ISSN 0859-547X

WESR
รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์
Weekly Epidemiological Surveillance Report, Thailand

ปีที่ 41 ฉบับที่ 3S : สิงหาคม 2553 | Volume 41 Number 3S : August 2010

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข / Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health

บทความฟื้นวิชา

โรคลิชมาเนีย (Leishmaniasis)

✉ theesukm@gmail.com

ธีรยุทธ สุขมี THEERAYUDH SUKMEE

ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

ความเป็นมา (Background)

โรคลิชมาเนียเป็นโรคติดต่อนำโดยแมลง (Vector-borne disease; VBD) ที่องค์การอนามัยโลกให้ความสำคัญเป็น 1 ใน 5 ของโรคติดต่อที่สำคัญของมนุษย์ โรคนี้เกิดจากเชื้อชนิด obligate intracellular protozoa ที่เรียกว่า ลิชมาเนีย (*Leishmania* sp.) โดยปกติจะติดต่อด้วยการกัดของแมลงพาหะ คือ ริ้นฝอยทราย (Sandfly) ในตระกูล *Phlebotomus* sp. ซึ่งอยู่ในโลกเก่า (Old world) และตระกูล *Lutzomyia* sp. ซึ่งอยู่ในโลกใหม่ (New world) และแหล่งรังโรคที่สำคัญคือ สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงภายในบ้าน (Domestic animals) ได้แก่ สุนัข แมว วัว ม้า เป็นต้น ทั้งนี้มนุษย์เป็นโฮสท์โดยบังเอิญ (Accidental host) ของวงจรชีวิตของเชื้อลิชมาเนีย และแสดงอาการได้ 2 ลักษณะหลัก คือ 1) Visceral Leishmaniasis (VL) และ 2) Cutaneous Leishmaniasis การวินิจฉัยโรคนี้ นอกจากการซักประวัติตรวจร่างกายแล้ว จำเป็นต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เป็น gold standard คือ การแสดงและคัดแยกเชื้อ (Demonstration & Isolation parasite) อย่างไรก็ตาม Polymerase Chain Reaction (PCR) ก็ให้ความไวและความจำเพาะสูงสุด และ Direct Agglutination Test (DAT) และหรือ rk39 strip test เป็นการทดสอบทางซีโรโลยีที่ช่วยคัดกรองการติดเชื้อได้ดีโดยเฉพาะงานภาคสนาม

ระบาดวิทยาของโรคลิชมาเนีย (Epidemiology of Leishmaniasis)

ปัจจุบันมีรายงานว่าพบเชื้อ *Leishmania* sp. อย่างน้อย 21 ชนิด ที่ก่อโรคในมนุษย์ และพบริ้นฝอยทรายกว่า 30 ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อนี้ได้ แหล่งที่มีการระบาดของโรคพบได้ในเขตร้อนชื้นเขตอบอุ่น กระจายตั้งแต่เขตป่าที่มีฝนตกชุกในทวีปอเมริกาไปจนถึงทะเลทรายในตะวันตกของทวีปเอเชีย และเขตชนบทจนถึงชานเมือง มีรายงานพบผู้ป่วยด้วยโรคลิชมาเนียกว่า 12 ล้านคนทั่วโลก และอุบัติการณ์ของโรค (Incidence) ประมาณ 1.5 - 2 ล้านคน/ปี ใน 88 ประเทศทั่วโลก แบ่งเป็นในประเทศโลกเก่า (Old world) คือ ประเทศในทวีปเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา จำนวน 66 ประเทศ และประเทศโลกใหม่ (New world) คือ ประเทศในทวีปอเมริกาจำนวน 22 ประเทศ ทั้งนี้ได้มีการคาดการณ์ว่าจะพบประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงประมาณ 350 ล้านคน/ปี และเมื่อปี พ.ศ. 2543 ได้มีการคำนวณภาระโรค (Burden of disease) ของโรค Visceral leishmaniasis (VL) นี้เท่ากับ 1.98 ล้าน disability-adjusted life years (DALYs) แบ่งเป็นเพศชายมีภาระโรค VL เท่ากับ 1.67 ล้าน DALYs ในขณะที่เพศหญิงเท่ากับ 0.74 ล้าน DALYs

สำหรับผู้ป่วย Cutaneous leishmaniasis (CL) มีรายงานพบใน 82 ประเทศ และพบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 1.5 ล้านคน/ปี ซึ่งกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยพบในประเทศอัฟกานิสถาน แอลจีเรีย บราซิล อิหร่าน อิรัก เปรู ซาอุดิอาระเบีย และซีเรีย (รูปที่ 1) ในขณะที่ผู้ป่วย VL มีรายงานพบใน 70 ประเทศ และพบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 500,000 คน/ปี ซึ่งกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยพบในประเทศบังกลาเทศ เอธิโอเปีย อินเดีย เนปาล ซูดาน และบราซิล (รูปที่ 2) ทั้งนี้มีรายงานผู้เสียชีวิตด้วยโรคนี้ทั่วโลกสูงประมาณ 700,000 คน/ปี ทั้งนี้การกระจายของเชื้อลิชมาเนียสายพันธุ์ที่สำคัญในแต่ละภูมิภาคของโลกแตกต่างกัน (รูปที่ 3)

สารบัญ

◆ โรคลิชมาเนีย (Leishmaniasis) S49

วัตถุประสงค์ในการจัดทำ
รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์

1. เพื่อให้หน่วยงานเจ้าของข้อมูลรายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ได้ตรวจสอบและแก้ไขให้ถูกต้อง ครบถ้วน สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

2. เพื่อวิเคราะห์และรายงานสถานการณ์โรคที่เป็นปัจจุบัน ทั้งใน และต่างประเทศ

3. เพื่อเป็นสื่อกลางในการนำเสนอผลการสอบสวนโรค หรืองาน ศึกษาวิจัยที่สำคัญและเป็นปัจจุบัน

4. เพื่อเผยแพร่ความรู้ ตลอดจนแนวทางการดำเนินงานทางระบาดวิทยาและสาธารณสุข

คณะที่ปรึกษา

นายแพทย์สุชาติ เจตนเสน นายแพทย์ประยูร กุนาศล

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ น.พ.ประเสริฐ ทองเจริญ

นายแพทย์ธวัช จายนียโยธิน นายแพทย์คำนวณ อึ้งชูศักดิ์

นายสัตวแพทย์ประวิทย์ ชุมเกษียร นายองอาจ เจริญสุข

หัวหน้ากองบรรณาธิการ : นายแพทย์ภาสกร อัครเสวี

บรรณาธิการประจำฉบับ : บริมาศ ศักดิ์ศิริสัมพันธ์ สิริลักษณ์ รังษีวงศ์

บรรณาธิการวิชาการ : นายสัตวแพทย์ประวิทย์ ชุมเกษียร

กองบรรณาธิการ

บริมาศ ศักดิ์ศิริสัมพันธ์ สิริลักษณ์ รังษีวงศ์ พงษ์ศิริ วัฒนาสุรกิตต์

กรรณิการ์ หมอนพังเทียม อรพรรณ สุภาพ

ฝ่ายข้อมูล

ลัดดา ลิขิตยิ่งวรา น.สพ.ธีรศักดิ์ ชักนำ

สมาน สยุมภูรุจินันท์ สมเจตน์ ตั้งเจริญศิลป์

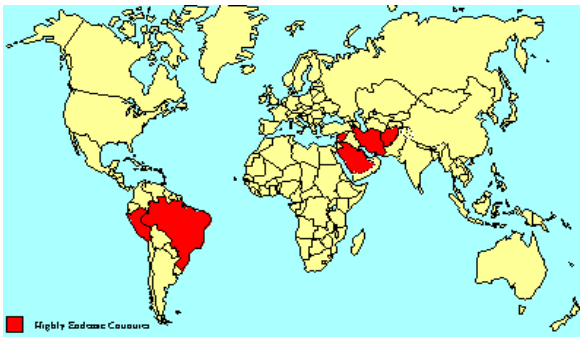
กนกทิพย์ ทิพย์รัตน์ ประเวศน์ แย้มชื่น

ฝ่ายจัดส่ง : พูนทรัพย์ เปียมณี เชิดชัย ดาราแจ้ง

ฝ่ายศิลป์ : ประมวล ทุมพงษ์

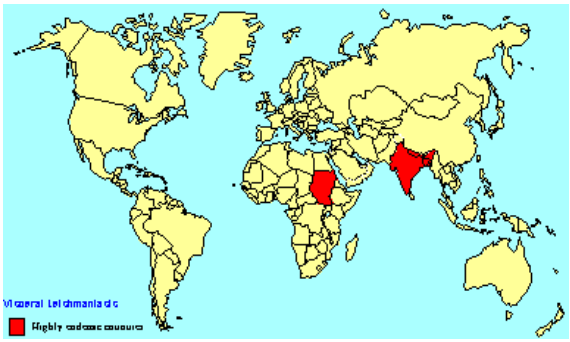
สื่ออิเล็กทรอนิกส์ : บริมาศ ศักดิ์ศิริสัมพันธ์ ถมยา พุกกะนานนท์

ปัจจัยสำคัญที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ทำให้เกิดการระบาดของโรคลิชมาเนียเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน ได้แก่ 1) การอพยพย้ายถิ่น (Migration) 2) การตัดไม้ทำลายป่า (Deforestation) 3) การเป็นชุมชนเมือง (Urbanization) 4) การขาดมาตรการควบคุมโรค 5) การติดเชื้อร่วมกับเอชไอวีหรือภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และ 6) การขาดสารอาหาร (Malnutrition) อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยของการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้มนุษย์จะติดเชื้อได้ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ในระบบนิเวศระหว่างกิจกรรมของมนุษย์และแหล่งรังโรค ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมนี้จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของการกระจายของเชื้อลิชมาเนียในภูมิภาคนั้น ๆ ด้วย



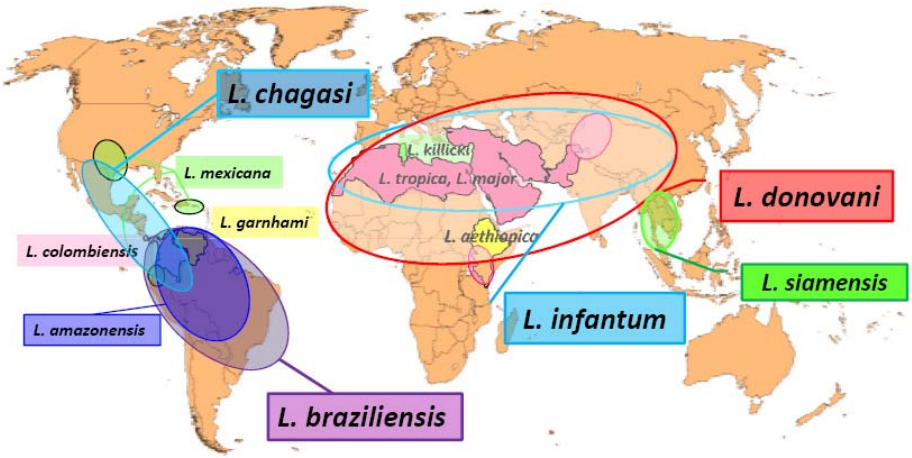
http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html

รูปที่ 1 Highly endemic countries of cutaneous leishmaniasis (CL)



http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.htm

รูปที่ 2 Highly endemic countries of visceral leishmaniasis (VL)



คัดแปลงจาก Warrell, David A.; Cox, Timothy M.; Firth, John D.; Benz, Edward J. Oxford Textbook of Medicine, 4th Edition. Copyright© 2003 Oxford University Press.

