

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโปรตีนชั้นผิวพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*
ที่มีศักยภาพสูงสำหรับการพัฒนาการวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis
(Study of the basic characteristics of the high potential *Fasciola gigantica* tegumental
antigens for the development of the fasciolosis diagnosis)

นายวิฑูร ขาวสุข

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

- 8 ส.ค. 2556
0155073
316525

AQ 009 4405

14 ส.ย. 2556

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก
สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

วิฑูร ชาวสุข

มีนาคม 2555

บทคัดย่อ

พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* พบการระบาดในปศุสัตว์เขตร้อน ก่อให้เกิดโรค fasciolosis ปัจจุบันการวินิจฉัยการติดเชื้อทำได้โดยการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ ซึ่งเป็นการตรวจหาพยาธิในระยะตัวเต็มวัยเท่านั้น นักวิทยาศาสตร์จึงตรวจหา antigen ที่จำเพาะในซีรัมของสัตว์ทดลองเพื่อเป็นการตรวจวินิจฉัยตั้งแต่ในระยะแรกของการติดเชื้อ งานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาลักษณะของ antigen ที่พยาธิหลังจากขั้นผิวของพยาธิระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัย รวมทั้งศักยภาพที่จะนำไปวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ โดยคัดเลือกโปรตีนของ tegumental antigen ที่ปล่อยเข้าสู่โฮสต์และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีด้วยวิธี western immunoblotting จากนั้นผลิต polyclonal antibody (PoAb) ที่ต้านต่อ antigen ดังกล่าว แล้วตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ PoAbs ด้วยวิธี ELISA และ western immunoblotting จากนั้นนำ PoAbs ไปตรวจหาคุณลักษณะของ antigen ด้วย 1 และ 2 dimension gel electrophoresis นอกจากนี้ตรวจลักษณะ glycosylation โดยย้อมด้วยสี periodic acid Shciff (PAS) ตรวจผล cross reaction ของ antibody ในพยาธิชนิดต่าง ๆ ตรวจหาตำแหน่งของ antigen ภายในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunoperoxidase นอกจากนี้ตรวจหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี Tandem Mass spectrometry และนำ polyclonal antibody ไปทดสอบความสามารถในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิเบื้องต้นด้วยวิธี direct ELISA

ผลการศึกษพบว่า มีแถบโปรตีนที่น่าสนใจ 4 แถบ คือ 16 kDa 21 kDa 25 kDa และ 36 kDa และสามารถสร้าง PoAbs ที่ต้านต่อโปรตีนทั้ง 4 แถบได้ แต่ PoAb ที่ต้านต่อ 16 kDa ให้ผล cross reaction กับโปรตีนหลายตัว จึงเป็นโปรตีนที่ไม่น่าสนใจ และ PoAbs ที่ต้านต่อ 25 kDa และ 36 kDa ให้ผล cross reaction กับโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 16 kDa ในขณะที่ PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa ให้ผลจำเพาะเจาะจง จากการศึกษด้วยวิธี PAS พบว่าโปรตีนทั้ง 4 ชนิด ให้ผลบวก แสดงว่ามีหมู่น้ำตาลอยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีน จากการศึกษ cross reaction พบว่า PoAbs ที่ต้านต่อ 21 kDa ให้ผล cross reaction กับพยาธิ *Paramphistomum* sp. และ PoAbs ที่ต้านต่อ 25 kDa ให้ผล cross reaction กับ *Eurytrema pancreaticum* จากการศึกษตำแหน่งของโปรตีนในเนื้อเยื่อพบว่า 21 kDa สามารถตรวจพบได้บริเวณชั้นผิวของพยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ในขณะที่ 16 kDa 25 kDa และ 36 kDa ส่วนใหญ่สามารถพบได้บริเวณเนื้อเยื่อ parenchyma แสดงให้เห็นว่า antigen ที่น่าสนใจมากที่สุดคือ 21 kDa จากการศึกษด้วยวิธี 2-DE western immunoblotting พบว่า PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa สามารถทำปฏิกิริยากับ antigen 2 จุด ซึ่งเมื่อนำไปตรวจหาลำดับกรดอะมิโน พบว่าโปรตีนทั้ง 2 จุด คือ calcium binding protein และเมื่อนำ PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa ไปตรวจการติดเชื้อพยาธิในสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 ของการติดเชื้อ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TA เป็น antigen ที่สำคัญ สามารถหลังจากตัวพยาธิและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี จากการศึกษในครั้งนี้อาจสรุปได้ว่า 21 kDa หรือ calcium binding protein เป็น antigen ที่มีศักยภาพสูงสุดที่น่าจะสามารถนำไปศึกษาเพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในอนาคตได้

Abstract

Fasciola gigantica is a causative parasite of fasciolosis in tropical country. The infection is leading to the huge economic loss worldwide. Diagnosis of the disease has done in the latter stage of infection by fecal egg count. In order to investigate the earlier infection, the juvenile-specific circulating antigen has been studied. This study characterizes the properties and immunodiagnostic potential of tegumental antigens (TA). The studies have done by identification the high immunogenic antigen by using natural and experimental *F. gigantica*-infected sera as primary antibodies. After that, the polyclonal antibodies (PoAbs) against the interested protein have produced. The specificity of PoAbs was carried out by ELISA and western immunoblotting. The characteristics of each antigen were identified by 1 and 2 dimensional gel electrophoresis, and periodic acid Schiff (PAS) staining. After the cross reaction experiment among the various parasites, the antigens were localized by immunoperoxidase technique. Sequencing of the most promising antigen has done by Tandem Mass spectrometry. Finally, the PoAb was used for immunodiagnosis by direct ELISA in the experimental infected rat's sera.

The results found that there are 4 bands of interested antigens; 16 kDa, 21 kDa, 25 kDa and 36 kDa. The PoAbs against these antigens have been produced and the PoAb anti 16 kDa showed highly cross reactivity with various antigens. Both PoAbs anti 25 kDa and 36 kDa express the cross reaction with 16 kDa band, whereas, PoAbs anti 21 kDa is very specific. All interested antigenic bands give positive result with PAS staining, shows that they contain carbohydrate moiety within the molecules. Moreover, PoAbs anti 21 kDa shows the cross reactive band with *Paramphistomum* sp. antigen and PoAbs anti 25 kDa cross reacts with *Eurytrema pancreaticum*. The distributions of 25 kDa and 36 kDa are found in the parenchymal tissue, while 21 kDa is found mainly in the tegument of the juvenile and adult parasites. The distribution of 21 kDa shows that it is the most promising among the interested antigen. The latter study found that PoAb anti 21 kDa can reacts with 2 dots of antigens under 2 DE western immunoblotting and they are characterized as calcium binding proteins. Finally, the result of ELISA diagnosis shows that PoAbs can be used for detection of the parasite infection as early as 3 weeks after infection.

This study shows that TA is very important antigen and it can elicit the high specific host immune response. Especially, 21 kDa TA or calcium binding protein is the most interesting antigen that can be further investigated for the immunodiagnostic development of *F. gigantica* infection.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	3
บทคัดย่อ.....	4
สารบัญเรื่อง.....	6
สารบัญตาราง	9
สารบัญภาพ	10
สารบัญคำย่อ.....	11
บทนำ	
การทบทวนวรรณกรรม	12
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	19
วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	20
ขอบเขตของโครงการวิจัย	21
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	21
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	22
เนื้อเรื่อง	
วิธีดำเนินการวิจัย	23
ผลการวิจัย	30
อภิปรายผลการวิจัย	55
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย	58
ผลผลิต	59

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รายงานการเงิน	60
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก	70
ประวัตินักวิจัยและคณะ	72

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์จุดโปรตีนเบอร์ 1 และเบอร์ 2 ด้วย Tandem Mass spectrometry.....	49
ตารางที่ 2 แสดงค่า OD ₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิเป็นเวลา 21 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อศึกษาด้วยวิธี direct ELISA.....	51
ตารางที่ 3 แสดงค่า OD ₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิเป็นเวลา 35 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อศึกษาด้วยวิธี direct ELISA.....	53

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดง TA ของ <i>F. gigantica</i> ที่แยกด้วย 12.5% reducing SDS-PAGE และ western immunoblotting โดยใช้ Rat's infected serum (RIS) เป็น primary antibody.....	30
2	แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 16 kDa.....	31
3	แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 22 kDa.....	32
4	แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 25 kDa.....	32
5	แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 36 kDa.....	33
6	แสดง western immunoblotting ของ antigen ที่ใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 16 kDa เป็น primary antibody.....	34
7	แสดง western immunoblotting ของ antigen ที่ใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa เป็น primary antibody.....	35
8	แสดง western immunoblotting ของ antigen ที่ใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa และ 36 kDa เป็น primary antibody.....	35
9	แสดง western immunoblotting ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ ที่แยกด้วย reducing SDS-PAGE โดยใช้ PoAb anti 21 kDa เป็น primary antibody.....	36
10	แสดง western immunoblotting ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆที่แยกด้วย reducing SDS-PAGE โดยใช้ PoAb anti 25 kDa เป็น primary antibody.....	37
11	แสดง western immunoblotting ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆที่แยกด้วย reducing SDS-PAGE โดยใช้ PoAb anti 36 kDa เป็น primary antibody.....	37
12	แสดง western blotting ของ TA ที่ผ่านการแยกด้วย reducing SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี PAS.....	38
13	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิตัวอ่อน โดยใช้ PoAb anti 16 kDa เป็น primary antibody.....	40
14	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิตัวเต็มวัย โดยใช้ PoAb anti 16 kDa เป็น primary antibody.....	41

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิตัวอ่อน โดยใช้ PoAb anti 21 kDa เป็น primary antibody.....	42
16	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิตัวเต็มวัย โดยใช้ PoAb anti 21 kDa เป็น primary antibody.....	43
17	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa เป็น primary antibody.....	44
18	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวเต็มวัย โดยใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa เป็น primary antibody.....	45
19	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 36 kDa เป็น primary antibody.....	46
20	แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวเต็มวัย โดยใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 36 kDa เป็น primary antibody.....	47
21	แสดง 2-DE gel และ western immune blotting ของ tegumental antigen โดยใช้ PoAb anti 21 kDa เป็น primary antibody	48
22	แสดงโครงสร้างของ Tegumental calcium-binding ของพยาธิ <i>F. gigantica</i>	49
23	แสดง titration curve ของ serum หนูตะเภาที่ immunize ด้วย 21 kDa.....	50
24	แสดง western immunoblotting ของ TA โดยใช้ PoAb guinea pig anti 21 kDa เป็น primary antibody ในความเข้มข้นต่างๆ.....	50
25	กราฟแสดงค่าเฉลี่ย OD ₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 21 วัน.....	52
26	แผนภาพกล่องแสดงค่าเฉลี่ย OD ₄₅₀ ของซีรัมของหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 21 วัน.....	52
27	กราฟแสดงค่าเฉลี่ย OD ₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 35 วัน	53
28	แผนภาพกล่องแสดงค่าเฉลี่ย OD ₄₅₀ ของซีรัมของหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 35 วัน.....	54

สารบัญคำย่อ (List of Abbreviation)

ACN	=	acetonitrile
AEC	=	aminothethyl carbazole
BSA	=	bovine serum albumin
CIS	=	<i>F. gignatica</i> infected cow serum
2 DE	=	2 dimensional gel electrophoresis
DTT	=	dithiotreitol
EDTA	=	ethylene diamine acitic acid
ES	=	excretory secretory antigen
ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
HRP	=	horseradish peroxidase
IEF	=	isoelectric focusing
MoAb	=	monoclonal antibody
MS	=	mass spectrometry
Mw	=	molecular weight marker
NaCl	=	sodium chloride
PAS	=	periodic acid Schiff
PBS	=	phosphate buffer saline
PBST	=	phosphate buffer saline tween 20
PMSF	=	phenylmethyl sulfonyl fluoride
PoAb	=	polyclonal antibody
RIS	=	<i>F. gigantica</i> infected rat serum
SDS	=	sodium dodesyl sulfete
SDS-PAGE	=	sodium dodesyl sulfete-polyacrylamide gel electrophoresis
TA	=	tegumental antigen
TCA	=	trichloro acitic acid
TMB	=	tetramethyl benzidine
WB	=	Whole body antigen

บทนำ (Introduction)

1. การทบทวนวรรณกรรม (Literature review)

Fasciola gigantica เป็นพยาธิใบไม้ตับเขตร้อน ก่อให้เกิดโรค Fasciolosis ซึ่งมีการติดเชื้อในสัตว์ที่กินหญ้าและพืชน้ำเป็นอาหาร เช่น โคและกระบือ (1) โรคพยาธิชนิดนี้เป็นปัญหาที่สำคัญของการปศุสัตว์ในเขตร้อนทั่วโลก (2) โดยแหล่งระบาดส่วนใหญ่พบในทวีปเอเชีย แอฟริกาและแถบอเมริกาใต้ เช่น ในประเทศโคลัมเบีย ฮาวาย อิรัก อิหร่าน รัสเซีย ปากีสถาน อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย รวมทั้งประเทศไทย (3-5) พยาธิชนิดนี้อาศัยอยู่ในท่อน้ำดีและตับของโฮสต์ซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพอย่างรุนแรงที่ตับโดยเฉพาะส่วนของ parenchyma และทำให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำดี สัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิจะมีการเจริญเติบโตช้า ให้ผลผลิตโดยเฉพาะเนื้อและนมลดลง (6) ถ้ามีการติดเชื้อพยาธิในจำนวนมากหรือสัตว์ที่ติดเชื้ออายุน้อยอาจทำให้สัตว์ตายได้ ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจทั่วโลก (2) ปัจจุบันโรคพยาธิชนิดนี้ยังเป็นปัญหาที่สำคัญของการปศุสัตว์ในประเทศไทย โดยมีอัตราการแพร่กระจายของโรคในโคและกระบือประมาณ 4-24 % (7) ซึ่งพบมากที่สุดใภูมิภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ตามลำดับ ทำให้ประเทศไทยต้องสูญเสียรายได้ถึง 350-400 ล้านบาทต่อปี (5) นอกจากนี้พบว่าพยาธิ *F. gigantica* สามารถติดเชื้อในคนได้เช่นกัน ซึ่งพบผู้ป่วยจำนวน 16 คนที่ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (3)

พยาธิ *F. gigantica* เป็นพยาธิที่จัดอยู่ใน Phylum Platyhelminthes, Class Trematoda, Subclass Digenea, Superorder Anepitheliocystida, Order Echinostomatida, Family Fasciolidae และ Genus Fasciola โดยมีวงจรชีวิตเริ่มจากเมื่อไข่ถูกปล่อยออกมาจากอุจจาระของ host ตัวอ่อนภายในไข่จะยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งจะใช้เวลาอยู่ในน้ำประมาณ 10-15 วัน ที่อุณหภูมิ 22-27 องศาเซลเซียส ตัวอ่อนจะเจริญไปเป็น miracidium อยู่ในไข่ หลังจากฟักออกมาจากไข่ miracidium จะว่ายน้ำอยู่ในน้ำ เมื่อพบหอยที่เป็น intermediate host ซึ่งได้แก่ *Lymnaea rubiginosa* miracidium จะไชเข้าไปภายในตัวของหอยแล้วเจริญเป็น sporocyst redia และ cercaria ตามลำดับ ภายใน 3-6 สัปดาห์ cercaria จะไชออกมาจาก intermediate host และว่ายน้ำอยู่ในน้ำเป็นระยะเวลานาน ๆ หลังจากนั้นจะเกาะอยู่ตามพืช เช่น ผักแว่น ผักบุ้ง ผักกระเฉด หรือหญ้า เมื่อสลัดหางออกจะสร้างผนังหุ้มลำตัวเรียกว่า cyst กลายเป็นพยาธิระยะ metacercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อก่อน เมื่อคนหรือสัตว์ที่เป็น specific host กินพืชที่มีตัวอ่อนระยะ metacercaria ปะปนอยู่โดยไม่ทำให้สุกเสียก่อนก็จะติดเชื้อพยาธิเข้าสู่ร่างกาย cyst ของ metacercaria จะถูกย่อยภายในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ทำให้ตัวอ่อนพยาธิสามารถออกมาจาก cyst และไชผ่านผนังลำไส้เข้าสู่ช่องท้อง หลังจากนั้นจะเดินทางไปยังตับผ่านเข้าสู่เนื้อตับและเข้าสู่ท่อน้ำดีเจริญไปเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (8)

การควบคุมโรค

การควบคุมโรค Fasciolosis สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การฉายยาพยาธิ การควบคุมอาหาร และน้ำที่ให้สัตว์กิน ควบคุมบริเวณที่ใช้เลี้ยงสัตว์ และการทำลายหอยที่เป็น intermediate host ของ

พยาธิ นอกจากนี้การควบคุมโรคนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาพเศรษฐกิจและการศึกษาของผู้เลี้ยงสัตว์ซึ่งยังขาดความรู้ความเข้าใจในการป้องกันโรค และไม่ทราบถึงประโยชน์ที่จะได้รับหากสามารถป้องกันและควบคุมโรคพยาธิได้ ในปัจจุบันการควบคุมโรคส่วนมากจะให้ยาฆ่าพยาธิแก่สัตว์ โดยยาที่นิยมใช้ คือ Triclabendazole (6, 9) แต่การใช้ยาฆ่าพยาธิชนิดนี้มีข้อเสีย คือเมื่อใช้ยาในระยะเวลาานาน ๆ จะทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมลดลงเนื่องจากพยาธิเกิดการดื้อยา (10) นอกจากนี้การใช้ยาฆ่าพยาธิและการใช้สารเคมีกำจัดหอยจะทำให้มีสารตกค้างอยู่ในร่างกายของ host และมีการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการคิดค้นวัคซีนขึ้นมาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพยาธิซึ่งเชื่อว่าจะสามารถควบคุมโรคนี้ได้ในระยะยาวและมีราคาถูก (6)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาภูมิคุ้มกันของโรคพยาธิใบไม้ตับที่ติดเชื่อในสัตว์เคี้ยวเอื้องมากขึ้น เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิใบไม้ตับกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็น Specific host วิธีการหนึ่งคือการศึกษาในระดับโมเลกุลมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวัคซีนสำหรับใช้ในการควบคุมและป้องกันการติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับและการวินิจฉัยโรค ก่อนปี ค.ศ. 1987 ได้มีการทดลองฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อต้านต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ซึ่งสกัดได้จากตัวพยาธิตามธรรมชาติและเอนไซม์ protease ที่ปล่อยออกมาจากพยาธิ (11) จากผลการพิสูจน์และแสดงลักษณะเฉพาะของโปรตีนที่สกัดได้จากพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ที่ได้ทดสอบการใช้วัคซีนแล้วนี้ พบว่าสามารถลดการติดเชื่อได้ และพยาธิที่พบจะมีขนาดเล็กลงซึ่งให้ผลเช่น เดียวกับการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ต้านต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยใช้ metacercaria ที่ผ่านการฉายรังสีและหนูที่ถูกฉีดวัคซีนที่สกัดได้จาก metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* (12) แอนติเจนบริสุทธิ์ 4 ชนิดที่สกัดได้จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* นั้นประกอบด้วย fatty acid binding protein (FABP), glutathione S-transferase (GST), cathepsin L และ paramyosin ถูกนำมาทดสอบวัคซีนในโคพันธุ์ Brahman-cross ในประเทศอินโดนีเซียให้ผลการทดลองที่สามารถลดการติดเชื่อพยาธิ *F. gigantica* ได้ (13) ปัจจุบันพบโปรตีนหลายชนิดที่มีแนวโน้มและมีศักยภาพที่จะเป็นวัคซีนตัวเลือก ได้แก่ 1. Fatty acid-binding protein (Fh12) พบว่าสามารถลดการติดเชื่อพยาธิ *S. mansoni* และ *F. hepatica* ในหนูได้ 31-100 % (14) 2. Glutathione S-transferase พบว่าสามารถลดการติดเชื่อพยาธิ *F. hepatica* ในแกะ 57 % (15) และในโค 41-69 % (16) 3. Cathepsin L พบว่าสามารถลดการติดเชื่อพยาธิ *F. hepatica* ในแกะได้ 69 % (17) 4. Haemoglobin พบว่าสามารถลดการติดเชื่อพยาธิ *F. hepatica* ในโคได้ 42-69 % 5. Cathepsin L และ haemoglobin พบว่าสามารถลดการติดเชื่อพยาธิ *F. hepatica* ได้ 72 % (18).

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยการติดเชื่อพยาธิ *F. gigantica* สามารถทำได้ทั้งวิธีทางปรสิตวิทยาและวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน วิธีทางปรสิตวิทยาทำได้โดยการตรวจหาไข่พยาธิที่ออกมากับอุจจาระ แม้ว่าจะเป็นวิธีที่แม่นยำที่สุดแต่ก็มีปัญหาด้านความไวในการตรวจวิเคราะห์ซึ่งจะเป็นการตรวจพบโรคนี้ในช่วงท้ายของการติดเชื่อ เนื่องจากในระยะแรกของการติดเชื่อนั้นพยาธิยังเจริญไม่เต็มที่จึงไม่มีไข่ปนออกมากับอุจจาระทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาไข่พยาธิได้ นอกจากนี้ถ้ามีการติดเชื่อจำนวนน้อยไข่พยาธิก็จะมีในอุจจาระน้อยเช่นกัน จึงอาจต้องตรวจซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง อีกทั้งไข่

ของพยาธิ *F. gigantica* ยังมีลักษณะคล้ายคลึงกับไข่พยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น *Fasciolopsis* sp. และ *Echinostoma* sp. (19) เป็นต้น จึงอาจทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ อีกวิธีหนึ่งคือวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิใน serum และหาแอนติเจนของพยาธิใน serum และในอุจจาระซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคในระยะแรกของการติดเชื้อ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะเป็วิธีที่มีผู้ได้ศึกษากันมากแต่ยังคงอยู่ในช่วงพัฒนาให้มีความไว เทียงตรงและแม่นยำสูง แต่ก็มีข้อเสีย คือไม่สามารถแยกผู้ป่วยหรือสัตว์ที่กำลังติดเชื้อกับผู้ป่วยหรือสัตว์ที่หายจากโรคได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิมาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติเจนที่พยาธิสร้างขึ้นและขับออกมาจากตัวพยาธิ (excretory-secretory materials, ES) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งใน serum (20) และในอุจจาระของผู้ป่วย (21)

จากการศึกษาข้างต้นโปรตีนที่มีศักยภาพเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีน หรือ immunodiagnosis ส่วนใหญ่ถูกปล่อยออกมาจากตัวพยาธิแล้วสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้เป็นอย่างดี ซึ่งโปรตีนดังกล่าวอยู่ในรูปของ excretory-secretory (ES) material (22, 23) ซึ่ง ES antigen ดังกล่าวถูกปล่อยออกมาจากระบบอวัยวะต่าง ๆ ของพยาธิโดยเฉพาะอย่างยิ่งชั้นผิว (tegument) และทางเดินอาหาร (caeca) (24)

ระบบย่อยอาหารแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหน้าประกอบด้วย oral sucker, pharynx และหลอดอาหาร ส่วนหลังประกอบด้วยลำไส้ที่แตกแขนงจำนวนมากจนถึงท้ายสุดของลำตัว (25) เยื่อบุผิวลำไส้ของพยาธิ *F. gigantica* ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างคล้ายพีระมิด ภายในไซโตพลาสซึมมี RER และ zymogen granules จำนวนมาก (25) ซึ่ง zymogen granules เหล่านี้จะถูกปล่อยออกมาจากตัวพยาธิในรูปของ ES material (26) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ES materials นี้ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 กลุ่ม ได้แก่ serine, cysteine, metallo และ aspartic protease (27) เอนไซม์ protease เหล่านี้มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของพยาธิเนื่องจากพยาธิใช้เอนไซม์ protease ในการย่อยอาหาร ย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์ ในขณะที่ migration นอกจากนี้พบว่าพยาธิยังใช้เอนไซม์ protease ในการหลบหลีกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ host อีกด้วย ซึ่งเอนไซม์ที่พบมากที่สุด ใน ES material คือ กลุ่ม cysteine protease (28)

ระบบปกคลุมร่างกาย (Tegument)

ชั้นผิว (Tegument) เป็นอวัยวะที่สัมผัสกับเนื้อเยื่อและ body fluids ของ host ซึ่งถูกปกคลุมด้วย spines จำนวนมาก ยกเว้นบริเวณของ oral sucker ventral sucker และ excretory pore ชั้นของ tegument มีลักษณะเป็น syncytium เชื่อมต่อกับตัวเซลล์ด้วย cytoplasmic process ของเซลล์ tegument ซึ่งตั้งอยู่ใกล้กับ parenchyma ได้ชั้น peripheral muscle ผิวของ tegument จะมีลักษณะยื่นซึ่งเกิดจาก transverse fold สลับกับ groove (29) ชั้นผิวเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญซึ่งมีหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ สังเคราะห์และหลั่งสารต่าง ๆ มาเคลือบผิวทั่วร่างกายของพยาธิ ดูดซึมอาหาร osmoregulation ป้องกันการถูกย่อยโดย enzyme ในระบบทางเดินอาหารของ host และสาร surfactant ของน้ำดี ป้องกันพยาธิจากระบบภูมิคุ้มกันของ host และรับความรู้สึก (29) อย่างไรก็ตามโครงสร้างพื้นฐานของ tegument จะแตกต่างกันไปในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต (30)

