

# ความชุกและความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสดเลือดโคนม และสุนัข/แมว พื้นที่จังหวัดชุมพร

อิสมาแอล ยุมาดีน<sup>1</sup> กำชัย กิจศิลป์<sup>1</sup> วงศพัทธ์ จันไชยยศ<sup>2</sup>

## บทคัดย่อ

โรคพยาธิพลาเรียเป็นโรคปรสิตในสัตว์ที่พบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อน ก่อปัญหาสุขภาพต่อสัตว์และเป็นแหล่งแพร่โรคสู่คนผ่านพาหะซึ่งเป็นแมลงดูดเลือด โรคพลาเรียที่ติดต่อสู่คนมีสุนัขและแมวเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบสถานการณ์ความชุกและความสัมพันธ์ของการติดโรคพยาธิพลาเรียในโคนมและสุนัข/แมว ในฟาร์มโคนมจังหวัดชุมพร ทำการตรวจเลือดสัตว์ที่เตรียมด้วยวิธีฟิล์มโลหิตหนา และวิธี Hematocrit capillary tube แล้วย้อมสียิมซ่าเพื่อตรวจและจำแนกประเภทพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์ และอธิบายความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคนมและในสุนัข/แมว ในฟาร์มด้วยค่าสัมประสิทธิ์  $\phi$  และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยวิธี Fisher exact probability test จากสถิติ Chi-square test ที่ความเชื่อมั่น 95% เก็บตัวอย่างเลือดในฟาร์มโคนมทุกแห่ง รวม 21 ฟาร์ม ประกอบด้วยตัวอย่างเลือดโครีดนม 277 ตัว สุนัข 68 ตัว และแมว 24 ตัว ความชุกของพยาธิจำแนกตามชนิดสัตว์ได้ดังนี้ *Setaria* spp. ในโคร้อยละ 1.4 (4/277; 95%CI 0.4-3.4) *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ในสุนัขร้อยละ 1.4 (3/68; 95%CI 0.9-12.4) และ 4.4 (7/68; 95%CI 4.2-20.1) ตามลำดับ และ *Brugia* spp. ในแมวร้อยละ 4.2 (1/24; 95%CI 0.1-21.0) ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคนมและในสุนัข/แมว ในฟาร์มอยู่ในระดับเล็กน้อยไม่มีความสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์  $\phi$  เท่ากับ 0.14 และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value=0.53) ผลการศึกษานี้พบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโฮสต์จำเพาะ คือ *Setaria* spp. ในโค และ *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ในสุนัขและแมว และความสัมพันธ์ของการติดเชื้อในโฮสต์ต่างชนิดอยู่ในระดับต่ำ สามารถนำข้อมูลไปถ่ายทอดให้กับเกษตรกรฟาร์มโคนมในการรักษาและป้องกันโรคพยาธิพลาเรียในโคนม สุนัข และแมว เป็นข้อมูลประกอบการวางแผนการป้องกันควบคุมโรคในคน ควรติดตามโรคพยาธิพลาเรียในโคนม สุนัขและแมว อย่างต่อเนื่อง และใช้วิธีการตรวจที่มีความไวมากขึ้นที่สามารถระบุสายพันธุ์พยาธิได้ เพื่อให้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำสำหรับใช้ในการวางแผนป้องกันและควบคุมโรค

**คำสำคัญ:** ความชุก ความสัมพันธ์ โรคพยาธิพลาเรีย โคนม *Setaria* spp. *Dirofilaria* spp. *Brugia* spp.

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ: 65(2)-0116(8)-115

<sup>1</sup> สำนักงานปศุสัตว์เขต 8 อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84000

<sup>2</sup> สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดภูเก็ต อ.เมือง จ.ภูเก็ต, 83000

# Prevalence and Correlation of Microfilaria Infection in Dairy Cattle and Dogs/Cats in Chumphon Province

Ismael Yumadeen<sup>1</sup> Kamchai Kidsin<sup>1</sup> and Wongsaphat Janchaiyot<sup>2</sup>

## Abstract

Filariasis is a parasitic zoonotic disease of animals in tropical regions. Blood-sucking insects transmit microfilaria, an infective stage of filarial, to animals and humans. Dogs and cats are important reservoirs of zoonotic filariasis. This study aimed to describe prevalence of microfilaria infection in cows, dogs and cats and correlation between microfilaria infection in cows and dogs/cats in dairy farms in Chumphon Province. The microscopic examination was used to detect and defined parasite genus from Giemsa's stain smeared blood samples prepared by thick blood smear and hematocrit capillary tube techniques. Correlation of microfilaria infection in cattle and dogs/cats was determined by phi ( $\phi$ ) correlation coefficient. The relationship was analyzed by Fisher exact probability test from Chi-square test with 95% confidence. We collected samples from 277 milking cows, 68 dogs and 24 cats from all 21 dairy farms. The prevalence of *Setaria* spp. in cows was 1.4% (4/277; 95%CI 0.4-3.4); *Dirofilaria* spp. and *Brugia* spp. in dogs were 1.4% (3/68; 95%CI 0.9-12.4) and 4.4% (7/68; 95%CI 4.2-20.1), respectively; *Brugia* spp. in cat was 4.2% (1/24; 95%CI 0.1-21.0). The  $\phi$  of 0.14 and was not statistically significant ( $p$ -value=0.53). Our results identified *Setaria* spp. in cows, *Dirofilaria* spp. and *Brugia* spp. in dogs and cats, the correlation of infection among different hosts was low. This information shall be transferred to the farmers for treatment and control microfilaria infection in their animals and public health for planning zoonotic filariasis prevention activities. Continuous monitoring of microfilaria infection in animals in the farms should be continued and using more sensitive and specific tests, that can identify parasitic strains to provide accurate information for use in disease prevention and control planning.

