นิพนธ์ต้นฉบับ/ Original article

Journal of Medicine and Health Sciences (Vol.13 No.1 April 2006)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิเท้าช้างในแมวรังโรค

อาชว์ดาม์ ภาคพิธเจริญ, ศันสนีย์ ผาสุข, ไพศาล ขาวสัก, สินทวี คู่เจริญถาวร และโกสุม จันทร์ศิริ

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

โรคเท้าช้าง เป็นปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศที่กำลังพัฒนารวมถึงในประเทศไทยซึ่งพบโรคเท้าช้างที่เกิดจากพยาธิเท้าช้าง 2 ชนิด คือ *Brugia malayi* และ *Wuchereria bancrofti* โดย *B. malayi* นั้นจะมีแหล่งระบาดทางภาคใต้ของประเทศ ในการวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างแมวซึ่งเป็นสัตว์รังโรค (reservoir host) ของพยาธิชนิดนี้มาจำนวน 2 ตัว จากพื้นที่ระบาดของโรคในจังหวัดนราธิวาส จากการตรวจโดยการย้อมสี Giemsa พบว่ามี ไมโครฟิลาเรียชนิด *Brugia* spp.แต่ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ ดังนั้นจึงทำการเพิ่มขยายจำนวน DNA ของ ribosomal DNA บริเวณ Internal transcribed spacer 1 (ITS1) และ Internal transcribed spacer 2 (ITS2) ด้วยวิธี PCR พบว่า PCR product มีความยาว 586 และ 660 bp ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการหาลำดับเบสแล้วทำ nucleotide sequence alignment เพื่อสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PAUP* version 4.0b10 ผลของ ITS1 และ ITS2 trees แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิเท้าช้างชนิด *B. malayi* ในแมวตัวที่ 1 ทำนองเดียวกันจากข้อมูล ITS1 tree ชี้ให้เห็นว่าแมวตัวที่ 2 มีการติดเชื้อ *Brugia* spp. ที่คาดว่าน่าจะเป็น new variant ของสายพันธุ์ ส่วนข้อมูล ITS2 tree แสดงให้เห็นว่าแมวตัวที่ 2 มีการติดเชื้อพยาธิเท้าช้างร่วมกันระหว่าง *B. malayi*, *B. pahangi* และ *D. repens* จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าบริเวณ ITS นั้นสามารถจำแนกความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Brugia* ที่เก็บได้จากแมวที่เป็นแหล่งรังโรคทางภาคใต้ของประเทศไทยได้

คำสำคัญ : พยาธิเท้าช้าง, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, สัตว์รังโรค

Genetic diversity of filaria in cat reservoirs

Arda Pakpitcharoen✉, Sunsanee Phasook, Paisarn Khawsak,
Sintawee Khuchareontaworn and Kosum Chansiri

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

ABSTRACT

Lymphatic filariasis is a significant health problem in many developing countries. In Thailand, only two of parasitic worms, *Wucherelia bancrofti* and *Brugia malayi* are reported. The survey of feline blood samples in the endemic area of Narathiwat, the province in the south of Thailand, revealed that two of them were infected with *Brugia* spp. Upon the examination of feline blood specimens by Giemsa staining, the results were positive for microfilaria. However, morphological characters did not clearly provide a mean of distinguishing *Brugia* species. In this study, the internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 regions (ITS2) have been isolated by using PCR amplification. generating the products of 586 bp and 660 bp in sizes, respectively. DNA sequencing, nucleotide sequence alignment and phylogenetic tree construction revealed that ITS1 and ITS2 trees showed the genetic diversity of *B. malayi* in Cat 1 and Cat 2. In addition, the ITS1 tree also indicated that the Cat 2 contained the new variant of *B. malayi* whereas ITS2 tree demonstrated that the mix infection of *B.malayi*, *B. pahangi* and *D. repens* may be occurred.