การศึกษา ultrastructure ของ tegument ใน *F. gigantica* ตัวเต็มวัย (31) พบว่ามีลักษณะพื้นฐานที่คล้ายคลึงกับ tegument ใน *F. hepatica* ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 4 ชั้น ชั้นที่ 1 ประกอบด้วย microfold หรือ ridge และ pits ซึ่งถูกคลุมด้วย trilaminar membrane หนาประมาณ 8 nm. surface membrane ถูกคลุมด้วย glycocalyx ซึ่งประกอบด้วย 2 ชั้นคือ inner dense homogeneous layer หนาประมาณ 9-14 nm และ outer fibrillar layer หนาประมาณ 50-280 nm ภายใน cytoplasmic syncytium ของ tegument ประกอบด้วย densely-packed microtrabecular network และ granule ลักษณะกลม (G1) ขนาด 90x180 nm. และ granule ที่มีลักษณะคล้าย disc (G2) ขนาดประมาณ 40x250 nm G1 มี matrix เป็นลักษณะ dense ruthenium-red positive matrix ซึ่งมี glycocalyx สะสมอยู่ภายใน ส่วน G2 จะมี matrix ใส glycocalyx ภายใน G1 จะถูก exocytose และเคลือบอยู่บริเวณส่วนนอกของ tegument ส่วน G2 จะทำหน้าที่หลักในการสร้าง surface membrane tegument ชั้นที่ 2 ค่อนข้างแคบซึ่งมี G1 และ G2 สะสมอยู่จำนวนมาก รวมทั้ง lysosome ชั้นที่ 3 เป็นชั้นที่กว้างที่สุด ประกอบด้วย mitochondria จำนวนมาก ปริมาณ G1 และ G2 ลดลง ชั้นที่ 4 อยู่ล่างสุดติดกับ basal lamina cytoplasm ในชั้นนี้มีลักษณะหลวมและมีการพับ (infolding) ของ basal plasma membrane จำนวนมาก รวมทั้งพบ mitochondria G1 และ G2 เช่นกัน เซลล์ tegument ที่อยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อจะส่ง process ขึ้นไประหว่างชั้นกล้ามเนื้อและเชื่อมรวมกับ tegumental syncytium ในชั้นที่ 4 ซึ่งเซลล์ tegument จะส่ง granules G1 G2 ไปยัง tegument โดยอาศัย microtubules ภายในเซลล์ (31)

เซลล์ tegument เรียงตัวเป็นแถวอยู่ใต้กล้ามเนื้อ ภายใน cytoplasm ประกอบด้วย mitochondria RER polysome และ Golgi complex เซลล์ tegument ในพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยมี 2 ชนิดด้วยกันคือเซลล์ T1 และ T2 โดยจะพบกลุ่มเซลล์ชนิด T1 มากกว่า T2 คิดเป็นสัดส่วน T1:T2 ประมาณ 4:1 เซลล์ชนิด T1 มี nucleus ขนาดใหญ่และเห็นได้ชัดเจน มี mitochondria เป็นจำนวนมาก พบ RER และ Golgi complexes ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้าง secretory bodies จึงเห็นได้ว่าเซลล์ชนิด T1 เป็น active secretory cell เซลล์ชนิด T2 มีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์ชนิด T1 แต่มีปริมาณ RER Golgi complex และ mitochondria น้อยกว่าแต่มี secretory bodies ในปริมาณที่มากกว่า เซลล์ชนิด T1 เก็บสะสมอยู่ใน cytoplasm (32) ส่วนเซลล์ tegument ของพยาธิ *F. gigantica* พบว่ามีเพียงหนึ่งชนิดเท่านั้นซึ่งสามารถสร้าง G1 และ G2 granule ได้ภายในเซลล์เดียวกัน (31)

ชั้นผิวของพยาธิ *F. gigantica* ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile ปกคลุมด้วยหนามปลายเดี่ยวทั่วร่างกาย ชั้นผิวมีความหนาประมาณ 1-1.5 ไมครอน สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชั้นย่อย คือส่วนนอกมีลักษณะของ invagination ของผิว ส่วนชั้นภายในมีความกว้างมากกว่า ซึ่งภายในประกอบด้วย granules จำนวนมากและ mitochondria โดย granules ภายในชั้นผิวสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ G0 และ G2 ซึ่งคาดว่า G0 เป็น granule ที่ทำหน้าที่ในการหลั่งสารที่เป็น glycocalyx ในขณะที่ G2 ทำหน้าที่ในการสร้าง membrane ให้ชั้นผิว เมื่อพยาธิมีการพัฒนาเพิ่มมากขึ้น พบว่ามี granule ชนิด G1 เกิดขึ้นในขณะที่ G0 มีปริมาณลดลงและหายไปในที่สุด โดย G1 เริ่มปรากฏเมื่อพยาธิเข้าไปอยู่ในเนื้อตับ (1 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ) ซึ่ง G1 นี้จะทำหน้าที่ในการหลั่ง glycocalyx แทน G0 ในขณะนี้ G2 ก็มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากพยาธิจะถูกโจมตีโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ พยาธิจำเป็นจะต้อง

มีการสลัดผิวออกตลอดเวลาเพื่อป้องกันการจับของเม็ดเลือดขาวบริเวณชั้นผิว ซึ่งการสลัด membrane ของชั้นผิวดังกล่าวจะทำงานร่วมกับการสลัด glycocalyx ของชั้นผิวเช่นกัน ในขณะที่เดียวกันขณะที่พยาธิตัวอ่อนชอนไชไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของโฮสต์นั้น พยาธิก็จะมีการปล่อย protease enzymes ออกมาจากทางเดินอาหาร เพื่อใช้ในการย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อใช้เป็นอาหาร เพื่อชอนไชไปตามส่วนต่าง ๆ และเพื่อทำลายระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (30)

นอกจากนี้พบว่า tegument ของพยาธิ *F. hepatica* มีเอนไซม์สะสมอยู่มากมายได้แก่ acid phosphatase, Na^+/K^+ -ATPase, esterase, peroxidase, cytochrome oxidase และ succinic dehydrogenase (33-38) activity ของเอนไซม์ acid phosphatase จะพบในบริเวณ syncytium โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ apical plasma membrane และยังพบเอนไซม์ภายใน tegument ทางด้าน dorsal มากกว่าด้าน ventral (37, 39) activity ของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase จะพบในบริเวณ invagination ของ apical plasma membrane และ infoldings ของ basal plasma membrane ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิด ion pump ของ tegument membranes โดยจะพบ Na^+/K^+ -ATPase ด้าน ventral มากกว่า dorsal tegument (36, 38)

จากการศึกษาพบว่า tegument ในแต่ละบริเวณของพยาธิมีลักษณะที่แตกต่างทั้งทางด้านรูปร่าง ลักษณะการกระจายของ spine และการกระจายของเอนไซม์ acid phosphatase และ Na^+/K^+ -ATPase ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น sensory receptor ใน tegument ก็พบว่าการกระจายที่แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณเช่นกัน นอกจากนี้พบว่า tegument ก็มีการตอบสนองต่อ anthelmintic induce damage ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณ แสดงให้เห็นว่า tegument ในแต่ละส่วนของร่างกายพยาธิมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไปซึ่งต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป (32)

Tegument-surface associated antigens

Tegumental-associated antigens เป็นแอนติเจนหลักที่ปลดปล่อยออกมาจากพยาธิตัวแบน จากการศึกษา tegumental antigens ของพยาธิ *Schistosoma japonicum* และ *S. mekongi* ด้วยวิธี western immunoblotting พบว่ามีแถบโปรตีนเด่นประมาณ 15-20 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26-205 kDa (40, 41) ในขณะที่ *S. mansoni* มีแถบโปรตีนเด่นที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97, 86, 68, 50 และ 38 kDa (42) ซึ่งเชื่อว่าโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่มาจากชั้นผิวหรือสัมพันธ์กับชั้นผิวของพยาธิ การศึกษา specific โปรตีนของพยาธิใบไม้เลือดพบว่า พบ phosphoglycerate kinase (SmPGK) ในส่วนต่าง ๆ ของ *S. mansoni* รวมถึงชั้นผิว โดย SmPGK นี้จะถูกปลดปล่อยออกมาจากชั้นผิวของพยาธิ เข้าสู่กระแสเลือดของสัตว์ที่ติดเชื้อรวมถึงมนุษย์ (43) โดย SmPGK นี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้เป็นอย่างดีและไม่มีผล cross reaction กับ PGK ของโฮสต์ (43) นอกจากนี้มีการศึกษาพบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 22 kDa บริเวณชั้นผิวของ *S. japonicum* (Sj22) โดยจากการศึกษาการฉีด cDNA ของ Sj22 ในสัตว์ทดลองพบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีเช่นกัน (44) มีการตรวจพบโปรตีน 20.8 kDa ในชั้นผิวของ *S. mansoni* ระยะ sporocyst และตัวเต็มวัย (45, 46) ซึ่ง rSm20.8 สามารถทำปฏิกิริยากับ serum ของคนและกระต่ายที่ immunized ด้วย irradiated cercariae (46) นอกจากนี้พบว่า polyclonal antibodies ที่ต้านต่อ Sm20.8 สามารถตรวจพบ Sm20.8 ในทุกระยะ

ของการพัฒนาของพยาธิ และจากการศึกษา *in vitro* killing โดยใช้ IgG fraction พบว่าสามารถฆ่าพยาธิ schistosomules ของ *S. mansoni* ได้ 34% โดยอาศัยการทำงานร่วมกับ complement (46) และจากการ immunize สัตว์ทดลองด้วย cDNA ของ Sm20.8 พบว่าสามารถลดการติดเชื้อได้ประมาณ 30% หลังจากการติดเชื้อด้วย cercariae (46) จากการศึกษาศึกษาโดยการ screening cDNA libraries ของ *S. mansoni* โดยใช้ polyclonal antibodies ที่ต้านต่อ tegument ของ schistosomules พบ 30S โปรตีนซึ่งสามารถตรวจพบได้ใน serum ของสัตว์ที่ติดเชื้อด้วย irradiated cercariae (47)

การศึกษานพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยพบว่า major antigen มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64-52, 38-24, 17, 15, 13 และ 12 kDa ที่โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 kDa พบได้เฉพาะในระยะแรกของการติดเชื้อเท่านั้น ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยสามารถพบได้ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ (48) ในขณะที่ ES fraction ของ *F. gigantica* ประกอบด้วยโปรตีนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้ดีมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66, 64, 58, 54, 27 และ 26 kDa (49, 50) ซึ่งเชื่อว่า 66, 64, 58 และ 54 kDa เป็นโปรตีนที่หลั่งมาจากชั้นผิว ในขณะที่ 27 และ 26 kDa หลั่งมาจากทางเดินอาหาร (51, 52) จากการศึกษ tegumental antigens ของ *F. gigantica* โดยใช้ monoclonal antibodies พบว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 66 (51) และ 28.5 kDa (53) เป็นโปรตีนที่ตรวจพบได้เฉพาะที่ชั้นผิวเท่านั้น เชื่อว่า tegumental membrane antigens เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะภายใน species ค่อนข้างมาก ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนหรือใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิ ด้วยวิธี immunodiagnosis ต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาศึกษาโดยการนำซีรัมของวัวที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในธรรมชาติ (Cow's infected serum, CIS) มาทำปฏิกิริยากับ tegument antigen (TA) ของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี western immunoblotting พบว่าแถบโปรตีนของ TA ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ CIS ค่อนข้างเข้มคือที่น้ำหนักโมเลกุล 16 21 29 33 และ 52 kDa ซึ่งแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถพบได้ในระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และ crude extract ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย นอกจากนี้จากการนำแอนติเจนที่ 21 kDa มาฉีดให้หนูเพื่อผลิต polyclonal antibody เมื่อนำ polyclonal antibody ดังกล่าวมาศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบโปรตีน 21 kDa ได้ใน excretory secretory antigen ของพยาธิตัวเต็มวัยอีกด้วย และ crude extract ของพยาธิระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และพยาธิระยะตัวเต็มวัย จากการศึกษ ข้างต้นแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa น่าจะถูกคัดหลังจากตัวพยาธิและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี (54)

Immunodiagnosis

แอนติเจนที่นิยมนำมาศึกษา immunodiagnosis ในปัจจุบันได้แก่ ES product ของพยาธิ เนื่องจากเป็นแอนติเจนที่หลั่งออกมาจากตัวพยาธิ และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้เป็นอย่างดี จากการศึกษ circulating antibodies ใน serum ของผู้ป่วยด้วยวิธี ELISA โดยใช้ ES product สามารถตรวจพบ antibodies ได้ในปริมาณที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน (54) และจากการตรวจวินิจฉัย human fasciolosis โดยใช้ ES product ของ *F. hepatica* ด้วยวิธี ELISA พบว่ามี sensitivity และ specificity 100% (55, 56) ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี indirect haemagglutination test

(IHAT) มี sensitivity และ specificity ที่ต่ำกว่าวิธี ELISA (56) ES product ของพยาธิ *Fasciola* มีองค์ประกอบหลักคือเอนไซม์ในกลุ่ม protease โดยเฉพาะ cysteine protease เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่มีการนำมาศึกษากันมากได้แก่ cathepsin (Cat) L, B การศึกษา diagnosis ด้วย ELISA โดยใช้ recombinant Cat L ในการตรวจหาแอนติบอดีใน serum ของแกะและโคที่ติดเชื้อในธรรมชาติ ให้ sensitivity 99.1 และ 100% ในแกะและโค ตามลำดับ ในขณะที่ sensitivity ของการตรวจหาแอนติบอดีใน serum ของแกะและโคที่ติดเชื้อในห้องทดลองมีค่าประมาณ 98.5% ในโค และ 96.5% ในแกะ ซึ่งสามารถตรวจพบแอนติบอดีใน serum ของโคและแกะประมาณสัปดาห์ที่ 5 และ 7 หลังจากการติดเชื้อตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะก่อนการตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ โดยยังคงตรวจพบแอนติบอดีใน serum ของสัตว์จนถึงสัปดาห์ที่ 23 หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้ rFhCat L ใน serum ของสัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* คือพบแอนติบอดีได้ในสัปดาห์ที่ 5-20 หลังจากการติดเชื้อ (57)

การศึกษาในพยาธิ *F. gigantica* พบว่าการวินิจฉัยการติดเชื้อด้วยวิธี ELISA โดยตรวจหาแอนติบอดีของ somatic antigen เปรียบเทียบกับ cysteine protease (CP) พบว่า specificity ของการใช้ CP มีประมาณ 98.4% ซึ่งสูงกว่าการใช้ somatic antigen (96.9%) (58) มีการศึกษานำ purified protein มาศึกษา immunodiagnosis เมื่อให้ได้ sensitivity ที่เพิ่มมากขึ้น โดยการนำ rcat L 1 มาทำ cystatin capture ELISA โดยใช้ serum ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *F. gigantica* 13 คน ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น ๆ 209 คนป่วยเป็นโรค cholangiocarcinoma 32 คนและคนปกติ 42 คน พบว่ามี sensitivity, specificity, accuracy และ positive และ negative values ของวิธีการตรวจสอบประมาณ 100%, 99.3%, 99.3%, 86.7% และ 100% ตามลำดับ โดย IgG4-ELISA ให้ผลการตรวจได้สูงสุด (59) โดยการใช้ specific epitope ของ rcat L1 ดังกล่าว (DKIDWRESGYVTEVKDQGNC และ DKIDWRESGYVTELDKDGNC) ในการตรวจการติดเชื้อ พบว่าให้ sensitivity, specificity, accuracy และ positive และ negative values ประมาณ 100%, 97.3%, 97.5%, 61.9% และ 100% ตามลำดับ (60) มีการนำ purified protein ชนิดอื่น ๆ จาก ES product มาศึกษา immunodiagnosis เช่นกัน นำโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 49.5 kDa มาตรวจหา circulating antibodies ต่อโปรตีนชนิดนี้ด้วยวิธี enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB), counter electrophoresis (CIEP) และ ELISA พบว่าวิธี ELISA ให้ผลการตรวจที่ดีที่สุดคือ sensitivity 91.4%, specificity 92.3%, accuracy 91.8%, negative predictive value 88.9% และ positive predictive value 94.1% (61) ส่วนโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 26-28 kDa circulating antigens ของ *F. gigantica* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตมาจาก gut และชั้นผิวของพยาธิตัวเต็มวัย ภายในโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic ประมาณ 47.5% hydrophobic ประมาณ 29.3% และจากการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจหา circulating 26-28 kDa ใน serum ของโค 9 ตัวซึ่งติดเชื้อด้วย *F. gigantica* โดยมีกลุ่มควบคุมจำนวน 27 ตัว ด้วย polyclonal antibody ที่ต้านต่อ 26-28 kDa ให้ sensitivity 100% (62) ในขณะที่การนำ 28 kDa cystein protease มาตรวจหาแอนติบอดีใน serum ของแกะด้วยวิธี ELISA, western blotting และ Dipstick-ELISA ซึ่งติดเชื้อ *F. gigantica* ในห้องทดลอง พบว่าให้ sensitivity 100% ซึ่งสามารถตรวจพบแอนติบอดีด้วยวิธี western blotting ได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2

หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งพบพยาธิภายในสัตว์ทดลองจำนวน 38 ตัว ในขณะที่สัตว์ทดลองที่พบพยาธิในดับจำนวน 3-8 ตัวนั้นสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ 28 kDa ประมาณสัปดาห์ที่ 10th หลังจากการติดเชื้อ (63) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ El-Kerdany และคณะ (64) พบว่า tegumental antigen ของพยาธิ *F. gigantica* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีกว่า ES หรือ somatic extract หลังจากการศึกษาดังกล่าวด้วยวิธี ELISA immunohistochemical staining และ CIEP จากการศึกษที่ผ่านมามากมายแสดงให้เห็นว่ามีการนำแอนติเจนของชิ้นผิวมาศึกษา immuodiagnosis กันค่อนข้างน้อย Viyanant และคณะ ทำการผลิต monoclonal antibody ต่อ circulating 66 kDa tegumental antigen ของ *F. gigantica* แล้วนำมาตรวจหาโปรตีน 66 kDa ใน serum ของสัตว์ที่ติดเชื้อในธรรมชาติด้วยวิธี sandwich ELISA โดยการ coat microtiter plate ด้วย monoclonal antibody และ probe ด้วย polyclonal rabbit sera anti 66 kDa พบว่าให้ sensitivity ประมาณ 86.6-100 % ซึ่งสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1- 32 ของการติดเชื้อในธรรมชาติ (51)

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* เป็นสาเหตุของโรค fasciolosis ในปศุสัตว์และมนุษย์ ซึ่งมีการระบาดมากในประเทศเขตร้อน ทำให้ผลผลิตทางปศุสัตว์ลดลงรวมถึงเป็นสาเหตุการตายของสัตว์ในรายที่มีการติดเชื้อรุนแรง โรคพยาธิชนิดนี้รักษาได้โดยการให้ยา Triclabendazole แก่สัตว์ที่ติดเชื้อ แต่ยาชนิดนี้มีราคาค่อนข้างแพงและต้องใช้ในปริมาณมากถึงจะฆ่าพยาธิได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพยาธิชนิดนี้สามารถพัฒนาตัวเองให้สามารถต้านยาชนิดนี้ได้ ซึ่งทำให้ในแต่ละปีจะต้องใช้ยาฆ่าพยาธิในปริมาณที่มากขึ้นทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคพยาธิสามารถทำได้โดยการตรวจไข่ของพยาธิชนิดนี้ในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยการติดเชื้อด้วยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องการผู้ที่มีความชำนาญสูงในการตรวจวิเคราะห์ และไข่พยาธิ *F. gigantica* มีลักษณะคล้ายคลึงกับไข่พยาธิ *Fasciolopsis* spp. และ *Echinostoma* spp. ทำให้การตรวจอาจเกิดความผิดพลาดได้ และที่สำคัญที่สุดคือการตรวจพบไข่พยาธิ แสดงให้เห็นว่าเป็นการติดเชื้อพยาธิในช่วงท้ายของการติดเชื้อ ซึ่งในระยะนี้พยาธิตัวเต็มวัยได้เข้าไปอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีของสัตว์ที่ติดเชื้อ ทำให้การรักษาโดยการให้ยาฆ่าพยาธิไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร นักวิทยาศาสตร์จึงคิดค้นวิธีใหม่ ๆ ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิชนิดนี้ คือวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิใน serum และในอุจจาระ ซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในระยะแรกของการติดเชื้อ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะ เป็นวิธีที่มีผู้ได้ศึกษากันมากแต่ยังคงอยู่ในช่วงพัฒนาให้มีความไว เทียบตรงและแม่นยำสูง แต่ก็มีข้อเสียคือไม่สามารถแยกผู้ป่วยหรือสัตว์ที่กำลังติดเชื้อกับผู้ป่วยหรือสัตว์ที่หายจากโรคได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิมาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติเจนที่พยาธิสร้างขึ้นและขับออกมาจากตัวพยาธิ (excretory-secretory materials, ES) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งใน serum และในอุจจาระของผู้ป่วย

จากการศึกษาพบว่า ES antigens สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี ซึ่ง ES antigen ดังกล่าวถูกปลดปล่อยออกมาจากทางเดินอาหาร ระบบขับถ่าย และระบบชั้นผิวของพยาธิ จากการศึกษา immunodiagnosis โดยใช้การตรวจหาเอนไซม์ cathepsin L ของพยาธิ *Fasciola* ซึ่งเป็น

แอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมาจากทางเดินอาหาร พบว่าให้ sensitivity ที่ดี แต่พบว่ามี specific ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาแบบ cross reaction กับพยาธิชนิดอื่นได้ ได้แก่ *Schistosoma* sp. และ *Echinococcus* sp. ดังนั้นการตรวจหาแอนติเจนที่ปลดปล่อยออกมาจากชั้นผิวของพยาธิจึงเป็นทางเลือกใหม่ เนื่องจากชั้นผิวเป็นโครงสร้างที่สัมผัสกับเนื้อเยื่อของโฮสต์โดยตรง และทำหน้าที่ในการคัดหลั่งสารเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์ในรูปของ ES antigen จึงทำให้โปรตีนจากชั้นผิวสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี

จากการศึกษาโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 22 kDa บริเวณชั้นผิวของ *S. japonicum* (Sj22) และ *S. mansoni* (Sm22) พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ และสามารถบ่งบอกถึงการผลิต antigen-specific IgE antibody ของการติดเชื้อพยาธิ schistosome และการติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น ๆ ได้ จากการศึกษาโดยการตรวจหาแอนติเจนของชั้นผิวพยาธิ *F. gigantica* ที่น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa พบว่าสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 – 32 ของการติดเชื้อ และให้ sensitivity ประมาณ 86.6% จากการศึกษาโดยการนำซีรัมของวัวที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในธรรมชาติ (Cow's infected serum, CIS) มาทำปฏิกิริยากับ tegument antigen (TA) ของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี western immunoblotting พบว่าแถบโปรตีนของ TA ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ CIS ค่อนข้างเข้มคือที่น้ำหนักโมเลกุล 16 21 29 33 และ 52 kDa ซึ่งแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถพบได้ในระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และ crude extract ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย นอกจากนี้จากการนำแอนติเจนที่ 21 kDa มาฉีดให้หนูเพื่อผลิต polyclonal antibody เมื่อนำ polyclonal antibody ดังกล่าวมาศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบโปรตีน 21 kDa ได้ใน excretory secretory antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย crude extract ของพยาธิระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และพยาธิระยะตัวเต็มวัย จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa น่าจะถูกคัดหลั่งจากตัวพยาธิและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี จึงเป็นโปรตีนตัวเลือกที่น่าสนใจที่จะทำมาศึกษาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนามต่อไปในอนาคต

อย่างไรก็ตามการศึกษาคูณลักษณะพื้นฐานของ tegumental antigen ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ CIS นั้นยังมีการศึกษากันค่อนข้างน้อยทั้งในเรื่องของลักษณะพื้นฐานของโปรตีน เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ผลิต antigen และศักยภาพในการทำไปตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นลักษณะพื้นฐานของโปรตีน เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ผลิต antigen และศักยภาพในการทำไปตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาในระดับสูงต่อไป