**Keyword:** Prevalence, Correlation, Filariasis, Dairy Cattle, *Setaria* spp, *Dirofilaria* spp., *Brugia* spp.

---

Register No.: 65(2)-0116(8)-115

<sup>1</sup>Office of Regional Livestock 8, Meuang Surat Thani, Surat Thani 84000

<sup>2</sup>Phuket Provincial Livestock Office, Meuang Phuket, Phuket 83000

## บทนำ

โรคพยาธิฟิลาเรีย (Filariasis) เป็นโรคปรสิตในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์เลี้ยงคาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ที่พบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อน ก่อปัญหาสุขภาพต่อสัตว์และบางสายพันธุ์ติดต่อสู่คน พยาธิฟิลาเรียมีหลายประเภทและสายพันธุ์ มีความหลากหลายของประเภทของโฮสต์กึ่งกลางและโฮสต์จำเพาะ (Kaikuntod, et. al, 2018) เฉพาะพยาธิฟิลาเรียที่มีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นโฮสต์จำเพาะเท่านั้นที่มีการรายงานการติดต่อสู่คน เช่น *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*, *Onchocerca volvulus* และ *Wuchereria bancrofti* ซึ่งมีสุนัขและแมวเป็นแหล่งรังโรคสำคัญ (Anderson, 2000) การติดต่อของโรคโดยไมโครฟิลาเรียซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิที่เจริญในโฮสต์กึ่งกลางซึ่งเป็นพาหะคือแมลงดูดเลือดในสกุลต่างๆ เข้าสู่ร่างกายของสัตว์ซึ่งเป็นโฮสต์จำเพาะผ่านทางกัด (Bowman, 2009) โรคพยาธิฟิลาเรียมีรายงานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและขยายพื้นที่ ชนิดของโฮสต์และตำแหน่งที่พบในร่างกาย เช่น พบการติดเชื้อ *Onchocerca lupi* ที่มีโคเป็นโฮสต์จำเพาะในสุนัขป่า (Domenico et al., 2012) พบการติดเชื้อ *Onchocerca* spp. ในช้างที่จังหวัดสุรินทร์ (Pabutta, et al, 2021) หรือการพบ *Dirofilaria immitis* และ *Brugia malayi* จากเห็บของช้างและสิงโต (Koray et al., 2022) และพบ *Brugia malayi* จากแผลผิวหนังอักเสบของยีราฟ (Sushan et al., 2022) เป็นต้น ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคพยาธิฟิลาเรีย ได้แก่ สภาพแวดล้อมซึ่งมีอิทธิพลกับการคงอยู่และเพิ่มจำนวนของแมลงดูดเลือดซึ่งเป็นพาหะของพยาธิ แหล่งรังโรค รวมทั้งกิจกรรมและพฤติกรรมของมนุษย์ (CDC, 2021)

ประเทศไทยมีรายงานโรคและความชุกของพยาธิฟิลาเรียรวมทั้งไมโครฟิลาเรีย ในคน สุนัข แมว โค สัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่า (Kaikuntod, et. al, 2018) ถึงแม้ปัจจุบันสามารถควบคุมโรคพยาธิฟิลาเรียที่ก่อโรคเท้าช้างในคนได้สำเร็จ แต่ยังคงมีความเสี่ยงจากการเคลื่อนย้ายคน สัตว์ และสัตว์พาหะ (สีใส, 2555) และยังมีโรคพยาธิฟิลาเรียที่ยังไม่มีการควบคุมในสัตว์ เช่น *Dirofilaria immitis* จึงต้องติดตามสถานการณ์ของโรคอย่างต่อเนื่อง เพื่อควบคุมป้องกันโรคในคน และในสัตว์ซึ่งเจ็บป่วยหรือตายจากโรคและเป็นแหล่งรังโรค ทั้งนี้จากรายงานของ Tiawsirisup (2010) พบว่าหากความชุกของไมโครฟิลาเรียต่างๆสูงทั้งในสัตว์และในคน ก็จะทำให้เพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อและถ่ายทอดเชื้อระหว่างสัตว์และคน ทั้งนี้สภาพแวดล้อมของฟาร์มปศุสัตว์ในประเทศไทย โดยเฉพาะฟาร์มโคนมซึ่งส่วนใหญ่เป็นฟาร์มเปิดขนาดเล็กถึงขนาดกลาง มักมีการเลี้ยงสุนัขและแมวและใช้แรงงานคนในการจัดการฟาร์ม สัตว์และคนจึงมีความใกล้ชิดกันมากมีโอกาสสูงที่คนจะได้รับ การถ่ายทอดเชื้อโรคผ่านแมลงพาหะในพื้นที่หากสัตว์ในฟาร์มมีการติดเชื้อ จึงควรทราบสถานการณ์การติดพยาธิฟิลาเรียของสัตว์ในพื้นที่ เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนควบคุมป้องกันโรคให้ได้อย่างเหมาะสม แต่ข้อมูลเหล่านี้มีจำกัดและยังไม่เคยมีรายงานในพื้นที่จังหวัดชุมพร ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นในฟาร์มโคนมในพื้นที่จังหวัดชุมพร เพื่อทราบสถานการณ์ความชุกและความสัมพันธ์ของการติดโรคพยาธิฟิลาเรียในโคนมและสุนัข/แมว ในฟาร์ม

