

บทบาทของแบคทีเรียโวลบาเกียในสัตว์ขาข้อ และพยาธิกลุ่มฟีลาเรีย

จันทิมา พุกษากร
สุรางค์ นุชประยูร

คัดจากวารสารจุฬาลงกรณ์เวชสาร ปีที่ 45 ฉบับที่ 7 กรกฎาคม 2544

บทบาทของแบคทีเรีย Wolbachia เกี่ยวในสัตว์ขาข้อ และพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย

จันทิมา พุกษากร*

สุรางค์ นุชประยูร**

Porksakorn C, Nuchprayoon S. The roles of *Wolbachia* in arthropods and filarial parasites.
Chula Med J 2001 Jul; 45(7): 603 - 22

The *Wolbachia* is a group of obligate intracellular bacteria, belonging to the order Rickettsiales. The bacteria are found in a diverse group of arthropods including insects, isopods and mites. These microorganisms are transmitted through the cytoplasm of eggs and have evolved various mechanisms for manipulating the reproductive mechanisms of their hosts, including cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis induction, and feminization of genetic males. *Wolbachia* have recently been found in filarial nematodes including all of the major pathogenic filariae of human, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus*. All developmental stages and all individual worms appear to be infected, with transmission maintained through vertical transfer via the egg. Phylogenetic analyses indicated that arthropod and filarial *wolbachiae* can be classified into four main lineages (A, B, C, and D). *Wolbachia* have evolved a mutualistic association with their hosts. It has been suggested that *Wolbachia* might contribute to the pathogenesis of filarial diseases and offer a novel target for chemotherapy.

Key words: *Wolbachia*, Filarial nematodes, Arthropods.

Reprint request : Triteeraprapab S. Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. January 10, 2001.

วัตถุประสงค์

1. เข้าใจรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย *Wolbachia* และโฮสต์
2. เข้าใจถึงบทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีต่อโฮสต์หนอนพยาธิฟิลาเรีย

* นิสิตปริญญาเอกสหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Wolbachia เป็นแบคทีเรียที่ต้องอาศัยอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น (obligate intracellular bacteria) ซึ่ง *Wolbachia* จะพบมากในเซลล์บริเวณระบบอวัยวะสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ (host) แบคทีเรีย *Wolbachia* ถูกจัดอยู่ในพวก Alpha Proteobacteria เช่นเดียวกับแบคทีเรียใน genus *Rickettsia*⁽¹⁾ และ *Ehrlichia*^(2,3) และเป็นสมาชิกใน order Rickettsiales⁽⁴⁾ สามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ขาข้อ (arthropods) ที่จัดอยู่ใน class Insecta, class Arachnida และ class Crustacea ใน phylum Arthropoda (ตารางที่ 1) และจากการสำรวจแมลง species ต่าง ๆ (แมลงจัดอยู่ใน class Insecta) พบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ครอบคลุมมากกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ของจำนวน species ในแมลงทั้งหมด⁽⁵⁾ ในจำนวนนี้ส่วนใหญ่เป็นแมลงที่รู้จักกันดี เช่น แมลงหวี่ (*Drosophila* spp., ชื่อสามัญ คือ fruit flies) ยุงลาย (*Aedes* spp.) ยุงบ้าน (*Culex* spp.) และตัวต่อ

จำพวก parasitic wasps เป็นต้น⁽⁶⁾ นอกจากนี้พวกสัตว์ขาข้ออื่น ๆ เช่น พวกตัวไร (mites) ซึ่งจัดอยู่ใน class Arachnida และพวก isopods ได้แก่ woodlouse พบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้เช่นกัน⁽⁵⁻⁷⁾ บทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในสัตว์ขาข้อนั้นมีทั้งการทำให้เกิด cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis และ feminization ซึ่งปรากฏการณ์เหล่านี้มีผลต่อการปรับเปลี่ยนรูปแบบการสืบพันธุ์ของโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อ เพื่อประโยชน์ในการแพร่เชื้อของแบคทีเรียเป็นหลัก ความสัมพันธ์และบทบาทต่าง ๆ ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีต่อโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อซึ่งน่าสนใจเหล่านี้ ได้มีการศึกษาวิจัยทางชีววิทยายาวอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำความรู้ทางชีววิทยาของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ได้มาประยุกต์ใช้ ตัวอย่างเช่น เพื่อประโยชน์ใช้ในการควบคุมโฮสต์พวกแมลงนำโรคที่สำคัญต่าง ๆ เป็นต้น

ตารางที่ 1. โฮสต์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ได้มีการรายงานพบ (ดัดแปลงจาก O'Neill et al, 1997)

Phylum	Class	Order	ได้แก่ Genus
Nematoda	Phasmidia	Spirurida	<i>Brugia</i> , <i>Wuchereria</i> , <i>Onchocerca</i> , <i>Dirofilaria</i> และ <i>Litomosoides</i>
Arthropoda	Crustacea	Isopoda	<i>Armadillidiidae</i>
	Arachnida	Acariformes	
	Insecta	Coleoptera	
		Diptera	<i>Aedes</i> , <i>Culex</i> และ <i>Drosophila</i>
		Hemiptera	
		Hymenoptera	<i>Trichogramma</i> , <i>Aphytis</i> , <i>Encarsia</i> , <i>Leptopilina</i> และ <i>Muscidifurax</i>
		Lepidoptera	
		Orthoptera	

สำหรับสิ่งมีชีวิตนอกเหนือจากพวกสัตว์ขาข้อ นั้นมีการศึกษาพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา โดยสามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ในหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรีย (filarial nematodes) ซึ่งได้แก่ หนอนพยาธิโรคเท้าช้าง (*Wuchereria bancrofti* และ *Brugia malayi*) เป็นต้น^(4,5,8) โดยหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรียจัดอยู่ใน Phylum Nematoda, superfamily Filarioidea, family Onchocercidae การค้นพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในโฮสต์พวกหนอนพยาธิฟิลาเรียนั้น ทำให้เกิดหลายคำถามทางการวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ว่า แบคทีเรีย *Wolbachia* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของการเกิดโรคฟิลาเรียเอซิส (filariasis) ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากพยาธิตัวกลมในกลุ่มนี้ ซึ่งรวมถึงโรคเท้าช้างด้วย หรือแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจจะเป็นเป้าหมายในการรักษาโรค filariasis แนวทางใหม่แทนที่แนวทางการรักษาโรคเดิมซึ่งมีผลข้างเคียงของยาสูงและจำเป็นต้องให้มีการรักษาซ้ำตลอดจนการรักษาไม่ผลโดยตรงต่อหนอนพยาธิฟิลาเรียตัวอ่อนเป็นหลัก^(4,8-10)

Wolbachia ในสัตว์ขาข้อ

แบคทีเรีย *Wolbachia* ในสิ่งมีชีวิตพวกสัตว์ขาข้อได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์มานานเกือบ 80 ปี โดยในปี พ.ศ. 2467 Hertig และ Wolbach รายงานการค้นพบแบคทีเรียภายในเซลล์บริเวณรังไข่ของยุงบ้าน *Culex pipiens* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และต่อมาได้ให้ชื่อแก่แบคทีเรียที่พบว่า *Wolbachia pipientis*⁽¹¹⁾ การรายงานในครั้งนั้น นับได้ว่าเป็นรายงานการพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ครั้งแรกในสัตว์จำพวกแมลงด้วย

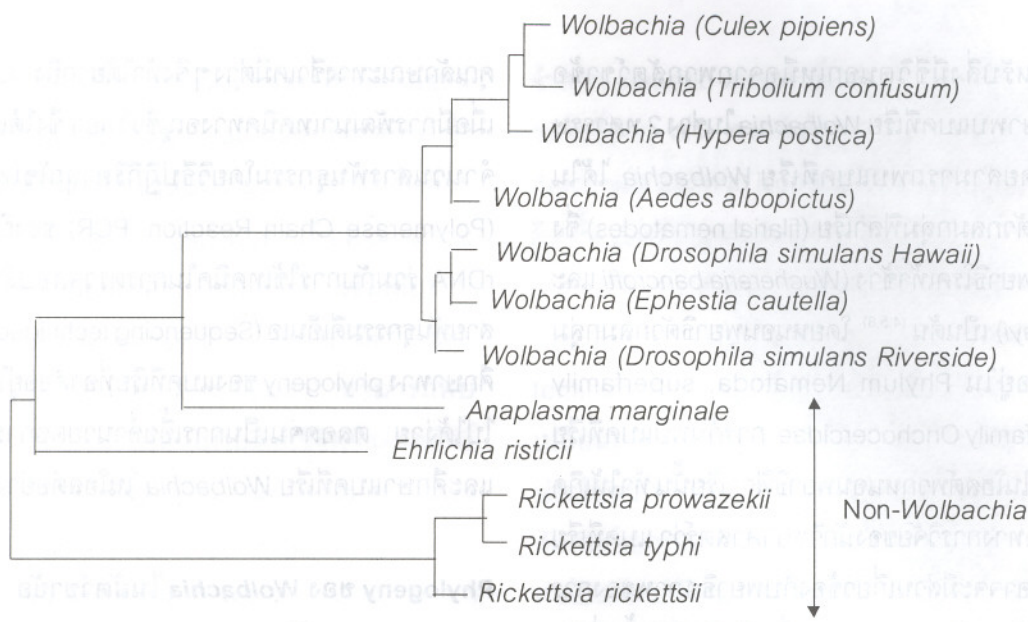
แบคทีเรีย *Wolbachia* พบได้ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อ บริเวณเนื้อเยื่อของระบบอวัยวะสืบพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นบริเวณรังไข่ (ovaries) หรือ อัณฑะ (testes) ของโฮสต์^(1,7,12-14) ความที่ *Wolbachia* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น และยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงภายนอกเซลล์ของโฮสต์ได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปกติทั่วไป ดังนั้นการจัดจำแนกแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยอาศัย

คุณลักษณะทางชีวเคมีต่างๆ จึงทำได้ยากยิ่ง อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งได้แก่ การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ของยีนเช่น 16S rDNA ร่วมกับการใช้เทคนิคในการตรวจสอบลำดับเบสในสายพันธุกรรมดีเอ็นเอ (Sequencing technique) ทำให้การศึกษาทาง phylogeny ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเซลล์เป็นไปได้ง่าย ตลอดจนเป็นการเอื้ออำนวยต่อการจัดจำแนกและศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* ในโฮสต์อย่างมาก

Phylogeny ของ Wolbachia ในสัตว์ขาข้อ

จากการศึกษา phylogenetic tree ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ชนิดต่างๆ พบว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ในสัตว์ขาข้อแบ่งแยกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม A และ B (Cluster A และ B)^(12,15) นอกจากนี้ ผลจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* พบว่าไม่มีความสอดคล้องกับ phylogeny ของสิ่งมีชีวิตพวกแมลงที่เป็นโฮสต์⁽¹⁾ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงหวี่ *Drosophila simulans* ซึ่งจัดอยู่ใน order Diptera มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในแมลงพวกผีเสื้อกลางคืน *Ephestia cautella* ซึ่งจัดอยู่ใน order Lepidoptera มากกว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในยุง *Aedes albopictus* และ *Culex pipiens* ซึ่งจัดอยู่ใน order Diptera เช่นเดียวกับแมลงหวี่ (รูปที่ 1)

แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในโฮสต์ที่จัดอยู่ใน order ต่างกันแต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกันน้อย แสดงถึงการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ไปสู่โฮสต์พวกแมลงต่าง ๆ ระหว่าง order ได้^(1,6) ซึ่งเรียกว่า horizontal transmission นอกจากนี้ การแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบภายในแมลง species เดียวกันพบว่าแบบ vertical transmission เป็นหลัก^(5,6) โดยที่ตัวแม่เป็นแหล่งแพร่เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ไปสู่รุ่นลูกทางไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (egg) ในขณะที่ไม่พบการแพร่เชื้อจากเพศผู้ไปสู่รุ่นลูก⁽¹⁶⁾



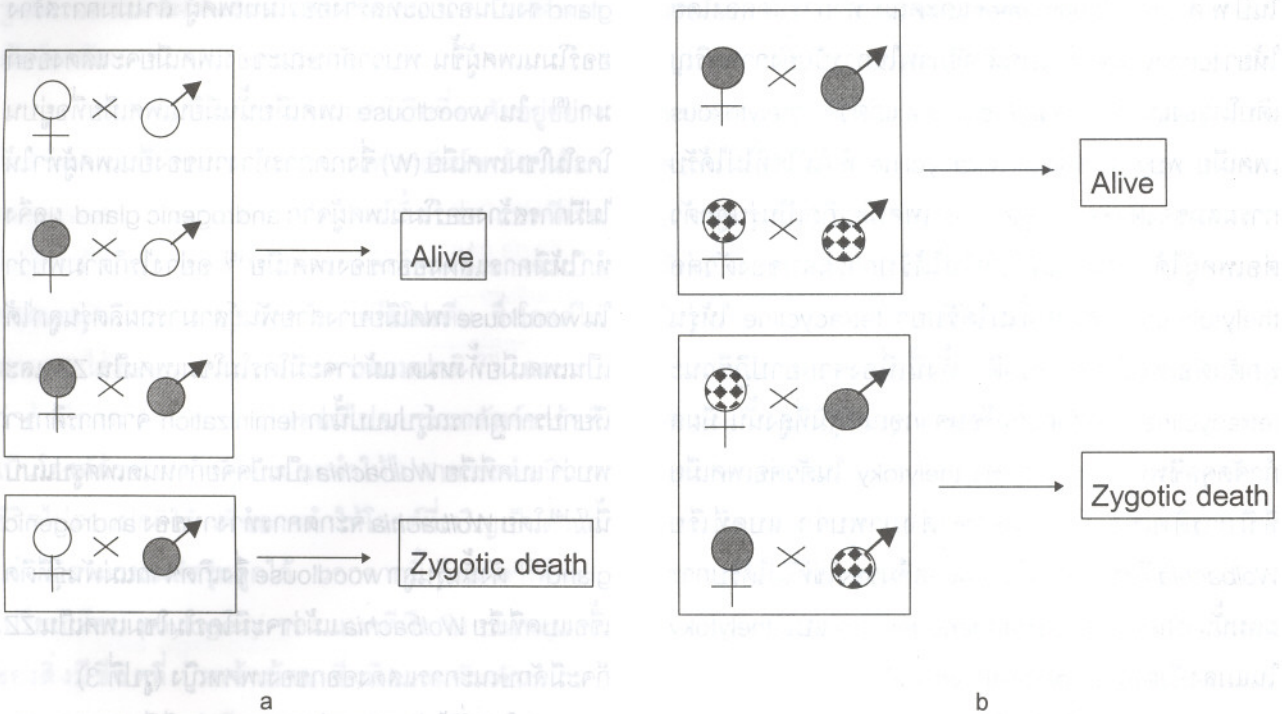
รูปที่ 1. แผนภูมิ phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ 16S rDNA ของแบคทีเรีย Wolbachia ในแมลง แบคทีเรีย Ehrlichia risticii, Anaplasma marginale และ Rickettsia spp. (non-Wolbachia) ซึ่งแบคทีเรียทั้งหมดเป็นสมาชิกในกลุ่ม Alpha Proteobacteria (ดัดแปลงจาก O'Neill et al, 1992)

บทบาทของ Wolbachia ต่อโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อ

แบคทีเรีย Wolbachia อาศัยอยู่อย่างใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์หลากหลายชนิด โดยบทบาทของแบคทีเรีย Wolbachia ที่มีต่อโฮสต์นั้น มีการรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2514 โดย Yen และ Barr ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย Wolbachia เป็นสาเหตุของการเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า cytoplasmic incompatibility⁽¹⁷⁾ ที่พบเมื่อมีการผสมเพศผู้และเพศเมียของยุงบ้าน Culex pipiens ต่างสายพันธุ์กัน (รูปที่ 2) ผลของ cytoplasmic incompatibility ทำให้ตัวอ่อน (zygote) ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตายในที่สุด (zygotic death) จำนวนรุ่นลูกจึงเกิดขึ้นน้อยลงหรือไม่เกิดขึ้นเลย จากการทดลองผสมพันธุ์ยุงบ้าน Cx. pipiens ตัวอย่างเช่น ทำการผสมเพศผู้สายพันธุ์ Hamburg กับเพศเมียสายพันธุ์ Ogglehausen ให้ผล zygotic death (cytoplasmic incompatibility) แต่ถ้าทำการผสมเพศผู้สายพันธุ์ Ogglehausen กับเพศเมียสายพันธุ์ Hamburg ปรากฏว่าเพศเมียออกลูกได้จำนวนตามปกติ (compatibility) จากการศึกษาทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ Hamburg นั้นติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ส่วนสายพันธุ์ Ogglehausen

นั้นไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia โดยสรุปพบว่าปรากฏการณ์ cytoplasmic incompatibility เกิดขึ้นจากการผสมระหว่างเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia กับเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ในทางกลับกัน cytoplasmic incompatibility จะไม่เกิดขึ้นระหว่างการผสมเพศเมียที่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia กับเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia หรือไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ก็ตาม นอกจากนี้พบได้ว่า cytoplasmic incompatibility เกิดขึ้นได้จากการผสมแมลงเพศผู้และเพศเมียที่มีการติดเชื้อ Wolbachai ต่างสายพันธุ์กัน (รูปที่ 2)

กลไกของปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ยังไม่มี การสรุปแน่นอน แต่คาดว่าแบคทีเรียมีกลไกบางอย่างที่มีผลต่อเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia การผสมระหว่างสเปิร์ม (sperm) และไข่ (egg) จนเกิดเป็นตัวอ่อนที่สมบูรณ์ต้องอาศัยกลไกช่วยเหลือของแบคทีเรีย Wolbachia ซึ่งอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ถ้าเพศเมียไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรียก็จะไม่มีกลไกการช่วยเหลือเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ยังผลให้ตัวอ่อนที่ได้จากการผสมไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้



รูปที่ 2. ปรากฏการณ์ cytoplasmic incompatibility (CI) ที่เกิดขึ้นระหว่างการผสมกันของแมลงเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (♀) กับแมลงเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (♂) (a) หรือเกิดขึ้นระหว่างการผสมแมลงเพศเมีย (♀) กับแมลงเพศผู้ (♂) ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์แตกต่างกัน (b) โดยเมื่อเกิด cytoplasmic incompatibility แล้ว เป็นผลให้เกิด zygotic death

จากการสำรวจปรากฏการณ์ cytoplasmic incompatibility ในการผสมเพศผู้สายพันธุ์ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* กับเพศเมียสายพันธุ์ที่ไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ของแมลงหัวชนิดต่าง ๆ (*Drosophila* spp.) เพิ่มเติม พบว่าผลกระทบที่มีต่อจำนวนรุ่นลูกแมลงหัวที่เกิดขึ้นพบได้ตั้งแต่ระดับเล็กน้อย ได้แก่การที่ได้ผลจำนวนรุ่นลูกที่เกิดขึ้นน้อยลงกว่าปกติ จนถึงไม่มีผลกระทบเกิดขึ้น ซึ่งหมายถึงให้ผลจำนวนรุ่นลูกตามปกติเมื่อเทียบกับการผสมแมลงหัวเพศผู้และเพศเมียสายพันธุ์ที่ไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (18,19)

บทบาทและความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย *Wolbachia* กับสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์สามารถพบได้ในรูปแบบอื่น ดังตัวอย่างในแมลงตัวต่อบางจำพวกที่อยู่ใน genus *Trichogramma*, *Aphytis*, *Encarsia*, *Leptopilina*

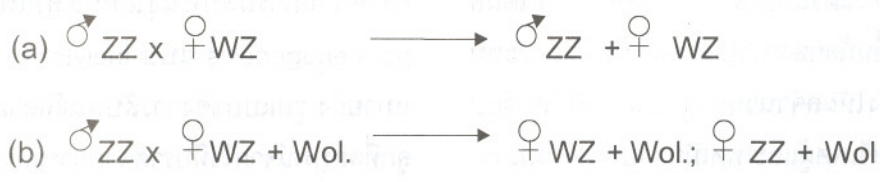
และ *Muscidifurax* (ชื่อสามัญ คือ parasitic wasp) ตามธรรมชาติไซซึ่งไม่ได้รับการผสมจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของตัวต่อที่อยู่ใน genus เหล่านี้ จะเกิดเป็นต่อรุ่นลูกเพศเมียทั้งหมด ส่วนไซที่ได้รับการผสมก็เกิดเป็นตัวต่อรุ่นลูกเพศเมียเช่นกัน ซึ่งเรียกรูปแบบของการสืบพันธุ์โดยปราศจากการผสมพันธุ์แล้วได้ลูกเพศเมียทั้งหมดนี้ว่า parthenogenesis แบบ thelytoky (Parthenogenesis หมายถึง รูปแบบของการสืบพันธุ์ที่สามารถได้สิ่งมีชีวิตรุ่นลูกที่สมบูรณ์จากไซที่ปราศจากการผสมพันธุ์) และเรียกตัวต่อเหล่านี้ว่า thelytokous parasitic wasp แต่อย่างไรก็ตาม ในช่วงฤดูร้อนที่มีอุณหภูมิของอากาศสูงประมาณ 28 องศาเซลเซียสถึงมากกว่า 30 องศาเซลเซียส พบว่าไซที่ไม่ได้รับการผสมจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของตัวต่อ thelytokous เพศเมียที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติเหล่านี้เกิดเป็นตัวต่อเพศผู้ได้ (6)

