



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนในกลุ่มแอนไซม์

ย่อยสลายโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ

Developments of the vaccines using

protease enzymes for fasciolosis

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๓๗๖๘๐๗
สัญญาเลขที่ ๓๑/๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนในกลุ่มแอนไซม์
ย่อยสลายโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ
Developments of the vaccines using
protease enzymes for fasciolosis

ผศ.ดร.พรอนันต์ เกื้อไข

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการ
การวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 31/2560

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University
through National Research Council of Thailand (Grant no. 31/2560).

บทคัดย่อ

Fasciola gigantica cathepsinL, B (CatL, CatB) และ saposin-like protein 1 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่มีความสำคัญ มีการแสดงออกมากในเซลล์เยื่อทางเดินอาหาร และปล่อยสู่สารที่พยาธิหลั่งออกมา (ES product) ชนิดของ CatL, CatB และ SAP-1 เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกในตัวอ่อนระยะแรก ๆ ของพยาธิสำหรับการเคลื่อนที่และย่อยอาหาร ดังนั้น โปรตีน CatL, CatB และ SAP-1 น่าจะเป็นเป้าหมายสำหรับการผลิตวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในการศึกษาครั้งนี้ มีการผลิต Recombinant pro-*F.gigantica* CatL1 (rpFgCatL1), recombinant mature *F. gigantica* CatL1 (rmFgCatL1), rmFgCatL1H, rmFgCatL1G, rFgCatB2 , rFgSAP-1 ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* BL21 ซึ่งมีมวลโมเลกุล เท่ากับ 30, 25, 25, 25, 28, 56, 12 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในการทดสอบวัคซีนของโปรตีน rFgSAP-1 ใช้หนูสายพันธุ์ Imprinting Control Region (ICR) กลุ่มละ 10 ตัว โดยมีการฉีดโปรตีนครั้งละ 50 ไมโครลิตร เข้าใต้ผิวหนัง หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ได้ทำให้หนูติดเชื้อโดยป้อนตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อ (metacercariae) ตัวละ 15 metacercariae ซึ่งผลการทดสอบวัคซีนมีการแสดงระดับการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rFgSAP-1 เท่ากับ ร้อยละ 73.2 และ 74.3 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ แอนติบอดีในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนมีการทำปฏิกิริยากับ newly excysted juveniles (NEJ), 4-week-old juveniles and the ES products of 4 week-old juveniles และพบว่าในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนมีการตอบสนองทั้ง Th1 และ Th2 ซึ่งสอดคล้องกับระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ที่เพิ่มขึ้น ระดับของเอนไซม์ตับ Serum Glutamic Oxaloacetic Transferase (SGOT) และ Serum Glutamic Pyruvate Transferase (SGPT) ในกลุ่ม rFgSAP-1 แสดงให้เห็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม รอยโรคที่เกิดกับตับในกลุ่มวัคซีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า โปรตีน rFgSAP-1 มีศักยภาพในการเป็นวัคซีนป้องกันพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และอาจจะมีการทดสอบในสัตว์เคี้ยวเอื้องและมนุษย์ต่อไป

Abstract

In *Fasciola gigantica* cathepsin L and B (CatL, CathB), leucine aminopeptidase (LAP), saposin-like proteins (SAP) are a family of predominant proteases that is expressed in caecal epithelial cells and secreted into the excretory-secretory products (ES). CatL, SAP, LAP and CatB isotypes are expressed in both early and late stages of the life cycle and the parasites use them for migration and digestion. Therefore, CatL, SAP, LAP and B are a plausible target for vaccination against this parasite. Recombinant pro-*F.gigantica* CatL1 (rpFgCatL1), recombinant mature *F. gigantica* CatL1 (rmFgCatL1), recombinant mature *F.gigantica* CatL1G (rmFgCatL1G), recombinant mature *F.gigantica* CatL1H (rmFgCatL1H), recombinant *F. gigantica* SAP-1 (rFgSAP-1), recombinant *F. gigantica* SAP-2 (rFgSAP-2), recombinant *F. gigantica* LAP (rFgLAP), and recombinant mature *F. gigantica* CatB2 (rmFgCatB2) were expressed in *Escherichia coli* BL21 at molecular weight 30, 25, 25, 25, 12, 12, 56, 28 kDa, respectively. By immunoblotting and immunohistochemistry, rabbit IgG anti-rFgSAP-1 reacted with rFgSAP-1 at a molecular weight 12 kDa, but not with rFgSAP-2. The rFgSAP-1 reacted with antisera from mouse infected with *F. gigantica* metacercariae collected at 2, 4, and 6 weeks after infection. The FgSAP-1 protein was expressed at a high level in the caecal epithelium of metacercariae and NEJ. The vaccination was performed in Imprinting Control Region (ICR) mice (n=10) by subcutaneous injection with 50 µg of rFgSAP-1 combined with Alum adjuvant. Two weeks after the second boost, mice were infected with 15 metacercariae by the oral route. The level of protection of rFgSAP-1 vaccines was estimated to be 73.2% and 74.3% when compared with non vaccinated-infected and adjuvant-infected controls, respectively. By determining the levels of IgG1 and IgG2a in the immune sera, which are indicative of Th2 and Th1 immune response, respectively, it was found that both Th1 and Th2 responses were significantly increased in rmFgCatL1G-immunized groups compared with the control groups, with higher levels of Th2 (IgG1) than Th1 (IgG2a). The levels of Serum Glutamic Oxaloacetic Transferase (SGOT) and Serum Glutamic Pyruvate Transferase (SGPT) in rFgSAP-1-immunized group showed significant decrease when compared to control groups. The pathological lesions of liver in vaccinated groups were significantly decreased when compared with control groups. This study indicates that rFgSAP-1 has a potential as a vaccine candidate against *F. gigantica* in mice, and this potential will be tested in ruminants.

Keywords : Vaccine, saposin-like protein 1, *Fasciola gigantica*, mice

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	5
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
เนื้อเรื่อง	8
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	8
การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ	8
การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย <i>L. ollula</i>	8
การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ	9
การสังเคราะห์ recombinant FgCatL1	9
การทดสอบคุณสมบัติของพัฒนาวัคซีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน	9
ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน	11
การตรวจวิเคราะห์ระดับแอนติบอดี	11
วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล	11
ผลการวิจัย	12
การ clone cDNA ของ CatL, B	12
การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน	12
การศึกษาคุณลักษณะของโปรตีน SAP-1 โดยวิธี immunoblot	14
การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	15
การศึกษาหาแอนติบอดีต่อ FgSAP-1 ในซีรัมที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ	16
การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SAP-1 โดยวิธี immunohistochemistry	17
การทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของโปรตีน	18
การศึกษาการทดสอบศักยภาพเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์ rFgSAP-1 ในหนู ICR	20
ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 & IgG2a) กับจำนวนพยาธิ	21
ระดับแอนติบอดี (SGOT และ SGPT)	22
สรุปผลการวิจัย	24
อภิปรายและวิจารณ์	24
ผลผลิต	25
รายงานการเงิน	26
บรรณานุกรม	27

ภาคผนวก	32
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ	32
ประวัตินักวิจัย	41

สารบัญตาราง (List of Table)

		หน้า
ตารางที่ 1	สรุปผลการทดสอบวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่คณะผู้วิจัยได้ทดลอง	3
ตารางที่ 2	สรุปการทดลองวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่ตีพิมพ์	3
ตารางที่ 3	ตารางแสดงร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ	19
ตารางที่ 4	แสดงค่าความเสียหายของตับ (liver damage lesion)	22

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงผลการสังเคราะห์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว	13
รูปที่ 2 แสดงผลการสังเคราะห์โปรตีน rFgSAP-1	14
รูปที่ 3 แสดงผลการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	15
รูปที่ 4 แสดงกราฟการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA	16
รูปที่ 5 การแสดงออกของโปรตีน FgSAP-1 ด้วยวิธี immunohistochemistry	17
รูปที่ 6 แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยวิธี IgG1 & IgG2a	20
รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับจำนวนพยาธิ	21
รูปที่ 8 แสดงระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT)	23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

SAP-1	saposin-like protein 1
SAP-2	saposin-like protein 2
LAP	leucine aminopeptidase
CatL1	Cathepsin L1
CatB	Cathepsin B
r	recombinant
Fg	<i>Fasciola gigantica</i>
NEJ	Newly excysted juvenile
JV	Juvenile
AD	Adult
ES	Excretion-secretion
TA	Tegumental antigen
cDNA	Complementary DNA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
AP	alkaline phosphatase
NBT/BCIP	nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indodyl phosphate
SGOT	Serum Glutamic Oxaloacetic Transferase
SGPT	Serum Glutamic Pyruvate Transferase
WB	Whole body
Ig	Immunoglobulin

บทนำ (Introduction)

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แพะ และแกะที่เลี้ยงในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะต่อเกษตรกรและอุตสาหกรรมการสัตว์เลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตเนื้อและนม จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8 และในบางพื้นที่อัตราการติดเชื้ออาจสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่มีอาชีพเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละไม่น้อยกว่า 300 ล้านบาท (Sukhapesna et al., 1990; Sirihakim and Pholpark, 1991) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่ามีความคิดเชื่อพยาธิ ชนิดนี้ไม่น้อยกว่า 30 ราย และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ในประเทศเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการแพร่ กระจายของหอยพาหะอย่างกว้างขวางในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา

เมื่อสัตว์เคี้ยวเอื้องหรือมนุษย์กินตัวอ่อนระยะติดต่อก็คือระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าไป ผนังหุ้มตัวอ่อนระยะนี้จะถูกทำลายโดยน้ำย่อยทำให้ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile (NEJ) ออกจากซิสต์บริเวณลำไส้เล็กของโฮสต์ NEJ จะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าไปในช่องท้องภายในลำตัวของโฮสต์ และเคลื่อนไปสู่ตับแล้วเจริญเป็นพยาธิตัวอ่อนซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อของตับ ทำให้เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเกิด haemorrhage และ fibrosis ในเนื้อตับ เมื่อพยาธิเจริญเป็นตัวเต็มวัยก็จะเดินทางไปที่อาศัยในท่อน้ำดีโดยใช้อวัยวะยึดเกาะ (oral และ ventral suckers) เกาะผนังของท่อน้ำดี เนื่องจากมีความต้องการอาหารในปริมาณสูง พยาธิจะทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสต์บริเวณที่พยาธิอาศัยอยู่ จากการเคลื่อนที่ไปมา พยาธิใช้ oral sucker กัดหรือฉีกเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดเพื่อดูดกิน ในขณะที่หนามบริเวณผนังลำตัวจะครูดและทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ในขณะที่พยาธิเคลื่อนที่ไปมา เอนไซม์และสารที่พยาธิหลั่งออกมา โดยเฉพาะกลุ่ม proteases และ lytic proteins จะช่วยทำลายและย่อยสลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสต์มากยิ่งขึ้น เอนไซม์กลุ่ม endoproteases ในกลุ่ม cathepsin L (CatL) ,cathepsin B (CatB) และกลุ่ม exopeptidases ในสกุล leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิหลั่งออกมาในสารคัดหลั่ง (excretion-secretion (ES) material) และพบว่ามียูในพยาธิตั้งแต่ระยะ NEJ จนกระทั่งระยะตัวเต็มวัย โดยอาจมี isotype ที่ปรับเปลี่ยนไปเช่น CathB3 ถูกสร้างและปล่อยโดย NEJ ในช่วงที่ไชเข้าเนื้อเยื่อของโฮสต์ ส่วน CatB2 พบในชั้นตัวอ่อน และ CatB1 เป็นเอนไซม์หลักในตัวเต็มวัย (Meemon et al., 2004) เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายตัวที่ tegumental cells และ caecal epithelial cell ในตัวพยาธิ (Carmona et al., 1993; Smith et al., 1993; Creaney et al., 1996; Wilson et al., 1998; Law et al., 2003; Meemon et al., 2004) นอกจากนั้นพยาธิจะขับ lytic protein ที่ช่วยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก ได้แก่ สารพวก saposin-like protein (SAP) ซึ่งจะจับกับไขมันบนผนังเซลล์ทำให้เกิดรูและทำให้เซลล์ของโฮสต์แตกออกเพื่อเป็นอาหารพยาธิต่อไป

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติบางประการของยีน saposin-like protein (SAP) สองชนิดในพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. hepatica* (FhSAP-1 และ FhSAP-2) (Reed et al., 1998; Reed et al., 2000;

Espino and Hillyer, 2003) โปรตีนทั้งสองตัวนี้มีน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างคล้ายกับโปรตีน amoebopore ของ *Entamoeba* spp. ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มเดียวที่มีการศึกษาและวิเคราะห์คุณสมบัติของ SAP อย่างสมบูรณ์ที่สุด นอกเหนือจากโปรตีน SAP แล้ว ยังพบโปรตีน NK-lysin และ granulysin ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่มีคุณสมบัติคล้ายกันกับโปรตีน amoebopore โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ของโปรโตซัว จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์แปลกปลอมทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์เป้าหมายแตก (Zhai and Saier, 2000; Bruhn, 2005) โปรตีนกลุ่มนี้จึงถูกใช้เป็นกลไกในการป้องกันตัว และย่อยอาหารของอะมีบา ส่วนในพยาธิ *Fasciola* SAP ถูกใช้สำหรับการสลายสารอาหาร โดยเฉพาะการสลายเซลล์เม็ดเลือดซึ่งเป็นอาหารหลัก (Espino and Hillyer, 2003) เซลล์เม็ดเลือดที่แตกออกจะถูกพยาธินำมาใช้เป็นอาหาร โดยมีเอนไซม์โปรตีนสลาย proteases ดังกล่าวแล้ว ออกมาย่อย อีกต่อหนึ่งจนกลายเป็นโมเลกุลเชิงเดี่ยวที่ถูกดูดซึมผ่านทางผนังลำไส้เข้าสู่ตัวพยาธิ

การศึกษาเพื่อทดลองหาวัคซีนป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. เริ่มต้นเมื่อประมาณ 20 ปีที่แล้วมา โดยเริ่มจากการทดลองใช้แอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัว และสารที่พยาธิตัวเต็มวัยหลั่งออกมาโดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ พบว่าให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้แต่ไม่ดีเท่าที่ควร วัคซีนที่ให้ผลดีพอสมควรคือวัคซีนที่เตรียมจากพยาธิตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์ตาเรียที่ถูกฉายรังสี ซึ่งสามารถให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้ถึง 69-80% (Nansen, 1975; Hall and Lang, 1978; Haroun and Hilyer, 1986) แต่มักจะทำให้เกิดสภาวะแทรกซ้อน เช่น การเป็นถุงน้ำ (cysts) ที่อวัยวะต่าง ๆ เช่น ปอด เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของ NEJ ที่ถูกฉายแสงแล้วไปอยู่ที่อวัยวะเหล่านั้นก่อนที่จะสลายไป ต่อมาได้มีการศึกษาทดลองโดยใช้วัคซีนที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งแยกให้บริสุทธิ์เสียก่อน ด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าให้ผลดีพอสมควรในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ แต่ก็เตรียมและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก ปัจจุบันวัคซีนตัวเลือกที่ได้ถูกนำมาใช้คือโปรตีนที่มีความสำคัญในการดำรงชีพของพยาธิดังที่กล่าวมาแล้ว โปรตีนตัวแรก ๆ ที่ถูกนำมาใช้คือโปรตีนในกลุ่ม FABPs (Hillyer *et al.*, 1987; Tendler *et al.*, 1995; Aban *et al.*, 1999) และโปรตีนในกลุ่ม antioxidant enzymes โดยเฉพาะ glutathione-S-transferase (GST) (Sexton *et al.*, 1990; Sexton *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 1996) ต่อมาได้มีการนำโปรตีนในกลุ่ม proteases ได้แก่ Cath L และ LAP มาใช้ (Wijffels *et al.*, 1994; Dalton *et al.*, 1996; Estuningsih *et al.*, 1997; Muro *et al.*, 1997; Mulcahy *et al.*, 1998; Piacenza *et al.*, 1999) ซึ่งปรากฏว่าได้ผลดีพอสมควร โดยเฉพาะการใช้ CatL กับ LAP และ heme โปรตีนทำให้พยาธิตัวเต็มวัยไม่ออกไข่และตายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นวัคซีนของ recombinant FhSAP-2 ต่อ *F. hepatica* ในกระต่าย และพบว่าโปรตีนนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนที่ดี โดยมีจำนวนพยาธิลดลงถึงร้อยละ 81.2 และจำนวนไข่พยาธิในอุจจาระและน้ำดีของสัตว์ทดลองลดลงร้อยละ 83.8 และ 73 ตามลำดับ (Espino and Hillyer, 2003)