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### รูปแบบการศึกษา

การศึกษาเชิงพรรณนาแบบภาคตัดขวาง (Cross sectional study) ในโคนม สุนัข และแมว ในฟาร์มโคนมในพื้นที่จังหวัดชุมพร ระหว่างเดือน เมษายน ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2562 เพื่อทราบความชุกและความสัมพันธ์ของการติดโรคพยาธิฟิลาเรียในโคนมและสุนัข/แมว จากการตรวจเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์

### พื้นที่และประชากรที่ศึกษา

จังหวัดชุมพรมีการเลี้ยงโคนมมาเป็นเวลา 30 ปี ในพื้นที่ 3 อำเภอ ได้แก่ ปะทิว ท่าแซะ และ เมืองชุมพร ปัจจุบันมีจำนวนฟาร์มโคนมทั้งหมด 21 ฟาร์ม โคนมรวมประมาณ 1,000 ตัว ประชากรเป้าหมายในการศึกษาคือ โครีดนมจำนวน 277 ตัว สุนัขจำนวน 68 ตัว และแมวจำนวน 24 ตัว ในครัวเรือนฟาร์มโคนมที่มีอายุประมาณ 1 ปีขึ้นไป และไม่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันพยาธิหนอนหัวใจภายในระยะเวลา 6 เดือน นับถึงวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง

### การเก็บตัวอย่างเลือดสัตว์

เก็บตัวอย่างเลือดโคนมโดยใช้ไซริงค์ 3 มิลลิลิตร (ml) เข็มเบอร์ 18 ความยาว 1 นิ้ว เจาะเลือดปริมาณ 2 มิลลิลิตร (ml) จากเส้นเลือดดำตำแหน่งโคนหาง เก็บตัวอย่างเลือดสุนัขและแมว โดยใช้ไซริงค์ 3 มิลลิลิตร (ml) เข็มเบอร์ 23 ความยาว 1 นิ้ว เจาะเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ml) จากเส้นเลือดดำตำแหน่งปลายขาหน้า บรรจุเลือดสดที่เก็บได้ทันทีในหลอดเก็บเลือดที่มีสาร EDTA ป้องกันเลือดแข็งตัว เขย่าให้เลือดและสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเข้ากันดี บันทึกหมายเลขตัวอย่างข้างหลอด แล้วเก็บรักษาตัวอย่างในกล่องควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (C°) บันทึกประวัติสัตว์รายตัว ชื่อฟาร์ม ชื่อสัตว์ อายุ เพศ

### การตรวจหาเชื้อไมโครฟิลาเรีย

เตรียมตัวอย่างในวันที่เก็บตัวอย่างตามขั้นตอนดังนี้

**วิธีฟิล์มโลหิตหนา** ผสมเลือดให้เข้ากันดีใช้ไมโครปิเปตหยดเลือดปริมาณ 30 ไมโครลิตร ( $\mu$ l) ลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วใช้ไม้จิ้มฟันละเอียดกดให้แบนวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง  $\frac{1}{2}$  นิ้ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำมาทำการสลายเม็ดเลือดแดงโดยจุ่มในแนวนอนลงในบีกเกอร์บรรจุน้ำกลั่นหันด้านที่มีเลือดลง เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วตรึงสไลด์ด้วย Methanol 95% 30 วินาที แล้วนำไปย้อมสีิมซา (สุริย์พร, 2551)

**วิธี Hematocrit capillary tube** ผสมเลือดให้เข้ากันดีจุ่มปลายหลอด capillary tube ดูดเลือดตัวอย่าง เช็ดคราบเลือดที่ติดข้างหลอด อดปลายด้านล่างหลอดด้วยดินน้ำมัน นำหลอดไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย  $\times 40$  ตรวจสอบการเคลื่อนไหวของไมโครฟิลาเรียที่ชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) บันทึกผลการตรวจ จากนั้นใช้ใบเลื่อยขนาดเล็กตัด capillary tube ได้ชั้น buffy coat ประมาณ 2 มิลลิเมตร (mm) หักออกแล้วเคาะส่วนของเม็ดเลือดขาวให้หยุดลงบน

ปลายสไลด์ข้างหนึ่ง กลี๋ยให้เป็นแผ่นบางโดยใช้แผ่นไกลสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและตรึงสไลด์ด้วย Methanol 95% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปย้อมสียิมซ่า (สุรียัพร, 2551)

**การย้อมสียิมซ่า (Giemsa's stain)** นำสไลด์จากการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 วิธี จุ่มลงในโลย้อมที่มี Methanol 95% นานประมาณ 2-3 นาที แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ จากนั้นนำไปจุ่มลงในโลย้อมที่มีสียิมซ่า pH 7.0-7.2 นานประมาณ 10 นาที เมื่อครบกำหนดแล้วนำสไลด์ขึ้นมาล้างสีที่เหลือออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นบัฟเฟอร์หรือน้ำประปาและตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง (อาคม, 2541)

**การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์** อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย  $\times 40-100$  ตรวจและจำแนกลักษณะของไมโครฟิลาเรียทางกายสัณฐาน ซึ่งมีลักษณะจำเพาะในการพิจารณาคือ *Brugia* spp. ทุกสายพันธุ์จะมีปลอกหุ้มลำตัว (sheathed) ติดสีชมพูชัดเจน ปลายหางมีนิวเคลียสจำนวน 2 อัน อันปลายสุดมีขนาดเล็กแยกออกจากกัน ส่วน *Dirofilaria* spp. จะไม่มีปลอกหุ้มลำตัว มีรูปร่างเรียวยาว ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปกรวย (cone shape) และมีนิวเคลียสเรียงตัวเป็นระเบียบ สำหรับ *Setaria* spp. ลำตัวด้านหน้าโค้งมนเรียวแหลมไปด้านหลังและเต็มไปด้วยนิวเคลียสรูปวงกลม ปลายหางมีลักษณะเรียกว่า hyaline ovoid process และส่วนที่ติดสียิมซ่าจะสว่างขึ้นในบริเวณ cephalic space, excretory pore, nerve ring และ anal pore (อาคม, 2541)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา ความถี่ ร้อยละ มัธยฐาน ค่าต่ำสุดและสูงสุด อธิบายลักษณะของตัวอย่างตามฟาร์ม ชนิดสัตว์ เพศ และอายุ ประมาณการความชุกเป็นร้อยละของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียใน โค สุนัข และแมว โดยคำนวณจากจำนวนสัตว์ที่พบเชื้อไมโครฟิลาเรียในกระแสเลือด/จำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ทำการตรวจ  $\times 100$  คำนวณช่วงค่าประมาณการความชุกที่ความเชื่อมั่น 95% แสดงแผนที่การกระจายเชิงพื้นที่ของฟาร์ม โคนมและฟาร์มที่ตรวจพบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรีย โดยใช้โปรแกรม QGIS (<http://www.qgis.org/>) แสดงความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในแมวและสุนัขกับการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียในโคนมในฟาร์มด้วยสัมประสิทธิ์  $\phi$  (phi coefficient) (Chedzoy, 2006) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วัดระดับความสัมพันธ์ของ 2 ตัวแปรชนิดนามบัญญัติ (nominal variable) ที่แสดงผลในรูปแบบตัวแปรฐานสอง โดย  $\phi$  แสดงระดับความสัมพันธ์มีค่าระหว่าง -1-1 โดยค่าที่เข้าใกล้ -1 หรือ +1 หมายถึงความสัมพันธ์สูง และ 0 หมายถึงไม่มีความสัมพันธ์ การแปลผลเบื้องต้นคือ  $\pm 0.70$ - $\pm 1$  มีความสัมพันธ์สูงมาก  $\pm 0.40$ - $\pm 0.69$  มีความสัมพันธ์สูง  $\pm 0.30$ - $\pm 0.39$  มีความสัมพันธ์ปานกลาง  $\pm 0.20$ - $\pm 0.29$  มีความสัมพันธ์น้อยไม่สำคัญ และ 0 ไม่มีความสัมพันธ์ (Glen, 2016) แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยวิธี Fisher exact probability test จากสถิติ Chi-square test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS version 29 และมีสมการการคำนวณ  $\phi$  เป็นดังนี้

	Y=0	Y=1
X=0	A	B
X=1	C	D

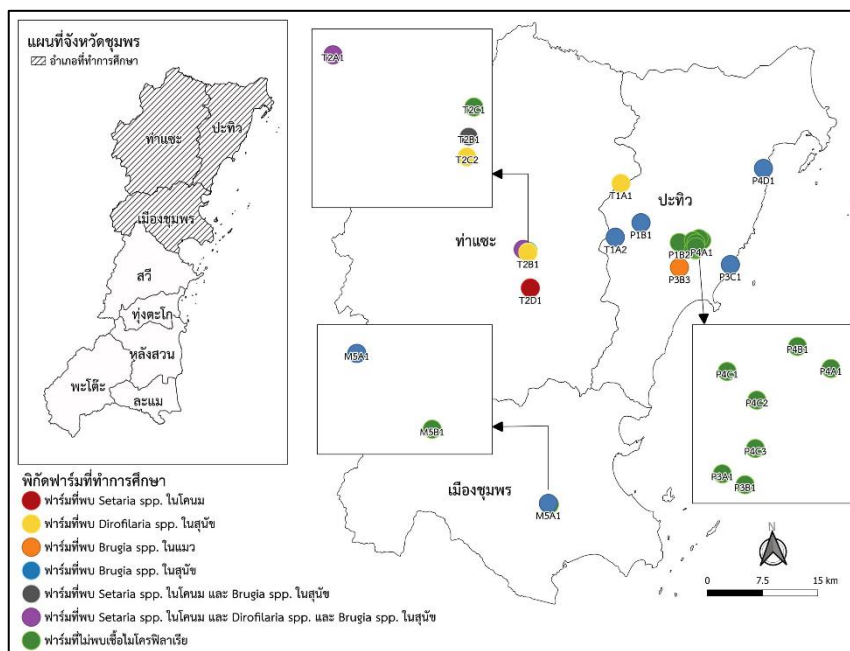
$$; \phi = (AD-BC) / \sqrt{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)}$$

## ผลการศึกษา

ทำการศึกษาในฟาร์มโคนมทั้งหมดในจังหวัดชุมพร รวม 21 ฟาร์ม อำเภอท่าแซะ 6 ฟาร์ม ปะทิว 13 ฟาร์ม และ เมืองชุมพร 2 ฟาร์ม เก็บตัวอย่างเลือดโคจากแม่โครีดนมทุกตัวทุกฟาร์ม รวม 277 ตัว ค่ามัธยฐานอายุแม่โค 4 ปี (3-8 ปี) สุนัข 68 ตัว จาก 19 ฟาร์ม เพศผู้ 33 ตัว เพศเมีย 35 ตัว ค่ามัธยฐานอายุ 2 ปี (1-8 ปี) และ แมว 24 ตัว จาก 13 ฟาร์ม เพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 14 ตัว ค่ามัธยฐานอายุ 3 ปี (1-8 ปี)