ในปี พ.ศ. 2533 Stouthamer และคณะ ทำการทดลองโดยให้ยา tetracycline ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวก *Rickettsia* แก่ตัวต่อ thelytokous เพศเมีย พบว่าผลของยา tetracycline ทำให้ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของตัวต่อ thelytokous เพศเมียเกิดเป็นรุ่นลูกตัวต่อเพศผู้ได้ ในขณะที่ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของตัวต่อ thelytokous เพศเมียที่ไม่ได้รับยา tetracycline ให้รุ่นลูกตัวต่อเพศเมียตามปกติ ทั้งนี้เนื่องจากยาปฏิชีวนะ tetracycline รวมทั้งความร้อนจากอุณหภูมิที่สูงนั้น มีผลกำจัดจุลชีพที่เป็นสาเหตุของ thelytoky ในตัวต่อเพศเมียที่มีการติดเชื้อ (20) การศึกษาต่อมาพบว่า แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบภายในไซโตพลาสซึมของไข่ที่ไม่ได้รับการผสมนั้น เป็นสาเหตุของ parthenogenesis แบบ thelytoky ในแมลงตัวต่อพวก parasitic wasp (12)

นอกจากนี้ในสัตว์จำพวก isopod crustaceans เช่น woodlouse เป็นตัวอย่างที่ดีของการอธิบายบทบาทอื่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีต่อโฮสต์ที่อาศัยอยู่ โดยธรรมชาติของสัตว์จำพวกต่าง ๆ ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสองชุด โครโมโซมเพศที่ได้รับมาจากพ่อและแม่เป็นปัจจัยกำหนดการเป็นเพศผู้หรือเพศเมียในรุ่นลูกตามหลักการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดล (Mendelian inheritance) สำหรับใน woodlouse เพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น WZ ส่วนเพศผู้มีโครโมโซมเพศเป็น ZZ โดยโครโมโซมเพศคือ Z มียีนเพศผู้ที่มีผลควบคุมพัฒนาการของ androgenic

gland ซึ่งเป็นอวัยวะที่สร้างฮอร์โมนเพศผู้ ถ้าไม่มีการสร้างฮอร์โมนเพศผู้ขึ้น พบว่าลักษณะของเพศเมียจะแสดงออกมา (6) ใน woodlouse เพศเมียนั้นมียีนเพศเมียที่อยู่บนโครโมโซมเพศเมีย (W) ซึ่งก่อดการทำงานของยีนเพศผู้ทำให้ไม่มีการสร้างฮอร์โมนเพศผู้จาก androgenic gland ผลจึงทำให้มีการแสดงออกของเพศเมีย (6) อย่างไรก็ตามพบว่าใน woodlouse เพศเมียบางสายพันธุ์สามารถผลิตรุ่นลูกได้เป็นเพศเมียทั้งหมด แม้ว่าจะมีโครโมโซมเพศเป็น ZZ และเรียกปรากฏการณ์รูปแบบนี้ว่า feminization จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นปัจจัยกำหนดเพศรูปแบบนี้ (7,14) โดย *Wolbachia* จะก่อดการทำงานของ androgenic gland (21) ดังนั้นรุ่นลูก woodlouse ซึ่งเกิดจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* แม้ว่าจะมีโครโมโซมเพศเป็น ZZ ก็จะมีลักษณะการแสดงออกของเพศหญิง (รูปที่ 3)

โดยทั่วไปบทบาทต่าง ๆ ของแบคทีเรีย *Wolbachia* พบว่าไม่ก่อให้เกิดโทษร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์ที่อาศัยอยู่ อย่างไรก็ตาม ในปี พ.ศ. 2540 Min และ Benzer พบว่า แมลงหวี่สายพันธุ์ที่มีอายุสั้นกว่าปกติ (X-chromosome deficiency strain) มีความสัมพันธ์กับการพบแบคทีเรีย *Wolbachia* บริเวณสมองและเรตินา และลักษณะนี้ยังพบว่าถูกถ่ายทอดมาจากแม่ การทดลองโดยให้ยา tetracycline แก่เพศเมียสายพันธุ์นี้ ซึ่งเป็นผลให้สามารถกำจัดแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้นั้น จะพบว่ารุ่นลูกมีช่วงอายุตามปกติ (22)



รูปที่ 3. แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นปัจจัยกำหนดเพศเมียใน woodlouse ที่เรียกว่า feminization (b) การผสมพันธุ์ระหว่าง woodlouse เพศผู้และเพศเมียที่ไม่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จะได้ผลจำนวนรุ่นลูกเพศผู้ และเพศเมียตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดล (a) ส่วน woodlouse เพศเมียสายพันธุ์ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (Wol.) เมื่อผสมกับเพศผู้จะได้ผลรุ่นลูกที่แสดงลักษณะของเพศเมียทั้งหมด แม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมของเพศผู้ก็ตาม (b)

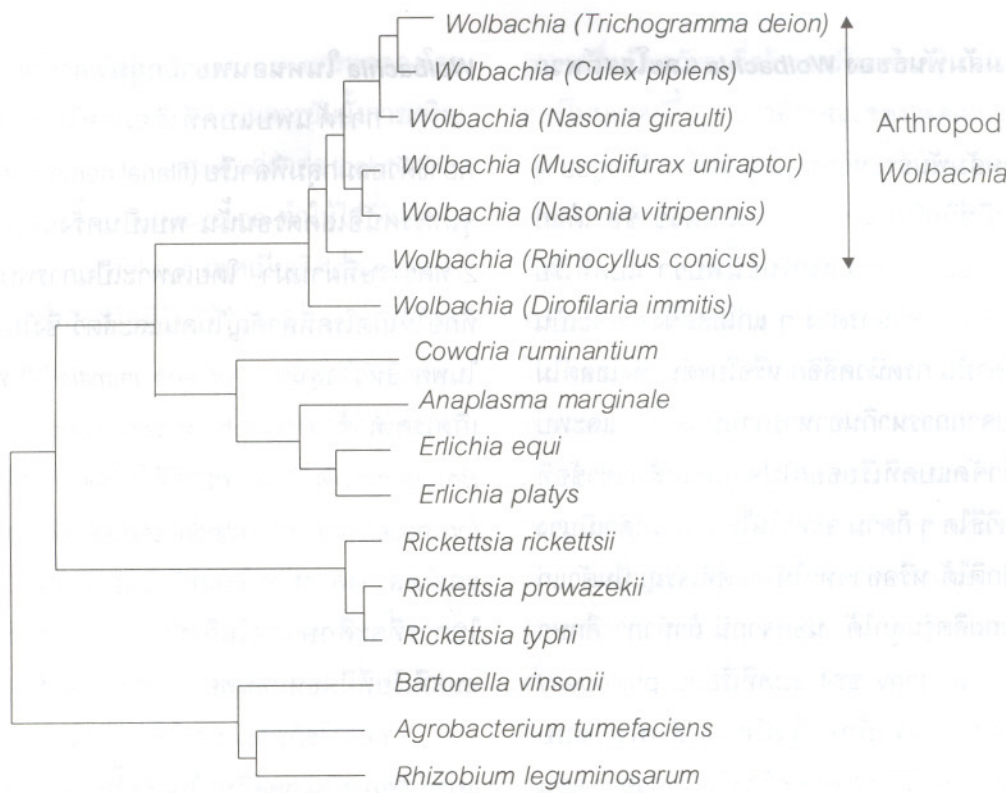
รูปแบบความสัมพันธ์ของ *Wolbachia* และโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อ

ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้านพวกสัตว์ขาข้อ ได้แก่ mutualism รูปแบบความสัมพันธ์นี้พบว่า แบคทีเรียจะทำหน้าที่สร้างสารอาหารต่าง ๆ แก่โฮสต์ซึ่งอาจจะเป็นกรดอะมิโน วิตามิน กรดนิวคลีอิก หรือโปรตีน ซึ่งโฮสต์ไม่สามารถได้รับจากการหาอาหารตามปกติ⁽²³⁾ และพบว่าถ้ามีการกำจัดแบคทีเรียออกไปจากพวกสัตว์ขาข้อที่เป็นโฮสต์ด้วยวิธีใด ๆ ก็ตาม จะทำให้ไม่สามารถดำเนินวงจรชีวิตไปตามปกติได้ หรืออาจทำให้โฮสต์ที่เจริญเป็นตัวแก่แล้วไม่สามารถผลิตรุ่นลูกได้ นอกจากนี้ ถ้าทำการศึกษาเปรียบเทียบ phylogeny ของ แบคทีเรียกับ phylogeny ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้าน ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบ mutualism จะพบว่ามีความสอดคล้องกัน⁽⁶⁾ ตัวอย่างเช่น ถ้าทำการศึกษาทาง phylogeny โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่พบในโฮสต์ต่าง order กัน ก็จะพบความแตกต่างของลำดับยีน 16S rDNA มากกว่าความแตกต่างของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่พบในโฮสต์ต่าง class กัน ความสอดคล้องกันทาง phylogeny ระหว่างแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างกันที่มีมายาวนาน รวมถึงรูปแบบของการถ่ายทอดแบคทีเรียผ่านทางพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูก (vertical transmission)⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อไม่ได้ถูกจัดเป็น mutualistic symbionts ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์แบบ mutualism กับโฮสต์ที่อาศัยอยู่⁽²³⁾ แต่ถูกจัดเป็น reproductive symbionts ที่มีความสัมพันธ์แบบ parasitism กับโฮสต์⁽⁶⁾ เนื่องจากแบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นสาเหตุของปรากฏการณ์ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, และ feminization โดยปรากฏการณ์เหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแบบแผนการสืบพันธุ์ของโฮสต์เพื่อประโยชน์ต่อการแพร่พันธุ์ของแบคทีเรียเอง^(6,23)

Wolbachia ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย

การค้นพบแบคทีเรียภายในเซลล์ของหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรีย (filarial nematodes) โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้น พบเป็นครั้งแรกเป็นเวลากว่า 2 ทศวรรษที่ผ่านมา โดยเฉพาะเป็นการพบใน species ที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญในคนและสัตว์ ซึ่งในระยะแรกพบในพยาธิหัวใจสุนัข *Dirofilaria immitis*⁽²⁴⁾ พยาธิที่ก่อให้เกิดโรคเท้าช้าง (elephantiasis, lymphatic filariasis) *Brugia malayi*⁽⁹⁾ และพยาธิที่ทำให้ตาบอดได้ในทวีปแอฟริกา (onchocerciasis, river blindness) *Onchocerca volvulus*⁽¹⁰⁾ และได้สร้างความสนใจแก่นักวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก ในการที่จะศึกษาต่อไปถึงบทบาทและความสำคัญของแบคทีเรียที่มีต่อหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มนี้

