)
		Mf-ve	0	33	24 (72.7)	9 (27.3)	32.35 $\pm$ 16.02 (4-60 ปี)
	Ag -ve	Mf-ve	0	142	62 (43.7)	80 (56.3)	33.45 $\pm$ 10.38 (16-65 ปี)
มีพยาธิสภาพ	Ag -ve	Mf-ve	0	4	3(75.0)	1 (25.0)	57.50 $\pm$ 15.55 (45-80 ปี)
รวม				195	101 (69.6)	94 (30.4)	37.51 $\pm$ 14.48 (4-80 ปี)

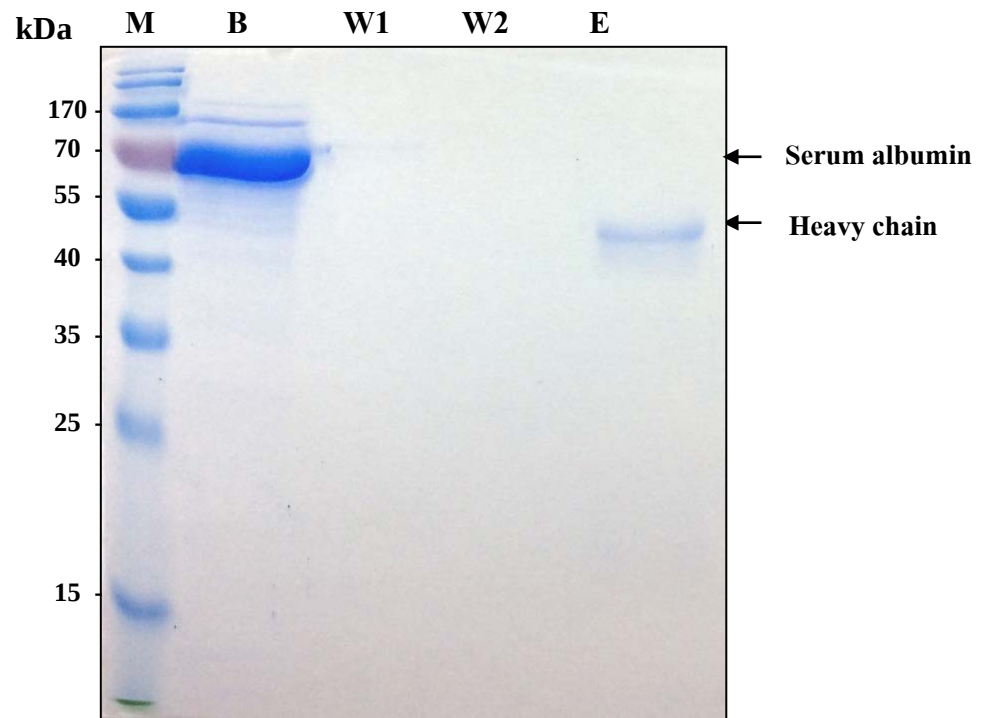
4. การเตรียม polyclonal antibodies ที่จำเพาะต่อ rWSP และ rPAL

4.1 Polyclonal anti-rWSP antibodies

ภายหลังเจาะเก็บซีรัมจากกระต่าย ตรวจวัด antibody titers ของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี indirect ELISA พบการสร้าง anti-rWSP antibodies ในปริมาณสูง ตั้งแต่วันที่ 21 หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก และสูงที่สุดในวันที่ 63 (รูปที่ 11) จึงได้นำซีรัมจากกระต่ายในวันที่ 63 มาทำการแล้วแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ (antibody purification) โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads® Magnetic Beads) และนำมาตรวจหา antibody โดย SDS-PAGE พบว่าภายหลัง purification สามารถตรวจพบ heavy chain ของแอนติบอดีได้ และกำจัด albumin ในซีรัมกระต่ายออกไปได้ (รูปที่ 12) จากนั้นตรวจหาความจำเพาะของ anti-rWSP antibodies โดย western blot analysis (รูปที่ 13)

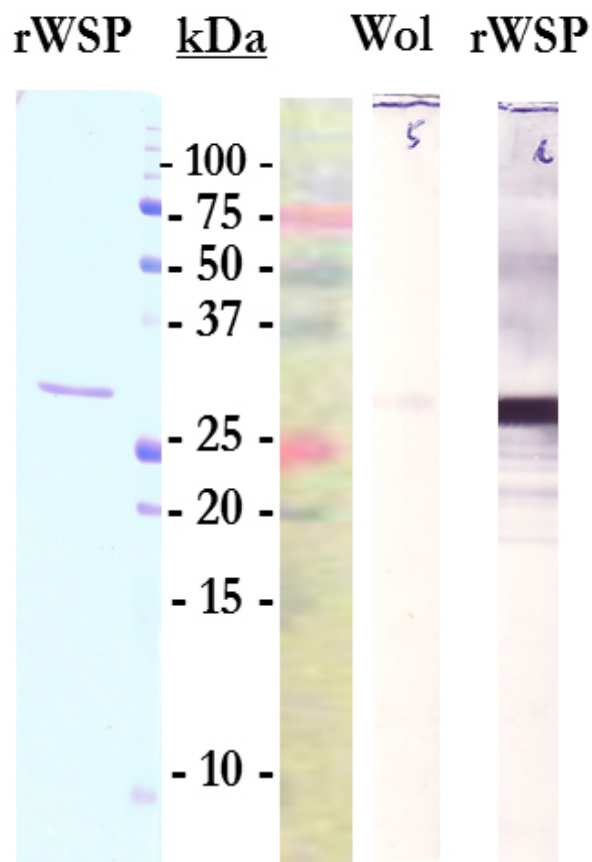


รูปที่ 11 Antibody titers ของ anti-*Wolbachia* Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ indirect ELISA



รูปที่ 12 Antibody purification ของ polyclonal anti-*Wolbachia* Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads[®] Magnetic Beads) นำมาแยกโดย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining

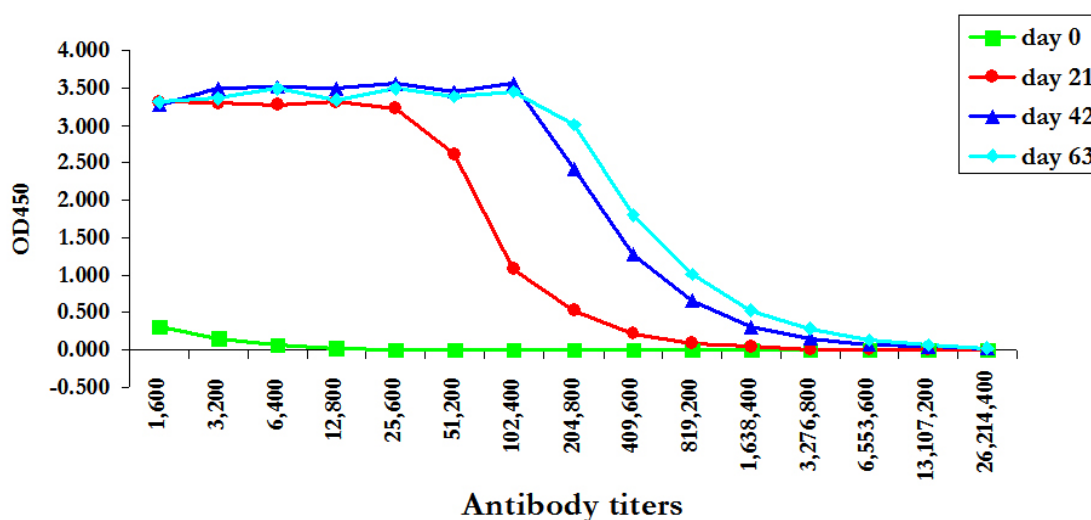
M: Molecular weight marker; B: Before purification; W: Wash; E: Elute



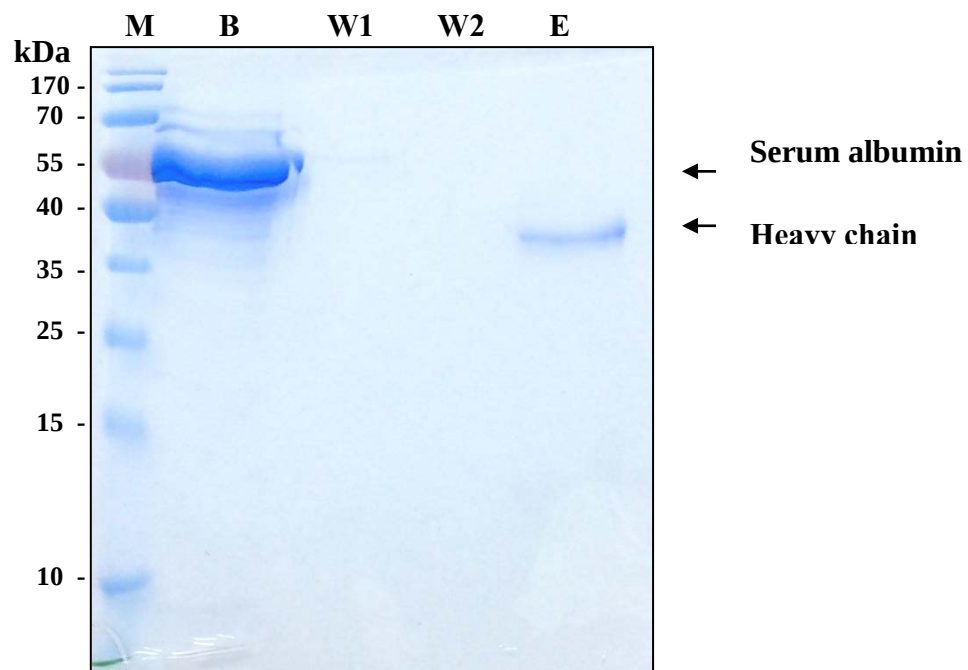
รูปที่ 13 การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal anti-*Wolbachia* Surface Protein (WSP) antibodies โดยวิธี Western blot analysis โดยนำโปรตีน *Wolbachia* crude antigen และ rWSP มาทำ SDS-PAGE และ Western Blot analysis โดยใช้ polyclonal anti-*Wolbachia* Surface Protein (WSP) ที่ได้แยกบริสุทธิ์จากซีรัมของกระต่าย

4.2 Polyclonal anti-rPAL antibodies

ภายหลังเจาะเก็บซีรัมจากกระต่ายที่ฉีดกระตุ้นด้วย antibody peptide แล้วนำมาตรวจวัด antibody titers ของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี indirect ELISA พบการสร้าง anti-rPAL antibodies ในปริมาณสูง ตั้งแต่วันที่ 21 หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก และสูงที่สุดในวันที่ 63 (รูปที่ 14) จึงได้นำซีรัมจากกระต่ายในวันที่ 63 มาทำการแล้วแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ (antibody purification) โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads® Magnetic Beads) และนำมาตรวจหา antibody โดย SDS-PAGE พบว่า ภายหลัง purification สามารถตรวจพบ heavy chain ของแอนติบอดีได้ และกำจัด albumin ในซีรัมกระต่ายออกไปได้ (รูปที่ 15)



รูปที่ 14 Antibody titers ของ anti-peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) antibodies โดยใช้ indirect ELISA



รูปที่ 15 Antibody purification ของ polyclonal anti-peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads[®] Magnetic Beads) นำมาแยกโดย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining
M: Molecular weight marker; B: Before purification; W: Wash; E: Elute

