

บทความวิจัย

การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารคัดหลั่งจากพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum*

อาตุลย์ มีพูล* และ กมลชนก งามสม

บทคัดย่อ

โพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อสารคัดหลั่งของพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum* ผลิตโดยการปลูกภูมิคุ้มกันในหนู rat ด้วยสารคัดหลั่งจากการเลี้ยงพยาธิตัวเต็มวัยในสารละลาย RPMI จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western immunoblotting พบว่าสามารถจับกับโปรตีนที่ได้จากสารคัดหลั่งจำนวน 5 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 140, 52, 37, 17 และ 12 kDa และจับกับโปรตีนที่สกัดจากตัวพยาธิได้ 19 แถบ คือที่ 128, 123, 120, 112, 102, 99, 89, 83, 81, 78, 68, 57, 54, 52, 43, 37, 29, 17 และ 12 kDa ตามลำดับ เมื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปตรวจหาบริเวณที่พบสารคัดหลั่งในเนื้อเยื่อของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี immunoperoxidase staining พบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนของสารคัดหลั่งโดยพบตะกอนสีเข้มในเนื้อเยื่อค้ำจุน ท่อระบบขับถ่าย อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และพบตะกอนสีปานกลางในผนังลำไส้และในเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกาย แต่ไม่พบตะกอนสีในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ

คำสำคัญ: พยาธิใบไม้ตับอ่อน สารคัดหลั่ง โพลีโคลนอลแอนติบอดี

Production and Characterization of Polyclonal Antibodies against Excretory-Secretory Products from *Eurytrema pancreaticum*

Arduol Meepool* and Kamonchanok Ngamsom

ABSTRACT

Polyclonal antibodies against excretory-secretory products (ES-products) of *Eurytrema pancreaticum* were obtained after immunization of rat with Es-products prepared from adult parasites were cultured in RPMI solution. The antibody was determined by Western immunoblotting method and showed specificity to 5 bands protein of ES-products with molecular weight 140, 52, 37, 17 and 12 kDa and 19 bands of the whole body (WB) extracted proteins with 128, 123, 120, 112, 102, 99, 89, 83, 81, 78, 68, 57, 54, 52, 43, 37, 29, 17 and 12 kDa respectively. Specificity of antibody was also shown by immunoperoxidase staining method with tissue of adult parasites *E. pancreaticum*. The immunostaining showed strong immunoreactive staining at the parenchyma, the excretory bladder and its branches, male reproductive organs, female reproductive organs and intermediate immunoreactive staining in caecal epithelium and the tegument tissue but no staining in the muscular tissue.

Keywords: *Eurytrema pancreaticum*, excretory-secretory antigen, polyclonal antibody

บทนำ

โรคพยาธิใบไม้ในตับอ่อน (Eurytremiasis) เกิดจากการติดเชื้อพยาธิ *Eurytrema pancreaticum* (Class: Trematoda, Family: Dicrocoeliidae) ซึ่งเป็นโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาให้กับอุตสาหกรรมสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย และในภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโคและกระบือ ในประเทศเกาหลีได้มีการสำรวจอูจาระของสัตว์ที่เป็น definitive hosts ของพยาธิชนิดต่างๆ จำนวน 13,685 ตัว พบว่าสัตว์มีการติดเชื้อ *E. pancreaticum* สูงถึงร้อยละ 29.7 ของสัตว์ทั้งหมด และเมื่อแยกวิเคราะห์สัตว์แต่ละชนิดพบว่าโค กระบือ (cattle) มีการติดเชื้อสูงที่สุดคือร้อยละ 99.0 รองลงมาคือ แกะร้อยละ 86.4 สุกรร้อยละ 85.4 สุนัขร้อยละ 35.4 และแมวร้อยละ 15.1 ซึ่งส่วนมากการติดเชื้อเป็นแบบ single infection ร้อยละ 60 [1] นอกจากนี้โรคพยาธิใบไม้ในตับอ่อนจะเกิดในสัตว์แล้วยังมีการเกิดโรคนี้ในคนด้วยเช่นกัน มีรายงานผู้ป่วยจากประเทศบราซิล จีน เกาหลี และประเทศญี่ปุ่น โดยการสำรวจในประเทศญี่ปุ่นพบว่ามีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร เนื่องจากมีพยาธิ *E. pancreaticum* อดตันท่อของตับอ่อน [2] ถึงแม้ว่าในประเทศไทยยังไม่มีกรรวบรวมสถิติการติดเชื้อของพยาธิชนิดนี้ แต่จากการสำรวจตับอ่อนของวัวที่ถูกฆ่าในโรงฆ่าสัตว์พบว่าการติดเชื้อค่อนข้างสูง