อย่างไรก็ตาม การให้ความสำคัญต่อการศึกษาแบคทีเรียภายในเซลล์ที่พบในครั้งนั้น ได้เริ่มจริงจังและเป็นรูปธรรมเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา โดยในปี พ.ศ. 2538 มีรายงานของ Sironi และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษา phylogeny ของยีน 16S rDNA ในแบคทีเรียที่พบในหนอนพยาธิ *D. immitis* เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในสัตว์ขาข้อชนิดต่าง ๆ และแบคทีเรียภายในเซลล์ที่อยู่ใน genus *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* และ *Coxiella* ซึ่งเป็น genus ของแบคทีเรียที่อยู่ใน order *Rickettsiales* นั้นพบว่าแบคทีเรียภายในเซลล์ที่พบในหนอนพยาธิตัวกลมฟิลาเรียนั้น เป็นแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในสัตว์ขาข้อ⁽²⁵⁾ (รูปที่ 4) จากการศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* ในอดีตที่ผ่านมา นั้น พบเฉพาะในพวกสัตว์ขาข้อเท่านั้น ดังนั้นการค้นพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรียจึงเป็นการพบโฮสต์อื่นกลุ่มแรกที่นอกเหนือจากโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อ การศึกษาถึงบทบาทและความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อกับแบคทีเรีย *Wolbachia* อย่างกว้างขวางมาเกือบ 80 ปีแล้วนั้น ทำให้สามารถนำความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางการศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิฟิลาเรียได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 4. แผนภูมิ phylogenetic tree จากการวิเคราะห์หีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย Wolbachia ในแมลง (arthropod Wolbachia) และในหนอนพยาธิหัวใจสุนัข D. immitis ของแบคทีเรียใน order Rickettsiales และแบคทีเรียในกลุ่ม Alpha Proteobacteria อื่น ๆ

รายงานการค้นพบแบคทีเรีย Wolbachia ใน หนอนพยาธิฟิลาเรียชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 2) พบว่าหนอนพยาธิฟิลาเรียหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในคนนั้น มีการติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ที่สำคัญได้แก่ หนอนพยาธิที่ก่อให้เกิดโรคเท้าช้าง *W. bancrofti* ^(26,27) และ *B. malayi* ^(9,26,27) ซึ่งเป็นโรคที่พบได้ในประเทศไทย ⁽²⁸⁻³⁰⁾ และหนอนพยาธิ *O. volvulus* ^(10,31) ที่ก่อให้เกิดโรค onchocerciasis หรือ river blindness ในประเทศแถบทวีปอาฟริกา เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรีย Wolbachia ได้ในหนอนพยาธิฟิลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสุนัขและแมว คือ *D.immitis* ^(24-26,31) ส่วน หนอนพยาธิฟิลาเรียชนิดอื่น ๆ ที่พบแบคทีเรีย Wolbachia ได้แก่ *Litomosoides sigmodontis*, ^(26,32,33) *B.pahangi* ^(24,26,27,34) และ *O. gibsoni* ^(26,31,35) เป็นต้น ซึ่งหนอนพยาธิฟิลาเรียเหล่านี้พบเป็นปรสิตในสัตว์จำพวกหนู แมว และสัตว์ใหญ่ จำพวกวัวและกระบือตามลำดับ หนอนพยาธิฟิลาเรีย

ชนิดต่าง ๆ ที่มีการสำรวจแล้วนั้น ส่วนมากมีการติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ยกเว้นหนอนพยาธิฟิลาเรีย *Acanthocheilonema viteae* และ *O. flexuosa* ซึ่งเป็นปรสิตในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ไม่พบว่ามี การติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ^(24,26,31,36)

วิธีการศึกษา Wolbachia

การศึกษาแบคทีเรีย Wolbachia ในหนอนพยาธิฟิลาเรียในระยะแรกอาศัยอุปกรณ์หลักคือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาแบคทีเรีย Wolbachia ตั้งแต่เริ่มแรกจนถึงปัจจุบัน นอกจากนี้ยังอาศัยเทคนิคทาง immunohistology โดยทำการย้อมชิ้นเนื้อพยาธิด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ catalase ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย Wolbachia ⁽³¹⁾ หรือใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ชื่อว่า heat shock protein 60

ตารางที่ 2. รายชื่อ genus species ของหนอนพยาธิในกลุ่มฟิลาเรียที่มีการศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* โดย EM (Electron microscope; การศึกษาพบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน) IM (การศึกษาพบด้วยวิธี immunohistology) และ PCR (Polymerase Chain Reaction; การศึกษาพบด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และวิธี sequencing) สัญลักษณ์ + หมายถึง พบแบคทีเรีย *Wolbachia* สัญลักษณ์ – หมายถึง ไม่พบแบคทีเรีย *Wolbachia* และ ND หมายถึงไม่ได้ทำการศึกษา (Taylor et al, 1999)

Species	EM	IM	PCR
<i>Acanthocheilonema viteae</i>	-	ND	-
<i>Brugia malayi</i>	+	ND	+
<i>B. pahangi</i>	+	ND	+
<i>Dipetalonema setariosum</i>	-	ND	ND
<i>Dirofilaria immitis</i>	+	+	+
<i>D. repens</i>	+	ND	+
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	+/-	+	+
<i>Loa loa</i>	-	ND	ND
<i>Mansonella ozzardi</i>	+	ND	ND
<i>Onchocerca armillata</i>	ND	+	ND
<i>O. fasciata</i>	+	+	ND
<i>O. flexuosa</i>	-	-	ND
<i>O. gibsoni</i>	+	+	+
<i>O. gutturosa</i>	ND	+	+
<i>O. jakutensis</i>	+	+	ND
<i>O. lienalis</i>	ND	ND	+
<i>O. ochengi</i>	+	+	+
<i>O. tarsicola</i>	ND	+	ND
<i>O. volvulus</i>	+	+	+
<i>Wuchereria bancrofti</i>	+	ND	+

(hsp60) ^(31,32) วิธีการศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและ immunohistology นั้น มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาตำแหน่งที่อยู่ของแบคทีเรียที่อยู่ในตัวหนอนพยาธิฟิลาเรีย ต่อมาได้มีการศึกษาถึงสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ซึ่งก่อให้เกิดความก้าวหน้าอย่างมากในการศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ในการเพิ่มจำนวน

ของยีน เช่น 16S rDNA (ยีนที่สร้างสารพันธุกรรม ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไรโบโซม) หรือ *ftsZ* (ยีนที่สร้างโปรตีนที่ใช้ในการแบ่งตัวของแบคทีเรีย) ⁽²⁵⁻²⁷⁾ ได้เอื้ออำนวยความสะดวกต่อการตรวจหาแบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิฟิลาเรียชนิดต่าง ๆ อย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูงและเหมาะกับการศึกษาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์ การศึกษาลำดับเบสด้วยวิธีการ sequencing technique จากยีนที่ได้ ทำให้ได้ข้อมูลสำหรับการศึกษาทาง phylogeny ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ต่อไป

การอาศัยอยู่ของ *Wolbachia* ในโฮสต์หนอนพยาธิกลุ่ม ฟิลาเรีย

ในวงจรชีวิตของหนอนพยาธิฟิลาเรีย เมื่อแมลงได้
รับระยะไมโครฟิลาเรีย (microfilaria) จะมีการพัฒนาการ
ของไมโครฟิลาเรียไปสู่ตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 ตาม
ลำดับ โดยเกิดขึ้นในแมลงพาหะชนิดต่าง ๆ ที่สามารถดูด
เลือดได้ (ตัวอย่างเช่น ยุงจะเป็นพาหะของพยาธิโรคเท้าช้าง)
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเป็น definitive hosts ของพยาธิใน
กลุ่มฟิลาเรีย โดยเมื่อโฮสต์เหล่านี้ถูกแมลงดูดเลือดที่มี
เชื้อระยะติดต่อดำรง (ตัวอ่อนระยะที่ 3) กัด ตัวอ่อนจากแมลง
จะเข้าไปในโฮสต์และเจริญเป็นพยาธิตัวแก่ (adult) ต่อไป
หลังจากที่พยาธิตัวแก่เพศเมียผสมพันธุ์กับตัวแก่เพศผู้
จะออกลูกออกมาเรียกว่า ไมโครฟิลาเรีย จากการศึกษา
ขึ้นเนื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียระยะต่าง ๆ ภายใต้อกล้อง
จุลทรรศน์อิเล็กตรอนและการศึกษาทาง immunohistology
พบว่าสามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิ
ฟิลาเรียได้ทุกระยะของวงจรชีวิต⁽⁸⁾ โดยที่พบมากในพยาธิ
ตัวแก่เพศเมีย แบคทีเรีย *Wolbachia* พบได้ในพยาธิตัวแก่
ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ hypodermal cells โดยเฉพาะบริเวณ
ของ lateral cords (รูปที่ 5A)^(8,10,24,31) สำหรับในหนอนพยาธิ
ตัวแก่เพศเมียยังพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ที่ระบบอวัยวะ
สืบพันธุ์ ซึ่งพบอยู่ในเซลล์ oogonia, oocyte และเซลล์ที่
อยู่รอบท่อไข่ (cell layer surrounding the oviduct)
(รูปที่ 5B) นอกจากนี้ภายในมดลูก (uterus) พบว่า มี
แบคทีเรีย *Wolbachia* อยู่ในเซลล์หนอนพยาธิระยะ
embryo ที่กำลังเจริญเติบโต (รูปที่ 5C) รวมทั้งไมโคร
ฟิลาเรียที่พบในกระแสเลือดของโฮสต์^(8,10,24) แบคทีเรีย
Wolbachia ยังพบได้ในหนอนพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 1, 2
และ 3 ที่อยู่ในโฮสต์พวกแมลง^(10,24) อย่างไรก็ตาม จากการ
ศึกษาไม่พบแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ระบบอวัยวะสืบพันธุ์
ของเพศผู้ (testes) ระบบทางเดินอาหาร (esophagus และ
intestine) เยื่อบุผิว (epithelium cells) ชั้นเซลล์ที่บุผนังมดลูก
และรังไข่ ส่วนผิวนอกสุดของพยาธิ (cuticle) เซลล์ประสาท
(nerve cells) และเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cells)^(8,10,31)

แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในเซลล์ของหนอน

พยาธิฟิลาเรียตัวอ่อนระยะต่าง ๆ และตัวแก่ อาจมีรูปร่าง
กลมรี (spherical หรือ ovoid) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง
ประมาณ 0.3 ถึง 0.5 ไมโครเมตร หรือมีรูปร่างเป็นแท่งขนาด
ยาวประมาณ 1.5 ไมโครเมตร แต่พบว่าอาจมีขนาดยาว
ที่สุดถึง 4.5 ไมโครเมตรได้ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางกว้าง
ประมาณ 0.7 ไมโครเมตร^(10,24) โดยแบคทีเรีย *Wolbachia*
อาศัยอยู่ในเซลล์ของโฮสต์บริเวณไซโตพลาสซึมซึ่งเยื่อ
หุ้มเซลล์ของ *Wolbachia* ประกอบด้วย 3 ชั้น โดยชั้นนอก
สุดได้มาจากเซลล์ของโฮสต์ ส่วนชั้นในและชั้นกลางเป็น
เยื่อหุ้มเซลล์ 2 ชั้นที่สร้างโดยแบคทีเรียเอง^(8,10,24) ในแต่
ละเซลล์ของโฮสต์นั้น สามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มี
จำนวนตั้งแต่ 1 เซลล์จนถึงประมาณ 15 เซลล์ และโดย
ทั่วไปมักพบแบคทีเรีย *Wolbachia* จำนวนมากในเซลล์ของ
หนอนพยาธิระยะ embryo ซึ่งกำลังเจริญเติบโต⁽²⁴⁾ นอก
จากนี้ยังพบว่า *Wolbachia* มีการแบ่งตัวแบบ binary
fission (รูปที่ 5D) ซึ่งเหมือนกับการแบ่งตัวของแบคทีเรีย
โดยทั่วไปได้

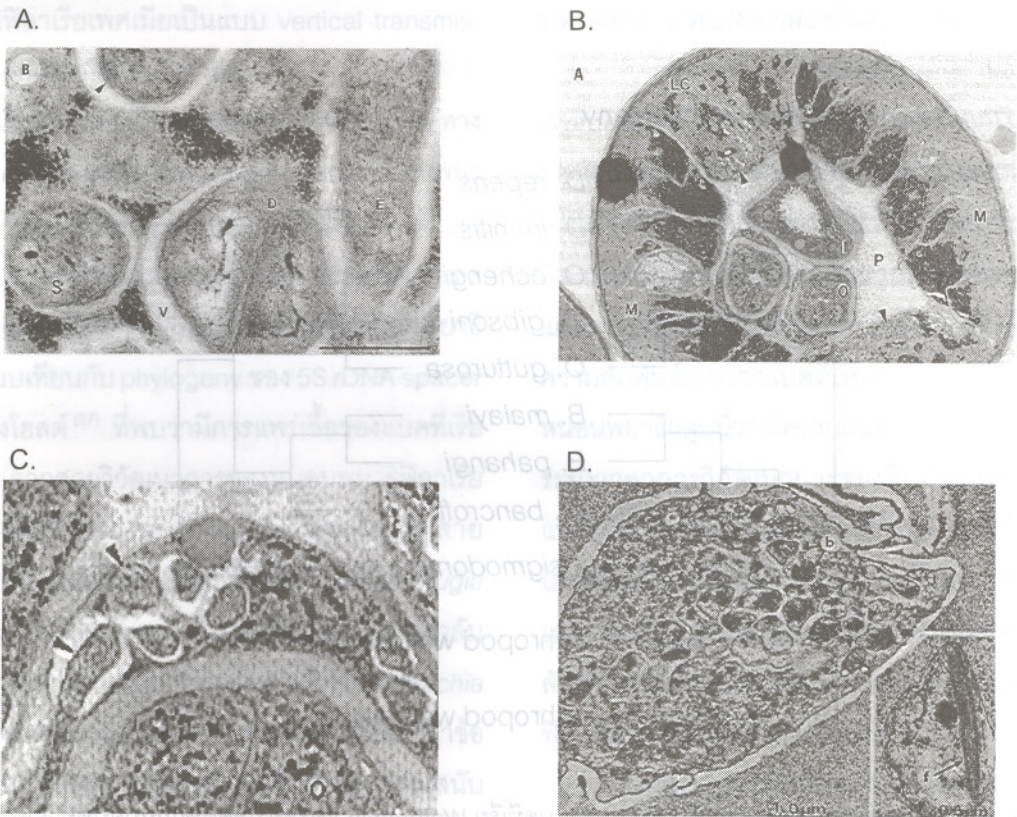
Phylogeny ของ *Wolbachia* ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย

จากการศึกษา phylogenetic tree ของยีน 16S
rDNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิ
ฟิลาเรีย *D. immitis* ครั้งแรกนั้น ทำให้สันนิษฐานว่า
แบคทีเรียที่พบในหนอนพยาธิในกลุ่มฟิลาเรียอื่น ๆ น่าจะ
เป็นกลุ่มเดียวกันกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในพวก
สัตว์ขาข้อ ทั้งนี้ ได้มีการศึกษาทาง phylogeny ของ
แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรียชนิด
อื่น ๆ เพิ่มเติม^(26,27) ซึ่งจากการศึกษาทาง phylogeny โดย
การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย
ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรียต่าง ๆ 9 species ได้แก่ *D.*
immitis, *D. repens*, *B. malayi*, *B. pahangi*, *L.*
sigmodontis, *O. ochengi*, *O. gipsoni*, *O. gutturosa*
และ *W. bancrofti* เปรียบเทียบกับลำดับของยีน 16S
rDNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในสัตว์ขาข้อ
และแบคทีเรียที่อยู่ใน genus ต่าง ๆ ในกลุ่ม Alpha
Proteobacteria ตลอดจนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวแทนของ

กลุ่ม Beta, Gamma Proteobacteria และแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของกลุ่มหลักอื่นๆ ของ Eubacteria ทั้งหมดที่นอกเหนือจากกลุ่ม Proteobacteria พบว่าแบคทีเรียที่พบในหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่มฟิลาเรียข้างต้นนั้น เป็นกลุ่มเดียวกัน (monophyletic cluster) กับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในสัตว์ขาข้อทั้งหลาย⁽²⁶⁾ แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในพวกสัตว์ขาข้อและหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียนั้น จากการศึกษาด้าน phylogenetic tree โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA และยีน *ftsZ* พบว่าสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก คือ กลุ่ม A, B, C และ D โดยที่กลุ่มย่อย A และ B เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อ ส่วนกลุ่มย่อย C และ D เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในโฮสต์พวกหนอนพยาธิ

ฟิลาเรีย⁽²⁶⁾ ซึ่งแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรีย 9 species ข้างต้น แบ่งได้เป็นกลุ่ม C และกลุ่ม D ดังนี้ กลุ่ม C ได้แก่ แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรีย *D. immitis*, *D. repens*, *O. ochengi*, *O. gipsoni* และ *O. gutturosa* กลุ่ม D ได้แก่ แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรีย *B. malayi*, *B. pahangi*, *W. bancrofti* และ *L. sigmodontis* (รูปที่ 6)

นอกจากนี้การศึกษาโดยเปรียบเทียบ phylogenetic tree ของยีน 16S rDNA และยีน *ftsZ* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรียกับ phylogenetic tree ของ 5S rDNA spacer regions ของโฮสต์พวกหนอนพยาธิฟิลาเรีย⁽³⁷⁾ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย *Wolbachia* กับโฮสต์พวกหนอนพยาธิกลุ่ม

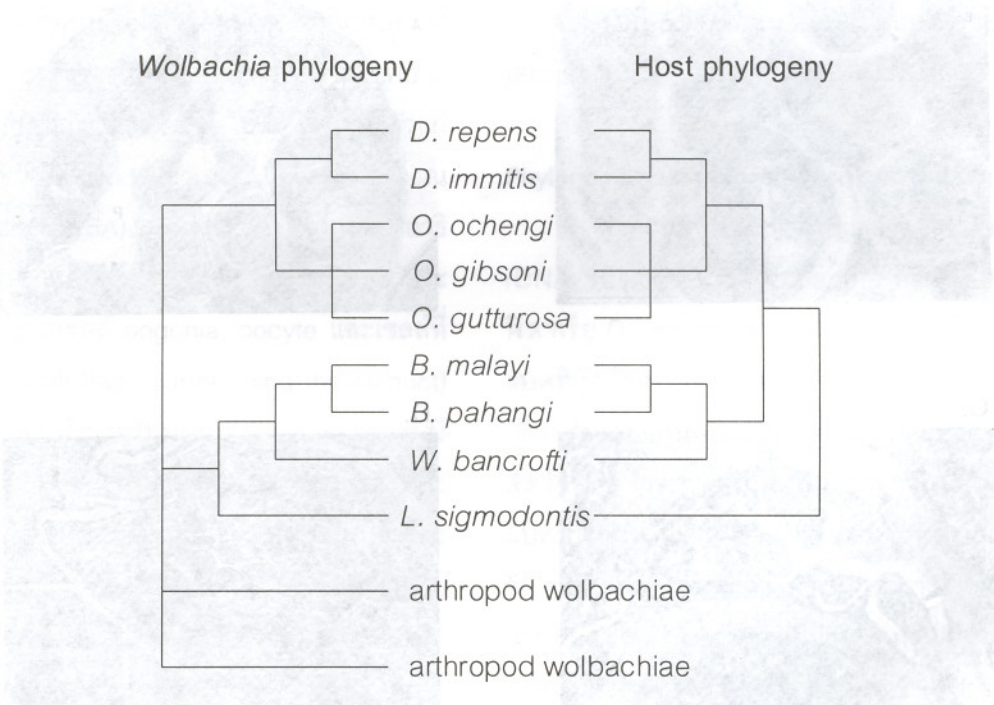


รูปที่ 5. แบคทีเรีย *Wolbachia* จากตัวอย่างชิ้นเนื้อหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบคทีเรียมีการแบ่งตัวแบบ binary fission (A) ภาพตัดขวางชิ้นเนื้อหนอนพยาธิ *B. malayi* แสดงที่อยู่ของแบคทีเรียบริเวณ lateral cords (B) และบริเวณรอบท่อลำไส้ (C) แบคทีเรียภายในไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว (fertilized egg) จากตัวอย่างหนอนพยาธิ *D. immitis* เพศเมีย (D)

ฟิลาเรียนั้น พบว่า phylogenetic tree ของทั้งแบคทีเรียและของโฮสต์มีความสอดคล้องระหว่างกัน⁽²⁶⁾ (รูปที่ 6) ซึ่งต่างจากที่พบในโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อ ตัวอย่างเช่น ผลของ phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรีย genus *Dirofilaria* มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรีย genus *Onchocerca* มากกว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรีย genus อื่นเช่น genus *Brugia* และ *Wuchereria* และเมื่อวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ 5S rDNA spacer regions ในโฮสต์หนอนพยาธิฟิลาเรียตาม Xie และคณะ⁽³⁷⁾ ก็พบว่า หนอนพยาธิฟิลาเรียใน genus *Dirofilaria* มีความใกล้เคียงกับหนอนพยาธิฟิลาเรียใน genus *Onchocerca* มากกว่าหนอนพยาธิฟิลาเรียใน genus อื่นเช่นกัน