### ความชุกและการกระจายเชิงพื้นที่ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคนม สุนัขและแมว

ผลการตรวจหาไมโครพลาเรียในเลือดและจำแนกประเภททางกายสัณฐาน จำแนกเชื้อได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ *Setaria* spp., *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ทั้งนี้ในโคนมพบ *Setaria* spp. ร้อยละ 1.4 ความชุกที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ร้อยละ 0.4-3.4 ในสุนัขพบ *Dirofilaria* spp. ร้อยละ 4.4 ช่วงความชุก 0.9-12.4 และ *Brugia* spp. ร้อยละ 10.3 ช่วงความชุก 4.2-20.1 สำหรับในแมวพบ *Brugia* spp. ร้อยละ 4.2 ช่วงความชุก 0.1-21.0 (ตารางที่ 1) ทั้งนี้พบ *Brugia* spp. ในสุนัขจากทั้ง 3 อำเภอ โดยในอำเภอปะทิวมี 3 ฟาร์ม เมืองชุมพรและท่าแซะ แห่งละ 1 ฟาร์ม และในแมวพบเฉพาะในอำเภอปะทิว 1 ฟาร์ม ส่วนอำเภอท่าแซะพบฟาร์ม 1 แห่ง มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Brugia* spp. และ *Dirofilaria* spp. ในสุนัขและพบ *Setaria* spp. ในโค มีฟาร์ม 1 แห่ง พบ *Brugia* spp. ในสุนัขและพบ *Setaria* spp. ในโค และฟาร์มอีก 1 แห่ง ที่พบเฉพาะ *Setaria* spp. ในโค ตามลำดับ สำหรับ *Dirofilaria* spp. พบในสุนัขในพื้นที่อำเภอท่าแซะเท่านั้น 2 ฟาร์ม ส่วนฟาร์มที่ตรวจไม่พบเชื้อไมโครพลาเรียชนิดใดเลยมีจำนวนทั้งหมด 10 แห่ง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนที่แสดงการกระจายของฟาร์มโคนมที่พบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคนม สุนัข และแมว ของจังหวัดชุมพร

ตารางที่ 1 ความถี่ การกระจาย และประมาณการความชุกของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโค สุนัข และแมว ในฟาร์มโคนม จังหวัดชุมพร

อำเภอ	ฟาร์ม	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบและที่พบเชื้อไมโครพลาเรีย (%)						
		โค		สุนัข			แมว	
		ทดสอบ	พบเชื้อ	ทดสอบ	พบเชื้อ		ทดสอบ	พบเชื้อ
			<i>Setaria</i> spp.		<i>Dirofilaria</i> spp.	<i>Brugia</i> spp.		<i>Brugia</i> spp.
ท่าแซะ	T1A1	9	0	5	1(20.0)	0	2	0
	T2A1	20	1(5.0)	5	1*(20.0)	1*(20.0)	3	0
	T2B1	34	1(2.9)	5	0	1(20.0)	1	0
	T2C1	9	0	3	1(33.3)	0	2	0
	T2C2	10	0	7	0	0	3	0
	T2D1	16	2(12.5)	4	0	0	1	0
ปะทิว	P1A2	2	0	1	0	1(100.0)	4	0
	P1B1	23	0	5	0	0	ns	-
	P1B2	7	0	1	0	0	1	1(100.0)
	P3B1	8	0	4	0	0	ns	-
	P3B3	5	0	ns	-	-	ns	-
	P3C1	23	0	3	0	1(33.3)	3	0
	P3A1	31	0	2	0	1(50.0)	ns	-
	P4A1	14	0	4	0	0	1	0
	P4B1	20	0	5	0	0	ns	-
	P4C1	6	0	ns	-	-	1	0
	P4C2	6	0	4	0	0	ns	-
	P4C3	3	0	3	0	0	ns	-
	P4D1	6	0	4	0	1(25.0)	ns	-
	เมือง	M5A1	16	0	1	0	1(100.0)	2
M5B1		9	0	2	0	0	ns	-
<b>รวม</b>	<b>21</b>	<b>277</b>	<b>4</b>	<b>68</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>1</b>
ความชุก			1.4		4.4	10.3		4.2
(95%CI)			(0.4-3.4)		(0.9-12.4)	(4.2-20.1)		(0.1-21.0)

หมายเหตุ: \* = ติดเชื้อร่วม *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ; ns = ไม่มีตัวอย่าง; - = ไม่มีการทดสอบ

### ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดโคและสุนัข/แมวในฟาร์มโคนม

ผลตรวจการติดเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดโคนมในฟาร์ม และสุนัข/แมวในฟาร์ม 20 แห่ง มี 2 ฟาร์ม ที่ตรวจพบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในกระแสเลือดโคและสุนัข/แมว และมี 9 ฟาร์ม ที่ตรวจไม่พบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคและสุนัข/แมว ส่วนความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในเลือดโคและ

สุนัข/แมว ในฟาร์มโคนมอยู่ในระดับต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์  $\phi$  เท่ากับ 0.14 และไม่พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\text{-value}=0.53$ )

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคนมกับการติดเชื้อไมโครพลาเรียในสุนัข/แมว ในฟาร์มโคนม 20 แห่ง ในจังหวัดชุมพร

		ฟาร์มมีการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโค		รวม
		ใช่	ไม่ใช่	
ฟาร์มมีการติดเชื้อไมโครพลาเรียในสุนัข/แมว	ใช่	2	1	3
	ไม่ใช่	8	9	17
รวม		10	10	20