เมื่อพยาธิเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์จะมีการผลิตสารและคัดหลั่งเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ เรียกว่า Excretory-secretory (ES) materials ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาพัฒนาวัคซีน หรือตัวชี้วัดการติดเชื้อพยาธิจากโปรตีนใน ES materials ของพยาธิชนิดต่างๆ เช่น *Schistosoma* spp., *Fasciola* spp. โปรตีนที่สำคัญคือ cathepsin L protease (Cat L), glutathione S transferase (GST) [3], paramyosin [4], fatty acid binding protein [5], leucine aminopeptidase [6] และ tegumental antigens [7, 8] ซึ่งโปรตีนต่างๆ เหล่านี้ให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิแต่ละชนิดแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนต่างๆ เหล่านี้ผลิตจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันในพยาธิแต่ละชนิด การนำโปรตีนเหล่านี้มาเป็นวัคซีนก็อาจจะทำให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อได้ ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับสารคัดหลั่งของพยาธิ *E. pancreaticum* ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาจำนวน คุณสมบัติ และแหล่งที่พบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของสารคัดหลั่งของพยาธิ *E. pancreaticum* โดยผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของโปรตีนแต่ละชนิดในการใช้เป็นตัวชี้วัดหรือใช้เป็นตัวชี้วัดในการวินิจฉัยการติดเชื้อของพยาธิต่อไป

วิธีการทดลอง

การเตรียมพยาธิ *E. pancreaticum*

พยาธิ *E. pancreaticum* ตัวเต็มวัยที่ยังมีชีวิตเก็บจากท่อตับอ่อนของโคที่ถูกฆ่าจากโรงฆ่าสัตว์ แล้วนำพยาธิที่ได้มาล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออก จากนั้นแบ่งพยาธิออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 นำพยาธิตัวเต็มวัยมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพื่อใช้ในการเตรียม whole body extracted protein (WB-extracted protein) กลุ่มที่ 2 นำพยาธิที่มีชีวิตมาเลี้ยงในสารละลาย RPMI เพื่อเตรียม excretory-secretory products (ES-products)

กลุ่มที่ 3 นำพยาธิมารักษาสภาพใน 4% paraformaldehyde และ 0.5% glutaraldehyde ใน PBS (0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับ immunoperoxidase staining

การเตรียม WB-extracted protein

นำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว มาบดละเอียดใน homogenized buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM ethylenediaminetetra acetic acid) แล้วนำไปแยกโปรตีนด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บสารละลายส่วนบนไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) และเก็บรักษาโปรตีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม ES-products

นำพยาธิตัวเต็มวัยที่ยังมีชีวิตมาเลี้ยงในสารละลาย RPMI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายส่วนบนไปทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จากนั้นละลายตะกอนในน้ำกลั่นในปริมาณ 1 ใน 10 ของสารละลายเริ่มต้น แล้วนำไป dialysis ที่ molecular weight cut off ที่ 8 kDa ใน PBS ปั่นตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลายอีกครั้งที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับ WB-extracted protein เก็บรักษาโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody)

นำ ES-products 100 µg ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 จากนั้นนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังของหนู Wistar rat (วันที่ 0) ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หนูอีก 2 ครั้งในวันที่ 14 และวันที่ 28 ด้วย ES-product 100 µg ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 เก็บเลือดจากหางหนูในวันที่ 0, 10, 24 และ 35 ใสในหลอดทดลองขนาดเล็กปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกเม็ดเลือดที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดเซรัมและเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจหา titer ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วย indirect ELISA

นำ WB-extracted protein ที่ละลายใน coating buffer (3.18% sodium carbonate, 5.86% sodium hydrogen carbonate pH 9.6) ปริมาตร 50 µl/well มาเคลือบผิว

ของ polystyrene microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย washing solution (10 mM PBS pH 7.2) 3 ครั้ง แล้ว block non-specific binding ของแอนติบอดีด้วยนมพร่องมันเนย 5% (5% skimmed milk ใน 10 mM PBS pH 7.2, 0.05% Tween 20) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำปฏิกิริยากับเซรัมของหนูก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในนมพร่องมันเนย 1% ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำปฏิกิริยากับ HRP-goat anti-rat IgG ที่ละลายในนมพร่องมันเนย 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง และเติม TMB substrate แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 16.5% sulfuric acid นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