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคูณลักษณะของโปรตีนจากชั้นผิวของพยาธิ *F. gigantica* ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี
2. เพื่อศึกษาศักยภาพของโปรตีนจากชั้นผิวของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยในการนำไปพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis เบื้องต้นในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยในครั้งนี้เป็นศึกษาหาแอนติเจนจากชั้นผิวพยาธิ และรวมถึงศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแอนติเจนดังกล่าวเป็นสำคัญ เพื่อนำมาพัฒนาใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis เขตร้อนในสัตว์เคี้ยวเอื้องและมนุษย์ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* การศึกษาเริ่มต้นโดยการคัดเลือกโปรตีนเฉพาะจาก tegumental antigen (TA) ของพยาธิ โดยการทำปฏิกิริยากันระหว่าง TA และ natural infected serum โดย positive band ที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงโปรตีนของชั้นผิวพยาธิที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี ซึ่งการคัดเลือก band จะพิจารณาจากความเข้มของจุดโปรตีนที่เกิดขึ้นจาก 2 dimensional gel electrophoresis และจุดโปรตีนนั้น ๆ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ช่วงต้นของการติดเชื้อพยาธิ เมื่อคัดเลือกจุดโปรตีนได้แล้วจะเป็นขั้นตอนการผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อโปรตีนดังกล่าว โดยการตัดจุดโปรตีนผสมกับ adjuvant แล้วฉีดให้สัตว์ทดลอง หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนการ screening polyclonal antibodies ที่สร้างขึ้นว่ามีความจำเพาะต่อ band ที่ฉีดให้หรือไม่ด้วยวิธี indirect ELISA โดย coat microtitre plate ด้วย TA antigen แล้วศึกษาคุณสมบัติของ specific แอนติเจนโดยใช้ polyclonal antibodies ที่ผลิตได้เป็น probe ซึ่งประกอบด้วย (1) การศึกษา specificity ของ polyclonal antibodies โดยการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของพยาธิ *F. gigantica* และพยาธิ species ใกล้เคียง (2) การศึกษาคุณสมบัติ glycosylation โดยการย้อมด้วยสี periodic acid Schiff reagent (PAS) (3) นอกจากนี้ยังศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ specific protein ในเนื้อเยื่อของพยาธิโดยวิธี immunoperoxidase เพื่อให้ทราบว่าเนื้อเยื่อใดที่มีการสะสมของโปรตีนชนิดนั้น ๆ และ (4) เป็นการศึกษาศักยภาพของ polyclonal antibodies ที่ผลิตได้ในการนำไปใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี immunodiagnosis เบื้องต้นด้วยวิธี direct ELISA โดยการตรวจหา specific antigen ภายใน serum ของสัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในห้องปฏิบัติการที่อายุของการติดเชื้อแตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้ทราบว่าสามารถตรวจพบ specific antigen ได้ในช่วงใดของการติดเชื้อ

5. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากข้อมูลของการศึกษาที่กล่าวมาแล้วข้างต้นแสดงให้เห็นว่ามีการศึกษาลักษณะแอนติเจนของชั้นผิวเพื่อนำมาพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis กันค่อนข้างน้อยมาก และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาอันยังไม่สามารถนำมาใช้ได้จริงในภาคสนาม และยังคงอยู่ในขั้นตอนการศึกษาหาโปรตีนที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ เพราะฉะนั้นเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาหาแอนติเจนตัวใหม่ ๆ เพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการนำไปพัฒนาต่อไป แอนติเจนจากชั้นผิวนับว่าเป็นแอนติเจนที่มีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาดังกล่าว โดยการศึกษาในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายหลักคือ มุ่งเน้นที่จะคัดเลือกแอนติเจนหลักจากชั้นผิวที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีมาศึกษาความสามารถในการนำมาตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิด้วยวิธี immuno diagnosis ซึ่งโปรตีนของชั้นผิวพยาธิ *F. gigantica* ที่พบได้ตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อ และถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดของโฮสต์นั้น น่าจะมีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปพัฒนาเพื่อการวินิจฉัยโรคพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ต่อไปได้

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลของโปรตีนชนิดใหม่ ๆ ที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเพื่อนำไปวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis ด้วยวิธี immuodiagnosis ซึ่งจะเป็นการวินิจฉัยในระยะแรกของการติดเชื้อ ซึ่งเป็นระยะที่พยาธิเพิ่งจะ infect โฮสต์ การทำลายเนื้อเยื่อตัวยังมีไม่มากนัก นอกจากนี้เป็นระยะที่พยาธิมีความอ่อนแอ มีความไวต่อยาฆ่าพยาธิ เพราะฉะนั้นน่าจะเป็นช่วงเวลาที่สามารถทำลายพยาธิได้ดีและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้น่าจะเป็นการทำลายพยาธิก่อนที่จะมีการทำลายเนื้อตับมากขึ้นในช่วงท้ายของการติดเชื้อ ทำให้ปศุสัตว์มีสุขภาพที่ดี ลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ และผลการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นของโปรตีนที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนได้ในอนาคต ซึ่งจะ เป็นวิธีการป้องกันการติดเชื้อพยาธิในระยะยาวต่อไป

โดยเมื่อโครงการนี้ประสบความสำเร็จ ข้อมูลที่ได้จะสามารถเป็นประโยชน์ต่อกรมปศุสัตว์ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพก่อนที่จะมีการติดเชื้อที่รุนแรง หรือแม้แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงโค กระบือ ก็อาจจะสามารถตรวจโรคพยาธิได้เอง ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้จะมีประโยชน์กับการวินิจฉัยโรคพยาธิในมนุษย์ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ได้เช่นกัน

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

1. การเก็บตัวอย่างพยาธิ *F. gigantica*

1.1 ไข่ (eggs)

ทำการเก็บไข่พยาธิจาก *F. gigantica* ตัวเต็มวัยและจากถุงน้ำดีของโคที่มีการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* โดยนำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์มาแช่ในสารละลาย normal saline เพื่อให้พยาธิตัวเต็มวัยปล่อยไข่ออกมา หลังจากนั้นนำ normal saline ที่มีไข่พยาธิปะปนอยู่และน้ำดีของวัวที่มีการติดเชื้อพยาธิมาตั้งทิ้งไว้ให้ไข่พยาธิตกตะกอน แล้วล้างไข่พยาธิด้วย normal saline หลาย ๆ ครั้งจนกว่าสารละลาย normal saline ใส หลังจากนั้นนำไป centrifuge แล้วเก็บไข่พยาธิไปใช้ทำการทดลองต่อไป

1.2 Metacercaria

พยาธิระยะ metacercaria ของ *F. gigantica* ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง โดยการ infect พยาธิระยะ miracidium เข้าหอย *Lymnaea ollula* หลังจากนั้นประมาณ 60 วัน ทำการ shed พยาธิระยะ cercaria ออกจากตัวหอยแล้วปล่อยให้เกาะและ encyst บนแผ่นพลาสติกใสกลายเป็นพยาธิระยะ metacercaria หลังจากนั้นใช้แปรงเขี่ย metacercaria ออกจากแผ่นพลาสติกแล้วแช่ในสารละลาย normal saline เก็บไว้ใช้ทำการทดลองต่อไป

1.3 ตัวอ่อนอายุ 7 สัปดาห์

ทำการป้อน metacercariae จำนวน 50 ตัวให้หนู Wistar Rat โดยใช้ gastric tube วันที่ 49 หลังจากการ infection ทำการสลบหนูด้วย diethyl ether แล้วเก็บพยาธิระยะตัวอ่อนจากตับ ล้างพยาธิด้วยสารละลาย normal saline แล้วเก็บไว้ทำการทดลองต่อไป

1.4 ตัวเต็มวัย

เก็บพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยจากถุงน้ำดีและท่อน้ำดีของตับโคที่ถูกฆ่าจากโรงฆ่าสัตว์ จากนั้นนำพยาธิที่ได้มาล้างด้วยสารละลาย normal saline จนกว่าจะไม่มีเลือดและน้ำดีติดอยู่ที่ตัวพยาธิ แล้วนำไปทำการทดลองต่อไป

2. การเตรียมแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

2.1 Whole body (WB) antigens

นำพยาธิในระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ ไข่ metacercaria ตัวอ่อนอายุ 7 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยมา homogenize ใน homogenization buffer ที่เย็นซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) แล้วนำไป sonicate ที่อุณหภูมิ 4°C นานประมาณ 5 นาที rotate ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป centrifuge และเก็บ supernatant นำไปวัดความเข้มข้นโดยวิธีของ Lowry ต่อไป

2.2 Tegumental antigen (TA)

นำพยาธิตัวเต็มวัยมาล้างด้วยสารละลาย Hank's balance salt solution ที่มี penicillin และ streptomycin ผสมอยู่ หลังจากนั้นนำพยาธิตัวเต็มวัยไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 1% Triton-X 100, 0.05 M Tris buffer pH 8.0, 0.01 M EDTA และ 150 mM NaCl นานประมาณ 20 นาที เก็บสารละลายที่แช่พยาธิมา centrifuge ที่ 100,000g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลาย tegumental antigen ใน PBS pH 7.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มข้นโดยวิธีของ Lowry ต่อไป

2.3 Excretory-secretory (ES) antigen

นำพยาธิตัวเต็มวัยมาแช่ในสารละลาย Hank's balance salt solution ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป centrifuge ที่ 4°C ความเร็ว 5,000g นาน 30 นาที เก็บ supernatant กรองด้วย 0.22 ไมครอน Millipore filter นำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มข้นโดยวิธีของ Lowry ต่อไป

3. การคัดเลือกแถบโปรตีนที่เป็น highly immunogenic bands

ขั้นตอนนี้เป็น การคัดเลือกแถบโปรตีนเด่นที่พบได้ในชั้นผิว (tegumental antigen, TA) ของพยาธิ *F. gigantica* และเป็นโปรตีนที่สามารถตรวจพบได้ในชั้นผิวของพยาธิตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อพยาธิในธรรมชาติ โดยการนำ TA ของพยาธิมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของวัวที่ติดเชื้อพยาธิในธรรมชาติ และซีรัมของหนูที่ติดเชื้อพยาธิในห้องทดลองที่อายุ 7 สัปดาห์ แล้วคัดเลือกแถบโปรตีนที่มีความเข้มมาก โดยมีวิธีการศึกษาคือ เริ่มต้นโดยการแยก TA ของ *F. gigantica* โดยวิธี reducing SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli หลังจากนั้นนำโปรตีนไปย้ายลงแผ่น nitrocellulose โดยวิธี western blotting แล้วนำแผ่น blotting ที่ได้ไปทำ immunostaining โดยใช้ซีรัมของวัวที่ติดเชื้อพยาธิในธรรมชาติ (CIS) และซีรัมของหนูที่ติดเชื้อพยาธิในห้องทดลองที่อายุ 7 สัปดาห์ (RIS) เป็น primary antibody

3.1 แยกโปรตีนด้วยเทคนิค one dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

นำ TA มาผสมกับ sample buffer, 0.35 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% glycerol, 0.175 mM Bromophenol Blue และ 9.3% DTT ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปต้มประมาณ 5 นาที centrifuge แล้วนำไปแยกด้วย separating gel 12.5% และ stacking gel 4% โดยใช้ปริมาณ Ta 10 µg/ well ใช้ standard marker เป็น reference ของ molecular weight และใช้ 0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% SDS เป็น running buffer ทำการแยก antigens โดยใช้ constant current กระแสไฟฟ้า 20 mA, 250 V จาก cathode ไปยัง anode เมื่อ Bromophenol Blue marker วิ่งมาถึงขอบด้านล่างของแผ่น gel นำแผ่น gel ที่ได้ไปย้อมด้วยสี Coomassie Blue คำนวณ molecular weight ของ antigens ที่แยกได้ โดยใช้ standard molecular weight marker เป็น reference Standard curve ของ standard molecular weight marker ทำได้โดยการวัด relative mobility ของแถบโปรตีนแต่ละแถบแล้วนำไป plot กราฟ semilogarithm ต่อ molecular weight ของโปรตีนแต่ละแถบ

3.2 Western blotting

นำแผ่น gel จากข้อ 3.1 ที่ยังไม่ได้ย้อมสีมาย้ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose ด้วยวิธี semidried transfer โดยการ soak แผ่น gel แผ่น nitrocellulose และแผ่นกระดาษกรองใน transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine และ 20% methanol) หลังจากนั้นนำไปวางบนเครื่อง semidry blotting transfer โดยวางกระดาษกรอง 3 แผ่นไว้ด้านล่างสุด ตามด้วยแผ่น gel และแผ่น nitrocellulose ไว้บนสุด ใส่ฟองอากาศออกให้หมด แล้ววางแผ่นกระดาษกรองอีก 3 แผ่นไว้ด้านบนสุด โดยให้แผ่น gel หันไปทางด้านขั้ว anode หลังจากนั้นทำการ transfer ที่ constant current 0.8-1.0 mA ต่อ 1 ตารางเซนติเมตรของเนื้อ gel นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose ที่ได้ออกมาย้อมด้วยสี 0.1% Ponceau S ใน 5% acetic acid เพื่อย้อมให้เห็นแถบโปรตีนที่แยกได้ ตากให้แห้ง แล้วนำไปทำ immunostaining ต่อไป

3.3 Immunostaining

นำแผ่น nitrocellulose มาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้างสี Ponceau S ออก แล้วนำไป block nonspecific binding โดยการแช่ใน 5% Skimmed milk ที่ละลายใน 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง แช่แผ่น nitrocellulose ใน primary antibody (CIS และ RIS ที่ละลายใน 1% skimmed milk ใน PBS + 0.05% Tween 20 + 1% BSA) นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-Tween 20 ต่อมาแช่ใน secondary antibody (horseradish peroxidase –conjugated rabbit anti bovine IgG หรือ horseradish peroxidase –conjugated goat anti rat IgG) นาน 1 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย PBS-Tween 20 หลังจากนั้นแช่แผ่น nitrocellulose ใน tetramethyl benzidine (TMB) ประมาณ 5-10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น ตากให้แห้งแล้วนำไปคำนวณ molecular weight ของแต่ละแถบของโปรตีน แล้วคัดเลือกแถบของโปรตีนที่ให้ผล positive

4. การผลิต Polyclonal antibody ที่ต้านต่อ highly immunogenic bands

4.1 การ Immunization หนูด้วย highly immunogenic bands

นำ TA fraction ของพยาธิมาผ่านการแยกด้วย 1-DE gel ตามวิธีในข้อ 3.1 และย้อมด้วยสี Coomassie blue หลังจากนั้นตัดแถบโปรตีนที่สนใจมาบด แล้วผสมกับ complete Freund's adjuvant จากนั้นนำไป immunize ในสัตว์ทดลอง โดย immunize หนู Wistar rat ทาง subcutaneous (priming, วันที่ 0) ทำการ immunization อีกครั้งหลังจากการ priming 2 สัปดาห์ (first boosting, วันที่ 14) และ 4 สัปดาห์ (second boosting, วันที่ 28) ด้วยโปรตีนที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ทาง subcutaneous เก็บ serum ของหนูในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองทาง tail vein โดยเก็บเลือดในวันที่ 0, 12 และ 26 เมื่อครบวันที่ 35 หลังจากการ immunization ทำการสลับหนู แล้วเก็บเลือดจากหัวใจ

นำ serum ที่ได้ในแต่ละช่วงของการทดลองมาทำการตรวจ titer ของ antibody โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

4.2 การตรวจสอบ titer ของ polyclonal antibody ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การทำ ELISA ใช้ตามวิธีของ Engval และ Perlman โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งใช้ TA ในการ coat microtiterplate และใช้ horseradish peroxidase เอนไซม์เป็น probe ตามวิธีการคร่าว ๆ ดังนี้

ละลาย TA จำนวน 10 µg ใน coating buffer ปริมาตร 50 µl แล้วนำไป coat polystyrene microtiter plate จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12-14 ชั่วโมง ล้าง TA ส่วนเกินด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้ว block nonspecific binding ของ antibody ด้วย 5% skimmed milk ใน PBS-T จำนวน 200 µl แล้วแช่ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ตามด้วย primary antibody, rat sera ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T หลังจากนั้นแช่ด้วย peroxidase-conjugated goat anti-rat immunoglobulin ที่ละลายใน 1% skimmed milk ใน PBS-T ปริมาตร 100 µl ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T สุดท้ายแช่ด้วย TMB ปริมาตร 100 µl ที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยา โดยการเติม 6 N H₂SO₄ ปริมาตร 100 µl นำไปวัดค่า OD ที่ 492 nm ด้วย microtitre plate reader หลังจากนั้นนำค่า OD ที่ได้ไป plot กราฟ และคำนวณหาค่า titer

5. การศึกษาคุณลักษณะของ high immunogenic proteins

5.1 ศึกษาด้วยวิธี Western immunoblotting

เป็นการตรวจสอบยืนยันว่า polyclonal antibodies ที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อแถบโปรตีนที่ฉีดเข้าไปหรือไม่ ด้วยวิธี reducing SDS-PAGE, non-reducing SDS-PAGE, 2-DE gel electrophoresis, และ western immunoblotting โดยใช้ polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากข้อ 4 เป็น primary antibody แล้ววัดน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ positive ต่อ polyclonal และน้ำหนักโมเลกุลในสภาวะ reducing และ non-reducing มีความแตกต่างกันอย่างไร นอกจากนี้ยังศึกษาความจำเพาะเจาะจงของ polyclonal antibody ว่ามี cross reaction กับพยาธิชนิดอื่น ๆ หรือไม่

5.1.1 reducing และ non reducing sodium dodesylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ western immunoblotting

นำ TA มาแยกด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยใช้ loading buffer 2 ชนิด คือ reducing buffer และ non reducing buffer (ไม่มี DTT หรือ mercaptoethanol) หลังจากนั้นนำมาทำ western immunoblotting ตามวิธีในข้อ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ โดยใช้ rat sera ที่ต้านต่อแถบโปรตีนที่สนใจเป็น primary antibody

5.1.2 2-DE gel electrophoresis และ western immunoblotting

นำ TA ความเข้มข้น 200 µg มาผสมกับ rehydration buffer ที่ประกอบด้วย 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 120 mM DTT, 40 mM Tris-base, 2% ampholytes (pH 3-10) และ bromophenol blue ให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 150 µl จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาใส่ถาดตัวอย่างแล้วดูดซับด้วย Immobililine DryStrip (ยาว 7 cm มีค่า nonlinear pH gradient 3-10) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง จากนั้นนำ strip ไปแยกใน dimension แรก คือ isoelectric focusing (IEF) โดย

เครื่อง Ettan IPGphor II IEF System (GE Healthcare) ที่อุณหภูมิ 20°C โดยกำหนดให้มีการเพิ่มของ voltage เป็นแบบขั้นบันได (stepwise mode) จนถึง 9000 Vh หลังจากสิ้นสุดการขั้นตอนการทำ IEF แล้วนำแผ่น strip มา equilibrate ด้วย buffer I ที่ประกอบด้วย 6 M urea, 130 mM DTT, 112 mM Tris-base, 4% SDS, 30% glycerol, และ 0.002% bromophenol blue เป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นนำมาแช่ใน buffer II ที่มีส่วนประกอบคล้ายกันเว้นแต่มี 135 mM iodoacetamide มาแทน DTT เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ strip มาแยกโปรตีนใน dimension ที่สอง กระทำบน 12% polyacrylamide gel โดยใช้เครื่อง SE260 mini-Vertical Electrophoresis Unit (GE Healthcare) ที่ 150 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โปรตีนต่าง ๆ ที่แยกได้จะนำมาย้อมด้วยสี Coomassie blue และนำแผ่น gel ไปสแกนด้วยเครื่อง Typhoon laser scanner (GE Healthcare) และศึกษาว่า polyclonal antibody ที่ผลิตได้มีความจำเพาะเจาะจงกับ antigen ในจุดใดบน 2-DE ด้วย western immunoblotting ตามวิธีในข้อ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ โดยใช้ rat sera ที่ต้านต่อแถบโปรตีนที่สนใจเป็น primary antibody

5.1.3 การศึกษา specificity ของ polyclonal antibody

เป็นการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่า polyclonal antibodies ที่ผลิตได้นั้นมีผล cross reaction กับพยาธิชนิดอื่น ๆ หรือไม่ โดยการศึกษาคู่ออกของพยาธิตัวแบนในกลุ่ม trematode ได้แก่ *Paramphistomum* sp. *Eurytrema pancreaticum* และ *Gigantocotyl* sp. ด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วทำ western immunoblotting ตามวิธีในข้อ 3 โดยใช้ polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากข้อ 4 เป็น primary antibody

5.2 ศึกษาคุณสมบัติ glycosylation

เป็นการตรวจสอบว่าแถบโปรตีนที่ให้ผล positive ต่อ polyclonal antibodies นั้นเป็น glycosylated protein หรือไม่ โดยศึกษาวิธี periodic acid Schiff's staining (PAS) มีวิธีการศึกษาดังนี้

นำ TA fraction มาศึกษาด้วยวิธี reducing SDS-PAGE และ western blotting ลงบน nitrocellulose membrane ตามวิธีในข้อ 3 หลังจากนั้นนำแผ่น nitrocellulose membrane มาล้างด้วย 12% TCA นาน 5 นาที treat nitrocellulose membrane ด้วย 1% (w/v) periodic acid นาน 15 นาที ล้างด้วย 15% acetic acid 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที แล้ว incubate ด้วย Schiff's reagent ในที่มีด นาน 30 นาที ล้าง nitrocellulose membrane ด้วย 7.5% acetic acid 6 ครั้ง นาน 1-2 ชั่วโมง ตากให้แห้ง แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของโปรตีนในเนื้อเยื่อของพยาธิ *Fasciola gigantica* ด้วยวิธี Immunoperoxidase

นำพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* มา fixed ด้วย 4% paraformaldehyde และ 0.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมา dehydrate ด้วย ethyl alcohol และฝังลงใน paraffin นำ paraffin block ไปตัด section หนาประมาณ 5 ไมครอน ติดลงบน slide ที่เคลือบด้วย silane ตากให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 40°C

นำ slide ที่ได้มาละลาย paraffin และ rehydrate ด้วย graded series-ethyl alcohol ทำลาย endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อพยาธิโดยการ incubate sections ด้วย 3% H₂O₂ นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS ทำ antigen retrieving โดยแช่สไลด์ใน saturated lithium carbonate นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS-T จากนั้น block non-specific binding โดยการแช่ใน 0.1% glycine และ 4% BSA ตามลำดับนานขึ้นละ 30 นาที incubate สไลด์ด้วย primary antibodies ที่ผลิตได้ในข้อ 4 นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS-T จากนั้นนำสไลด์ไป incubate ด้วย HRP-conjugated secondary antibody นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS-T แล้ว incubate ด้วย aminopethyl carbazole (AEC) substrate นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้ว counterstain ด้วย Mayer hematoxylin นาน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา จากนั้น mount ด้วย buffer glycerol ทาน้ำยาทาเล็บ และศึกษาถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

7. Immunodiagnosis

เป็นการทดลองเพื่อนำ polyclonal antibody ที่ได้ไปตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ของสัตว์ทดลองในห้องทดลองโดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

7.1 การติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในหนู

นำ metacercaria ของพยาธิ *F. gigantica* ประมาณ 10 ตัว มา infect หนู Wistar rat เพศเมีย อายุ 4 สัปดาห์ด้วย intragastric tube หลังจากการติดเชื้อพยาธิ 3 และ 5 สัปดาห์ ทำการสลบหนูด้วย diethyl ether แล้วเก็บเลือดจากหัวใจ นำ serum ไปใช้ศึกษาด้วยวิธี sandwich ELISA ต่อไป

7.2 การผลิต polyclonal antibody ที่ต้านต่อ 21 kDa ในหนูตะเภา

ทำการ immunize หนูตะเภาด้วย 21 kDa และเก็บเลือดเช่นเดียวกับทดลองในข้อ 4.1 หลังจากนั้นนำมาตรวจหาการผลิต antibody เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.2 และตรวจความจำเพาะของ antibody ที่ผลิตได้เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3

7.3 การตรวจหา circulating protein ด้วย Sandwich ELISA

ทำการ coat plate โดยผสมซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อ *F. gigantica* ในห้องทดลองเป็นเวลา 21 และ 35 วัน ใน coating buffer (0.15 M Na₂CO₃ + 0.35 M NaHCO₃) ด้วยอัตราส่วน 1:5 ปริมาตร 50 µl/well ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 12-14 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer (0.1 M PBS-T) แล้ว block ด้วย 5% skimmed milk ที่ละลายใน PBS-T ปริมาตร 200 µl/well ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้น incubate ด้วย primary antibody คือ guinea pig anti-21 ในอัตราส่วน 1:100 ปริมาตร 100 µl/well ล้างด้วย washing buffer หลังจากนั้น incubate ด้วย secondary antibody (HRP-conjugated rabbit anti guinea pig IgG) ที่อัตราส่วน 1:4,000 ปริมาตร 100 µl/well ล้างด้วย washing แล้วเติม TMB substrate ปริมาตร 100 µl/well ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ในที่มืด และหยุดปฏิกิริยาด้วย 6 M H₂SO₄ ปริมาตร 50 µl/well และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วย microtiter plate reader (PROGRAMMABLE READER DV 990BV6) นำค่าการดูดกลืนแสงไป plot กราฟ

8. การหาลำดับกรดอะมิโน

8.1 2-DE gel electrophoresis

นำ TA มาแยกด้วย 2-DE gel electrophoresis ตามวิธีการในข้อ 5.1.2 แล้วย้อมด้วย Coomassie blue