ตารางที่ 1 สรุปผลการทดสอบวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่คณะผู้วิจัยได้ทดลอง

Protein	Expression system	Animal	%protection	References
rFgSAP-2	<i>E. coli</i>	Mice	78.5	Kueakhai et al., 2013
rFgLAP	<i>E. coli</i>	Mice	64.3	Changklung et al., 2013
rFgCatL1H	Yeast	Mice	66	Sansri et al., 2015
rFgCatB2	Yeast	Mice	60	Chantree et al., 2013
rFgCatB3	Yeast	Mice	66	Chantree et al., 2013
rFgSOD	<i>E. coli</i>	Mice	45	Jaikua et al., 2016
rFgCatL1	<i>E. coli</i>	Mice	39-47	Kueakhai et al., 2015

ตารางที่ 2 สรุปผลการทดลองวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่ตีพิมพ์

Protein	Type	Species	Animal	%protection	Reference
Hb	N	<i>F. hepatica</i>	Cattle	43.8	Dalton et al., 1996
CP		<i>F. gigantica</i>	Sheep	56.9	EL-Ahwany et al., 2012
B	R	<i>F. hepatica</i>	Rat	63.0	Jayaraj et al., 2009
L1	N	<i>F. hepatica</i>	Cattle	42.5	Dalton et al., 1996
	N	<i>F. hepatica</i>	Sheep	34.0	Piacenza et al., 1999
	R	<i>F. hepatica</i>	Cattle	48.2	Golden et al., 2010
L1G	R	<i>F. hepatica</i>	Cattle	43.0	Jayaraj et al., 2010
L2	N	<i>F. hepatica</i>	Cattle	43.0	Dalton et al., 1996
	N	<i>F. hepatica</i>	Sheep	33.0	Piacenza et al., 1999
L3	R	<i>F. hepatica</i>	Rat	52.0	Reszka et al., 2005
L5	R	<i>F. hepatica</i>	Rat	59.0	Jayaraj et al., 2009
LAP	N	<i>F. hepatica</i>	Sheep	89.6	Piacenza et al., 1999
	R	<i>F. hepatica</i>	Rabbit	78.0	Acota et al., 2008
	R	<i>F. gigantica</i>	Buffalo	0.0-8.4	Raina et al., 2011
	R	<i>F. hepatica</i>	Sheep	49.5-86.9	Maggioli et al., 2012
L1+L2	N	<i>F. hepatica</i>	Cattle	54.0	Mulcahy et al., 1998
	N	<i>F. hepatica</i>	Sheep	60.0	Piacenza et al., 1999
L1+L2+LAP	N	<i>F. hepatica</i>	Sheep	79.0	Piacenza et al., 1999
LAP+Prx	R	<i>F. gigantica</i>	Buffalo	0.0	Raina et al., 2011

L1+Hb	N	<i>F. hepatica</i>	Cattle	51.9	Dalton et al., 1996
L2+Hb	N	<i>F. hepatica</i>	Cattle	72.4	Dalton et al., 1996
	N	<i>F. hepatica</i>	Cattle	72.4	Mulcahy et al., 1998
B+L5	R	<i>F. hepatica</i>	Rat	76.0	Jayaraj et al., 2009
B+L1G	R	<i>F. hepatica</i>	Rat	62.0	Jayaraj et al., 2009
L5+L1G	R	<i>F. hepatica</i>	Rat	52.0	Jayaraj et al., 2009
B+L5+L1G	R	<i>F. hepatica</i>	Rat	52.0	Jayaraj et al., 2009
SAP2	R	<i>F. hepatica</i>	Mice	60.0	Espino et al., 2010

หมายเหตุ N=โปรตีนจากพยาธิ, R=รีคอมบิแนนท์แอนติบอดี

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แกะ และคนในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านเกษตรอุตสาหกรรมสัตว์เลี้ยงของประเทศในอัตราสูง จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ ร้อยละ 11.8 และในบางบริเวณของประเทศไทยอาจมีอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม การเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ เนื่องจากทำให้ผลผลิตเนื้อ นม และการใช้แรงงานลดลงอย่างมาก มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละประมาณ 300 ล้านบาท (Sukhapesna et al., 1990 : Sirihakim and Pholpark, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในประเทศไทย มีคนติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* มีแนวโน้มจะมากขึ้นเนื่องจากการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ในประเทศ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* และ *F. hepatica* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์

รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถช่วยลดการติดเชื้อ *Fasciola* spp. ได้จริงและมีโอกาสประสบความสำเร็จอย่างมากที่จะทำให้ลดการติดเชื้อถึงร้อยละ 95-99 ซึ่งในประเทศไทยจะมีรายงานการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในคนน้อยนั้น ไม่สามารถแปรผลได้ว่าประเทศไทยไม่มีการระบาดของของโรค Fasciolosis เป็นเพราะคนส่วนใหญ่ของประเทศไม่ได้รับการตรวจทางการแพทย์ เนื่องจากพฤติกรรมของคนไทยนั้นถ้าอาการของโรคไม่รุนแรงมากก็จะไม่ไปตรวจรักษา ซึ่งถ้าติดเชื้อ *F. gigantica* น้อยก็จะไม่แสดงอาการของโรคมักมาก ในทางตรงกันข้ามคนไทยนิยมบริโภคผักสด และผักบางชนิดนั้นปลูกในน้ำ เช่น ผักคะน้า ผักบุ้งไทย เป็นต้น ดังนั้นคนไทยจึงตกอยู่ในภาวะเสี่ยงเป็นโรค Fasciolosis จากพฤติกรรมการบริโภคโดยไม่รู้ตัว และอีกประการที่สนับสนุนได้ว่า *F. gigantica* มีการติดเชื้อในคนได้มากเช่นกันดังมีรายงานการติดเชื้อ *F. gigantica* ในกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และแอฟริกาเหนือ ส่วน

การติดเชื้อ *F. hepatica* มีรายงานการติดทั้งคนและสัตว์เช่นกัน ในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ออกเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เช่น เชียงใหม่ ปทุมธานี เพชรบุรี นครราชสีมา ยังพบวัวและควายติดเชื้อ *F. gigantica* อยู่ หรือสัตว์บางตัวไม่มีตัวพยาธิให้เห็นแต่กลับมีรอยโรค fasciolosis ให้เห็นอยู่ แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันการแพร่ระบาดของโรค fasciolosis ในประเทศไทยนั้นไม่ได้ลดลงเลย น่าจะเพิ่มขึ้นมากยิ่งขึ้นอีก ภาวะโรคร้อนยิ่งเป็นตัวเร่งของวงจรชีวิตของ *Fasciola* spp. ให้เร็วและเพิ่มขึ้นด้วย ในสถานการณ์ปัจจุบันมีการนำวัวจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า บังคลาเทศ เข้ามา ซึ่งวัวในแถบนั้นมีการติดเชื้อ *Fasciola* spp. อยู่มาก และในอนาคตมีโอกาสมากที่เชื้อ *F. hepatica* จะมาแพร่ระบาดในประเทศไทยด้วย จึงยิ่งทำให้สถานการณ์การแพร่ระบาดไม่อาจหายไปได้เลย ดังมีรายงานหอยในแหล่งน้ำสาธารณะมีการติดเชื้อ *F. gigantica*

พันธุกรรมของ *F. gigantica* และ *F. hepatica* นั้นมีความคล้ายกันร้อยละ 95-100 จึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะผลิตวัคซีนให้ได้ป้องกันครอบคลุมทั้งสองชนิด และปัญหาโรค fasciolosis ยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขและปศุสัตว์อยู่มาก จึงเป็นโอกาสทางการค้าที่ประเทศไทยจะสามารถผลิตวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ได้เองและสร้างมูลค่ารายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างดี และถ้างานวิจัยนี้สามารถเป็นวัคซีนที่ใช้งานได้จริงซึ่งจะเป็นต้นแบบแนวคิดที่จะสร้างวัคซีนสำหรับโรคพยาธิอื่นๆ เช่น *Opisthorchis viverrini* ที่มีการแพร่ระบาดมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ดังนั้นคณะผู้วิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ได้ จึงคิดที่จะต่อยอดงานวิจัยให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสร้างชื่อเสียงกับมหาวิทยาลัยและประเทศชาติ

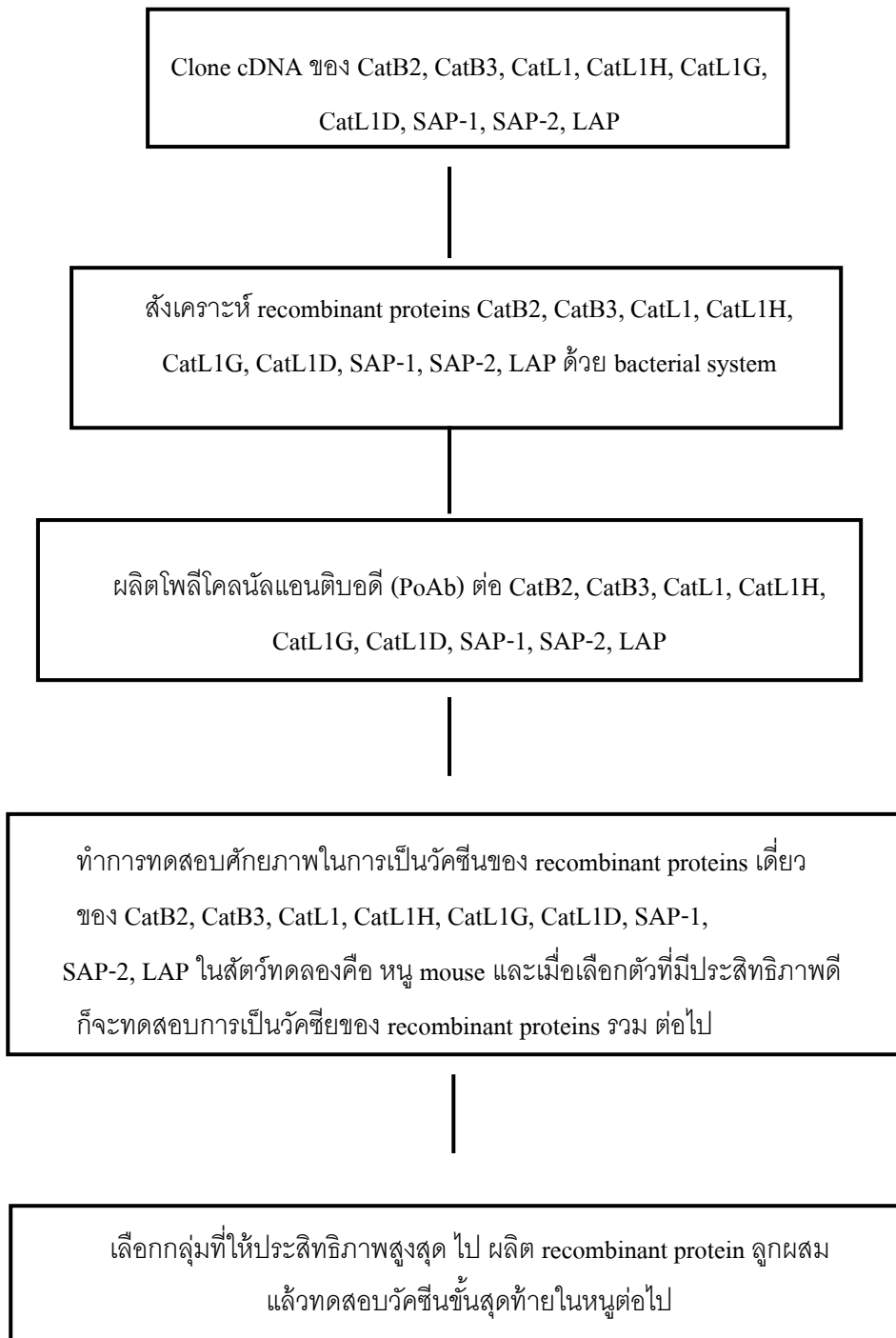
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

การพัฒนาและปรับปรุงศักยภาพของวัคซีนที่สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และ *F. hepatica* โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน จากกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ cathepsin B (CatB), cathepsin L (CatL), leucine aminopeptidase (LAP) และ saposin (SAP) ในหนูทดลอง

1. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์แอนติเจนเดี่ยว (single recombinant protein vaccine) ที่ผลิตจาก *E. coli*
2. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์แอนติเจนรวม (combine recombinant protein vaccine) ที่ผลิตจาก *E. coli*
3. การพัฒนารีคอมบิแนนท์แอนติเจนลูกผสมและศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์แอนติเจนลูกผสม (hybrid recombinant protein vaccine) ที่ผลิตจาก *E. coli*

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

โรคพยาธิส่วนใหญ่ซึ่งรวมทั้งโรคพยาธิใบไม้ตับไม่มีทางที่จะกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ เนื่องจากพยาธิชนิดนี้มีวงจรชีวิตที่แทรกซึมอยู่ในสภาพแวดล้อม โดยมีวงจรชีวิตส่วนหนึ่งที่พัฒนาเฉพาะในหอย *lymnae* ที่เป็นพาหะกลาง (intermediate host) ซึ่งมีกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำต่าง ๆ และไม่อาจจะกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ มาตรการที่จะช่วยให้สามารถควบคุมการติดเชื้อในประชากรของสัตว์ที่เป็นพาหะเฉพาะ (definitive hosts) ได้แก่ วัว ควาย แพะ แกะ ตลอดจนมนุษย์ (ซึ่งเป็น accidental hosts) เพื่อป้องกันการติดเชื้อซ้ำซ้อนจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวัคซีนที่สามารถลดอัตราการติดเชื้อของพยาธิตัวอ่อน (newly excysted juvenile-NEJ) และ/หรือวัคซีนที่สามารถทำลายพยาธิตัวเต็มวัยหรือลดอัตราการออกไข่ของพยาธิ วัคซีนดังกล่าวคือ กลุ่มของแอนติเจนที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพยาธิ และไม่มีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับโปรตีนกลุ่มเดียวกันในโฮสต์ โดยเฉพาะกลุ่มเอนไซม์โปรตีเอส (proteases) ได้แก่ CatB/L/D และ LAP ซึ่งพยาธิใช้ในการย่อยอาหาร กับกลุ่มสารที่ช่วยทำให้ผนังเม็ดเลือดแดงที่พยาธิกินเป็นอาหารแตก เช่น SAP



แผนผังแสดงวิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวาร

คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์บทความวิชาการในวารสารนานาชาติที่มี impact factor ค่อนข้างดี (Q1 หรือ Q2) ได้ไม่น้อยกว่า 1 บทความ

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันผลิตสัตว์และสุขภาพสัตว์
2. สถาบันบำรุงพันธุ์และวิเคราะห์โรคสัตว์ กรมปศุสัตว์
3. ฟาร์มปศุสัตว์
4. เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์รายย่อย

เนื้อเรื่อง (Main body)