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โรคเท้าช้างเป็นโรคที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้เป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไปเป็นโรคแรกภายในปี พ.ศ. 2563 ทั้งนี้ โครงการกำจัดโรคเท้าช้างขององค์การอนามัยโลกได้กำหนดเป้าหมายในการควบคุมโรคให้มีอัตราความชุกของการติดเชื้อเหลืออยู่ร้อยละ 1 จากการตรวจแอนติเจนที่จำเพาะ หรือร้อยละ 0.2 เมื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการประเมินผลการสำเร็จของโครงการจำเป็นต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่มีความไวสูง เพื่อสามารถประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของโรคได้ สำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้จัดให้มีโครงการกำจัดโรคเท้าช้างในปี พ.ศ. 2545-2549 จากข้อจำกัดทั้งด้านภูมิประเทศ ภูมิอากาศ การเข้าถึงแหล่งชุกชุมของโรค การเข้าออกของประชากรในแหล่งชุกชุมของโรค การมีแรงงานต่างด้าวที่เป็นโรคเท้าช้างอยู่เป็นจำนวนมากและกระจายอยู่ตามแหล่งชุมชนต่างๆ ของไทย ตลอดจนข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัย โดยในหลายพื้นที่สามารถทำได้เฉพาะการตรวจหาไมโครฟิลาเรีย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่ำแม้จะมีความจำเพาะสูง ทำให้การประเมินสถานการณ์โรคเท้าช้างในปัจจุบันมีแนวโน้มว่าจะต่ำกว่าความเป็นจริง

ถึงแม้ว่าการตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดจะเป็นการวินิจฉัยที่ให้ผลแน่นอน แต่มีผู้ป่วยบางรายที่มีการติดเชื้อแต่ไม่สามารถตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดได้ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ผู้ป่วยติดเชื้อโรคเท้าช้างเพียงเพศเดียวทำให้พยาธิไม่มีการสืบพันธุ์ ผู้ป่วยติดเชื้อในระยะแรกหรืออยู่ในช่วงระยะก่อนปรากฏอาการ ที่เรียกว่า prepatent period ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง เพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้มีประสิทธิภาพและรวดเร็วขึ้น โดยมีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างแต่ละชนิดมาใช้ ปัจจุบันมีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิด ที่ใช้กันแพร่หลาย ซึ่งที่มีความไวและความจำเพาะต่อการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเท้าช้างจาก *W. bancrofti* สูงคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด AD12.1 และ Og4C3

การตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้าง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด Og4C3 เป็นตัวเคลือบในจานหลุมทดสอบ ในรูปแบบ ELISA ให้ความไวร้อยละ 95.8-100 และให้ความจำเพาะถึงร้อยละ 100 สำหรับการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด AD12.1 ใช้วิธีที่อาศัยหลักการโครมาโตกราฟีด้านภูมิคุ้มกันวิทยา ที่เรียกว่า immunochromatographic test (ITC) วิธีนี้เหมาะสมในการตรวจภาคสนามเพราะทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว รู้ผลการตรวจได้ภายในเวลาประมาณ 10-15 นาที และไม่ต้องอาศัยความชำนาญหรือเครื่องมือเป็นพิเศษ อีกทั้งมีความไวและความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 95.7-97 และร้อยละ 99-100

ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ชุดตรวจวินิจฉัยดังกล่าวสามารถตรวจวินิจฉัยได้เฉพาะโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* เท่านั้น สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ด้วยวิธี ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *B. malayi* ชื่อ 17E10 ให้ความไวในการตรวจวินิจฉัยถึงร้อยละ 93.3 อย่างไรก็ตาม ยังคงพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับพยาธิหัวใจสุนัข (*Dirofilaria immitis*) ได้ และไม่มีจำหน่ายโดยทั่วไป

ถึงแม้ว่าจะมีการนำวิธีการวินิจฉัยซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงมาใช้ โดยเฉพาะการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะในการวินิจฉัยโรคเท้าช้างจาก *W. bancrofti* แต่เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงมีการใช้ประเมินสถานการณ์ในบางพื้นที่เท่านั้น ปัจจุบัน การพัฒนาวิธีการวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา ทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำและจำเพาะสูง สามารถตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของพยาธิฟิลาเรียรวมทั้งพยาธิโรคเท้าช้างได้ในการทดสอบครั้งเดียว แต่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง ผู้ทำการทดสอบต้องได้รับการอบรมให้สามารถปฏิบัติงานได้ถูกต้องและเข้าใจหลักการแปลผล ตลอดจนมีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ ดังนั้น การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างซึ่งให้ความไวและความจำเพาะสูงที่สามารถใช้ได้ในพื้นที่ภาคสนามและมีความคุ้มค่า และสามารถผลิตได้เองภายในประเทศจะมีประโยชน์อย่างยิ่งเพื่อประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของโรค และทำให้สามารถวางแผนการควบคุมและกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการทบทวนวรรณกรรมตลอดจนค้นหาจากฐานข้อมูลของแบคทีเรียโวลบาเซียได้พบโปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) และ peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) คาดว่าเป็นโปรตีนหลักของแบคทีเรียโวลบาเซียที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง จึงได้ทำการโคลนและสร้างโปรตีนบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมาผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าวและพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่สามารถตรวจได้ทั้งโรคเท้าช้างจาก *W. bancrofti* และ *B. malayi* ซึ่งเป็นชุดตรวจในรูปแบบ lateral flow strip สามารถตรวจวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็วสามารถใช้ในภาคสนามได้

โปรตีน WSP และ PAL ที่ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกมานี้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ทำการวัดระดับแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP และ PAL ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเท้าช้างซึ่งมีอาการทางคลินิกต่างๆ พบว่าแอนติบอดีชนิด IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL มีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดเท่านั้น ไม่พบการสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย และไม่พบความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PAL กับการเกิดพยาธิสภาพเรื้อรังของโรคเท้าช้าง ในขณะที่ผู้ป่วยที่