8.2 In-Gel Tryptic Digestion

จุดโปรตีนที่สนใจที่ให้ผล positive กับ primary antibody ถูกตัดออกจาก 2-DE gel นำมาล้าง 2 ครั้งด้วย 50% acetonitrile (ACN)/ 25 mM NH_4HCO_3 buffer (pH 8.0) ปริมาตร 200 μL ป่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที และล้างหนึ่งครั้งด้วย 100% ACN ปริมาตร 200 μL หลังจากล้าง gel เพื่อกำจัดตัวทำละลายออกแล้ว นำชิ้น gel มาทำให้แห้งด้วย SpeedVac concentrator (Savant; Holbrook, NY) จากนั้นนำมาย่อยด้วย 1% (w/v) trypsin ใน 25 mM NH_4HCO_3 ปริมาตร 10 μL ป่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง ต่อมาสกัด peptide 2 ครั้งด้วย 50% ACN/5% trifluoroacetic acid (TFA) ปริมาตร 50 μL นำส่วนที่สกัดได้มารวมกันและทำให้แห้งด้วย SpeedVac concentrator ส่วน peptide pellet ที่ได้จะนำมาละลายใน 0.1% TFA ปริมาตร 10 μL และสกัดให้บริสุทธิ์ ด้วย ZipTipC18 (Millipore; Bedford, MA) ตามด้วยการล้าง 0.1% formic acid ปริมาตร 10 μL ในที่สุด ทำการ elute peptide ด้วย 75% ACN/0.1% formic acid ปริมาตร 5 μL

8.3 Protein Identification by Tandem Mass Spectrometry

หลังจากการย่อยจุดโปรตีนแต่ละจุดแล้ว นำ peptide ที่ได้มาสกัดด้วย extraction solution ที่ ประกอบด้วย 50% ACN/0.5% TFA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำให้แห้งด้วย N_2 จากนั้น นำ peptide ผสมกับ matrix solution ที่ประกอบด้วย 5 mg/mL alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) ใน 50% ACN/0.1% v/v TFA และ spot ลงบน sample plate ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลด้วย Tangem mass spectrometry ภายในแต่ละหลุมของสารตัวอย่าง ถ้า parent ion ใดสามารถผ่านเกณฑ์ที่กำหนดต้องมี peak อยู่ภายใน m/z 800–3000 range และมีความเข้มเหนือกว่า 10 count จะทำการคัดเลือกไว้สำหรับการทำ CID MS/MS ใช้ argon เป็น collision gas โดยให้ LM และ HM resolution ของ quadrupole ตั้งไว้ที่ 10 เพื่อให้มีการคัดเลือก window ให้กว้างที่ 4-Da และเครื่องมือจะมีการ calibrate ไว้ถึง <5 ppm accuracy เหนือ mass range ช่วง m/z 800-3000 โดยใช้ส่วนผสมของ sodium iodide และ PEG 200, 600, 1000, และ 2000 เป็น calibrant และระหว่างประมวลผลปรับด้วย Glu-Fibrinopeptide B ให้มีจุดที่ใกล้กับ lock mass calibrant ข้อมูลที่ได้จาก MS and MS/MS จะนำมาสกัด และรายงานผลเป็น .txt and .pkl files ตามลำดับ สำหรับค้นหาข้อมูลใน NCBI mammalian protein database ที่มีอยู่ประมาณ 5.7×10^6 entries ด้วย MASCOT search engine

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อพิจารณาความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองใช้ Student *t*-test ด้วยโปรแกรม SPSS

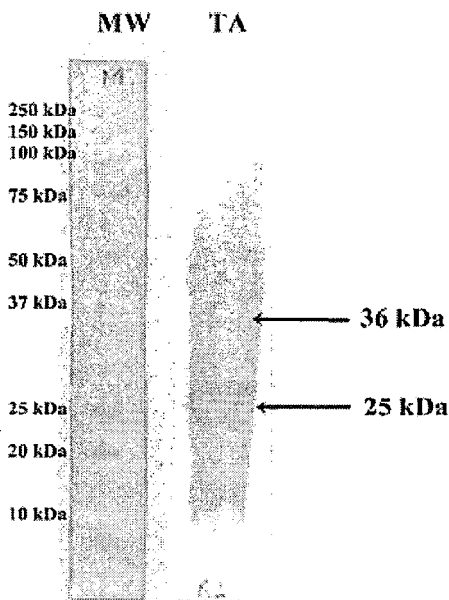
ผลการวิจัย (Results)

1. การคัดเลือกแถบโปรตีนที่เป็น highly immunogenic bands ด้วยวิธี western immunoblotting และ probe ด้วย serum ของวัวที่ติดเชื้อพยาธิในธรรมชาติ (CIS) และ serum ของหนู rat ที่ติดเชื้อในห้องทดลอง (RIS)

จากข้อเสนองานวิจัยได้มีการคัดเลือกแถบโปรตีนที่เป็น highly immunogenic bands ด้วยวิธี 2 DE และ western immunoblotting แต่เพื่อความสะดวกในการศึกษาเบื้องต้น ผู้วิจัยได้มีการปรับการศึกษาโดยเป็นเป็น 1D SDS-PAGE แทน

1.1 การศึกษา western immunoblotting โดยใช้ CIS เป็น primary antibody (ไม่ได้แสดงภาพ)

จากการนำโปรตีนหลาย ๆ fraction ของพยาธิ *F. gigantica* ได้แก่ WB, TA, ES, crude antigen ของตัวอ่อน มาแยกด้วย SDS-PAGE แล้วทำ western blotting ลงบน nitrocellulose membrane หลังจากนั้น probe ด้วย CIS ผลการศึกษาพบว่า พบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกในแต่ละ fraction หลายแถบ แต่เมื่อพิจารณาแถบที่ให้ผลบวกซ้ำกันในหลาย ๆ fraction พบทั้งสิ้น 5 แถบ ได้แก่ 16, 21-22, 29, 33 และ 52 kDa โดยมีความเข้มที่แตกต่างกัน และแถบโปรตีนที่มีความเข้มมากในตัว เต็มวัยและชันผิว (TA) และเป็นแถบเดี่ยว คือ แถบที่ 21-22 และ 16 kDa จึงเป็นแถบโปรตีนที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อไป



ภาพที่ 1 แสดง TA ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 12.5% reducing SDS-PAGE และ western immunoblotting โดยใช้ Rat's infected serum (RIS) ที่ dilution 1:500 เป็น primary antibody

1.2 การศึกษา western immunoblotting โดยใช้ RIS เป็น primary antibody

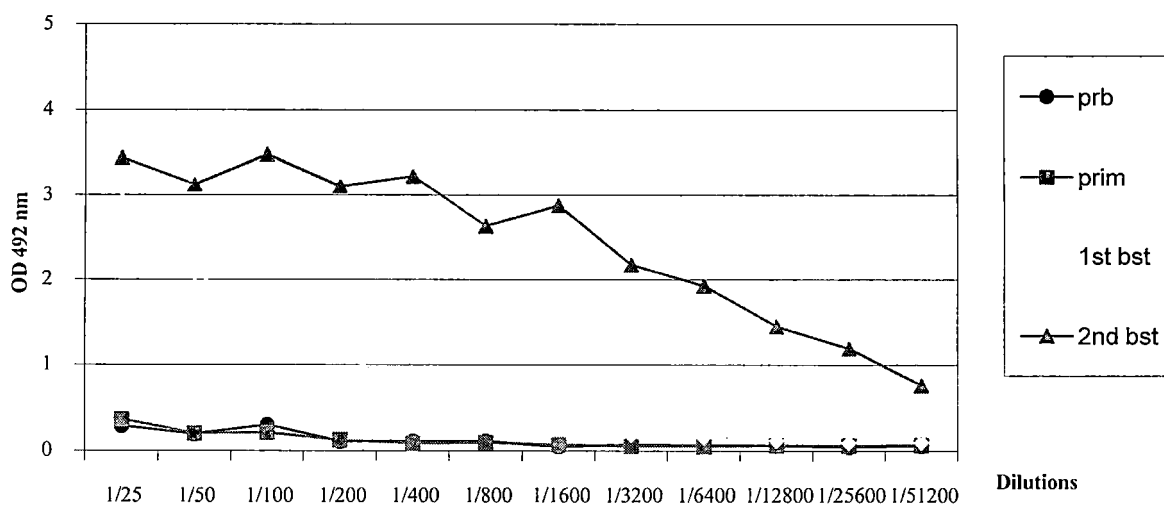
จากการนำ TA มาแยกด้วย SDS-PAGE และ western blotting ลงบน nitrocellulose membrane แล้ว probe ด้วย RIS ผลการศึกษาพบว่า พบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกที่ 21 kDa 23 kDa 24 kDa 25kDa 26 kDa และ 36 kDa โดยแถบที่ให้ความเข้มมากที่สุดคือ 25 kDa จะเห็นได้ว่าแถบโปรตีนที่มีความเข้มชัดเจน คือ 25 kDa และ 36 kDa (ภาพที่ 1) ซึ่งมีความน่าสนใจที่จะทำไปศึกษาต่อไป

2. การผลิต Polyclonal antibody ที่ต้านต่อ highly immunogenic bands

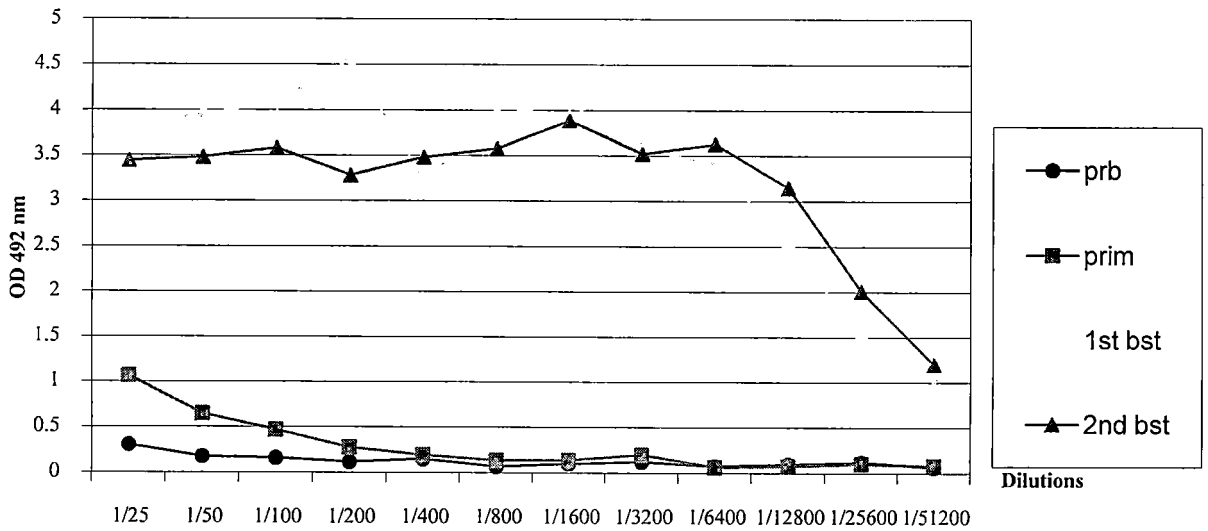
2.1 ผลการศึกษาด้วยวิธี ELISA

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาตัดแถบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วย SDS-PAGE ไปผลิต polyclonal antibody ในหนู rat เพื่อนำ antibody ที่ได้ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

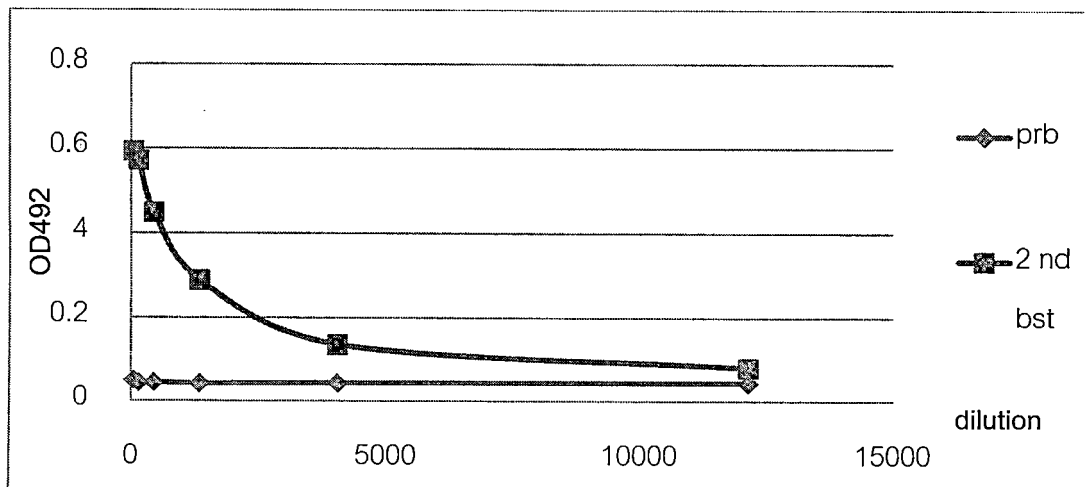
จากการนำ TA แยกด้วย SDS-PAGE ย้อมด้วยสี coomassie blue แล้วตัดแถบโปรตีน 16 kDa 21-22 kDa 25 kDa และ 36 kDa ไปผสมกับ complete หรือ incomplete Freund's adjuvant แล้วนำไป immunize ในหนู rat แล้วนำ sera ที่ได้มาทดสอบ titer ด้วยวิธี ELISA พบว่าสามารถผลิต antisera ที่ต้านต่อ 16 kDa (ภาพที่ 2) 21-22 kDa (ภาพที่ 3) 25 kDa (ภาพที่ 4) และ 36 kDa (ภาพที่ 5) ได้ โดย PoAb ที่ต้านต่อ 16 kDa มีค่า titer ประมาณ 1/3,200 PoAb ที่ต้านต่อ 21-22 kDa มีค่า titer ประมาณ 1/51,200 PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa มีค่า titer ประมาณ 1/1,000 และ PoAb ที่ต้านต่อ 36 kDa มีค่า titer ประมาณ 1/250



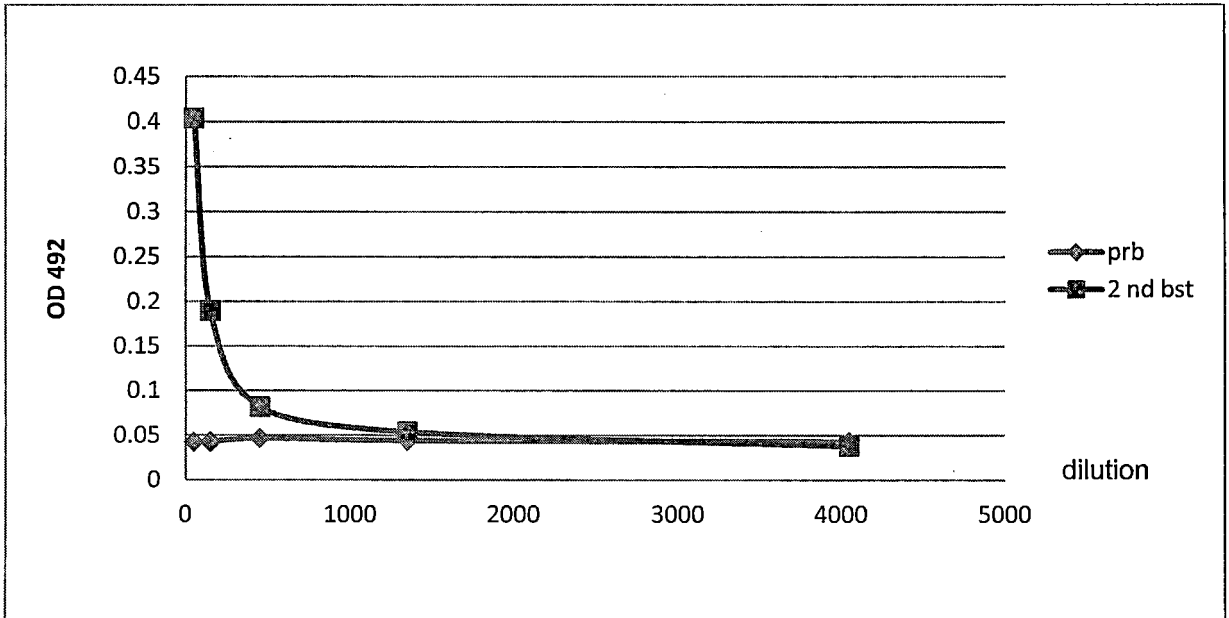
ภาพที่ 2 แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 16 kDa



ภาพที่ 3 แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 21-22 kDa



ภาพที่ 4 แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 25 kDa



ภาพที่ 5 แสดง titration curve ของ serum หนู rat ที่ผ่านการ immunize ด้วย 36 kDa

2.2 การทดสอบความจำเพาะของ polyclonal antibody ด้วยวิธี western immunoblotting

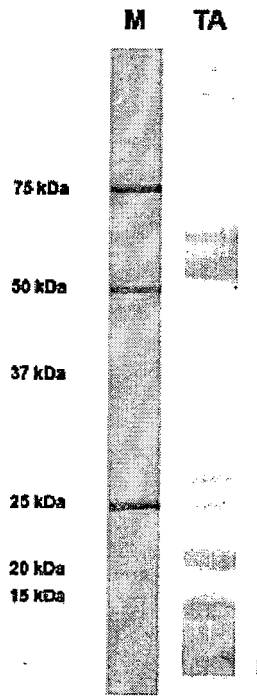
หลังจากนั้นนำ serum ที่ได้ไปเป็น primary antibody เพื่อศึกษา TA ด้วยวิธี western immunoblotting พบว่า

PoAb ที่ต้านต่อ 16 kDa (ภาพที่ 6) ให้ผลบวกชัดเจนที่ 16 kDa นอกจากนี้ยังปรากฏผล cross reaction กับแถบโปรตีนบริเวณอื่น ๆ คือ 21, 31-35, 54-61 kDa

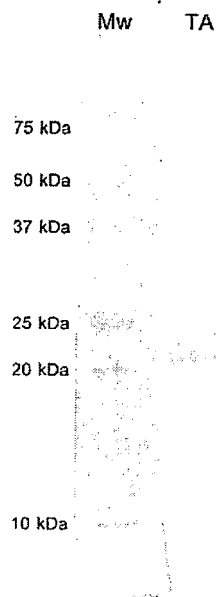
PoAb ที่ต้านต่อ 21kDa (ภาพที่ 7) ให้ผลบวกชัดเจนที่ 21 kDa ในขณะที่ส่วนอื่น ๆ ให้ผล negative

PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa (ภาพที่ 8) ให้ผลบวกชัดเจนที่ 25 kDa นอกจากนี้ยังพบ cross reaction กับแถบโปรตีนที่ 16 kDa

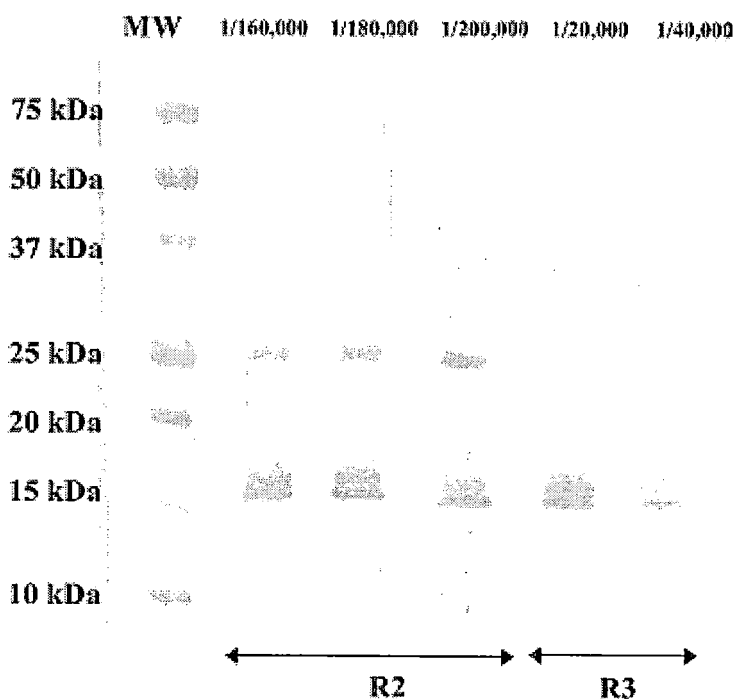
PoAb ที่ต้านต่อ 36 kDa (ภาพที่ 8) ให้ผลบวกที่ 36 kDa นอกจากนี้ยังพบ cross reaction กับแถบโปรตีนที่ 16 kDa เช่นกัน



ภาพที่ 6 แสดง western immunoblotting ของ antigen ที่ใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 16 kDa เป็น primary antibody



ภาพที่ 7 แสดง western immunoblotting ของ TA ที่ใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa เป็น primary antibody



ภาพที่ 8 แสดง western immunoblotting ของ TA ที่แยกด้วย 12.5% SDS-PAGE และใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa (R2) และ 36 kDa (R3) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น primary antibody

3. การตรวจสอบลักษณะของ antigen

3.1 ผลตรวจหา 21 kDa 25 kDa และ 36 kDa antigen ใน fraction ของพยาธิใบไม้ชนิดต่าง ๆ

จากการนำ crude extract ของพยาธิชนิดต่าง ๆ ผ่านการแยกด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วทำ western immunoblotting โดยใช้

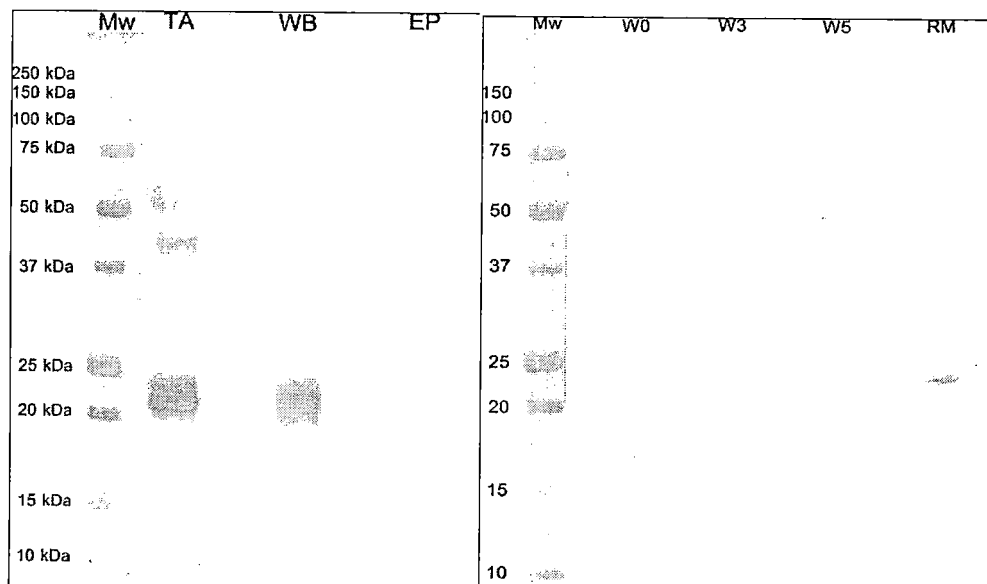
PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ antigen ของพยาธิ *Paramphistomum* sp. ได้ ที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa เช่นกัน ในขณะที่ fraction ของพยาธิชนิดอื่น ๆ ให้ผล negative (ภาพที่ 9)

PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ antigen ของพยาธิ *Eurytrema pancreaticum* ได้ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17 kDa ในขณะที่ fraction ของพยาธิชนิดอื่น ๆ ให้ผล negative (ภาพที่ 10)

PoAb ที่ต้านต่อ 36 kDa พบว่าไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ antigen ของพยาธิชนิดต่าง ๆ ได้ (ภาพที่ 11)

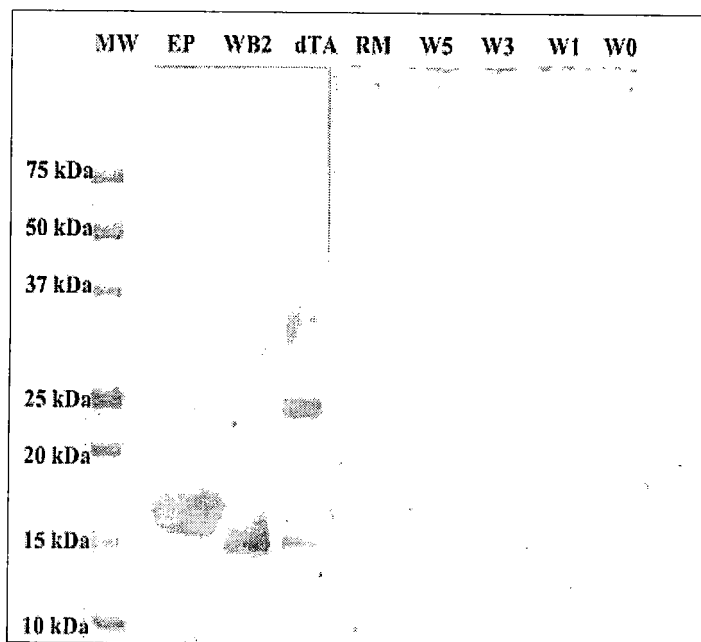
3.2 ผลการย้อม TA ด้วยสี PAS

จากการนำ TA มาแยกด้วย 12.5% SDS-PAGE และ western blot ลงบน nitrocellulose membrane แล้วย้อมด้วยสี PAS พบว่าแถบโปรตีนทั้ง 4 แถบ ได้แก่ 21 kDa 25 kDa และ 36 kDa ให้ผล positive (ภาพที่ 12)



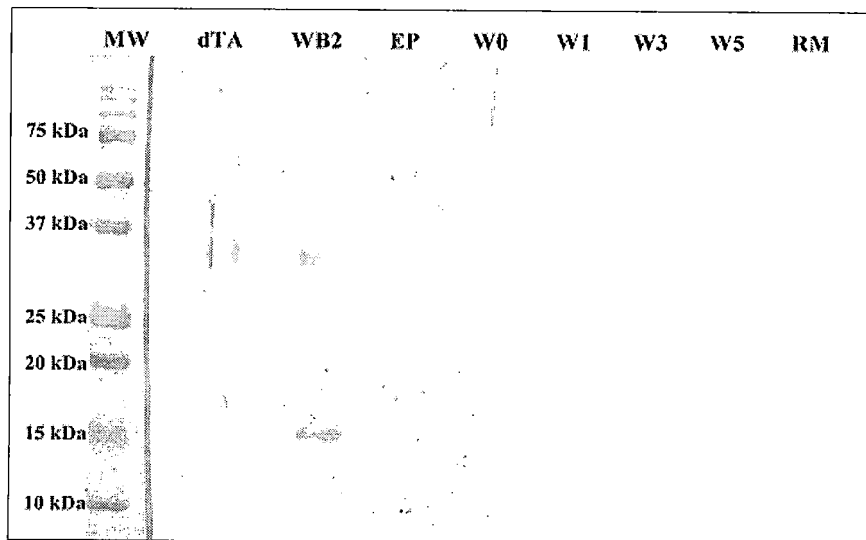
ภาพที่ 9 แสดงผล western immunoblotting ของพยาธิใบไม้ชนิดต่าง ๆ ที่แยกด้วย 12.5% reducing SDS-PAGE โดยใช้ PoAb anti 21 kDa เป็น primary antibody

WB = crude extract of adult *F. gigantica*, Ep = *E. pancreaticum*, W = various rumen fluke, RM = *Paramphistomum* sp.



