



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โครงการวิจัยวิจัย
เงินงบประมาณแผ่นดิน
ปีงบประมาณ 2548

รายงานวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อ
พยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti*
ในคนไทยและแรงงานอพยพ

โดย

สุรางค์ นุชประยูร
สราวุธ สุวรรณทัตพะ
ยง ภู่วรรณ

มกราคม 2548

รายงานฉบับสมบูรณ์ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2548

ชื่อโครงการวิจัย (Research Project)

(ภาษาไทย) การศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง *Wuchereria bancrofti* ในคนไทยและแรงงานอพยพ

(ภาษาอังกฤษ) Study and differentiation of *Wuchereria bancrofti* strains in Thai and migrant workers

ผู้วิจัยหลัก / หัวหน้าโครงการ

รศ. พญ. ดร. สุรางค์ นุชประยูร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

3.1 รศ. พญ. ดร. สุรางค์ นุชประยูร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 นพ. สราวุธ สุวรรณทัตพะ

กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

3.3 ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ

โครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 นางสาวอลิสา จันทร์ปี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 นางสาววิวรรพรรณ สรรประเสริฐ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 นางสาวพรพรรณ จรัสสิงห์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. คำนำ

โรคเท้าช้าง (Lymphatic filariasis; Elephantiasis) เกิดจากพยาธิฟิลาเรียที่สำคัญคือ *Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi* โดยเป็นโรคที่พบมากในกว่า 80 ประเทศในแถบเขตร้อนทั่วโลก ประชากรทั่วโลกกว่าพันล้านคนมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ โดยในปัจจุบันพบผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างถึง 100-150 ล้านคน ซึ่งในจำนวนนี้มีผู้ที่แสดงอาการถึง 43 ล้านคน (Molyneux *et al.*, 2003) ถึงแม้ว่าโรคเท้าช้างจะไม่ใช่อันตรายถึงชีวิต แต่พยาธิสภาพในระยะเรื้อรังของโรคก่อให้เกิดความทุพพลภาพ และความพิการอย่างถาวร ไม่สามารถกลับเป็นปกติได้ จึงก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจและสังคม ซึ่งมีผลกระทบต่อการพัฒนาความเจริญของประเทศชาติ ดังนั้นองค์การนานาชาติเพื่อการกำจัดโรค (International Task Force of Disease Eradication; ITFDE) ในความดูแลขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้กำหนดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคที่ควรกำจัดให้หมดไปภายในปี พ.ศ. 2563 (Behbehani, 1998) ความสำเร็จของโครงการกำจัดโรคเท้าช้างจำเป็นต้องอาศัยวิธีการตรวจวินิจฉัยและติดตามประเมินผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งขณะนี้วิธีการตรวจวินิจฉัยยังมีข้อจำกัดในการติดตามผลการรักษา

สำหรับในประเทศไทยนั้นโรคเท้าช้างยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในระดับประเทศ ซึ่งประเทศไทยเองโดยกระทรวงสาธารณสุขได้มีส่วนร่วมในโครงการดังกล่าวเช่นกัน แม้ว่าในปัจจุบันจะสามารถดำเนินการควบคุมโรคได้ โดยมีอัตราการตรวจพบผู้ป่วยลดลงอย่างต่อเนื่อง และสามารถจำกัดเขตของโรคให้อยู่ในเขตรังโรคชุกชุม (endemic area) คือ ภาคตะวันตกของไทยติดชายแดนไทย-พม่า ได้แก่ จังหวัดตาก กาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน ซึ่งเป็นแหล่งโรคชุกชุมของ *W. bancrofti* และทางภาคใต้ของไทย โดยเฉพาะจังหวัดนราธิวาส ซึ่งเป็นแหล่งโรคชุกชุมของ *B. malayi* (Triteeraprab et al., 1998; 2001a; Nuchprayoon *et al.*, 2001)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ความต้องการแรงงานในประเทศไทยได้เพิ่มขึ้น ประกอบกับสภาพเศรษฐกิจที่ไม่ดีของประเทศเพื่อนบ้าน ทำให้มีแรงงานต่างชาติจากประเทศเพื่อนบ้านหลั่งไหลเข้ามาทำงานตามเขตเมืองเป็นจำนวนมากมานับล้านคนทั้งโดยถูกและผิดกฎหมาย โดยเฉพาะแรงงานจากประเทศพม่า จากการสำรวจแรงงานต่างชาติเหล่านี้พบโรคติดเชื้อที่สามารถแพร่กระจายได้หลายชนิดรวมทั้งโรคเท้าช้าง แม้ว่าโรคเท้าช้างที่เป็นระยะปรากฏอาการจะเป็น 1 ใน 7 ของโรคต้องห้ามซึ่งไม่ยินยอมให้แรงงานต่างชาติที่มีโรคเหล่านี้เข้ามาทำงานในประเทศไทย ผู้ติดเชื้อโรคเท้าช้างส่วนมากจะไม่ปรากฏอาการแต่มีไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดซึ่งสามารถแพร่เชื้อสู่ผู้อื่นได้ โดยยุงพาหะที่สำคัญคือยุงรำคาญซึ่งพบได้ทั่วไปตามเมืองใหญ่ แม้จะยังไม่มีรายงานว่ายุงรำคาญไทยนำโรคเท้าช้างมาสู่คนไทยแต่จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่ายุงรำคาญของไทยมีความสามารถในการเป็นพาหะได้

(Kamjanopas *et al.*, 1997; Triteeraprab *et al.*, 2001)