มีการติดเชื้อปัจจุบันมีการสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG3 ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP นอกจากนี้ แอนติบอดีชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP ยังมีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีพยาธิสภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการพบแอนติบอดีชนิด IgG1 ที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพเรื้อรังของโรคเท้าช้าง ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาพบการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP มีความสัมพันธ์กับการที่สัตว์ติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในสัตว์ ทั้งนี้ พบการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ในแมวที่ติดเชื้อพยาธิ *D. immitis* สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ในคน พบว่าสัมพันธ์กับการเกิดโรค โดยในผู้ป่วยโรค pulmonary dirofilariasis จากการติดเชื้อพยาธิ *D. immitis* จะมีระดับของแอนติบอดีต่อ WSP สูงกว่าคนปกติในพื้นที่เดียวกัน นอกจากนี้ การสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP ยังมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้าง โดยพบการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP สัมพันธ์กับการเกิดภาวะระบบน้ำเหลืองอักเสบในลิงที่ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* และในผู้ป่วยโรคเท้าช้างจากพยาธิ *W. bancrofti* ดังนั้นโปรตีน WSP และ PAL จึงน่าจะเป็นโปรตีนที่มีความเป็นแอนติเจนสูงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยได้เป็นอย่างดี

บรรณานุกรม

- 1) Molyneux DH, Bradley M, Hoerauf A, Kyelem D, Taylor MJ. (2003) Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. Trends in parasitology. 19:516-22.
- 2) Filariasis Division. (2001) CDC Department, Ministry of Public Health, Thailand. Annual Report.
- 3) Bhumiratana A, Koyadun S, Suvannadabba S, Karnjanopas K, Rojanapremsuk J, Buddhirakkul P, Tantiwattanasup W. (1999) Field trial of the ICT filariasis for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infections in an endemic population of Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 30:562-8.
- 4) Triteeraprapab S, Karnjanopas K, Porksakorn C, Sai-Ngam A, Yentakam S, Loymak S. (2001) Lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* in an endemic area of Narathiwat Province, southern of Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. 84 Suppl 1:S182-8.
- 5) Nuchprayoon S, Yentakam S, Sangprakarn S, Junpee A. (2001) Endemic bancroftian filariasis in Thailand: detection by Og4C3 antigen capture ELISA and the polymerase chain reaction. Journal of the Medical Association of Thailand. 84:1300-7.
- 6) Nuchprayoon S, Sanprasert V, Porksakorn C, Nuchprayoon I. (2003) Bancroftian filariasis in an endemic area of Thailand-Myanmar border. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21: 179-188.
- 7) Triteeraprapab S, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. (1998) *Wuchereria bancrofti*-specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. Chulalongkorn Medical Journal. 42:267-77.
- 8) Triteeraprapab S, Karnjanopas K, Porksakorn C, Sai-Ngam A, Yentakam S, Loymak S. (2001a) Lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* in an endemic area of Narathiwat Province, southern of Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. 84 Suppl 1:S182-8.
- 9) Nuchprayoon S, Yentakam S, Sangprakarn S, Junpee A. (2001) Endemic bancroftian filariasis in Thailand: detection by Og4C3 antigen capture ELISA and the polymerase chain reaction. Journal of the Medical Association of Thailand. 84:1300-7.
- 10) Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C. (1995) Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. Molecular and biochemical parasitology. 74:2 223-7.

- 11) Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML. (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences. 265:2407-13.
- 12) Werren, JH. (1997) Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology. 42:587-609.
- 13) Genchi C, Sacchi L, Bandi C, Venco L. (1998) Preliminary results on the effect of tetracycline on the embryogenesis and symbiotic bacteria (*Wolbachia*) of *Dirofilaria immitis*. An update and discussion. Parassitologia. 40:247-9.
- 14) Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. (1999) Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. International journal for parasitology. 29:357-64.
- 15) Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Duhrsen K, Blaxter ML, Buttner DW, Gallin MY, Al-Qaoud KM, Lucius R, Fleischer B. (1999) Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. The Journal of clinical investigation. 103:11-8.
- 16) Porksakorn C, Nuchprayoon S, Scott AL. (2003) Detection of immunodominant molecules derived from *Wolbachia* from the filarial nematode *Brugia malayi*. Program and abstracts of the 52nd annual meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). 69:460.
- 17) Simon F, Prieto G, Morchon R, Bazzocchi C, Bandi C, Genchi C. (2003) Immunoglobulin G antibodies against the endosymbionts of filarial nematodes (*Wolbachia*) in patients with pulmonary dirofilariasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 10: 180-181.
- 18) Bazzocchi C, Ceciliani F, McCall JW, Ricci I, Genchi C, Bandi C. (2000) Antigenic role of the endosymbionts of filarial nematodes: IgG response against the *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilaria immitis*. Proc R Soc Lond B. 267: 2511-2516.
- 19) Punkosdy GA, Dennis VA, Lasater BL, Tzertzis G, Foster JM, Lammie PJ. (2001) Detection of serum IgG antibodies specific for *Wolbachia* surface protein in rhesus monkeys infected with *Brugia malayi*. The Journal of Infectious Diseases. 184: 385-389.
- 20) Ramsden JJ. What is nanotechnology? Nanotechnology perception. 2005;1: 3-15.
- 21) Zhou J, Ralston J, Sedev R, David A. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. Journal of Colloid and Interface Science. 2009;331: 251–62.
- 22) Baptista P, Pereira E, Eaton P. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. ABC. 2007;391: 943-50.

- 23) Modified from www.nanoprobes.com/Vol8_Iss5.html.
- 24) Sato K, Hosokawa K, Maeda M. Colorimetric biosensors based on DNA-nanoparticle conjugates. *JSAC*. 2007;23: 17-20.
- 25) Ackerson CJ, Sykes MT, Kornberg RD. Defined DNA/nanoparticle conjugates. *PNAS*. 2005;102: 13383-5.
- 26) Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J Amer Chem Soc*. 1998;120: 1959-64.
- 27) Reynolds AJ, Haines AH, Russell DA. Gold glyconanoparticles for mimics and measurement of metal ion-Mediated carbohydrate-carbohydrate interactions. *Langmuir*. 2006;22: 1156-63.
- 28) Condon A. Designed DNA molecules: principles and applications of molecular nanotechnology. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7: 565-75.
- 29) Pingarro JM, Yañez-Sedeno P, lez-Cortes AG. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*. 2008;53: 5848–66.
- 30) Sanprasert V, Sungpradit S, Nuchprayoon S. 2010. *Wolbachia* isolation by fractioned centrifugation from *Dirofilaria immitis* for protein analysis. *Chulalongkorn Medical Journal*. 54(6): 537-548.
- 31) Nuchprayoon S, Sanprasert V, Porksakorn C, Nuchprayoon I. 2003 Bancroftian filariasis in an endemic area of Thailand-Myanmar border. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 179-188.
- 32) Nuchprayoon S, Porksakorn C, Junpee A, Sanprasert V. 2003 Comparative Assessment of the Og4C3 ELISA to ICT Filariasis Test: A study in Myanmar migrants of Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 253-257.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย) อ.ดร.วิวรพรรณ สรรประเสริฐ
(ภาษาอังกฤษ) Vivornpun Sanprasert, Ph.D.
2. หมายเลขประจำตัวประชาชน
3100601868092
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
อาจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3567 โทรสาร -
E-mail: vivornpun@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2544
วิทยาศาสตรดุษฎี บัณฑิต	สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2552