การวิเคราะห์โปรตีนของพยาธิด้วยวิธี SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamine gel electrophoresis)

นำ 35 µg WB-extracted protein และ 1 µg ES-products ที่เตรียมจากพยาธิตัวเต็มวัย ผสมกับ 6X sample buffer (350 mM HCl, 10% sodium dodecyl sulphate, 30% glycerol, 9.3% dithiothreitol (DTT), 0.012% bromophenol blue) และต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแยกแถบโปรตีนใน 12.5% SDS-PAGE โดยผ่านไฟฟ้าคงที่ 25 mA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น gel ไปย้อมสี silver staining เพื่อศึกษาแถบโปรตีนต่างๆ

การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western immunoblotting

นำแผ่น gel ที่ผ่านการแยกโดย SDS-PAGE มาย้ายโปรตีนไปยังแผ่น nitrocellulose ด้วยเครื่อง semidry blotting (Biometra, Fastblot B34) โดยผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ 0.8-1.0 mA/cm² ของพื้นที่ gel เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่น nitrocellulose ที่ได้มาแช่ในนมพร่องมันเนย 5% ใน TBS-T (10 mM Tris buffer saline pH 7.4, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดี จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับเซรัมของหนูก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในนมพร่องมันเนย 1% ใน TBS-T เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยนมพร่องมันเนย 1% ใน TBS-T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วทำปฏิกิริยากับ HRP-goat anti-rat IgG ในนมพร่องมันเนย 1% ใน TBS-T เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเติม DAB substrate (Zymed Laboratories Inc.) และปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกด้วยโปรแกรม Genetools (Syngene)

การตรวจหาบริเวณที่พบ ES-products ด้วยวิธี immunoperoxidase staining

นำพยาธิกลุ่มที่ 3 ไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วย 70%, 80%, 90%, 95% และ

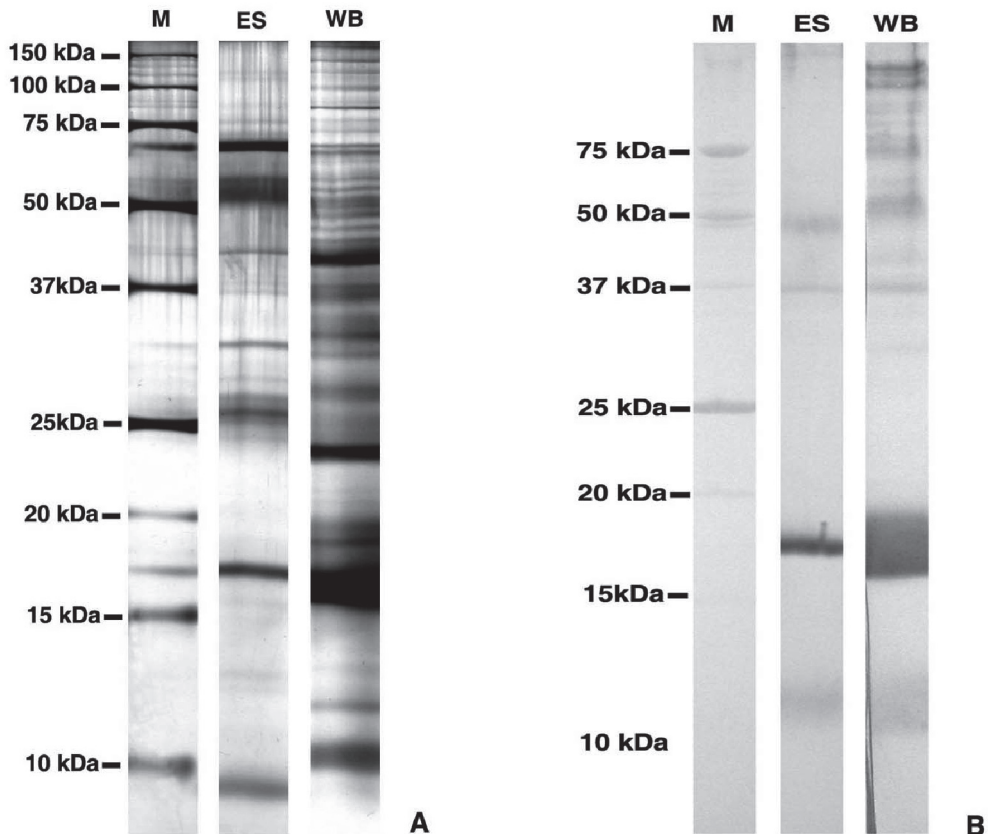
100% ethyl alcohol ขึ้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที จากนั้นแช่พยาธิลงใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที และแช่ในสารผสมระหว่าง paraffin ต่อ xylene ในอัตราส่วน 1: 1 และ pure paraffin 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที และสุดท้ายฝังใน pure paraffin จากนั้นนำ block ที่ได้มาตัดด้วยเครื่อง microtome (Accu-Cut, SRM) ให้มีความหนา 5-7 ไมครอน และยึดติดแผ่น slide โดยการอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ slide มาละลายพาราฟินด้วย xylene 2 ครั้ง และเติมน้ำกลั่นเข้าเนื้อเยื่อโดยการแช่ใน ethyl alcohol จาก 100% จนถึงน้ำกลั่น จากนั้นทำลาย endogenous peroxidase โดยการแช่ใน 3% H₂O₂ ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำ slide มาทำ antigen retrieving โดยการต้มใน citrate buffer (10 mM citrate buffer pH 6.0) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ทำการป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีด้วยสารละลาย 0.1% glycine ใน PBS เป็นเวลา 30 นาที 4% bovine serum albumin ใน PBS เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยากับเซรุ่มหนูก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันผสมกับ 1% BSA ใน PBS-T (0.1 M PBS, 0.05% Tween 20) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ต่อจากนั้นทำปฏิกิริยากับ HRP-goat anti-rat IgG ที่ผสมกับ 1% BSA ใน PBS-T อัตราส่วน 1: 200 เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเติม AEC single solution chromogen (Zymed[®] Laboratories Inc.) และปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย Mayer's hematoxylin 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา 15 นาที จากนั้นปิดด้วย cover glass โดยใช้ buffer glycerol เป็นตัวกลาง แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, BX51)