รูปที่ 3 การกระจายของเชื้อลิชมาเนียสายพันธุ์ที่สำคัญของโลก

เชื้อลิชมาเนีย (*Leishmania* sp.)

ตามหลักการจัดแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นกลุ่ม (Taxonomy) เชื้อชนิดนี้ถูกจัดอยู่ใน **Kingdom**; *Protista* **Subkingdom**; *Protozoa* **Phylum**; *Sarcomastigophora* **Subphylum**; *Mastigophora* **Class**; *Zoomastigophora* **Order**; *Kinetoplastida* **Suborder**; *Trypanomatina* **Family**; *Trypanosomatidae* **Genera**; *Leishmania* sp. และจากการทบทวนฐานข้อมูลสารพันธุกรรมใน GenBank พบว่า มีเชื้อลิชมาเนียที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้จำนวนทั้งสิ้น 11 กลุ่มดังนี้

***Leishmania* species**	***Leishmania* species**
1) *Leishmania aethiopica* species complex (1)	10.4) *Leishmania lainsoni* species complex (1)
• *Leishmania aethiopica*	• *Leishmania lainsoni*
2) Leishmania aristidesi	10.5) *Leishmania naiffi* species complex (1)
3) Leishmania deanei	• *Leishmania naiffi*
4) Leishmania donovani species complex (3)	**11) Unclassified *Leishmania* (28)**
• *Leishmania chagasi*	• *Leishmania arabica*
• *Leishmania donovani*	• *Leishmania gerbilli*
• *Leishmania infantum*	• *Leishmania guliki*
5) *Leishmania hertigi*	• *Leishmania herreri*
6) *Leishmania major* species complex (2)	• *Leishmania killicki*
• *Leishmania major*	• *Leishmania turanica*
• *Leishmania cf. major*	• *Leishmania* sp.
7) *Leishmania mexicana* species complex (4)	• *Leishmania* sp. AM-2004
• *Leishmania amazonensis*	• *Leishmania* sp. BK-2007
• *Leishmania enriettii*	• *Leishmania* sp. Ghana-2006
• *Leishmania mexicana*	• *Leishmania* sp. IMT208
• *Leishmania pifanoi*	• *Leishmania* sp. IRN580
8) *Leishmania tropica* species complex (1)	• *Leishmania* sp. MHOM/IN/2003/NAV-122
• *Leishmania tropica*	• *Leishmania* sp. MHOM/IN/2003/NAV-131
9) Lizard *Leishmania* (5)	• *Leishmania* sp. MHOM/IN/2003/NAV-132
• *Leishmania adleri*	• *Leishmania* sp. MHOM/IN/2003/NAV-135
• *Leishmania gymnodactyli*	• *Leishmania* sp. MHOM/MQ/92/MAR1
• *Leishmania hoogstraali*	• *Leishmania* sp. SA-2000
• *Leishmania tarentolae*	• *Leishmania* sp. *shifai*
• *Leishmania* sp. *NC29/Iran/2007*	• ***Leishmania* sp. *siamensis***
10) *Viannia* subgenus group (10)	• *Leishmania* sp. SL/R/1
10.1) *Leishmania braziliensis* species complex (4)	• *Leishmania* sp. SL/R/2
• *Leishmania braziliensis*	• *Leishmania* sp. SL/R/3
• *Leishmania colombiensis*	• *Leishmania* sp. SL/R/4
• *Leishmania equatorensis*	• *Leishmania* sp. SL/R/5
• *Leishmania peruviana*	• *Leishmania* sp. SL/R/6
10.2) *Leishmania garnhami*	• *Leishmania* sp. SL/R/7
10.3) *Leishmania guyanensis* species complex (3)	• *Leishmania* sp. SL/R/8
• *Leishmania guyanensis*	• *Leishmania* sp. SL/R/9
• *Leishmania panamensis*	• *Leishmania* sp. SL/R/10
• *Leishmania shawi*	

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5658&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock

วงจรชีวิตของเชื้อลิชมาเนีย (Life cycle of *Leishmania* sp.)

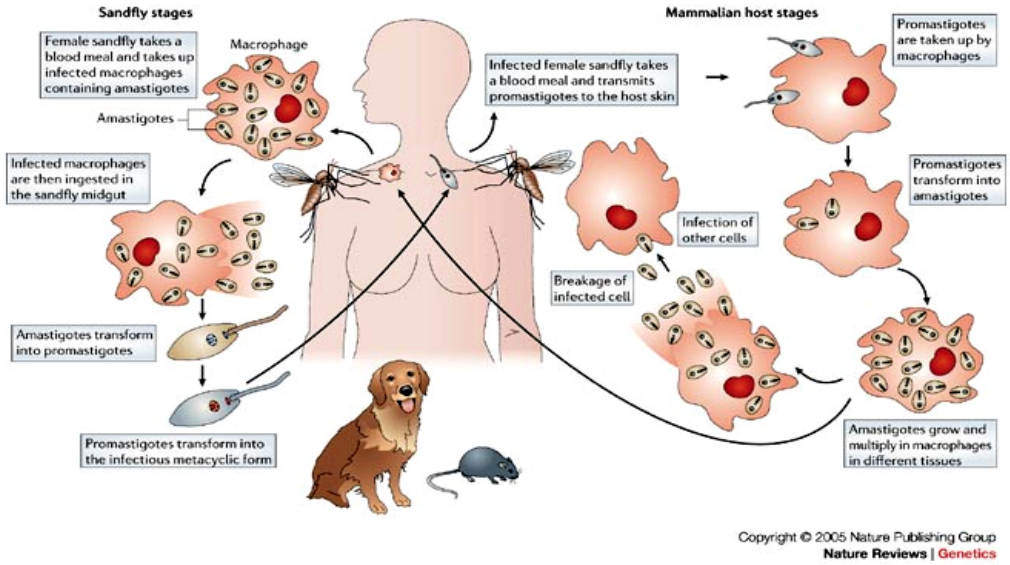
มนุษย์ถือเป็นโฮสท์โดยบังเอิญ (Accidental host) ของโรคลิชมาเนีย เพราะมนุษย์อาจมีกิจกรรมที่เข้าไปอยู่ในวงจรของการแพร่โรคทำให้มีการติดเชื้อโดยบังเอิญ เช่น การพักอาศัยหรือท่องเที่ยวในแหล่งที่มีโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น หรือ การเข้าไปอยู่ในพื้นที่ที่มีความหนาแน่นของริ้นฝอยทรายและสัตว์รังโรคสูง

เมื่อริ้นฝอยทรายเพศเมียที่ติดเชื้อลิชมาเนียซึ่งจะอยู่ในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของพาหะ กระโดดมาเกาะดูดเลือดโฮสท์ และปล่อยเชื้อลิชมาเนียซึ่งอยู่ในรูปของ Promastigotes ออกทางปากดูดทั้งสั้นและแข็ง เชื้อที่ปล่อยออกนี้จะเข้าสู่ร่างกายโฮสท์ และถูกเม็ดเลือดขาวชนิด Macrophage จับกินเข้าเซลล์ไป เชื้อลิชมาเนียจะมีการเปลี่ยนรูปจาก Promastigotes ซึ่งมีรูปร่างเป็นกระสวย หางยาว กลายเป็น Amastigotes ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีนิวเคลียสและ Kinetoplast เด่นชัด และเพิ่มจำนวนแบบแบ่งออกเป็นสองเรื่อย ๆ จนเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้นแตก แล้วก็ไปถูกเม็ดเลือดขาวตัวอื่นจับกินต่อไป เมื่อเข้าสู่เซลล์ก็จะเพิ่มจำนวนแบบนี้ไปเรื่อย ๆ ขบวนการที่เม็ดเลือดขาวติดเชื้อนี้จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันหลาย ๆ เซลล์ในร่างกายมนุษย์และเป็นช่วงเดียวกันกับที่มีไข้เรื้อรัง เป็น ๆ หาย ๆ (แต่ไม่หนาวสั่นเหมือนไข้มาลาเรีย) รบกวนการทำงานของระบบไขกระดูก ระบบโลหิต ระบบน้ำเหลือง ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงตับและม้าม จนเกิดอาการและอาการแสดงที่สำคัญ 5 ประการแรกคือ ไข้ ซีดน้ำหนักลด ม้ามโต และตับโต จนเมื่อผู้ที่ติดเชื้อลิชมาเนียมีอาการของโรค และมีระดับของเชื้อลิชมาเนียเต็มที่ หากถูกริ้นฝอยทรายเพศเมียมากัด ริ้นฝอยทรายตัวนี้ก็จะได้รับเชื้อนี้ ผ่านระบบทางเดินอาหารของมัน และเชื้อจะเปลี่ยนรูปตัวเองจาก Amastigotes ไปเป็น Promastigotes อีกครั้งหนึ่ง เชื้อจะเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งออกเป็นสองเช่นกัน และเคลื่อนที่ไปอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง รอการแพร่เชื้อเกิดเป็นวงจรชีวิตและการแพร่โรค ลิชมาเนียต่อไป (รูปที่ 4)

จากวงจรชีวิตของเชื้อลิชมาเนียจะเห็นว่าเชื้อมี 2 ระยะ คือ ระยะ Amastigote และระยะ Promastigote ดังรายละเอียดต่อไปนี้

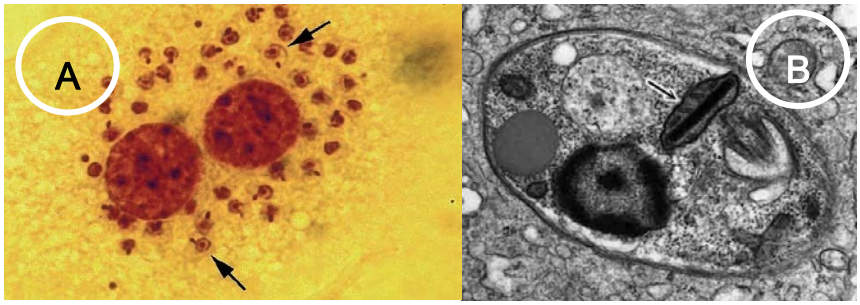
ระยะที่ 1 Amastigote stage เป็นระยะที่จะพบเฉพาะในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเท่านั้น (ได้แก่ มนุษย์ สัตว์เลี้ยงภายในบ้าน สัตว์เลื้อยคลาน เป็นต้น) รูปร่างของเชื้อเป็นลักษณะ ovoid shape (รูปที่ 5 A; ลูกศรชี้) ขนาดประมาณ 2-4 µm เคลื่อนที่ไม่ได้เพราะไม่มีหาง (Non-flagellated form) เป็นเชื้อที่ต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์ (Intracellular parasite) และเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการแบบแยกออกเป็นสอง (Binary fission) ในเม็ดเลือดขาวชนิด Macrophage ภายในของเซลล์เชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เห็นเด่นชัด และ Kinetoplast ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งตั้งฉากกับนิวเคลียส (รูปที่ 5 B; ลูกศรชี้ Kinetoplast) สามารถตรวจพบได้ในระบบ Reticuloendothelial system (ไขกระดูก ม้าม) และต่อมน้ำเหลือง