พยาธิโรคเท้าช้างที่พบในคนไทยและคนพม่า นั้นเป็นคนละสายพันธุ์กันและนำโดยยุงต่างชนิดกัน (Harinasuta *et al.*, 1970; Sucharit and Harinasuta, 1981; Sumethvanich *et al.*, 1996; Triteeraprab., 1997; 2000; 2001b; Jitpakdi *et al.*, 1999) โดยพยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์ไทยเป็น *W. bancrofti* ชนิด nocturnally subperiodic type (rural type) ตรวจพบไมโครฟิลาเรียได้ทั้งเวลากลางวันและกลางคืนแต่พบในเวลากลางคืนได้มากกว่า มียุงสกุลยุงลาย (*Aedes [Ochlerotatus] spp.*) เป็นพาหะนำโรค ผู้ที่ติดพยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์ไทยส่วนใหญ่ คือ ชาวไทย-กะเหรี่ยง (Harinasuta *et al.*, 1970; Filariasis Division, 1995; 1996) ที่อาศัยอยู่บริเวณชายแดนไทย-พม่า ซึ่งมีพื้นที่เป็นชนบทป่าเขา ส่วนพยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าเป็นชนิด nocturnally periodic type (urban type) สามารถตรวจพบไมโครฟิลาเรียได้เฉพาะเวลากลางคืน โดยมียุงพาหะคือ ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ซึ่งเป็นยุงชนิดที่พบมากในพื้นที่ที่มีน้ำขังหรือแหล่งน้ำสกปรกที่พบโดยได้ทั่วไปในเขตเมืองและชุมชนแออัด (Harinasuta *et al.*, 1970; Sasa, 1976; Sucharit and Harinasuta, 1981) พยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ นำเข้ามาโดยแรงงานอพยพชาวพม่า พบผู้ติดพยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่ากระจายอยู่ทั่วประเทศโดยเฉพาะในเขตเมืองและชานเมือง (Triteeraprab and Songtrus 1999; Triteeraprab *et al.*, 20001; 2001b; Filariasis Division, 1995; 1996)

ถึงแม้ว่าพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* ที่พบในคนไทยและคนพม่า นั้นเป็นคนละสายพันธุ์กันและนำโดยยุงต่างชนิดกัน (Sumethvanich *et al.*, 1996; Triteeraprab, 1997; Jitpakdi *et al.*, 1999) แต่อย่างไรก็ตามจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าพยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าสามารถเจริญเติบโตในยุงรำคาญสายพันธุ์ไทยจนเป็นระยะติดต่อดี (Karnjanopas, 1997; Triteeraprab *et al.*, 2000) นอกจากนี้ผลการเก็บตัวอย่างยุงยังพบพยาธิโรคเท้าช้างในยุงรำคาญของคนไทย (Karnjanopas, 1997) แม้ว่าปริมาณน้อยมากจนไม่น่าจะก่อให้เกิดการแพร่กระจายของโรคได้ แต่โดยธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตจะมีการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นหากยังปล่อยให้ยุงรำคาญสายพันธุ์ไทยได้รับพยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าต่อไปเรื่อยๆ ในอีกไม่กี่ปีข้างหน้า พยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าอาจสามารถปรับตัวอาศัยอยู่ในยุงรำคาญของไทยและใช้เป็นพาหะนำโรคได้ ซึ่งจะมีผลทำให้การควบคุมโรคเท้าช้างทำได้ยากยิ่งขึ้น

การตรวจวินิจฉัยจำแนกระหว่างพยาธิโรคเท้าช้างระหว่างสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์พม่าในปัจจุบันทำได้โดยการดูรูปร่าง (morphological studies) และการวัดขนาดของส่วนต่างๆ (morphometric studies) ของพยาธิไมโครฟิลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ติดตั้งอุปกรณ์สำหรับวาดภาพ (camera lucida) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่ำ ต้องอาศัยผู้ชำนาญ ใช้แรงงานมากและเวลานาน ต้องใช้เครื่องมือพิเศษและไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ในภาคสนาม วิธีทางอณูชีววิทยา Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีที่อาศัยหลักการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในอีโนมอย่างสุ่ม โดยใช้ primer ที่ออกแบบอย่างไร้กฎเกณฑ์ (arbitrary primer) เพียงข้างเดียว (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) เข้าไปจับและเพิ่มจำนวนของ DNA ได้หลากหลาย เพราะใช้สภาวะในการทำ

PCR ที่ไม่เข้มงวด (low stringency) และจากการที่ primer สามารถเข้าไปจับได้หลายตำแหน่งในอีโนม ดังนั้นจึงได้ PCR product จำนวนมาก ซึ่งในสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันจะมีการเรียงตัวของลำดับเบสที่ต่างกันบางส่วน ทำให้ได้รูปแบบของ PCR product ออกมาแตกต่างกันคล้ายลายพิมพ์ DNA ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้ มีรายงานการใช้ RAPD เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับการจำแนกสปีชีส์และสายพันธุ์ของปรสิตประเภทโปรโตซัว (protozoa) เมตาซัว (metazoa) หนอนพยาธิตัวกลม (nematode) และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ หลายชนิด (Bandi *et al.*, 1993; Siles-Lucas *et al.*, 1994; Guo and Johnson, 1995; Kumar Pradeep *et al.*, 2002) ข้อดีของ RAPD นี้คือเร็ว ง่าย และสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากอีโนมดีเอ็นเอจำนวนน้อยเพียงระดับนาโนกรัมได้ และสามารถตรวจกรองทั้งอีโนมโดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลของลำดับเบส ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำ RAPD มาใช้ในจำแนกระหว่างพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* สายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์พม่า ซึ่งพบว่า RAPD สามารถแยกระหว่างพยาธิโรคเท้าช้าง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวออกจากกันได้ อันจะเป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์ในการเฝ้าติดตามควบคุมโรคเท้าช้างทั้งในผู้ป่วยและยุงพาหะ