การถ่ายทอดแบบ Vertical transmission

การแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียพบว่า มีการแพร่เชื้อแบคทีเรียจากตัวแม่ไปสู่รุ่นลูก (vertical transmission) เป็นหลัก โดยอาศัยการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียผ่านทางไซโตพลาสซึมของไข่^(9,27) ซึ่งเหมือนกับการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบภายในแมลง species ต่าง ๆ ทั้งนี้จากการศึกษาชิ้นเนื้อของหนอนพยาธิฟิลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและด้วยเทคนิค immunohistology พบว่าสามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ตลอดจนสามารถตรวจพบ *Wolbachia* ได้ในตัวอ่อนระยะ embryo ที่กำลังเจริญเติบโต แต่จะไม่สามารถพบแบคทีเรียได้ในบริเวณระบบสืบพันธุ์ของเพศผู้ดังกล่าวแล้วนั้น นอกจากนี้ Taylor และคณะ



รูปที่ 6. การเปรียบเทียบ phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Wolbachia* และของโฮสต์พวกหนอนพยาธิฟิลาเรีย โดย phylogenetic tree ของโฮสต์ (host phylogeny) ได้มาจากการวิเคราะห์ 5S rDNA spacer regions (Xie et al, 1994) ส่วน phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Wolbachia* (symbiont phylogeny) ได้มาจากการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA และยีน *ftsZ* กลุ่ม A, B, C และ D เป็นกลุ่มย่อยของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อและหนอนพยาธิฟิลาเรีย ซึ่งได้จากการศึกษา phylogeny ของยีน 16S rDNA และยีน *ftsZ* ของแบคทีเรีย (Bandi et al, 1998) (จาก Bandi et al, 1998)

ได้ทำการทดลองผสมพันธุ์หนอนพยาธิฟิลาเรียตัวแก่ *B. malayi* เพศผู้กับหนอนพยาธิฟิลาเรียตัวแก่ *B. pahangi* เพศเมีย ซึ่งได้มีการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อยู่ในโฮสต์ทั้งสอง species แล้วพบว่ามีความแตกต่างของยีน 16S rDNA จึงนำมาใช้ติดตามศึกษาการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* จากตัวอย่างไมโครฟิลาเรียรุ่นลูกที่มาจากหนอนพยาธิฟิลาเรียเพศผู้หรือเพศเมีย โดยการทดลองได้ใช้พยาธิตัวแก่เพศเมียของ *B. pahangi* ผสมพันธุ์กับพยาธิตัวแก่เพศผู้ของ *B. malayi* เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในไมโครฟิลาเรียรุ่นลูกพบว่า มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในตัวแก่ตัวเมีย *B. pahangi* ทุกประการ จึงสรุปได้ว่าการแพร่ของ *Wolbachia* จากหนอนพยาธิฟิลาเรียเพศเมียเป็นแบบ vertical transmission ไปสู่หนอนพยาธิฟิลาเรียรุ่นลูก⁽²⁷⁾

สำหรับการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ทาง horizontal transmission ระหว่าง genus ของหนอนพยาธิฟิลาเรียนั้น พบว่ามีหลักฐานที่แสดงความเป็นไปได้ โดยผลจากการวิเคราะห์ phylogeny ของยีน 16S rDNA และยีน *ftsZ* ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรียเปรียบเทียบกับ phylogeny ของ 5S rDNA spacer regions ของโฮสต์⁽³⁷⁾ ที่พบว่ามีการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* จากสายวิวัฒนาการของหนอนพยาธิฟิลาเรีย *Litomosoides* (*Litomosoides* lineage) ไปสู่สายวิวัฒนาการของหนอนพยาธิฟิลาเรีย *Wuchereria-Brugia* (*Wuchereria-Brugia* lineage) หรือเกิดขึ้นได้ในทางกลับกัน⁽²⁶⁾ (รูปที่ 6) ส่วนการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ทาง horizontal transmission ระหว่างโฮสต์พวกสัตว์ขาข้อกับโฮสต์พวกหนอนพยาธิฟิลาเรียนั้นไม่พบหลักฐานสนับสนุนเหตุการณ์ดังกล่าว โดยที่วงชีวิตของหนอนพยาธิฟิลาเรียต้องอาศัยโฮสต์พวกแมลงเพื่อการพัฒนาการ อีกทั้งหนอนพยาธิฟิลาเรียและสัตว์จำพวกแมลงต่างก็เป็นโฮสต์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ตามธรรมชาติ จึงทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า มีความเป็นไปได้หรือไม่ที่แบคทีเรีย

Wolbachia จะมีการแพร่เชื้อจากโฮสต์จำพวกแมลงไปยังหนอนพยาธิฟิลาเรีย หรือแพร่เชื้อจากหนอนพยาธิฟิลาเรียไปยังโฮสต์จำพวกแมลง อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาทาง phylogeny ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในโฮสต์พวกหนอนพยาธิฟิลาเรียและของสัตว์ขาข้อจำพวกต่าง ๆ นั้น ทำให้แบ่งแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้เป็นกลุ่มย่อย A และ B ที่เป็นกลุ่มของ *Wolbachia* ที่พบในสัตว์ขาข้อ และกลุ่มย่อย C และ D ที่เป็นกลุ่มของ *Wolbachia* ที่พบในหนอนพยาธิฟิลาเรีย ดังนั้น แบคทีเรีย *Wolbachia* ที่พบในโฮสต์ทั้งสองพวกนั้น จึงมีความแตกต่างของพันธุกรรมระดับหนึ่ง ทั้งนี้จึงยังไม่มีข้อมูลสนับสนุนการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ทาง horizontal transmission ระหว่างโฮสต์จำพวกแมลงและหนอนพยาธิฟิลาเรีย⁽²⁶⁾

บทบาทของ *Wolbachia* ต่อหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย

จากการศึกษา phylogeny ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งพบว่ามีความสอดคล้องกับ phylogeny ของโฮสต์พวกหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย และการที่สามารถพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ทั่วไปในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรีย รวมทั้งพบได้ในทุกสายพันธุ์ของพยาธิฟิลาเรียแต่ละ species ที่ได้มีการศึกษานั้น เป็นการสนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย *Wolbachia* และโฮสต์พวกหนอนพยาธิกลุ่มนี้ว่า มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดตลอดระยะเวลาการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั้งสอง⁽⁴⁾ โดยแบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยการถ่ายทอดเชื้อไปสู่รุ่นลูกของโฮสต์แบบ vertical transmission เป็นหลัก ข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้ เป็นมูลเหตุจูงใจต่อการตั้งสมมติฐานว่า ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย *Wolbachia* และหนอนพยาธิฟิลาเรียนั้นเป็นแบบ mutualism

การศึกษารูปแบบความสัมพันธ์และบทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีต่อโฮสต์หนอนพยาธิฟิลาเรียนั้น ได้มีการทดลองพิสูจน์โดย Hoerauf และคณะ ซึ่งสนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างกันว่าเป็นแบบ mutualism⁽³²⁾ การทดลองทำโดยให้ยาปฏิชีวนะ tetracycline แก่หนูทดลอง BALB/C mice ก่อนให้การติดเชื้อพยาธิ *Litomosoides*

sigmodontis โดยอาศัยตัวไรเป็นพาหะนำพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อหรือระยะที่ 3 และให้ยา tetracycline แก่หนูทดลองจนกระทั่งครบเวลาของการพัฒนาการพยาธิ *L. sigmodontis* จากตัวอ่อนระยะที่ 3 ไปเป็นระยะตัวแก่ นั้น พบว่าผลจากการดูชิ้นเนื้อพยาธิ *L. sigmodontis* ระยะ ตัวแก่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และด้วยวิธี immunohistology ซึ่งย้อมชิ้นเนื้อพยาธิด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน hsp60 นั้น ไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ ในขณะที่สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนอนพยาธิ *L. sigmodontis* ระยะตัวแก่ตามปกติ ซึ่งได้จากหนูทดลองกลุ่มที่ติดเชื้อและไม่ได้รับยา tetracycline (หนูทดลองกลุ่มควบคุม) ประสิทธิภาพของยา tetracycline ที่มีผลกำจัดแบคทีเรีย *Wolbachia* ในหนูทดลองกลุ่มที่ติดเชื้อ *L. sigmodontis* นั้น พบว่ามีความสอดคล้องกับผลในการยับยั้งพัฒนาการของพยาธิระยะที่ 3 ไปเป็นพยาธิระยะตัวแก่ด้วย ซึ่งสรุปผลการทดลองจากค่าเฉลี่ยจำนวนพยาธิ *L. sigmodontis* ที่ติดเชื้อในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา tetracycline โดยพบว่า มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนพยาธิที่ติดเชื้อในหนูทดลองกลุ่มควบคุม รวมทั้งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพยาธิด้วย โดยพบว่าพยาธิ *L. sigmodontis* ระยะตัวแก่ที่ติดเชื้อในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา tetracycline นั้น มีขนาดความยาวของลำตัวที่สั้นผิดปกติ

การทดลองนี้ยังพบด้วยว่า ยา tetracycline มีผลยับยั้งการออกลูกไมโครฟิลาเรียของพยาธิตัวแก่เพศเมีย ซึ่งแสดงผลจากการที่ไม่สามารถพบไมโครฟิลาเรียออกมาในกระแสเลือดของหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับยา tetracycline ผลของยาปฏิชีวนะที่มีต่อการแพร่พันธุ์นี้ คาดว่ามีผลยับยั้งในระยะ embryogenesis มากกว่ามีผลต่อไมโครฟิลาเรียโดยตรง เนื่องจากผลการศึกษาชิ้นเนื้อพยาธิเพศเมียพบว่า ไม่พบตัวอ่อนระยะ embryo ร่วมกับการไม่พบแบคทีเรีย *Wolbachia* ภายในมดลูกด้วย นอกจากนี้ ยาปฏิชีวนะที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียใน genus *Rickettsia* ได้แก่ penicillin, gentamicin และ ciprofloxacin ซึ่งให้แก่หนูทดลองที่ติดเชื้อพยาธิ *L. sigmodontis* นั้น

พบว่ายาปฏิชีวนะดังกล่าวไม่มีผลในการยับยั้งพัฒนาการและการแพร่พันธุ์ของหนอนพยาธิ *L. sigmodontis* นอกเหนือจากการศึกษาผลของยา tetracycline ที่มีต่อหนอนพยาธิ *L. sigmodontis* ⁽³²⁾ นั้น ได้มีการศึกษาผลของยา tetracycline ที่มีประสิทธิภาพกำจัดแบคทีเรีย *Wolbachia* สอดคล้องกับผลในการยับยั้งระยะ embryogenesis ของหนอนพยาธิ *B. pahangi* ⁽³⁴⁾ และพยาธิ *D. immitis* ^(34,38) ด้วย

