

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างด้วยวิธีนาโนเทคโนโลยี  
(Nanodetection of lymphatic filariasis)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินงบประมาณแผ่นดิน  
ประจำปี 2558

โดย

อาจารย์ ดร. วิวรรณ สรรประเสริฐ

ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง สุรางค์ นุชประยูร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์

หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้าง และ โรคเขตร้อน  
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 ขอขอบคุณ ผู้ใหญ่บ้านในพื้นที่ต่างๆ ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือด และขอขอบคุณ นางสาวอุทัยทิพย์ บุญเกษม นางสาวสิริพร ศรีรุ่งเรือง นางสาวรุ่งฟ้า บุญเสริม นางสาวนิตยา ศรีไชยพล นางสาวราตรี ชูอ่อน นางสาวปนัดดา จินตะน้อย นางสาวนฤมล ชัยพัฒน์ นางสาววรรณชูศรีจันทร์ นางสาวอุทัยรัตน์ เกิดแก้ว เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างภาคสนามและการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ

## บทคัดย่อ

โรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis) เกิดจากหนอนพยาธิ 2 ชนิดหลัก คือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* ทางองค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไปภายในปี พ.ศ. 2563 โดยมีแนวทางหลักในการควบคุมและป้องกันโรคเท้าช้างคือการกำจัดให้มีโปรแกรมการรักษาแบบหมุนเวียนแก่ประชากรในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคสูง และการควบคุมพยาธิภาวะ ทั้งนี้ โครงการกำจัดโรคเท้าช้างขององค์การอนามัยโลกได้กำหนดเป้าหมายในการควบคุมโรคให้มีอัตราความชุกของการติดเชื้อเหลืออยู่ร้อยละ 1 จากการตรวจแอนติเจนที่จำเพาะ หรือร้อยละ 0.2 เมื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการประเมินผลการสำเร็จของโครงการจำเป็นต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่มีความไวสูง เพื่อสามารถประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของโรคได้ ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่มีขายในปัจจุบัน สามารถวินิจฉัยได้เฉพาะโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* ยังไม่มีชุดตรวจที่มีความไวสูงสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก *B. malayi* การศึกษานี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง โดยตรวจหาแอนติเจน และ/หรือแอนติบอดีต่อแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ตรวจพบได้ในพยาธิฟิลาเรียเท่านั้นและตรวจพบทั้งในพยาธิ *W. bancrofti* และ *B. malayi* และไม่พบปฏิกริยาข้ามกับปรสิตชนิดอื่นๆ

ทั้งนี้จากการทบทวนวรรณกรรม ผู้วิจัยได้คัดเลือกแอนติเจน 2 ชนิด ซึ่งเป็นแอนติเจนที่มีปริมาณมากที่สุดของแบคทีเรีย และมีความเป็นแอนติเจนสูง ได้แก่ *Wolbachia* Surface Protein (WSP) และ peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) โดยจากผลการศึกษาในปีแรกได้ทำการสกัดโปรตีนจากแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่แยกจากหนอนพยาธิหัวใจสุนัข 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 ในปีที่สองนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาชุด lateral flow strip ที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่โปรตีน WSP ในตัวอย่างซีรัมคนไข้พยาธิโรคเท้าช้างสามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียได้ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้เวลาเพียง 20 นาทีในการตรวจ ทั้งนี้ยังได้ทดสอบความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ โดยมีความไวอยู่ที่ 65.70% และมีความจำเพาะถึง 84.72% ผู้วิจัยคาดว่าชุดตรวจพยาธิฟิลาเรีย lateral flow strip นี้จะมีความเหมาะสมต่อการตรวจผู้ป่วยทั้งในสถานรักษาพยาบาลและภาคสนามได้เป็นอย่างดี

## 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* Surface 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. In this study, we showed that lateral flow strip could be rapidly used to detect both *W. bancrofti* and *B. malayi*. Moreover, the sensitivity and specificity of lateral flow strip were tested. The sensitivity and specificity are 65.70% and 84.72%, respectively.

# สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	9
วัตถุประสงค์	10
ขอบเขตการวิจัย	11
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	11
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	12
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	20
วิธีดำเนินการวิจัย	
ขั้นตอนการดำเนินงาน	21
สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	24
ผลการวิจัย	25
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	28
บรรณานุกรม	30
ประวัตินักวิจัยและคณะ	33
ภาคผนวก	49

## สารบัญตาราง

		หน้า
<u>ตารางที่ 1</u>	ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับ lateral flow strip	25
<u>ตารางที่ 2</u>	ความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ lateral flow strip เปรียบเทียบ X กับวิธี O <sub>g</sub> 4C3 ELISA และ immunochromatographic test (ICT)	27
<u>ตารางที่ 3</u>	อัตราความชุกของ โรคเท้าช้าง โดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิ โรคเท้าช้าง จำแนกตามพื้นที่ที่สำรวจ	56
<u>ตารางที่ 4</u>	อัตราความชุกของ โรคเท้าช้าง โดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิ โรคเท้าช้าง จำแนกตามอำเภอที่สำรวจ	57
<u>ตารางที่ 5</u>	ข้อมูลพื้นฐาน ของผู้ป่วยที่ตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิ โรคเท้าช้าง	58
<u>ตารางที่ 6</u>	ข้อมูลพื้นฐาน ของผู้ป่วย โรคเท้าช้าง ที่ตรวจพบพยาธิสภาพ	58
<u>ตารางที่ 7</u>	การจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างจากการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง	59

## สารบัญภาพ

		หน้า
<b>รูปที่ 1</b>	การสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม	17
<b>รูปที่ 2</b>	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	18
<b>รูปที่ 3</b>	การนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและทางการแพทย์ โดยการนำสารชีวโมเลกุลต่างๆ ไปติดบนพื้นผิวของ AuNPs	19
<b>รูปที่ 4</b>	ส่วนประกอบและการแปลผล ของ lateral flow strip	19
<b>รูปที่ 5</b>	ค่าการดูดกลืนแสงอนุภาคทองคำระดับนาโน	21
<b>รูปที่ 6</b>	ส่วนประกอบ lateral flow strip ของชุดตรวจโรคเท้าช้าง	22
<b>รูปที่ 7</b>	ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการติดฉลากกับอนุภาคทองคำระดับนาโน	25
<b>รูปที่ 8</b>	การทดสอบชุด lateral flow strip เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดยตรวจหาแอนติเจน หรือ แอนติบอดี	26
<b>รูปที่ 9</b>	<i>Wolbachia</i> crude antigen ที่สกัดแยกได้จากหนอนพยาธิหัวใจสุนัข	50
<b>รูปที่ 10</b>	การผลิตโปรตีน WSP โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	51
<b>รูปที่ 11</b>	โปรตีน <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin	52
<b>รูปที่ 12</b>	การผลิตโปรตีน PAL โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	53
<b>รูปที่ 13</b>	โปรตีน Peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin	54

## สารบัญภาพ

		หน้า
<b>รูปที่ 14</b>	โปรตีน <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) และ โปรตีน peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) ที่แยกให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA resin	55
<b>รูปที่ 15</b>	Antibody titers ของ anti- <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ indirect ELISA	60
<b>รูปที่ 16</b>	Antibody purification ของ polyclonal anti- <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads	61
<b>รูปที่ 17</b>	การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal anti- <i>Wolbachia</i> Surface Protein (WSP) antibodies โดยวิธี Western blot analysis	62
<b>รูปที่ 18</b>	Antibody titers ของ anti-peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) antibodies โดยใช้ indirect ELISA	63
<b>รูปที่ 19</b>	Antibody purification ของ polyclonal anti-peptidoglycan associated-lipoprotein (PAL) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads	64



## บทนำ

### □ ความสำคัญและที่มาของปัญหา

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

โครงการนี้จึงมุ่งมั่นที่จะใช้นวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีในการวินิจฉัยโรคเท้าช้างซึ่งจัดเป็นโรคติดเชื้ออุบัติซ้ำ เพื่อป้องกันการเกิดภาวะเท้าช้างในคนไทย ทั้งนี้ถ้าโรคไม่ได้รับการวินิจฉัยและการรักษาในระยะแรก จะทำให้ผู้ป่วยเข้าสู่ภาวะระยะเรื้อรังซึ่งยังไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาดในปัจจุบัน โดยใช้นาโนเทคโนโลยีในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง โดยการนำอนุภาคทองคำมาทำปฏิกิริยาเคมีให้มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร อนุภาคทองคำจะเปลี่ยนรูปเป็นสารละลายสีแดงใส จากนั้นนำมาผสมกับแอนติบอดีที่จับตัวแน่นกับแอนติเจนของแบคทีเรีย *Volvaba* ซึ่งแบคทีเรียที่อยู่

ในพยาธิโรคเท้าช้างอย่างจำเพาะ พบได้ในทุกระยะของพยาธิโรคเท้าช้างและมีปริมาณมาก ดังนั้นจึงมีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อใช้เป็นตัววินิจฉัยโรคเท้าช้าง หากตัวอย่างเลือดหรือซีรัมมีแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซีย สีแดงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะสามารถเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือดำและตกตะกอนในที่สุด สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถใช้ตรวจได้ง่าย แม่นยำ ในเวลาไม่ถึง 5 นาที และวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้ทั้งการติดพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* และ *Brugia malayi* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโรคติดเชื้ออื่น ซึ่งชุดตรวจวินิจฉัยที่พัฒนาขึ้นนี้จะสามารถผลิตได้เองในประเทศด้วยต้นทุนต่ำกว่าชุดทดสอบต่างประเทศกว่า 100 เท่า และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ง่าย ทำให้สามารถเฝ้าระวังโรคได้อย่างใกล้ชิดและประเมินสถานการณ์ของโรคได้อย่างแท้จริง และเป็นการเฝ้าระวังโรคเท้าช้างไม่ให้อุบัติซ้ำในคนไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการวางมาตรการการกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปได้อย่างเป็นรูปธรรมและยั่งยืน อีกทั้งสามารถนำไปจดสิทธิบัตรและใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ในการจำหน่ายชุดตรวจวินิจฉัยต้นทุนต่ำสำหรับประชากรกลุ่มเสี่ยงกว่าพันล้านคนในกว่า 80 ประเทศทั่วโลกซึ่งเป็นแหล่งซุกซมของโรคเท้าช้าง

#### □ วัตถุประสงค์

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

## □ ขอบเขตการวิจัย

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

## □ ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การใช้นาโนเทคโนโลยีในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง โดยการนำอนุภาคทองคำมาทำปฏิกิริยาเคมีให้มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร อนุภาคทองคำจะเปลี่ยนรูปเป็นสารละลายสีแดง จากนั้นนำมาผสมกับแอนติบอดีที่จับตัวแน่นกับแอนติเจนของแบคทีเรีย *โวลบาเซีย* หากตัวอย่างเลือดหรือซีรัมมีแอนติเจนของแบคทีเรีย *โวลบาเซีย* 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

### โรคเท้าช้างเป็นปัญหาในระดับชาติและนานาชาติ

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

ปัญหาแรงงานต่างด้าว โดยเฉพาะแรงงานพม่าที่มีอัตราการตรวจพบพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* (urban strain) ซึ่งมียุงรำคาญเป็นยุงพาหะ แม้ว่ายุงรำคาญของไทยจะไม่เคยมีรายงานว่าโรคได้ตามธรรมชาติ แต่พบว่ามีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าในห้องปฏิบัติการ จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้คนไทยต้องมีมาตรการเฝ้าระวังในการควบคุมป้องกันโรคเท้าช้างอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากตามธรรมชาติพยาธิจะมีการปรับตัวให้อาศัยอยู่ได้ในยุงพาหะเพื่อคงวงชีพและแพร่สู่คนต่อไป โดยเฉพาะตามเมืองใหญ่ เช่น กรุงเทพฯ มักมีแหล่งน้ำเสียที่เป็นแหล่ง