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ประชากรเป้าหมายและการเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการตรวจกรองหาผู้ที่มีไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดชาวไทย-กะเหรี่ยงใน อ. ท่าสองยาง จ. ตาก และ อ. สังขละบุรี จ. กาญจนบุรี และแรงงานอพยพชาวพม่าที่ อ. แม่สอด จ. ตาก

ทำการเจาะเลือดผู้ที่พบไมโครฟิลาเรียจากหลอดเลือดดำบริเวณข้อพับแขน ในช่วงเวลาปรากฏตัวมากที่สุดในการแสเลือดส่วนปลายของ *W. bancrofti* สายพันธุ์นั้นๆ รายละเอียด 10 ml เก็บใส่หลอดบรรจุเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เพื่อนำไประบุสปีชีส์และสายพันธุ์และทำการเก็บไมโครฟิลาเรียต่อไป

2.2 การระบุเวลาการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด

ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยจากผู้ป่วยสายพันธุ์ละ 4 ราย บริเวณปลายนิ้วมือ โดยใช้ Heparinized capillary tube ที่กำหนดปริมาตร 60 μ l ไว้เป็นอุปกรณ์สำหรับเก็บเลือด จากนั้นนำเลือดมาเกลี่ยลงบนสไลด์เป็น 3 เส้น (Thee linear smear) เส้นละ 20 μ l เจาะเลือดทุกๆ 2 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมงหลังจากทิ้งฟิล์มเลือดทิ้งให้แห้งแล้วนำไปย้อมสี Giemsa จากนั้นจึงนำไปนับจำนวนไมโครฟิลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3 การศึกษารูปร่างและการวัดขนาด ของไมโครฟิลาเรีย

นำเลือดประมาณ 60 μ l มาทำฟิล์มเลือดหนา โดยทำตัวอย่างละ 2 สไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง 24 ชั่วโมง นำมาทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการแช่ฟิล์มเลือดในน้ำกลั่น 1-2 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปย้อมสี Giemsa ซึ่งเป็นสีมาตรฐานที่ใช้ย้อมสำหรับระบุสปีชีส์ของไมโครฟิลาเรีย จากนั้นนำมาตรวจภายใต้กล้อง camera lucida ซึ่งเป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ติดตั้งอุปกรณ์สำหรับวาดภาพเพื่อศึกษารูปร่าง และการวัดขนาดของส่วนต่างๆ ของไมโครฟิลาเรีย โดยทำการวัดขนาดและรูปร่างไมโครฟิลาเรียจากผู้ที่มีฟิลาเรียสายพันธุ์ละ 120 ตัว รวมทั้งหมดวัด 240 ตัว

2.4 การเก็บไมโครฟิลาเรียจากเลือด

ใช้ syringe ดูดเลือด 1 ml แล้วดูด PBS pH 7.4 จนครบ 10 ml และผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำมากรองผ่าน polycarbonate nucleopore membrane (Nucleopore Corp. Pleasanton, CA, USA) ซึ่งมี pore size 5 μ m ที่อยู่ภายในชุดกรอง ใช้ syringe ดูด PBS pH 7.4 ผ่านชุดกรอง แล้วดำเนินการเก็บไมโครฟิลาเรียภายใต้กล้อง stereo microscope

2.5 การสกัด DNA ของไมโครพลาเรีย

นำไมโครพลาเรียมาล้างด้วย PBS แล้วจึงนำมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาหยดลงบนกระดาษกรองนำกระดาษกรอง FTA (Whatman Bioscience, Cambridge, UK) หลังจากทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำกระดาษกรองมาล้างด้วย FTA purification buffer (Whatman Bioscience) และ TE-1 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) DNA จะติดอยู่บนกระดาษกรอง FTA

2.6 การทำ RAPD

นำ DNA บนกระดาษกรองที่ได้มาทำ RAPD โดยใช้ Ready-To-Go[®] RAPD Analysis Beads (Pharmacia Biotech) โดยในแต่ละปฏิกิริยาใช้ DNA template 10 ng และ RAPD analysis primer 25 pmol โดย Negative control ใช้ DNA จากเลือดผู้ที่ไม่ติดพยาธิโรคเท้าช้าง และ dH₂O ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากันแล้วนำมาเข้าเครื่อง DNA Thermocycler โดยตั้งอุณหภูมิดังนี้

96°C	4 min	} 40 cycles
94°C	1 min	
40°C	1 min	
72°C	2 min	

2.7 การวิเคราะห์ผล RAPD

นำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2 % agarose gel บั้มด้วย Ethidium bromide เป็นเวลา 20 นาที บันทึกโดยถ่ายภาพเก็บภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc) และวิเคราะห์แถบ DNA (banding pattern) โดยวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ Quantity One[®] 1-D Analysis Software (Biorad, USA)

3. ผลของการวิจัย

3.1 การเก็บสิ่งตัวอย่างเลือดผู้ป่วย

ไทย-กะเหรี่ยง

ผลการสำรวจหาผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างในกลุ่มประชากรชาวไทย-กะเหรี่ยงในเขตโรคชุกชุม ใน อ. แม่สอด และ อ. ท่าสองยาง จ. ตาก และใน อ. สังขละบุรี จ. กาญจนบุรี จำนวนทั้งหมด 2,690 ราย พบผู้ที่มีไมโครฟิลาเรีย จำนวน 7 ราย คิดเป็น 0.26 % ซึ่งเป็นเพศชายจำนวน 5 ราย คิดเป็น 71.43% เพศหญิงจำนวน 2 ราย คิดเป็น 28.57% ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงช่วงอายุ >30-45 ปี (42.86) (ตารางที่ 1)