Keywords : *B. malayi*, genetic diversity, reservoir host

Arda Pakpitcharoen✉
Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
Sukhumvit 23,Wattana,Bangkok 10110,Thailand.
Telephone; 0-2260-2122-4 Ext.4606,
Mobile; 089-793-1039

Journal of Medicine and Health Sciences
Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
Vol.13 No.1 April 2006

บทนำ

โรคเท้าช้าง (elephantiasis) เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปบริเวณเขตร้อนชื้นและเขตกึ่งร้อนชื้นแถบเอเชีย,แอฟริกา,หมู่เกาะแปซิฟิกตะวันตกและบางส่วนของทวีปอเมริกา ในปี ค.ศ.1995 WHO[1] ประมาณการผู้ป่วยโรคเท้าช้างเป็นสัดส่วน 20% ของประชากรทั่วโลกหรือประมาณ 120 ล้านคน โดย 107 ล้านคน ติดเชื้อชนิด *Wuchereria bancrofti* และอีก 13 ล้านคน ติดเชื้อชนิด *Brugia malayi* ถึงแม้ว่าโรคนี้จะไม่ทำอันตรายถึงชีวิตแต่ก็เป็นสาเหตุของอาการทุพลภาพทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลงก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพจิตและเป็นปัญหาในการดำรงชีวิตของผู้ป่วย[2] โรคเท้าช้างที่พบในประเทศไทยเกิดจากพยาธิเท้าช้างชนิด *B. malayi* และ *W. bancrofti* โดย *B. malayi* มีแหล่งระบาดของโรคที่บริเวณภาคใต้ของประเทศไทยโดยเฉพาะในบริเวณจังหวัดนราธิวาสและสุราษฎร์ธานี เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีสภาพพื้นที่แบบป่าพรุ ซึ่งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ที่สำคัญของยุงเสือ (*Mansonia* spp.) ซึ่งเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างที่เกิดจากพยาธิเท้าช้างชนิด *B. malayi* ยุงชนิดนี้มีวงจรชีวิตที่ดูดเลือดคนและสัตว์ในช่วงกลางคืน (nocturnal periodic) ตั้งแต่ช่วงเวลา 21.00 น. ถึง 02.00 น.[3-4]

ในอดีตการระบาดของโรคจะพบในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นฤดูที่พบยุงเสือ (*Mansonia* spp.) ชุกชุม แต่ในปัจจุบันนี้พบว่าการระบาดของโรคลดลงมากเนื่องจากมียาหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีประสิทธิภาพร่วมกับการใช้ยากำจัดลูกน้ำยุงเสือ นอกจากนี้การลดลงของพื้นที่ป่าพรุก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ยุงเสือลดจำนวนลงตามไปด้วย แม้ว่าอุบัติการณ์การเกิดโรคจะลดน้อยลงแต่กลับไม่สามารถกำจัดโรคนี้ให้หมดไปได้ เนื่องจากมีรังโรคในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าหลายชนิด เช่น แมว สุนัข ค่าง ลิง ซึ่งสามารถนำโรคนี้กลับมาสู่คนได้[5] ดังนั้นจึงต้องมีการเฝ้าระวังสำรวจโรคนี้อย่างใกล้ชิดทั้งในคนและสัตว์รังโรคควบคู่กันไป[6]