เพาะพันธุ์ยุงรำคาญ ทำให้คนไทยมีความเสี่ยงที่จะติดโรคเท้าช้างจากพยาธิสายพันธุ์พม่าได้ (re-emerging disease) หากไม่มีมาตรการการเฝ้าระวัง และป้องกันโรคที่ดี

### ปัญหาการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคเท้าช้าง

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

การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง ได้มีการนำ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างมาใช้ ปัจจุบันมี monoclonal antibody 2 ชนิด ที่ใช้กันแพร่หลาย และผลิตเป็นชุดตรวจวินิจฉัยซึ่งที่มีความไวและความจำเพาะต่อการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเท้าช้างจาก *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* ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ *B. malayi* ชื่อ 17E10 ซึ่งให้ความไวในการตรวจวินิจฉัยถึงร้อยละ 93.3 อย่างไรก็ตาม ยังคงพบปฏิกิริยา

ข้ามกลุ่มกับพยาธิหัวใจสุนัข (*Dirofilaria immitis*) ได้ การตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของพยาธิโรคเท้าช้างทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างสะดวกขึ้น เนื่องจากไม่ต้องเจาะเลือดในช่วงเวลากลางคืน อีกทั้งสามารถบอกภาวะการติดเชื้อในปัจจุบันและยังสามารถใช้ติดตามผลการรักษาได้อีกด้วย เนื่องจากระดับของแอนติเจนจะลดลงภายหลังการรักษา อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างคือราคาที่สูงสำหรับประเทศกำลังพัฒนาที่เป็นแหล่งชุกชุมของโรค

การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดยการตรวจแอนติบอดีนั้น มีรายงานพบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ระหว่างพยาธิโรคเท้าช้างกับพยาธิชนิดอื่น เช่น พยาธิปากขอหรือพยาธิไส้เดือน<sup>(7)</sup> เป็นต้น เนื่องจากกลุ่มพยาธิเหล่านี้มีโครงสร้างของแอนติเจนหลักร่วมกันอยู่ ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ และเป็นผลทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดขึ้น นอกจากนี้ การตรวจหาแอนติบอดียังไม่สามารถแยกภาวะการติดเชื้อในปัจจุบัน (active infection) กับภาวะที่เคยติดเชื้อ จึงไม่สามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพการรักษาว่าโรคได้หายขาดได้ แม้ว่าจะมีการศึกษาพบว่าการตรวจหา anti-filarial IgG4 antibodies จะเพิ่มความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยได้ และสัมพันธ์กับการติดเชื้อปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจโดยวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ crude antigen ที่เตรียมจากพยาธิฟิลาเรีย จึงต้องใช้สัตว์ทดลองและยุ่งในการคงวงจรชีวิตของพยาธิฟิลาเรียเพื่อสกัดแอนติเจนมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี นอกจากนี้ใช้หลักการของ indirect ELISA ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลาในการทดสอบนาน และต้องใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการ

ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของพยาธิ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งพบว่ามีควมไวต่ำเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจหาแอนติเจน<sup>(8-9)</sup> นอกจากนี้ จากข้อจำกัดในการตรวจและจากความเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง ตลอดจนผู้ทำการทดสอบต้องได้รับการอบรมให้สามารถปฏิบัติงานได้ถูกต้อง และเข้าใจถึงหลักการแปลผล ตลอดจนการควบคุมคุณภาพของการทดสอบการตรวจด้วยวิธี PCR จึงไม่สะดวกในการที่จะนำไปใช้ในการตรวจทั่วไปแม้จะนิยมใช้กันในงานวิจัย

อนึ่ง แม้ว่าปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยที่มีความไวสูง อย่างไรก็ตามชุดตรวจวินิจฉัยดังกล่าวยังคงมีราคาสูง และต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งยังไม่สามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพผลการรักษาว่าโรคได้หายขาด ทำให้การประเมินผลการควบคุมโรคในโครงการกำจัดโรคเท้าช้างเป็นไปได้ยาก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งนอกจากจะสามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และความไวสูงแล้ว ยังจำเป็นต้องสามารถติดตาม และประเมินการ

รักษาได้ด้วย อีกทั้งยังสามารถผลิตใช้ได้เองภายในประเทศในราคาที่เหมาะสม เพื่อลดการนำเข้าของผลิตภัณฑ์ราคาแพงได้

### **ความสำคัญของแบคทีเรียโวลบาเซียต่อหนอนพยาธิโรคเท้าช้าง**

แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์ (intracellular bacteria) ที่พบได้เฉพาะในสัตว์ขาข้อและหนอนพยาธิฟิลาเรียเท่านั้น จึงเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันอย่างยิ่ง ซึ่งจากการศึกษาโดยวิธีทางอณูชีววิทยาพบว่าแบคทีเรียโวลบาเซียในสัตว์ขาข้อ และแบคทีเรียโวลบาเซียในหนอนพยาธิฟิลาเรีย มีลักษณะลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน<sup>(10-11)</sup> โดยแบคทีเรียโวลบาเซียในสัตว์ขาข้อ เป็นสาเหตุทำให้สัตว์ขาข้อมีการสืบพันธุ์ที่ผิดปกติไป<sup>(12)</sup> การศึกษาถึงบทบาทหน้าที่และความสำคัญของแบคทีเรียโวลบาเซียในหนอนพยาธิฟิลาเรียพบความสำคัญของแบคทีเรียโวลบาเซียต่อการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของหนอนพยาธิฟิลาเรีย และบทบาทของแบคทีเรียถูกกำจัดไป เมื่อให้ยาปฏิชีวนะที่ทำลายแบคทีเรียโวลบาเซีย<sup>(13-16)</sup> แสดงถึงความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualism) ระหว่างแบคทีเรียโวลบาเซียในหนอนพยาธิฟิลาเรีย จึงนำมาซึ่งความสนใจในการศึกษายบทบาทต่างๆ ของแบคทีเรียโวลบาเซียในหนอนพยาธิฟิลาเรีย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาและควบคุม โรคติดเชื้อหนอนพยาธิโรคเท้าช้างต่อไป

### **โปรตีนจากแบคทีเรียโวลบาเซียช่วยในการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง**

จากปัญหาในการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง ซึ่งแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเพื่อตรวจหาแอนติเจนของหนอนพยาธิโรคเท้าช้างที่มีความไวในการตรวจวินิจฉัยสูง แต่ชุดตรวจวินิจฉัยที่ตรวจหาแอนติเจนที่มีจำหน่ายในปัจจุบันสามารถวินิจฉัยได้เฉพาะโรคเท้าจากพยาธิ *W. bancrofti* เท่านั้น ยังไม่มีชุดตรวจหาแอนติเจนเพื่อการวินิจฉัยโรคเท้าช้างจากพยาธิ *B. malayi* จึงนำไปสู่แนวคิดการตรวจหาแอนติเจนจากแบคทีเรียโวลบาเซียเพื่อตรวจวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคเท้าช้าง เนื่องจากสามารถตรวจพบแบคทีเรียโวลบาเซียจำนวนมากทั้งในพยาธิ *W. bancrofti* และ *B. malayi* ทุกระยะ อีกทั้งยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อแบคทีเรียโวลบาเซียได้ในคนไข้โรคเท้าช้าง ซึ่งแสดงว่ามีการหลั่งแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซียออกมาสู่กระแสเลือดในคนไข้โรคเท้าช้าง ดังนั้นการวินิจฉัยโรคเท้าช้างโดยการตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซีย จึงน่าจะมีประสิทธิภาพ มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าการตรวจหาแอนติเจนของหนอนพยาธิโรคเท้าช้างที่มีอยู่เดิม โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโรคปรสิตอื่นๆ

ในการศึกษาโปรตีนต่างๆ ของแบคทีเรียโวลบาเซีย ทางกลุ่มผู้วิจัยโดยได้พัฒนาและปรับปรุงวิธีการสกัดแบคทีเรียโวลบาเซียจากหนอนพยาธิให้ได้โปรตีนที่มีคุณภาพและมีปริมาณเพียงพอในการวิจัยโปรตีนในระดับสูง ซึ่งผลจากการแยกโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเซีย โดยวิธี 2-dimensional gel electrophoresis และตรวจหาโปรตีนที่จำเพาะของแบคทีเรียโวลบาเซีย โดยใช้ anti-Wolbachia antibodies และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่จำเพาะ โดยวิธี MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าโปรตีนของแบคทีเรียโวลบาเซียที่มีปริมาณมากและความเป็นแอนติเจนสูง คือ Wolbachia surface protein (WSP)<sup>(16)</sup> ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ WSP ยังความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Dirofilaria immitis* ในคน<sup>(17)</sup> และในแมว<sup>(18)</sup> และสัมพันธ์กับการเกิดการบวมของต่อมน้ำเหลืองในลิงที่ติดเชื้อ *B. malayi*<sup>(19)</sup> ดังนั้น WSP จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาเพื่อนำมาเป็นโปรตีนเป้าหมายของการสร้างระบบการตรวจหาแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซีย ซึ่งระบบการตรวจหาแอนติเจนที่สร้างขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาระดับแอนติเจนของแบคทีเรียโวลบาเซียในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง อันจะเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการวินิจฉัย และติดตามประสิทธิภาพการรักษา ซึ่งจะส่งผลให้สามารถวางแผนการรักษาโรคได้ดียิ่งขึ้น เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดของการควบคุมและกำจัดโรคเท้าช้าง ตามนโยบายระดับประเทศและสอดคล้องกับนโยบายขององค์การอนามัยโลก

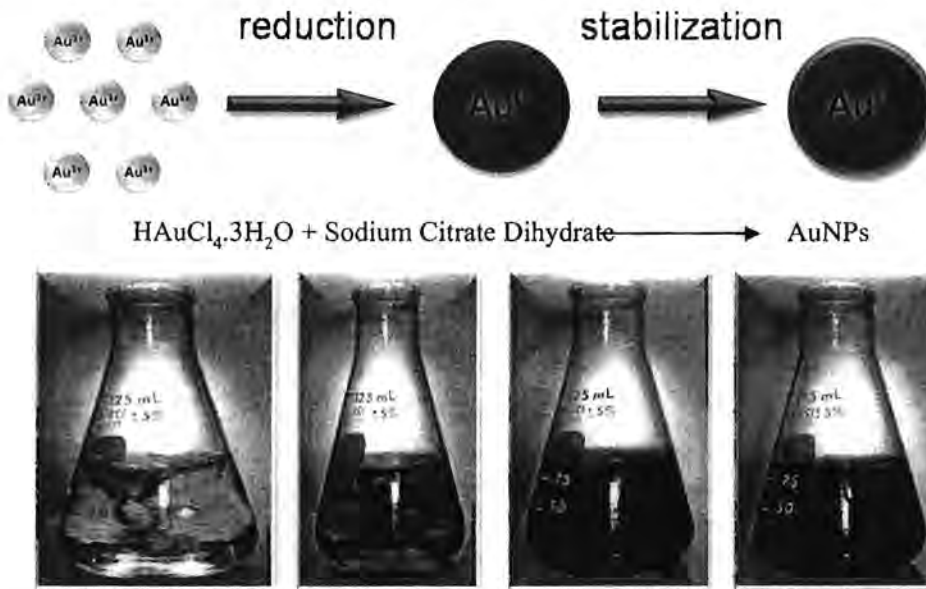
### นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

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

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโน ที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง<sup>(21)</sup> ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายคอลลอยด์สีแดง ในการสังเคราะห์ AuNPs นั้นสามารถทำได้โดยการนำสารละลายของ  $\text{HAuCl}_4$  ที่มีทองคำประจุ  $3^+$  ( $\text{Au}^{3+}$ ) ทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ได้ AuNPs ที่มีทองคำประจุเป็น 0 ( $\text{Au}^0$ ) ซึ่งยังไม่มีความเสถียร จึงต้องเติมสารช่วยทำให้เสถียร (Stabilizer) โดยสารนี้จะมาล้อมรอบอนุภาค ป้องกันการรวมตัวหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน

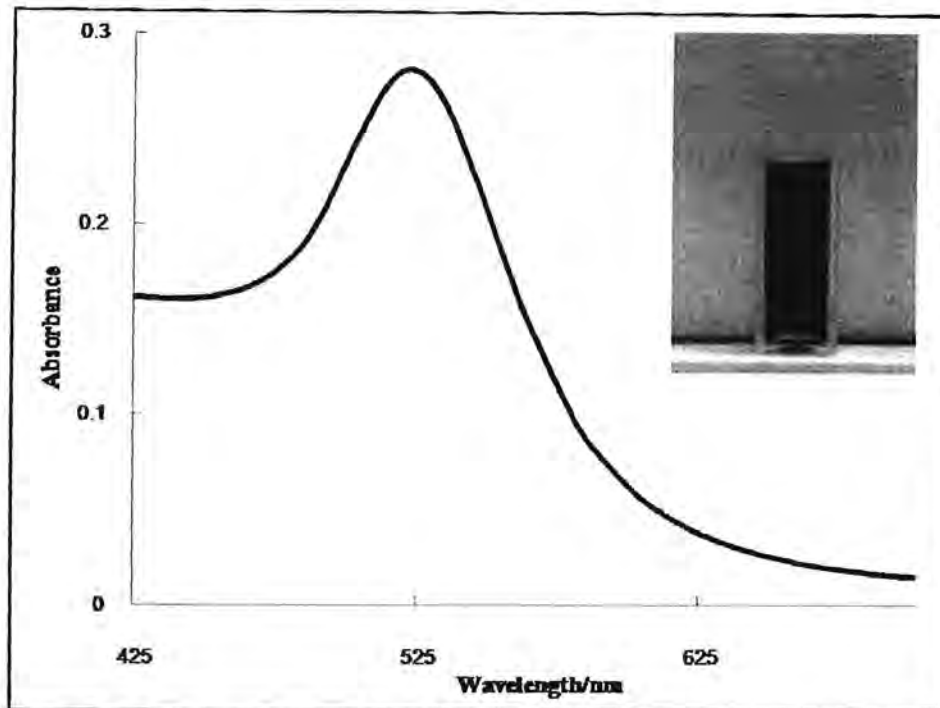


ทำให้ AuNPs นั้นสามารถคงขนาดและรูปร่างอยู่ในระดับนาโนได้ สารที่นิยมใช้เป็นตัวรีดิวซ์และช่วยทำให้อนุภาคทองคำ เกิดความเสถียร ได้แก่ sodium citrate<sup>(22)</sup> ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์และทำให้ AuNPs มีความเสถียรในคราวเดียวกัน (รูปที่ 1)



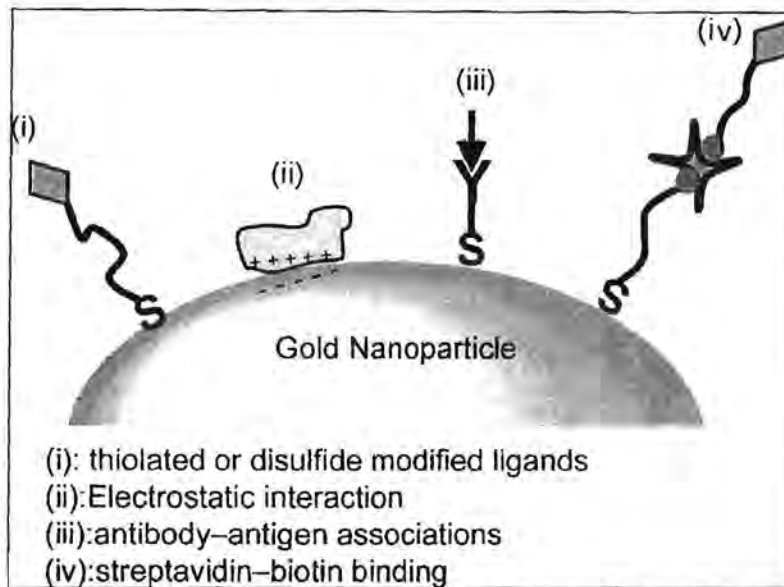
**รูปที่ 1** การสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม<sup>(23)</sup>

AuNPs มีคุณสมบัติเชิงแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวซึ่งต่างจากทองคำแบบก้อนทั่วไป เมื่อขนาดอนุภาคทองคำเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มากกระทบมากๆ จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า เซอร์เฟซพลาสมอน เรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) ซึ่งเป็นคลื่นความหนาแน่นของประจุที่เกิดจากการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระ ที่มีลักษณะการสั่นพร้อมเพรียงกัน เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยผิวต่อของ AuNPs กับสารไดอิเล็กทริก ทำให้ AuNPs สามารถดูดกลืนแสงสีเขียว ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ซึ่งจะส่งผลให้ AuNPs มีสีแดงทับทิม (ruby red)<sup>(24)</sup> ดังรูปที่ 2



**รูปที่ 2** ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (ภาพเล็ก)

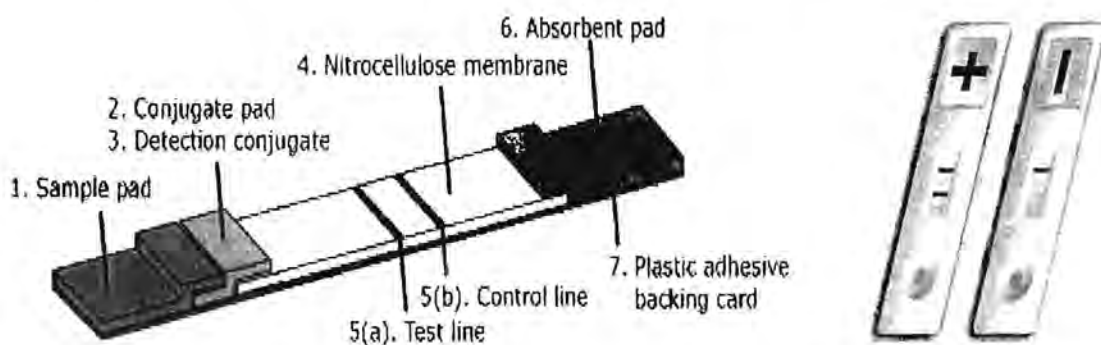
บนพื้นผิวของ AuNPs สามารถปรับปรุงให้มีโมเลกุลต่างๆที่ต้องการมาเคลือบอยู่บนผิวของอนุภาค และนำ AuNPs ที่ปรับปรุงพื้นผิวแล้ว มาใช้เป็นตัวติดตามหรือตัวตรวจจับสารชีวโมเลกุลเป้าหมายได้ เช่น DNA<sup>(25)</sup>, โปรตีน<sup>(26)</sup>, คาร์โบไฮเดรต<sup>(27)</sup>, ยา<sup>(28)</sup> หรือสี fluorescent<sup>(25)</sup> ดังรูปที่ 3 ด้วยเหตุนี้ จึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างอุปกรณ์ตรวจจับสารทางชีวภาพ (Biosensor)<sup>(29)</sup> 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) โดยถ้าแถบสีชมพูเกิดขึ้นที่ตำแหน่งทดสอบและตำแหน่งควบคุมเท่ากับผลเป็นบวก 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) นักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโทที่มีความรู้คู่คุณธรรม มีความชำนาญในงานวิจัยระดับลึก ซึ่งจะเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีคุณค่าแก่สังคม และประเทศชาติ และมีความพร้อมที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ เทคโนโลยีทางการแพทย์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต อันเป็นการสนับสนุนการดำเนินการตามนโยบายแห่งชาติ ในการพัฒนาคนและสังคมที่มีคุณธรรมและความรู้
- 6) เจ้าหน้าที่สาธารณสุข อาสาสมัคร มีความรู้และเทคโนโลยีที่ทันสมัย สามารถเฝ้าระวังควบคุมและป้องกัน โรคได้อย่างยั่งยืนแท้จริง และสามารถประยุกต์ใช้กับโรคติดต่ออื่นได้

#### หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

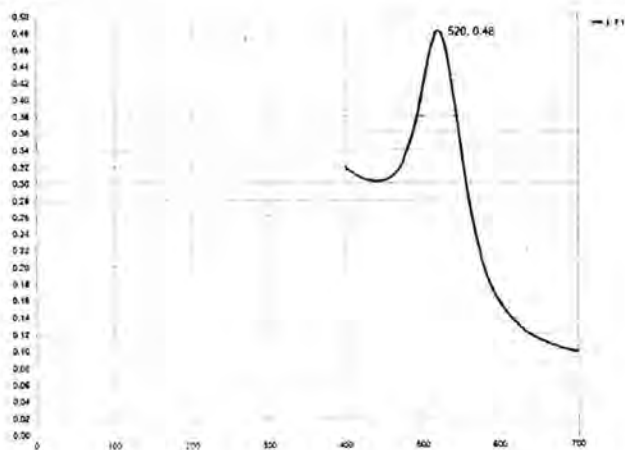
## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียมชุด lateral flow strip สำหรับการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

#### 1.1 สังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโน

ล้างเครื่องแก้วและ magnetic bar ที่จะใช้ในการสังเคราะห์ด้วย aqua regia ( $\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3:1$ ) หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำ distilled water และทำให้แห้ง จากนั้นบีบเปิดสารละลาย 1% hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) ใส่ใน flask ที่มี Milli Q water อยู่ ต้มสารละลายบน hot plate stirrer โดยใช้ magnetic bar ช่วยกวนตลอดเวลา เมื่อสารละลายเดือด เติม 1% trisodium citrate dihydrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) อย่างรวดเร็วสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำเงินเข้ม (deep blue) ต้มต่อไปอีกประมาณ 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง (wine red) ที่งัวให้เย็น เก็บ AuNPs ที่สังเคราะห์ได้ในภาชนะป้องกันแสงที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  ตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้โดยนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

- Transmission Electron Microscope (TEM) ที่ 100 กิโลโวลต์ : หาขนาดอนุภาค, ตรวจสอบรูปร่างและดูการเกาะกลุ่มหรือการกระจายของ AuNPs
- UV-vis spectroscopy ที่ 520 นาโนเมตร : ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสง (รูปที่ 5)
- Zetasizer : หาค่า Zeta potential เพื่อดูปริมาณประจุบนผิวอนุภาคทองคำ



รูปที่ 5

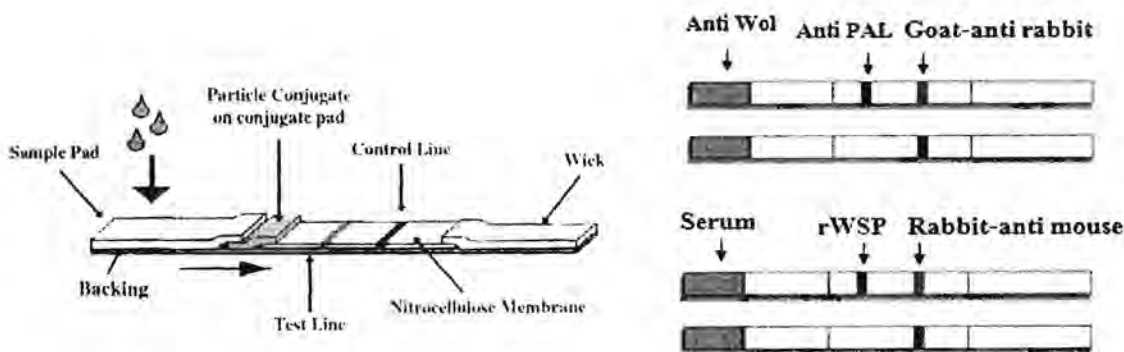
ค่าการดูดกลืนแสงอนุภาคทองคำระดับนาโน

## 1.2 การติดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรบนแอนติบอดี

- 1.2.1 ปรับค่า pH ของ AuNPs ด้วย 0.2 M sodium carbonate (10  $\mu$ l ต่อ 500  $\mu$ l ของ AuNPs)
- 1.2.2 เติมแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 2.5, 5, 10 และ 20 mg/ml และ blank ผสมให้เข้ากันเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm; ทำ 2 ซ้ำ
- 1.2.3 เติม 10% sodium chloride ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm; ทำ 2 ซ้ำ
- 1.2.4 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟโดยนำค่าดูดกลืนแสงจากข้อ 1.2.3 ลบด้วย 1.2.2 เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการทดลอง

## 1.3 เตรียมและประกอบชุด Lateral flow strip

ในชุดทดสอบ lateral flow strip จะมีองค์ประกอบดังนี้ คือ sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad และ plastic backing card ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ส่วนประกอบ Lateral flow strip ของชุดตรวจโรคเท้าช้าง

### 1.3.1 การเตรียม conjugated pad สำหรับอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ติดกับแอนติบอดี

- 1) นำ AuNPs มาปรับ pH (9.0) ด้วย 0.2 M sodium carbonate
- 2) ใส่แอนติบอดี 5 mg/ml และนำไปหมุนที่ความเร็ว 80 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3) ทำการ block ด้วย 10% BSA และนำไปหมุนที่ความเร็ว 80 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
- 4) เทส่วนใส่ทิ้งและ re-suspend ด้วย running buffer 200  $\mu$ l
- 5) หยดแอนติบอดีที่ติดกับอนุภาคทองคำระดับนาโน 30  $\mu$ l บน conjugated pad และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

### 1.3.2 การเตรียม membrane

- 1) ทำการหยดแอนติบอดี goat-anti rabbit IgG หรือ rabbit-anti mouse IgG ปริมาณ 1  $\mu$ g ที่แถบ control line
- 2) ทำการหยดแอนติบอดี anti PAL 1  $\mu$ g (1 mg/ml) หรือ rWSP 2  $\mu$ g ที่แถบ test line จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3) บล็อก membrane ด้วย 1% BSA เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วย mili Q water 2 รอบแล้วซับให้แห้ง จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

## 1.4 การทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ anti-PAL antibodies ในการตรวจหา PAL antigen หรือ human-anti rWSP เพื่อการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

เมื่อประกอบชุดตรวจ lateral flow strip แล้วนำมาทดสอบโดยใช้ rPAL ที่ 1  $\mu$ g หรือตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคเท้าช้างและใช้น้ำ mili Q เป็น negative control หยดลงบน sample pad ตามด้วย running buffer 100  $\mu$ l จากนั้นเริ่มสังเกตผลที่ 0, 5, 10, 15, 20 นาทีตามลำดับ

### 2. การทดสอบประสิทธิภาพของชุด Lateral flow strip ที่ได้พัฒนาขึ้นในการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

การทดสอบความไวของชุด Lateral flow strip โดยนำซีรัมของผู้ป่วยโรคเท้าช้างทั้งที่ตรวจเจอไมโครฟิลาเรียในเลือด (MF+, Ag+) ตรวจพบแอนติเจนของพยาธิเท้าช้าง (MF-, Ag+) และผู้ป่วยที่มีอาการอวัยวะบวม (C) โดยสังเกตผลที่ 0, 5, 10, 15, 20 นาทีตามลำดับ

การทดสอบความจำเพาะของชุด Lateral flow strip โดยนำซีรัมของผู้ที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของซีรัมจากสัตว์ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น โดยสังเกตผลที่ 0, 5, 10, 15, 20 นาทีตามลำดับ

- สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล
  - หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคเท้าช้างและโรคเขตร้อน ศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CHULA-MRC)
  - ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ผลการวิจัย

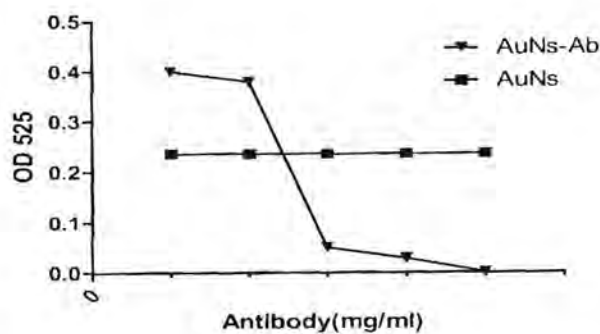
### 1. การเตรียมชุด lateral flow strip สำหรับการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

#### 1.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการติดการติดอนุภาคทองคำระดับนาโน

ในการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการติดกับอนุภาคทองคำระดับนาโนโดยใช้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 20.0 mg/ml พบว่า แอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml เป็นปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นปริมาณที่สามารถเข้าจับ ได้อนุภาคทองคำระดับนาโนได้อย่างเหมาะสม (รูปที่ 7)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับ lateral flow strip

Antibody (mg/ml)	AuNPs (100 $\mu$ l)	AuNPs (blank)
0	0.40	0.237
2.5	0.380	0.237
5.0	0.050	0.237
10.0	0.028	0.237
20.0	0.001	0.237

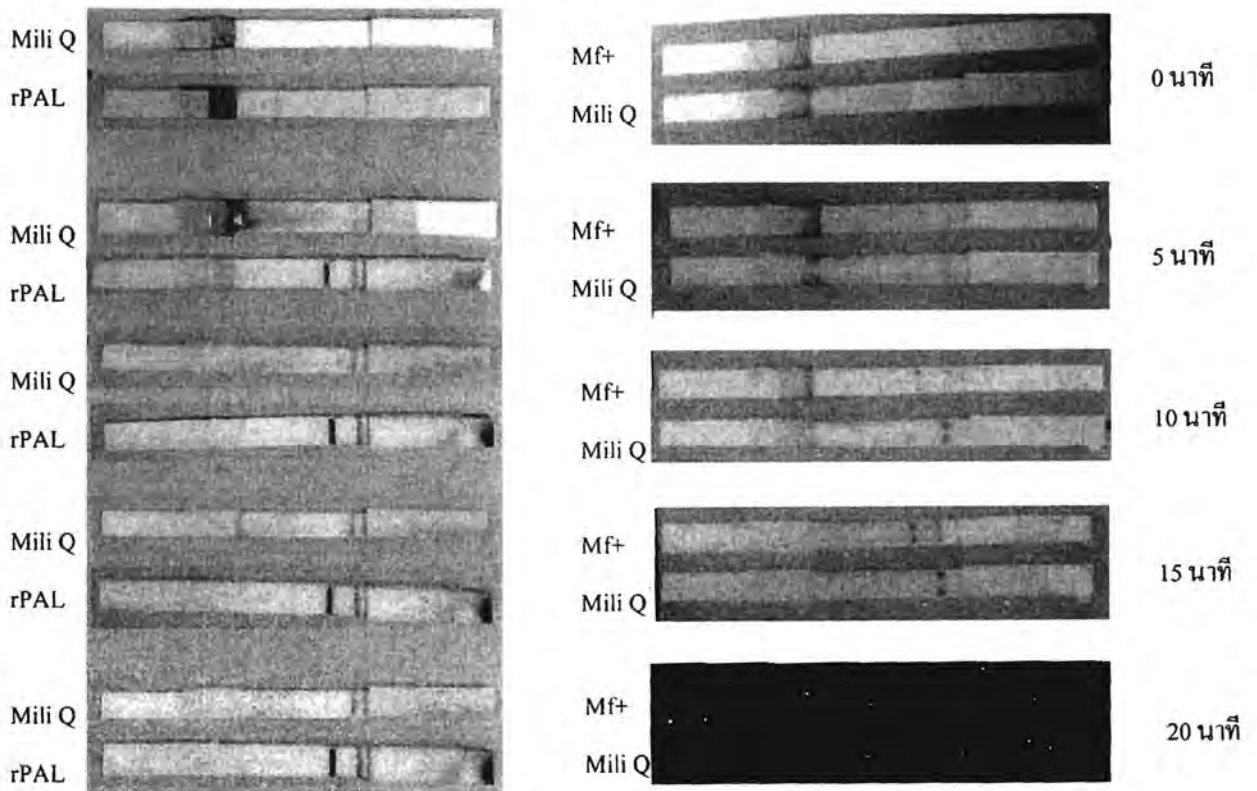


รูปที่ 7

ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการติดกับอนุภาคทองคำระดับนาโน

**2. การทดสอบชุด lateral flow strip โดยใช้ anti-PAL antibodies ในการตรวจหา PAL antigen หรือ human-anti rWSP เพื่อการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง**

จากการทดลองใช้ lateral flow strip โดยใช้ anti-PAL antibodies ในการตรวจหา PAL antigen หรือ human-anti rWSP เพื่อการวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่เวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 นาทีพบว่าเวลาที่สามารถตรวจพบผลบวกได้ตั้งแต่เวลาที่ 5 โดยไม่พบผลบวกบน test line เมื่อทดสอบด้วย mili Q water ดังรูปที่ 8



**รูปที่ 8** ผลการทดสอบชุด lateral flow strip เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง โดยตรวจหาแอนติเจน หรือ แอนติบอดี

อย่างไรก็ตามชุดตรวจ lateral flow strip ที่ใช้ตรวจหา rPAL ยังพบว่ามีความผิดพลาดในเรื่องของการจับกันระหว่างแอนติบอดี จึงไม่เหมาะต่อการนำไปทดสอบหาประสิทธิภาพของชุดตรวจต่อไป

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพของชุด lateral flow strip ในการวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

จากการทดสอบความไวของชุด lateral flow strip โดยนำซีรัมของผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่ตรวจเจอไมโครฟิลาเรียในเลือด (Mf+, Ag+) ตรวจพบแอนติเจนของพยาธิเท้าช้าง (Mf-, Ag+) และผู้ป่วยที่มีอาการอวัยวะบวม (C) เปรียบเทียบกับวิธีตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี ICT และ Og4C3 ELISA (ตารางที่ 2) พบว่าชุดตรวจสามารถตรวจผลได้ไวโดยใช้เวลาไม่เกิน 20 นาที โดยมีความไวอยู่ที่ 65.7%

จากการทดสอบความจำเพาะของชุด lateral flow strip โดยนำซีรัมของผู้ที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของพยาธิเท้าช้างจากผู้ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นพบว่า lateral flow strip มีการเกิด cross-reaction กับพยาธิชนิดอื่นในจำนวนที่น้อย โดยมีความจำเพาะสูงถึง 84.72%

**ตารางที่ 2** ความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ lateral flow strip เปรียบเทียบกับวิธี Og4C3 ELISA และ immunochromatographic test (ICT)

ICS		ICT		Total	Og4C3 ELISA		Total
		+	-		+	-	
Mf+ (Ag+)	+	10	0	10	3	7	10
	-	4	0	4	0	4	4
	Total	14	0		3	11	
Mf- (Ag-)	+	10	0	10	5	5	10
	-	4	3	7	0	7	7
	Total	14	3		5	12	
C	+	3	0	3	0	4	4
	-	1	0	1	0	0	0
	Total	4	0		0	4	
EN	+	0	6	6	3	3	6
	-	0	10	10	0	13	13
	Total	0	16		3	16	
Other	+	ND	ND	5	ND	ND	5
	-	ND	ND	51	ND	ND	51