แรงงานอพยพชาวพม่า

ผลการสำรวจ *W. bancrofti* ในแรงงานอพยพชาวพม่าจาก อ. แม่สอด จ.ตาก จำนวน 1,441 ราย พบผู้ที่มีไมโครฟิลาเรีย จำนวน 10 ราย คิดเป็น 0.69% ซึ่งเป็นเพศชายจำนวน 7 ราย คิดเป็น 70.00% เพศหญิงจำนวน 3 ราย คิดเป็น 30.00% ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ >15-30 ปี (40.00%) (ตารางที่ 1) ผู้ที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาเดิมอยู่ที่เมืองมะละแหม่ง (5 ราย; 45.5%) และย่างกุ้ง (3 ราย; 27.2%)

ตารางที่ 1 ผู้ที่มีไมโครฟิลาเรียแบ่งตามอายุและเพศ

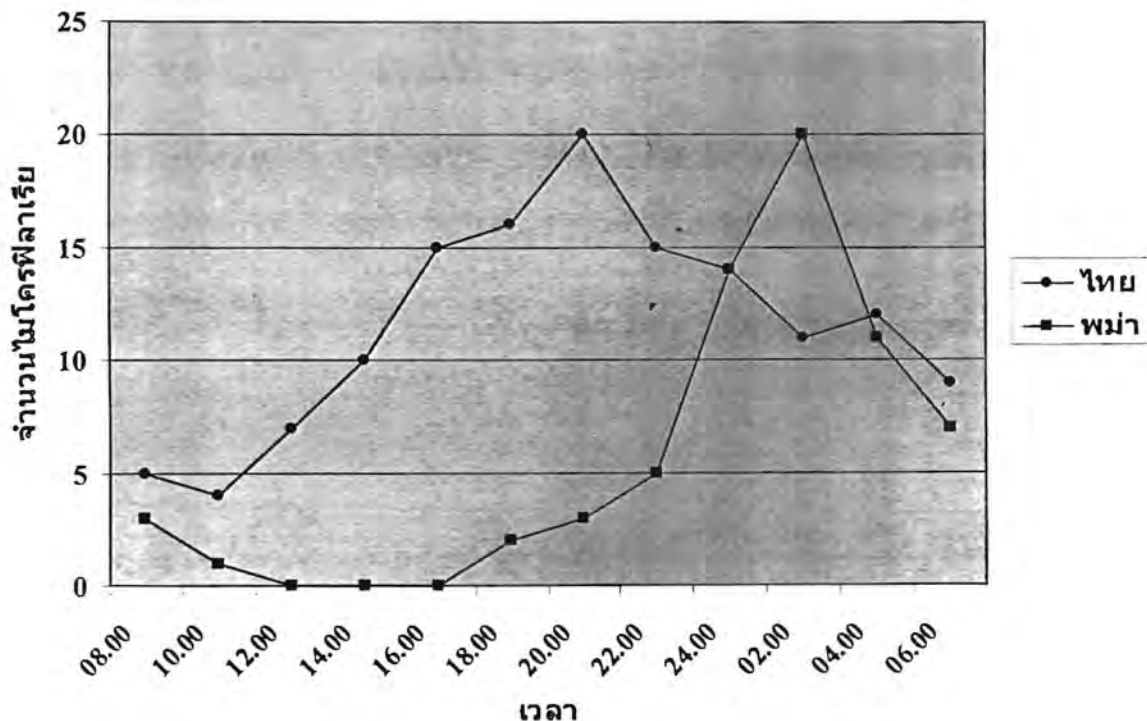
อายุ	เพศ		รวม (%)
	ชาย	หญิง	
ไทย-กะเหรี่ยง			
1-15	0	0	0
>15-30	1 (14.29)	1 (14.29)	2 (28.57)
>30-45	3 (42.86)	0	3 (42.86)
>45-60	1 (14.29)	1(14.29)	2 (28.57)
รวม	5 (71.43)	2 (28.57)	7 (100)
พม่า			
1-15	3 (20.00)	1 (10.00)	3 (30.00)
>15-30	3 (40.00)	0	3 (40.00)
>30-45	1 (10.00)	0	1 (10.00)
>45-60	0	2 (20.00)	2 (20.00)
รวม	7 (70.00)	3 (30.00)	10 (100.00)

3.2 การระบุเวลาการปรากฏตัวของไมโครพลาเรียในกระแสเลือด

จากการตรวจนับจำนวนไมโครพลาเรียจากฟิล์มเลือดทั้ง 3 เส้น และนำมาหาค่าเฉลี่ยจำนวนไมโครพลาเรียต่อเลือด 20 μ l ของผู้ป่วยแต่ละรายในช่วงเวลาต่างๆ พบว่า

สำหรับ *W. bancrofti* สายพันธุ์ไทยมีช่วงปรากฏตัวตลอดเวลา แต่จะพบไมโครพลาเรียในตอนกลางคืนจำนวนมากว่าในตอนกลางวัน ลักษณะการปรากฏตัวในกระแสเลือดดังกล่าวเรียกว่า nocturnal subperiodicity โดยมีช่วงสูงสุดเวลา 20.00 น. (รูปที่ 1)