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

-

7. ประสบการณ์วิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

-

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Nuchprayoon S, Sanprasert V, Suntravat M, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. Parasitology Research. 91: 137–143.

- Nuchprayoon S, Porksakorn C, Junpee A, **Sanprasert V**, Poovorawan Y. 2003 Comparative assessment of an Og4C3 ELISA and an ICT filariasis test: A study of Myanmar in Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 253-257.
- Nuchprayoon S, **Sanprasert V**, Porksakorn C, Nuchprayoon I. 2003 Prevalence of bancroftian filariasis on the Thai-Myanmar border. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21(3):179-88.
- **Sanprasert V**, Jaratsing P, Nuchprayoon I, Nuchprayoon S. 2005 Computer-assisted instruction in parasitology: A cross-over design. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4): S214-S219.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Kaewzaithim S, Saksirisampant W. 2008. Screening for intestinal parasitic infections among Myanmar migrant workers in Thai food industry: A high-risk transmission. *Journal of Immigrant and Minority Health*. 11(2):115-121.
- **Sanprasert V**, Sungpradit S, Nuchprayoon S. 2010. *Wolbachia* isolation by fractioned centrifugation from *Dirofilaria immitis* for protein analysis. *Chulalongkorn Medical Journal* 2010; 54(6): 537-548.
- Nuchprayoon S, **Sanprasert V**, Jaratsing P, Jaijakul S. 2010. A case report of severe adverse reactions following diethylcarbamazine treatment of lymphatic filariasis. *Chulalongkorn Medical Journal* 2010; 54(6): 593-604.
- Tiawsirisup S, Thanapaisarnkit T, Varatorn E, Apichonpongsa T, Bumpenkiattikun N, Rattanapuchpong S, Chungpiwat S, **Sanprasert V**, Nuchprayoon S. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection and immunoglobulin G antibodies against *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in stray dogs in Bangkok, Thailand. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 2010; 40(2): 165-170.
- **Sanprasert V**, Sujariyakul A, Nuchprayoon S. A single dose of doxycycline in combination with diethylcarbamazine for treatment of bancroftian filariasis. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2010; 41(4):800-812.
- Junpee A, Tencomnao T, **Sanprasert V**, Nuchprayoon S. Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis. *Parasitology Research* 2010; 107(4): 807-816.

- Semnani RT, Mahapatra L, Moore V, **Sanprasert V**, Nutman TB. Functional and phenotypic characteristics of alternative activation induced in human monocytes by IL-4 or the parasitic nematode *Brugia malayi*. Infection and Immunity 2011; 79(10): 3957-3965.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- “Genetic variation of *Blastocystis* sp. in Thais and the association with clinical symptoms” เป็นผู้วิจัยหลัก
- “Nanodetection of lymphatic filariasis” เป็นผู้วิจัยหลัก

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. **ชื่อผู้วิจัยหลัก** (ภาษาไทย) ศ.ดร.พญ. สุรางค์ นุชประยูร
(ภาษาอังกฤษ) Surang Nuchprayoon M.D., Ph.D., M.P.H.
2. **หมายเลขประจำตัวประชาชน**
3100100774745
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน**
ศาสตราจารย์
4. **หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail**
หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ. พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 0-2256-4387 โทรสาร 02-252-5944
E-mail: fmedstt@md.chula.ac.th
5. **ประวัติการศึกษา**

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม)		จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2530
Master of Public Health	Immunology and infectious Diseases	Johns Hopkins University, USA	2535
Doctor of Philosophy	Molecular Parasitology and Immunology	Johns Hopkins University, USA	2538
อนุมัติบัตร	พยาธิวิทยาคลินิก	แพทยสภา	2546

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

Molecular Parasitology and Immunology

Lymphatic filariasis

7. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

6.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

6.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

- 6.2.1 “Early detection of bancroftian filariasis in children and young individuals using IgG4 assays” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.2 “การวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่เกิดจากเชื้อ *Wuchereria bancrofti* ในระยะแรกเริ่มโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและการตรวจทางน้ำเลี้ยง” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.3 “Polymerase chain reaction-based detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus*” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.4 “บทบาทของโวลบาเกียในการเกิดพยาธิสภาพผลข้างเคียงต่อยารักษาโรคเท้าช้าง (The role of *Wolbachia* in the pathogenesis of chemotherapy-induced adverse reactions in lymphatic filariasis)” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.5 “การศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti* ในคนไทยและแรงงานอพยพ (Study and differentiation of *Wuchereria bancrofti* strains in Thais and migrant workers)” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.6 “ความสัมพันธ์ของแอนติบอดี IgG ชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) ในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (Association between specific anti-WSP IgG subclasses and clinical manifestation in lymphatic filariasis patients)” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.7 “ผลของยาDoxycycline ในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาและลดอาการข้างเคียงของยา Diethylcarbamazine (DEC) ในการรักษาผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (Effects of doxycycline on increasing of efficacy and decreasing of adverse drug reactions from treatment of lymphatic filariasis patients with Diethylcarbamazine (DEC))” (หัวหน้าโครงการ)
- 6.2.8 “ผลของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *Wolbachia* spp. เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคเท้าช้าง (Effects of antimicrobial agents against *Wolbachia* spp. for treatment of filariasis)” (ผู้ร่วมวิจัย)