### สรุปและวิจารณ์

จากการตรวจเลือดสัตว์ที่เตรียมด้วยวิธีฟิล์มโลหิตหนาและวิธี Hematocrit capillary tube ย้อมด้วยสียิมซ่าแล้วตรวจจำแนกประเภทด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคและสุนัข/แมว ในฟาร์มโคนมของจังหวัดชุมพรนั้นเป็นการติดเชื้อเฉพาะแต่ในโฮสต์ที่จำเพาะ คือ *Setaria* spp. ในโค และ *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ในสุนัขและแมว โดยความชุกของพยาธิจำแนกตามชนิดสัตว์ได้ดังนี้ *Setaria* spp. ในโคร้อยละ 0.4-3.4 *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ในสุนัขร้อยละ 0.9-12.4 และ 4.2-20.1 ตามลำดับ และ *Brugia* spp. ในแมว ร้อยละ 0.1-21.0 และพบว่าความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครพลาเรียในโคนมและในสุนัข/แมว ในฟาร์มอยู่ในระดับต่ำที่ไม่มีทั้งความสำคัญและนัยสำคัญทางสถิติ

ความชุกของ *Setaria* spp. ในโคนมจากการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานในโคเนื้อในหลายพื้นที่ของประเทศไทย เช่น ในภาคใต้ตอนบนพบไมโครพลาเรียร้อยละ 1.9 (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน, 2563) ในโคชนในพื้นที่ภาคใต้ร้อยละ 2.7 (Ngasaman *et al.*, 2021) ในโคเนื้อจังหวัดน่าน ร้อยละ 1 (Kaewthammasorn, 2006) เช่นเดียวกันกับในสุนัขความชุกของ *Dirofilaria* spp. ที่พบเป็นไปในทางเดียวกับผลการศึกษาในสุนัขในภาคเหนือที่พบไมโครพลาเรียร้อยละ 6.2 (Kaikuntod *et al.*, 2018) สุนัขในกรุงเทพมหานครพบ *D. immitis* ร้อยละ 0.43 (Jitsamai *et al.*, 2021) และในสุนัขภาคใต้ของจังหวัดสงขลาและสตูลพบร้อยละ 7.7 (Kamyngkerd *et al.*, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับสถานการณ์ความชุกร้อยละ 1-47 ของ *D. immitis* ในสุนัขในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Kaikuntod *et al.*, 2018) ต่างจากความชุกของ *Brugia* spp. ในสุนัขซึ่งพบว่าสูงกว่าในพื้นที่กรุงเทพและปริมณฑลที่พบ *B. pahangi* ต่ำกว่าร้อยละ 1 (Jitsamai *et al.*, 2021) การพบการติดเชื้อร่วมระหว่าง *Dirofilaria* spp. และ *Brugia* spp. ในสุนัข (1/68) เช่นเดียวกับในสุนัขของภาคเหนือซึ่งพบการติดเชื้อร่วมระหว่าง *D. immitis* และ *B. pahangi* (Kaikuntod *et al.*, 2018) สำหรับในแมวพบการติดเชื้อ *Brugia* spp. เพียงประเภทเดียว ซึ่งต่างจากการศึกษาในแมวพื้นที่กรุงเทพมหานคร และในแมวของจังหวัดสงขลาและสตูลที่พบ *D. immitis* เพียงประเภทเดียวที่ความชุกร้อยละ 20 และร้อยละ 36 ตามลำดับ (Thenchaisri *et al.*, 2022; Kamyngkerd *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตามระดับความชุก *Brugia* spp. ที่พบในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาเชื้อ *Brugia* spp. สายพันธุ์



ติดต่อกันในแมววัดของจังหวัดนครปฐม ที่พบความชุกของ *B. pahangi* ร้อยละ 4 (Rawangchue *et al.*, 2022) ความแตกต่างของประเภทพยาธิที่ตรวจพบและระดับความชุก นอกจากจะเกี่ยวข้องกับพื้นที่ และสภาพแวดล้อมที่ต่างกันแล้วมีโอกาสเกิดขึ้นจากปัจจัยอื่นๆได้อีกด้วย เช่น ชนิดตัวอย่างที่ศึกษา วิธีการตรวจ ช่วงเวลาหรือฤดูกาลที่ศึกษา การจัดการเลี้ยงดูสัตว์รวมทั้งประวัติการใช้ยา benzimidazole และ macrocyclic lactone (Kaikuntod *et al.*, 2018)

ในแง่การกระจายของเชื้อเชิงพื้นที่พบ *Dirofilaria* spp. ในสุนัข และ *Setaria* spp. ในโค เฉพาะอำเภอท่าแพเท่านั้น อาจเนื่องมาจากอำเภอท่าแพมีที่ตั้งทางทิศตะวันตกติดกับป่าร้อนชื้นของเทือกเขาตะนาวศรี เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ที่เหมาะสมของยุงรำคาญ ยุงลาย และยุงก้นปล่อง ซึ่งเป็นพาหะของเชือดังกล่าว ทั้ง 2 ประเภท (Tiawsirisup and Nithiuthai, 2006; Cornelia *et al.*, 2017; Cancrini *et al.*, 1997; Sauli *et al.*, 2009) สำหรับ *Brugia* spp. พบทั้งในสุนัขและแมวใน 3 อำเภอ พาหะหลักของเชือนี้คือยุงเสื่อที่ชอบหากินบริเวณหนองน้ำที่มีวัชพืชหรือป่าพรุในที่ราบชายฝั่งตะวันออกทั่วไปของภาคใต้ (ชูศักดิ์ และคณะ, 2548; Budi *et al.*, 2019; Peter *et al.*, 2007)