สำหรับ *W. bancrofti* สายพันธุ์พม่ามีช่วงปรากฏตัวของไมโครพลาเรียเฉพาะในเวลากลางคืน ในช่วงเวลา 18.00-06.00 น. ลักษณะการปรากฏตัวในกระแสเลือดดังกล่าวเรียกว่า nocturnal periodicity โดยออกในกระแสเลือดสูงสุดเวลา 02.00 น. (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ช่วงเวลาการปรากฏตัวของไมโครพลาเรียในกระแสเลือด ซึ่งได้จากค่าเฉลี่ยจากการนับไมโครพลาเรียในเลือด 20 μ l จำนวน 3 เส้น จากชาวไทย-กะเหรี่ยง และแรงงานพม่า อย่างละ 4 ราย สำหรับ *Wuchereria bancrofti* สายพันธุ์ไทย มีการปรากฏตัวของไมโครพลาเรียเป็น nocturnal subperiodicity ส่วน *Wuchereria bancrofti* สายพันธุ์พม่า มีช่วงปรากฏตัวของไมโครพลาเรียเป็น nocturnal periodicity

3.3 การตรวจวัดรูปร่างและขนาดของไมโครฟิลาเรีย

จากการนำฟิล์มเลือดหนาмаย้อมสี Giemsa และนำมาตรวจภายใต้กล้อง camera lucida เพื่อศึกษารูปร่างไมโครฟิลาเรียของ *W. bancrofti* ทั้งสายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์พม่ามี sheath หุ้มลำตัว มีนิวเคลียสภายในลำตัวแต่อันแยกกัน แต่อาจจะมีนิวเคลียสเกาะทับกันบ้างในบางบริเวณที่มีนิวเคลียสหนาแน่น อย่างไรก็ตามนิวเคลียสแต่อันจะขอบเขตชัดเจน

จากการวัดขนาดของส่วนต่างๆ และการนับจำนวนนิวเคลียสที่อยู่ในบริเวณระหว่าง cephalic space และ nerve ring ของไมโครฟิลาเรียของ *W. bancrofti* สายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์พม่า พบว่าบริเวณความยาวของลำตัว (Body length) ความยาวของช่องว่างส่วนหัว (Cephalic space length) และความกว้างของช่องว่างส่วนหัว (Cephalic space width) ของไมโครฟิลาเรียสายพันธุ์ไทยมีขนาดใหญ่กว่าไมโครฟิลาเรียสายพันธุ์พม่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดย ส่วนขนาดของบริเวณส่วนอื่นๆ และจำนวนนิวเคลียสที่อยู่ในบริเวณระหว่าง cephalic space และ nerve ring ของไมโครฟิลาเรียไม่มีความต่างต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขนาดของส่วนต่างๆ (morphometric measurements) และจำนวนนิวเคลียสที่อยู่ระหว่าง cephalic space และ nerve ring ของไมโครพลาเรีย

ส่วนที่วัด	สายพันธุ์*		t, (P)
	ไทย (nocturnally subperiodic) Mean \pm SD (Range)	พม่า (nocturnally periodic) Mean \pm SD (Range)	
Measurements (μ m)			
Body length	299.20 \pm 11.87 (270-324)	286.92 \pm 9.42 (255-310)	8.879 (0.000**)
Cephalic space length	5.27 \pm 0.71 (4-7)	5.47 \pm 0.68 (4-7)	-2.945, (0.004**)
Head to nerve ring	56.81 \pm 5.32 (34-72)	56.24 \pm 3.26 (48-67)	0.994, (0.321)
Innenkorper length	42.62 \pm 5.78 (32-64)	42.67 \pm 5.08 (32-60)	-0.710 (0.943)
Cephalic space width	5.62 \pm 0.56 (4-7)	5.91 \pm 0.53 (4-8)	-4.097 (0.000**)
Body width at nerve ring	6.32 \pm 0.52 (6-8)	6.30 \pm 0.69 (5-9)	0.211 (0.833)
Number nuclei between cephalic space and nerve ring	88.51 \pm 7.76 (66-101)	89.52 \pm 6.37 (72-103)	-1.100 (2.72)

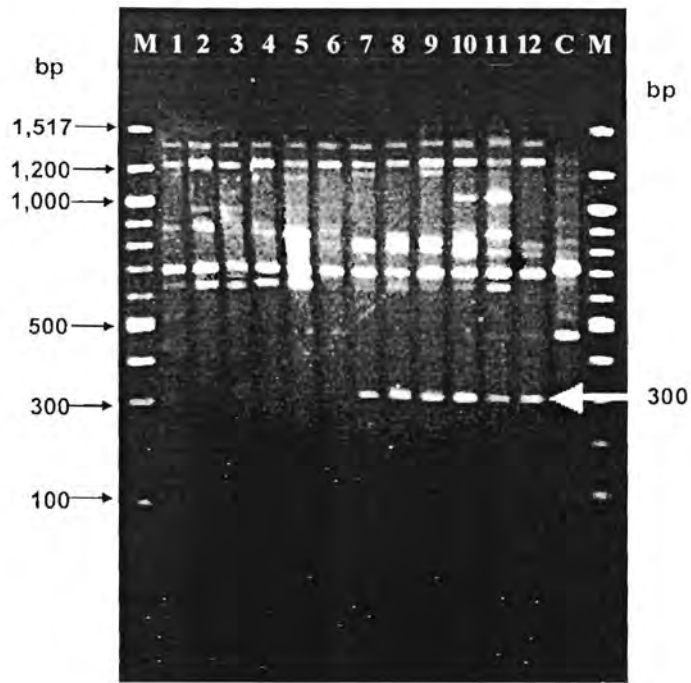
* ทำการวัดขนาดและรูปร่างไมโครพลาเรียจากผู้ที่มีพลาเรียสายพันธุ์ละ 4 รายๆ ละ 30 ตัว รวมทั้งหมดวัด 240 ตัว

** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

3.4 การทำ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

จากการทดสอบทั้งด้วย primer ทั้งหมด 6 ข้าง พบว่ามีเพียง RAPD Analysis Primer 1 (5'-dGGTGC GGAA-3') ที่สามารถแยกความแตกต่างด้านพันธุกรรมระหว่าง *W. bancrofti* สายพันธุ์ไทย และพม่าได้ชัดเจน รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ของ *W. bancrofti* สายพันธุ์ไทย และ *W. bancrofti* สายพันธุ์พม่า จำนวนสายพันธุ์ละ 6 ตัวอย่าง (รูปที่ 3) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละสิ่งตัวอย่างมีจำนวนอยู่ระหว่าง 5-11 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง 300-1,200 bp

จากการทำ RAPD โดยใช้ RAPD Analysis Primer 1 พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp (ลูกศรชี้) ซึ่งจำเพาะต่อ *W. bancrofti* สายพันธุ์พม่า ซึ่งจะปรากฏในผู้ป่วยรายที่ 7-12 แต่ไม่ปรากฏในผู้ป่วยรายที่ 1-6 ซึ่งเป็น *W. bancrofti* สายพันธุ์ไทย แถบส่วนดีเอ็นเอขนาด 710, 1,250, และ 1,300 bp สามารถพบได้ในทุกสิ่งตัวอย่างทั้งสองสายพันธุ์ แสดงว่าไม่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง (รูปที่ 3) ส่วนการทำ RAPD จากดีเอ็นเอของผู้ที่ไม่ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง (negative control) ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอจำนวน 9 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 470-1,020 bp ซึ่งในจำนวนนี้ไม่มีแถบดีเอ็นเอใดมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอของ RAPD จากสิ่งตัวอย่างไมโครพลาเรียจากทั้งสองสายพันธุ์ แสดงว่าสามารถแยกไมโครพลาเรียจากเลือดของคน โดยไม่มีเม็ดเลือดขาวของคนปนเปื้อน



รูปที่ 3 RAPD โดยใช้ RAPD Analysis Primer 1

Lane M: 100 bp DNA marker, Lane 1-6: *Wuchereria bancrofti* สายพันธุ์ไทย Lane 7-12: *Wuchereria bancrofti* สายพันธุ์พม่า Lane C: Negative Control แถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp (ลูกศรชี้) จำเพาะต่อ *W. bancrofti* สายพันธุ์พม่า

4. สรุปและวิจารณ์ผลของการวิจัย

แม้ว่าความชุกของโรคเท้าช้างในคนไทยจะต่ำ แต่จากการที่แรงงานพม่าอพยพเข้ามาทำงานอาจเป็นสาเหตุให้อัตราการเกิดโรคเท้าช้างที่เกิดจากพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* สูงขึ้น เนื่องจากอัตราการตรวจพบพยาธิโรคเท้าช้างในแรงงานพม่าสูง ประกอบกับยุงรำคาญพบได้ทั่วไปในบ้านเรา คนไทยจึงมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะติดโรคเท้าช้าง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีมาตรการควบคุมและปกป้องที่เหมาะสม จากการสำรวจ *W. bancrofti* ในชาวไทย-กะเหรี่ยงใน อ. แม่สอด และ อ. ท่าสองยาง จ. ตาก และใน อ. สังขละบุรี จ. กาญจนบุรี จำนวนทั้งหมด 2,690 ราย พบผู้ที่มีไมโครฟิลาเรีย จำนวน 7 ราย คิดเป็น 0.26% ซึ่งเป็นเพศชาย จำนวน 5 ราย คิดเป็น 71.43% เพศหญิงจำนวน 2 ราย คิดเป็น 28.57% ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ >30-45 ปี และจากการสำรวจ *W. bancrofti* ในแรงงานอพยพชาวพม่าจาก อ. แม่สอด จ.ตาก จำนวน 1,441 รายพบผู้ที่มีไมโครฟิลาเรีย จำนวน 10 ราย คิดเป็น 0.69% ซึ่งเป็นเพศชายจำนวน 7 ราย คิดเป็น 70.00% เพศหญิงจำนวน 3 ราย คิดเป็น 30.00% ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ >15-30 ปี ผู้ที่ตรวจพบไมโครฟิลาเรียชาวพม่าส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาเดิมอยู่ที่เมืองมะละแหม่ง และย่างกุ้งตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ที่ตรวจพบผู้ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างเพศชายมีจำนวนมากกว่าเพศหญิงในประมาณอัตราส่วนประมาณ 2:1 ซึ่งผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีอายุอยู่ในช่วงวัยทำงาน (15-45 ปี) และผู้ติดเชื้อชาวพม่าส่วนใหญ่จะอพยพมาจากเมืองมะละแหม่ง (Triteeraprab and Songtrus, 1999)

จากการศึกษาเวลาการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดพบว่า พยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* สายพันธุ์ไทยซึ่งพบในชนเผ่ากะเหรี่ยงซึ่งอาศัยอยู่ในบริเวณชนบทป่าเขาชายแดนไทย-พม่าเป็นชนิด nocturnally subperiodic type (rural type) มีการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดทั้งกลางคืนและกลางวัน แต่มีมากในเวลากลางคืนและมีการปรากฏตัวในกระแสเลือดสูงสุดเวลา 20.00 น. มียุงสกุลยุงลายเป็นพาหะ ส่วนพยาธิโรคเท้าช้างสายพันธุ์พม่าซึ่งตรวจพบในแรงงานอพยพชาวพม่าที่อาศัยในพื้นที่เขตเมืองและชุมชนแออัดเป็นชนิด nocturnally periodic type (urban type) สามารถตรวจพบไมโครฟิลาเรียได้เฉพาะเวลากลางคืนซึ่งมีการปรากฏตัวในกระแสเลือดสูงสุดเวลา 02.00 น. โดยมียุงพาหะคือ ยุงรำคาญ ซึ่งลักษณะการปรากฏตัวของไมโครฟิลาเรียดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของกองโรคเท้าช้าง (กองโรคเท้าช้าง, 2538)