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- **Triteeraprapab S.** 1989 *Blastocystis hominis*: A neglected intestinal protozoan parasite. Chulalongkorn Medical Journal. 33: 343-348.
- **Triteeraprapab S**, Richie TL, Tuan RS, Shepley KJ, Dinman JD, Neubert TA, and Scott AL. 1995 Molecular cloning of a gene expressed during early embryonic development in *Onchocerca volvulus*. Molecular and Biochemical Parasitology. 69: 161-171.
- **Triteeraprapab S**, 1997 “Want to do research.....Who can help” Chulalongkorn Medical Journal. 41: 345-346.
- **Triteeraprapab S.** 1997 update in lymphatic filariasis: a re-emerging disease of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 611-622.
- **Triteeraprapab S**, Jongwutiwes S, Chanthachume N. 1997 The prevalence rates of human intestinal parasites in Mae-la-moong, Umphang, Tak province, a rural area of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 649-658.
- **Triteeraprapab S.** 1998 New vaccine introduction: Summary from “The First Asia-Pacific Regional Consultation on Economic and Policy Considerations in New Vaccine Introduction” Chulalongkorn Medical Journal. 42(10): 925-933.
- **Triteeraprapab S**, Nuchprayoon I. 1998 Eosinophilia, anemia, and parasitism in a rural region of Northwest Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 29(3): 584-590.
- **Triteeraprapab S**, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. 1998 *Wuchereria bancrofti*-specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. Chulalongkorn Medical Journal. 42: 267-277.
- **Triteeraprapab S**, and Songtrus J. 1999 High prevalence of bancroftian filariasis in Myanmar migrants: A study in Mae sot, Tak province, Thailand. Journal of Medical Association of Thailand. 82: 734-739.
- **Triteeraprapab S**, Akraovorn P, Promtorng J, Chuenta K. 1999 High prevalence of hookworm infection in a population of Northeastern Thailand after an opisthorchiasis control program. Chulalongkorn Medical Journal. 43(2): 99-108.

- **Triteeraprapab S**, Thumpanyawat B, Nuchprayoon I and Thanamun B. 2000 Eosinophilia with low prevalence of parasitism in a rural area of Maha Sarakham after yearly mass treatment with mebendazole. *Chulalongkorn Medical Journal*. 44(6): 423-432.
- **Triteeraprapab S**, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y and Scott AL. 2000 Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex quinquefasciatus*: Establishing the potential for urban filariasis in Thailand. *Epidemiology and Infection*. 125(1): 207-212.
- **Triteeraprapab S**, Nuchprayoon I, C Porksakorn, Poovorawan Y and Scott AL. 2000 High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants of Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 95(5): 535-538.
- **Triteeraprapab S**, Karnjanopas K, Porksakorn C, Sai-ngam A, Yentakan S and Loymak S. 2001 Lymphatic filariasis caused by *Brugia malayi* in an endemic area of Narathiwat province, Southern of Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. June 84 (suppl 1): S182-S188.
- Nuchprayoon I, Sai-Engam A, Suntrarachun, S, Noiphrom J, Pakmanee N, Chanhom L, **Nuchprayoon S**, Sitprija V. 2001 Molecular Cloning of Phospholipase A2 from a Thai Russell's Viper Venom Gland cDNA Library. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 84 (suppl 1): S99-S105.
- Saksirisampant W, Chawengkiattikul R, Kraivichain K, **Nuchprayoon S**. 2001 Specific IgE Antibody Responses to Somatic and Excretory-Secretory Antigens of Third Stage *G. spinigerum* Larvae in Human Gnathostomiasis. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 84 (suppl 1): S173-S181.
- **Nuchprayoon S**, Yentakam S, Sangprakarn S and Junpee A. 2001 Endemic Bancroftian filariasis in Thailand : detection by Og4C3 antigen capture ELISA and the Polymerase Chain Reaction. *Journal of the Medical Association of Thailand*. September 84 (9): 1300-1307.
- Saksirisampant W, Kulkaew K, **Nuchprayoon S**, Yentakham S and Wiwanitkit V. 2002 A survey of the infective larvae of *Gnathostoma spinigerum* in swamp eels bought in a local market in Bangkok, Thailand. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 96(2): 191-195.

- **Nuchprayoon S**, Siriyasatien P, Kraivichian K, Porksakorn C, Nuchproayoon I. 2002 Prevalence of Parasitic Infections among Thai Patients at the King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. June 85(Suppl 1) :S415-S423.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S**, Wiwanitkit V, Kraivichian K, Suwansaksri J. 2002 Prevalence and intensity of third stage *Gnathostoma spinigerum* larvae in swamp eels sold in three large markets in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. June 33 (Suppl 3): 60-62.
- Saksirisampant W, Wiwanitkit V, Akrobavorn P, **Nuchprayoon S**. 2002 Parasitic infections in Thai workers that pursue overseas employment : The need for a screening program. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. Vol 33 (Suppl 3) :110-112.
- Nuchprayoon I, Sanpavat S, **Nuchprayoon S**. (2002) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Hum Mutation* 19(2):185.
- Siriyasatien P, Yingyourd P, **Nuchprayoon S**. 2003 Efficacy of Albendazole against early and late stage of *Trichinella spiralis* infection in mice. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 86 (Suppl 2) : S257-S262.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S**, Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A. 2003 Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani Province. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 86 (Suppl 2) : S263-S270.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Suntravat M, Kraivichian K, Saksirisampant W, Nuchprayoon I. 2003 Study of specific IgG subclass antibodies for diagnosis of *Gnathostoma spinigerum*. *Parasitology Research*. 91:137-143.
- **Nuchprayoon S**, Sangprakarn S, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Poovorawan Y. 2003 Differentiation of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by PCR-RFLP of ITS-1 and ITS-2. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 34 (Suppl 2) : 67-73.