ระยะที่ 2 Promastigote stage เป็นระยะที่จะพบเฉพาะในริ้นฝอยทรายเท่านั้น รูปร่างของเชื้อเป็นรูปกระสวย Spindle shape (รูปที่ 6) ขนาดประมาณ 15 - 20 x 1.5-3.5 µm เคลื่อนที่ได้เพราะมีหาง (Flagellated form) เชื้อจะอยู่นอกเซลล์ (Extracellular parasite) และสามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธีการแบบแยกออกเป็นสอง (Binary fission) เช่นกัน เชื้อจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่เห็นเด่นชัด และ Kinetoplast จะกลายไปเป็นหางเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถตรวจพบได้ในทางเดินอาหารส่วนกลาง (Middle gut) ของริ้นฝอยทราย หรือจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่เตรียมเป็นการเฉพาะ



อ้างอิงจาก *Marie Lipoldov, Peter Demant. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. Nature review Genetics; 2006 (7); 294-305.*

รูปที่ 4 วงจรชีวิตของเชื้อลิชมาเนีย



A: Henry W Murray, Jonathan D Berman, Clive R Davies, Nancy G Saravia. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366: 1561–77.

B: Oui Ju, David I Grove, Wilfrid J Jaksic and Geoffrey W Dart. Visceral leishmaniasis: a trip to the Greek Islands is not always idyllic. MJA 2004; 181 (8): 446-447.

รูปที่ 5 เชื้อลิชมาเนียในระยะ Amastigotes

http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=37&id=13038008.

รูปที่ 6 เชื้อลิชมาเนียในระยะ Promastigotes

ริ้นฝอยทราย (Sandfly)

ริ้นฝอยทรายที่ค้นพบแล้วมี 6 genus กว่า 1,000 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มีจำนวน 70 ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อลิชมาเนียก่อโรคในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม มีริ้นฝอยทราย 3 genus ที่ชอบดูดเลือดสัตว์มีกระดูกสันหลังเป็นอาหารคือ

1) *Phlebotomus* sp. (Old world); พบในประเทศแถบ Mediterranean และ tropical Africa
2) *Lutzomyia* sp. (New world); พบในประเทศแถบ Central America และ South America
3) *Sergentomyia* sp. (Old world); พบในประเทศแถบ Central และ South Asia และ Africa

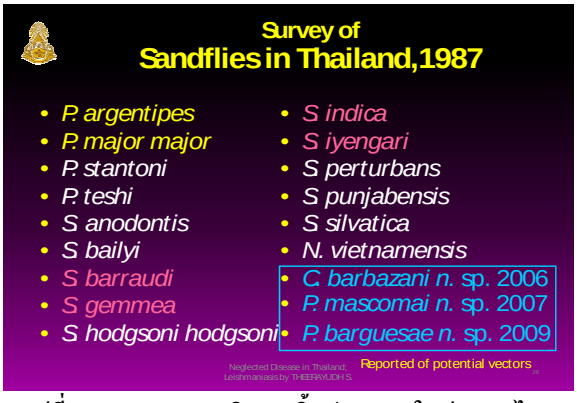
ซึ่งหมายความว่า ริ้นฝอยทรายเหล่านี้มีโอกาสที่จะเป็นพาหะนำเชื้อได้ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาธรรมชาติของโรคลิชมาเนียในมนุษย์ว่า เกิดจากเชื้อลิชมาเนียชนิดใด และมีริ้นฝอยทรายชนิดใดเป็นพาหะ ดังตัวอย่างโรค Cutaneous Leishmaniasis (CL)ที่เกิดจากเชื้อ ***L. aethiopica*** มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. longipes* และ *P. pedifer* เป็นพาหะนำเชื้อโดยเฉพาะ ในขณะที่เชื้อ ***L. major*** มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. alexandri, P. duboscqi* และ *P. papatasi* เป็นต้น

สำหรับโรค Visceral leishmaniasis (VL) ที่เกิดจากเชื้อ ***L. donovani*** มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. alexandri, P. argentipes, P. celiac*, *P. martini* และ *P. orientalis* ส่วนเชื้อ ***L. infantum*** มี Phlebotomine sandfly ชนิด *P. ariari, P. chinensis, P. langeroni, P. longicuspis, P. longiductus, P. major major, P. neglectus*, *P. perfiliewi, P.perniciosus, P. sichuanesis, P. smirnovi* และ *P. tobbi*

สำหรับประเทศไทยได้มีการสำรวจและรายงานพบริ้นฝอยทรายแล้วจำนวน 5 genus ได้แก่

1) *Phlebotomus* sp.
2) *Sergentomyia* sp.
3) *Nemopalpus* sp. (เป็น *subgenus* ของ *Sergentomyia* sp.)
4) *Chinius* sp.
5) *Euphlebotomus* sp. (เป็น *subgenus* ของ *Phlebotomus* sp.)

จากการสำรวจชนิดของริ้นฝอยทรายครอบคลุมทุกภาคทั่วประเทศ โดยคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ในปี พ.ศ. 2537 พบว่า ประเทศไทยมีริ้นฝอยทรายชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อได้จำนวน 2 ชนิด (ณ องค์ความรู้ปัจจุบัน) คือ *P. argentipes* และ *P. major major* (รูปที่ 7) ตลอดระยะเวลา 16 ปีที่ผ่านมา คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ก็ยังมีการศึกษาวิจัยริ้นฝอยทรายมาตลอดอย่างต่อเนื่อง พบว่า แหล่งเพาะพันธุ์ของริ้นฝอยทรายที่สำคัญ คือ ถ้ำค้างคาว เพราะมีระบบนิเวศเหมาะสมในการเพาะพันธุ์



รูปที่ 7 ผลการสำรวจชนิดของริ้นฝอยทรายในประเทศไทย

จากผลการสอบสวนโรคลิชมาเนียในหลาย ๆ กรณี ของสำนักระบาดวิทยา และสำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ตลอด 6 ปีที่ผ่านมา (2548-2553) พบว่า ผลการจำแนกชนิดริ้นฝอยทราย ส่วนใหญ่ คือ *P. stantoni*, *S. barraudi, S. iyengari, S. gemmea, S. perturbans* และ *S. indica* ซึ่งเป็นริ้นฝอยทรายที่ยังไม่มีการพิสูจน์ว่า จะสามารถนำเชื้อลิชมาเนียได้หรือไม่ โดยเฉพาะชนิด *Sergentomyia* sp. ซึ่งเป็นที่ทราบแล้วว่า ไม่สามารถนำเชื้อลิชมาเนียได้ อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาในประเทศจีน พบว่า นอกจาก Phlebotomine sandfly ชนิด *P. alexandri, P. chinensis, P. longiductus, P. smirnovi* และ *P. sichuanesis* ที่สามารถนำเชื้อลิชมาเนียก่อโรคในมนุษย์ และ *P. alexandri, P. caucasicus,*

P. andrejievi, P. mongolensis และ *P. smirnovi* นำเชื้อก่อโรคในgreat gerbil (สัตว์คล้ายหนูจำพวก *Gerbillus*) แล้ว ยังพบว่า ริ้นฝอยทรายชนิด *Sergentomyia sinkiangensis* สามารถนำเชื้อลิชมาเนียในสัตว์จำพวกจิ้งเหลน (Lizards) ได้

ลักษณะรูปร่างของริ้นฝอยทราย

ริ้นฝอยทรายมีขนาดเล็กกว่ายุง 3 เท่า (รูปที่ 8 และ 9) มีความยาวลำตัวเพียง 1.3 - 3.5 mm. ตาเป็นจุดสีดำเห็นชัดเจน ปากสั้นและแข็ง มีปีกหนึ่งคู่แต่บินไม่ได้ ลำตัวและปีกปกคลุมด้วยขนค่อนข้างยาว มีขายาวเป็นข้อปล้อง 2 คู่ เคลื่อนที่ด้วยการกระโดดโผสูงไม่เกิน 1 เมตรจากพื้นดิน

วงจรชีวิตของริ้นฝอยทราย

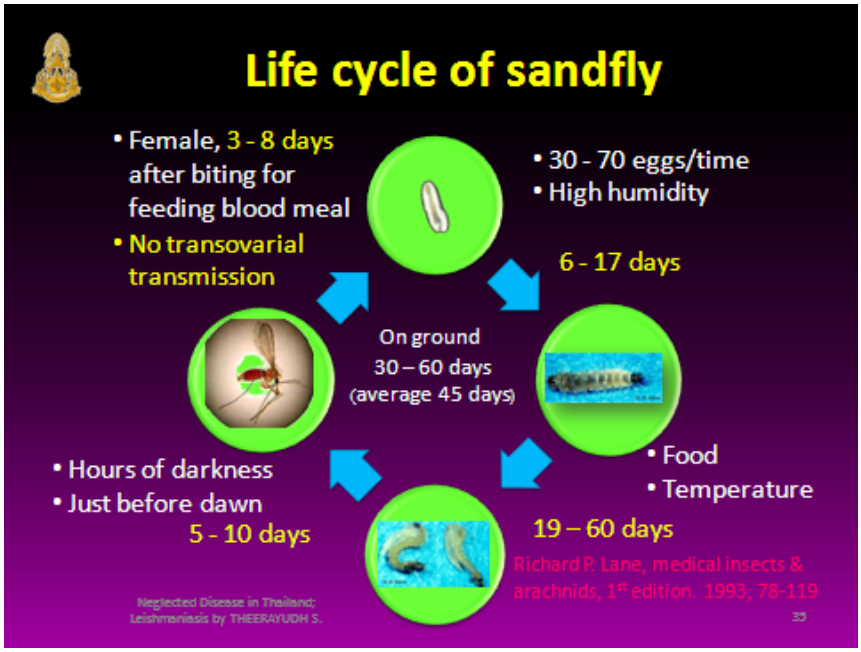
วงจรชีวิตของริ้นฝอยทรายทุกระยะเกิดขึ้นบนดิน โดยเฉลี่ยใช้เวลานาน 30-60 วันต่อวงจรชีวิตหนึ่งรอบ (รูปที่ 10) เริ่มตั้งแต่ริ้นฝอยทรายเพศเมียเกาะดูดเลือดจากสัตว์มีกระดูกสันหลังประมาณ 3-8 วัน ก็จะวางไข่ (Eggs) ในดินบริเวณที่มีความชื้น อับแสงแดด สามารถวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 30-70 ฟอง ใช้เวลาประมาณ 6-17 วันก็จะฟักออกเป็นตัวอ่อน (Larva) อาศัยและหากินจำพวกสารอินทรีย์ในดิน ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตในช่วงนี้ 4 ระยะใช้เวลานานประมาณ 19-60 วัน จนพัฒนาเป็นตัวโม่ง (Pupae) จำศีลอยู่ในดินใช้เวลาประมาณ 5-10 วันพัฒนาอวัยวะส่วนต่างๆจนครบกลายเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งถ้าเป็นเพศเมียก็จะดูดเลือดสัตว์เพื่อพัฒนาไข่และวางไข่เป็นวงจรเรื่อยไป ทั้งนี้วงจรชีวิตของริ้นฝอยทรายจะสั้นลงหรือยาวขึ้นนั้น จะขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความชื้น และอาหารในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ

กรณีที่ริ้นฝอยทรายเพศเมียมีเชื้ออยู่ หากมีการวางไข่ เชื้อลิชมาเนียจะไม่สามารถติดต่อสู่ไข่ได้ (No transovarial transmission) ดังนั้นริ้นฝอยทรายที่เกิดมาในรุ่นถัดไปจากตัวแม่ที่มีเชื้อ ก็จะไม่มีเชื้อลิชมาเนียที่จะไปแพร่โรคได้

http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/Vector%20and%20Reservoirs.html

รูปที่ 8 ตัวเต็มวัยของริ้นฝอยทราย (Sandfly)

รูปที่ 9 การเปรียบเทียบขนาดระหว่างริ้นฝอยทรายกับยุง



ดัดแปลงจาก Richard P. Lane. Medical insects & Arachnids, 1st edition. 1993; 78-119.

รูปที่ 10 วงจรชีวิตของริ้นฝอยทราย

แหล่งเพาะพันธุ์ของริ้นฝอยทราย

พื้นที่หรือบริเวณที่ความชื้น อับแสงแดด และมีอาหารเป็นสารอินทรีย์สำหรับตัวอ่อนของริ้นฝอยทรายเพื่อดำรงชีพหลังฟักออกจากไข่ และน้ำท่วมไม่ถึง หรือไม่เปียกชุ่มถึงมีน้ำขัง จึงจะเป็นที่อยู่ที่เหมาะสมของริ้นฝอยทราย ข้อสังเกตที่สำคัญ คือ แหล่งเพาะพันธุ์และที่อยู่อาศัยของริ้นฝอยทรายนี้มักใกล้กับแหล่งอาหารหรือที่อยู่ของสัตว์ที่มันชอบดูดเลือดด้วย แหล่งเพาะพันธุ์และที่อยู่สำคัญ ได้แก่

1) โรงเลี้ยงสัตว์ หรือคอก หรือเล้าเลี้ยงสัตว์ ได้แก่ สัตว์จำพวกวัว ควาย เป็ด ไก่ กระต่าย เป็นต้น
2) รูที่อยู่อาศัยของสัตว์ เช่น หนู งู และสัตว์เลื้อยคลานอื่น ๆ
3) แขนงรากของต้นไม้ โคนต้นไม้ เปลือกไม้
4) รอยแตกร้าวของสิ่งปลูกสร้าง เช่น ผนังบ้าน เสาไม้ /ปูนโบราณสถาน
5) จอมปลวกเก่า (ไม่มีปลวกอาศัยอยู่แล้ว)
6) ก้อนอิฐ กองหิน กองทราย กองไม้ฟืน
7) เรือนกล้วยไม้ เรือนปลูกต้นไม้
8) กอต้นกล้วย หรือ กอไม้ประดับ พุ่มไม้เตี้ย
9) กองปุ๋ยหมัก ที่ที่มีการทับถมของขยะ ใบไม้
10) รูบนพื้นดิน
11) ถ้ำ หรืออุโมงค์
12) ใต้ท่อนซุงเก่า

พฤติกรรมของริ้นฝอยทรายตัวเต็มวัย

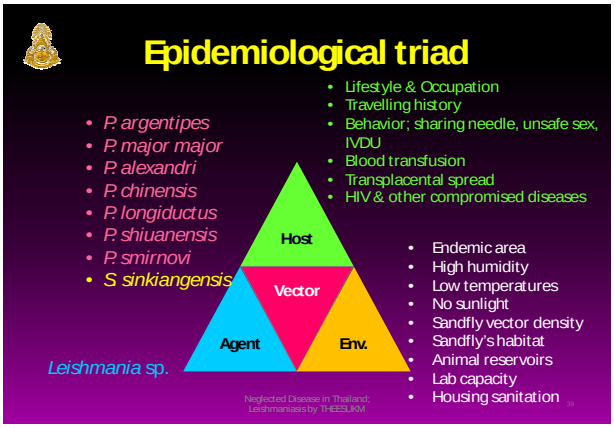
เมื่อริ้นฝอยทรายโตเต็มวัยจะมีพฤติกรรมในการดำรงชีพกล่าวคือ จะเคลื่อนที่ด้วยการกระโดดกึ่งบิน (โผ) เกาะพักไปเรื่อย ๆ จนพบแหล่งอาหาร ก็จะกระโดดเกาะกับสัตว์ที่ต้องการดูดเลือดนั้น ส่วนใหญ่มักออกหากินในเวลาตอนเย็นใกล้ตะวันตกดิน หรือโพล้เพล้ หรือกลางคืน และจะกัดภายนอกบ้าน (Outdoor) ในเวลากลางวันริ้นฝอยทรายจะเกาะพักในที่ที่ปลอดภัย มืด อับแสง อุณหภูมิต่ำหรือมีความเย็นและชื้น ทั้งนี้จะหากินเวลากลางวันก็ต่อเมื่อ ริ้นฝอยทรายหิว และเกาะพักภายในบ้านของโฮสท์แล้วก็จะกัดในเวลากลางวัน รวมถึง การพักอาศัยอยู่ภายในป่า หรือพื้นที่ที่คล้ายคลึงป่า เช่น สวนยางพารา พื้นที่ที่มีต้นไม้รกทึบ เป็นต้น

โดยปกติริ้นฝอยทรายจะอาศัยและออกหากินภายในรัศมี 200-300 เมตรจากแหล่งเพาะพันธุ์ (Breeding places) อย่างไรก็ตามมันสามารถเคลื่อนที่ได้ไกลถึง 2.2 กิโลเมตร แต่ใช้เวลานาน 2-3 วัน กรณีที่ย้ายหรือหาแหล่งอาหาร

ริ้นฝอยทรายเพศเมียเท่านั้นที่จะดูดเลือดเพื่อการวางไข่ สำหรับริ้นฝอยทรายเพศผู้จะดูดน้ำหวาน สารน้ำจากพืชและดอกไม้เท่านั้น ดังนั้นการจับริ้นฝอยทรายเพศเมียจึงเป็นวิธีการสำคัญในการจำแนกชนิด เพื่อพิสูจน์ถึงความเป็นไปได้ในการนำเชื้อลิชมาเนียจากสัตว์รังโรคไปแพร่ให้กับมนุษย์หรือสัตว์อื่น ๆ ต่อไป

องค์ประกอบสามเส้าทางระบาดวิทยาของโรคลิชมาเนีย (Epidemiological triad of Leishmaniasis)

การติดเชื้อลิชมาเนียจะเกิดขึ้นได้ ก็ต่อเมื่อมีการปฏิสัมพันธ์กันของโฮสท์ (มนุษย์) ตัวเชื้อลิชมาเนีย (กว่า 21 species) ริ้นฝอยทราย (กว่า 30 species) และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะมนุษย์ นอกจากปัจจัยเรื่องวิถีชีวิต อาชีพ ประวัติการเดินทางไปยังที่ที่มีโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น โรคประจำตัวแล้ว ยังมีปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญได้แก่ ความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันเช่นการติดเชื้อ HIV/AIDS หรือการเป็นโรคอื่น ๆ ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน การมีพฤติกรรมเสี่ยง เช่น การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน การมีเพศสัมพันธ์ที่ไม่ปลอดภัย รวมถึงการมีประวัติการได้รับเลือด เป็นต้นปัจจัยเหล่านี้ทำให้มีโอกาสได้รับหรือสัมผัสเชื้อได้ อีกทั้งการอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตขยายพันธุ์ของแมลงพาหะ เช่น มีความชื้นและค่อนข้างอับแสง อุณหภูมิไม่สูง (ไม่ร้อน) เป็นต้น ส่งผลให้มีความหนาแน่นของริ้นฝอยทรายมากขึ้น และการมีความหนาแน่นของสัตว์รังโรคในพื้นที่สูง (รูปที่11)



อ้างอิงจาก Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):136-73.

รูปที่ 11 องค์ประกอบสามเส้าทางระบาดวิทยาของโรคลิชมาเนีย

อาการและอาการแสดงของโรคลิชมาเนีย

อาการและอาการแสดงของโรคมีตั้งแต่ไม่มีอาการใดๆ (Asymptomatic) จนถึงมีการติดเชื้อของอวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis; VL) อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางคลินิกของโรคจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ *Leishmania* sp. (ตารางที่ 2) ซึ่งลักษณะทางคลินิกของโรคหลัก 2 ลักษณะคือ

1) **Cutaneous Leishmaniasis (CL)** เป็นแผลเรื้อรังตามผิวหนังในบริเวณที่ถูกริ้นฝอยทรายกัดซึ่งเกิดจากเชื้อ *L. Donovani, L. infantum, L. tropica, L. major, L. aethopica,* และ *L. killicki* มีระยะฟักตัวปกตินานเป็นสัปดาห์ไปจนถึงเป็นเดือน ซึ่งรอยโรคอาจจะปรากฏให้เห็นบนผิวหนังภายใน 2-3 วัน หรือหลังออกจากพื้นที่ที่มีการระบาดนานเป็นปีก็ได้ พยาธิสภาพของโรคที่สำคัญ คือ ผู้ป่วยจะมีตุ่มหรือแผลเกิดขึ้นเพียงแห่งเดียว หรือหลายแห่งขึ้นอยู่กับ

ว่า Promastigotes จะอยู่ ณ บริเวณใด นั่นหมายถึงว่า ริ้นฝอยทรายกัดในบริเวณใดมากน้อยแค่ไหน รอยโรคเริ่มต้นจากมีตุ่มเล็กแดงกลมแข็ง ต่อมาตุ่มนี้มีขนาดใหญ่ขึ้น มีสะเก็ดน้ำเหลืองปกคลุมแตกออก เกิดเป็นแผลที่ขยายขนาดอย่างช้า ๆ แผลแดง ตื้น ขอบเขตชัดเจน ขอบแผลยก ตรงกลางแผลมี granulation tissue ปรากฏให้เห็น ทั้งนี้เพราะการดำเนินโรคเป็นไปในลักษณะของภาวะภูมิไวเกินประเภทที่ 4 (Hypersensitivity Type IV) หรือที่เรียกว่า Delayed Type Hypersensitivity (รูปที่ 12)