W. bancrofti ทั้งสองสายพันธุ์มีรูปร่างลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน แต่จากการวัดขนาดทั้งความยาวและความกว้างบริเวณส่วนต่างๆ ของไมโครฟิลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ camera lucida พบว่าความยาวของลำตัว (body length), ความยาวของช่องว่างส่วนหัว (cephalic space length) และความกว้างของช่องว่างส่วนหัว (cephalic space width) ของสายพันธุ์ไทยมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พม่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามในการที่จะนำค่าดังกล่าวมาใช้ในทางปฏิบัติเพื่อแยกแยะระหว่าง 2 สายพันธุ์จะมีความไม่สะดวก เนื่องจาก range ของทั้ง 3 ค่ามีส่วนที่ซ้ำซ้อนกันอยู่ (body length ของสายพันธุ์ไทย 270-324 μm และของสายพันธุ์พม่า 255-310 μm , cephalic space length ของสายพันธุ์ไทย 4.00-7.00 μm และของสาย

พินธุ์พม่า 4.00-7.00 μm , cephalic space length ของสายพินธุ์ไทย 4.00-8.00 μm และของสายพินธุ์พม่า 4.00-7.00 μm) อีกทั้งด้วยเทคนิคดังกล่าวต้องใช้เครื่องมือพิเศษ อาศัยผู้ที่มีประสบการณ์และความชำนาญ ในการวัดขนาดตัวของไมโครฟิลาเรีย นอกจากนี้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้เวลานาน ทำให้ไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้ตรวจในภาคสนามซึ่งมีสิ่งตัวอย่างจำนวนมาก

ผลการวัดขนาดของไมโครฟิลาเรียในการศึกษานี้แตกต่างจากศึกษาก่อนหน้า (Sumethvanich *et al.*, 1996; Jitpakdi *et al.*, 1999) ที่พบว่า *W. bancrofti* สายพินธุ์ไทยมีขนาดใหญ่กว่าสายพินธุ์พม่าในทุกบริเวณ ที่ทำการวัด และมีจำนวนนิวเคลียสในบริเวณ cephalic space ถึง nerve ring มากกว่า *W. bancrofti* สายพินธุ์พม่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่จากการศึกษานี้พบว่ามีเพียง 3 บริเวณที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังอธิบายข้างต้น อาจเนื่องมาจากเก็บตัวอย่างจากคนละพื้นที่กัน ซึ่ง *W. bancrofti* สายพินธุ์พม่าที่ได้ นำมาศึกษานี้มาอาจจะเป็น long form ของสายพินธุ์พม่า ทำให้ขนาดของบริเวณต่างๆ ของไมโครฟิลาเรียมีค่าเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับสายพินธุ์ไทย ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานพบ long form ของสายพินธุ์ไทยในจังหวัด แม่ฮ่องสอน (Filariasis Division, 2000)

มีรายงานการนำเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาต่างๆ มาใช้ในการแยกสปีชีส์ของพยาธิฟิลาเรีย เช่น DNA hybridization assays (McReynolds *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1988; Poole and Williams, 1990; Siridewa *et al.*, 1994), PCR (Lizotte *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996; Nuchprayoon *et al.*, 2001; Tritteraprapab *et al.*, 2001;), PCR-RFLP (Thanomsub *et al.*, 2000; Chansiri *et al.*, 2002; Nuchprayoon *et al.*, 2003a; 2005) แต่อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานการนำวิธีทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการแยกระหว่างสายพินธุ์พยาธิโรคเท้าช้าง งานวิจัยชิ้นนี้นำเครื่องหมายพันธุกรรม RAPD มาใช้ในการตรวจแยกสายพินธุ์พยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* ระหว่างสายพินธุ์ไทยและสายพินธุ์พม่า ซึ่งพบว่าสามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างทั้งสองสายพินธุ์ได้อย่างชัดเจน โดยจากใช้ RAPD Analysis Primer 1 พบว่าให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อแต่ละสายพินธุ์ นอกจากนี้พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้กระดาษกรอง FTA เป็นวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมสำหรับการทำ RAPD เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และมีความรวดเร็ว อีกทั้งน้ำยาและสารเคมีที่ใช้ไม่เป็นอันตราย และให้ปริมาณ DNA ที่มากกว่าการสกัดโดยใช้ Phnol/Chloroform

เทคนิค RAPD ดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับภาคสนามเพื่อตรวจสอบสายพินธุ์ของพยาธิโรคเท้าช้างในผู้ป่วยทำให้ทราบว่าผู้ป่วยติดพยาธิโรคเท้าช้างมาจากแหล่งใด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบสายพินธุ์ในยุงพาหะในพื้นที่ระบาดของโรค เช่นหากพบพยาธิโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* สายพินธุ์พม่าในยุงรำคาญไทยจะเป็นตัวชี้วัดที่บ่งบอกถึงการแพร่เชื้อจากชาวพม่าเข้ามา อันจะนำไปสู่การพิจารณาหาทางป้องกันและควบคุมโรคเท้าช้างในพื้นที่ที่ชาวพม่าอาศัยอยู่ต่อไปนอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบการดื้อยาของพยาธิโรคเท้าช้าง ได้อีกด้วย (Manna *et al.*, 2005)