- **Nuchprayoon S**, Porksakorn C, Junpee A, Sangprakarn S, Poovorawan Y. 2003 Comparative assessment of an Og4C3 ELISA and an ICT filariasis test: A study of Myanmar in Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21: 253-257.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Porksakorn C, Nuchprayoon I. 2003 Prevalence of Brancroftian Filariasis on the Thai-Myanmar Border. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21:179-188.
- Sritangratanakul S, **Nuchprayoon S**, Nuchprayoon I. 2004 Pneumocystis Pneumonia: An Update. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 87 (Suppl 2) : S309-S417.
- Kraivichian K, **Nuchprayoon S**, Sitichalernchai P, Chaicumpa W, Yentakam S. 2004 Treatment of cutaneous Gnathostomiasis with ivermectin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71(5) : 623-628.
- Saksirisampant W, Prownebon J, Kammarnee P, Thaisom S, Yentakam S, **Nuchprayoon S**. 2004 Prevalence of Paratism among Students of the Karen Hill-Tribe in Mae Chame District, Chaing Mai Province, Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 87 (Suppl 2) : S278-S283.
- Jaijakul S, **Nuchprayoon S**. 2005 Treatment of lymphatic filariasis: An update. *Chulalongkorn Medical Journal*. July 49: 401-421.
- Sanprasert V, jaratsing P, Nuchprayoon I, **Nuchprayoon S**. 2005 Computer-Assisted Instruction in Parasitology: A Cross-Over Design. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4) : S214-S219.
- Jaijakul S, Saksirisampant W, Prownebon J, Junpee A, Yenthakam S, Mungthin M, Leelayoova S, **Nuchprayoon S**. 2005 *Pneumocystis jiroveci* in HIV/AIDS Patients: Detection by FTA Filter Paper together with PCR in Noninvasive Induced Sputum Specimens. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4) : S294-S299.
- Siriyasatein P, Tangthongchaiwiriya K, Kraivichian K, **Nuchprayoon S**, Tawatsin A, Tahvara U. 2005 Decrease of Mosquito Salivary Gland Proteins after a Blood Meal: An Implication for Pathogenesis of Mosquito Bite Allergy. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (Suppl 4) : S255-S259.
- Charuruks N, Milintagas A, Watanaaboonyoungcharoen P, Kalayanachati A, **Nuchprayoon S**. 2005 Annual Laboratory Checkup: Early Signs of Health Promblems in

Young and Middle-Age Adults. Bnormal Results of Annual Laboratory Checkup in Young Adults. 36 (3) : 769-774.

- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers PCR and RFLP analysis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 73(5): 895-900.
- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Nithiuthai S, Chungpivat S, Suvannadabba S, Poovorawan Y. 2006 Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1. Veterinary Parasitology. 140: 366-372.
- Saksirisampant W, Prownebon J, Kulkumthorn M, Yenthakam S, Janpla S, **Nuchprayoon S**. 2006 Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in the central region of Thailand. J Med Assoc Thai. 2006 Nov;89(11):1928-33.
- Porksakorn C, **Nuchprayoon S**, Park K, Scott AL. 2007 Proinflammatory cytokine gene expression by murine macrophages in response to *Brugia malayi* *Wolbachia* surface protein. Mediators of Inflammation. 2007:84318.
- **Nuchprayoon S**, Junpee A, Poovorawan Y. 2007 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria Journal. 6(1):6.
- **Nuchprayoon S**, Saksirisampant W, Jaijakul S, Nuchprayoon I. 2007. Flinders technology associates (FTA) filter paper-based DNA extraction with polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Pneumocystis jirovecii* from respiratory specimens of immunocompromised patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 21(6): 382-386.
- Tiawsirisup S, Sripatranusorn S, Oraveerakul K, **Nuchprayoon S**. 2008. Distribution of mosquito (Diptera: Culicidae) species and *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections during the bird immigration season in Pathumthani province, central Thailand. Parasitology Research. 102(4): 731-735.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Kaewzaithim S, Saksirisampant W. 2008. Screening for intestinal parasitic infections among Myanmar migrant workers in Thai food industry: A high-risk transmission. Journal of Immigrant and Minority Health. 11(2):115-121.
- **Nuchprayoon S**. DNA-based diagnosis of lymphatic filariasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2009; 40(5):904-13.

- Junpee A, Tencomnao T, Sanprasert V, **Nuchprayoon S**. Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis. *Parasitol Res*. 2010; 107(4):807-16.
- Sanprasert V, Sujariyakul A, **Nuchprayoon S**. A single dose of doxycycline in combination with diethylcarbamazine for treatment of bancroftian filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2010; 41(4):800-12.
- Tiawsirisup S, **Nuchprayoon S**. Mosquito distribution and Japanese encephalitis virus infection in the immigration bird (Asian open-billed stork) nested area in Pathum Thani province, central Thailand. *Parasitol Res*. 2010; 106(4):907-10.
- Saksirisampant W, **Nuchprayoon S**, Pradniwat P, Lamchuan D. 2010. Boeck and Drbohlav Locke egg serum medium for detection of *Blastocystis hominis*. *Chulalongkorn Medical Journal*. 54(6): 527-36.
- Sanprasert V, Sungpradit S, **Nuchprayoon S**. 2010. *Wolbachia* isolation by fractioned centrifugation from *Dirofilaria immitis* for protein analysis. *Chulalongkorn Medical Journal*. 54(6): 537-548.
- Sungpradit S, **Nuchprayoon S**, Chatsuwan T. 2010. Cost-effectiveness analysis of alkaline lysis, MagNA Pure, and Phenol-chloroform DNA extraction methods followed by measurement of single gene copy number using quantitative real-time PCR for *Dirofilaria immitis* microfilaria. *Chulalongkorn Medical Journal*. 54(6): 549-61.
- **Nuchprayoon S**, Sanprasert V, Jaratsing P, Jaijakul S. 2010. A case report of severe adverse reactions following diethylcarbamazine treatment of lymphatic filariasis. *Chulalongkorn Medical Journal*. 54(6): 593-604.
- Sungpradit S, **Nuchprayoon S**. 2010. *Wolbachia* of arthropods and filarial nematodes: biology and applications. *Chulalongkorn Medical Journal*. 54(6): 605-21.
- Pinyachat A, Rojnuckarin P, Muanpasitporn C, Singhamatr P, Nuchprayoon S. 2011. Albocollagenase, a novel recombinant P-III snake venom metalloproteinase from green pit viper (*Cryptelytrops albolabris*), digests collagen and inhibits platelet aggregation. *Toxicon*. 57(5): 772-80.