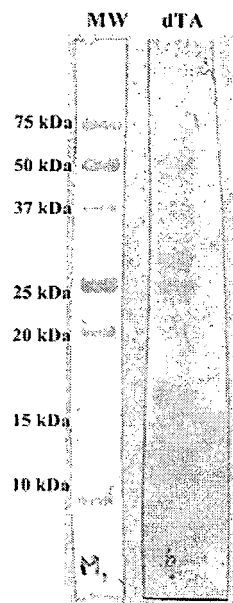
ภาพที่ 10 แสดงผล western immunoblotting ของพยาธิใบไม้ชนิดต่าง ๆ ที่แยกด้วย 12.5% reducing SDS-PAGE โดยใช้ PoAb anti 25 kDa เป็น primary antibody

WB = crude extract of adult *F. gigantica*, Ep = *E. pancreaticum*, W = various rumen fluke, RM = *Paramphistomum* sp.



ภาพที่ 11 แสดงผล western immunoblotting ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆที่แยกด้วย 12.5% reducing SDS-PAGE โดยใช้ PoAb anti 36 kDa เป็น primary antibody

WB = crude extract of adult *F. gigantica*, Ep = *E. pancreaticum*, W = various rumen fluke, RM = *Paramphistomum* sp.



ภาพที่ 12 แสดง TA ที่ผ่านการแยกด้วย 12.5% reducing SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี PAS

4. การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของโปรตีนในเนื้อเยื่อของพยาธิ *F. gigantica*

การทดลองนี้เป็นการนำ PoAb ที่ผลิตได้ไปตรวจหาตำแหน่งของโปรตีนในเนื้อเยื่อพยาธิ เพื่อยืนยันตำแหน่งของโปรตีนดังกล่าวว่าผลิตหรือมีการสะสมอยู่บริเวณชั้นผิวหนังหรือไม่

4.1 ตำแหน่งการกระจายของ 16 kDa

จากการศึกษาในพยาธิระยะไข่ที่อยู่ภายในตัวพยาธิตัวเต็มวัย (ภาพที่ 13) พบว่าให้ผล negative แต่เมื่อศึกษาในพยาธิระยะ miracidium พบว่าให้ผล positive reaction กระจายทั่วไปบริเวณขอบนอกของลำตัว miracidium ในขณะที่ภายในลำตัวให้ผล negative

จากการศึกษาในพยาธิระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 13) พบว่าให้ผล positive reaction ปานกลางในชั้นผิวหนังของพยาธิ ในขณะที่ภายในลำตัว และส่วนยอดของทางเดินอาหารให้ผล positive reaction เช่นกัน ในขณะที่เมื่อใช้ preimmunized sera เป็น primary antibody ให้ผล negative (ไม่แสดงผลการศึกษา)

จากการศึกษาในพยาธิระยะตัวเต็มวัย (ภาพที่ 14) พบว่า ให้ผล positive reaction เข้มมากในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่กระจายอยู่ทุกส่วนของร่างกาย ในขณะที่ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ให้ผล positive เช่นกัน ส่วนระบบทางเดินอาหารส่วน caecum และระบบสืบพันธุ์ ให้ผลค่อนข้างจาง ในขณะที่เมื่อใช้ preimmunized sera เป็น primary antibody ให้ผล negative (ไม่แสดงผลการศึกษา)

4.2 ตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa

จากการศึกษาในพยาธิระยะไข่ที่อยู่ภายในตัวพยาธิตัวเต็มวัย (ภาพที่ 15) พบว่าให้ผล negative แต่เมื่อศึกษาในพยาธิระยะ miracidium พบว่าให้ผล positive reaction เข้มมากกระจายทั่วไปบริเวณขอบนอกของลำตัว miracidium ในขณะที่ภายในลำตัวให้ผล negative

จากการศึกษาในพยาธิระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 15) พบว่าให้ผล positive reaction เข้มในชั้นผิวหนังของพยาธิ ในขณะที่ภายในเนื้อเยื่อ parenchyma ระบบขับถ่าย และทางเดินอาหารให้ผล positive reaction ค่อนข้างจาง ในขณะที่เมื่อใช้ preimmunized sera เป็น primary antibody ให้ผล negative (ไม่แสดงผลการศึกษา)

จากการศึกษาในพยาธิระยะตัวเต็มวัย (ภาพที่ 16) พบว่า ให้ผล positive reaction เข้มมากในชั้นผิวหนังทุกส่วนของร่างกายรวมทั้งในระทางเดินอาหารส่วนต้น ในขณะที่ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ให้ผล positive เข้มเช่นกัน ส่วนระบบทางเดินอาหารส่วนปลาย ระบบสืบพันธุ์ และ parenchyma ให้ผลค่อนข้างจาง ในขณะที่เมื่อใช้ preimmunized sera เป็น primary antibody ให้ผล negative (ไม่แสดงผลการศึกษา)

4.3 ตำแหน่งการกระจายของ 25 kDa

จากการศึกษาในพยาธิระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 17) พบว่าให้ผล positive reaction เข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma ในขณะที่ชั้นผิวหนัง และขอบด้านในของทางเดินอาหาร และเยื่อบุผิวของ bladder ให้ผล positive reaction ค่อนข้างจาง

จากการศึกษาในระยะไขที่อยู่ภายในตัวพยาธิตัวเต็มวัยพบว่าให้ผล negative ในขณะที่เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ พบ positive reaction เข้มมากในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่กระจายอยู่ทุกส่วนของร่างกาย ในขณะที่ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ให้ผล positive เข้มเช่นกัน ส่วนระบบทางเดินอาหารส่วน caecum และระบบสืบพันธุ์ ให้ผลค่อนข้างจาง (ภาพที่ 18)

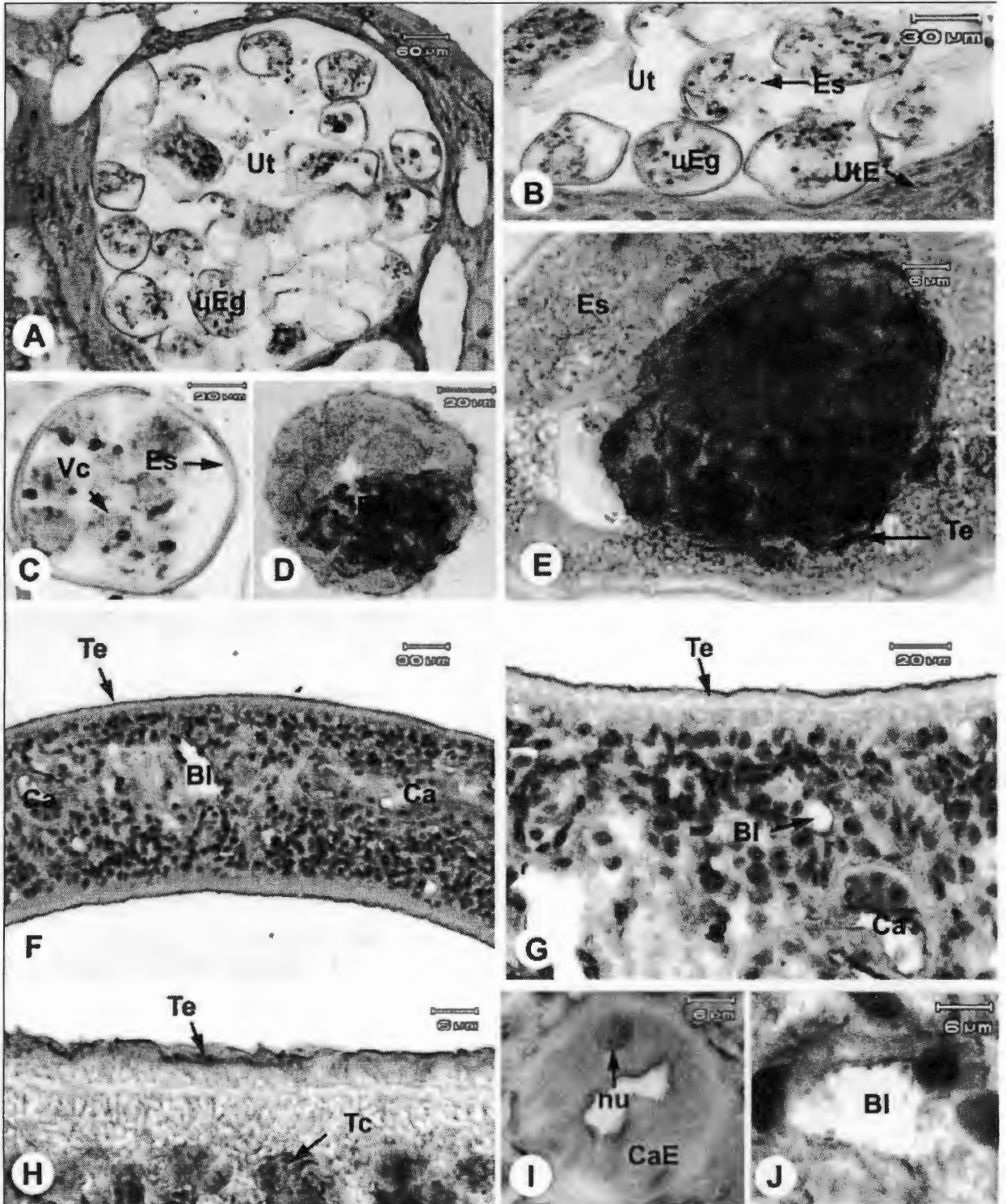
ในขณะที่เมื่อใช้ preimmunized sera เป็น primary antibody พบ background staining ภายในเนื้อเยื่อชั้นผิว เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร เยื่อบุผิว bladder แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อที่ให้ผล positive ต่อ 25 kDa คือ เนื้อเยื่อ parenchyma เท่านั้น (ภาพที่ 17)

4.4 ตำแหน่งการกระจายของ 36 kDa

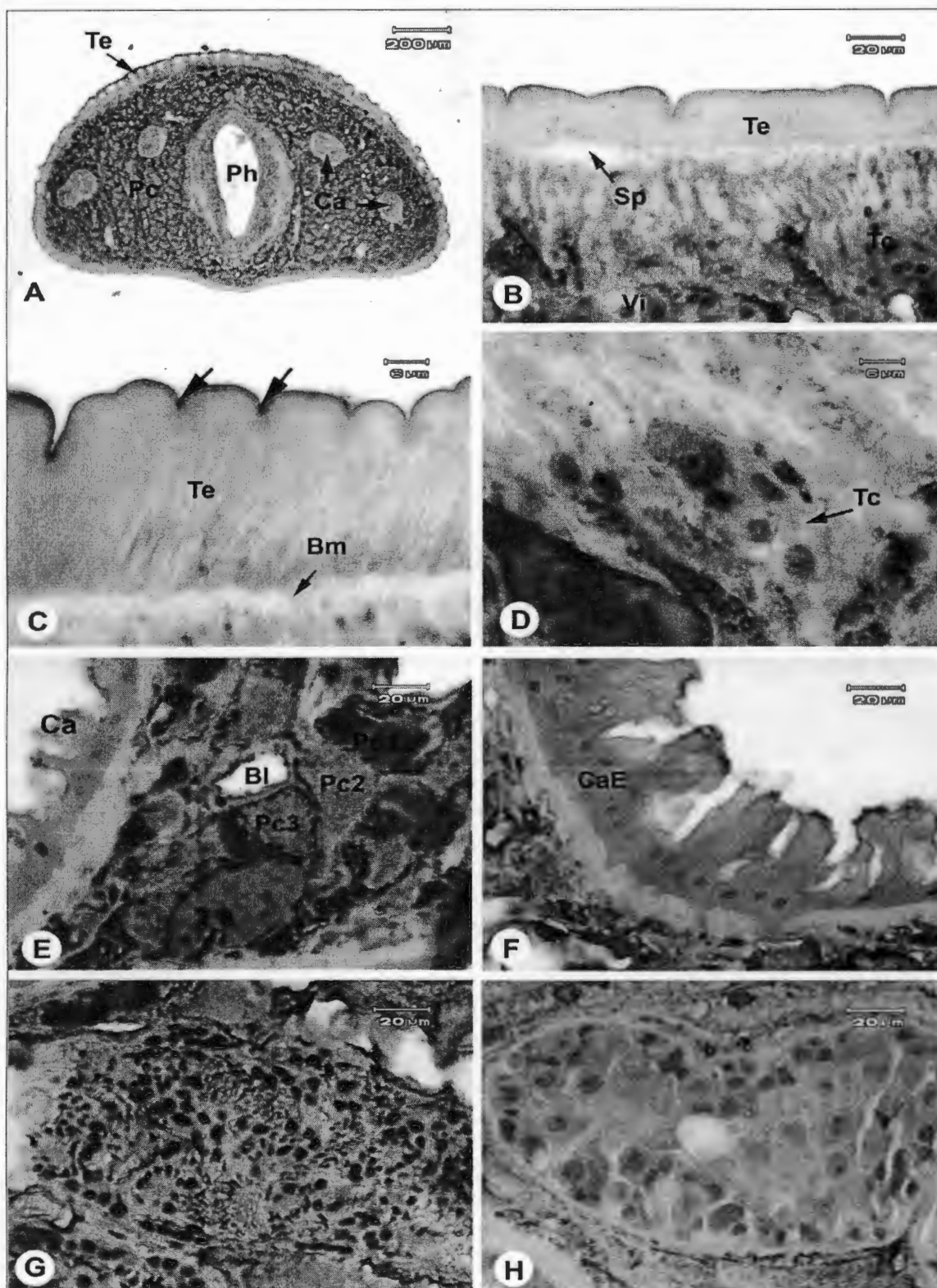
จากการศึกษาในพยาธิระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 19) พบว่าให้ผล positive reaction เข้มในเนื้อเยื่อ parenchyma ในขณะที่ชั้นผิว และขอบด้านในของทางเดินอาหาร และเยื่อบุผิวของ bladder ให้ผล positive reaction ค่อนข้างจาง

จากการศึกษาในระยะไขที่อยู่ภายในตัวพยาธิตัวเต็มวัยพบว่าให้ผล negative ในขณะที่เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ พบ positive reaction เข้มมากในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่กระจายอยู่ทุกส่วนของร่างกาย ในขณะที่ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ให้ผล positive เข้มเช่นกัน ส่วนระบบทางเดินอาหารส่วน caecum และระบบสืบพันธุ์ ให้ผลค่อนข้างจาง (ภาพที่ 20)

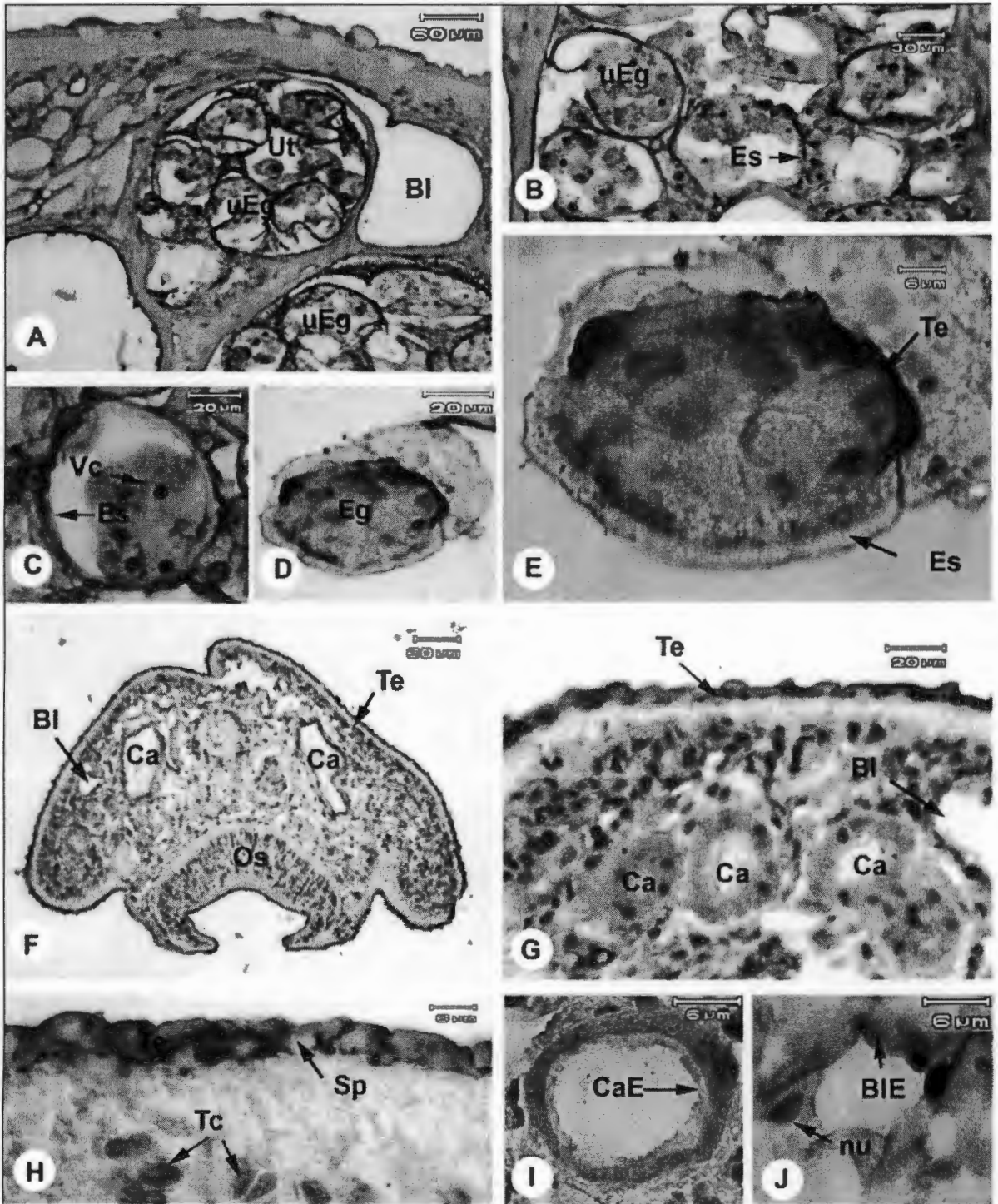
ในขณะที่เมื่อใช้ preimmunized sera เป็น primary antibody พบ background staining ภายในเนื้อเยื่อชั้นผิว เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร เยื่อบุผิว bladder แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อที่ให้ผล positive ต่อ 25 kDa คือ เนื้อเยื่อ parenchyma เท่านั้น (ภาพที่ 19)



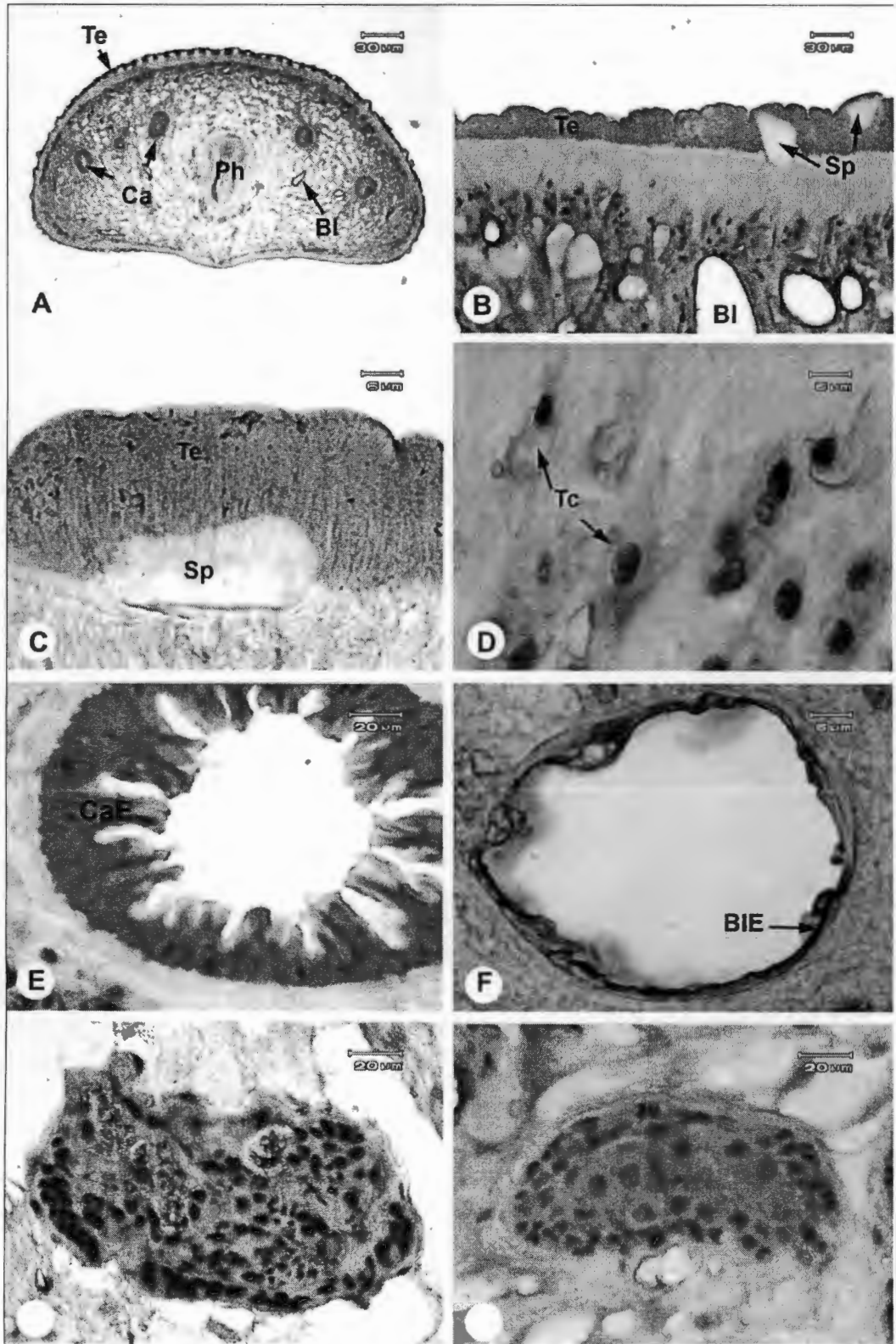
ภาพที่ 13 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะต่าง ๆ โดยใช้ PoAb anti 16 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining ภายในผิวของ miracidium (D-E) ในขณะที่ไข่ที่อยู่ภายในตัวพยาธิให้ผล negative (A-C) ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ให้ผล positive เข้มปานบริเวณขอบนอกของชั้นผิวและภายใน parenchyma (F-H) และทางเดินอาหาร (I) และ bladder ให้ผลปานกลาง (J)