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โรคเท้าช้างเป็นโรคที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้เป็นโรคทางปรสิตที่ควรกำจัดให้หมดไป เป็นโรคแรกภายในปี พ.ศ. 2563 ทั้งนี้ โครงการกำจัดโรคเท้าช้างขององค์การอนามัยโลกได้กำหนด เป้าหมายในการควบคุมโรคให้มีอัตราความชุกของการติดเชื้อเหลืออยู่ร้อยละ 1 จากการตรวจแอนติเจนที่ จำเพาะ หรือร้อยละ 0.2 เมื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่สำคัญของการ ประเมินผลการสำเร็จของโครงการจำเป็นต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่มีความไวสูง เพื่อสามารถประเมิน สถานการณ์ที่แท้จริงของโรคได้ สำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้จัดให้มีโครงการการ กำจัดโรคเท้าช้างในปี พ.ศ. 2545-2549 จากข้อจำกัดทั้งด้านภูมิประเทศ ภูมิอากาศ การเข้าถึงแหล่งชุก ชุมของโรค การเข้าออกของประชากรในแหล่งชุกชุมของโรค การมีแรงงานต่างด้าวที่เป็นโรคเท้าช้างอยู่ เป็นจำนวนมากและกระจายอยู่ตามแหล่งชุมชนต่างๆ ของไทย ตลอดจนข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัย โดยในหลายพื้นที่สามารถทำได้เฉพาะการตรวจหาไมโครฟิลาเรีย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่ำแม้จะมึ ความจำเพาะสูงและในผู้ป่วยบางรายที่มีการติดเชื้ออาจจะตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด ทำให้การประเมินสถานการณ์โรคเท้าช้างในปัจจุบันมีแนวโน้มว่าจะต่ำกว่าความเป็นจริง

จากข้อจำกัดของการตรวจไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดทำให้มีการพัฒนาการตรวจหา แอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้างเพื่อให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างได้มีประสิทธิภาพและ รวดเร็วขึ้น โดยมีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง แต่ละชนิดมาใช้ ปัจจุบันมีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิด ที่ใช้กันแพร่หลาย ซึ่งที่มีความไวและ ความจำเพาะต่อการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเท้าช้างจาก *W. bancrofti* สูงได้แก่โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด AD12.1 และ Og4C3 การตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิด Og4C3 เป็นตัวเคลือบในงานหลุมทดสอบ ในรูปแบบ ELISA ให้ความไวร้อยละ 95.8-100 และให้ ความจำเพาะถึงร้อยละ 100 สำหรับการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด AD12.1 ใช้วิธีที่เรียกว่า immunochromatographic test (ICT) ซึ่งเหมาะสมในการตรวจ ภาคนามเพราะทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว รู้ผลการตรวจได้ภายในเวลาประมาณ 10-15 นาที อีกทั้งมึ ความไวและความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 95.7-97 และร้อยละ 99-100 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ชุดตรวจ วินิจฉัยดังกล่าวสามารถตรวจวินิจฉัยได้เฉพาะโรคเท้าช้างที่เกิดจาก *W. bancrofti* เท่านั้น สำหรับการ ตรวจหาแอนติเจนของพยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยการติด พยาธิโรคเท้าช้าง *B. malayi* ด้วยวิธี ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *B. malayi* ชื่อ 17E10

ให้ความไวในการตรวจวินิจฉัยถึงร้อยละ 93.3 อย่างไรก็ตาม ยังคงพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับพยาธิหัวใจสุนัข (*Dirofilaria immitis*) ได้ และไม่มีจำหน่ายโดยทั่วไป

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการนำวิธีการวินิจฉัยซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงมาใช้ โดยเฉพาะการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะในการวินิจฉัยโรคเท้าช้างจาก *W. bancrofti* แต่เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงมีการใช้ประเมินสถานการณ์ในบางพื้นที่เท่านั้น ปัจจุบัน การพัฒนาวิธีการวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา ทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำและจำเพาะสูง สามารถตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของพยาธิฟิลาเรียรวมทั้งพยาธิโรคเท้าช้างได้ในการทดสอบครั้งเดียว แต่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง ผู้ทำการทดสอบต้องได้รับการอบรมให้สามารถปฏิบัติงานได้ถูกต้องและเข้าใจหลักการแปลผล ตลอดจนมีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ ดังนั้น การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างซึ่งให้ความไวและความจำเพาะสูงที่สามารถใช้ได้ในภาคสนาม และมีราคาถูก และสามารถผลิตได้เองภายในประเทศจะมีประโยชน์อย่างยิ่งเพื่อประเมินสถานการณ์ที่แท้จริงของโรค และทำให้สามารถวางแผนการควบคุมและกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โดยในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้เลือกโปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) และ peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนหลักของแบคทีเรียไวลบาเซียที่สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคเท้าช้างจึงได้ทำการโคลนและสร้างโปรตีนบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมาผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนดังกล่าว และพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่สามารถตรวจได้ทั้งโรคเท้าช้างจาก *W. bancrofti* และ *B. malayi* ซึ่งเป็นชุดตรวจในรูปแบบ lateral flow strip สามารถตรวจวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว สามารถใช้ในภาคสนามได้ ผลการศึกษาพบว่าการใช้ชุดตรวจ lateral flow strip ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน WSP มีประสิทธิภาพในการตรวจผู้ป่วยโรคเท้าช้างได้ทั้งในผู้ป่วยที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรีย ผู้ป่วยที่มีแอนติเจนของพยาธิเท้าช้างแต่ตรวจไม่พบไมโครฟิลาเรีย และผู้ป่วยที่มีอวัยวะบวมในระยะเวลาดันรวดเร็ว โดยชุดตรวจ lateral flow strip ตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน WSP มีความไว 65.7% และมีความจำเพาะสูงถึง 84.72 ซึ่งให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยวิธี O<sub>6</sub>4C3 ELISA แม้ว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าประสิทธิภาพของ lateral flow strip จะต่ำกว่าเมื่อเทียบกับวิธี ICT อย่างไรก็ตามผู้วิจัยคาดว่าอาจจะมีส่วนเหตุจากระยะเวลาการเก็บตัวอย่างซีรัม เนื่องจากตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างซีรัมที่เก็บไว้เป็นเวลานาน ทั้งนี้ผู้วิจัยเชื่อว่าชุดตรวจ lateral flow strip จากการศึกษาครั้งนี้จะมีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเท้าช้างได้เป็นอย่างดีทั้งในสถานรักษาพยาบาลและในการตรวจภาคสนาม

## 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) Tritteeraprapab 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) Tritteeraprapab S, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. (1998) *Wuchereria bancrofti*- specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. *Chulalongkorn Medical Journal*. 42:267-77.
- 8) Tritteeraprapab 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 52<sup>nd</sup> 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, Cecilian 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, Tzertztintis 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. (2005) What is nanotechnology? *Nanotechnology perception*.1: 3-15.

- 21) Zhou J, Ralston J, Sedev R, David A. (2009) Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*.331: 251–62.
- 22) Baptista P, Pereira E, Eaton P. (2007) Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *ABC*. 391: 943-50.
- 23) Modified from [www.nanoprob.es.com/Vol8\\_Iss5.html](http://www.nanoprob.es.com/Vol8_Iss5.html).
- 24) Sato K, Hosokawa K, Maeda M. (2007) Colorimetric biosensors based on DNA-nanoparticle conjugates. *JSAC*. 23: 17-20.
- 25) Ackerson CJ, Sykes MT, Kornberg RD. (2005) Defined DNA/nanoparticle conjugates. *PNAS*.102: 13383-5.
- 26) Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. (1998) One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J Amer Chem Soc*.120: 1959-64.
- 27) Reynolds AJ, Haines AH, Russell DA. (2006) Gold glyconanoparticles for mimics and measurement of metal ion-Mediated carbohydrate-carbohydrate interactions. *Langmuir*. 22: 1156-63.
- 28) Condon A. (2006) Designed DNA molecules:principles and applications of molecular nanotechnology. *Nature Reviews Genetics*.7: 565-75.
- 29) Pingarro' JM, Ya'n`ez-Seden`o P, Iez-Corte' s AG. (2008) Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*. 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  
หน่วยปฏิบัติการวิจัย โรคเท้าช้าง 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*. 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*. 54(6): 593-604.
- Tiawsirisup S, Thanapaisarnkit T, Varatorn E, Apichonpongsa T, Bumpenkiattikun N, Rattanapuchpong S, Chungpiwat S, **Sanprasert V**, Nuchprayoon S. 2010 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*. 40(2): 165-170.

- **Sanprasert V**, Sujariyakul A, Nuchprayoon S. 2010 A single dose of doxycycline in combination with diethylcarbamazine for treatment of bancroftian filariasis. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 41(4):800-812.
- Junpee A, Tencomnao T, **Sanprasert V**, Nuchprayoon S. 2010 Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis. *Parasitology Research*. 107(4): 807-816.
- Semnani RT, Mahapatra L, Moore V, **Sanprasert V**, Nutman TB. 2011 Functional and phenotypic characteristics of alternative activation induced in human monocytes by IL-4 or the parasitic nematode *Brugia malayi*. *Infection and Immunity*. 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
- “Multiple PCR for Soil-Transmitted Helminths detection”

## 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@gmail.com

### 5. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม)	แพทยศาสตร์	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

Molecular Parasitology and Immunology

Lymphatic filariasis

## 7. ประสบการณ์วิจัย

### 7.1 อำนวยการแผนงานวิจัย

#### 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

- “Early detection of bancroftian filariasis in children and young individuals using IgG4 assays” (หัวหน้าโครงการ)
- “การวินิจฉัยโรคเท้าช้างที่เกิดจากเชื้อ *Wuchereria bancrofti* ในระยะแรกเริ่มโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสและการตรวจทางน้ำเหลือง” (หัวหน้าโครงการ)
- “Polymerase chain reaction-based detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus*” (หัวหน้าโครงการ)
- “บทบาทของโวลบาเกียในการเกิดพยาธิสภาพผลข้างเคียงต่อยารักษาโรคเท้าช้าง (The role of *Wolbachia* in the pathogenesis of chemotherapy-induced adverse reactions in lymphatic filariasis)” (หัวหน้าโครงการ)
- “การศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti* ในคนไทยและแรงงานอพยพ (Study and differentiation of *Wuchereria bancrofti* strains in Thais and migrant workers)” (หัวหน้าโครงการ)
- “ความสัมพันธ์ของแอนติบอดี IgG ชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อโปรตีน *Wolbachia* surface protein (WSP) ในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง (Association between specific anti-WSP IgG subclasses and clinical manifestation in lymphatic filariasis patients)” (หัวหน้าโครงการ)
- “ผลของยา Doxycycline 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)
- “ผลของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *Wolbachia* spp. เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคเท้าช้าง (Effects of antimicrobial agents against *Wolbachia* spp. for treatment of filariasis)” (ผู้ร่วมวิจัย)

## 7.2 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,** Akrovorn P, Promtong 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-Ngam 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 Bancroftion 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, Akrabovorn 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, Yingyoud 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**, Sangprakam 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 Bancroftian 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**, Sitichalemchai 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 Paratitism 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 Problems 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. 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. 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**. 2009 DNA-based diagnosis of lymphatic filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 40(5):904-13.
- Junpee A, Tencomnao T, Sanprasert V, **Nuchprayoon S**. 2010 Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis. *Parasitol Res*. 107(4):807-16.
- Sanprasert V, Sujariyakul A, **Nuchprayoon S**. 2010 A single dose of doxycycline in combination with diethylcarbamazine for treatment of bancroftian filariasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 41(4):800-12.
- Tiawsirisup S, **Nuchprayoon S**. 2010 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*. 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**, Chatsuwat 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.

## ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย) ผศ.ดร.นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์  
(ภาษาอังกฤษ) Amornpun Sereemaspun, MD, PhD
2. หมายเลขประจำตัวประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail  
Department of Anatomy  
Faculty of Medicine  
Chulalongkorn University  
Bangkok 10330, Thailand  
Tel. (662)-256-4281  
Fax. (662)-252-7028

## 5. ประวัติการศึกษา

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

## 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

## 7. ประสบการณ์วิจัย

7.1 อำนวยการแผนงานวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

### 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Takeuchi K, Sereemaspun A, Inagaki T, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Ookawara S. 2003 Morphologic characterization of green fluorescent protein in embryonic, neonatal, and adult transgenic rats. *Anat Rec A DiscovMol Cell Evol Biol.* 274(2):883-6.
- Sereemaspun A, Takeuchi K, Sato Y, Iwamoto S, Inakagi T, Ookawara S, Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. 2005 Testosterone-dependent transgene expression in the liver of the CAG-lacZ transgenic rat. *Gene Expr.* 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. 2007 Gold nanoparticle as an alternative tool for urine microalbumin test: The first world report. *Renal Failure* 29 (8), pp. 1047-1048
- Lowanitchapat A, Sereemaspun A, Ekpo P, et al. 2008 LipL32 mRNA expression in kidneys, livers and lungs of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. *ASIAN BIOMEDICINE.* 2(2): 141-146
- Sereemaspun A, Wiwanitkit V, Rojanathanes R. 2008 Effect of gold nanoparticle on renal cell: An implication for exposure risk *Renal Failure.* 30 (3), pp. 323-325
- Wiwanitkit V, Sereemaspun A, Rojanathanes R. 2008 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.* 22 (4), pp. 583-585
- Rojanathanes, R., Sereemaspun, A., Pimpha, N., Buasorn, V., Ekawong, P., Wiwanitkit, V. 2008 Gold nanoparticle as an alternative tool for a urine pregnancy test *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 47 (3), pp. 296-299
- Wiwanitkit V, Sereemaspun A, Rojanathanes R. 2009 Identification of gold nanoparticle in lymphocytes: A confirmation of direct intracellular penetration effect. *Turkish Journal of Hematology .* 26 (1), pp. 29-30
- Wiwanitkit V, Sereemaspun A, Rojanathanes R. 2009 Effect of gold nanoparticle on the microscopic morphology of white blood cell. *Cytopathology.* Apr 20(2):109-10.
- Wiwanitkit V, Sereemaspun A, Rojanathanes R. 2009 Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertil Steril.* Jan;91(1):e7-8.

- **Sereemaspun A**, Wiwanitkit V, Rojanathanes R. 2009 Interaction between gold nanoparticles and *Cryptococcus* spp. *Archives of Hellenic Medicine* .26 (4), pp. 520-522
- Wiwanitkit V, **Sereemaspun A**, Rojanathanes R. 2009 Gold nanoparticles and a microscopic view of platelets: a preliminary observation. *Cardiovasc J Africa*. 20(2):141-2.
- Kamnerdsin O , Korkiatsakul V, Rakphetmanee K Rojanathanes R, Chirathaworn C, **Sereemaspun A**. 2009 Influence of Gold Nanoparticles on Intracellular Organelles and Cell Viability in Hela Cells.11 supp 2: 95-96.
- **Sereemaspun, 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., **Sereemaspun, A.** 2009 Gold Nanoparticle As A Nevel Tool For DNA and Protein Detection. *Chula Med J*. 53(6): 465-475
- Lowanitchapat A, Payungporn S, **Sereemaspun A**, Ekpo P, Phulsuksombati D, Poovorawan Y, Chirathaworn C. 2010 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*. Sep 33(5): 423-34.
- Sap-Lam, N., Homklinchan, C., Larpudomlert, R., Warisnoicharoen, W., **Sereemaspun, A.**, Dubas, S.T. 2010 UV irradiation-induced silver nanoparticles as mosquito larvicides *Journal of Applied Sciences*. 10 (23), pp. 3132-3136
- Ammaranond P, Sriyarak J, Saejong S, Deesin P, **Sereemaspun, A.** Rojanathanes R. 2010 ENHANCED AGGLUTINATION REACTION OF ABO SUBGROUPS BY GOLD NANOPARTICLE: IMPLICATION FOR IDENTIFICATION OF ABO DISCREPANCIES. *VOX SANGUINIS*. 99: 501-501
- Chirathaworn C, Chantaramalai T, **Sereemaspun A**, Kongthong N, Suwancharoen D. 2011 Detection of *Leptospira* in urine using anti-*Leptospira*-coated gold nanoparticles *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, Jan 34(1) 31-4 (Epub 2009 Dec 14)
- Suntravat M, Yusuksawad M, **Sereemaspun A**, Pérez JC, Nuchprayoon I. 2011 Effect of purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X) on renal hemodynamics, renal functions, and coagulopathy in rats. *Toxicon*. Jun 16. [Epub ahead of print]

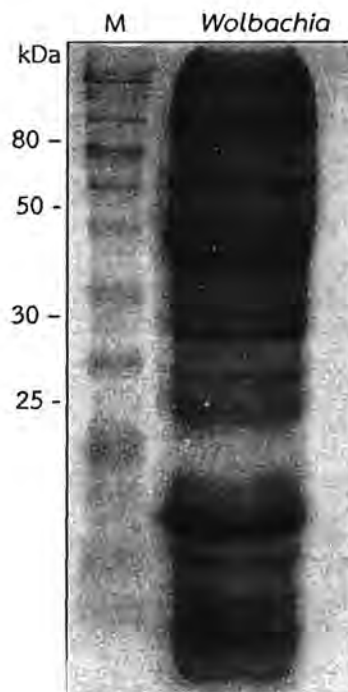


## ภาคผนวก

## ผลงานวิจัยในปีงบประมาณ 2557

### 1. การเตรียม crude *Wolbachia* antigen

แบคทีเรีย *Wolbachia* ถูกสกัดแยกออกจากหนอนพยาธิหัวใจสุนัข 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* จากหนอนพยาธิหัวใจสุนัขได้ด้วยควมบริสุทธิ์สูง โดยความเข้มข้นของ NP-40 ที่เพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่แยกได้เพิ่มขึ้น และสามารถลดการปนเปื้อนจากหนอนพยาธิซึ่งเป็นโฮสต์ได้ โดยสารบัฟเฟอร์ที่ให้ควมเข้มข้นของโปรตีนของแบคทีเรีย *Wolbachia* มากที่สุดแต่มีการปนเปื้อนจากโปรตีนของหนอนพยาธิน้อยที่สุดคือ 0.85% NaCl + 0.08% NP-40

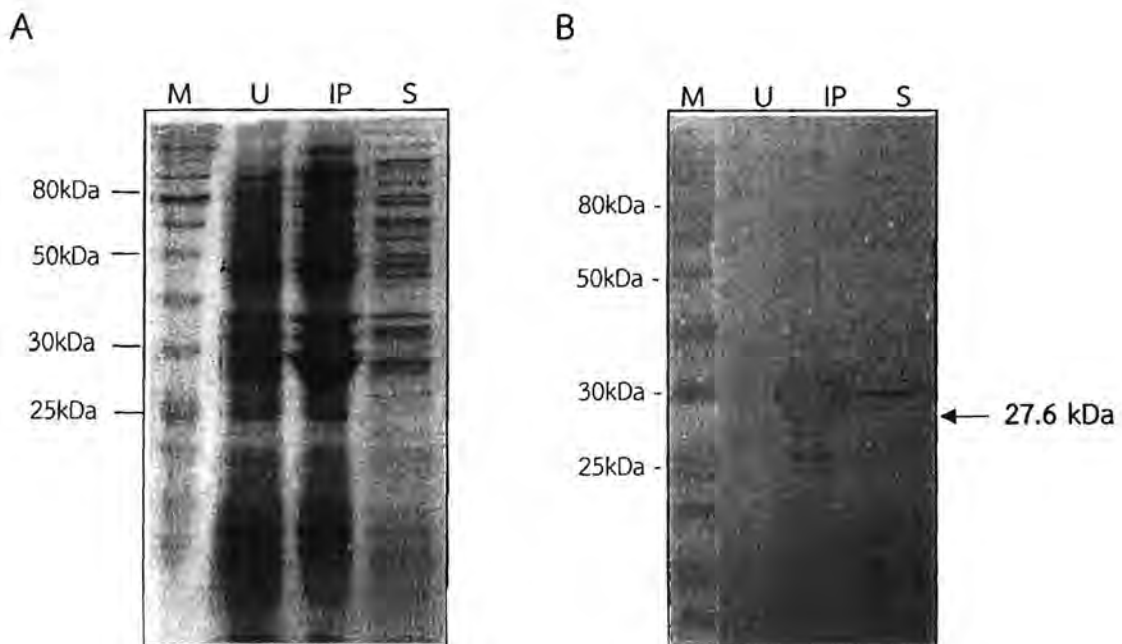


รูปที่ 9 *Wolbachia* crude antigen ที่สกัดแยกได้จากหนอนพยาธิหัวใจสุนัข

## 2. ผลิต recombinant antigens ของแบคทีเรียโวลบาเซีย

### 2.1 การผลิตโปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP)

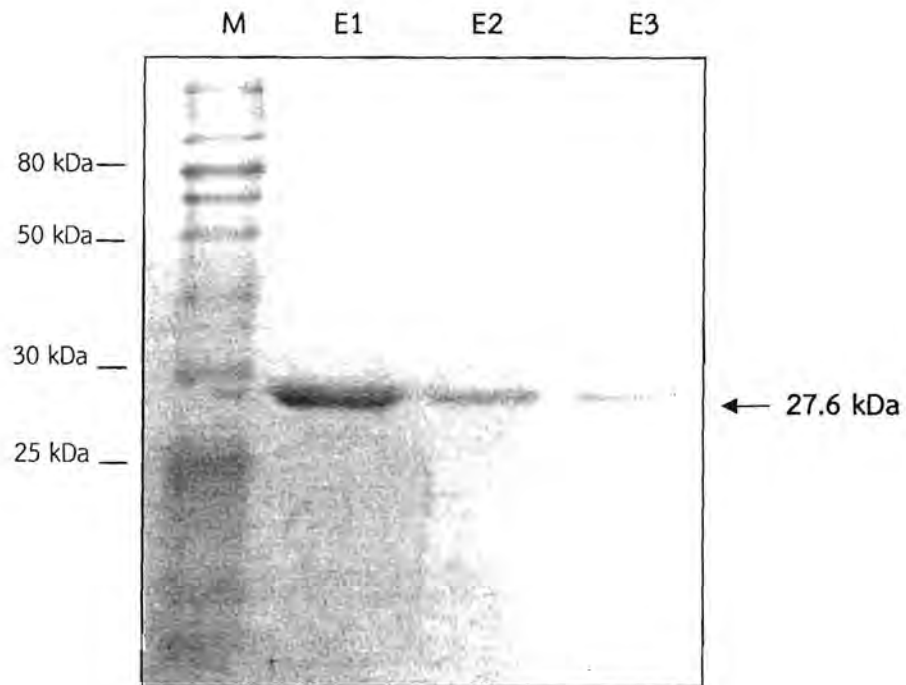
Recombinant *wsp* clone ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ได้ถูกนำมาทำการทดสอบเพื่อหาเวลาและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโปรตีน WSP โดยทำการเลี้ยง *Escherichia coli* ที่มี *wsp* gene ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG แล้วทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่เวลาต่างๆ เก็บส่วนใส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