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองของยา tetracycline ที่มีต่อหนอนพยาธิ *L. sigmodontis* เนื่องมาจากผลของยาในการกำจัดแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้น มีความเป็นไปได้ว่า ยาปฏิชีวนะ tetracycline นั้น มีผลทั้งต่อแบคทีเรีย *Wolbachia* และต่อหนอนพยาธิฟิลาเรียโดยตรงอย่างไรก็ตาม การทดลองให้ยา tetracycline แก่สัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพยาธิ *A. viteae* ซึ่งเป็นหนอนพยาธิฟิลาเรียที่มีการรายงานแล้วว่า ไม่พบแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้น พบว่ายา tetracycline ไม่มีผลยับยั้งการพัฒนาการของพยาธิ *A. viteae* ตัวอ่อนระยะที่ 3 ไปเป็นพยาธิระยะตัวแก่ ⁽³²⁾ การกำจัดแบคทีเรีย *Wolbachia* ออกจากโฮสต์หนอนพยาธิฟิลาเรีย ส่งผลกระทบต่อการดำเนินวงจรชีวิตของหนอนพยาธิตามปกติ โดยแบคทีเรีย *Wolbachia* มีบทบาทต่อการพัฒนาการ และการแพร่พันธุ์ของพยาธิฟิลาเรียนั้น เป็นการสนับสนุนสมมุติฐานความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย *Wolbachia* และโฮสต์หนอนพยาธิฟิลาเรียว่าเป็นแบบ mutualism อย่างไรก็ดี ความรู้ทางชีววิทยาพื้นฐานถึงกลไกของความสัมพันธ์ระหว่างกันนี้ ยังไม่ได้มีการศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* มีประโยชน์เอื้ออำนวยสารใด หรือมีความจำเป็นต่อเมตาบอลิซึมใดของหนอนพยาธิฟิลาเรีย จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาต่อไป โดยนักวิทยาศาสตร์คาดว่า การศึกษาในโมเดลของแบคทีเรีย *Wolbachia* จะเป็นพื้นฐานในการตอบคำถามเหล่านี้ได้ดี

***Wolbachia* และประโยชน์ในการควบคุมโรค filariasis**

ในช่วงเวลากว่า 2 ทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนายาสำหรับใช้ในการรักษาและควบคุมโรคเท้าช้าง

และโรค onchocerciasis อย่างต่อเนื่อง เพื่อหวังผลให้ยาเหล่านั้น มีคุณสมบัติในการทำลายทั้งพยาธิฟิลาเรียระยะตัวแก่ (macrofilaricidal effect) และระยะไมโครฟิลาเรีย (microfilaricidal effect) แผนงานในการควบคุมโรคเท้าช้างทั่วโลกนั้น องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้ยา diethylcarbamazine (DEC) ในแหล่งพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเท้าช้าง เพราะยา DEC มีผลต่อระยะไมโครฟิลาเรีย และมีผลบ้างต่อระยะตัวแก่ จึงต้องให้ยาติดต่อกันหลายครั้ง ขนาดและปริมาณรับประทานของยา DEC ที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ (ขนาด 6 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นั้น เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่จะกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปภายใน 20 ปี (พ.ศ. 2563) จำเป็นต้องมีการให้ติดต่อกันเป็นเวลานาน 5-10 ปี⁽³⁹⁾ เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาและควบคุมโรค ซึ่งต้องอาศัยความร่วมมืออย่างดีจากผู้ป่วยในพื้นที่ระบาด นอกจากนี้ ยา DEC ถูกห้ามใช้ในการรักษาโรคเท้าช้างในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของทั้งโรคเท้าช้าง ร่วมกับโรค onchocerciasis โดยให้มีการใช้ยา ivermectin แทนสำหรับการรักษาโรคเท้าช้างร่วมกับโรค onchocerciasis ในพื้นที่นั้น เนื่องจากการใช้ยา DEC ในการรักษาโรค onchocerciasis ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อยา ซึ่งเป็นอันตรายอย่างมากต่อผู้ป่วยได้ จากการศึกษพบว่า ยา ivermectin มีประสิทธิภาพทำลายพยาธิระยะไมโครฟิลาเรีย (mature microfilaria) เท่านั้น จึงไม่สามารถยับยั้งการแพร่พันธุ์ของพยาธิตัวแก่เพศเมียอย่างถาวรได้ การรักษาจึงต้องทำอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาหลายปี ดังนั้นการรักษาโรค filariasis ในปัจจุบันนั้น ยังจำเป็นต้องมีการพัฒนาคุณสมบัติของยา และทดลองยาตัวใหม่ ๆ สำหรับการรักษาต่อไป เพื่อให้ได้ยาที่มีคุณสมบัติในการทำลายพยาธิฟิลาเรียอย่างครบถ้วน

จากผลการศึกษาถึงประสิทธิภาพของยา tetracycline ที่มีต่อพยาธิฟิลาเรียนั้น ทำให้เกิดแนวทางการวิจัยเพื่อนำยา tetracycline มาประยุกต์ใช้สำหรับรักษา และควบคุมโรค filariasis ในคนต่อไป โดยข้อมูลจากการทดลองซึ่งสนับสนุนความเป็นไปได้ดังกล่าว นั้น สรุปได้ดังนี้ การให้ยา tetracycline เป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือนแก่สัตว์

ทดลอง โดยเริ่มให้ขณะที่หนอนพยาธิฟิลาเรียเจริญเป็นระยะตัวแก่สมบูรณ์แล้ว พบว่าสามารถยับยั้งการแพร่พันธุ์ของพยาธิตัวแก่เพศเมียในระดับ embryogenesis ผลการทดลองดังกล่าวนี้ ได้มีการศึกษาในสัตว์ทดลองหลายชนิด และพบว่ายา tetracycline มีผลยับยั้งการแพร่พันธุ์ของพยาธิ *L. sigmodontis*⁽³²⁾ *D. immitis*^(34,38) และ *B. pahangi*^(34,40) นอกจากนี้ ผลของยา tetracycline จากการศึกษานี้ในหนูทดลองที่ติดเชื้อ *B. pahangi* นั้น มีประโยชน์ต่อการรักษาโรคเท้าช้างในคนอย่างมาก สำหรับการศึกษารักษาโรคเท้าช้างในคนอย่างมาก สำหรับการศึกษารักษาโรค onchocerciasis ในสัตว์ทดลองนั้น ได้มีการทดลองให้การรักษาด้วยยา oxytetracycline แก่วัวที่ติดเชื้อ *O. ochengi* เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่ายาดังกล่าวมีคุณสมบัติต่อการยับยั้งระยะ embryogenesis ในพยาธิตัวแก่เพศเมีย และมีผลทำลายพยาธิระยะตัวแก่ (macrofilaricidal effect) ด้วย ซึ่งยังผลให้สามารถรักษาพยาธิสภาพของโรคที่ผิวหนัง⁽⁴¹⁾ ได้ภายในระยะเวลา 9 เดือน การศึกษาในสัตว์ทดลองถึงประสิทธิภาพของยา tetracycline และอนุพันธ์ของยา tetracycline ที่มีผลยับยั้งการออกลูกไมโครฟิลาเรียของพยาธิตัวแก่เพศเมีย และผลในระยะยาวต่อพยาธิฟิลาเรียระยะตัวแก่ นั้น เป็นประโยชน์อย่างมาก สำหรับการศึกษเพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษา และควบคุมโรค filariasis ในคนต่อไป

Wolbachia และพยาธิสภาพการเกิดโรคเท้าช้าง

พยาธิสภาพในผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย นอกจากจะเกิดจากพยาธิโรคเท้าช้างโดยตรงแล้ว อาการอาจรุนแรงมากขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีต่อสารหลังจากตัวพยาธิ โดยเฉพาะจากพยาธิที่กำลังจะตายหรือที่ตายแล้ว⁽³¹⁾ จากการศึกษพบแบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นจำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อของพยาธิฟิลาเรียระยะต่างๆ ดังกล่าวนั้น มีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียจะถูกปลดปล่อยออกมาจากพยาธิฟิลาเรียภายหลังการตาย หรือโดยกลไกการขับถ่ายสารต่าง ๆ ของพยาธิ⁽⁸⁾ แอนติเจนชนิดต่าง ๆ บนเซลล์แบคทีเรีย หรือแอนติเจนจากการปลดปล่อยโดย

เซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียได้อย่างดีนั้น อาจจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของการเกิดโรค filariasis ด้วย

จากการทดลองโดย Taylor และคณะพบว่า สารสกัดจากพยาธิฟิลาเรีย *B. malayi* สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพะเลี้ยงแมคโครฟาจหลั่ง tumor necrosis factor (TNF)- α และ interleukin (IL)- 1β ซึ่งเป็น proinflammatory cytokine ทำหน้าที่ตอบสนองต่อขบวนการอักเสบและติดเชื้อ รวมทั้งมีผลให้หลั่ง nitric oxide (NO) อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพยาธิ *A. viteae* ซึ่งเป็นพยาธิฟิลาเรียที่มีการรายงานแล้วว่าไม่พบแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้น พบว่าไม่สามารถกระตุ้นแมคโครฟาจให้มีการตอบสนองดังกล่าวได้⁽⁴²⁾ ดังนั้นจึงคาดว่าแอนติเจนที่สำคัญต่อการกระตุ้นแมคโครฟาจมาจากแบคทีเรีย *Wolbachia* จากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพบว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) มีศักยภาพกระตุ้นโมโนไซต์และแมคโครฟาจให้มีการหลั่ง TNF- α และ IL-1 ได้ในปริมาณที่สูง การทดลองนี้ได้มีการพิสูจน์ว่า แอนติเจนที่คาดว่ามาจากแบคทีเรีย *Wolbachia* และสามารถกระตุ้นการตอบสนองของแมคโครฟาจนั้น มีคุณสมบัติเป็นสาร LPS⁽⁴²⁾

ปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคเท้าช้าง เป็นส่วนหนึ่งของการเกิดพยาธิสภาพของโรคที่สำคัญ จากการศึกษาที่ผ่านมา ยังไม่มีการสรุปอย่างแน่ชัดว่า ระบบภูมิคุ้มกันด้านใดมีบทบาทหลักในพยาธิกำเนิดของโรคเท้าช้าง อย่างไรก็ตาม การทดลองติดเชื้อพยาธิ *B. malayi* แก่หนูทดลองที่มีความผิดปกติของการพัฒนาการของต่อมไทมัส (athymic mice) ซึ่งทำให้หนูทดลองนี้ไม่สามารถพบ T cell ที่เจริญเต็มที่ (mature T cell) หรือพบได้น้อยนั้น พบว่าการศึกษาระดับไฮโดรโคโรนินชนิดต่าง ๆ จากตัวอย่างน้ำเหลืองที่บริเวณพยาธิสภาพของโรคของหลอดน้ำเหลืองนั้น สามารถตรวจพบไฮโดรโคโรนินที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้แก่ IL-1, IL-6, TNF- α และ GM-CSF⁽⁴³⁾ จากการทดลองที่พบว่า สารสกัดจากพยาธิ *B. malayi* สามารถกระตุ้นแมคโครฟาจให้มีการหลั่งไฮโดรโคโรนิน TNF- α และ IL-