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ

นำเอาตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจากไข่พยาธิไปติดเชื้อในหอย *Lymnaea ollula* ซึ่งนำมาจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อให้ได้ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียสำหรับการทดลองได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากหอย *L. ollula* เป็นพันธุ์ที่มีความทนต่อการติดเชื้อพยาธิกว่าหอย *Radix rubiginosa* ซึ่งเป็นพาหะกลางของพยาธิใบไม้ตับ โค กระบือ ตามธรรมชาติในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงหอย *L. ollula* กระทำโดยนำหอยตัวเต็มวัยประมาณ 30 ตัว ใส่ในอ่างพลาสติกสีขาว ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 ซม. สูงประมาณ 9 ซม. ภายในอ่าง ใส่ดินเหนียวและก้อนหิน ทำเป็นทางลาดเพื่อให้หอยวางไข่ เติมน้ำให้ท่วมดินเหนียวและก้อนหินประมาณ 2 ซม. ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงไปใอ่างน้ำตลอดเวลา และให้แสงสว่างโดยใช้ไฟนีออนขนาด 40W เป็นเวลา 8 ชม. ต่อวัน ให้อาหารคือผักกาดหอม

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*

(1) นำเอาไข่พยาธิที่ได้จากถุงน้ำดีของโคหรือกระบือที่ติดเชื้อพยาธิมาล้างน้ำตอกด้วยน้ำที่ปราศจากคลอรีน จากนั้นรวมเอาไข่ที่ได้ใส่จานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 ซม. เติมน้ำให้ท่วมผาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการพัฒนาของไข่พยาธิทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope) พยาธิใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน จึงจะเจริญเป็นระยะไมราซิเดียม และฟักออกมาจากไข่

(2) นำหอยที่โตเต็มที่ขนาดประมาณ 4-5 มม. แยกออกมาใส่ถ้วยพลาสติกซึ่งบรรจุน้ำปราศจากคลอรีน ดูดเอาตัวอ่อนพยาธิระยะไมราซิเดียม จำนวน 2 ตัว ใส่ลงในถ้วยที่ใส่หอยไว้แล้วใช้หลอดไฟขนาด 40W ส่องห่าง ๆ เพื่อช่วยกระตุ้นไมราซิเดียมซึ่งไวต่อแสง ตั้งถ้วยทิ้งไว้ประมาณ 2 ชม. เพื่อให้ไมราซิเดียมไชเข้าไปในหอย หลังจากนั้นแยกเอาหอยออกมาเลี้ยงตามปกติ

การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercariae) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อนพยาธิใช้เวลาในการเจริญในหอยประมาณ 6 สัปดาห์ จึงจะได้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งจะออกจากหอยมาว่ายอยู่ในน้ำ หลังการติดเชื้อได้สัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มตรวจดูหอยที่ติดเชื้อไว้ และแยกหอยที่ติดเชื้อออกมาเลี้ยงรวมกันในที่ซึ่งพรางแสง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียออกมาจากหอย

สำหรับการเก็บตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียดำเนินการดังต่อไปนี้

- (1) นำหอยที่ได้ติดเชื้อไว้แล้วแยกใส่ถ้วยพลาสติกใสที่มีน้ำปราศจากคลอรีนทำเช่นนี้ทุกวันเว้นวัน
- (2) ใช้แผ่นพลาสติกบางใสขนาด 5x5 ซม. ใส่ลงในถ้วย
- (3) ใช้โคมไฟขนาด 40W ส่องกระตุ้นให้เซอร์คาเรียออกจากหอย
- (4) ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่ออกมาจากหอยจะว่ายอยู่ในน้ำระยะเวลาสั้น ๆ แล้วจึงเกาะกับแผ่น พลาสติก สลัดทางทิ้ง สร้างซิสต์ระยะเมตาเซอร์คาเรียขึ้นมา
- (5) หลังจากนั้นประมาณ 2 ชม. แยกเอาหอยออกไปเลี้ยงตามเดิม นำเอาแผ่นพลาสติกออกมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บแผ่นพลาสติกที่มีเมตาเซอร์คาเรียไว้ในตู้เย็น ซึ่งเมตาเซอร์คาเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 1 สัปดาห์

การสังเคราะห์ recombinant proteins

กระบวนการผลิต recombinant proteins ของจีนเป้าหมายจะกระทำโดยใช้ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนและสุดท้ายทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน recombinant protein vaccine

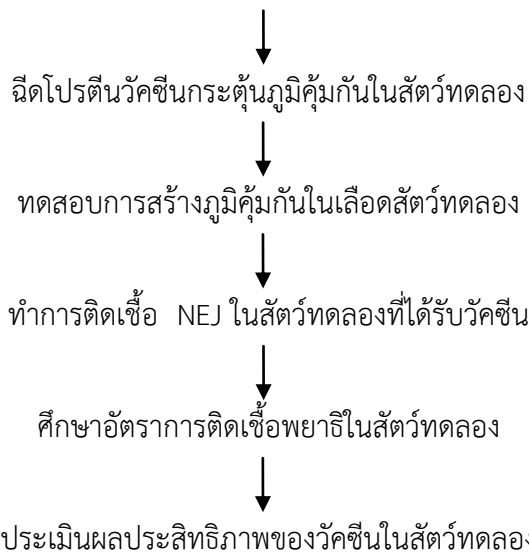
กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั้งในรูปของโปรตีนเดี่ยว (single vaccine) โปรตีนผสม (cocktail vaccine) และโปรตีนลูกผสม (hybrid protein vaccine) โดยผสมกับสาร adjuvants เช่น Freund ในการศึกษาส่วนนี้ผู้ทำการวิจัยจะทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองต่อ recombinant proteins เป้าหมาย (CatB, CatL, SAP, LAP) โดยเลือกใช้ Freund's เป็น adjuvant โดยทำการฉีดกระตุ้น 2 วิธี เพื่อเปรียบเทียบผล คือ ใต้ผิวหนัง โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง กลุ่มทดลองละ 10 ตัว ได้แก่

- กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดกระตุ้นใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ 1
- กลุ่มที่ 2 ทำการฉีดกระตุ้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มีโปรตีนผสมเป็นกลุ่มควบคุมที่ 2
- กลุ่มที่ 3 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย บัฟเฟอร์ผสมกับ adjuvant

กลุ่มที่ 4 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย recombinant protein 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง

นำโปรตีนจำนวน 50 ไมโครกรัม ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline) ผสมกับ Freund' s Adjuvant ในปริมาณเท่า ๆ กัน และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจนกระทั่งเหนียวข้นไม่แตกตัว กระจาย และจับตัวเป็นกลุ่มเมื่อหยดทดสอบลงในน้ำ จากนั้นฉีดเข้าช่องท้องหนูหรือใต้ผิวหนังโดยฉีด ทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยผสมโปรตีน Complete Freund's Adjuvant สำหรับการฉีดครั้งแรก และจะผสมโปรตีนกับ Incomplete Freund's Adjuvant สำหรับการฉีดครั้งต่อไป เมื่อครบ 2 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งที่ 3 จะเก็บเลือดจากหางหนูเพื่อทดสอบการสร้างภูมิคุ้มกันในหนู และจากนั้นจะทำการทดสอบการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ โดยการป้อนเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 15 เม็ด และหลังจากป้อนเมตาเซอร์คาเรีย 4 สัปดาห์ จะฆ่าหนูเพื่อคำนวณหาค่าร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อ

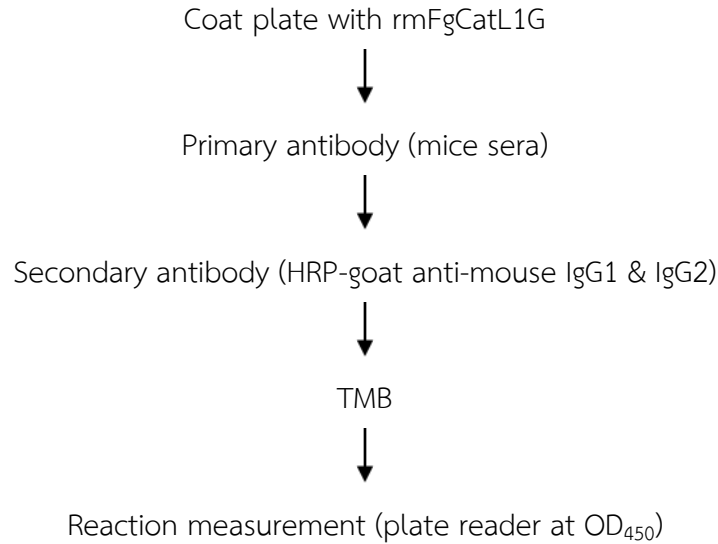
ทำการสังเคราะห์โปรตีน



แผนภูมิ แสดงแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาโปรตีนวัคซีน เพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันการติดเชื้อพยาธิ

ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

ทำการวัดระดับของ immunoglobulin (Ig) โดยเฉพาะ IgG1 และ IgG2 เพื่อดูการตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์ FgCatL1G โดยวิธี indirect ELISA



แผนภูมิที่ 2 แสดงการทำ ELISA

การนับจำนวนพยาธิ

หนูถูกทำให้ตายด้วย ether หลังจากการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ 4 สัปดาห์ แล้วนำตับหนูออกมาใส่ในน้ำเกลือ และฉีกตับหนูให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปล่อยให้ตัวพยาธิออกมาจากตับ หลังจากนั้นนับจำนวนพยาธิจากตับของหนูแต่ละตัว เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

ตรวจวัดระดับ liver enzymes ในเลือด

ตรวจวัดระดับ เอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT) เพื่อตรวจวัดความผิดปกติของตับ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (automatic machine)

วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

1. ทำการคำนวณหาค่า % protection ของกลุ่มที่ 4 และ 5 โดยเทียบกับกลุ่มที่ 2 และ 3 ดังสูตรด้านล่าง

$$\% \text{ Protection} = (A - B)/A \times 100$$

“A” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มควบคุมที่ 1 หรือ 2

“B” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มทดสอบที่ 3 หรือ 4

2. เปรียบเทียบ ระดับของแอนติบอดี และ เอนไซม์ตับ ของกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ one-way ANOVA and Kruskal-Wallis Test และ ใช้โปรแกรม SPSS version 18.0 ในการคำนวณ และ ที่ $p \leq 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

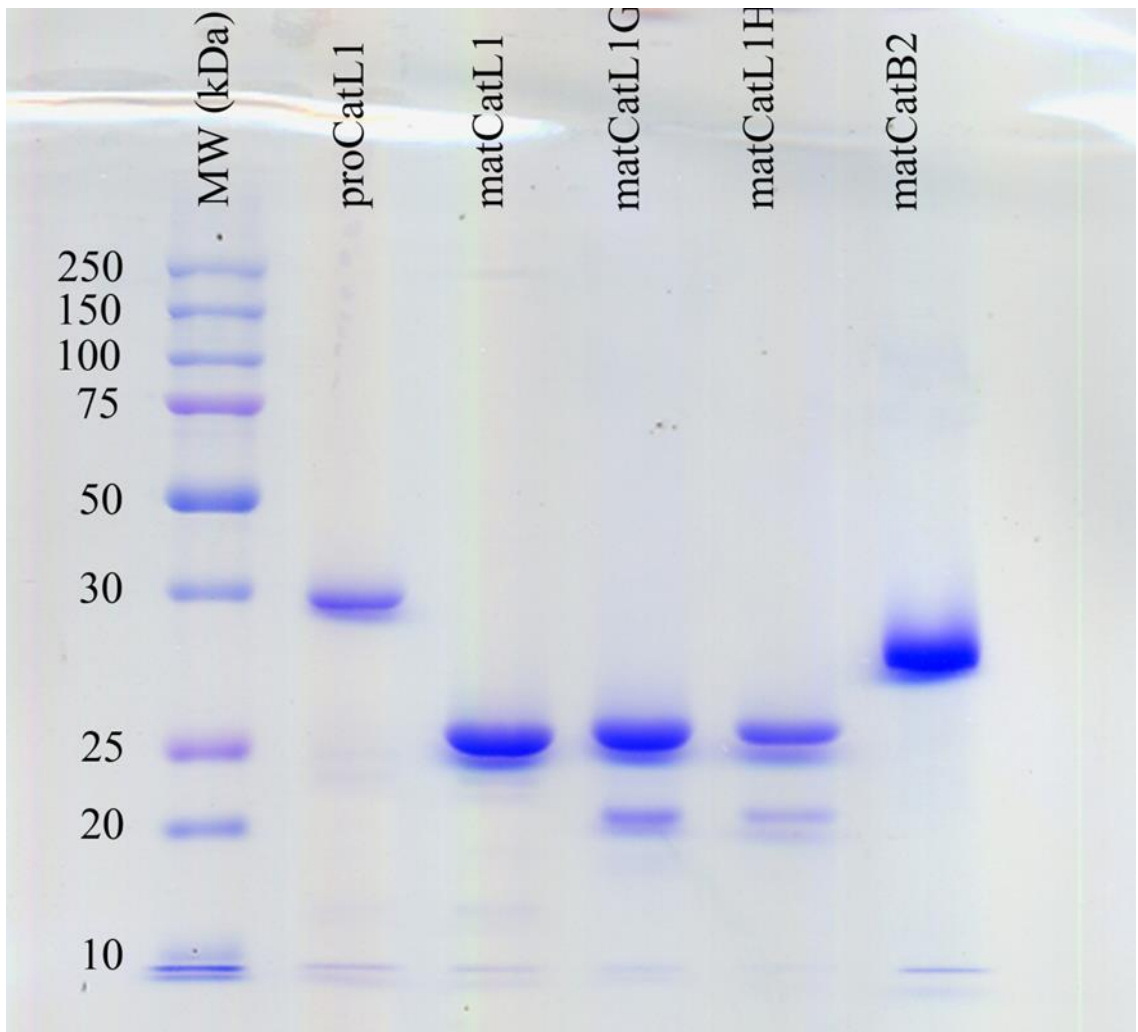
ผลการวิจัย (Results)

1. การ clone cDNA ของ CatL1, CatL1H, CatL1G, CatL1D, CatB2, SAP2 และ LAP แล้ว ยีน

ได้ทำการโคลนยีน CatL1, CatL1H, CatL1G, CatL1D, CatB2, SAP2 และ LAP โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ cDNA libraries จาก *F.gigantica* เป็น template หลังจากนั้นได้ทำการผลิต recombinant DNA โดย ligate ยีนที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทำการวิเคราะห์หาลำดับ DNA โดย MacroGen Inc (South Korea) หลังจากนั้นวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยโปรแกรม BLAST (The National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) และ SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

2. สังเคราะห์ recombinant protein

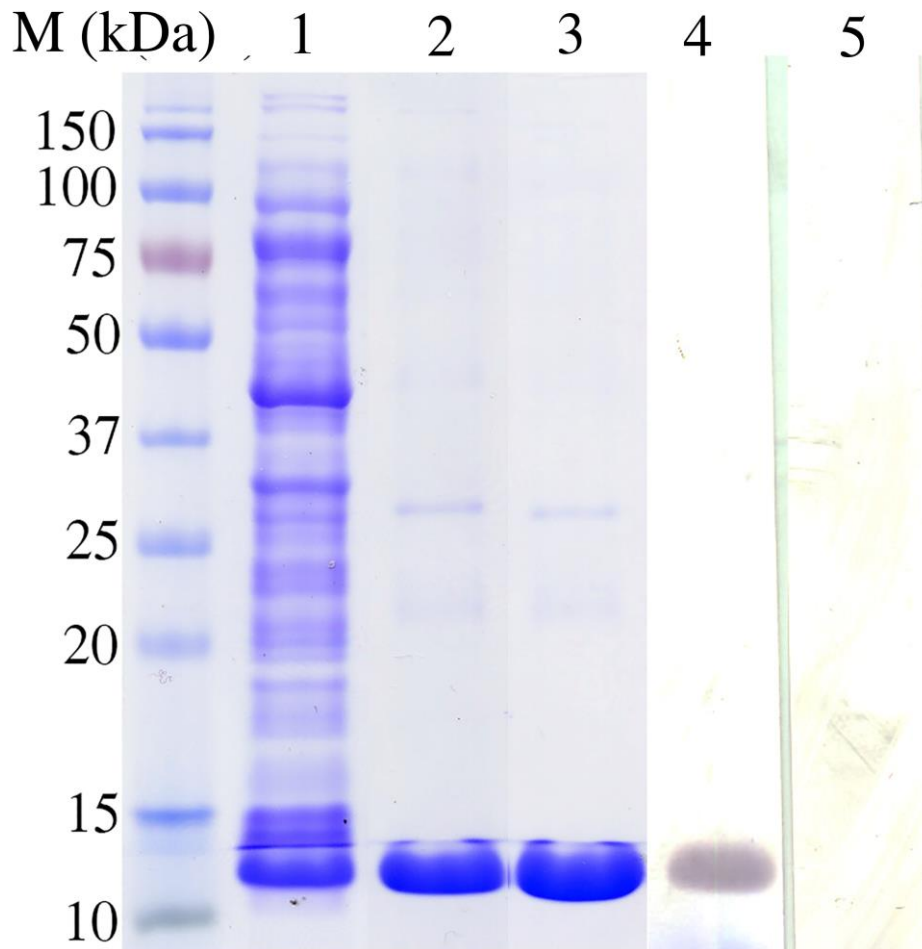
การสังเคราะห์ recombinant proteins (CatL1, CatL1H, CatL1G, CatL1D, CatB2, SAP2 และ LAP) ทำโดยการ ligate cDNA ของยีนเป้าหมายกับ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโดยใช้ isopropyl- β -D- thiogalactoside (IPTG) และทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA หลังจากนั้นศึกษาขนาดของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue โดยขนาด (molecular weight) ของ matureCatL1 (mCatL1), mCatL1H, mCatL1G, mCatL1D, mCatB2 ที่ 30, 25, 25, 25, 28 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงขนาดของ recombinant proteins (lane 1: proCatL1, lane 2: matCatL1, lane 3: matCatL1G, lane 4: matCatL1H, lane 5: matCatB)