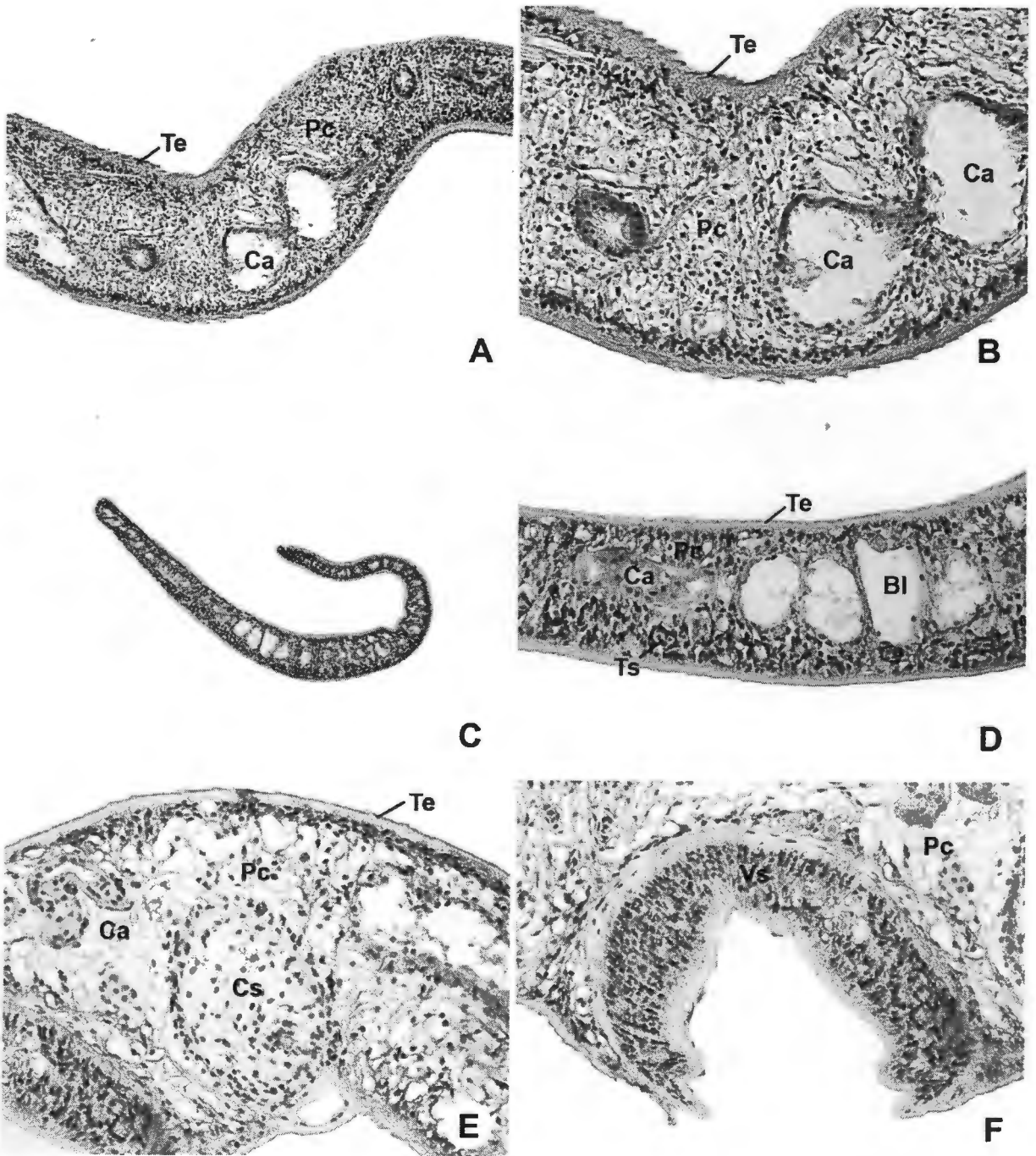
ภาพที่ 14 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิตัวเต็มวัย โดยใช้ PoAb anti 16 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining งามากบริเวณภายในผิวของพยาธิตัวเต็มวัย (A-C) ในขณะที่ภายในชั้นผิวและเซลล์ชั้นผิว (D) ให้ผล negative ในขณะที่ bladder (E) ทางเดินอาหาร (F) และระบบสืบพันธุ์ (G-H) ให้ผลค่อนข้างจาง



ภาพที่ 15 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะต่าง ๆ โดยใช้ PoAb anti 21 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining ภายในผิวหนังของ miracidium (D-E) ในขณะที่ไข่ที่อยู่ภายในตัวพยาธิให้ผล negative (A-C) ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ให้ผล positive เข้มมากในชั้นผิวหนัง (F-H) และทางเดินอาหาร (I) และ bladder ให้ผลค่อนข้าง (J)

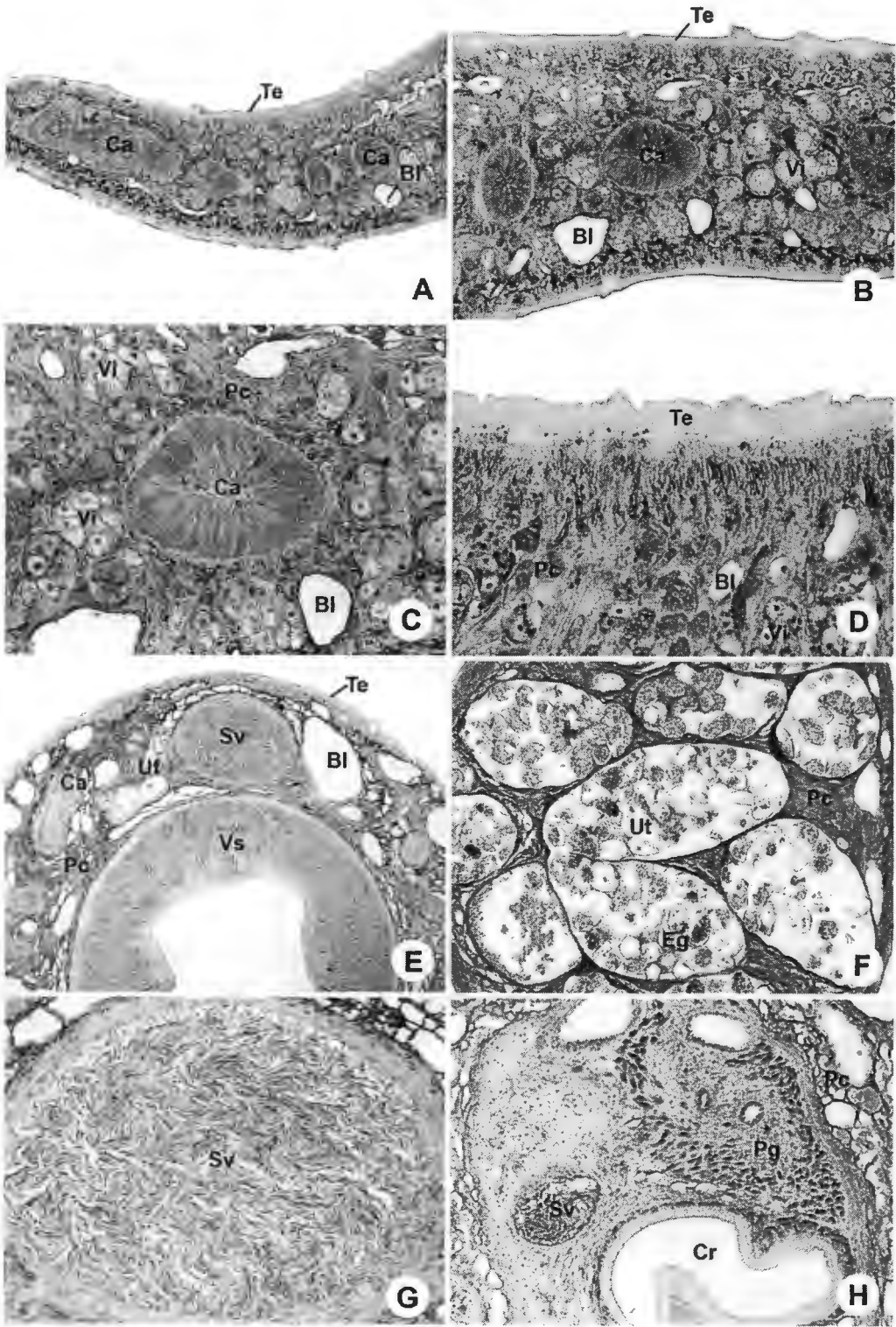


ภาพที่ 16 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิตัวเต็มวัย โดยใช้ PoAb anti 21 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining ภายในผิวหนังของพยาธิตัวเต็มวัย (A-C) และเซลล์ชั้นผิวหนัง (D) ในขณะที่ทางเดินอาหาร (E) และระบบสืบพันธุ์ (G-H) ให้ผลค่อนข้างจาง bladder แสดง positive เข้ม (F)



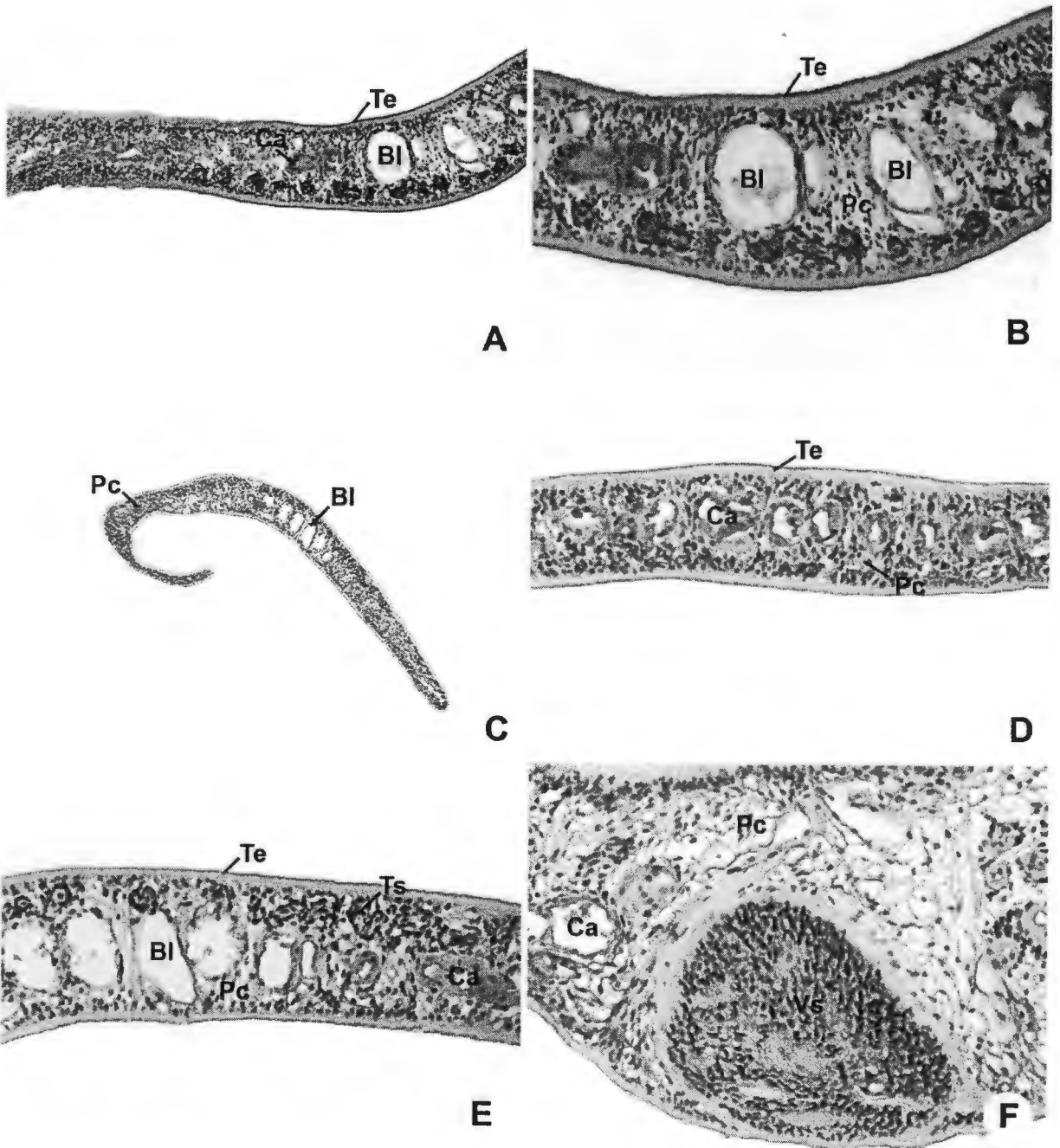
ภาพที่ 17 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ A-B) preimmunized serum เป็น primary antibody พบ background staining บริเวณผิว (Te) C-F) ใช้ PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining เข้ม บริเวณ parenchyma (Pc) ที่แทรกอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

Bl = bladder, Ca = caecum, Cs = cirrus, Vs = ventral sucker



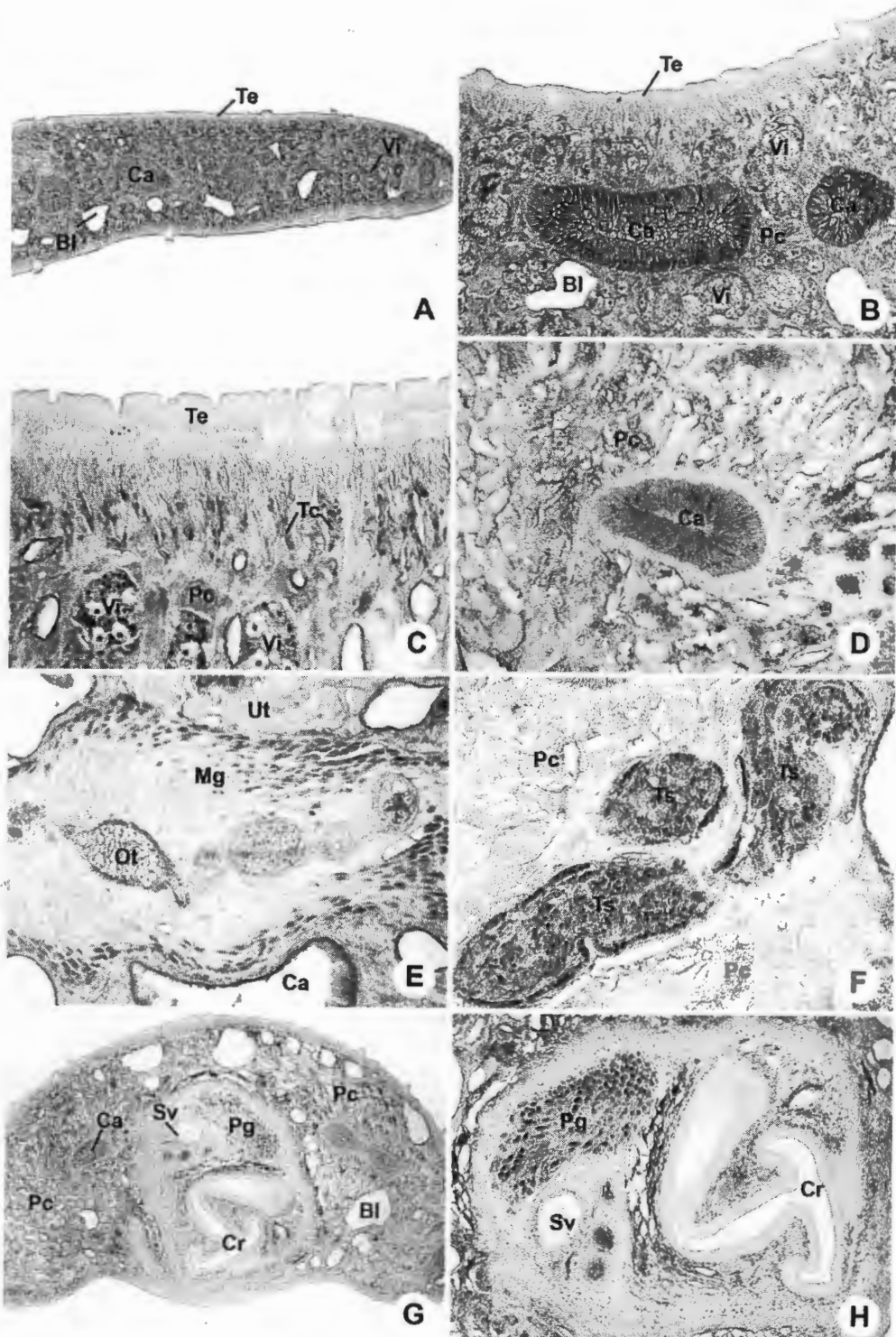
ภาพที่ 18 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวเต็ม โดยใช้ PoAb anti 25 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining เข้มมากภายในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่แทรกอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายพยาธิ

BI = bladder, Ca = caecum, Cr = cirrus, Eg = egg, Pc = parenchyma, Te = tegument, Sv, seminal vesicle, Ut = uterus, Vi = vitelline, Vs = ventral sucker



ภาพที่ 19 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ A-B) preimmunized serum เป็น primary antibody พบ background staining บริเวณผิว (Te) caecum (Ca) และ bladder (Bl) C-F) ใช้ PoAb ที่ดันต่อ 36 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining เข้มปานกลางบริเวณ parenchyma (Pc) ที่แทรกอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

Vs = ventral sucker



ภาพที่ 20 แสดง immunoperoxidase staining ของพยาธิในระยะตัวเต็ม โดยใช้ PoAb anti 36 kDa เป็น primary antibody พบ positive staining เข้มมากภายในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่แทรกอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายพยาธิ

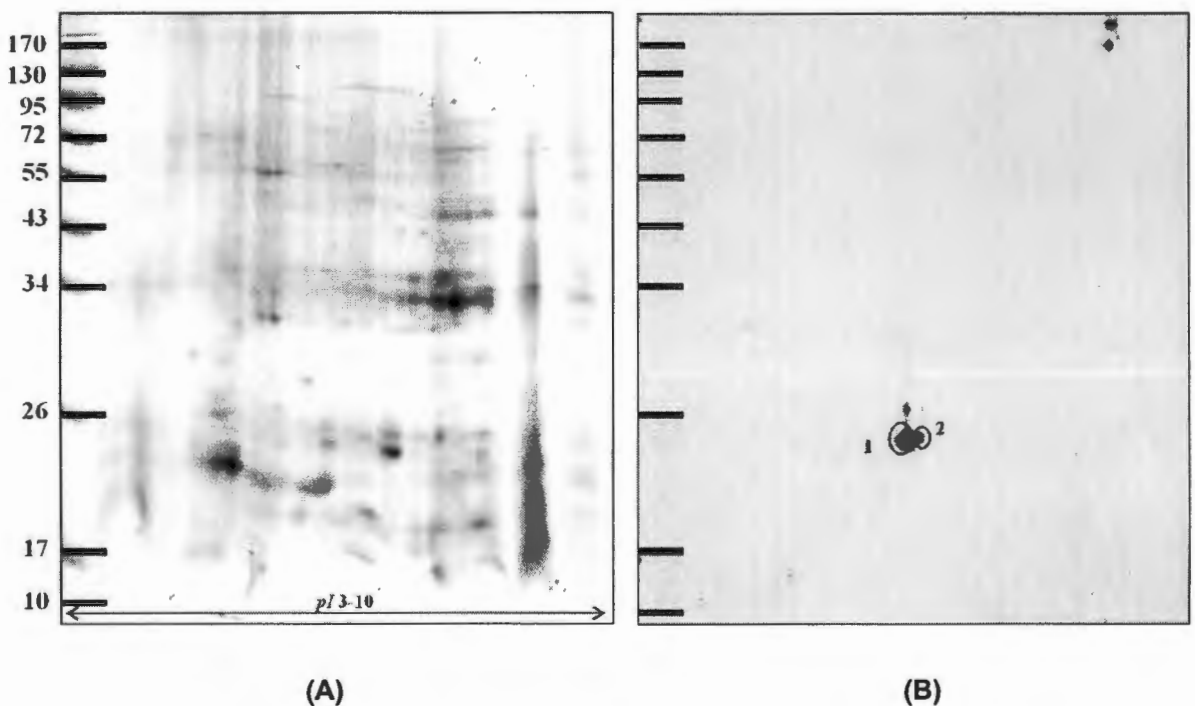
Bl = bladder, Ca = caecum, Cr = cirrus, Eg = egg, Mg = Mehlis' gland Ot = ootype, Pc = parenchyma, Pg = prostate gland Tc = tegumental cell, Te = tegument, Ts = testis, Sv, seminal vesicle, Ut = uterus, Vi = vitelline, Vs = ventral sucker

5. การศึกษาด้วยวิธี 2DE western immunoblotting และ Tandem Mass spectrometry

5.1 การศึกษาด้วยวิธี 2DE western immunoblotting

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2-DE ของ TA ความเข้มข้น 100 μg โดยใช้ Immobiline DryStrip nonlinear pH gradient 3 – 10 ขนาด 7 cm โดยย้อม 2-DE gel ด้วยสี Coomassie brilliant blue G ผลการทดลอง (ภาพที่) พบจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกเด่นชัดประมาณ 150 - 200 จุด โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 10 ถึง 95 กิโลดาลตัน และมี pI กระจายอยู่ในช่วง 3 ถึง 10

จากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยวิธี western immunoblotting โดยใช้ PoAb ที่ด้านต่อ 21 kDa เป็น primary antibody ที่ความเข้มข้นเดียวกับที่ทดลองใน 1D western blot (ภาพที่ 21) พบตำแหน่งของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ PoAb 2 จุดชัดเจน (จุดเบอร์ 1 และเบอร์ 2) ที่ขนาดประมาณ 21-22 kDa มีค่า pI กระจายอยู่ในช่วง 4 ถึง 6



ภาพที่ 21 แสดง 2-DE gel ของ tegumental antigen ความเข้มข้น 100 μg โดยใช้ Immobiline DryStrip nonlinear pH gradient 3 – 10 ขนาด 7 cm ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue G (A) และ DE western immune blotting โดยใช้ rat anti 21-22 kDa เป็น primary antibody และ HRP-conjugated goat anti-rat IgG เป็น secondary antibody (B)

5.2 การศึกษาด้วยวิธี Tandem Mass spectrometry

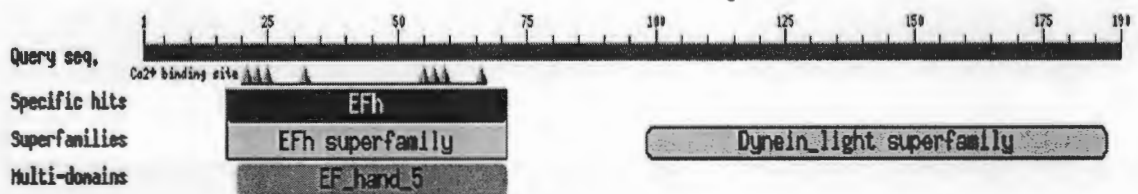
จากผลการทดลองในข้อ 5.1 ทำการตัดจุดโปรตีนทั้งสองย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและนำไปวิเคราะห์ด้วย Tandem Mass spectrometry เพื่อ identify ชนิดของโปรตีน ผลการวิเคราะห์ (ตารางที่ 1) พบว่าโปรตีนทั้งสองจุดเป็นชนิดเดียวกันคือ Tegumental calcium-binding EF-hand protein ของพยาธิ *F. gigantica* มี 190 amino acids มีน้ำหนักโมเลกุล 22.249 กิโลดาลตัน และ pI 5.28 (ภาพที่ 22)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไป Blast กับ NCBI database โดยใช้ Basic local alignment search tool พบว่าโปรตีนชนิดนี้มีความเหมือนกับ calcium-binding protein (gi|2764758) ของพยาธิ *Fasciola hepatica* 96% นอกจากนี้ พบว่ามีความเหมือนกับ tegument antigen (gi|358339751) ของ *Clonorchis sinensis* 56%, 22.6 kDa tegumental antigen (gi|2739154) ของ *Schistosoma japonicum* 50%

จุดที่	โปรตีน	NCBI ID ^a	Ion score	% Cov ^b	p/	MW (kDa)
1	Tegumental calcium- binding EF-hand protein (<i>Fasciola gigantica</i>)	gi 71040800	208	32	5.28	22.249
2	Tegumental calcium- binding EF-hand protein (<i>Fasciola gigantica</i>)	gi 71040800	220	32	5.28	22.249

^a NCBI= National Center for Biotechnology Information; ^b %Cov= %Sequence coverage [(number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence) x 100%];

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์จุดโปรตีนเบอร์ 1 และเบอร์ 2 ด้วย Tandem MS



ภาพที่ 22 แสดงโครงสร้างของ Tegumental calcium-binding EF-hand protein ของพยาธิ *F. gigantica*

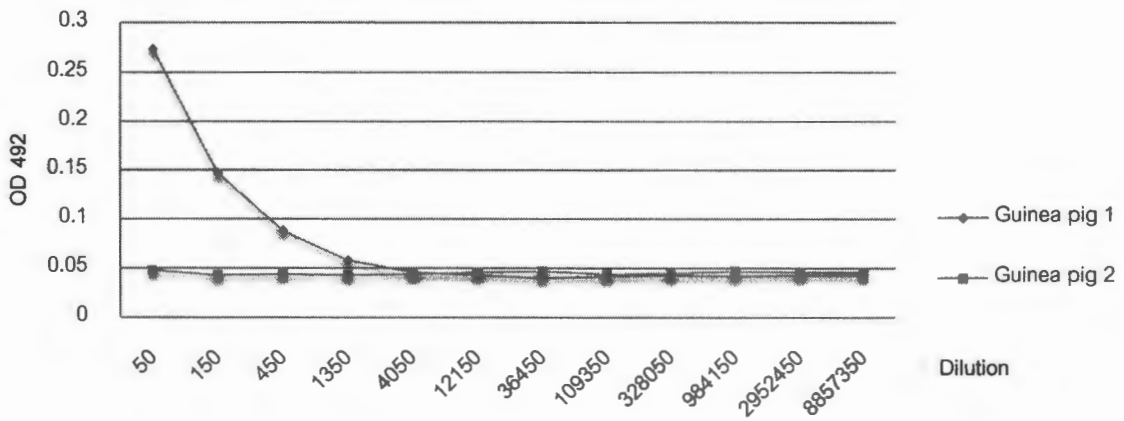
6. การตรวจการวินิจฉัยการติดเชื้อด้วยวิธี ELISA