จากการสำรวจพบว่าสัตว์เลี้ยงส่วนใหญ่ที่นิยมเลี้ยงในจังหวัดนราธิวาสและสุราษฎร์ธานี คือ แมว และโค[6] จากข้อมูลทางสัตววิทยาพบว่าสัตว์ในตระกูลแมวมีพยาธิไมโครฟิลาเรียในเลือด 2 ชนิด คือ *B. pahangi* และ *Dirofilaria repens* ในปี ค.ศ.1987 Phantana และคณะ[5] ได้รายงานการพบพยาธิเท้าช้างชนิด *B. malayi* ในแมวแถบจังหวัดนราธิวาส โดยการใช้วิธีย้อมสี Geimsa stain และ Acid Phosphatase[7-9] จากการศึกษาเบื้องต้นโดยการย้อมสีของเชื้อด้วยสี Giemsa และ Acid Phosphatase พบว่าพยาธิชนิด *B.pahangi* มีรูปร่างและลักษณะคล้ายคลึงกับ *B. malayi* มาก จึงทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดของเชื้อทั้งสองสปีชีส์ นอกจากนี้การสืบค้นข้อมูลใน GenBank พบว่าพยาธิ *B. malayi* และ *B. pahangi* มีลำดับเบสของยีนต่างๆ ใกล้เคียงกันมากประมาณ 95-97% เช่น ยีน Cuticle gene-1, Glutathione peroxidase, Sheat protein เป็นต้น ดังนั้นการจำแนกเชื้อ *Brugia* ทั้ง 2 สปีชีส์นี้ด้วยวิธี PCR อย่างเดียวจึงไม่สามารถทำได้ ในปี ค.ศ. 2005 Nuchprayoon และคณะ[10] ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธี PCR-RFLP ของบริเวณ ITS1 พบว่าสามารถจำแนกชนิดของ *Brugia* spp.ได้ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวไม่สามารถใช้ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิชนิดต่างๆในแมวได้ เนื่องจากแมว

เป็นรังโรคของพยาธิเท้าช้างได้ทั้ง 4 ชนิด คือ *B. malayi*, *B.pahangi*, *D.repens* และ *D.immitis* ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มขยาย DNA ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของไมโครฟิลาเรียที่พบในแมว ซึ่ง ITS region เป็น marker ตัวหนึ่งที่ใช้ในการวิจัยอย่างกว้างขวางสำหรับการจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับ intraspecies ของสิ่งมีชีวิตทั้งเชื้อรา[11] พืช[12] และสัตว์[13] ข้อมูลที่ได้นอกจากจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกชนิดของพยาธิเท้าช้างแล้วยังสามารถใช้เป็นข้อมูลในการติดตามการระบาด และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิโดยเฉพาะชนิด *B. malayi* ที่สามารถติดต่อสู่คนได้

วิธีดำเนินงานวิจัย

เก็บตัวอย่างแมว 2 ตัวที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียของพยาธิ *Brugia* spp.ในกระแสเลือดจากจำนวนแมวที่สำรวจ 60 ตัว ในปี พ.ศ.2547 จาก ต.มะรือโบออก อ.เจาะไอร้อง จ.นราธิวาส

วิธีทดลอง

1. เก็บตัวอย่างเลือดแมว และย้อมด้วยสี Giemsa

ทำการสำรวจแมวที่มีการติดเชื้อพยาธิเท้าช้างในพื้นที่จังหวัดนราธิวาส จำนวน 60 ตัว โดยการทำความสะอาดใบหูแมว ใช้เข็มเจาะเลือดที่ใบหูแมวแล้วใช้ capillary tube เก็บเลือดหัก capillary tube ออก นำมาเคาะกับสไลด์เบาๆ แล้วนำสไลด์อีกแผ่นหนึ่งมาไถรอยเลือดให้เกิดเป็นฟิล์มบางๆ แล้วนำไปย้อมสี Giemsa บันทึกภาพไมโครฟิลาเรียที่ได้ หลังจากนั้นคัดเลือกแมวที่ติดเชื้อพยาธิเท้าช้างจำนวน 2 ตัว เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิเท้าช้างต่อไป

2. การสกัด DNA

นำเลือดที่มีพยาธิเท้าช้างจากแมวมากรองผ่านเมมเบรนชนิด polycarbonate ที่มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำมาใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย TE buffer, SDS และเอนไซม์ proteinase K นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 55^0C นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Phenol : Chloroform ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าเบาๆ นาน 20 นาที นำไปปั่นแยกสารด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 10 นาที แยกเอาเฉพาะสารละลายใสส่วนบนออกมาใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นจึงเติม absolute ethanol ที่เย็นในอัตราส่วน 2 เท่า เขย่าเบาๆ จะสังเกตพบสายใยสีขาวลอยอยู่ ให้นำไปปั่นตกตะกอนสายใย DNA ที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นล้าง DNA ที่ได้ด้วย 70% ethanol ที่เย็นและนำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง เพื่อให้ส่วนของแอลกอฮอล์ระเหยออกให้หมด แล้วละลาย DNA ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์หรือสารละลาย TE buffer