**รูปที่ 10** การผลิตโปรตีน WSP โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

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

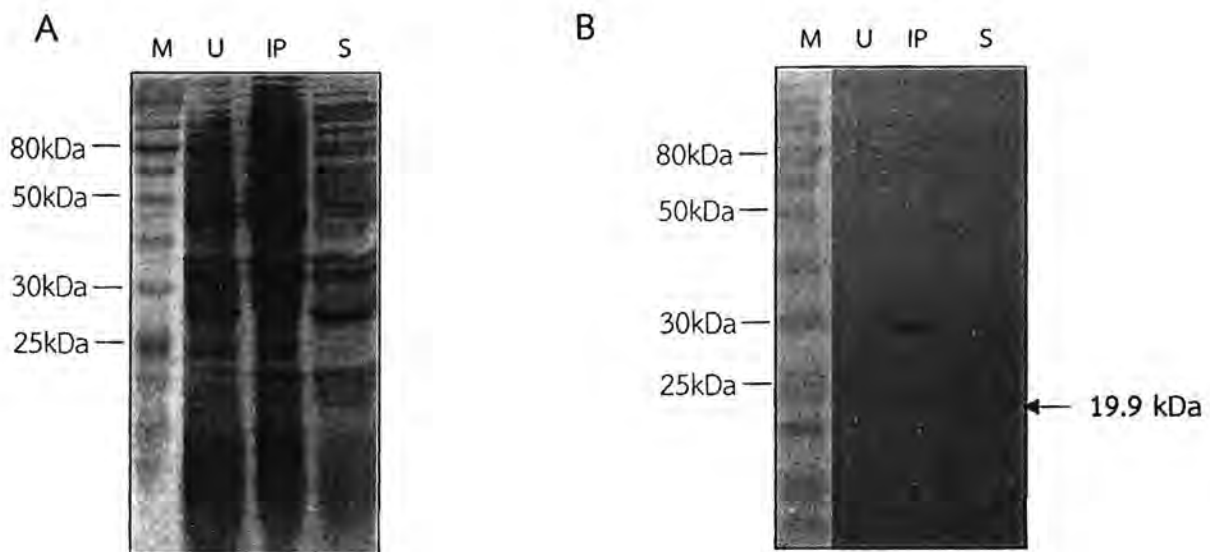
Coomassie blue staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B)



**รูปที่ 11** โปรตีน *Wolbachia* Surface Protein (WSP) 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  
M: Molecular weight marker; E1:Elution 1; E2: Elution 2; E3:Elution 3

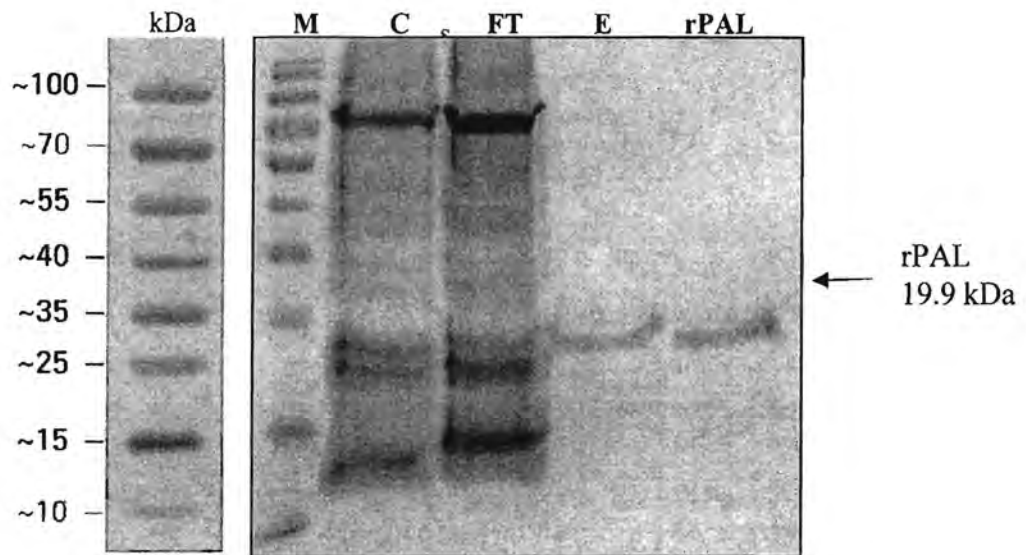
## 2.2 การผลิตโปรตีน peptidoclycan associated lipoprotein (PAL)

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 ชั่วโมง หลังการเหนี่ยวนำ แล้วได้ทำการสร้างโปรตีนจำนวนมากและแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA column ทำให้สามารถแยกโปรตีน PAL ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* ได้ (รูปที่ 9)

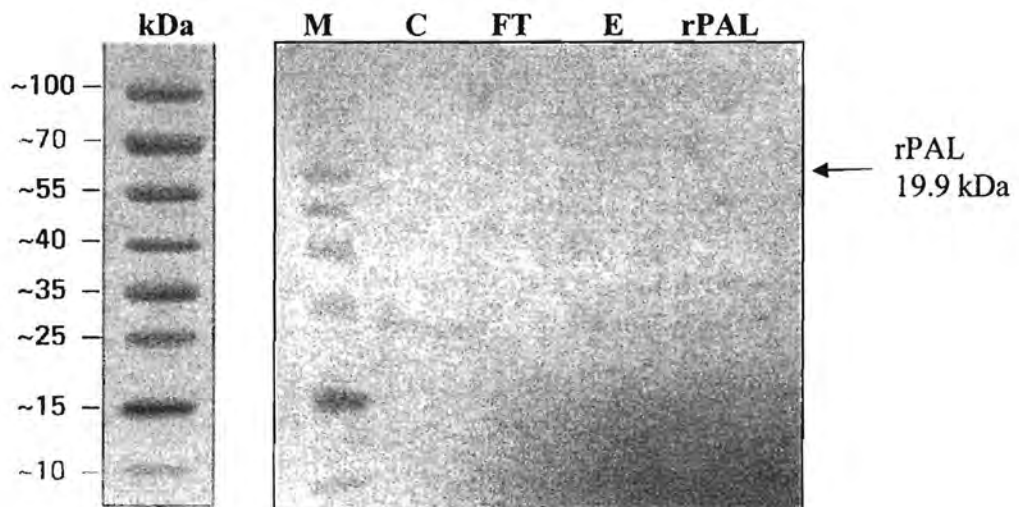


**รูปที่ 12** การผลิตโปรตีน PAL โดยการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (U= uninduce, IP= Insoluble Protein, S= Soluble Protein) แล้วข้อมด้วย coomassie blue staining (A) และ Western blot analysis by anti-His-HRP (B)

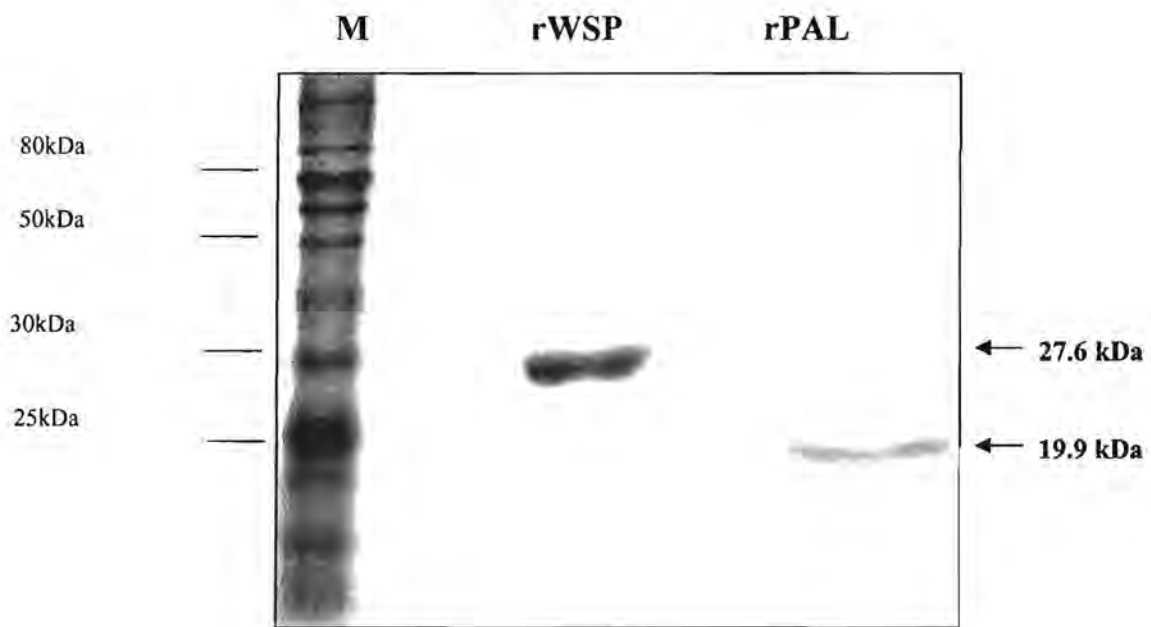
A



B



**รูปที่ 13** โปรตีน Peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) 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 PAL ที่ 19.9 kDa  
M: Molecular weight marker; C: Crude protein; FT: flow through; E: Elute



**รูปที่ 14** 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 และโปรตีน PAL ขนาด 19.9 kDa; M: Molecular weight marker

### 3. เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ รวมทั้งคนปกติที่อาศัยอยู่ในแหล่ง ชุกชุมของโรคเท้าช้าง

ได้ทำการสำรวจโรคเท้าช้างในแรงงานชาวพม่าโดยการเจาะเลือดในเวลากลางคืนในหมู่บ้าน  
คลองซื่อ 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 ใน  
อำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี โดยการเจาะเลือดในเวลากลางคืน สามารถรวบรวมอาสาสมัครได้  
จำนวนทั้งสิ้น 51 คนเป็นเพศชาย 23 คน เพศหญิง 28 คน อายุระหว่าง 16-62 ปี (ตารางที่ 1) และได้ทำ  
การตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้างจากการทำฟิล์มเลือดหนา และฟิล์มเลือดบางเพื่อตรวจหาไมโครฟิลาเรียใน  
เลือดและตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของโรคเท้าช้างโดยชุดตรวจวินิจฉัย Og4C3  
ELISA อย่างไรก็ตาม ไม่พบผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างจากการวินิจฉัยทั้ง 3 วิธี ในอาสาสมัครทั้ง 142 คน  
(ตารางที่ 1)

ตารางที่ 3 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.สังข ละบุรี	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 อุ้มผาง ในจังหวัดตาก และอำเภอสังขละบุรีในจังหวัดกาญจนบุรี โดยการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง โดยวิธี immunochromatographic test (ICT) พบผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างจำนวน 49 ราย คิดเป็นอัตราความชุกของโรคเท้าช้างร้อยละ 0.62 (ตารางที่ 2) มีอายุเฉลี่ย  $32.6 \pm 17.0$  ปี (อายุระหว่าง 4-80 ปี) (ตารางที่ 3) โดยเป็นเพศชาย 36 ราย (73.5%) อายุเฉลี่ย  $32.22 \pm 17.47$  ปี (4-80 ปี) เพศหญิง 13 ราย (26.5%) อายุเฉลี่ย  $33.54 \pm 16.28$  ปี (13-60 ปี) และพบผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพจำนวน 4 ราย คิดเป็นอัตราร้อยละ 0.05 (ตารางที่ 4) อายุเฉลี่ย  $57.50 \pm 15.55$  (อายุระหว่าง 45-80 ปี) เป็นเพศชาย 3 ราย (75%) และเพศหญิง 1 ราย (25%) โดยเป็นผู้มีขาโต 3 ราย และอัมตะขาโต 1 ราย รวมตัวอย่างสำหรับการศึกษาคั้งนี้จำนวน 195 ราย แบ่งเป็น ผู้ป่วยโรคเท้าช้างจำนวน 53 ราย และผู้ไม่ติดโรคเท้าช้างจำนวน 142 ราย (ตารางที่ 5) ทั้งนี้อยู่ในระหว่างรวบรวมตัวอย่างผู้ป่วยโรคปรสิตอื่นๆ

**ตารางที่ 4** 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
	อุ้มผาง	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 5** ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่ตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อพยาธิโรคเท้าช้าง

พื้นที่		จำนวนคนที่ตรวจพบแอนติเจน (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 6** ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคเท้าช้าง ที่ตรวจพบพยาธิสภาพ

จังหวัด	จำนวนผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพ (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย $\pm$ SD (ช่วงอายุ)	พยาธิสภาพที่ตรวจพบ
		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)	