รูปที่ 12 รอยโรคของลิชมาเนียที่ผิวหนังแบบต่างๆในทหารอเมริกันระหว่างปฏิบัติหน้าที่ในประเทศอิรัก

สำหรับ Mucocutaneous leishmaniasis (MCL) นั้น จะมีลักษณะคล้ายกับ CL เพียงแต่จะเกิดแผลลุกลามในอวัยวะที่มีเยื่อเมือก เช่น จมูก ปาก เป็นต้น ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อ *L. braziliensis, L. amazonensis* มักพบในแถบประเทศในอเมริกากลางและอเมริกาใต้

2) **Visceral Leishmaniasis (VL)** เป็นการติดเชื้อของอวัยวะภายในร่างกายโดยเฉพาะที่ ไขกระดูก ม้าม ต่อมน้ำเหลือง และ ตับ เป็นต้น ถือว่าเป็นลักษณะโรคที่รุนแรงที่สุด หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสมอาจทำให้เสียชีวิตได้ภายใน 2 ปี เกิดจากการติดเชื้อในกลุ่มของ *Leishmania donovani* complex ซึ่งได้แก่ *L. donovani, L. infantum,* และ *L. chagasi* มีระยะฟักตัวของเชื้อนี้นานตั้งแต่ 10 วัน – 2 ปี โดยเฉลี่ยประมาณ 2-3 เดือน ลักษณะของอาการและอาการแสดง (รูปที่ 13) คือ

1) ***มีไข้เรื้อรังเป็น ๆ หาย ๆ*** (Intermittent fever; chronically)

2) ***น้ำหนักลดอย่างต่อเนื่อง***; ผอมโซ (Progressive weight loss; Cachexia)

3) ***ซีด*** (Pale)

4) ท้องอืดและโตขึ้นจาก ***ม้ามโต*** (Splenomegaly) และ ***ตับโต*** (Hepatomegaly)

5) มีเลือดออกได้ง่าย (Bleeding tendency) เช่น เลือดกำเดาไหล เลือดออกตามไรฟัน

6) ต่อมน้ำเหลืองโต (Lymphadenopathy)

7) ผิวหนังสีคล้ำขึ้น (Hyperpigmented skin)

8) อ่อนเพลีย (Fatigue)

นอกจากสปีชีส์ของเชื้อจะทำให้เกิดความแตกต่างของอาการทางคลินิกแล้ว ยังสามารถบ่งชี้ถึงสปีชีส์ของริ้นฝอยทราย รวมถึงระบาดวิทยาในพื้นที่ต่าง ๆ ของโลกด้วย ตัวอย่าง เช่น *L. donovani* มีริ้น-ฝอยทรายที่สำคัญที่สำคัญเป็นพาหะ คือ 1) *P. argentipes* ซึ่งพบว่าริ้นฝอยทรายชนิดนี้จะมีการกระจายตัวในประเทศ Bangladesh, India และ Nepal และ 2) *P. alexandri* จะพบการกระจายตัวทางตอนเหนือของประเทศแอฟริกาไปจนถึงตะวันตกของประเทศจีน ใน

ตารางที่ 2 ลักษณะทางคลินิกของโรคจำแนกตามชนิดของเชื้อ *Leishmania* sp.

Cutaneous Leishmaniasis	Mucocutaneous Leishmaniasis	Visceral Leishmaniasis
L. tropica *L. major* *L. aethiopica* *L. donovani** *L. Infantum** ***L. mexicana* complex;** • *L. mexicana* • *L. amazonensis* *L. venezuelensis* ***Viannia* subgenus;** • *L. [V] brazilliensis* • *L. [V] panamensis* • *L. [V] guyanensis* • *L. [V] peruviana*	*L. [V] brazilliensis* *L. amazonensis*	***L. donovani*complex;** • *L. donovani** • *L. infantum** in Mediteranean • *L. chagasi* in America

ขณะที่ *L. tropica* ซึ่งทำให้เกิด Cutaneous Leishmaniasis (CL) มีรีนฝอยทรายที่สำคัญเป็นพาหะ คือ *P. sergenti* พบการกระจายตัวในกลุ่มประเทศตะวันออกกลางเป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยโรคลิชมาเนีย

การวินิจฉัยผู้ป่วยโรคลิชมาเนียจำเป็นต้องอาศัยระบาดวิทยาของโรค (Epidemiology of disease) การซักประวัติการดำเนินของโรค อาการที่ผู้ป่วยบอก (Symptoms) รวมถึงพฤติกรรมและปัจจัยเสี่ยงต่อการสัมผัสโรค (Behaviors & Risk factors) และการตรวจร่างกายเพื่อค้นหาอาการแสดง (Signs) จะทำให้แพทย์นึกถึงโรคนี้ เมื่อผู้ป่วยอยู่ในพื้นที่ที่เคยมีการระบาดของโรคมาก่อน มีอาการและอาการแสดงเข้าได้กับโรคลิชมาเนีย อย่างไรก็ตาม การตรวจทางห้องปฏิบัติ-การเพื่อคัดกรองหรือเพื่อตรวจยืนยันก็จำเป็นในการวินิจฉัยโรคนี้ให้ได้อย่างถูกต้อง ซึ่งการตรวจทางห้องปฏิบัติที่สำคัญ ได้แก่

1. การแสดงและคัดแยกเชื้อลิชมาเนีย (Demonstration & Isolation parasites) โดยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) ยังคงเป็น gold standard ของการวินิจฉัยโรคนี้ กรณีผู้ป่วยเป็นโรค CL สามารถตรวจได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับ ความสามารถหรือความถนัดของแพทย์ ความสามารถและความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจ และความยินยอมของผู้ป่วยในการตรวจ วิธีการตรวจได้แก่

1) การเจาะดูดตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนังรอยโรค (Skin aspiration) หรือ

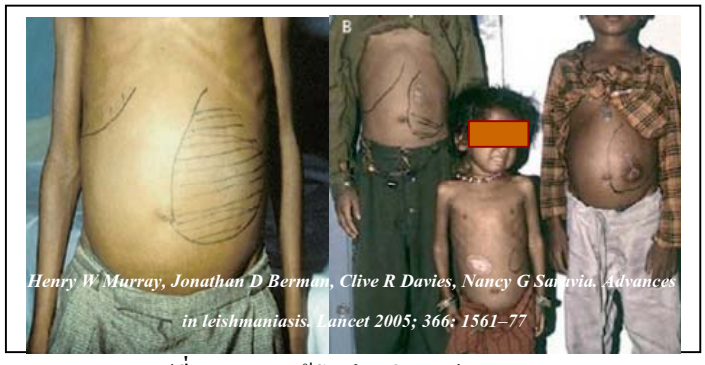
2) การตัดชิ้นเนื้อผิวหนังรอยโรค (Skin biopsy)

3) การขูดผิวหนังรอยโรค (Skin scraping)

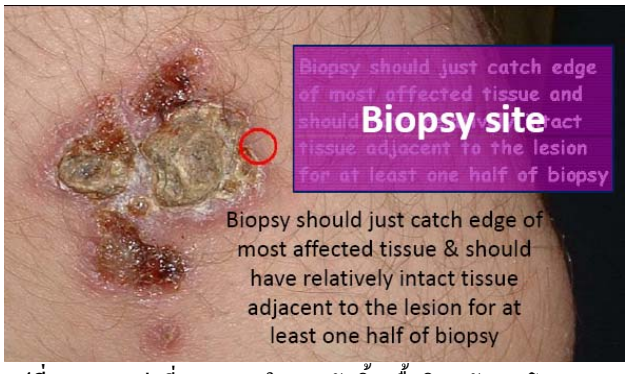
รอยโรคที่ผิวหนัง (ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่นอกร่มผ้า) ซึ่งเป็นมานานกว่า 3 สัปดาห์ขึ้นไป แม้ว่าจะรักษาด้วยยาปฏิชีวนะถูกต้องตามมาตรฐานแล้วแต่รอยโรคที่ผิวหนังนั้นยังไม่ดีขึ้นหรือยังไม่หาย ก็สามารถพิจารณาตรวจด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น โดยเฉพาะการทำ Skin biopsy ตำแหน่งที่ควรจะตัดอยู่ตรงขอบรอยโรคหรือขอบแผลโดยให้ได้เนื้อผิวหนังที่ดี (2/3) ให้มากกว่าผิวหนังที่เป็นแผล (1/3) (รูปที่ 14) และให้ได้ชิ้นเนื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร และลึกประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร นำไปแช่ใน 90-95% แอลกอฮอล์ นำส่งพยาธิแพทย์เพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อทำสไลด์เนื้อเยื่อตรวจพิสูจน์ต่อไป

ในกรณีผู้ป่วยเป็นโรค VL มีปัจจัยที่มากำหนดวิธีการตรวจเช่นเดียวกันกับกรณีของ CL ซึ่งสามารถวิธีการตรวจได้แก่

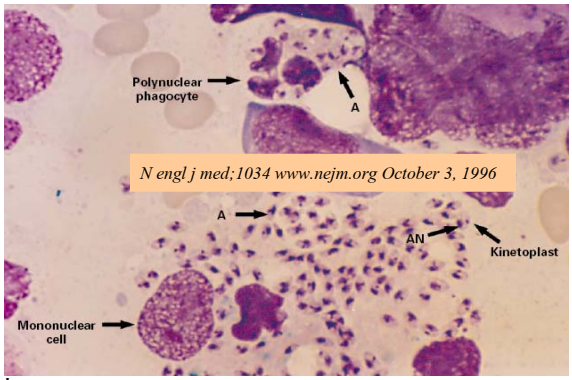
1) การเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อไขกระดูก (Bone marrow aspiration & biopsy) พบว่า ให้ความไวเพียง (Sensitivity) ร้อยละ 60-85 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ endemic area ของโรคด้วย ซึ่งในแต่ละประเทศก็จะแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้แพทย์ในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเช่น โรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป โรงเรียนแพทย์นิยมใช้ในการช่วยการวินิจฉัยและติดตามการรักษาผู้ป่วย เพราะสามารถทำได้โดยง่าย เนื่องจากมีแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางอายุรกรรมทั่วไป หรือโลหิตวิทยา พยาธิแพทย์ และรวดเร็วในการวินิจฉัยสามารถดำเนินการได้ภายในอย่างน้อย 1 วัน



รูปที่ 13 ลักษณะผู้ป่วยโรคลิชมาเนียแบบ VL



รูปที่ 14 ตำแหน่งที่เหมาะสมในการตัดชิ้นเนื้อผิวหนังรอยโรค (Skin biopsy)



รูปที่ 15 Bone marrow smear จากการเจาะไขกระดูก (Bone marrow aspiration)

2) การเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (Lymph node aspiration & biopsy) มีความไวเพียงแค่ร้อยละ 53-65 เท่านั้น ใช้ในกรณีที่พบว่าผู้ป่วยมีต่อมน้ำเหลืองโตในที่ต่าง ๆ ของร่างกาย ร่วมกันกับมีอาการเข้าได้กับโรคนี้ ก็ช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคโดยเฉพาะจาก วัณโรค หรือมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น เป็นวิธีที่สามารถดำเนินการได้ในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเช่นเดียวกันการเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อไขกระดูก

3) การเจาะดูดเนื้อเยื่อม้าม (Spleen aspiration) ให้ความไวมากกว่าร้อยละ 95 (ร้อยละ 93-99) ทำในกรณีที่จำเป็นเท่านั้น เพราะเป็นหัตถการที่มีความเสี่ยงสูง และไม่นิยมทำโดยทั่วไป

4) การย้อมสีเม็ดเลือดขาว (Buffy coat staining) ที่ได้จากการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ (peripheral blood) จะมีประโยชน์ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Leishmania* และ HIV/AIDS (*Leishmania*/HIV co-infection) เพราะผู้ป่วยในภาวะนี้จะมีโอกาสพบเชื้อลิชมาเนียในกระแสเลือดประมาณ ร้อยละ 50 สำหรับกรณีผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อลิชมาเนียอย่างเดียว มักนิยมทำวิธีการเจาะดูดหรือตัดเนื้อเยื่อไขกระดูกมากกว่า เพราะให้การวินิจฉัยโรคที่ชัดเจนกว่า

5) การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture) ซึ่งมีวัตถุประสงค์หลัก คือ ช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยในกรณีที่การตรวจด้วยวิธีการข้างต้นไม่ประสบความสำเร็จ รวมถึงความต้องการในการใช้ antigen เพื่อการจำแนก สปีชีส์ และการวินิจฉัยทางอิมมูโนโลยี หรือ นำมาการทดลองในสัตว์ดูการก่อโรค หรือ ศึกษาเกี่ยวกับยาที่ใช้ในการรักษา ทั้งนี้จะช่วยเพิ่มความไว (sensitivity) ในการคัดแยกเชื้อ อย่างไรก็ตาม การเพาะเชื้อจะใช้เวลานาน อย่างน้อย 1 เดือนในการเฝ้าดูการเจริญเติบโต และมีราคาแพง เพราะต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรในการเตรียมเป็นการเฉพาะ จึงนิยมใช้ในการศึกษาวิจัยในเชิงลึกมากกว่านำมาใช้ในทางคลินิก และสามารถทำได้เฉพาะโรงพยาบาลที่เป็นโรงเรียนแพทย์ที่มีความพร้อมเท่านั้น

ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเชื้อลิชมาเนีย และการตรวจวิเคราะห์ทางสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนียด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จะให้ความไว (sensitivity) มากกว่าการแสดงและคัดแยกเชื้อลิชมาเนียโดยการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination)

2. การตรวจวิเคราะห์ทางสารพันธุกรรมของเชื้อลิชมาเนีย (Genetic detection) ที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification ซึ่งต้องทำการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่ส่งตรวจ ก่อนนำมาเข้าขบวนการทำ PCR ซึ่งต้องใช้เวลาในการดำเนินงานอย่างน้อย 5-7 วัน ในกรณีสิ่งส่งตรวจเป็น peripheral blood การตรวจด้วย PCR จะให้ความไวร้อยละ 72-100 ถ้าสิ่งส่งตรวจเป็นไขกระดูก PCR จะให้ความไวสูงถึงร้อยละ 82-100 ทั้งนี้การประสบความสำเร็จในการตรวจนี้มีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสิ่งส่งตรวจ คุณภาพของสิ่งส่งตรวจ ความชำนาญของผู้ตรวจ ความพร้อมของเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ เป็นต้น

การตรวจ PCR ของเชื้อ *Leishmania* sp. กระทำใน 2 gene ดังนี้

1) PCR amplification ของ Minicircle kDNA เป็นการทำ PCR ในบริเวณ miniexon gene ซึ่งเป็นตำแหน่งบนสายพันธุกรรมของเชื้อ *Leishmania* sp. วิธีนี้ใช้ยืนยันว่า สิ่งส่งตรวจมีเชื้อ *Leishmania* sp. หรืออีกนัยหนึ่ง คือ เป็นการยืนยันการติดเชื้อ *Leishmania* sp. ว่ามีหรือไม่

2) PCR amplification ของ 18s SSU-rRNA gene เป็นการทำ PCR ในบริเวณ ITS1 ซึ่งเป็นตำแหน่งบนสายพันธุกรรมของ small subunit ribosomal DNA ของเชื้อลิชมาเนียเพื่อยืนยันสปีชีส์ของเชื้อ *Leishmania* sp. เช่นกัน

ซึ่งการตรวจ PCR amplification ทั้ง 2 gene จะแตกต่างกันเพียงตำแหน่งที่มีการวิเคราะห์สายพันธุกรรม ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์การติดเชื้อลิชมาเนียซึ่งกันและกัน อย่างไรก็ตามตัวอย่างสารพันธุกรรมจากทั้งสองวิธีจะเข้าสู่การวิเคราะห์ด้วยวิธี Restrict Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นขั้นตอนที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ Eae I และ Hae III ในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมจากแบบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (รูปที่ 16)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาลำดับคู่เบสของสายพันธุกรรม (DNA Sequencing) เป็นการนำตัวอย่างสารพันธุกรรมที่ได้มาจากวิธีที่ 2 ตรงตำแหน่ง ITS1 มาวิเคราะห์หาลำดับคู่เบสของสายพันธุกรรม โดยการนำลำดับคู่เบสมาเปรียบเทียบกับลำดับคู่เบสของเชื้อลิชมาเนียที่รายงานในฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) อยู่แล้วแต่เดิม ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์ทราบสปีชีส์ของเชื้อ *Leishmania* sp.ที่ต้องการพิสูจน์ (รูปที่ 17) หลังจากนั้นก็จะนำลำดับคู่เบสนี้ไปวิเคราะห์หาลำดับการวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) และจะเป็นการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับคู่เบสของลิชมาเนียที่กำลังตรวจกับเชื้อลิชมาเนียที่ทราบกันอยู่แล้วหลาย ๆ สปีชีส์พร้อม ๆ กัน (รูปที่ 18)

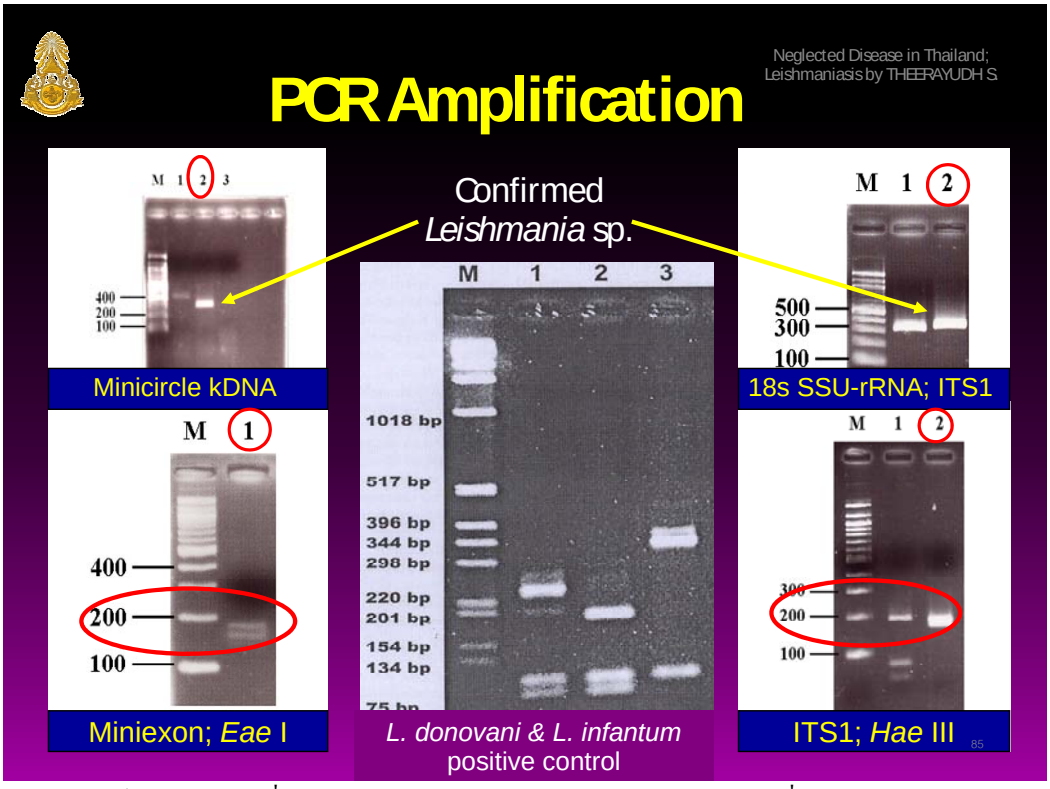
3. การตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยี (Serology) เป็นการตรวจที่มีผลกระทบต่อผู้ป่วยน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการข้างต้น เพียงแค่เจาะเลือดและนำมาปั่นแยกซีรั่มแล้วนำมาตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อลิชมาเนียเท่านั้น อย่างไรก็ตามกรณีผู้ป่วยเป็นโรค CL การตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีจะไม่ช่วยในการวินิจฉัยมากนัก เพราะไม่สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อลิชมาเนียได้หรือไม่ก็จะให้ค่า titer level ของแอนติบอดีค่อนข้างต่ำ ในทางตรงกันข้าม หากผู้ป่วยเป็นโรค VL การตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีนี้จะช่วยในการคัดกรองหรือสนับสนุนการวินิจฉัยอย่างมากที่นิยมใช้ ได้แก่

1) **Direct Agglutination Test (DAT)** เป็นการตรวจทางซีโรโลยีแบบ Semi-quantitative test ใช้ตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อลิชมาเนีย โดยมีเกณฑ์ในการแปลผล คือ Anti-*Leishmania* Antibodies titer > 1:100 ขึ้นไป และจากการวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะของ DAT จากหลายๆการวิจัย (Meta-analysis) พบว่าให้ความไว (Sensitivity) ร้อยละ 94.8 และให้ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 97.1 การตรวจด้วยวิธีนี้แสดงดังรูปที่ 19 และ 21