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

Full name Amornpun Sereemaspun, MD, PhD

Institutional Affiliation Department of Anatomy

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Bangkok 10330, Thailand

Tel. (662)-256-4281

Fax. (662)-252-7028

Education and professional training

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยมหิดล	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2543
Jichi Medical University, JAPAN	Ph.D.	Human Molecular Biology	2549

Publications

- Takeuchi K, **Sereemaspun A**, Inagaki T, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Ookawara S. Morphologic characterization of green fluorescent protein in embryonic, neonatal, and adult transgenic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;274(2):883-6.
- **Sereemaspun A**, Takeuchi K, Sato Y, Iwamoto S, Inakagi T, Ookawara S, Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. Testosterone-dependent transgene expression in the liver of the CAG-lacZ transgenic rat. *Gene Expr.* 2005;12(4-6):305-13.
- Wiwanitkit V, **Sereemaspun A**, Rojanathanes R. Increasing the agglutination reaction in slide test for weak B blood group by gold nanoparticle solution: The first world report. *Journal of Immunological Methods* 328 (1-2), pp. 201-203
- Wiwanitkit V, **Sereemaspun A**, Rojanathanes R. Gold nanoparticle as an alternative tool for urine microalbumin test: The first world report. 2007 *Renal Failure* 29 (8), pp. 1047-1048

- Lowanitchapat A, **Sereemasapun A**, Ekpo P, et al. LipL32 mRNA expression in kidneys, livers and lungs of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. *ASIAN BIOMEDICINE*.2008. 2(2): 141-146
- **Sereemasapun A**, Wiwanitkit V, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticle on renal cell: An implication for exposure risk 2008 *Renal Failure*. 30 (3), pp. 323-325
- Wiwanitkit V, **Sereemasapun A**, Rojanathanes R. Visualization of gold nanoparticle on the microscopic picture of red blood cell: Implication for possible risk of nanoparticle exposure. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*. 2008. 22 (4), pp. 583-585
- Rojanathanes, R., **Sereemasapun, A.**, Pimpha, N., Buasorn, V., Ekawong, P., Wiwanitkit, V. Gold nanoparticle as an alternative tool for a urine pregnancy test *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008. 47 (3), pp. 296-299
- Wiwanitkit V, **Sereemasapun A**, Rojanathanes R. Identification of gold nanoparticle in lymphocytes: A confirmation of direct intracellular penetration effect. *Turkish Journal of Hematology* . 2009. 26 (1), pp. 29-30
- Wiwanitkit V, **Sereemasapun A**, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticle on the microscopic morphology of white blood cell. *Cytopathology*. 2009 Apr;20(2):109-10.
- Wiwanitkit V, **Sereemasapun A**, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertil Steril*. 2009 Jan;91(1):e7-8.
- **Sereemasapun A**, Wiwanitkit V, Rojanathanes R. Interaction between gold nanoparticles and *Cryptococcus* spp . *Archives of Hellenic Medicine* 2009.26 (4), pp. 520-522
- Wiwanitkit V, **Sereemasapun A**, Rojanathanes R. Gold nanoparticles and a microscopic view of platelets: a preliminary observation. *Cardiovasc J Africa*. 2009 ;20(2):141-2.
- Kamnerdsin O , Korkiatsakul V, Rakphetmanee K Rojanathanes R, Chirathaworn C, **Sereemasapun A**. Influence of Gold Nanoparticles on Intracellular Organelles and Cell Viability in Hela Cells.2009. 11 supp 2: 95-96.
- **Sereemasapun, A.**, Hongpiticharoen, P., Rojanathanes, R., Maneewattanapinyo, P., Ekgasit, S., Warisnoicharoen, W. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by metallic nanoparticles: A preliminary to nanogenomics. *International Journal of Pharmacology* 4 (6), pp. 492-495
- Rojanathanes, R., **Sereemasapun, A.**, Gold Nanoparticle As A Novel Tool For DNA and Protein Detection. *Chula Med J*. 2009. 53(6): 465-475

- Lowanitchapat A, Payungporn S, **Sereemasapun A**, Ekpo P, Phulsuksombati D, Poovorawan Y, Chirathaworn C. Expression of TNF-alpha, TGF-beta, IP-10 and IL-10 mRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010 Sep;33(5): 423-34.
- Sap-Lam, N., Homklinchan, C., Larpudomlert, R., Warisnoicharoen, W., **Sereemasapun, A.**, Dubas, S.T. UV irradiation-induced silver nanoparticles as mosquito larvicides *Journal of Applied Sciences* .2010. 10 (23), pp. 3132-3136
- Ammaranond P, Sriyarak J, Saejong S, Deesin P, **Sereemasapun, A.** Rojanathanes R. ENHANCED AGGLUTINATION REACTION OF ABO SUBGROUPS BY GOLD NANOPARTICLE: IMPLICATION FOR IDENTIFICATION OF ABO DISCREPANCIES. *VOX SANGUINIS*. 2010. 99: 501-501
- Chirathaworn C, Chantaramalai T, **Sereemasapun A**, Kongthong N, Suwancharoen D, Detection of *Leptospira* in urine using anti-*Leptospira*-coated gold nanoparticles *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011, Jan 34(1) 31-4 (Epub 2009 Dec 14)
- Suntravat M, Yusuksawad M, **Sereemasapun A**, Pérez JC, Nuchprayoon I. Effect of purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X) on renal hemodynamics, renal functions, and coagulopathy in rats. *Toxicon*. 2011 Jun 16. [Epub ahead of print]