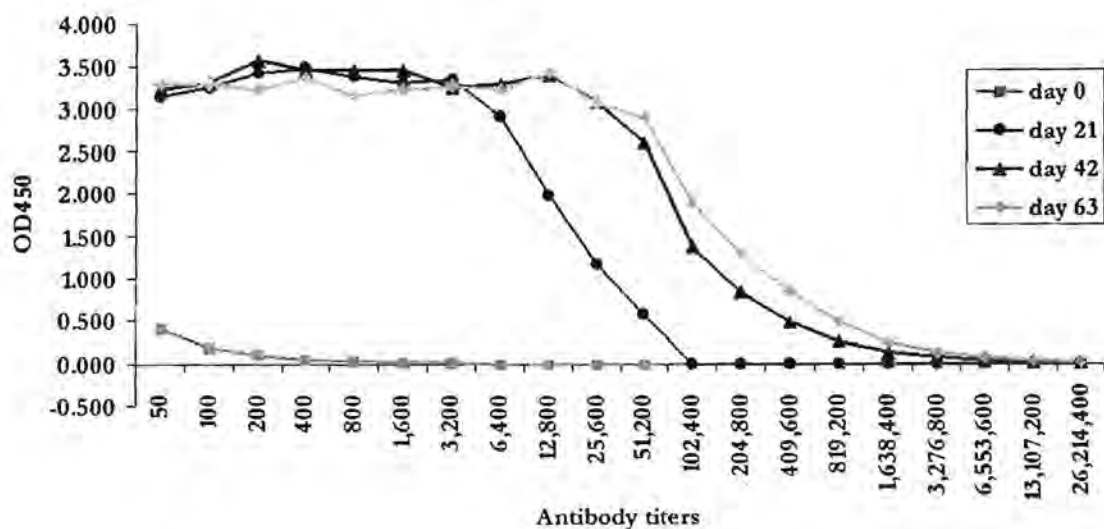
ตารางที่ 7 การจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างจากการตรวจวินิจฉัยโรคเท้าช้าง

การเกิดพยาธิสภาพ	การตรวจแอนติเจน	การตรวจหาไมโครฟิลาเรีย	จำนวนไมโครฟิลาเรีย (ตัว/เลือด 1 มล.)	จำนวน (ราย)	เพศ		อายุเฉลี่ย $\pm$ SD (ช่วงอายุ)
					ชาย (%)	หญิง (%)	
ไม่มีพยาธิสภาพ	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)

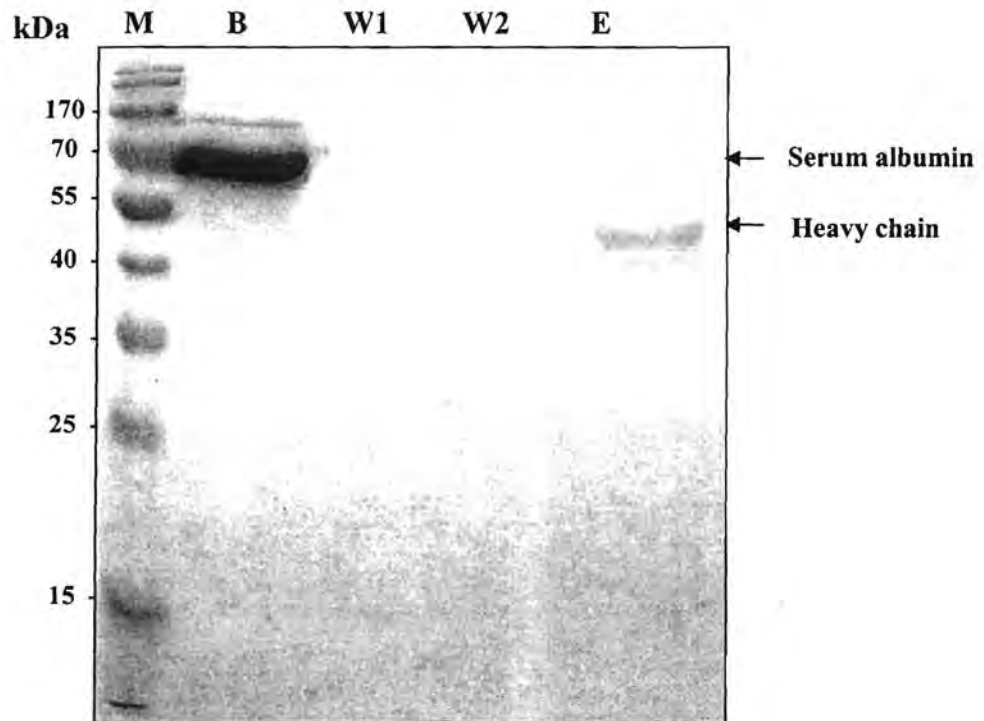
#### 4. การเตรียม polyclonal antibodies ที่จำเพาะต่อ rWSP และ rPAL

##### 4.1 Polyclonal anti-rWSP antibodies

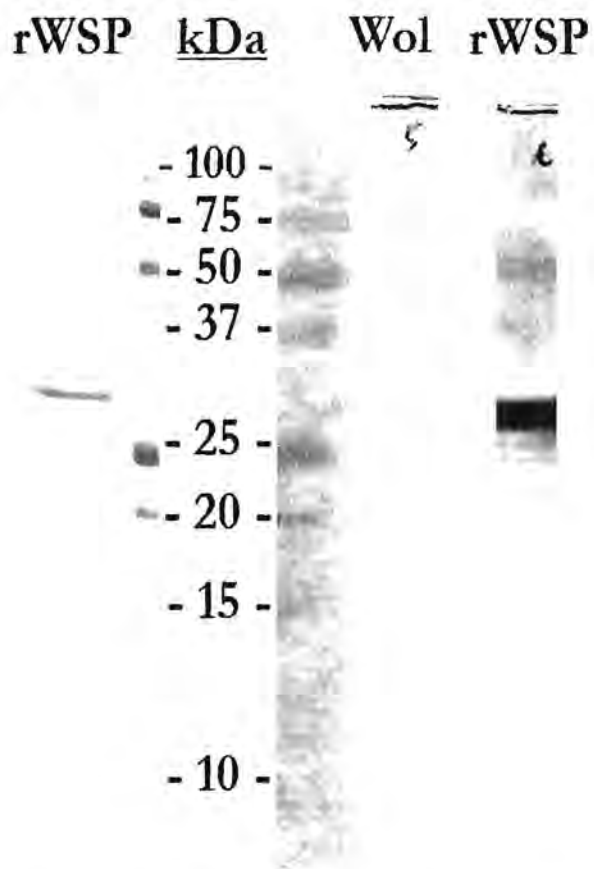
ภายหลังเจาะเก็บซีรัมจากกระต่าย ตรวจวัด antibody titers ของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี indirect ELISA พบการสร้าง anti-rWSP antibodies ในปริมาณสูง ตั้งแต่วันที่ 21 หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก และสูงที่สุดในวันที่ 63 (รูปที่ 11) จึงได้นำซีรัมจากกระต่ายในวันที่ 63 มาทำการแล้วแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ (antibody purification) โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads<sup>®</sup> 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 15 Antibody titers ของ anti-*Wolbachia* Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ indirect ELISA



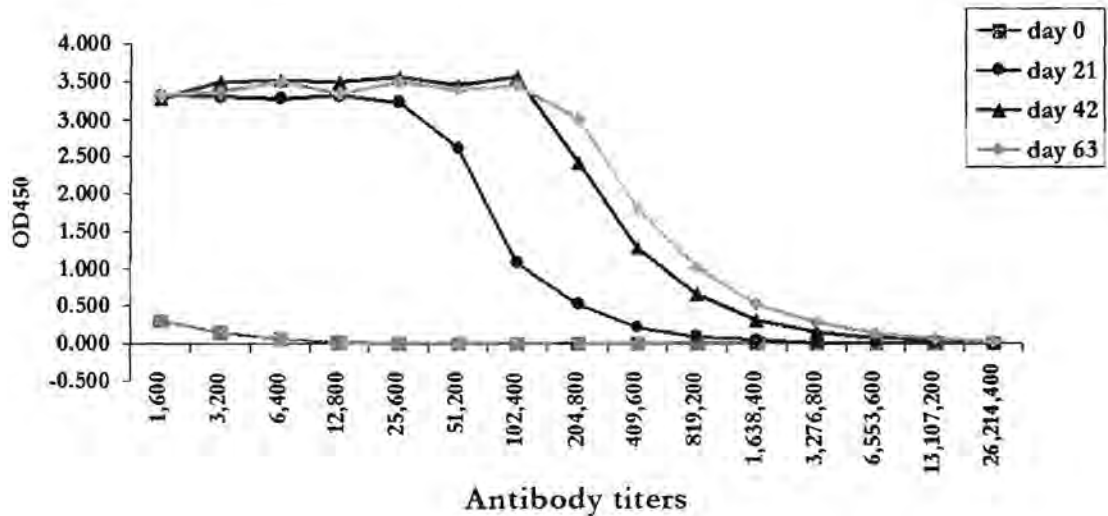
**รูปที่ 16** Antibody purification ของ polyclonal anti-*Wolbachia* Surface Protein (WSP) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads<sup>®</sup> Magnetic Beads) นำมาแยกโดย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining  
M: Molecular weight marker; B: Before purification; W: Wash; E: Elute



**รูปที่ 17** 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

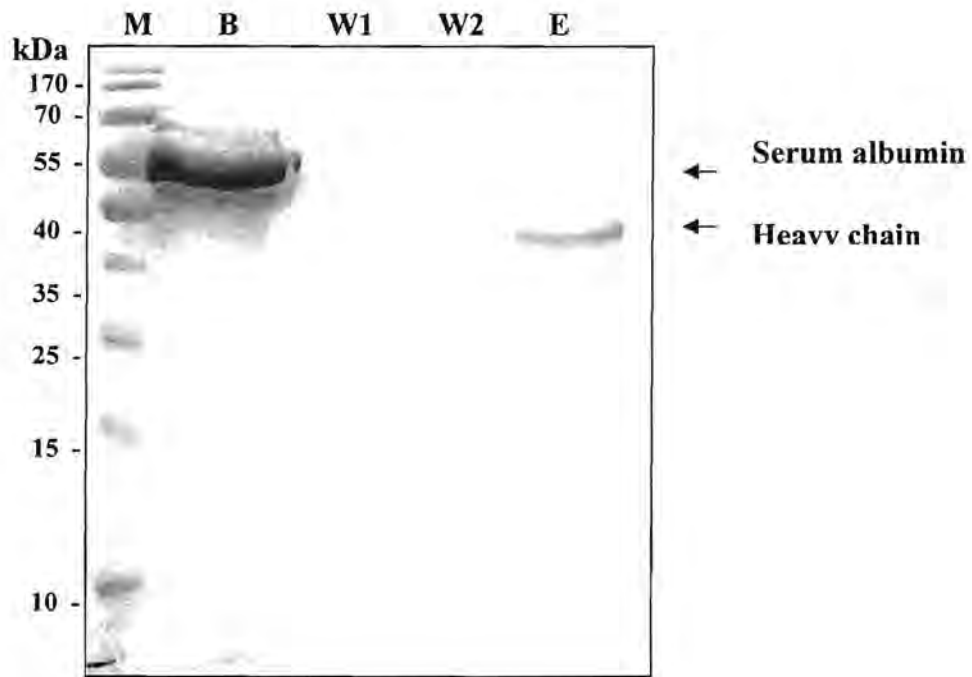
#### 4.2 Polyclonal anti-rPAL antibodies

ภายหลังจะเก็บซีรัมจากกระต่ายที่ฉีดกระตุ้นด้วย antibody peptide แล้วนำมา ตรวจวัด 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<sup>®</sup> Magnetic Beads) และนำมาตรวจหา antibody โดย SDS-PAGE พบว่าภายหลัง purification สามารถตรวจพบ heavy chain ของแอนติบอดีได้ และกำจัด albumin ในซีรัมกระต่ายออกไปได้ (รูปที่ 15)



รูปที่ 18

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



**รูปที่ 19** Antibody purification ของ polyclonal anti-peptidoglycan associated lipoprotein (PAL) antibodies โดยใช้ protein G magnetic beads (Dynabeads<sup>®</sup> Magnetic Beads) นำมาแยกโดย SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue staining  
M: Molecular weight marker; B: Before purification; W: Wash; E: Elute