เอกสารอ้างอิง (References)

1. สาธารณสุข, กระทรวง. กรมควบคุมโรคติดต่อ. กองโรคเท้าช้าง. คู่มือระบาดวิทยา งานควบคุมโรคเท้าช้าง. 2538
2. Bandi C, La Rosa G, Comincini S, Damiani G, Pozio E. (1993) Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology* 107 (Pt 4): 419-24.
3. Behbehani K. (1998) Candidate parasitic diseases. *Bulletin of the World Health Organization*. 76 Suppl 2: 64-7.
4. Division of filariasis. (1996) Department of communicable Disease Control, Ministry of Public Health, 46.
5. Division of filariasis. (1995) Department of communicable Disease Control, Ministry of Public Health, 46.
6. Filariasis Division. Annual Report, Filariasis Division, CDC Department, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand. 1995. (in Thai)
7. Filariasis Division. Annual Report, Filariasis Division, CDC Department, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand. 2000. (in Thai)
8. Guo ZG, Johnson AM. (1995) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology*. 111 (Pt 2): 127-32.
9. Harinasuta C, Sucharit S, Deesin T, Surathin K, Vutikes S. (1970) Bancroftian filariasis in Thailand, a new endemic area. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1: 233-45.
10. Jitpakdi A, Choochote W, Panart P, Insun P, Panart K, Pitasawat B, Prajakwong S. (1999) Variation in microfilariae and infective stages of two types of *Wuchereria bancrofti* from the Thai-Myanmar border. *Journal of Helminthology*. 73: 317-21.
11. Kamjanopas K. (1997) The susceptibility of some strains *Culex quinquefasciatus* in Thailand to nocturnal periodic *Wuchereria bancrofti*. *Journal of Public Health*. 27: 169-77. 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.
12. Kumar Pradeep N, Patra KP, Hoti SL, Das PK. (2002) Genetic variability of the human filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*, in south india. *Acta Tropica*. 82: 67-76.

13. Lizotte MR, Supali T, Partono F, Williams SA. (1994) A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 51: 314-21.
14. Manna M, Majumder HK, Sundar S, Bhaduri AN. The molecular characterization of clinical isolates from Indian Kala-azar patients by MLEE and RAPD-PCR. Med Sci Monit. 2005; 11(7):BR220-7.
15. McReynolds LA, DeSimone SM, Williams SA. (1986) Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite *Brugia malayi* and the animal parasite *Brugia pahangi*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 83: 797-801.
16. Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. (2005) Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. The American journal of tropical medicine and hygiene. 73: 895-900.
17. 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 migrants in Thailand. Asian Pacific journal of allergy and immunology. 21: 253-7.
18. Nuchprayoon S, Yentakam S, Sangprakam 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.
19. Poole CB, Williams SA. (1990) A rapid DNA assay for the species-specific detection and quantification of *Brugia* in blood samples. Molecular and biochemical parasitology. 40: 129-36.
20. Siridewa K, Karunanayake EH, Chandrasekharan NV, Abeyewickreme W, Franzen L, Aslund L, Pettersson U. (1994) Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Wuchereria bancrofti*. The American journal of tropical medicine and hygiene. 51: 495-500.
21. Thanomsub BW, Chansiri K, Sarataphan N, Phantana S. (2000) Differential diagnosis of human lymphatic filariasis using PCR-RFLP. Molecular and cellular probes. 14: 41-6.
22. Tritteraprapab S. (1997) Update in lymphatic filariasis: a re-emerging disease of Thailand. Chulalongkorn Medical Journal. 41: 611-22.

23. Tritteeraprapab S, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. (1998) *Wuchereria bancrofti*-specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. Chulalongkorn Medical Journal. 42: 267-77.
24. Tritteeraprapab S, Songtrus J. (1999) High prevalence of bancroftian filariasis in Myanmar-migrant workers: a study in Mae Sot district, Tak province, Thailand. Journal of the Medical Association of Thailand. 82: 735-9.
25. Tritteeraprapab S, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y, 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: 207-12.
26. 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.
27. Tritteeraprapab S, Nuchprayoon I, Porksakorn C, Poovorawan Y, Scott AL. (2001b) High prevalence of *Wuchereria bancrofti* infection among Myanmar migrants in Thailand. Annals of tropical medicine and parasitology. 95: 535-8.
28. Sasa M. (1976) Human filariasis: a global survey of epidemiology and control. 819 pp. Tokyo. University of Tokyo Press.
29. Siles-Lucas M, Felleisen R, Cuesta-Bandera C, Gottstein B, Eckert J. (1994) Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolates of *Echinococcus granulosus* by southern hybridization and Random Amplified Polymorphic DNA technique. Publikationen Parasitologie. 35: 107-17.
30. Sucharit S, Harinasuta C. (1981) The hypothesis on the evolution of *Wuchereria bancrofti*. Journal of Medical Association of Thailand. 64: 367-72
31. Sumethvanich C, Choochote W, Panart K, Jitpakdi A, Panart P. (1996) Comparative morphometry of nocturnally periodic and subperiodic *Wuchereria bancrofti* microfilaria. The Journal of Tropical Medicine and Parasitology. 19: 55-60.
32. Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic. Acids. Res. 18, 7213-7218.

33. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-5.
34. Williams SA, DeSimone SM, McReynolds LA. (1988) Species-specific oligonucleotide probes for the identification of human filarial parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 28: 163-9.
35. Williams SA, Nicolas L, Lizotte-Waniewski M, Plichart C, Luquaud P, Nguyen LN, Moulia-Pelat JP. (1996) A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 90: 384-7.