3. การทำ PCR

นำ DNA ที่สกัดได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ ITS1 และ ITS2 ด้วยเทคนิค PCR โดย primers ทั้ง 2 บริเวณนี้ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS 1 และ ITS 2 ของพยาธิเท้าช้างสปีชีส์ต่างๆ ที่มี

Journal of Medicine and Health Sciences
Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
Vol.13 No.1 April 2006

รายงานใน GenBank primers ที่ใช้มีลำดับเบสดังนี้

บริเวณ ITS1

ITS1F GGT GAA CCT GCG GAA GGA TC

ITS1R AAC CCA ATG GTG CAA TGT GC

บริเวณ ITS2

ITS2F GGT TGA TTC CCG ATG GTA

ITS2R AGC GGG TAA TCA CGA CTG

4. การโคลนบริเวณ ITS1 และ ITS2 และการหาลำดับเบส

นำ PCR product ที่ได้ทั้งบริเวณ ITS1 และ ITS2 มาเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM®-T Easy Vector แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ด้วยวิธี Electroporation ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 μg/ml, IPTG ความเข้มข้น 40 μg/ml และ X-gal ความเข้มข้น 40 μg/ml จากนั้นตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนของบริเวณ ITS1 และ ITS2 ที่ใส่เข้าไปหรือไม่ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer จากข้อ 3 สกัดพลาสมิดจากโคลนที่ให้ผลบวกโดยใช้ QIAGEN® QIAprep Spin Miniprep และนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen, ประเทศเกาหลี)

5. การทำ phylogenetic tree

นำลำดับเบสที่ได้ทั้งบริเวณ ITS1 และ ITS2 มาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83 จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0 b10 เพื่ออธิบายความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิเท้าช้างจากเลือดแมวกับพยาธิเท้าช้างสปีชีส์อื่นๆ

ผลการทดลอง

จากการทดลองได้นำแมวที่ติดเชื้อพยาธิเท้าช้างจำนวน 2 ตัวจากนราธิวาส มาเจาะเลือดเพื่อตรวจหา ไมโครฟิลาเรียโดยการย้อมสี Geimsa พบว่าแมวทั้ง 2 ตัวติดเชื้อพยาธิ *Brugia* spp.(รูปที่ 1 และ 2) โดยดูจากนิวเคลียสที่กระจายอยู่ในลำตัวเกือบตลอดความยาวลำตัว (nuclear column) และมีนิวเคลียส 2 อันที่แยกออกจาก nuclear column ไปอยู่ทางด้านปลาย (terminal nuclei)[14]จากการเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ ITS1 และ ITS2 พบว่า PCR product ของบริเวณ ITS1 และ ITS2 มีความยาว 580 bp และ 660 bp ตามลำดับ หลังจากการโคลนนิ่ง และทรานฟอร์มเมชั่นพบว่ามีโคโลนีสีขาวขึ้นเป็นจำนวนมากซึ่งหมายถึงมีชิ้นส่วนของ PCR product ที่สนใจเชื่อมอยู่กับเวคเตอร์ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวจาก ITS1 และ ITS2 ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการ

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโคโลนีสีขาวที่ได้จากการโคลน

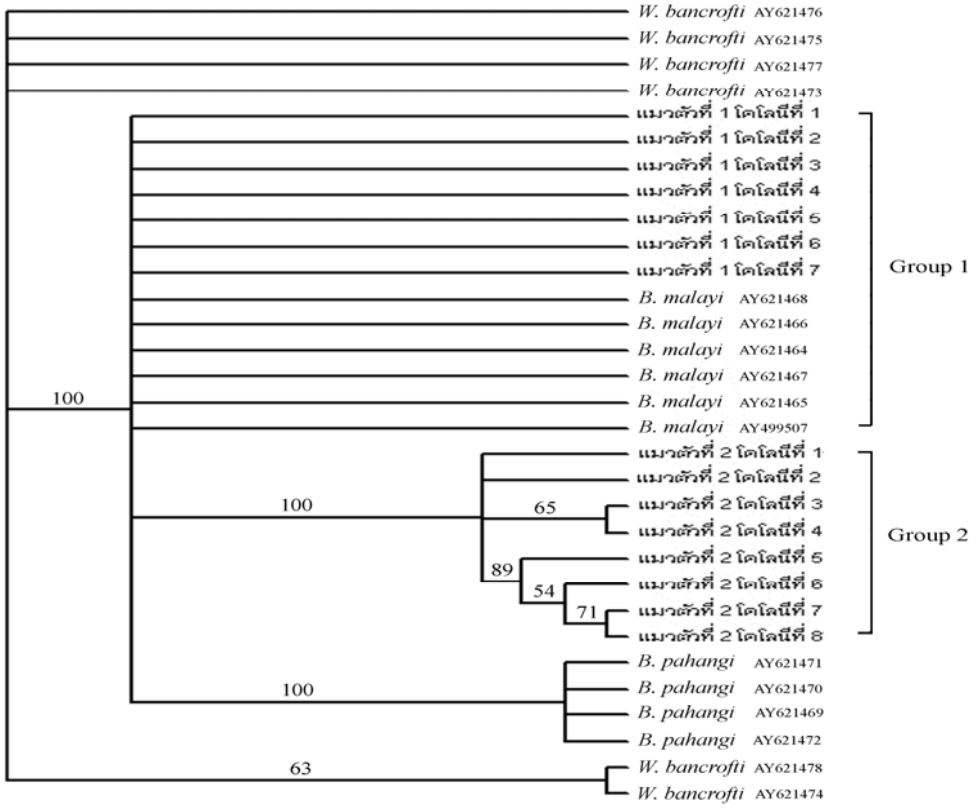
บริเวณ	ITS1	ITS2
แมวตัวที่ 1	7 โคโลนี	5 โคโลนี
แมวตัวที่ 2	8 โคโลนี	6 โคโลนี

รูปที่ 1 ไมโครฟิลาเรียที่พบในแมวตัวที่ 1

รูปที่ 2 ไมโครฟิลาเรียที่พบในแมวตัวที่ 2

1.1 Phylogenetic tree ของบริเวณ ITS1

จากผลของการทำ Phylogenetic tree บริเวณ ITS1 ของพยาธิเท้าช้างสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ *W. bancrofti* เป็น outgroup พบว่าในแมวตัวที่ 1 มีลำดับเบสที่ได้จาก 7 โคโลนีจัดอยู่ใน group 1 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *B. malayi* ส่วนในแมวตัวที่ 2 พบว่าลำดับเบสจากโคโลนีที่ได้จำนวน 8 โคโลนีมีความสัมพันธ์อยู่ระหว่าง *B. malayi* และ *B. pahangi* (รูปที่ 3)