6.1 การผลิต PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa ในหนูตะเภา

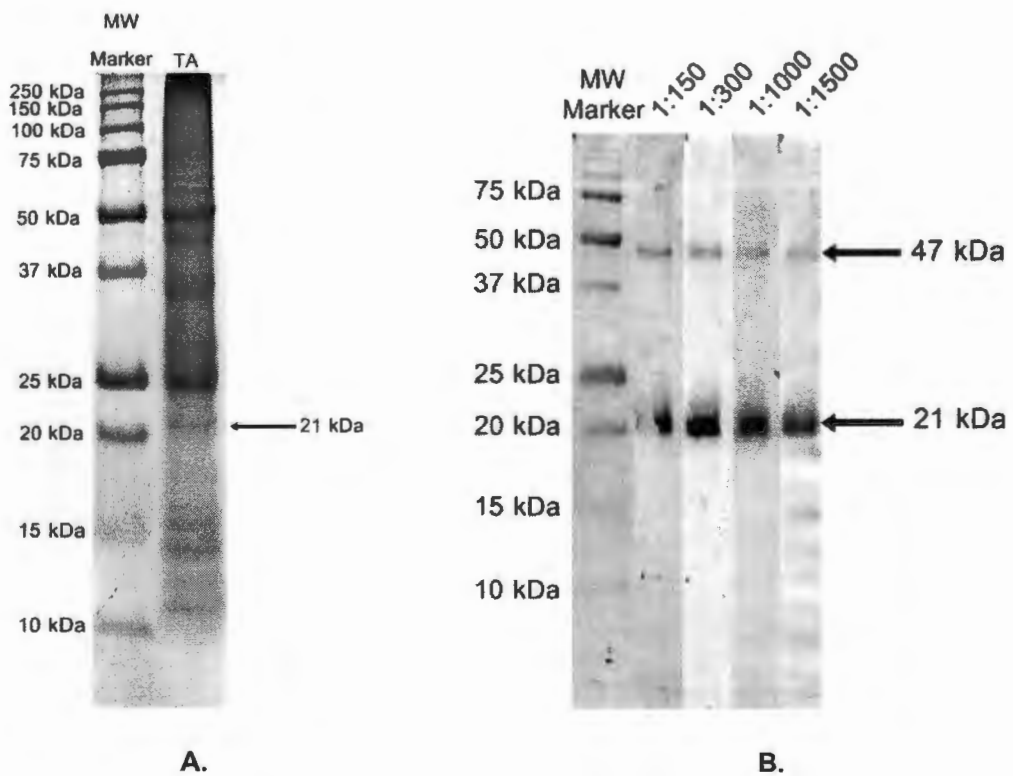
จากการผลิต PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa ในหนูตะเภา แล้วทดสอบด้วยวิธี ELISA โดย coat plate ด้วย TA พบว่า สามารถผลิต PoAb ได้ และให้ค่า titer ประมาณ 1:150 (ภาพที่ 23)

6.2 ศึกษาความจำเพาะ PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa ด้วยวิธี Western immunoblotting

เมื่อนำ TA มาวิเคราะห์ด้วย western immunoblotting โดยใช้ PoAb ที่ผลิตได้ เป็น primary antibody พบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวก 2 แถบ คือ แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa และ 47 kDa ซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนที่อยู่ในรูป dimer ทั้งนี้จะมีสาเหตุมากจากการ reduce ของ protein ไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 23 แสดง titration curve ของ serum หนูตะเภาที่ผ่านการ immunize ด้วย 21 kDa



ภาพที่ 24 A. แสดง TA ของ *F. gigantica* ที่แยกด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี coomassie blue

B. แสดง western immunoblotting ของ TA โดยใช้ PoAb guinea pig anti 21 kDa เป็น primary antibody ในความเข้มข้นต่างๆ

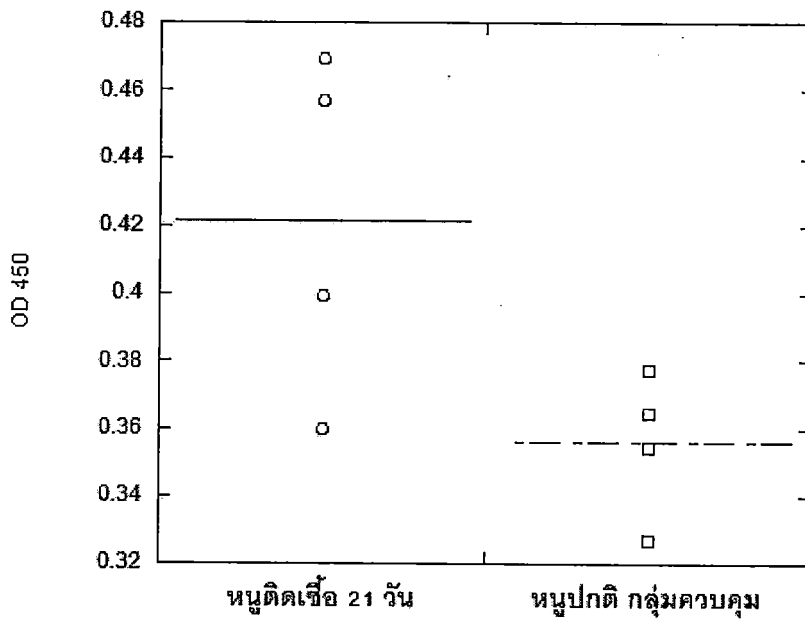
6.3 การตรวจหา 21 kDa antigen ในซีรัมของหนูติดเชื้อ ด้วยวิธี direct ELISA

จากการทดสอบซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อ *F. gigantica* เป็นเวลา 21 และ 35 วัน ด้วยวิธี direct ELISA โดย coat plate ด้วยซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อ แล้วใช้ anti 21 kDa polyclonal antibody ที่ผลิตได้ในหนูตะเภาเป็น primary antibody โดยใช้ซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อเป็นเวลา 21 วัน จำนวน 4 ตัว และหนูที่ไม่มีการติดเชื้อพยาธิจำนวน 4 ตัว พบว่าซีรัมของหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิมีค่า OD₄₅₀ มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ (ตารางที่ 2) เมื่อนำค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำของหนูแต่ละตัวมา plot กราฟ (ภาพที่ 25 และ 26) พบว่าค่า OD₄₅₀ เฉลี่ยในหนูกลุ่มที่ติดเชื้อมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า OD₄₅₀ ของหนูกลุ่มที่ติดเชื้อแต่ละตัว พบว่ามี 1 ตัวที่ให้ค่า OD₄₅₀ ใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 26)

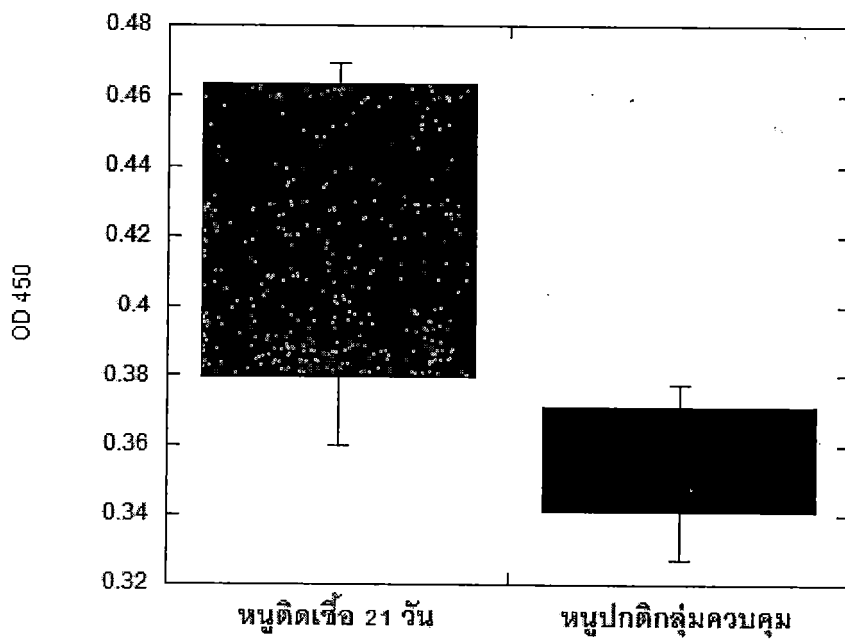
	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀)			
หนูติดเชื้อ	0.452	0.328	0.459	0.401
21 วัน	0.487	0.391	0.455	0.398
หนูปกติ	0.363	0.393	0.34	0.396
กลุ่มควบคุม	0.346	0.362	0.314	0.333

ตารางที่ 2 แสดงค่า OD₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 21 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี direct ELISA

จากการทดสอบซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิเป็นเวลา 35 วัน จำนวน 4 ตัว และหนูปกติในกลุ่มควบคุม จำนวน 4 ตัว เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (OD₄₅₀) พบว่าซีรัมของหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิมีค่า OD₄₅₀ มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ (ตารางที่ 3) เมื่อนำค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำของหนูแต่ละตัวมา plot กราฟ (ภาพที่ 27 และ 28) พบว่าค่า OD₄₅₀ เฉลี่ยในหนูกลุ่มที่ติดเชื้อมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อพิจารณาค่า OD₄₅₀ ของหนูกลุ่มที่ติดเชื้อแต่ละตัว พบว่า มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมทุกตัว (ภาพที่ 28)



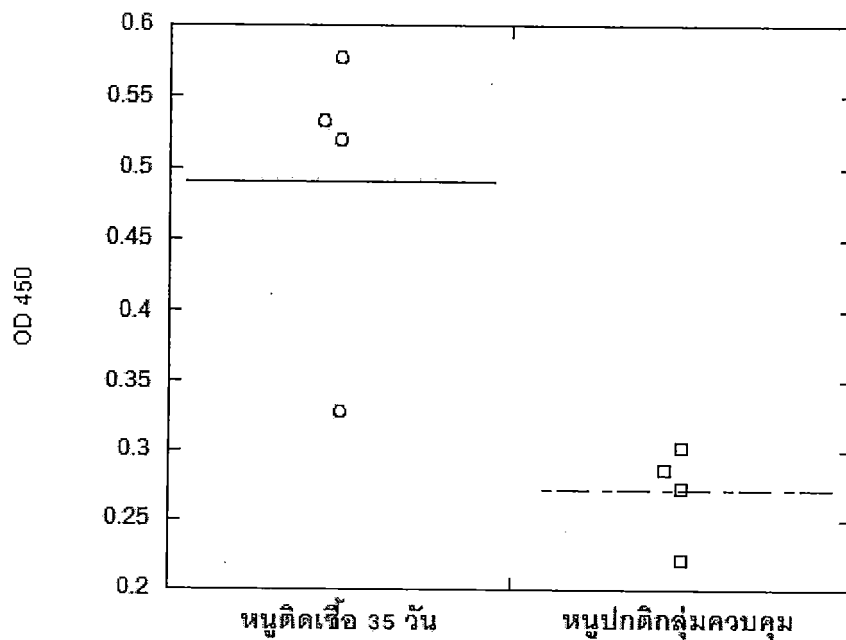
ภาพที่ 25 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย OD₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 21 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม



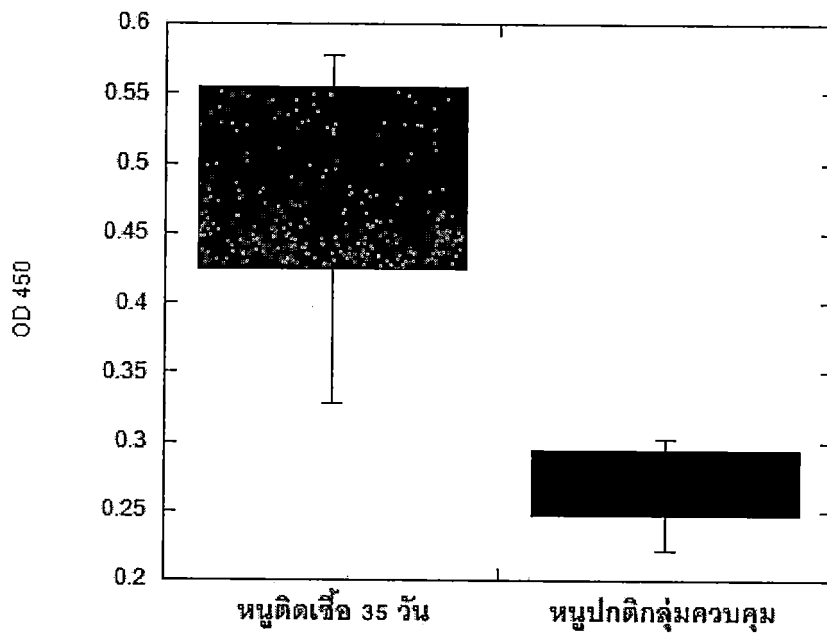
ภาพที่ 26 แผนภาพกล่องแสดงค่าเฉลี่ย OD₄₅₀ ของซีรัมของหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 21 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀)			
	หนูติดเชื้อ	0.34	0.522	0.527
35 วัน	0.315	0.544	0.627	0.546
หนูปกติ	0.333	0.326	0.26	0.333
กลุ่มควบคุม	0.27	0.247	0.184	0.212

ตารางที่ 3 แสดงค่า OD₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 35 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี direct ELISA



ภาพที่ 27 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย OD₄₅₀ ของซีรัมหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 35 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 28 แผนภาพกล่องแสดงค่าเฉลี่ย OD₄₅₀ ของซีรัมของหนูที่ติดเชื้อเป็นเวลา 35 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

การศึกษาในครั้งนี้พบว่า antigen ที่เรากัดเลือก คือ 16 kDa 21 kDa 25 kDa และ 36 kDa ทั้งนี้เนื่องจาก ให้ผล positive กับ CIS และ/หรือ RIS เข้มมาก แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้ง 4 เป็นองค์ประกอบของชั้นผิวที่น่าจะสามารถหลั่งออกมาจากชั้นผิว แล้วกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี และโปรตีนที่ให้ผล positive กับ RIS ทั้ง 4 ชนิดยังแสดงให้เห็นว่า โปรตีนดังกล่าวจะหลั่งออกจากตัวพยาธิตั้งแต่เป็นพยาธิระยะตัวอ่อน จากการศึกษา ES antigen ในพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยพบว่า major antigen มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64-52, 38-24, 17, 15, 13 และ 12 kDa ที่โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 kDa พบได้เฉพาะในระยะแรกของการติดเชื้อเท่านั้น ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยสามารถพบได้ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ (48) ในขณะที่พยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัยสามารถหลั่ง antigen ออกมาจากชั้นผิวและเยื่อผิวของ caecum กลายเป็น ES antigen (51, 52) นอกจากนี้พบว่า ES antigen ยังหลั่งมาจากระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์ได้อีกด้วย ซึ่ง antigen ดังกล่าวอยู่ในช่วง 66, 64, 58, 54, 27 และ 26 kDa (49, 50) และเชื่อว่า 66, 64, 58 และ 54 kDa เป็นโปรตีนที่หลั่งมาจากชั้นผิว ในขณะที่ 27 และ 26 kDa หลั่งมาจากทางเดินอาหาร ซึ่ง antigen ดังกล่าวสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถผลิต PoAbs ที่ต้านต่อโปรตีนทั้ง 4 ชนิดได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความจำเพาะเจาะจงของ PoAb ที่ผลิตได้ พบว่า PoAb ที่ต้านต่อ 16 kDa จะมีความจำเพาะเจาะจงน้อยที่สุด คือ จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนในแถบอื่นๆ ค่อนข้างมาก ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีน 16 kDa อาจจะมีโครงสร้างใกล้เคียงกับโมเลกุลอื่น ๆ ในขณะที่ PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa และ 36 kDa จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 16 kDa ได้ แสดงให้เห็นว่า 25 kDa และ 36 kDa น่าจะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับโปรตีนที่ 16 kDa การศึกษาในครั้งนี้ให้ผลคล้ายคลึงกับการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งพบว่า Fatty acid binding protein เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 12-16 kDa และพบหลั่งออกมาจากตัวพยาธิ และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี นอกจากนี้จากการศึกษา calcium binding protein ที่น้ำหนักโมเลกุล 16 kDa ใน *Schistosoma japonicum* พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีเช่นกัน (66) ในขณะที่โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 25 kDa และ 36 kDa มีการศึกษากันค่อนข้างน้อย

PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa มีความจำเพาะกับโปรตีน 21 kDa เท่านั้น ซึ่งเมื่อศึกษาด้วยวิธี 2 DE western immunoblotting พบว่า PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนเพียง 2 จุด แสดงให้เห็นว่า PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa เป็น antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง นอกจากนี้ epitope บนโมเลกุลของ 21 kDa น่าจะมีความแตกต่างจากโปรตีนอื่น ๆ ภายในพยาธิ *F. gigantica* ดังนั้น 21 kDa น่าจะเป็นโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับนำไปผลิตเป็น monoclonal antibody เพื่อนำไปศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ต่อไปในอนาคต

จากการศึกษา cross reactivity ของ PoAb ที่ผลิตได้ พบว่า PoAb ที่ต้านต่อ 21 kDa ให้ผล cross react กับพยาธิ *Paramphistomum* sp. และ PoAb ที่ต้านต่อ 25 kDa ให้ผล cross react กับพยาธิ *E. pancreaticum* ในขณะที่ PoAb ที่ต้านต่อ 36 kDa ไม่มีผล cross react กับพยาธิชนิดอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa และ 25 kDa น่าจะมีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันในแต่ละ species ส่วน 36 kDa น่าจะเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะกับพยาธิ *F. gigantica* อย่างไรก็ดีตามเพื่อเป็นการยืนยันว่าโปรตีนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงหรือแตกต่างกับโปรตีนใน species อื่นๆ หรือไม่จะต้องมีการศึกษาลำดับของกรดอะมิโน และลำดับของกรดนิวคลีอิกต่อไป

ผลการศึกษาตำแหน่งของโปรตีนต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อพยาธิพบว่า 16 kDa 25 kDa และ 36 kDa ให้ผลการศึกษาเหมือนกัน คือ พบกระจายอยู่ภายในเนื้อเยื่อ parenchyma และมีความเข้มข้นที่แตกต่างกันในเซลล์เซลล์ parenchyma แต่ละเซลล์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาการกระจายของ fatty acid bind protein ภายใน *F. gigantica* (67) glutathione-S-transferase ใน *F. gigantica* (30) และ *Cotylophoron cotylophorum* (68) ซึ่งพบว่าเนื้อเยื่อ parenchyma สามารถแบ่งได้อย่างน้อย 3-4 ชนิดตามความเข้มข้นของการติดสี ในขณะที่ 21 kDa ส่วนใหญ่สามารถตรวจพบได้มาก บริเวณชั้นผิวและเซลล์ชั้นผิวของพยาธิ ซึ่งเมื่อพิจารณาโดยละเอียด พบว่า 21 kDa มีการกระจายโดยทั่วไปภายในชั้นผิวซึ่งให้ผลการศึกษาที่คล้ายคลึงกับ 28.5 kDa ในพยาธิ *F. gigantica* คือ พบกระจายอยู่ภายในชั้นผิวและเซลล์ชั้นผิว แต่จะกระจายอย่างหนาแน่นบริเวณส่วนบนของชั้นผิว (53) เมื่อศึกษาด้วยวิธี immunogold labeling พบว่า 28.5 kDa กระจายอยู่ภายใน G₂ tegumental granules และบน surface membrane ของชั้นผิวพยาธิระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัย (69, 70) ซึ่ง granule และส่วนบนของชั้นผิวของพยาธิจะมีการหลุดลอกออกจากลำตัวเป็นระยะ ทำให้พยาธิสามารถหลั่ง 28.5 kDa กลายเป็นองค์ประกอบของ ES antigen ได้

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa พบว่าโปรตีนดังกล่าวคือ calcium binding protein ซึ่งมี identity 100% เมื่อเทียบกับ calcium binding protein 1 (CaBP1) ที่ศึกษาโดย Grams (71) โปรตีนชนิดนี้เป็นสมาชิกของ heterochimeric EF-hand protein family ซึ่งพบได้ในพยาธิ *Fasciola* และ *Schistosoma* ภายในโมเลกุลไม่มี signal peptide แสดงว่ามีคุณลักษณะเป็น cytoplasmic protein โมเลกุลของโปรตีนกลุ่ม EF-hand มีลักษณะเป็น dimer และมี calcium binding site อยู่ภายในโมเลกุล (71) จากการศึกษายังพบว่า CaBP1 สามารถตรวจพบได้ในทุก fraction ของพยาธิตัวเต็มวัยและพยาธิตัวอ่อน รวมทั้งใน ES และ TA antigen ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้ยังพบผล cross reaction กับ *S. mansoni* และ *Paramphistomum* sp. ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการทดลองในครั้งนี้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม CaBP1 มีน้ำหนักโมเลกุล 26 kDa ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa และจากการศึกษา CaBP family ในพยาธิ *F. gigantica* พบว่ามีทั้งหมด 4 ชนิด คือ CaBP1 CaBP2 CaBP3 และ CaBP4 (72)

จากการศึกษาตำแหน่งการกระจายของ CaBP1 CaBP3 และ CaBP4 ของ *F. gigantica* (71, 72) พบว่ามีการกระจายอยู่ภายใน tegumental type epithelium ได้แก่ ชั้นผิว ทางเดินอาหารส่วนต้น ท่อส่วนปลายของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้ยังพบ

CaBP1 ในเยื่อผิวของทางเดินอาหารส่วนปลาย และ CaBP4 ยังสามารถพบได้ในเยื่อผิวของ bladder อีกด้วย

ในขณะที่ calcium binding protein ในพยาธิกลุ่ม trematode มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างหลากหลายตั้งแต่ 8 kDa ใน *S. japonicum* (73) ประมาณ 20.8-22.6 kDa ใน *S. mansoni* (71) และ 20.8 kDa ใน *Clonorchis sinensis* (74) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ และจากการศึกษาคำแห่งการกระจายของ SJCaP8 ในพยาธิระยะตัวอ่อน พบกระจายอยู่ทั่วไปภายในชั้นผิว (77)

การศึกษาในครั้งนี้ได้นำ PoAb ที่ผลิตได้มาเป็นเครื่องมือในการตรวจหา calcium binding protein ในซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในห้องทดลอง โดยใช้สัตว์ทดลองทั้งหมด 4 ตัว ซึ่ง PoAb ดังกล่าวได้ยืนยันด้วยวิธี 2 DE western immunoblotting แล้วว่ามีความจำเพาะต่อโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21-22 kDa เท่านั้น จากการทดลองพบว่าสามารถนำ PoAb ที่ต้านต่อ calcium binding protein ที่ผลิตได้มาตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิได้ตั้งแต่อายุของการติดเชื้อ 3 สัปดาห์ ซึ่งให้ค่าที่แตกต่างจากซีรัมของหนูกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า calcium binding protein เป็นโปรตีนที่ศักยภาพสูงที่จะนำไปศึกษาพัฒนาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ได้ในอนาคต การศึกษาใน *C. sinensis* โดยนำโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 20.8 kDa มาใช้ตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิด้วยวิธี serodiagnosis โดยทดสอบในผู้ป่วยที่เป็น clonorchiasis 100 คน schistosomiasis 20 คน และไม่ติดเชื้อ 30 คน พบว่าให้ค่า sensitivity เท่ากับ 68% และ specificity เท่ากับ 84% (74, 75, 76)

จากการศึกษา SJE16 ซึ่งเป็น antigen ที่พบได้บริเวณชั้นผิวของ *S. japonicum* โดยทำการศึกษาดังวิธี serodiagnosis ในสัตว์ทดลอง พบว่ามีค่า specificity และ sensitivity เท่ากับ 94.1% และ 88.2% ตามลำดับ ซึ่งระดับของ antibody ที่ต้านต่อ SJE16 จะสามารถรักษาระดับอยู่ในร่างกายของสัตว์ทดลองจนถึง 21 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ ในขณะที่การศึกษาในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อพยาธิ มีค่า specificity 98.3% และ sensitivity ของการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังเท่ากับ 85.5% and 70.2% ตามลำดับ (66) นอกจากนี้จากการศึกษาการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* โดยการตรวจหา 28.5 kDa TA โดยใช้ monoclonal antibody ด้วยวิธี sandwich ELISA พบว่าสามารถตรวจหา antigen ได้ตั้งแต่วันที่ 1 หลังจากการติดเชื้อ ในขณะที่การตรวจหาระดับของ antibody ที่ต้านต่อ 28.5 kDa จะสามารถตรวจพบได้ในวันที่ 35 หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งการตรวจวินิจฉัยในครั้งนี้ให้ค่า sensitivity และ specificity เท่ากับ 94.55% และ 100% ตามลำดับ โดยมีค่า positive predictive value เท่ากับ 100% ค่า negative predictive value เท่ากับ 97.39% ค่า false positive rate เท่ากับ 0% ค่า false negative rate เท่ากับ 5.50% และค่า accuracy เท่ากับ 98.2% (78)