3. การศึกษาคุณลักษณะของโปรตีน SAP-1 โดยวิธี immunoblot

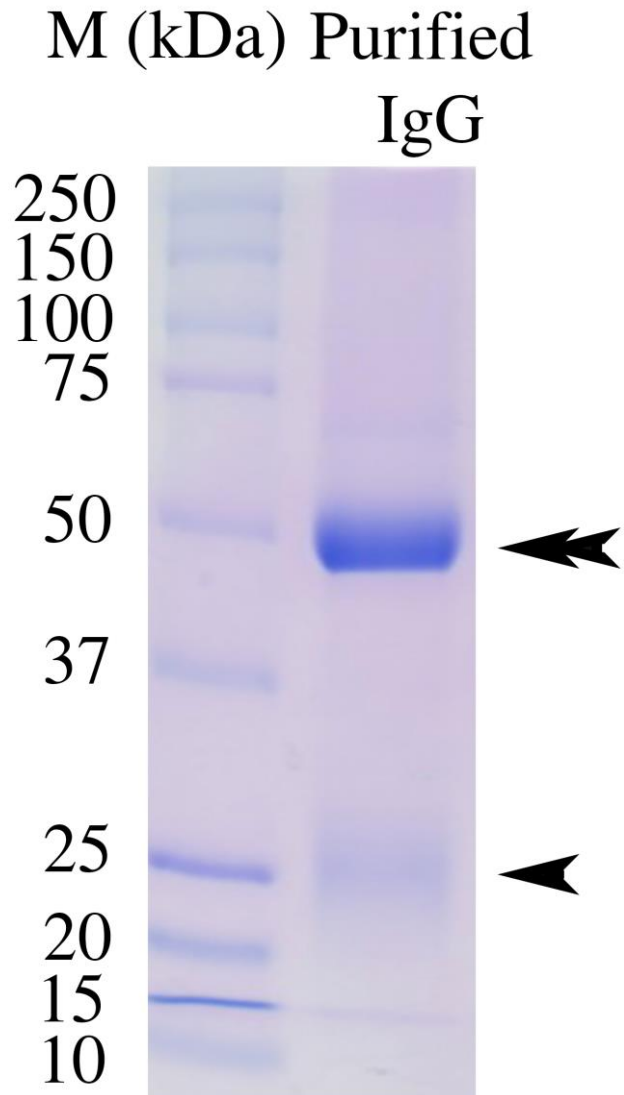
โปรตีน FgSAP-1 ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน FgSAP-1 แล้วนำผลที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET30b เพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* โปรตีนที่ได้มีขนาด 13 กิโลดาลตัน นำแอนติบอดีต่อโปรตีน FgSAP-1 จากกระต่ายมาทำปฏิกิริยากับ rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 โดยวิธี immunoblotting ซึ่งพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน FgSAP-1 จากกระต่ายแสดงผลบวก (positive band) ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 กิโลดาลตัน (lane 4) และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน rFgSAP-2 (lane 5) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงผลการสังเคราะห์โปรตีน rFgSAP-1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 13 กิโลดาลตัน

4. การทำแอนติบอดี (rabbit anti-rFgSAP-1) ให้บริสุทธิ์

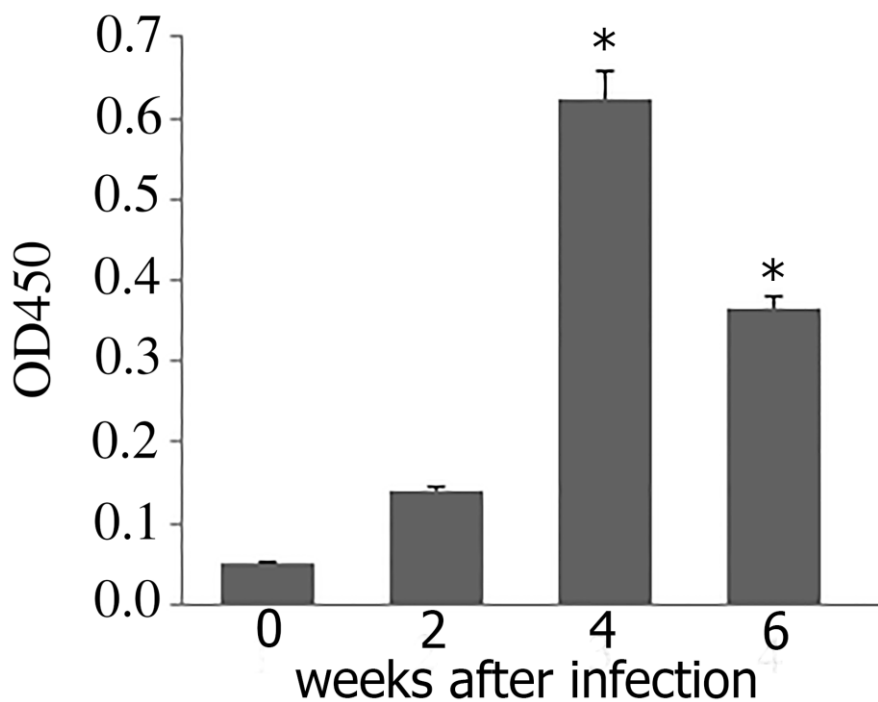
นำแอนติบอดีต่อโปรตีน FgSAP-1 จากกระต่าย มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A Affinity



รูปที่ 3 แสดงผลการทำแอนติบอดี (rabbit anti-rFgSAP-1 IgG), double head arrow แสดง heavy chain ที่น้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน, single head arrow แสดง light chain ที่ 25 กิโลดาลตัน

5. การศึกษาหาแอนติบอดีต่อ FgSAP-1 ในซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

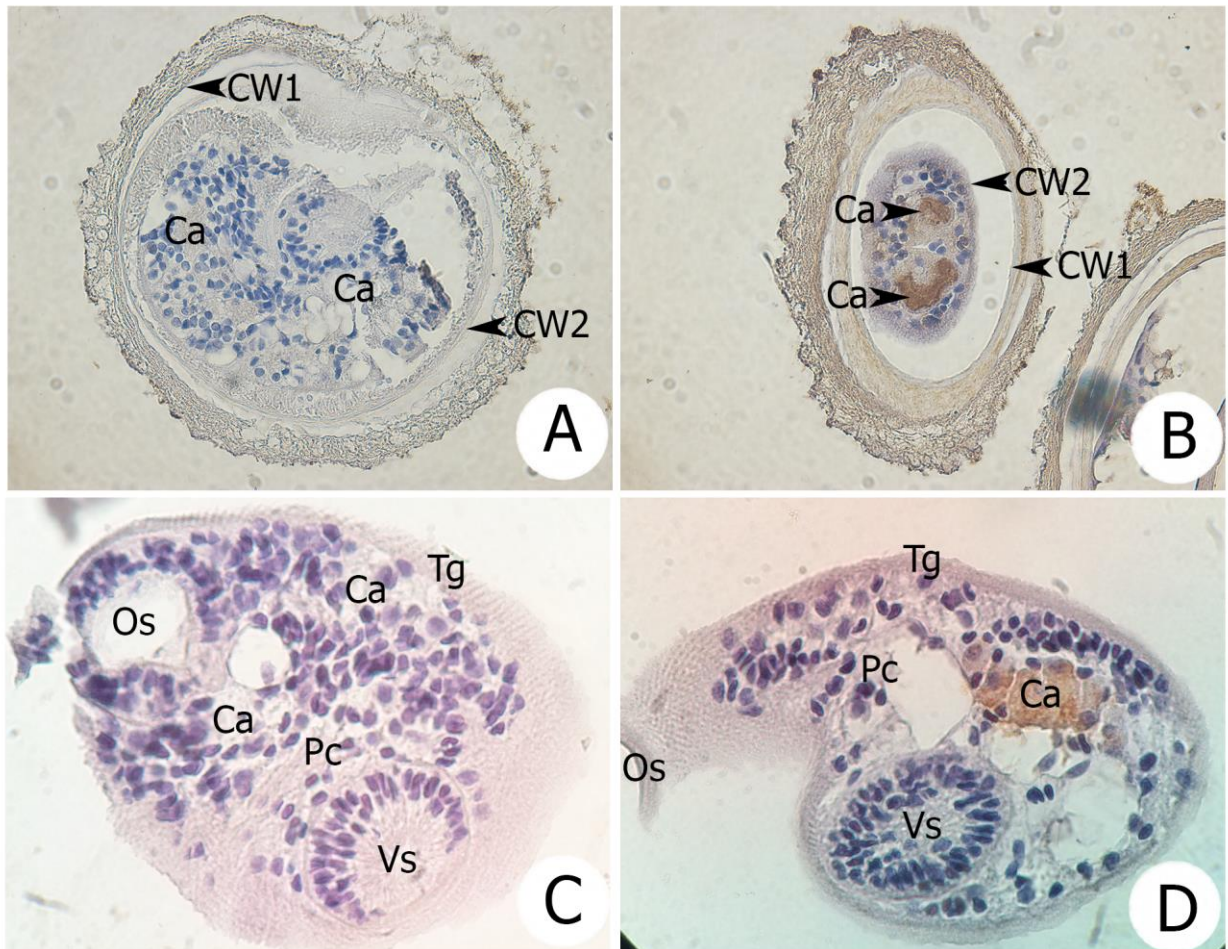
การศึกษาหาแอนติบอดีต่อ FgSAP-1 ในซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ตั้งแต่ 0, 2, 4, 6 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าซีรัมที่ 4 และ 6 สัปดาห์หลังการติดเชื้อมีค่า OD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ ซีรัมที่ 0 สัปดาห์ (negative control) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงกราฟการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าซีรัมที่ 4 และ 6 สัปดาห์หลังการติดเชื้อมีค่า OD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (*) ที่ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับ ซีรัมที่ 0 สัปดาห์ (negative control)

6. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน SAP-1 โดยวิธี immunohistochemistry

กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ rFgSAP-1 ในกระต่าย และนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน (native FgSAP-1) ในเนื้อเยื่อพยาธิ *F. gigantica* ระยะ metacercariae และ Newly excysted juveniles (NEJ) ด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโปรตีน SAP-1 มีการแสดงออกที่บริเวณทางเดินอาหาร (caecum) เท่านั้น ทั้งในพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อกับ metacercariae และ Newly excysted juveniles (NEJ) แต่ไม่มีการแสดงออกในตำแหน่งอื่นของพยาธิ (รูปที่ B และ D)



รูปที่ 5. แสดงการแสดงออกของโปรตีน FgSAP-1 ในพยาธิตัวอ่อนระยะตัวอ่อนระยะ metacercariae และ Newly excysted juveniles (NEJ) ย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry (A) metacercaria: Negative Control (B) metacercaria: ย้อมด้วยแอนติบอดี (rabbit anti-rFgSAP-1) (C) NEJ: Negative Control (D) NEJ: ย้อมด้วยแอนติบอดี (rabbit anti-rFgSAP-1)

3. ทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ โปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-1+rFgSAP-2, rmatFgCatB3 + rmatFgCatL1H, rFgSAP-2 + rFgLAP ในหนูทดลอง

- กลุ่มการทดลองแบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยหนู ICR เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้
- กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดกระตุ้น และไม่มีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ
 - กลุ่มที่ 2 ไม่มีการฉีดกระตุ้น และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ
 - กลุ่มที่ 3 ทำการฉีดกระตุ้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มีโปรตีนผสม และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ
 - กลุ่มที่ 4 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย rFgSAP-1 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ
 - กลุ่มที่ 5 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย rFgSAP-1+rFgSAP-2 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ
 - กลุ่มที่ 6 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย rmatFgCatB3 + rmatFgCatL1H 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ
 - กลุ่มที่ 7 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย rFgSAP-2 + rFgLAP 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ

โดยแต่ละกลุ่มทำการฉีดกระตุ้นหนู 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ และหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ทำให้หนูติดเชื้อตัวละ 15 metacercariae หลังจากนั้น 4 สัปดาห์หลังจากทำให้หนูติดเชื้อ ก็ทำการฆ่าหนูโดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เก็บตับและนับจำนวนพยาธิเพื่อคำนวณหาร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ และผลการทดสอบวัคซีนมีการแสดงระดับการป้องกันการติดเชื้อในแต่ละ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3

Worm recoveries and percentages of worm reduction in ICR mice immunized with rFgSAP-1, rFgSAP-1+rFgSAP-2, rFgCatB3 + rFgCatL1H, rFgSAP-2 + rFgLAP and challenged with 15 metacercariae of *F. gigantica* per mouse

Groups	Treatments	Worm recovery	Mean±SD	Reduction (%)
1. Uninfected Control	Non-immunized and uninfected			
2. Infected Control	Non-immunized and infected	9,6,8,7,6,7,8,9,7,7	7.4 ± 1.07	-
3. Adjuvant Control	Immunized with Adjuvant and infected	8,5,9,7,7,9,5,8,8,5	7.1 ± 1.60	-
4. rFgSAP-1	50 µg of rFgSAP-1 plus Adjuvant and infected	2,2,1,1,2,3,4,2,0,2	1.9 ± 1.11	74.3 a*, 73.2 b*
5. rFgSAP-1+rFgSAP-2	50 µg of rFgSAP-1+rFgSAP-2 plus Adjuvant and infected	1,1,0,1,2,2,1,3,1,2	1.4 ± 0.84	81.1 a*, 80.3 b*
6. rmatFgCatB3+rmatFgCatL1H	50 µg of rmatFgCatB3+rmatFgCatL1H plus Adjuvant and infected	2,2,3,0,2,2,3,3,1,2	2.0 ± 0.94	73.0 a*, 71.8 b*
7. rFgSAP-2 + rFgLAP	50 µg of rFgSAP-2 + rFgLAP plus Adjuvant and infected	0,2,0,1,2,1,3,1,0,2	1.3 ± 0.94	82.4 a*, 81.7 b*