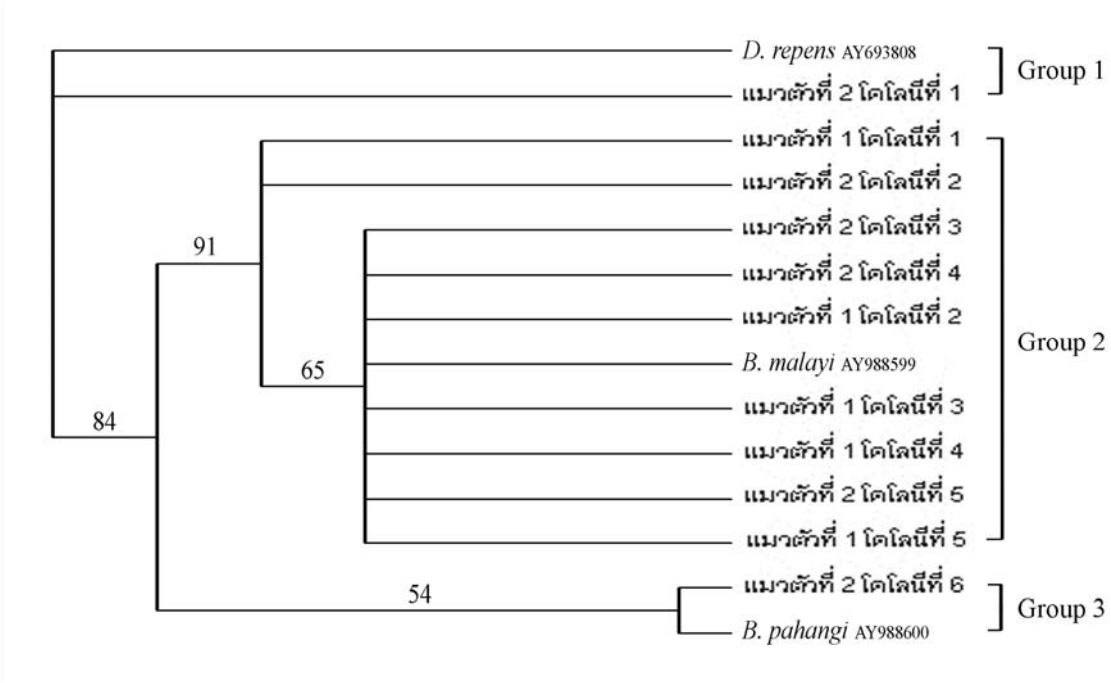


รูปที่ 3 แสดง parsimonious tree ซึ่งได้มาจากการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b10 โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS1 และใช้ *W. bancrofti* เป็น outgroup โดยทำการ bootstrap 100 ครั้ง

Journal of Medicine and Health Sciences
Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
Vol.13 No.1 April 2006

1.2 Phylogenetic tree ของบริเวณ ITS2

จากผลของการทำ Phylogenetic tree บริเวณ ITS2 ของพยาธิเท้าช้างสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ *D. repens* เป็น outgroup พบว่าในแมวตัวที่ 1 ลำดับเบสที่ได้จาก 5 โคโลนีนั้นจัดอยู่ใน group 2 ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 subgroups โดยมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *B. malayi* ส่วนในแมวตัวที่ 2 พบว่าโคโลนีที่ได้ทั้ง 6 โคโลนี มีลำดับเบสแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดโดย โคโลนีที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มของ outgroup คือ *D. repens* โดยมี bootstrap value เท่ากับ 84% ส่วนโคโลนีที่ 2 – 5 จัดอยู่ใน group 2 ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 subgroups โดยมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *B. malayi* (bootstrap value เท่ากับ ร้อยละ 91) ส่วนโคโลนีที่ 6 จัดอยู่ใน group 3 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *B. pahangi* โดยมี bootstrap value เท่ากับร้อยละ 54 (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดง parsimonious tree **ซึ่งได้มาจากการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม** PAUP* version 4.0b10 **โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ** ITS2 **และใช้** *D. repens* **เป็น** outgroup **โดยทำการ** bootstrap 100 **ครั้ง**

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาบริเวณ ITS1 และ ITS2 ของแมวที่ติดเชื้อพยาธิเท้าช้างจำนวน 2 ตัว สรุปได้ดังตารางที่ 2 ดังนี้

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าบริเวณ ITS ของ nuclear ribosomal DNA สามารถจำแนกความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Brugia* ที่เก็บได้จากแมวที่เป็นแหล่งรังโรคทางภาคใต้ของประเทศไทยได้ แต่อย่างไร

ตารางที่ 2 แสดงไมโครฟิลาเรียของพยาธิเท้าช้างที่อยู่ในแมวตัวที่ 1 และ 2

บริเวณ	ITS1	ITS2
แมวตัวที่ 1	*B. malayi* โดยมี genetic diversity	*B. malayi* โดยมี genetic diversity
แมวตัวที่ 2	*B. malayi* โดยมี genetic diversity และพบ new variant ของ *B. malayi*	*B. malayi* โดยมี genetic diversity, *B. pahangi* และ *D. repens* (outgroup)