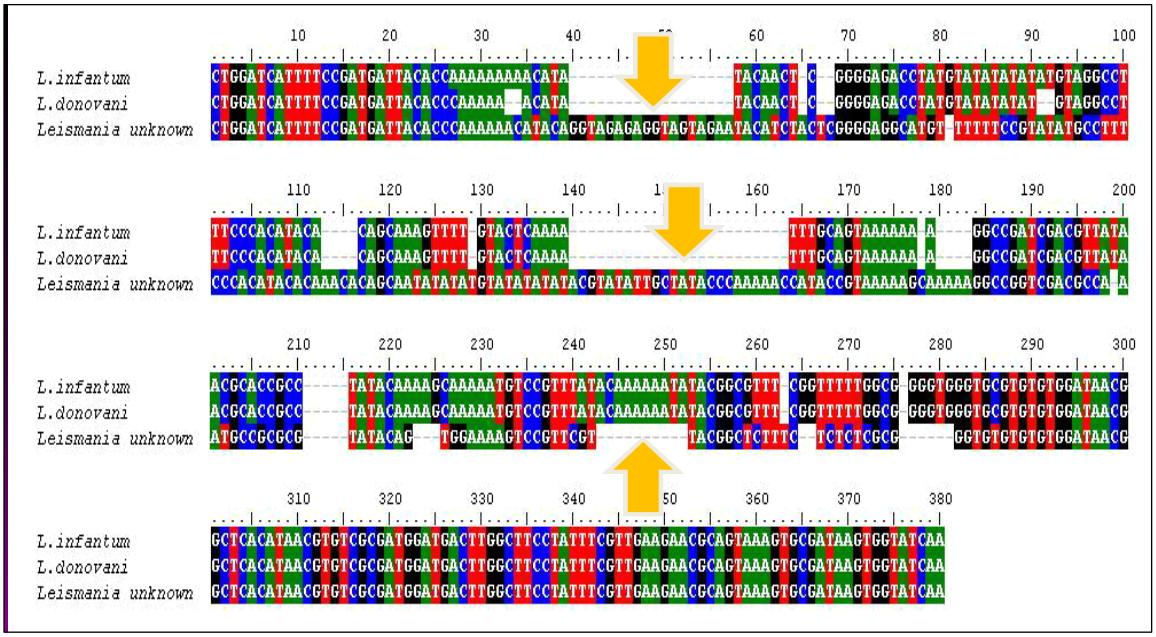
2) rk39 strip test เป็นการตรวจในลักษณะของ ELISA โดยใช้โปรตีนส่วน kinesin-related protein ของเชื้อ *L. chagasi* ซึ่งมันเป็นโปรตีนส่วนที่ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง (Conserved) ของเชื้อลิชมาเนียในตระกูล *L. donovani* complex (รูปที่ 20) มาผลิตในรูปของ Strip หรือ Kit Test โดยการใช้ซีรั่มมาหยดลงบนตำแหน่งที่ใส่ตัวอย่างซีรั่มและหยด dilution buffer รอเวลา 10 นาที ก็สามารถอ่านผลการตรวจโดยผลบวกจะให้ขีดสีแดงจำนวน 2 ขีดปรากฏในตำแหน่งที่ต่างกัน โดยเส้นด้านบน คือ control เส้นด้านล่าง คือ ผลบวก หากปรากฏเฉพาะขีดสีแดงด้านบนเพียงตำแหน่งเดียวแสดงว่า ให้ผลเป็นลบ ดังรูปที่ 21 ไม่สามารถระบุถึงค่า Titer ของระดับแอนติบอดีได้ และจากการวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะของ DAT จากหลายการวิจัย (Meta-analysis) พบว่า ให้ความไว (Sensitivity) ร้อยละ 93.9 และให้ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 95.3

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีในภาคสนามเพื่อการคัดกรองการติดเชื้อลิชมาเนีย เช่น การสอบสวนโรค และงานวิจัยภาคสนาม การใช้ rk39 strip test จะสะดวกและรวดเร็วกว่า เพราะมีลักษณะเป็น Kit Test ใช้ง่าย แต่ประสิทธิภาพของ rk39 strip test นี้ ขึ้นอยู่กับความชุกของเชื้อลิชมาเนียในกลุ่มสปีชีส์ที่นำมาใช้กับชุดทดสอบ และมักจะใช้ในประเทศที่มีความชุกของโรคนี้โดยเฉพาะกับเชื้อในกลุ่ม *L. donovani* complex คือ *L. donovani* *L. infantum* *L. chagasi* เท่านั้น และที่สำคัญ คือ มีราคาแพง หาซื้อยาก และน้ำยา diluents buffer ต้องเก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อรักษาคุณภาพ (cold chain)

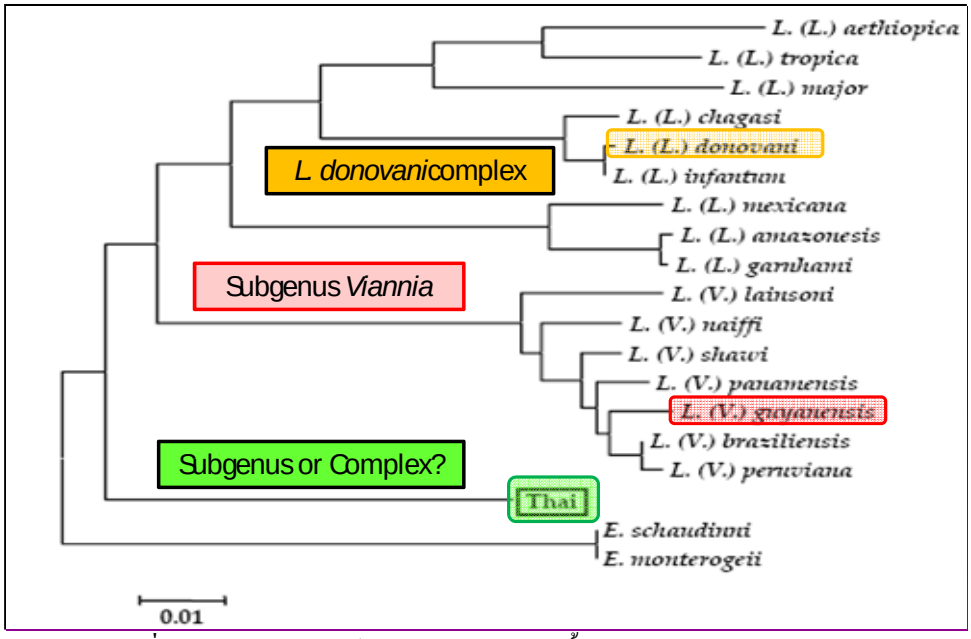
ในประเทศไทยมีการนำ rk39 strip test มาใช้ในการสอบสวนโรคในจังหวัดพังงาและนครศรีธรรมราชเพียงสองกรณีนี้ พบว่า เมื่อใช้ตรวจในผู้ป่วยยืนยันโรคลิชมาเนียให้ผลเป็นลบทั้งสองกรณี และยังไม่มีการนำมาใช้ในวงกว้าง สำหรับการสอบสวนโรคลิชมาเนียของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขในทุกกรณีจะตรวจด้วย DAT เนื่องจากสามารถจัดหาได้ง่าย ไม่ต้องอาศัย cold chain เพื่อการรักษาคุณภาพ และถึงแม้จะมีขั้นตอนในการตรวจมากและใช้เวลาในการตรวจนานอย่างน้อย 2-3 วัน แต่ให้ค่าความไวและความจำเพาะที่สูงกว่า rk39 strip test อีกประการหนึ่ง คือ DAT สามารถบอกระดับ titer ของแอนติบอดีได้ เช่น 1: 100, 1:200, 1:400, ..., 1:6400 เป็นต้น ในขณะที่ rk39 strip test บอกเพียงแค่ผลเป็นบวกหรือลบเท่านั้น



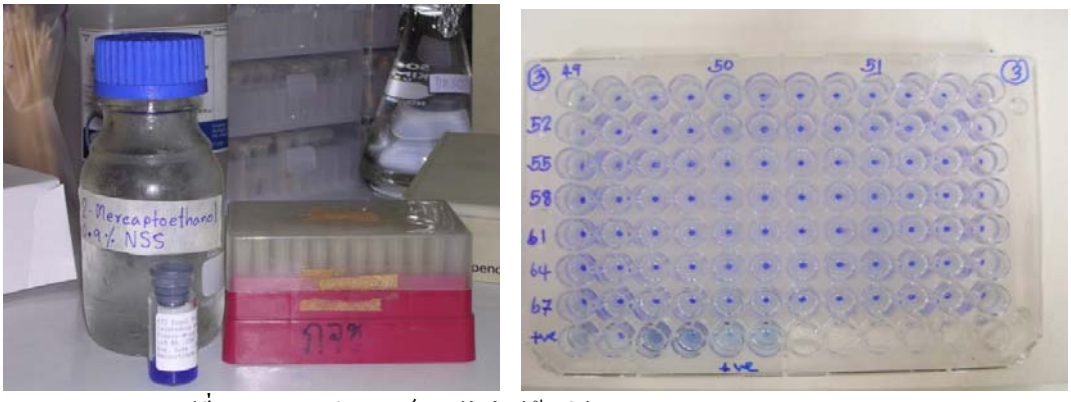
รูปที่ 16 การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมที่ Minicircle kDNA ตรงตำแหน่ง Miniexon gene และที่ 18s SSU-rRNA ตรงตำแหน่ง ITS1 ของ small subunit ribosomal DNA ของเชื้อลิชมาเนีย



รูปที่ 17 การตรวจวิเคราะห์ลำดับคู่เบสของเชื้อลิชมาเนีย (DNA sequencing)

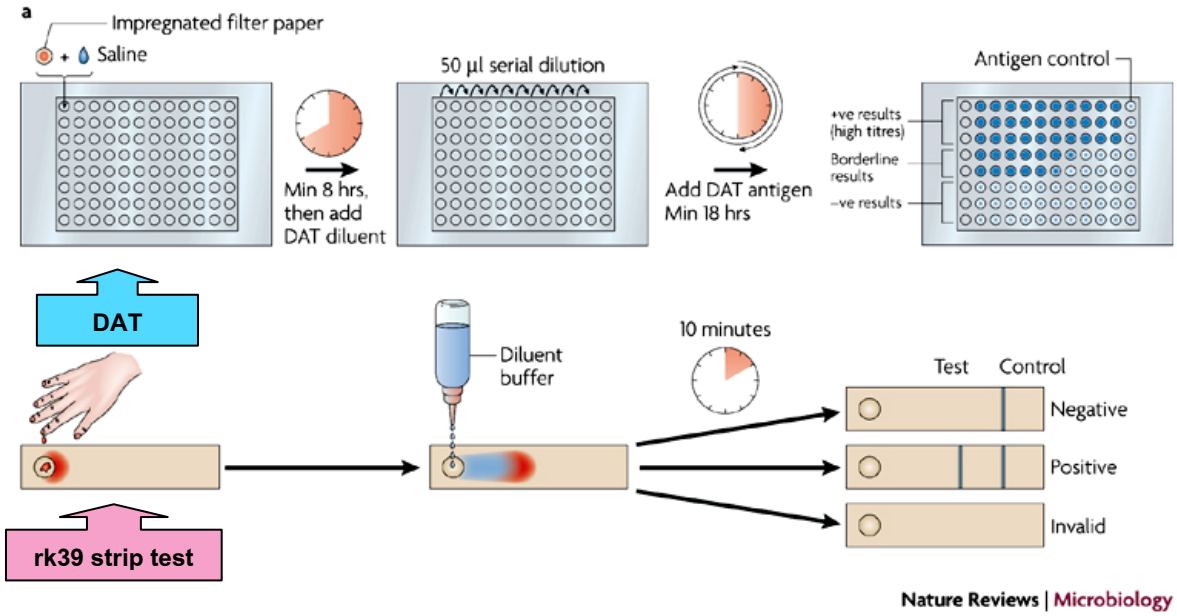


รูปที่ 18 การตรวจวิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการของเชื้อลิชมาเนีย (Phylogenetic tree)



รูปที่ 19 การตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีด้วยวิธี Direct Agglutination Test (DAT)

รูปที่ 20 การตรวจด้วย rk39 strip test



ที่มา Franois Chappuis, Shyam Sundar, Asrat Hailu, Hashim Ghalib, Suman Rijal, Rosanna W. Peeling, Jorge Alvar, Marleen Boelaert. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature review Microbiology; 2007 (5); 873-882.