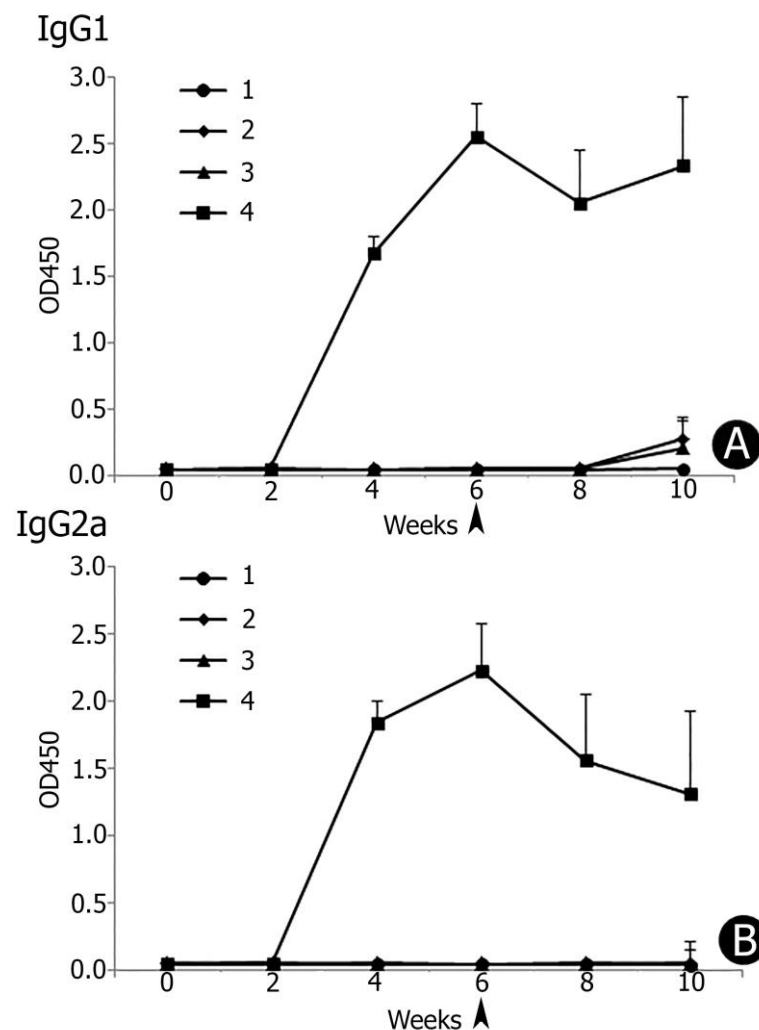
* Significant in worm reduction compared with control groups (p < 0.05)

a Percent reduction, compared with group 2

b Percent reduction, compared with group 3

7. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์ rFgSAP-1 ในหนู ICR และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ต่อรีคอมบิแนนท์ rFgSAP-1

จากการทำให้หนูติดพยาธิโดยการป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ (*F. gigantica*) ในระยะ Metacercaria พบว่าโปรตีน rFgSAP-1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้ โดยมีระดับของ Immunoglobulin (Ig) ชนิด IgG1 และ IgG2a ในกระแสเลือดสูงขึ้น (รูปที่ 2)

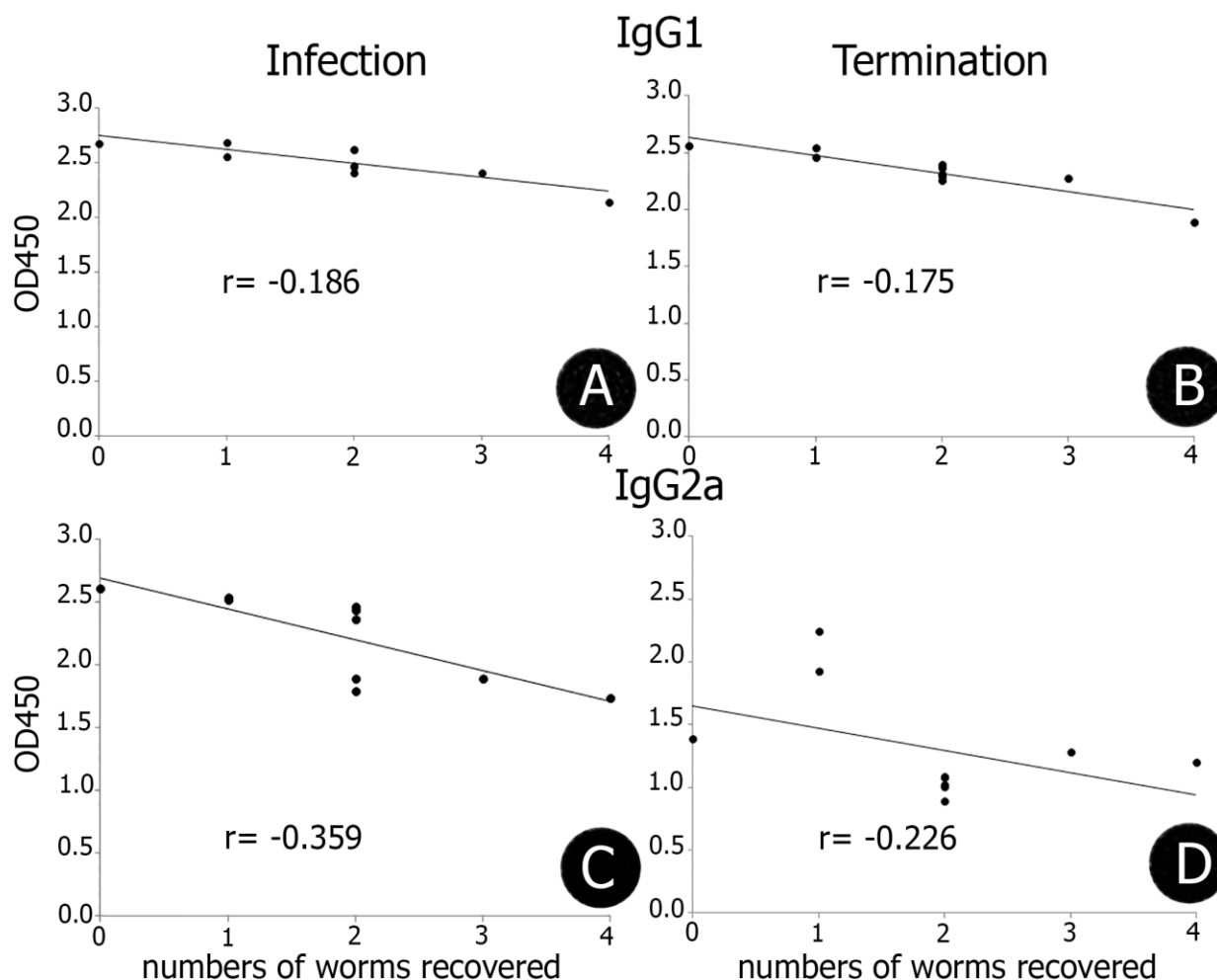


รูปที่ 6. แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (humoral) โดยเฉพาะ IgG1 และ IgG2a พบว่าทั้งในกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วย rFgSAP-1 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้ง IgG1 และ IgG2a (2A & 2B) แต่ระดับของ IgG1 จะสูงกว่า IgG2a ;1=Uninfected control, 2=Infected control, 3=Adjuvant control, 4=rFgSAP-1

7. ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับ จำนวนพยาธิ

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ IgG1 และ IgG2a และจำนวนพยาธิที่จุด ทำให้ติดเชื้อ (infection) และ termination (รูปที่. 4) พบว่าค่าที่ได้ IgG1 มีค่าที่สูงกว่า IgG2a (IgG1 showed stronger correlations than IgG2a) ซึ่งมีค่าดังนี้: IgG1 at infection , $r = -0.186$, at termination, $r = -0.175$; IgG2a at infection, $r = -0.359$, at termination, $r = -0.226$.

- คือระดับของ OD₄₅₀ และจำนวนพยาธิในกลุ่ม rFgSAP-1 vaccinated group



รูปที่ 7. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า OD450 นาโนเมตร กับจำนวนพยาธิในหนูแต่ละตัวในกลุ่ม rFgSAP-1+infected (A) IgG1:Infection (B) IgG1 : Termination (C) IgG2a : Infection (D) IgG2a : Termination

8. ระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT)

ระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT) มีค่าสูงขึ้นที่จุด termination ทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่ม non-immunized and uninfected แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม rFgSAP-1-immunized and infected และ กลุ่มควบคุม พบว่าระดับเอนไซม์ของกลุ่ม rFgSAP-1-immunized and infected มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ (รูปที่ 8)

* เท่ากับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

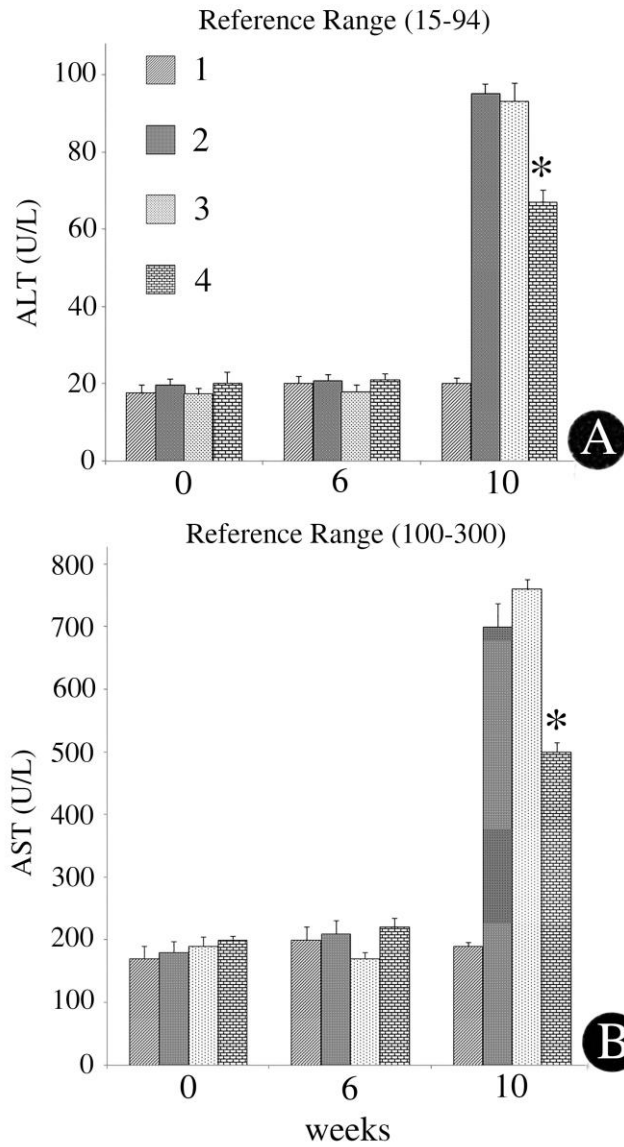
- (1) non-immunized and uninfected
- (2) non-immunized and infected
- (3) Freund's adjuvant and infected
- (4) rFgSAP-1-immunized and infected

ตารางที่ 4. The pathological lesions of the livers were analyzed by scoring the damage lesions. In rFgSAP-1-vaccinated group.

Group	Mean liver damage score \pm SD
1. Uninfected Control	-
2. Infected Control	3.5 \pm 1.3
3. Adjuvant Control	3.1 \pm 0.9
4. rFgSAP-1	1.6 \pm 0.8 ^{a*} , ^{b*}

*Significant in reduction of liver pathological lesion when compared with control group at p-value less than 0.05.

^a Liver damage score, compared with group 2, ^b Liver damage score, compared with group 3



รูปที่ 8 แสดงระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT)

(1) non-immunized and uninfected

(2) non-immunized and infected

(3) Freund's adjuvant and infected

(4) rFgSAP-1-immunized and infected

สรุปผลการวิจัย

ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์ยีน (cDNA) และโปรตีนของ pro CatL1, mature CatL1, CatL1G, CatL1H, SAP-1, SAP-2, LAP และ CatB2 ได้สำเร็จ โดยการใช้วิธี screening cDNA libraries ของพยาธิ *F. gigantica* ด้วย primers ที่ออกแบบและสังเคราะห์จากยีนที่คล้ายกันจากพยาธิ *F. hepatica* ค้นได้จากฐานข้อมูล NCBI ซึ่งโปรตีน pro CatL1, mature CatL1, CatL1G, CatL1H, SAP-1, SAP-2, LAP และ CatB2 มีมวลโมเลกุล (MW) เท่ากับ 30, 25, 25, 25, 12, 12, 56, 28 ตามลำดับ จากนั้นศึกษาคุณลักษณะของ recombinant proteins SAP-1 (rFgSAP-1) โดยวิธี immunoblot, ELISA, immunohistochemistry พบว่าโปรตีน SAP-1 มีการแสดงออกบริเวณทางเดินอาหารของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวอ่อน (metacercaria และ NEJ) และพบว่าโปรตีน SAP-1 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ หลังจากนั้นนำโปรตีน SAP-1 มาทดสอบศักยภาพในการเป็นวัคซีนในหนู โดยการ immunize หนูด้วย recombinant proteins ผสมกับ Alum adjuvant เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วติดเชื้อพยาธิด้วยการป้อน metacercaria 15 อันต่อหนูหนึ่งตัว เพื่อประเมินค่า percent protection พบว่าระดับของการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rFgSAP-1 เท่ากับ ร้อยละ 74.3 และ 73.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ และโปรตีน rFgSAP-1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้ โดยมีระดับของ Immunoglobulin (Ig) ชนิด IgG1 และ IgG2a ในกระแสเลือดสูงขึ้น และระดับการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดียังมีความสัมพันธ์กับการลดลงของจำนวนพยาธิอีกด้วย โดยเฉพาะระดับของ IgG1 ส่วนระดับของเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT) ที่บ่งบอกถึงความเสียหายของเนื้อเยื่อตับ พบว่าในกลุ่ม rFgSAP-1 ค่าเอนไซม์ตับทั้ง 2 ชนิด ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $p < 0.05$ และได้ทำการทดสอบ combine vaccine พบว่ากลุ่ม rFgSAP-1+rFgSAP-2 มีค่าการป้องกันเท่ากับร้อยละ 81.1, 80.3 กลุ่ม rmatFgCatB3+rmatFgCatL1H มีค่าการป้องกันเท่ากับร้อยละ 73.0, 71.8 และกลุ่ม rFgSAP-2 + rFgLAP มีค่าการป้องกันเท่ากับร้อยละ 82.4, 81.7 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

โดยทั่วไปแล้วการวิจัยในโครงการนี้ให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ที่ตั้งไว้ คือในปีแรกได้มีการผลิต recombinant proteins ได้สำเร็จ ทั้งสิ้น 5 โปรตีนคือ pro CatL1, mature CatL1, CatL1G, CatL1H และ CatB2 และได้มีการทดสอบวัคซีนแล้ว 3 โปรตีน พร้อมทั้งได้มีการวิเคราะห์ข้อมูลและได้มีการเผยแพร่โดยการศึกษาตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติเป็นที่เรียบร้อยแล้วคือโปรตีน pro CatL1 และ mature CatL1 (ทุน วช. 2558) (Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Jaikua W, Sobhon P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1 against fasciola gigantica in mice. Acta Trop 2015;.150, 71-78) และโปรตีน mature CatL1G (ทุน วช 2559) (Changklungmoa N, Phoinok N, Yenchan C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. Vet Parasitol 2016; 226: 124-131) ส่วนโปรตีนอื่น ๆ อยู่ระหว่างการดำเนินการทดสอบวัคซีนเดี่ยว

และโปรตีนรวม แล้วจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลและมีการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มีคุณภาพอยู่ในระดับดีต่อไปในปี 2560 ส่วนปัญหาที่ในการวิจัยคือ มีการผลิต metacercariae ไม่เพียงพอต่อการทดสอบ อาจจะต้องใช้เวลาในการผลิตและทดสอบวัคซีน และอาจจะทำให้การทดสอบวัคซีนลูกผสมล่าช้าไปบ้าง

สรุปและเสนอแนะ

ไม่มี

(5) ผลผลิต (Output)

(5.1) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในและระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. Changklungmoa N, Phoinok N, Yenchan C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. Vet Parasitol 2016; 226: 124-131. (ภาคผนวก)

(5.2) การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

(5.3) ผลงานเชิงพาณิชย์ (มรการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ไม่มี

(5.4) ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 3930100116821 สัญญาเลขที่ 31/2560

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. พรอนันต์ เกื้อไข

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม 2560

ระยะเวลาดำเนินการ.....ปี.....10.....เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	382,950	บาท	เมื่อวันที่ 26 เดือน ธันวาคม	ปี 2559
งวดที่ 2 (40%)	306,360	บาท	เมื่อวันที่ 4 เดือน พฤษภาคม	ปี 2560
งวดที่ 3 (10%)		บาท	เมื่อวันที่ - เดือน -	ปี -

รวม 689,310

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	72,000	72,000	-
2. ค่าจ้าง	120,000	120,000	-
3. ค่าวัสดุ	446,900	446,900	-
4. ค่าใช้สอย	127,000	127,000	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย)	-	-	-
รวม	765,900	765,900	-

(..........)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม (Bibliography)

- Aban JL, Ramajo V, Arellano JL, Oleaga A, Hillyer GV, Muro A, 1999. A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol.* 83: 107-121.
- Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF. 2008. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 158, 52-64.
- Alarcon JB, Waine GW, McManus DP, 1999. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Adv Parasitol.* 42: 343-410.
- Bruhn H, 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J.* 389: 249-257.
- Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP, 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated coxinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol.* 62: 9-17.
- Changklungmoa N, Kueakhai K, Riengrojpitak S, Chaithirayanon K, Chaichanasak P, Preyavichyapugdee N, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. 2013. Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitol Res.* 112, 3653–3659.
- Changklungmoa N, Poinok N, Yenchan C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. *Vet Parasitol* 2016; 226: 124-131.
- Chantree P, Phatsara M, Meemon K, Chaichanasak P, Changklungmoa N, Kueakhai P, Lorsuwannarat N, Sangpairoj K, Songkoomkronk S, Wanichanon C, Itagaki T, Sobhon P. 2013 Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology* 135:102-109.
- Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC, 1996. *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol.* 83: 202-215.
- Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ, 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun.* 64: 5066-5074.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA, 1997. DNA vaccines. *Annue Rev Immunol.* 15: 617-648.