ผลการทดลอง

จากการนำ ES-products และ WB-extracted protein ของพยาธิ *E. pancreaticum* ตัวเต็มวัยมาแยกแถบโปรตีนตามมวลโมเลกุลด้วย 12.5% SDS-PAGE (รูปที่ 1A) จากนั้นนำไปนับจำนวนและคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนเทียบกับ standard marker ด้วยโปรแกรม GeneTools (SynGene Laboratories) พบว่า ES-products มีแถบโปรตีนจำนวน 21 แถบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 120, 112, 89, 78, 68, 57, 54, 52, 43, 37, 36, 33, 29, 27, 26, 25, 24, 17, 13, 12 และ 9 kDa ในขณะที่ WB-extracted protein พบแถบโปรตีนจำนวน 37 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 165, 140, 120, 112, 99, 89, 86, 78, 73, 68, 63, 57, 54, 52, 50, 48, 46, 43, 41, 38, 37, 36, 34, 32, 29, 27, 26, 25, 24, 22, 21, 19, 18, 17, 13, 12 และ 10 kDa ซึ่งแถบโปรตีนใน ES-products ส่วนใหญ่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับแถบโปรตีนใน WB-extracted protein ยกเว้นแถบโปรตีนที่ 9 kDa ไม่พบใน WB-extracted protein (ตารางที่ 1)

จากการนำเซรุ่มหนู rat ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย ES-products ของพยาธิ *E. pancreaticum* ตัวเต็มวัยมาตรวจหา titer ของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า เซรุ่มหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันครั้งแรก และเซรุ่มหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 1 และ 2 มีค่า titer ของ

แอนติบอดีเท่ากับ 1: 200, 1: 12,800 และ 1: 25,600 ตามลำดับ และเมื่อนำ ES-products และ WB-extracted protein ของพยาธิ *E. pancreaticum* ตัวเต็มวัยมาวิเคราะห์ด้วย Western immunoblotting โดยใช้เซรุ่มหนูที่ผ่านการกระตุ้นครั้งที่ 2 พบว่า ES-products มีแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 5 แถบ (รูปที่ 1B) ที่น้ำหนักโมเลกุล 140, 52, 37, 17 และ 12 kDa และ WB-extracted protein มีแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 19 แถบ ที่ 128, 123, 120, 112, 102, 99, 89, 83, 81, 78, 68, 57, 54, 52, 43, 37, 29, 17 และ 12 kDa โดยมีแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกตรงกันจำนวน 4 แถบ คือ 52, 37, 17 และ 12 kDa นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนใน WB-extracted protein ที่ให้ผลบวกแต่ไม่พบแถบโปรตีนในการย้อมด้วย silver staining จำนวน 5 แถบ คือ 128, 123, 102, 83 และ 81 kDa (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 A) แสดงแถบโปรตีนจาก ES-products (ES) และ WB-extracted protein (WB) ของ *E. pancreaticum* จาก 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วยเทคนิค silver staining และ B) การทำ Western immunoblotting โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ES-products ของพยาธิ *E. pancreaticum*, M = standard molecular weight marker