การศึกษาครั้งนี้ได้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taylor *et al.*, (2016) ที่พบว่าพยาธิฟิลาเรียแต่ละสายพันธุ์ไม่สามารถติดเชื้อผ่านโฮสต์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่โฮสต์จำเพาะภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกัน แม้ว่าจะมีการพบเชื้อเหล่านี้ในยุงหลายชนิดตามธรรมชาติ (ชูศักดิ์ และคณะ, 2548; Budi *et al.*, 2019; Cancrini *et al.*, 1997) ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียของโคนมและสุนัข/แมว ในฟาร์ม และพบการติดเชื้อไมโครฟิลาเรียอยู่ในโฮสต์จำเพาะ คือ *Setaria* spp. ในโค และพบ *Dirofilaria* spp. กับ *Brugia* spp. ในสุนัขและแมว อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัดเรื่องความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจที่ใช้ โดยวิธีการกล้องจุลทรรศน์มีความไวต่ำและไม่สามารถยืนยันสายพันธุ์ของพยาธิได้ จึงมีโอกาสตรวจไม่พบเชื้อในสัตว์ติดเชื้อบางส่วน แต่อย่างไรก็ดีข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนทางให้ความรู้แก่เกษตรกรเจ้าของสัตว์ในการรักษาและป้องกันโรคในโคและสุนัข/แมว เป็นข้อมูลสนับสนุนการป้องกันควบคุมโรคติดเชื้อฟิลาเรียในคน และควรมีการเฝ้าระวังติดตามการติดเชื้อพยาธิฟิลาเรียในสัตว์อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งเลือกใช้วิธีการตรวจที่มีความไวและความจำเพาะสูงขึ้น

#### ข้อเสนอแนะ

การพบความชุกของเชื้อไมโครฟิลาเรียทั้งในโคนมและสุนัข/แมว ในบริเวณฟาร์ม แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงของเจ้าของฟาร์มและเพื่อนบ้านในบริเวณใกล้เคียง ต่อการติดเชื้อโรคที่เกิดจากแมลงพาหะที่มีแหล่งรังโรคในสัตว์เลี้ยง เจ้าหน้าที่ต้องแนะนำเกษตรกรและชาวบ้านในชุมชนให้ตระหนักและทราบถึงแนวทางการป้องกันแก้ไข เพื่อลดปัญหาทางสาธารณสุขที่เกี่ยวข้องกับโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อในสัตว์ วางแผนติดตามการกระจายของเชื้อ และมาตรการเฝ้าระวังควบคุมการติดเชื้อฟิลาเรียในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของเกษตรกร

## กิตติกรรมประกาศ

สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดชุมพร สนับสนุนเจ้าหน้าที่และยานพาหนะในการปฏิบัติงานภาคสนาม สำนักงานปศุสัตว์เขต 8 สนับสนุนอุปกรณ์การเก็บตัวอย่าง ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชุมพร อำนวยความสะดวกด้านสถานที่พักและห้องปฏิบัติการ ความร่วมมือจากเกษตรกรเจ้าของฟาร์มโคนมจังหวัดชุมพร นักวิชาการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน (นครศรีธรรมราช) อาจารย์สาขาวิชาสัตวแพทย์ สาธารณสุข และภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ที่ร่วมปฏิบัติงานภาคสนามและห้องปฏิบัติการ ได้ให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไข จนผลงานสำเร็จจุล่งด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- ชูศักดิ์ นิธิเกตุกุล สุภาภรณ์ วรรณภิญโญชีพ ประเสริฐ สายเชื้อ และ มยุรา นิธิเกตุกุล. 2548. โรคเท้าช้างโรคที่อาจกลับเป็นปัญหาของประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร. ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 ม.ค.-ก.พ. 2549
- สีใส ยี่สุนแสง. 2555. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2555. เข้าถึงได้ที่;  
[https://appsdoe.moph.go.th/boeeng/annual/Annual/AESR2012/main/AESR55part1/file/2/0755\\_Filariasis.pdf](https://appsdoe.moph.go.th/boeeng/annual/Annual/AESR2012/main/AESR55part1/file/2/0755_Filariasis.pdf)
- สุรีย์พร ทองหมื่น. 2551. การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียในฟิล์มโลหิตหนาด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการชั้นสูตกรประจำโรงพยาบาล; เข้าถึงได้ที่;  
<http://www.longhosp.go.th/UserFiles/File/Malaria%20finding%20in%20thick%20film>.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ตอนบน. 2563. รายงานประจำปี 2562. หน้า 37 ตารางที่ 26-2 เข้าถึงได้ที่;  
[http://vrdsp.dld.go.th/webnew/images/stories/report/ANNUAL2019/ANNUAL\\_REPORT\\_](http://vrdsp.dld.go.th/webnew/images/stories/report/ANNUAL2019/ANNUAL_REPORT_)
- อาคม สังข์วรานนท์. 2541. ปรสิตวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 3-4, 156-186
- Anderson, R.C. 2000. The Superfamily Filarioidea. In Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and transmission. 2nd ed. CABI Publishing. New York. p. 467-529.
- Bowman, D.D., 2009. Geogis' parasitology for veterinarians. 9th ed. Saunders Elsevier, Missouri, pp. 115-239.
- Budi M., S. R. Umniyati, S Hadisusanto, and E. Edyansyah. 2019. Study on vector mosquito of zoonotic *Brugia malayi* in Musi Rawas, South Sumatera, Indonesia. Published online 2019 Nov 7. doi: 10.14202/vetworld.2019.1729-1734