- EL-Ahwany E, Rabia I, Nagy F, Zoheiry M, Diab T, Zada S, 2012. Protective Role of Purified Cysteine Proteinases against *Fasciola gigantica* Infection in Experimental Animals. *Korean J Parasitol.* 50: 45-51.
- Espino AM, Hillyer GV, 2003. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol.* 89: 545-552.
- Espino AM, Morales A, Delgado B, Rivera FM, Figueroa O, Suárez E. 2010. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Ethnicity and Disease* 20, S1-17-23.
- Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosari E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, Spithill TW, 1997. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int J Parasitol.* 27: 1419-1428.
- Golden O, Flynn R.J, Reed C, Sekiya M, Donnelly S.M, Stack C., et al. 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine.* 28, 5551-5557.
- Hall RF, Lang BZ, 1978. The development of an experimental vaccine against *Fasciola hepatica* in cattle. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 82: 56-60.
- Haroun ET, Hillyer GV, 1986. Resistance to fascioliasis—a review. *Vet Parasitol.* 20: 63-93.
- Hillier GV, Haroun ET, Hernandez A, de Galanes MS. 1987. Acquired resistance of *Fasciola hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 37: 363-369.
- Jaikua W, Kueakhai P, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairot S, Riengrojpitak S, Sobhon P, Changklungmoa N, 2016. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Trop,* 162:75-82.
- Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM. 2010. Liver fluke vaccines: Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of recombinant stage-specific antigens. *Procedia in Vaccinology* 2: 82-85.
- Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PT. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol.* 160: 230-236.
- Kalinna BH, 1997. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol Cell Biol.* 75: 370-375.
- Kueakhai P, Changklungmoa N, Riengrojpitak S, Chaichanasak P, Meemon K, Chaithirayanon K, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. 2013. Vaccine potential of recombinant saposin-like protein 2 against *Fasciolosis gigantica* in mice. *Vaccine*, Accepted.

- Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whisstock JC, Pike RN, Spithill TW. 2003. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun.* 76: 6921-6932.
- Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, et al. 2012. The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine*, 29, 9057-9063.
- Meemon K, Grams R, Vichari-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Habe S, Sobhon P, 2004. Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol.* 136: 1-10.
- Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wieker J, Friedel T, Spithill TW, 1996. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine.* 14: 1603-1612.
- Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP, 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine.* 16: 932-939.
- Muro A, Ramajo V, Lopez J, Simon F, Hillyer GV. 1997. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol.* 69: 219-229.
- Nansen P, 1975. Resistance in cattle of *Fasciola hepatica* induced by gamma-ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res Vet Sci.* 19: 278-283.
- Ogra PL, Faden HS, Abraham R, Duffy LC, Sun M, Minor PD, 1991. Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines. *J Infect Dis.* 164: 191-194.
- Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C, 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun.* 67: 1954-1961.
- Raina OK, Nagar G, Varghese A, Prajitha G, Alex A, Maharana BR, et al. 2011. Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Tropica*, 118, 217-222.

- Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA, Panaccio M, 1998. *Fasciola hepatica*: stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. *Exp Parasitol.* 89: 169-179.
- Reed MB, Strugnell RA, Panaccio M, Spithill TW, 2000. A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.* 105: 297-303.
- Reszka N, Cornelissen JB, Harmsen MM, Bienkowska-Szewczyk K, de Bree J, Boersma WJ, Rijsewijk FA. 2005. *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine.* 23: 2987-2993.
- Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF, et al., 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol.* 145: 3905-3910.
- Sexton JL, Wilee MC, Colin T. Wijffels GL, Salvatore L, Feil S, Parker MW, Spithill TW, Morrison CA, 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. *J Immunol.* 152: 1861-1872.
- Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP, 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.* 62: 1-8.
- Smooker PM, Steeper KR, Drew DR, Strugnell RA, Spithill TW, 1999. Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunol.* 21: 357-364.
- Srihakim S, Pholpark M, 1991. Problem of fascioliasis in animal husbandry in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 22: 352-355.
- Sukhapesna V, Sarataphan N, Tuntasuvan D, Sangiamkuksana S, 1990. A study on epidemiology of liver fluke infections in buffaloes. *Thai J Vet Med.* 20: 527-534.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA, 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356: 152-154.
- Tendler M, Vilar MM, Brito CA, Freire NM, Katz N, Simpson A, 1995. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine. *Mem Inst Oswaldo Crus.* 90: 255-256.

- Weeks-Levy C, Tatem JM, DiMichele SJ, Waterfield W, Georgiu AF, Mento SJ, 1991. Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. *Virology*. 185: 934-937.
- Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F, et al., 1994. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp Parasitol*. 78: 132-148.
- Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW, 1998. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp Parasitol*. 88: 85-94.
- Zhai Y, Saier MHJ, 2000. The amoebapore superfamily. *Biochem Biophys Acta*. 1469: 87-99.

ภาคผนวก

(Appendix)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ



Research paper

Characterization and vaccine potential of *Fasciola gigantica* saposin-like protein 1 (SAP-1)



Pornanan Kueakhai^a, Narin Changklungmoa^a, Pinkamon Waseewiwat^a,
Thanaporn Thanasinpaiboon^a, Werachon Cheukamud^a, Pannigan Chaichanasak^b,
Prasert Sobhon^{a,c,*}

^a Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Long-Hard Bangsaen Road, Mueang District, Chonburi 20131, Thailand

^b Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Chuen-Sampan Road, Nong Chok, Bangkok 10530, Thailand

^c Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2016
Accepted 12 December 2016

Keywords:

Fasciola gigantica
Saposin-like protein 1
Characterization
Localization
Vaccine

ABSTRACT

The recombinant *Fasciola gigantica* Saposin-like protein-1 (rFgSAP-1) was cloned by polymerase chain reaction (PCR) from NEJ cDNA, expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and used for production of a polyclonal antibody in rabbits (anti-rFgSAP-1). By immunoblotting and immunohistochemistry, rabbit IgG anti-rFgSAP-1 reacted with rFgSAP-1 at a molecular weight 12 kDa, but not with rFgSAP-2. The rFgSAP-1 reacted with antisera from mouse infected with *F. gigantica* metacercariae collected at 2, 4, and 6 weeks after infection. The FgSAP-1 protein was expressed at a high level in the caecal epithelium of metacercariae and NEJs. The vaccination was performed in Inbred Control Region (ICR) mice (n = 10) by subcutaneous injection with 50 µg of rFgSAP-1 combined with Alum adjuvant. Two weeks after the second boost, mice were infected with 15 metacercariae per mouse by the oral route. The percent protection of rFgSAP-1 vaccine were estimated to be 73.2% and 74.3% when compared with non vaccinated-infected and adjuvant-infected controls, respectively. The levels of IgG1 and IgG2a specific to rFgSAP-1 in the immune sera, which are indicative of Th2 and Th1 immune responses, were inversely and significantly correlated with the numbers of worm recoveries. The rFgSAP-1-vaccinated mice showed significantly reduced levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), and liver damage. These indicated that rFgSAP-1 has strong potential as a vaccine candidate against *F. gigantica*, whose efficacy will be studied further in large economic animals including cattle, sheep, and goat.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Saposin-like proteins (SAPs) are a family of diverse lipid-interacting proteins whose membranolytic activities have only been recently understood. They are conserved phylogenetically in distant organisms, from primitive protozoa to mammals (Bruhn, 2005). The encoded proteins were found in *Entamoeba* spp., named amoebapores, which are similar in size and structure to the mammalian SAPs, NK-lysin and granulysin (Bruhn, 2005). In *F. hepatica*, recombinant SAP has been shown to induce lysis of human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cells. This suggests that

the SAPs are involved in the lysis of host cells for further enzymatic processing and uptake by the parasites. Two SAPs encoding cDNAs from *F. hepatica* (FhSAP-1, FhSAP-2), and three SAPs encoding cDNA from *F. gigantica* (FgSAP-1, FgSAP-2, FgSAP-3) were reported (Reed et al., 2000; Espino and Hillyer, 2003; Grams et al., 2001; Cabán-Hernández and Espino, 2013). FgSAP-1 is expressed at NEJ and early stage of *F. gigantica*, whereas FgSAP-2 and FgSAP-3 are expressed in late juveniles to adult stages but not at metacercaria, NEJ and early juvenile stage (Grams et al., 2001).

As SAP-1 gene is expressed in early juvenile of *Fasciola* spp. (Grams et al., 2001), we expect it to have high potential as a vaccine candidate that may interrupt the early stages of the life cycle. Therefore, to gain basic understanding of characteristics and tissue expression of the native FgSAP-1 is important for the developments of vaccine and immunodiagnosis for early infection.

The combined vaccine between FgSAP-1 and FgSAP-2 and other proteins (such as CatB3) should show higher percent protection against *F. gigantica* infection because they can block and possi-

* Corresponding author at: Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Long-Hard Bangsaen Road, Mueang District, Chonburi 20131 and Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand.

E-mail addresses: prasert.sob@mahidol.ac.th, prasertso@bun.ac.th, scpsob@mahidol.ac.th (P. Sobhon).

bly damage both early and late parasites. Various recombinant protein vaccines have been tested and shown to have varying levels of protection against *F. hepatica* infection, including leucine aminopeptidase (LAP) in sheep (Maggioli et al., 2011a), cathepsin L (CatL) in sheep and cattle (Piacenza et al., 1999; Golden et al., 2010), thioredoxin glutathione reductase (TGR) in rabbit (Maggioli et al., 2011b) and saposin-like protein 2 (SAP-2) in rabbit and mice (Rivera and Espino, 2016; Espino and Hillyer, 2004; Espino et al., 2010); and for *F. gigantica*, including LAP in mice and buffaloes (Changklungmoa et al., 2013; Raina et al., 2011), SAP-2 in mice (Kueakhai et al., 2013b), CatB2 and CatB3 in mice (Chantree et al., 2013), CatL1H in mice (Sansri et al., 2015), CatL1 in mice (Kueakhai et al., 2015b). However, these vaccines alone offer a fairly low percentage of protection. The vaccine potential of FgSAP-1 has not yet been tested in model animals, and this is the aim of the present study.

2. Materials and methods

2.1. Parasite preparations

Lymnaea ollula snails were infected with miracidia (one miracidium per snail). About 45 days after infection, cercariae were shed from the snails and settled on the 5 × 5 cm cellophane papers and transformed into metacercariae as previously described (Kueakhai et al., 2013a). The metacercariae were collected from the papers and washed several times with 0.85% NaCl solution. NEJ was excysted by activating metacercariae using a method described previously (Sethadavit et al., 2009).

2.2. Screening the adult *F. gigantica* cDNA for the saposin-like protein-1 gene

Incomplete cDNA of saposin-like protein 1 gene was isolated from the adult *F. gigantica* cDNA by polymerase chain reaction (PCR) using degenerated forward primer (5'-GAT ATG GAG GAA GAA CCA CAC CTT GAC-3') and reverse primer (5'-CTC GAG CTA GCA CAG TCT GAT TAC-3') designed from the homologous sequences of *F. gigantica* saposin-like protein 1 gene (Grams et al., 2001). DNA sequencing was done by Macrogen Inc., South Korea. Sequence analysis was performed by using the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and BioEdit program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The saposin gene obtained from the cDNA library screening showed 100% identity to FgSAP-1 as reported earlier (Grams et al., 2001).

2.3. Expression and purification of recombinant FgSAP-1 (rFgSAP-1) and Recombinant FgSAP-2 (rFgSAP-2)

Recombinant FgSAP-1 and FgSAP-2 cDNA were subcloned into the pET-30b vector and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The rFgSAP-1 and rFgSAP-2 expressions were induced with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) for 3 h at 37 °C and 25 °C, respectively. The protein was purified by using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity column under denaturing condition. The elutes were dialyzed by using SnakeSkin™ Pleated Dialysis Tubing, 10K MWCO (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄), pH 7.4 and concentrated by membrane filtration using Amicon Ultra centrifugal filter devices with 3.5K nominal molecular weight limit (Millipore, Bedford, MA, USA). The recombinant proteins were kept at -20 °C until use.

2.4. Production of rabbit polyclonal anti-rFgSAP-1

Rabbit polyclonal anti-rFgSAP-1 was produced by immunizing a female New Zealand White rabbit with 250 μg of rFgSAP-1 mixed with Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA) three times at 2-week intervals. Experiments on animals were approved by the Animal Care and Use Committee, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand.

2.5. Purification of rabbit polyclonal anti-rFgSAP-1 IgG

The rabbit anti-rFgSAP-1 serum was diluted at 1:2 with binding buffer (Bio-Rad, USA), pH 9.0. All samples were filtered through a 0.45 μm filter before loading onto the cartridge. The mixture of serum and binding buffer was added into the cartridge containing Aff-Prep protein A (Bio-Rad, USA). The IgG against rFgSAP-1 bound to protein A was eluted out with an elution buffer (Bio-Rad, USA), pH 3.0; and the eluent was neutralized immediately with 1 M Tris HCl, pH 9.0 (1 ml of eluent per 1.6 ml of 1 M Tris HCl) as previously described (Kueakhai et al., 2015a). The eluent containing IgG against rFgSAP-1 was dialyzed, concentrated, and stored at 4 °C until further experiments.

2.6. Immunoblotting

The rFgSAP-2 (1.0 μg) and rFgSAP-1 (1.0 μg) were separated on a 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 4% skim milk in PBS containing 0.1% Tween-20 (PBST) for 1 h, then incubated with 2 μg/ml of purified rabbit anti-rFgSAP-1 IgG for 1 h at RT. The positive bands were visualized using AP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Southern Biotech, Birmingham, USA) diluted at 1:2000 and the color developed with NBT/BCIP substrates (Roche, Mannheim, Germany).

2.7. Detection of humoral immune response levels by ELISA

To determine whether FgSAP-1 elicited humoral immune response in the host by ELISA, a 96-well plate was coated with 100 μl of 1 μg/ml of rFgSAP-1 in the coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6), incubated at 4 °C, overnight. The coated plates were washed three times with PBST (0.05% Tween 20), and non-specific bindings were blocked with 1% skim milk at RT for 1 h. Then the coated plates were washed three times with PBST. Mice infected sera collected at 0, 2, 4 and 6 weeks after infection were diluted at 1:100 with PBS, and added at 100 μl per well and incubated at RT for 1 h. The plates were washed three times with PBST and incubated with 100 μl per well of HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Southern Biotech, Birmingham, USA), diluted at 1:5000 with PBS, at RT for 1 h. Then the plates were washed three times with PBST and incubated with 100 μl per well of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (KPL, Gaithersburg, USA) at RT for 5 min. Finally, enzymatic reaction was stopped by adding 1N HCl at 100 μl per well. The optical density (OD₄₅₀) was measured at 450 nm in an automatic VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA). The experiments were performed in triplicate.