รูปที่ 21 การตรวจวิเคราะห์ทางซีโรโลยีด้วย Direct Agglutination Test (DAT) และ การตรวจด้วย rk39 strip test

เอกสารอ้างอิง

ระบาดวิทยาของโรคลิชมาเนีย

1) Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis.2003;49(1):55-60.

2) Herwaldt B L. Leishmaniasis. Lancet 1999;354(9185):1191-99.

3) Desjeux P.The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun;95(3):239-43.

4) Philippe J Guerin, Piero Olliaro, Shyam Sundar, Marleen Boelaert, Simon L Croft, Philippe Desjeux, Monique K Wasunna, Anthony D M Bryceson. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment and a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis 2002;2:494–501.

5) Henry W. Murray. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. Am. J. Trop. Med. Hyg;71(6);2004, 787–794.

6) Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis.Lancet. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.

7) Desjeux P.The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.Trans R Soc Trop Med Hyg. 95(3):2001; 239-43.

8) Desjeux, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. Clinics in Dermatology, 1996;14, 417-423.

9) Marleen Boelaert, Sujit Bhattacharya, François Chappuis, Sayda H. El Safi, Asrat Hailu, Dinesh Mondal, Suman Rijal, Shyam Sundar, Monique Wasunna, Rosanna W. Peeling. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. Nat Rev Microbiol. 2007 Nov;5(11):873-82.

10) Françis Chappuis, Suman Rijal, Alonso Soto, Joris Menten, Marleen Boelaert. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. BMJ 2006;333;723.

11) Françis Chappuis, Shyam Sundar, Asrat Hailu, Hashim Ghalib, Suman Rijal, Rosanna W. Peeling, Jorge Alvar, Marleen Boelaert. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature review Microbiology; 2007 (5); 873-882

12) http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html

13) Warrell, David A. Cox, Timothy M. Firth, John D. Benz, Edward J. Oxford Textbook of Medicine, 4th Edition. Copyright © 2003 Oxford University Press.

เชื้อลิชมาเนีย

14) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5658&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock

15) Marie Lipoldová, Peter Demant. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. Nature review Genetics; 2006 (7); 294-305

16) Henry W Murray, Jonathan D Berman, Clive R Davies, Nancy G Saravia. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366: 1561–77

17) Oui Ju, David I Grove, Wilfrid J Jaksic and Geoffrey W Dart.Visceral leishmaniasis: a trip to the Greek Islands is not always idyllic. MJA 2004; 181 (8): 446-447

18) http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=37&id=13038008

ริ้นฝอยทราย

19) Apiwathnasorn C, Sucharit S, Rongsriyam Y, Leemingsawat S, Kerdpibule V, Deesin T, Surathin K, Vutikes S, Punavuthi N. A brief survey of phlebotominesandflies in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1989 Sep;20(3):429-32.

20) Depaquit J, Léger N, Beales P. Chiniusbarbazani n. sp. from Thailand (Diptera: Psychodidae) Parasite. 2006 Jun;13(2):151-8. French.

21) Muller F, Depaquit J, Léger N. Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai n. sp. (Diptera-Psychodidae). Parasitol Res. 2007 Nov;101(6):1597-602.

22) Depaquit J, Muller F, Léger N. Phlebotomus (Euphlebotomus) barguesae n. sp. from Thailand (Diptera - Psychodidae). Parasit Vectors. 2009 Jan 8;2(1):5.

23) Zhang LM, Leng YJ. Eighty-year research of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915-1995). II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China.Parasite. 1997 Dec;4(4):299-306.

24) http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/Vector%20and%20Reservoirs.html

25) Richard P. Lane, medical insects & arachnids, 1st edition. 1993; 78-119.

26) Jam A. Rozendaal. Vector control; method for use by individuals and communities. WHO. Geneva, 1997; 20-21, 45-51.

27) Mike W. Service, Medical entomology for student 2nd edition;2000. Chapter 5: Phlebotomine sandfiles (Phlebotominae). Cambridge university press. 91-100.

28) Richard P. Lane, Roger W. Crosskey. Medical insects and arachnids 1st edition;1993. Chapter 4: Sandfiles (Phlebotominae). Published by Chapman and Hall. 78-119.

29) Bruce F. Eldridge and John D. Edman. Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropod;2000. Chapter 8: Leishmaniasis and Trypanosomiasis. Published by Kluwer Academic Publishers. 231-273.

30) Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):136-73.

อาการและอาการแสดงของโรคลิชมาเนีย

31) Henry W Murray, Jonathan D Berman, Clive R Davies, Nancy G Saravia. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366: 1561–77.

32) Herwaldt B L. Leishmaniasis. Lancet; 1999;354(9185):1191-99.

การตรวจวินิจฉัยโรคลิชมาเนีย

33) Richard R, Jean-Claude D. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. Journal of clinical microbiology;2007;45(1):21–25.

34) Shyam Sundar, M. Rai. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology;2002;9(5):951–958.

35) Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, Kongkaew W, Bumrungsana K, Chanachai K, Apiwathanasorn C, Rujirojindakul P, Wattanasri S, Ungchusak K, Leelayoova S. A suspected new species of Leishmania, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. Int J Parasitol. 2008 May;(386):617-22. Epub 2008 Jan 15.

36) Françis Chappuis, Shyam Sundar, Asrat Hailu, Hashim Ghalib, Suman Rijal, Rosanna W. Peeling, Jorge Alvar, Marleen Boelaert. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature review Microbiology; 2007 (5); 873-882

37) François Chappuis, Suman Rijal, Alonso Soto, Joris Menten, Marleen Boelaert. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 2006;333;723.

****

หลักเกณฑ์การส่งบทความวิชาการ

คณะกองบรรณาธิการฯ ได้เปิดเวทีให้ผู้ที่สนใจส่งบทความวิชาการ/ผลการศึกษาวิจัย เกี่ยวกับการดำเนินงานป้องกัน ควบคุมโรค เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในรายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ประจำสัปดาห์ และฉบับผนวก (Supplement) ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค โดยกำหนดหลักเกณฑ์ การส่งบทความวิชาการ/ผลการศึกษาวิจัยดังนี้

ลักษณะรูปแบบเรื่องทางวิชาการที่จะตีพิมพ์

1. บทความวิชาการ เนื้อความตัวอักษร จำนวนไม่เกิน 1 – 3 หน้า กระดาษ เอ 4 ประกอบด้วย
– บทนำ ซึ่งอาจมีวัตถุประสงค์ก็ได้ – เนื้อหา – สรุป – เอกสารอ้างอิง (ถ้ามี)

2. การสอบสวนโรค เนื้อความตัวอักษร จำนวนไม่เกิน 5 – 6 หน้า กระดาษ เอ 4 และ รูปจำนวน 1 หน้ากระดาษ เอ 4

3. การศึกษาวิจัย เนื้อความตัวอักษร จำนวนไม่เกิน 5 – 6 หน้า กระดาษ เอ 4 และ รูปจำนวน 1 หน้ากระดาษ เอ 4

4. แนวทาง/ผลการวิเคราะห์การเฝ้าระวังโรค เนื้อความตัวอักษร จำนวนไม่เกิน 3 – 5 หน้า กระดาษ เอ 4

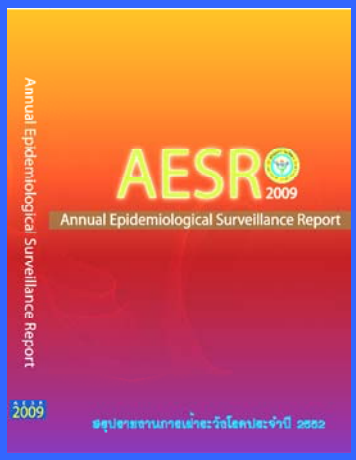
5. งานแปล ประกอบด้วย หนังสือ/เอกสารที่แปล, ชื่อผู้แปล, เนื้อหาที่แปล จำนวนไม่เกิน 3 หน้า กระดาษ เอ 4

การส่งต้นฉบับ

ส่งแผ่นดิสก์พร้อมกับต้นฉบับจริง จำนวน 1 ชุด หรือ ส่ง E-mail พร้อมแนบไฟล์บทความที่จะลงตีพิมพ์ พร้อมทั้งแจ้งสถานที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ของเจ้าของเรื่อง เพื่อที่คณะกองบรรณาธิการจะติดต่อได้ และส่งมาที่

กลุ่มงานเผยแพร่ สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค โทรศัพท์ 0-2590-1723 โทรสาร 0-2590-1784

E-mail : wesr@health2.moph.go.th หรือ wesr@windowslive.com



สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี
ฉบับล่าสุด... ปี 2552
สามารถค้นหาข้อมูลเพิ่มเติมที่ เว็บไซต์
สำนักระบาดวิทยา http://epid.moph.go.th

Annual Epidemiological Surveillance Report

รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์

WESR Weekly Epidemiological Surveillance Report, Thailand

ปีที่ 41 ฉบับที่ 3S : สิงหาคม 2553 Volume 41 Number 3S : August 2010

กำหนดออก : เป็นรายสัปดาห์ / จำนวนพิมพ์ 2,900 ฉบับ

ส่งบทความ ข้อคิดเห็น หรือพบความคลาดเคลื่อนของข้อมูล

กรุณาแจ้งมายัง กลุ่มงานเผยแพร่ ศูนย์ข้อมูลทางระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา

E-mail : wesr@health2.moph.go.th หรือ wesr@windowslive.com

ที่ สธ. 0420/ พิเศษ

ชำระค่าฝากส่งเป็นรายเดือน
ใบอนุญาตเลขที่ 23/2552
ไปรษณีย์กระทรวงสาธารณสุข

ผู้จัดทำ

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000 โทร. 0-2590-1723, 0-2590-1827 โทรสาร 0-2590-1784

Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Tivanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

Tel (66) 2590-1723, (66)2590-1827 FAX (66) 2590-1784