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า TA สามารถหลั่งเข้าสู่เนื้อเยื่อของ host และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้ดี องค์ประกอบของ TA ที่น่าสนใจ ได้แก่ 16 kDa 21 kDa 25 kDa และ 36 kDa ซึ่งเป็น antigen ที่สามารถพบได้ในซีรัมของสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพยาธิ ถึงแม้ว่า antigen ดังกล่าวจะเป็นองค์ประกอบของ TA แต่พบว่าเนื้อเยื่อที่ผลิต antigen ที่น้ำหนักโมเลกุล 16 kDa 25 kDa และ 36 kDa ส่วนใหญ่ไม่ได้มาจากชั้นผิวของพยาธิ แต่จะผลิตมาจากเนื้อเยื่อ parenchyma ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่บริเวณกลางลำตัว แต่เนื่องจากในงานวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษา antigen ที่มีศักยภาพในการนำไปตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ซึ่ง antigen ที่ดีควรเป็น antigen ที่ผลิตมาจากส่วนผิวหรือเนื้อเยื่อที่มีการสัมผัสกับเนื้อเยื่อของ host โดยตรง หรือมีการหลั่งสารเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์ ดังนั้น antigen ที่ 16 kDa 25 kDa และ 36 kDa จะเป็นการให้ความสำคัญค่อนข้างน้อย

ในขณะที่ antigen ที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa จะเป็น antigen ที่มีแหล่งผลิตมาจากชั้นผิวของพยาธิ ทั้งในเยื่อบุผิวและตัวเซลล์ที่อยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อ ซึ่งคาดว่า antigen ดังกล่าวจะมีการหลั่งออกจากผิวของพยาธิโดยการสลัดชั้นผิวในขณะที่ดำรงชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งขณะที่ต้องเผชิญกับระบบภูมิคุ้มกันของ host ดังนั้นจึงมีการศึกษา antigen ที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa โดยอาศัย PoAb ที่ผลิตได้ซึ่งพบว่า 21 kDa เป็น antigen ที่พบได้ทั้งในพยาธิระยะตัวอ่อน และระยะตัวเต็มวัย และยังพบว่า 21 kDa เป็นสารที่มี carbohydrate เป็นองค์ประกอบอยู่ภายในโมเลกุล นอกจากนี้จากการศึกษา cross reactivity พบว่า PoAb ที่ด้านต่อ 21 kDa ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ 21 kDa ของพยาธิใบไม้กระเพาะอาหาร *Paramphistomum* sp. แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับพยาธิใบไม้กระเพาะอาหาร (rumen fluke) ชนิดอื่น ๆ รวมทั้งพยาธิใบไม้ตับอ่อน *E. pancreaticum* และจากการศึกษาโดยวิธี ELISA พบว่าสามารถนำ polyclonal antibody ที่ผลิตได้ไปตรวจการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในหนู rat ได้ตั้งแต่มีการติดเชื้อพยาธิอายุ 3 สัปดาห์ จากการศึกษาด้วยวิธี 2 Dimensional gel electrophoresis และ western immunoblotting พบว่า PoAb ที่ด้านต่อ 21 kDa สามารถทำปฏิกิริยากับ TA ได้ 2 จุด และเมื่อนำจุดโปรตีนไปศึกษาลำดับของกรดอะมิโน พบว่าโปรตีนดังกล่าวคือ calcium binding protein

จากผลการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสามารถนำ calcium binding protein ของ *F. gigantica* มาใช้เป็น antigen ในการตรวจการติดเชื้อพยาธิได้ตั้งแต่มีการติดเชื้อ 3 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธินิยมใช้ monoclonal antibody (MoAb) ในการ coat plate ขณะทำ sandwich ELISA ดังนั้นเพื่อในบรรลุเป้าหมายในการทดสอบความสามารถในการนำไปตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ จึงจำเป็นต้องผลิต (MoAb) ที่ด้านต่อ calcium binding protein ซึ่งอาจจะมีการผลิต cDNA ของ calcium binding protein ตามฐานข้อมูลของ Genbank หลังจากนั้นผลิตเป็น recombinant protein แล้วจึงนำ recombinant protein ดังกล่าวไปผลิต monoclonal antibody และนำทดสอบการติดเชื้อพยาธิในห้องทดลอง หรือในภาคสนามต่อไปในอนาคต

ผลผลิต (Output)

(1) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่และหน้า)

- ยังไม่ได้ตีพิมพ์ แต่คาดว่าจะตีพิมพ์ได้ 1 เรื่อง คือ Identification fo 21 kDa calcium binding protein in the tegumental antigen of *Fasciola gigantica* วารสาร International Journal of Parasitology ในปี พ.ศ. 2556

(2) การจดสิทธิบัตร

-

(3) ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาครัฐกิจหรือบุคคลทั่วไป)

-

(4) ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-

รายงานสรุปการเงิน
เลขที่โครงการ (2554A10862027)
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
มหาวิทยาลัยบูรพา
การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโปรตีนชั้นผิวพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*
ที่มีศักยภาพสูงสำหรับการพัฒนาการวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis
(Study of the basic characteristics of the high potential *Fasciola gigantica* tegumental
antigens for the development of the fasciolosis diagnosis)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย.....ดร.วิฑูร ชาวสุข.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่....1 เมษายน 2554....ถึงวันที่....31 มีนาคม 2555.....

ระยะเวลาดำเนินการ...1..ปี..0.. เดือน ตั้งแต่วันที่..1 เมษายน 2554..ถึงวันที่..31 มีนาคม 2555.

รายจ่าย

หมวด (ตามสัญญา)	รายจ่ายสะสม จากรายงาน ครั้งก่อน	ค่าใช้จ่าย งวดปัจจุบัน	รวม รายจ่าย สะสมถึง ปัจจุบัน	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	คงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	30,000	-	30,000	60,000	30,000
2. ค่าจ้าง	-	-	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	10,486	113,487.9	123,973.9	132,500	8,526.1
4. ค่าใช้สอย	-	25,000	25,000	25,000	-
5. อื่นๆ	-	2,500	2,500	2,500	-
รวม	40,486	140,987.9	181,473.9	220,000	38,526.1

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	110,000	บาท	เมื่อ	มีนาคม 2554
งวดที่ 2	88,000	บาท	เมื่อ	มีนาคม 2555
รวม	<u>198,000</u>	บาท		

ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1	40,486.0	บาท
งวดที่ 2	140,987.9	บาท
รวม	<u>181,473.9</u>	บาท

จำนวนเงินคงเหลือ	16,526.1	บาท
------------------	----------	-----

.....

()

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....

()

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Sukhapesna V, Tantasuvan D, Sarataphan N, Imsup K. (1989). A study on the prevalence of liver fluke infection in cattle and buffaloes in Thailand. *J Thai Vet Med Assoc*; 40(1-2): 13-19 (in Thai).
2. Boray JC. (1988). Flukes of domestic animal. In: Gaafar SM, Howard WE, Marsh RE, editors. Parasites, pests and predators. New York; Elsevier, 179-218.
3. วัฒนา แสงวงกิจ. (2533). Clinical Syndrome of Fascioliasis. ใน : วิชาการในโรคระบบทางเดินอาหาร 6. กรุงเทพฯ : กรุงเทพมหานคร, 183-206.
4. Kachintorn, V, Atisook K, Tesjaroen S, Lertakyamanee N, Plengvanit U. (1988). *Fasciola gigantica*: the second case of human infection in Thailand. *J Med Assoc Thailand* ; 71(8): 451-455.
5. Srihakim S, Pholpark M. (1991). Problem in fascioliasis in animal husbandary in Thailand (review). *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth*; 22 suppl: 352-355.
6. Togerson P. Clextion J. (1998). Epidemiology and control. In: Dalton JP editor. Fasciolosis. Cambridge: CABI Publishing; 113-139.
7. วิจิตร สุขเพ็ญ, ดรุณี ทันทสุวรรณ, นพพร ศุภารักษ์, กิ่งดาว อิมทรัพย์. (2532). การศึกษาอัตรา การเกิดพยาธิใบไม้ตับของโคและกระบือในประเทศไทย. *สัตวแพทยสาร*, 13-19.
8. วันชัย มาลีวงศ์, ผิวพรรณ มาลีวงศ์, นิमित มรกต. (2544). ประสิทธิภาพของการแพทย์: โพรโตซัว และหนอนพยาธิ. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, 198-207.
9. Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, von Orelli M, Sarasin G. (1983). Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infection in sheep with triclabendazole. *Vet Rec*; 113: 315-317.
10. Sanyal PK. (1995). Kinetic disposition of triclabendazole in buffalo compare to cattle. *J Vet Phamacol Theraps*; 18: 370-374.
11. Haroun ET, Hillyer GV. (1986). Resistance to fascioliasis. A review. *Vet Parasitol*; 20:63-93.
12. Yoshihara S, Nakagawa M, Suda H. (1985). Protection against *Fasciola gigantica* infection in rats administered metacercarial antigens. *Res Vet Sci* ; 39:383-4.

13. Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosati E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, Spithill TW. (1997) .Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolososis in cattle. *Int J Parasitol*; 27:1419-28.
14. Tendler M, Brito CFA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diago CM, Almeida MS, et al. (1996). A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci*; 93: 269-73.
15. Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, et al. (1990). Glutathione S-transferase novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol*; 145: 3905-10.
16. Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, et al. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* ;14(17-18):1603-12.
17. Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, et al. (1994). Vaccination of sheep with purified cystein proteinases of *Fasciola hepatica* decrease worm fecundity. *Exp Parasitol*; 78: 132-48.
18. Spithill TW, Dalton JP. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol Today* ; 14(6): 224-8.
19. วิฑูรย์ ไวยนันท์. (2540). ปรสติดวิทยาทางการแพทย. กรุงเทพฯ : ศักดิ์โสภการพิมพ์ , 257-290.
20. Espino AM, Marcet R and Finlay CM. (1990). Detccion of circulating excretory secretory antigens in human with fascioliasis by sanwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbial*. 28: 2637-40.
21. Espino AM and Finlay CM. (1994). Sanwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in human with fascioliasis. *J Clin Microbiol*, 32: 190-3.
22. Bennett CE. (1978). The identification of soluble adult antigen on the tegumental surface of juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitol* ,77: 325-32.
23. Behm CA, Sangster NC. (1999). Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton JP, editor. Fasciolosis. Cambridge; CABI, 185-217.
24. Sobhon P, Anatavara S, Dangprasert T, Viyanant V, Krailas D, Upatham ES, et al. (1998). *Fasciola gigantica*: studies of the tegument as a basis for the development of

- immunodiagnosis and vaccine. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth*; 29(2): 387-400.
25. Sriburee S. (2000). Characterization of epithelial cells and the expression of cathepsin L gene in the digestive tract of *Fasciola gigantica*. [M.Sc. Thesis]. Bangkok: Mahidol University.
26. Dalton JP, Heffernan M. (1989). Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*; 35: 161-6.
27. McKerrow JH. (1981). Parasite proteases. *Exp Parasitol* ; 68:111-5.
28. Tort J, Brindely PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP. (1999). Proteinases and associated genes of parasitic helminthes. *Adv Parasitol*; 43:L161-266.
29. Dangprasert T, Khawsuk W, Meepool A, Wanichanon C, Viyanant W, Upatham ES, et al. (2001) *Fasciola gigantica*: surface topography of the adult tegument. *J Helmintol*; 75: 43-50.
30. Khawsuk, W. (2003). Development of *Fasciola gigantica* tegument, identification and localization of associated antigens. Ph.D. Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
31. Sobhon P, Dangprasert T, Chuanchaiyakul S, Meepool A, Khawsuk W, Wanichanon C, et al. (2000) . *Fasciola gigantica*: ultrastructure of the adult tegument. *Sci Asia*; 26: 137-48.
32. Fairweather, I., Threadgold L.T. and Hanna R.E.B. (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton, J.P. Fasciolosis. New York:CABI Publishing, 47-111.
33. Barry, D. H., Mawdesley-Thomas, L. E., and Malone J. C. (1968). Enzyme histochemistry of the adult liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*, 23:355-360.
34. Thrope, E. (1967). Comparative enzyme histochemistry of immature and mature stages of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*, 22:150-159.
35. Threadgold, L. T., and Read, C. P. (1968). Electron-microscopy of *Fasciola hepatica*. V. peroxidase localization. *Exp Parasitol*, 23:221-227.
36. Threadgold L. T., and Brennan. (1978). *Fasciola hepatica*: basal infolding and associated vacuoles of the tegument. *Exp Parasitol*, 46:300-316.

37. Fujino T and Ishii Y. (1986) Comparative histochemical studies of glycosidase activity in some helminthes. *J Helminthol*; 60: 1-13.
38. Skuce PJ, Anderson HR, Fairweather I. (1987) The interaction between the deacetylated (amine) metabolite of diamphenethide (DAMD) and cytochemically demonstrable Na⁺/K⁺-ATPase activity in the tegument of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*; 74:161-167.
39. Threadgold, L. T. (1968). Electron microscope studies of *Fasciola hepatica* VI the ultrastructural localization of Phosphatases. *Exp parasitol*; 23:264-276.
40. Sobhon P, Upatham ES. (1990) Snail hosts, life cycle, and tegument structure of oriental schistosomes. UNDP/World Bank/WHO special program for research and training in tropical diseases,.
41. Sobhon P, Upatham ES, Viyanant V, Kusamran T, Mothong V, Anantavara S. (1992) Identification and localization surface antigens in adult *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mekongi*. National Research Council, USA, Aquaculture and Schistosomiasis. Proceedings of a network meeting held in Manila, Philippines, August 6-10, 1991. Washington DC; National Academic Press;. 178-195.
42. Taylor JW, Hayunga EG, Vannier WE. (1981) Surface antigens of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*; 3: 157-168.
43. Lee KW, Thakur A, Karim AM, LoVerde PT. (1995) Immune response to *Schistosoma mansoni* phosphoglycerate kinase during natural and experimental infection: identification of a schistosoma-specific B cell epitope., *Infect Immun*; 63: 4307-11.
44. Yang W, Waine GJ, Mcmanus DP. (1995) Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian blood fluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun*; 212: 1029-1039.
45. Hoffmann KF, Strand M. (1997) Molecular characterization of a 20.8 kDa *Schistosoma mansoni* antigen. *J Biol Chem*; 272: 14509-15.
46. Mohamed MM, Shalaby KA, LoVerde PT, Karim AM. (1998) Characterization of Sm20.8, a member of a family of schistosome tegumental antigens. *Mol Biochem Parasitol*; 96: 15-25.

47. Shabaan AM, Mohamed MM, Abdallah MS Ibrahim HM and Karim AM. (2003) Cloning and characterization of a *Schistosoma mansoni* 1H and 30S clones as two tegumental vaccine candidate antigens. *Acta Biochemica Polonica*; 50: 269-278.
48. Itagaki T, Sakamoto T, Itagaki H. (1995) Analysis of *Fasciola* sp. antigen by enzyme-linked immunotransfer blot using sera from experimentally and naturally infected cattle. *J Vet Med Sci*; 57: 522-13.
49. Sobhon P, Anantavara S, Dangprasert T, Meepool A, Wanichanon C, Viyanant V, et al. (1996) *Fasciola gigantica*: Identification of adult antigens, their tissues sources and possible origins. *J Sci Soc Thailand*; 22: 143-162.
50. Sobhon P, Viyanant V, Upatham ES, Kusamran T, Grams SV, Ardseungnoen P, et al. (2000) Development of immunodiagnosis of *Fasciola gigantica*. The Allergy and Immunology Society of Thailand and the Faculty of Science, Mahidol University under the auspices of FIMSA. Proceeding of The 2nd FIMSA congress, Immunology and Allergy in the Asia-Oceania: at the dawn of the new millenium; Jan 23-27; Bangkok, Thailand: Aksornsmai Press; 1999.
51. Viyanant V, Krailas D, Sobhon P, Upatham ES, Kusamran T, Chompoochan T, et al. (1998) Diagnosis of cattle fasciolosis by the detection of a circulating antigen using a monoclonal antibody. *Asia Pacific J Allerg Immunol*; 15: 153-159.
52. Viyanant V, Upatham ES, Sobhon P, Krailas D, Ardseungnoen P, Anantawara S. (1997) Development and characterization of monoclonal antibodies against excretory-secretory antigens of *Fasciola gigantica*. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth*; 28: 128-133.
53. Chaithirayanon K, Wanichanon C, Vichasri-Grams S, Ardseungneon P, Grams R, Viyanant V, Upatham ES, Sobhon P. (2002) Production and characterization of a monoclonal antibody against 28.5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica*. *Acta Trop*; 84:1-8.
54. ปิยะฉัตร สงวนรัตน์ (2548) การผลิต polyclonal antibody การศึกษาคุณลักษณะและตำแหน่งการกระจายของ high immunogenic circulating tegumental antigen ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*, โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

55. Shehab AY, Abou Basha LM, El-Morshedy HN, Abel-Fattah M, Osman MM and Farag HF. (1999) Circulating antibodies and antigens correlate with egg counts in human fasciolosis. *Trop Med International Health*; 4: 691-694.
56. Carnevale S, Rodriguez MI, Santillan G, Labbe JH, Cabrera MG, Bellegarde EJ et al., (2001) Immunodiagnosis of human fasciolosis by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a micro-ELISA. *Clin Diagn Lab Immunol*; 8: 174-177.
57. Haseeb AN, el-Shazly AM, Arafa MA and Morsy AT. (2003) Evaluation of excretory/secretory *Fasciola* (Fhes) antigen in diagnosis human fasciolosis. *J Egypt Soc Parasitol*; 33: 123-138.
58. Cornelissen JBWJ, Gaasenbeek CPH, Borgsteede FHM, Holland WG, Harmsen MM and Boersma WJA. (2001) Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *Internatl J Parasitol*; 31: 728-737.
59. Rokni MB, Massoud J and Hanilo A. (2003) Comparasion of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola gigantica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Acta Tropica*, 88: 69-75.
60. Wongkham C, Tantrawatpan C, Intapan PM, Maleewong W, Wongkham S and Nakashima K. (2005) Evaluation of immunoglobulin G subclass antibodies against recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Clin Diagn Lab Immunol*; 12: 1152-1156.
61. Intapan PM, Tantrawatwan C, Maleewong W, Wongkham S, Wongkham C and Nakashima K. (2005) Potent epitopes derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in peptide-based immunoassay for the serodiagnosis of human fasciolosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 53: 125-129.
62. Arafa MS, Abaza SM, El-Shewy KA, Mohareb EW and El-Moamly AA. (1999) Detection of *Fasciola*-specific excretory/secretory (E/S) protein fraction band (49.5 kDa) and its utilization in diagnosis of early fasciolosis using different diagnostic techniques. *J Egypt Soc Parasitol*; 29: 911-926.

63. Attallah AM, Karawia EA, Ismail S, Tabll AA, Nawar AA, Ragab WA, et al., (2002) Identification and characterization of a 26- to 28- kDa circulating antigen of *Fasciola gigantica*. *Ann Trop Med Parasitol*; 96: 271-282.
64. Dixit AK, Yadav SC and Sharma. (2002) 28 kDa *Fasciola gigantica* cysteine protease in the diagnosis of prepatent ovine fasciolosis. *Vet Parasitol*; 109: 233-247.
65. El-Kerdany ED, Abd-aalla NM and Sharki OA. (2002) Recognition of antigenic components of *Fasciola gigantica* and their use in immunodiagnosis. *J Egypt Soc Parasitol*; 32: 675-690.
66. Wang ZJ, Hu W, Shen DK, Wu XW, Wang JJ, Han ZG, Xue CL. (2003) Prokaryotic expression of gene encoding *Schistosoma japonicum* SjE16 and its potential application in immunodiagnosis. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. ;21(2):76-9.
67. Sirisriro A, Grams R, Vichasri-Grams S, Ardseungneon P, Pankao V, Meepool A, Chaithirayanon K, Viyanant V, Tan-Ariya P, Upatham ES, Sobhon P. (2002) Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica*. *Vet Parasitol*; 105(2):119-29.
68. วินันดา แสงทอง (2547) การศึกษาตำแหน่งการกระจายของ glutathione S-transferase ในพยาธิใบไม้กระเพาะอาหารโค *Cotylophoron cotylophorum*. โครงการวิจัยหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
69. Anuracpreeda P, Wanichanon C, Chaithirayanon K, Preyavichyapugdee N and Sobhon P. (2006) Distribution of 28.5 kDa antigen in the tegument of adult *Fasciola gigantica*. *Act Trop*; 100: 31-40.
70. Anuracpreeda P, Wanichanon C and Sobhon P. (2009) *Fasciola gigantica*: Immunolocalization of 28.5 kDa antigen in the tegument of metacercaria and juvenile fluke. *Exp Parasitol*; 122: 75-83.
71. Grams SV, Subpipattana P, Sobhon P, Viyanant V and Grams R. (2006) An analysis of the calcium-binding protein 1 of *Fasciola gigantica* with a comparison to its homologs in the phylum Platyhelminthes. *Mol Biochem Parasitol*; 146 :10-23.
72. Subpipattana P, Grams R and Grams SV. (2012) Analysis of a calcium-binding EF-hand protein family in *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol*; xxx: xxx-xxx.
73. Hu SM, Law PK, Lv Z, Wu Z and Fung MC. (2008) Molecular characterization of a calcium-binding protein SjCa8 from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res*; 103: 1047-1053.

74. Zhou Z, Hu X, Huang Y, Hu H, Ma C, Chen X, Hu, F, Xu J, Lu F, Wu Z and Yu X. (2007) Molecular cloning and identification of a novel *Clonorchis sinensis* gene encoding a tegumental protein. *Parasitol Res*; 101:737–742.
75. Chung YB, Chung BS, Choi MH, Chai jY and Hong ST. (2000) Partial characteristic of a 17 kDa protein of *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol*; 38 (2): 95-97.
76. Chen J, Xu H, Zhang Z, Zeng S, Gan W, Yu X and Hu X. (2011) Cloning and expression of 21 kDa tegumental protein of *Clonorchis sinensis* and human antibody response to it as a trematode-nematode pan-specific serodiagnosis antigen. *Parasitol Res*; 108: 161-168.
77. Lv Z, Yang L, Hu S, Sun X, He H, He S, Li Z, Zhou Y, Fung M, Yu X, Zheng H, Cao A and Wu Z. (2009) Expression profile, localization of an 8-kDa calcium binding protein from *Schistosoma japonicum* (SjCa8), and vaccine potential of recombinant SjCa8 (rSjCa8) against infections of mice. *Parasitol Res*; 104: 733-743.
78. Anuracpreeda P, Wanichanon C, Chawengkirtkil R, Chaiñhirayanon K and Sobhon P. *Fasciola gigantica*: Immunodiagnosis of fasciolosis by detection of circulating 28.5 kDa tegumental antigen. *Exp Parasitol*; 123: 334-340.

ภาคผนวก (Appendix)

ตารางแสดงค่าทางสถิติจากการศึกษาด้วยวิธี indirect ELISA โดยผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows

1. direct ELISA ที่ coat plate ด้วยซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantia* เป็นเวลา 21 วัน

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
OD	R	4	.421375	.0512906	.0256453
	CR	4	.355875	.0214296	.0107148

ตารางที่ 1-1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า OD₄₅₀ ของ indirect ELISA เมื่อ coat plate ด้วยซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantia* เป็นเวลา 21 วัน โดยใช้ guinea pig anti 21 kDa TA polyclonal antibody เป็น primary antibody โดยที่ CR = กลุ่ม control และ R = หนู rat ติดเชื้อ

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
OD	6.404	.045	2.357	6	.057	.0655000	.0277937	-.0025087	.1335087
			2.357	4.016	.078	.0655000	.0277937	-.0115435	.1425435

ตารางที่ 1-2 แสดงการทดสอบความแปรปรวนโดยใช้สถิติ F-test ของค่า OD₄₅₀ ของ indirect ELISA เมื่อ coat plate ด้วยซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantia* เป็นเวลา 21 วัน โดยใช้ guinea pig anti 21 kDa TA polyclonal antibody เป็น primary antibody

2. Indirect ELISA ที่ coat plate ด้วยซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantia* เป็นเวลา 35 วัน

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
OD	R	4	.489375	.1106386	.0553193
	CR	4	.270625	.0345118	.0172559

ตารางที่ 2-1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า OD₄₅₀ ของ indirect ELISA เมื่อ coat plate ด้วยซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantia* เป็นเวลา 35 วัน โดยใช้ guinea pig anti 21 kDa TA polyclonal antibody เป็น primary antibody โดยที่ CR = กลุ่ม control และ R = หนู rat ติดเชื้อ

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
OD	Equal variances assumed	3.281	.120	3.775	6	.009	.2187500	.0579482	.0769560	.3605440
	Equal variances not assumed			3.775	3.578	.024	.2187500	.0579482	.0501000	.3874000

ตารางที่ 2-2 แสดงการทดสอบความแปรปรวนโดยใช้สถิติ F-test ของค่า OD₄₅₀ ของ indirect ELISA เมื่อ coat plate ด้วยซีรัมของหนู rat ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantia* เป็นเวลา 35 วัน โดยใช้ guinea pig anti 21 kDa TA polyclonal antibody เป็น primary antibody