2.8. Immunolocalization

Paraffin sections of metacercaria and NEJs, cut at 5 μm-thickness, were treated with fresh xylene twice for 10 min each, and then rehydrated in serial ethanol 100%, 95%, 80%, 70% and in tap water twice for 5 min each. The sections were microwaved at 700 W in citrate buffer (10 mM citric acid, pH6.0) for 5 min three times. The sections were washed thoroughly with tap water for 5 min followed by PBST, incubated in PBS containing 4% BSA for 1 h, and in

2 µg/ml of the Rabbit anti-rFgSAP-1 IgG in PBS, 1 h at RT. Finally, the sections were incubated in PBS containing horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG (Southern Biotech, Birmingham, USA) at 1:2000 dilution for 1 h at RT, and washed with PBST before incubating in 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrates (Vector Lab, CA, USA) in the dark. The optimal color development was stopped by soaking the sections in ddH₂O. The sections were counterstained with hematoxylin, mounted in Permount™ Mounting Medium (Bio-Optica, Milano, Italy), and photographed in a light microscope (Olympus BX51).

2.9. Experimental animals and vaccination protocol

Fifty 8 week-old male ICR mice were divided into five groups: (1) non-immunized and uninfected, (2) non-immunized and infected, (3) immunized with Alum adjuvant (InvivoGen, San Diego, CA, USA) and infected, (4) immunized with 50 µg of rFgSAP-1 mixed with Alum adjuvant and infected. All mice were kept under normal condition as described previously (Kueakhai et al., 2013b), and all experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee (BBU-ACUC) Burapha University, Thailand. The adjuvant control and rFgSAP-1-vaccinated groups were immunized three times at 2-week intervals by subcutaneous route. For the rFgSAP-1 vaccinated groups, the immunization used the recombinant proteins mixed with Alum adjuvant. Each mouse was orally infected with 15 *F. gigantica* metacercariae at 2 weeks after the second boost. Blood samples were taken at six intervals, i.e., pre-vaccination, 2 weeks after the first and second immunizations, at infection, 2, and 4 weeks post infection. Four weeks after infection, mice were anaesthetized with CO₂ inhalation and blood samples were taken by cardiac puncture, their peritoneal cavities were opened and washed thoroughly with 0.85% NaCl solution. The livers were immersed and minced in 0.85% NaCl solution, and the numbers of worms were examined following a previously described protocol (Kueakhai et al., 2015b).

2.10. Worm recovery and worm weights

The percent of protection against *F. gigantica* metacercariae infection in mice was expressed as percent of reduction in the number of worm recovered from the vaccinated mice compared with non-immunized-infected or adjuvant-infected control mice, and calculated as follows:

$$\% \text{Protection} = (A - B) / A \times 100$$

"A" represents the mean worm recovery from the non-immunized-infected or adjuvant-infected control mice, and "B" represents the mean worm recovery from rFgSAP-1-vaccinated mice. The weights of recovered worms from the vaccinated mice were measured and compared with those from non-immunized-infected or adjuvant-infected control mice.

2.11. Determination of IgG1 and IgG2a levels by indirect ELISA

The levels of IgG1 and IgG2a in blood samples collected from six intervals as previously mentioned were determined by indirect ELISA. Ninety six-well plates were coated with 100 µl of 1 µg/ml of rFgSAP-1 in coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) at 4 °C, overnight (O/N). The coated plates were washed three times with 0.05% PBS-Tween 20 and the non specific bindings were blocked by adding 150 µl per well of 1% skim milk (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in PBS and incubated at room temperature (RT) for 1 h. Then the coated plates were washed three times with 0.05% PBS-Tween 20, and 100 µl of each serum in PBS diluted at 500 was added and incubated for 2 h at RT. The plates

Table 1
The scoring for liver damage.

Liver damage score	Macroscopic liver lesions
Score 0	No signs of damage observed on the liver surface or hepatic lobes
Score 1	Minor damage confined to less than 5% of liver surface
Score 2	Light lesions of up to 15% of the liver surface
Score 3	Moderate damage of up to 30% of the liver surface
Score 4	Heavy damage of up to 50% of the liver surface
Score 5	Extensive necrosis of more than 50% of the liver surface

were washed three times with 0.05% PBS-Tween 20 and incubated in HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 and IgG2a (Southern-Biotech, Birmingham, USA) diluted with PBS at 1:5000 for 1 h, at RT. Then the plates were washed three times with 0.05% PBS-Tween 20, and 100 µl of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (KPL, Gaithersburg, USA) per well was added and incubated for 10 min at RT. Finally, the enzymatic reaction was stopped by adding 100 µl of 1N HCl per well. The optical densities (OD) were measured at 450 nm in an automatic Titertek Multiscan spectrophotometer (Flow Laboratories, VA, USA).

2.12. Liver enzymes

Levels of the liver enzymes, aspartate aminotransferase (AST) and alanine transaminase (ALT) released into the sera of all groups, collected at three intervals (0, 6 and 10 weeks), were measured in triplicate using an Automatic Clinical Chemistry Analyzer (Dimension Rxl Max, Siemens, Dublin, Ireland).

2.13. Pathological lesion of the liver

Four weeks after infection, mice were euthanized and their livers were removed and examined by naked eyes for pathological lesions, and the degrees of damage were scored 0–5 depending on the severity and the intensity of lesions according to the criteria published earlier (Raadsma et al., 2007; Jayaraj et al., 2009; Kueakhai et al., 2015b; Changklungmoa et al., 2016) (Table 1).

2.14. Statistical analysis

Differences between 2-, 4-, and 6-wk infected sera with non-infected mice sera were tested using the independent samples t-test. A p-value less than 0.05 was considered to be statistically significant. The levels of IgGs, liver enzymes and pathological score were compared between the controls and the rFgSAP-1-vaccinated groups using one-way ANOVA, Kruskal-Wallis Test. The correlations between the OD₄₅₀ values reflecting the IgG1, IgG2a levels in mouse sera at infection and termination and the numbers of worms recovered were analyzed by plotting the two variables against each other and tested statistically by one-way analysis of variance (Spearman's rank correlation test) using SPSS 18.0 software. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Expression and purification of recombinant FgSAP-1 (rFgSAP-1) and immunoblotting

The rFgSAP-1 and rFgSAP-2 proteins coupled with His-tag at the N-terminus were successfully expressed at 37 °C and 25 °C, respectively. SDS-PAGE analysis of the proteins after purification by Ni-NTA chromatography under denaturing condition revealed bands of the rFgSAP-1 and rFgSAP-2 at 12 kDa (Fig. 1 lanes 2, 3), induced lysate (Fig. 1 lane 1). Immunoblotting with rabbit IgG anti-

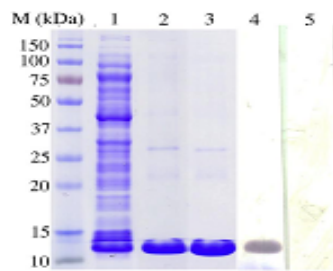


Fig. 1. Coomassie Blue stained 12.5% SDS-PAGE of expressed recombinant FgSAP-1 and rFgSAP-2 purified by the Ni-NTA affinity chromatography under the denaturing conditions. Lane 1 whole lysate after induction by IPTG; lane 2 recombinant FgSAP-1; lane 3 recombinant FgSAP-2 after purification. Immunoblot analysis indicating that the rabbit antiserum against rFgSAP-1 reacted with a rFgSAP-1 protein at 12 kDa (lane 4). No positive band was observed in rFgSAP-2 (lane 5). Molecular weight markers are shown on the left side.

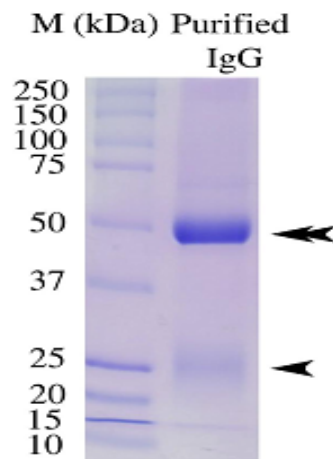


Fig. 2. The purity of rabbit anti-rFgSAP-1 IgG after purification by Affi-Gel[®] protein A MAPS[®] II Kit was determined by 12.5% SDS-PAGE stained with Coomassie Blue. Single and double arrows indicate the light and heavy chains of rabbit anti-rFgSAP-1 IgG, respectively. MW markers are shown on the left side.

serum against rFgSAP-1 reacting with rFgSAP-1 at MW 12 kDa of rFgSAP-1 (Fig. 1 lane 4), but not with rFgSAP-2 (Fig. 1 lane 5).

3.2. The purification of rabbit anti-rFgSAP-1 IgG

The purified rabbit anti-rFgSAP-1 IgG was analyzed by SDS-PAGE. Showing the bands for heavy and light chain at MW 50 and 25 kDa, respectively (Fig. 2 lane 2), indicating that the IgG was pure.

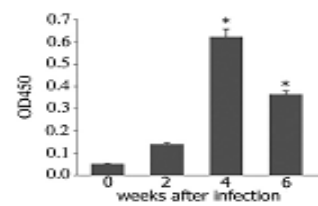


Fig. 3. Semiquantitation of antisera against FgSAP-1 from metacercarial infected mice collected at 2-, 4- and 6 weeks after the infection as estimated by reactivity with rFgSAP-1 using indirect ELISA. The highest level of the antibody (indicated by optical densities (OD)) were shown at 4-week after infection. Asterisk (*) denotes significant difference with $p < 0.05$.

3.3. Detection of anti-rFgSAP-1 levels in mice infected with *F. gigantica* metacercariae by ELISA

The reactivity level of antisera from *F. gigantica*-infected mouse collected at 2-, 4- and 6 weeks after the infection were estimated by indirect ELISA. The results showed that the levels of reactivity, the antisera against rFgSAP-1 (represented by OD values) were significantly higher when compared with normal mouse serum (Fig. 3).

3.4. Immunolocalization of SAP-1 protein in *F. gigantica* tissues

The localization of native FgSAP-1 in the tissues of metacercariae and NEJ of *F. gigantica* were probed with rabbit anti-rFgSAP-1 IgG. The pre-immunized serum was used as a negative control. Positive staining was detected in the cytoplasm of epithelial cells lining the caecum of metacercariae and NEJ, while tegument, ventral sucker, oral sucker and parenchyma showed no staining (Fig. 4B,D).

3.5. Worm recoveries

The numbers of worms recovered from the non-immunized-infected, adjuvant-infected and rFgSAP-1-vaccinated groups showed significant differences ($p < 0.05$). The worm reduction in the rFgSAP-1-vaccinated group when compared with the non-immunized-infected and adjuvant-infected control groups were 74.3 and 73.2%, respectively (Table 2).

3.6. The IgG1 and IgG2a levels

The IgG1 and IgG2a levels were measured in four groups of mice (the non-immunized and uninfected, non-immunized and infected, adjuvant and infected controls, and rFgSAP-1-vaccinated) at six intervals by indirect ELISA in duplicate. The OD₄₅₀ values of rFgSAP-1-specific IgG1, IgG2a were at the background level in sera of the non-immunized and uninfected, non-immunized and infected, and adjuvant and infected control groups. On the other hand the OD₄₅₀ values of IgG1 and IgG2a in the rFgSAP-1 vaccinated groups were significantly higher than the control groups ($p < 0.05$; Fig. 5A,B). In the rFgSAP-1-vaccinated mice, the OD₄₅₀ values of rFgSAP-1-specific IgG1 were higher than that of rFgSAP-1-specific IgG2a at all time points.

3.7. Correlations of IgG1 and IgG2a levels with worm recoveries

The correlations between the OD₄₅₀ values reflecting the levels of IgG1 and IgG2a and the numbers of worms recovered were determined at the infection and termination (Fig. 6). In the rFgSAP-1-vaccinated mice, the high OD₄₅₀ values of IgG1 and IgG2a were negatively correlated with the low numbers of worm recovered,

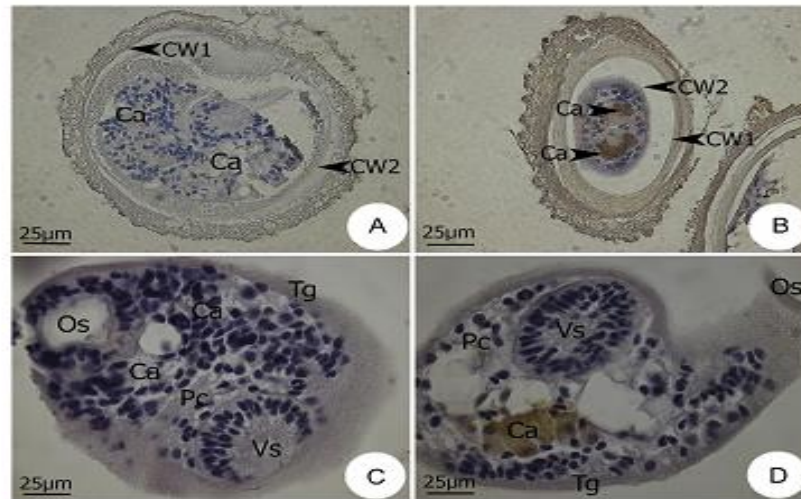


Fig. 4. Localization of native FgSAP-1 in the tissues of metacercariae and NEJ by immunohistochemical detection using rabbit anti-rFgSAP-1 IgG. (a,c) metacercarial and NEJ sections were probed with pre-immunized serum. (b,d) metacercarial and NEJ sections probed with rabbit anti-FgSAP-1 IgG showing a positive signal in the caecum (Ca), no signal was observed in the parenchymal cells (Pc), oral sucker (Os), ventral sucker (Vs), and the tegument (Tg).

Table 2
Worm recoveries and percentages of worm reduction in ICR mice immunized with rFgSAP-1 protein and challenged with 15 metacercariae of *F. gigantica* per mouse.

Groups	Mice	Treatments	Worm recovery	Mean ± SD	Reduction (%)
1. Uninfected Control	10	Non-immunized and uninfected			
2. Infected Control	10	Non-immunized and infected	9,6,8,7,6,7,8,9,7,7	7.4 ± 1.07	–
3. Adjuvant Control	10	Immunized with Adjuvant and infected	8,5,9,7,7,9,5,8,8,5	7.1 ± 1.60	–
4. rFgSAP-1	10	50 µg of rFgSAP-1 plus Adjuvant and infected	2,2,1,1,2,3,4,2,0,2	1.9 ± 1.11	74.3 ^a , 73.2 ^b

^a Significant in worm reduction compared with control groups ($p < 0.05$).

^b Percent reduction, compared with group 2.

^c Percent reduction, compared with group 3.

with IgG1 showing stronger correlation than IgG2a as follows: IgG1 at infection, $r = -0.186$; IgG1 at termination, $r = -0.175$; IgG2a at infection, $r = -0.359$; IgG2a at termination, $r = -0.226$.

3.8. Liver enzymes

The levels of AST and ALT increased above reference range at termination in all groups, except the non-immunized and uninfected group. However, both AST and ALT levels in the rFgSAP-1-vaccinated mice were significantly decreased ($p < 0.05$) when compared with the infected control mice at termination, while the levels of AST and ALT in both groups showed significant increase ($p < 0.05$) when compared to the non-immunized-uninfected control mice (Fig. 7).

3.9. Pathological lesion in the liver

The nonimmunized-infected and adjuvant-infected control mice showed significant higher scores ($p < 0.05$) of liver damage than the rFgSAP-1-vaccinated groups. Six out of ten nonimmunized-infected and adjuvant-infected control mice exhibited the high score of 4, indicating heavy damage between

Table 3
The pathological lesions of the livers were analyzed by scoring the damage lesions. In rFgSAP-1-vaccinated group.