1β ได้ และมีการพิสูจน์แล้วว่าแอนติเจนที่มีบทบาทต่อการกระตุ้น คือ สาร LPS จากแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้น ทำให้นักวิทยาศาสตร์คาดว่า แบคทีเรีย *Wolbachia* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพในโรคเท้าช้าง การศึกษาวิจัยต่อไปถึงกลไก และบทบาทของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีต่อพยาธิกำเนิดของโรคเท้าช้าง จะช่วยให้เข้าใจธรรมชาติของโรค ซึ่งเป็นผลให้มีการวางแผนการรักษา และป้องกันการเกิดพยาธิสภาพในโรคเท้าช้างได้ดียิ่งขึ้น

นอกจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันของร่างกายจะมีบทบาทต่อพยาธิสภาพ จนถึงทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ของโรคเท้าช้างแล้ว การศึกษาถึงกลไกการเกิดผลข้างเคียงต่อยา (drug-associated adverse reaction) ภายหลังจากผู้ป่วยได้รับยารักษาโรคเท้าช้างนั้น พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีต่อแอนติเจนซึ่งปลดปล่อยออกมาอย่างมากมาย จากตัวพยาธิที่กำลังจะตาย หรือที่ตายแล้วเนื่องจากฤทธิ์ยาที่ได้รับเข้าไปนั้น มีบทบาทสำคัญระดับความรุนแรงของผลข้างเคียงต่อยา DEC ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคเท้าช้างในปัจจุบันนั้น ขึ้นอยู่กับระดับของไมโครฟิลาเรียภายในกระแสเลือดของผู้ป่วยก่อนการรักษา ผู้ป่วยโรคเท้าช้างที่มีระดับไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดสูง เมื่อได้รับยารักษาขนาดเดียวกันกับผู้ป่วยที่มีระดับไมโครฟิลาเรียต่ำนั้น พบว่าผู้ป่วยดังกล่าวจะมีอาการจากผลข้างเคียงต่อยารุนแรงกว่าผู้ป่วยที่มีไมโครฟิลาเรียในระดับต่ำ⁽⁴⁴⁾ อาการผลข้างเคียงต่อยาในผู้ป่วยที่ได้รับยารักษาโรคเท้าช้าง ได้แก่ การมีไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดข้อและกล้ามเนื้อ และเวียนศีรษะ เป็นต้น ซึ่งอาการที่ไม่พึงประสงค์เหล่านี้ เป็นปัญหาต่อการควบคุมโรคเท้าช้างเนื่องจากการลดความร่วมมือในการรักษาของผู้ป่วย

กลไกการเกิดผลข้างเคียงต่อยายังไม่มีการสรุปที่แน่ชัด อย่างไรก็ตาม คาดว่าแอนติเจนจากตัวพยาธิโดยเฉพาะระยะไมโครฟิลาเรียที่พบในกระแสเลือดของผู้ป่วยซึ่งรับประทุษยารักษานั้น เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญต่อการตอบสนองให้มีการสร้าง proinflammatory cytokine ต่าง ๆ⁽⁴⁵⁾ จากการทดลองพบแอนติเจนจากแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถกระตุ้นให้แมคโครฟาจตอบสนอง และหลั่งไฮโดรโคโรนิน

ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการอักเสบ รวมทั้งความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียจะถูกปลดปล่อยออกจากตัวพยาธิฟิลาเรียได้นั้น ทำให้เกิดสมมติฐานว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพการเกิดผลข้างเคียงต่อยา ซึ่งสร้างความน่าสนใจแก่นักวิทยาศาสตร์ในการที่จะศึกษาและพิสูจน์ถึงกลไกต่อไป นอกจากนี้ผลจากการทดลองที่ศึกษาช่วยให้มีการวางแผนการรักษาโรคเท้าช้างได้ดี เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดของการควบคุมโรคเท้าช้างด้วย

สรุป

การค้นพบ *Wolbachia* ในหนอนพยาธิกลุ่มฟิลาเรียได้ก่อให้เกิดความสนใจและการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะถึงความสำคัญของ *Wolbachia* ต่อการสืบพันธุ์และการเจริญของหนอนพยาธิฟิลาเรีย และเป็นเครื่องมือในการศึกษาชีววิทยาของหนอนพยาธิฟิลาเรีย ตลอดจนความเป็นไปได้ในการที่จะเป็นเป้าหมายใหม่เพื่อการรักษาโรคของพยาธิกลุ่มนี้ ซึ่งรวมถึงโรคเท้าช้างด้วย นอกจากนี้การศึกษาดังบทบาทของ *Wolbachia* ต่อพยาธิสภาพของโรคก็เป็นสิ่งที่กำลังศึกษากันอยู่ ความก้าวหน้าของการศึกษาจีโนมของ *Wolbachia* จากหนอนพยาธิ *B. malayi* และการวิเคราะห์จีโนมของ *Wolbachia* ในสัตว์ขาข้อ จะทำให้เข้าใจชีววิทยาของ *Wolbachia* เอง ตลอดจนใช้เปรียบเทียบถึงแบคทีเรียชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในเซลล์

อ้างอิง

1. O' Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proc Natl Acad Sci USA 1992 Apr 1; 89(7): 2699 - 702
2. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. Res Microbiol 1995 Jun; 146(5): 385 - 96
3. Stothard DR, Fuerst PA. Evolutionary analysis of spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* using rRNA gene sequences. Syst Appl Microbiol 1995 Mar; 18(1): 52 - 61
4. Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf AM, Lazdins J. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: a target for control ? Parasitol Today 2000 May; 16(5): 179 - 80
5. Werren JH. Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol 1997; 42: 587 - 609
6. O' Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH. Influential Passengers. New York: Oxford University Press, 1997.
7. Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1992 Nov; 250(1328): 91 - 8
8. Taylor MJ, Hoerauf AM. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. Parasitol Today 1999 Nov; 15(11): 437 - 42
9. Kozek WJ. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. J Parasitol 1977 Dec; 63(6): 992 - 1000
10. Kozek WJ, Manoquin HF. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. Am J Trop Med Hyg 1977 Jul; 26(4): 663 - 78
11. Hertig M, The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. Parasitology 1936 Oct; 28: 453 - 86
12. Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Luck RF, Werren JH. Molecular Identification of microorganisms associated with parthenogenesis. Nature

- 1993 Jan 7; 361(6407): 66 - 8
13. Werren JH, Jaenike J. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity* 1995 Sep; 75(3): 320 - 26
14. Werren JH, Zhang W, Guo LR. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1995 Jul 22; 261(1360): 55 - 63
15. Breeuwer JAJ, Stouthamer R, Burns SM, Pelletier DA, Weisburg WG, Werren JH. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol Biol* 1992; 1(1): 25 - 36
16. Bressac C, Rousset F. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *J Invertebr Pathol* 1993 May; 61(3): 226 - 30
17. Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature* 1971 Aug 27; 232(5313): 657 - 8
18. Hoffmann AA, Clancy DJ, Duncan J. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 1996 Jan; 76(1): 1 - 8
19. Holden PR, Jones P, Brookfield JFY. Evidence for a *Wolbachia* symbiont in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 1993 Aug; 62(1): 23 - 9
20. Stouthamer R, Luck RF, Hamilton WD. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2424 - 27
21. Rigaud T, Juchault P. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics* 1993 Feb; 133(2): 247 - 52
22. Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10792 - 96
23. Beard CB, O'Neill SL, Tesh RB, Richards FF, Aksoy S. Modification of Arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitol Today* 1993; 9(5): 179 - 83
24. McLaren DJ, Worms MJ, Laurence BR, Simpson MG. Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 69(5-6): 509 - 14
25. Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Sacco BD, Damiani G, Genchi C. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol Biochem Parasitol* 1995 Nov; 74(2): 223 - 7
26. Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1998 Dec 22; 265(1413): 2407 - 13
27. Taylor MJ, Bilo K, Cross HF, Archer JP, Underwood AP. 16S rDNA phylogeny and ultrastructural characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *B. pahangi* and *Wuchereria bancrofti*. *Exp Parasitol* 1999 Aug; 91(4): 356 - 61
28. Tritteerapapab S. Update in lymphatic filariasis: A re-emerging disease of Thailand. *Chula Med*

- J 1997 Aug; 41(8): 611 - 22
29. Triterapapab S, Thumpanyawat B, Sangprakarn S. *Wuchereria bancrofti*-specific circulating antigen for diagnosis of bancroftian filariasis. Chula Med J 1998 Apr; 42(4): 267 - 77
30. Triterapapab S, Songtrus J. High prevalence of bancroftian filariasis in Myanmar-migrant workers: a study in Mae Sot District, Tak Province, Thailand. J Med Assoc Thai 1999; 82: 734 - 9
31. Henkle-Duhrsen K, Eckelt VHO, Wildenburg G, Blaxter M, Walter RD. Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. Mol Biochem Parasitol 1998 Oct; 96(1-2): 69 - 81
32. Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Duhrsen K, Blaxter M, Buttner DW, Gallin MY, AL-Qaoud KM, Lucius R, Fleischer B. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. J Clin Invest 1999 Jan; 103(1): 11 - 8
33. Franz M, Andrews P. Fine structure of adult *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea). Z Parasitenkd 1986; 72(4): 537 - 47
34. Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. Int J Parasitol 1999 Feb; 29(2): 357 - 64
35. Franz M, Copeman DB. The fine structure of male and female *Onchocerca gibsoni*. Trop Med Parasitol 1988 Dec; 39(Suppl 4): 466 - 8
36. Plenge-Bonig A, Kromer M, Buttner DW. Light and electron microscopy studies on *Onchocerca jakutensis* and *O. flexuosa* of red deer show different host-parasite interactions. Parasitol Res 1995; 81(1): 66 - 73
37. Xie H, Bain O, Williams SA. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. Parasite 1994 Jun; 1(2): 141 - 51
38. Genchi C, Sacchi L, Bandi C, Venco L. Preliminary results on the effect of tetracycline on the embryogenesis and symbiotic bacteria (*Wolbachia*) of *Dirofilaria immitis*. An update and discussion. Parasitologia 1998 Sep; 40 (3): 247-9
39. Ottesen EA, Ramachandran CP. Lymphatic filariasis infection and disease: control strategies. Parasitol Today 1995; 11: 129 - 31
40. Bosshardt SC, McCall JW, Coleman SU, Jones KL, Petit TA, Klei TR. Prophylactic activity of tetracycline against *Brugia pahangi* infection in jirds (*Meriones unguiculatus*). J Parasitol 1993 Oct; 79(5): 775 - 7
41. Langworthy NG, Renz A, Mackenstedt U, Henkle-Duhrsen K, de Bronsvort MB, Tanya VN, Donnelly MJ, Trees AJ. Macrofilariocidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. Proc R Soc Lond B Biol Sci 2000 Jun; 267(1448): 1063-9
42. Taylor MJ, Cross HF, Bilo K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopoly-saccharide-like activity from endosymbiotic