- Cancrini G., M. Pietrobelli, A. Frangipane di Regalbono and M. P. Tampieri. 1997. Mosquitoes as vectors of *Setaria labiatopapillosa*. International Journal for Parasitology. Volume 27, Issue 9, September 1997, Pages 1061-1064
- Center for Disease Control and Prevention. 2021. Parasites - Lymphatic Filariasis. Available from: <https://www.cdc.gov>
- Chedzoy, O. B. (2006). Phi-Coefficient. In Phi-coefficient. Encyclopedia of Statistical Sciences: John Wiley and Sons, Inc. [http://flowjo.typepad.com/the\\_daily\\_dongle/files/Phi-coefficient.pdf](http://flowjo.typepad.com/the_daily_dongle/files/Phi-coefficient.pdf)
- Cornelia S., R. Beck, G. Capelli, F. Montarsi and A. Mathis. 2017. Development of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in *Aedes japonicus* and *Aedes geniculatus*. Parasites & Vectors (2017); doi: 10.1186/s13071-017-2015-x
- Domenico O., F. Dantas-Torres, Z. Cebeci, B. Yeniac, N. Buyukbabani, O. B. Boral, A. Gustinelli, T. Mounir, Y. Mutafchiev and O. Bain. 2012. Human ocular filariasis: further evidence on the zoonotic role of *Onchocerca lupi*. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/5/1/84>
- Glen, S. 2016. "Phi Coefficient (Mean Square Contingency Coefficient)" From StatisticsHowTo.com: Elementary Statistics for the rest of us! <https://www.statisticshowto.com/phi-coefficient-mean-square-contingency-coefficient/>
- Jitsamai W., P. Kamkong, S. Asawakarn and P. Taweethavonsawat. 2021. Emergence of *Dirofilaria repens* (*Spirurida: Onchocercidae*) in dogs in Eastern Thailand. doi: 10.14202/vetworld.2021.2851-2854.
- Kaewthamasorn M. and S. Wongsamee. 2006. A preliminary survey of gastrointestinal and haemoparasites of beef cattle in the tropical livestock farming system in Nan Province, northern Thailand. Parasitol Res (2006) 99: 306–308 DOI 10.1007/s00436-006-0148-5
- Kaikuntod M., Thongkorn, K., Tiwananthagorn, S., and Boonyapakorn, C. 2018. Filarial worms in dogs in Southeast Asia. Veterinary Integrative Science. 16(2): 1-17.
- Kamyngkird K., Junsiri, W., Chimnoi, W., Kengradomkij, C., Saengow, S., Sangchuto, K., Kajeerum, W., Pangjai, D., Nimsuphan, B., Inpankeaw, T. and Jittapalapong, S. 2017. Prevalence and 50 risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs and cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. Agriculture and natural resources 51(4): 299-302.

- Koray E., M. Mutinda, B. Bourke, S. A. Justi, L. Caicedo-Quiroga, J. Kamau, S. Mutura, I. K. Akunda, E. Cook, F. Gakuya, P. Omondi, S. Murray, D. Zimmerman and Y. M. Linton. 2022. Metagenomic Investigation of Ticks from Kenyan Wildlife Reveals Diverse Microbial Pathogens and New Country Pathogen Records. [Doi.org/10.3389/fmicb.2022.932224](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.932224)
- Ngasaman R., N. Keawchana and P. Rakwong. 2021. Haemoparasites infection in bullfighting cattle in southern of Thailand *Veterinary Integrative Sciences*; 19(2): 133-140. DOI; 10.12982/VIS.2021.012
- Pabutta C., N. Bangkaew, P. Inthawong, P. Mahadthai, W. Jairak, N. Soda, M. Sukmak and S. Sripiboon. 2021. The first report on internal transcribed spacer region-based characterization of microfilaria in Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916 Available at; [www.veterinaryworld.org/Vol.14/August-2021/36.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.14/August-2021/36.pdf)
- Peter F., S. M. Erickson, K. Fischer, J. F. Fuchs, R. U. Rao, B. M. Christensen and G. J. Weil. 2007. Persistence of *Brugia Malayail* DNA in Vector and Non-Vector Mosquitoes: Implications for Xenomonitoring and Transmission Monitoring of Lymphatic Filariasis. *Am J Trop Med Hyg.*; 76(3): 502–507.
- Rawangchue T., N. Sripirom and S. Sungpradit. 2022. Surveillance of zoonotic *Brugia pahangi* in monastery cats, Samphran district, Nakhon Pathom, Thailand. *Thai J Vet Med*. 52(1): 117-125.
- Sauli L., M. Solismaa, R. Kortet, J. Kuusela and A. Oksanen. 2009. Vectors and transmission dynamics for *Setaria tundra* (Filarioidea; Onchocercidae), a parasite of reindeer in Finland. *Parasites & Vectors* 2009, 2:3 doi:10.1186/1756-3305-2-3
- Sushan H., L. Dadone, S. Ferguson, P. Bapodra-Villaverde, P. M. Dennis, R. Aruho, M. J. Sadar, J. Fennessy, M. Driciru, A. B. Muneza, M. B. Brown, M. Johnston, and K. Lahmers. 2022. Giraffe skin disease: Clinicopathologic characterization of cutaneous filariasis in the critically endangered Nubian giraffe (*Giraffa camelopardalis camelopardalis*). *Veterinary Pathology*; Doi: 10.1177/03009858221082606
- Taylor M. A., R. L. Coop and B. L. Wall, 2016. *Veterinary parasitology*. 4<sup>th</sup> ed. Wiley Blackwell. West Sussex, pp. 1-109.

- Thengchaisri N., T. Inpankaew, S. Arthitwong, J. M Steiner and Panpicha Sattasathuchana. 2022. Molecular prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia* infections in pet and semi-domesticated cats in Bangkok, Thailand. doi: 10.14202/vetworld.2022.239-243. Epub 2022 Feb 3.
- Tiawsirisup S. and N. Suwannee. 2006. Vector competence of *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) for *Dirofilaria immitis* (Leidy). Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006;37 Suppl 3:110-4.
- Tiawsirisup S., 2010. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*, Leidy) and risk of infection in human. Chula. Med. J. 54, 625-635.