Group	Mean liver damage score ± SD
1. Uninfected Control	–
2. Infected Control	3.5 ± 1.3
3. Adjuvant Control	3.1 ± 0.9
4. rFgSAP-1	1.6 ± 0.8 ^{a,b}

^a Significant in reduction of liver pathological lesion when compared with control group at p -value less than 0.05.

^b Liver damage score, compared with group 2.

^c Liver damage score, compared with group 3.

30% and 50% of the liver surface. All mice in rFgSAP-1-vaccinated group showed score of less than 4 (Table 3).

4. Discussion

In this study, we have successfully cloned FgSAP-1 gene from *F. gigantica* NEJ cDNA and expressed the recombinant protein in prokaryotic expression system using *E. coli*: BL21DE. The sequence of rFgSAP-1 was identical with that previously reported by Grams et al. (2001) and its molecular weight (MW) 12 kDa. A rabbit

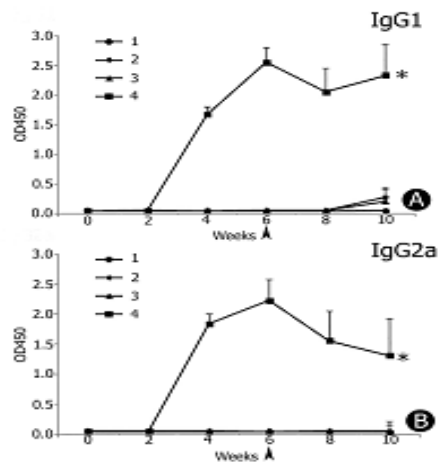


Fig. 5. The levels of IgG1 and IgG2a specific to rFgSAP-1 in the vaccinated and control mice ($n = 10$) which include the non-immunized and uninfected (1), the non-immunized and infected (2), the Alum adjuvant and infected (3), the immunized with rFgSAP-1 and Alum adjuvant and uninfected (4), (A) Mean IgG1 levels expressed as OD₄₅₀ estimated by indirect ELISA, (B) Mean IgG2a levels expressed as OD₄₅₀. Each point of the graphs represents an average value of the duplicated readings. Asterisk (*) denotes significant difference with $p < 0.05$. Single arrows indicate the times of infection.

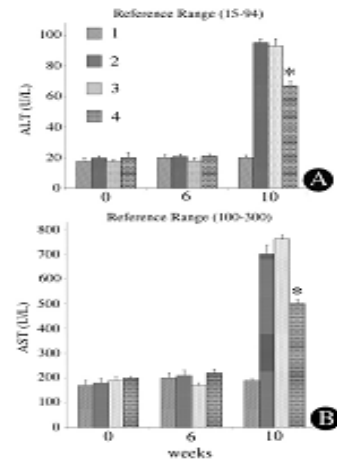


Fig. 7. The levels of liver enzymes at three intervals (at 0 week-preimmunization, at 6 week-challenge with metacercariae, at 10 week-termination) in five groups of mice as follows: (1) non-immunized and uninfected, (2) non-immunized and infected, (3) Alum adjuvant and infected, (4) rFgSAP-1-immunized and infected. The columns represent mean \pm SD levels of AST and ALT from triplicate measurements of the pool sera ($n = 10$). The levels are expressed as U/L (A) The levels of AST in all groups at 0, 6 and 10week (B) The levels of ALT in all groups at 0, 6 and 10week. Asterisk (*) denotes significant difference ($p < 0.05$) when compared the rFgSAP-1-immunized and infected group with the control and non-immunized and infected group.

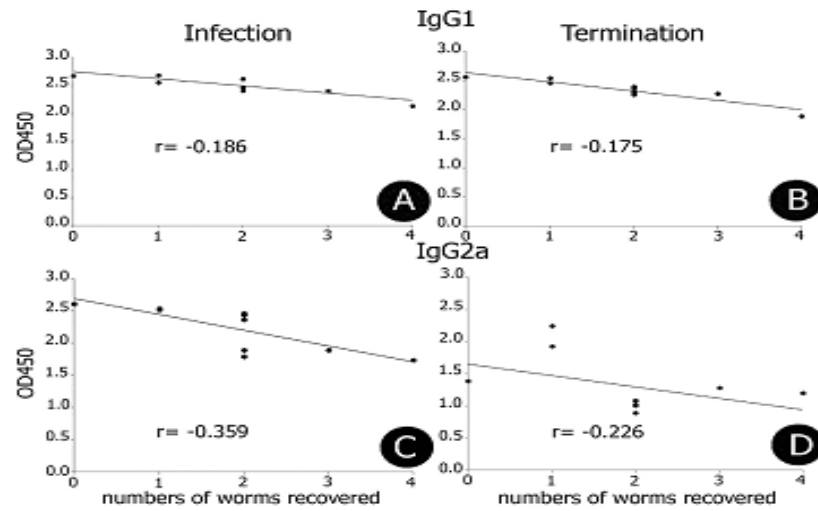


Fig. 6. Correlations between OD₄₅₀ values of IgG1, IgG2a and the numbers of worm recovered at infection (A, C), and termination (B, D) in the rFgSAP-1-vaccinated mice. Each point (●) represents the OD₄₅₀ value the serum ($n = 10$) and number of worm recovered in the rFgSAP-1 vaccinated group.

polyclonal IgG anti-rFgSAP-1 was raised and purified by Affi-Gel[®] protein A MAPS[®] II Kit, and it showed specific reactivity with rFgSAP-1 but not rFgSAP-2. This is because FgSAP-1 showed low identity (%) with FgSAP-2 (55.9%) as previously reported (Grams et al., 2001; Kueakhai et al., 2011). By immunohistochemistry, FgSAP-1 was detected only in caecum of metacercariae, NEJs and 2-week old juvenile, but not in tegument, ventral sucker, oral sucker, parenchyma. It was found that antisera from mouse infected with *F. gigantica* metacercariae collected at 2, 4 and 6 weeks after the infection could react with rFgSAP-1, which indicated that FgSAP-1 was released into the host circulation and stimulated the antibody production in the host after the metacercarial infection.

The immune responses against *Fasciola* spp. metacercarial infections, as well as infections by other trematode parasites, have been shown to be of mixed Th1/Th2 with Th2 predominates (Changklungmoa et al., 2013; Kueakhai et al., 2013b, 2015b; Chantree et al., 2013; Mulcahy et al., 1998, 1999; Clery et al., 1996; Moreau and Chauvin, 2010; Changklungmoa et al., 2016), as indicated by the levels of IgG2a and IgG1, respectively (Moreau and Chauvin, 2010). In the present study, FgSAP-1-vaccinated mice showed the rises of IgG1 and IgG2a reflecting the stimulation of both Th2 and Th1 responses, with IgG1 (Th2) predominated. Similar pattern of mixed Th2/Th1 immune responses with Th2 predominating has been reported in cattle vaccinated with the recombinant *F. hepatica* cathepsin L1 (rFhCatL1) (Golden et al., 2010), in mice vaccinated with rFhSAP-2 vaccine (Espino et al., 2010), in mice vaccinated with rFgSAP-2 vaccine (Kueakhai et al., 2013b), in mice vaccinated with recombinant *F. gigantica* glutathione S-transferase (rFgGST26) (Preyavichyapugdee et al., 2008), rFg cathepsin B3 (rFg-CatB3) (Chantree et al., 2013), rFgCatL1 and rmFgCatL1 (Kueakhai et al., 2015b), rmFgCatL1G (Changklungmoa et al., 2016), rFg superoxide dismutase (rFgSOD) (Jaikua et al., 2016) and rFg leucine aminopeptidase (rFgLAP) (Changklungmoa et al., 2013). Furthermore, there is a high degree of correlation between the high OD₄₅₀ values of IgG1 and IgG2a with the reduction of the numbers of worms being recovered, especially for antisera collected at the time of infection in the rFgSAP-1-vaccinated group. At termination, the rFgSAP-1-immunized groups showed lower correlations between the antibody levels and worm recoveries, because the antibodies may be neutralized by the native proteins that were secreted from parasites during the earlier period of the infection.

In addition, the sizes and weights of parasites in the rFgSAP-1-vaccinated mice were smaller than parasites in non-immunized-infected and adjuvant-infected control mice (data not shown), possibly because the parasites from the rFgSAP-1-vaccinated mice were starved by action of the vaccine. However, the rFgSAP-1 vaccines might not be able to block or kill all parasites as they still could use the other isoforms, i.e., FgSAP-2, that was expressed in late stages of parasites for their survival (Grams et al., 2001; Kueakhai et al., 2011; Kueakhai et al., 2013a). The percent of protection may be increased and the degree of the liver damage may be further decreased if rFgSAP-1 is used in combination with rFgSAP-2 with already proven vaccine potential at 76.4–78.5% (Kueakhai et al., 2013b). Moreover, we have demonstrated that Alum could be used effectively in place of Freund's adjuvant which is often not allowed in ruminant and human vaccinations. Compared to other previous studies we shared the rFgSAP-1 vaccine showed the highest percent protection even need as a single vaccine.

In future experiment a combined vaccines using rFgSAP-1 with rFgSAP-2 and also other recombinant proteins that can block or damage the early stage parasites such as CatB3 (Chantree et al., 2013) or CatL1G (Changklungmoa et al., 2016) should be tried and it successful the system should be tested in larger economic animals.

Acknowledgement

This research was financially supported by The Thailand Research Fund for New Scholar to Dr. Pornanan Kueakhai (Grant No TRG5880085) and a grant from Burapha University approved by the National Research Council of Thailand to Pornanan Kueakhai (Grant no. 31/2560).

References

- Bruhn, H., 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem. J.* 389, 249–257.
- Cabán-Hernández, K., Espino, A.M., 2013. Differential expression and localization of saposin-like protein 2 of *Fasciola hepatica*. *Acta Trop.* 128, 591–597.
- Changklungmoa, N., Kueakhai, P., Rieingrojitak, S., Chaitirayanon, K., Chaichanasak, P., Preyavichyapugdee, N., Chantree, P., Sansri, V., Itagaki, T., Sobhon, P., 2013. Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitol. Res.* 112 (10), 3603–3609.
- Changklungmoa, N., Phonok, N., Yenchan, C., Sobhon, P., Kueakhai, P., 2016. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. *Vet. Parasitol.* 226, 124–131.
- Chantree, P., Phatsara, M., Meemon, K., Chaichanasak, P., Changklungmoa, N., Kueakhai, P., Loruwananarat, N., Sangpairos, K., Songkoomkroong, S., Wanichanon, C., Itagaki, T., Sobhon, P., 2013. Vaccine potential of recombinant cathepsin B against *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol.* 135, 102–109.
- Clery, D., Torgerson, P., Mulcahy, G., 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 63 (1–2), 71–82.
- Espino, A.M., Hillyer, G.V., 2003. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J. Parasitol.* 89, 545–552.
- Espino, A.M., Hillyer, G.V., 2004. A novel *Fasciola hepatica* saposin-like recombinant protein with immunoprotective potential. *J. Parasitol.* 90, 876–879.
- Espino, A.M., Morales, A., Delgado, B., Riveira, F.M., Figueroa, O., Suárez, E., 2010. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Biom. Dis.* 3, 17–23.
- Golden, D., Flynn, R.J., Reed, C., Sekiya, M., Donnelly, S.M., Stack, C., Dalton, J.P., Mulcahy, G., 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine* 28 (2551–2557).
- Grams, R., Vichasri-Grams, S., Sobhon, S., Utham, E.S., Vivanant, V., 2001. Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Parasitol. Int.* 50, 105–114.
- Jaikua, W., Kueakhai, P., Chaitirayanon, K., Tanomrat, R., Wongwairat, S., Rieingrojitak, S., Sobhon, P., Changklungmoa, N., 2016. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. *Acta Trop.* 162, 75–82.
- Jayaraj, R., Piedrafitra, D., Dynon, K., Grams, R., Spithill, T.W., Smooker, P.M., 2009. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet. Parasitol.* 160, 230–236.
- Kueakhai, P., Meemon, K., Changklungmoa, N., Chaitirayanon, K., Rieingrojitak, S., Sobhon, P., 2011. Characterization and localization of saposin-like protein-2 (SAP-2) in *Fasciola gigantica*. *Parasitol. Res.* 108, 1493–1500.
- Kueakhai, P., Changklungmoa, N., Chaitirayanon, K., Songkoomkroong, S., Rieingrojitak, S., Sobhon, P., 2013a. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant saposin-like protein 2 of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop.* 125, 157–162.
- Kueakhai, P., Changklungmoa, N., Rieingrojitak, S., Chaichanasak, P., Meemon, K., Chaitirayanon, K., Chantree, P., Sansri, V., Itagaki, T., Sobhon, P., 2013b. Vaccine potential of recombinant saposin-like protein 2 against fasciolosis *gigantica* in mice. *Vaccine* 31, 5518–5523.
- Kueakhai, P., Changklungmoa, N., Chaitirayanon, K., Phatsara, M., Preyavichyapugdee, N., Rieingrojitak, S., Sangpairos, K., Chusongsang, P., Sobhon, P., 2015a. Saposin-like protein 2 has an immunodiagnostic potential for detecting fasciolosis *gigantica*. *Exp. Parasitol.* 151–152, 8–13.
- Kueakhai, P., Changklungmoa, N., Chaichanasak, P., Jaikua, W., Itagaki, T., Sobhon, P., 2015b. Vaccine potential of recombinant pro- and mature cathepsinL1 against fasciolosis *gigantica* in mice. *Acta Trop.* 150, 71–78.
- Maggioli, G., Acosta, D., Silveira, F., Rossi, S., Giacaman, S., Basilio, T., Gayo, V., Rosadilla, D., Roche, L., Tort, J., Carmona, C., 2011a. The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 29, 9057–9063.
- Maggioli, G., Silveira, F., Martín-Alonso, J.M., Salinas, G., Carmona, C., Parra, F., 2011b. A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from *Fasciola hepatica* induces a protective response in rabbits. *Exp. Parasitol.* 128, 323–330.
- Moreau, E., Chauvin, A., 2010. Immunity against helminthes: infections with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotechnol.* 428593.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., McGonigle, S., Dowd, A., Clery, D.G., Andrews, S.J., Dalton, J.P., 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 26 (9/10), 932–939.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., Clery, D.G., Hogan, S.F., Dowd, A.J., Andrews, S.J., Dalton, J.P., 1999. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccine. *Res. Vet. Sci.* 67 (1), 27–33.

- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J.P., Carmona, C., 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis in sheep. *Infect. Immun.* 67 (4), 1954–1961.
- Preyavichyapuddee, N., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S., Grams, R., Vivanant, V., Sobhon, P., 2008. *Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni*: vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice. *Exp. Parasitol.* 119, 225–237.
- Raadsma, H.W., Kingsford, N.M., Sulhawanta, S.T.W., Piedrafita, D., 2007. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep. I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Ver. Parasitol.* 143, 275–286.
- Raina, O.K., Nagar, G., Varghese, A., Prajitha, G., Alex, A., Maharana, B.R., Joshi, P., 2011. Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. *Acta Trop.* 118, 217–222.
- Reed, M.B., Strugnell, R.A., Panaccio, M., Spithill, T.W., 2000. A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 297–303.
- Rivera, F., Espino, A.M., 2016. Adjuvant-enhanced antibody and cellular responses to inclusion bodies expressing FhSAP2 correlates with protection of mice to *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 160, 31–38.
- Sansri, V., Meemon, K., Changklungmoa, N., Kueakhai, P., Chantree, P., Chaichanasak, P., Lertsuwannarat, N., Itagaki, T., Sobhon, P., 2015. Protection against *Fasciola gigantica* infection in mice by vaccination with recombinant juvenile-specific cathepsin L. *Vaccine* 33 (13), 1596–1601.
- Sethadavit, M., Meemon, K., Jardim, A., Spithill, T.W., Sobhon, P., 2009. Identification, expression and immunolocalization of cathepsin B3: a stage-specific antigen expressed by juvenile *Fasciola gigantica*. *Acta Trop.* 112, 164–173.