ในเลือดของแมวตัวที่ 1 น่าจะมีไมโครฟิลาเรียชนิดเดียวคือ *B. malayi* และในเลือดของแมวตัวที่ 2 จากการศึกษาบริเวณ ITS1 พบว่าอาจจะเป็น new variant ของ *B. malayi* โดยอาจเป็น strain ดั้งเดิมหรือเกิดขึ้นใหม่ที่มีวิวัฒนาการที่จำเพาะ และจากการศึกษาบริเวณ ITS2 พบว่า มี subgroup ของ *B.malayi* ซึ่งสามารถแบ่งแยกได้เป็น 2 subgroups แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Brugia* นอกจากนี้ยังพบ *B. pahangi* และเชื้อพยาธิเท้าช้างชนิดอื่นด้วยแสดงว่าในแมวตัวที่ 2 อาจจะเกิด mix infection ขึ้น จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันสูงในบริเวณ ITS2 ดังนั้น ก็ตามในการศึกษาต่อไปควรทำการเก็บโคโลนีให้มากขึ้นเพื่อศึกษาทางสถิติและเพื่อยืนยันการเกิดเป็น variant ชนิดใหม่ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ และเครื่องมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยโดยเป็นงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2547

Journal of Medicine and Health Sciences
Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
Vol.13 No.1 April 2006

เอกสารอ้างอิง

1. WHO model-prescribing information. Drugs used in parasitic diseases; 2nd ed. Geneva: World Health Organization (WHO) 1995;146.
2. Ramaiah KD, Vijay Kumar KN, Ramu K, et al. Functional impairment caused by lymphatic filariasis in rural areas of south India. Tropical Medicine and International Health 1997;2:832-8.
3. Lyengar MOT. Filariasis in Thailand. Bulletin of World Health Organization 1953;9:731-6.
4. Mak JW, Yen PK, Lim KC, Ramiah N. Zoonatic implication of cats and dogs in filariasis transmission in Peninsula Malaysia. Tropical and Geological Medicine 1980;32:259-64.
5. Phantana S, Shutidamrong C, Chusaitayanond W. *Brugia malayi* in cat from southern Thailand. Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1987;81:173-4.
6. Chansiri K, Tejangkura T, Kwadsak P, et al. PCR based method for identification of zoonostic *Brugia malayi* microfilariae in domestic cats. Molecular and Cellular Probes 2002; 16:129-35.
7. Redington BC, Montgomery CA, Jervis HR, Hockmeyer WT. Histochemical diffentiation of the microfilariae of *Brugia pahangi* and sub-periodic *Brugia malayi*. Annals of Tropical Medical Parasitology 1967;69:489-92.
8. Schacher JF, Sahyoun PF. A chronological study of the histopathology of filarial disease in cat and dogs caused by *Brugia pahangi* (Buckley and Addison 1956) Tranaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1967;61:234-43.
9. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidimiological studies of parasite infections. International Journal of Parasitology 1997;27:1135-45.
10. Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg 2005 ;73:895-900.
11. Varga J, Toth K, Rigo J, Teren Hoekstra RF, Kozakiewicz Z. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. Fungal Gen. Biol 2000;30:71-80.

12. Rangsirugi A, Newman MF, Cronk QCB. A study of the intrageneric classification of *Alpinia* (Zingiberaceae) based on the ITS region of nuclear rDNA and the *trn*L-*trn*F spacer of chloroplast DNA. Monocots-systematics and evolution 2000;695-709.
13. Alvarez JM, Hoy MA. Evaluation of the internal ITS2 DNA sequences in separating closely related populations of the parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera : Encyrtidae). Ann. Entomol. Soc. Am 2002;95:250-6.
14. ประยงค์ ระดมยศ, สุวณี สุภาเวชย์, ศรชัย หลูอารีย์สุวรรณ. ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์. ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2539 ;188.