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนจาก ES-products (ES) และ WB-extracted protein (WB) ที่ผ่านการแยกขนาดด้วย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วยเทคนิค silver staining และ Western immunoblotting โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ES-products ของพยาธิ *E. pancreaticum*

Silver staining		Western immunoblotting	
ES	WB	ES	WB
	165		
	140	140	
			128
			123
120	120		120
112	112		112
			102
	99		99
89	89		89
	86		
			83
			81
78	78		78
	73		
68	68		68
	63		
57	57		57
54	54		54
52	52	52	52
	50		
	48		
	46		

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Silver staining		Western immunoblotting	
43	43		43
	41		
	38		
37	37	37	37
36	36		
	34		
33	32		
29	29		29
27	27		
26	26		
25	25		
24	24		
	22		
	21		
	19		
	18		
17	17	17	17
13	13		
12	12	12	12
	10		
9			

จากการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ES-products ของพยาธิ *E. pancreaticum* ตัวเต็มวัยตรวจหาตำแหน่งที่พบ ES-products ในเนื้อเยื่อพยาธิตัวเต็มวัยพบว่า เซลล์หรืออวัยวะที่ให้ตะกอนสีซึ่งเป็นผลบวกของปฏิกิริยาเข้มที่สุดคือ เซลล์ค้ำจุน (parenchymal cell) (รูปที่ 2, 3, 4) ท่อระบบขับถ่าย (excretory bladder) (รูปที่ 2B, 3A, 3F, 4A) อวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive organs) เพศผู้ ได้แก่ อัณฑะ (testis) และ seminal vesicle (รูปที่ 2B, 3A-D) และเพศเมีย ได้แก่ vitelline gland รังไข่ (ovary) มดลูก (uterus) Mehlis' gland และ seminal receptacle (รูปที่ 2B, 2D, 4A-F) ในขณะที่ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) (รูปที่ 2B, 3A, 3E) และเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกาย (tegument) (รูปที่ 2B-D, 3A, 4A, 4C) พบตะกอนสีปานกลาง และไม่พบตะกอนสีที่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (muscular tissue)

เนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายทำหน้าที่ปกคลุมผิวหนังด้านนอกของตัวพยาธิซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (syncytial layer) และชั้นใน (tegumental cell layer) ที่อยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อ โดยมีแขนงของเซลล์ (cytoplasmic processes) เชื่อมเนื้อเยื่อทั้งสองชั้นเข้าด้วยกัน [9] จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงพบตะกอนสีกระจายตัวอยู่ทั้งภายในไซโตพลาซึมและในเมมเบรนรวมทั้งรอบๆ หนาม (spine) ของเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายชั้นนอก และในไซโตพลาซึมของเซลล์เนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายชั้นใน (รูปที่ 2C-D)

ท่อทางเดินอาหารของพยาธิ *E. pancreaticum* แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นประกอบด้วย oral sucker, pharynx และ esophagus ซึ่งบุด้วย tegumental-type epithelium และลำไส้ (caecum) เป็นส่วนที่ต่อมาจาก esophagus มี 2 แขนง ผนังของลำไส้บุด้วยเยื่อบุผิวชั้นเดียวหรือ caecal type epithelium จากการย้อมด้วย immunostaining ไม่พบตะกอนสีในท่อทางเดินอาหารส่วนต้น สำหรับในลำไส้พบตะกอนที่มีความเข้มปานกลางที่เซลล์บุผิวลำไส้ (caecal epithelial cells) โดยมีความเข้มที่ cytoplasmic lamellae ที่ยื่นเข้าไปภายในช่องว่างของลำไส้ และบริเวณส่วนฐานของเซลล์ที่ติดกับ basement membrane และแขนงของเซลล์ค้ำจุน ในขณะที่บริเวณไซโตพลาซึมให้ผลลบ (รูปที่ 3E)

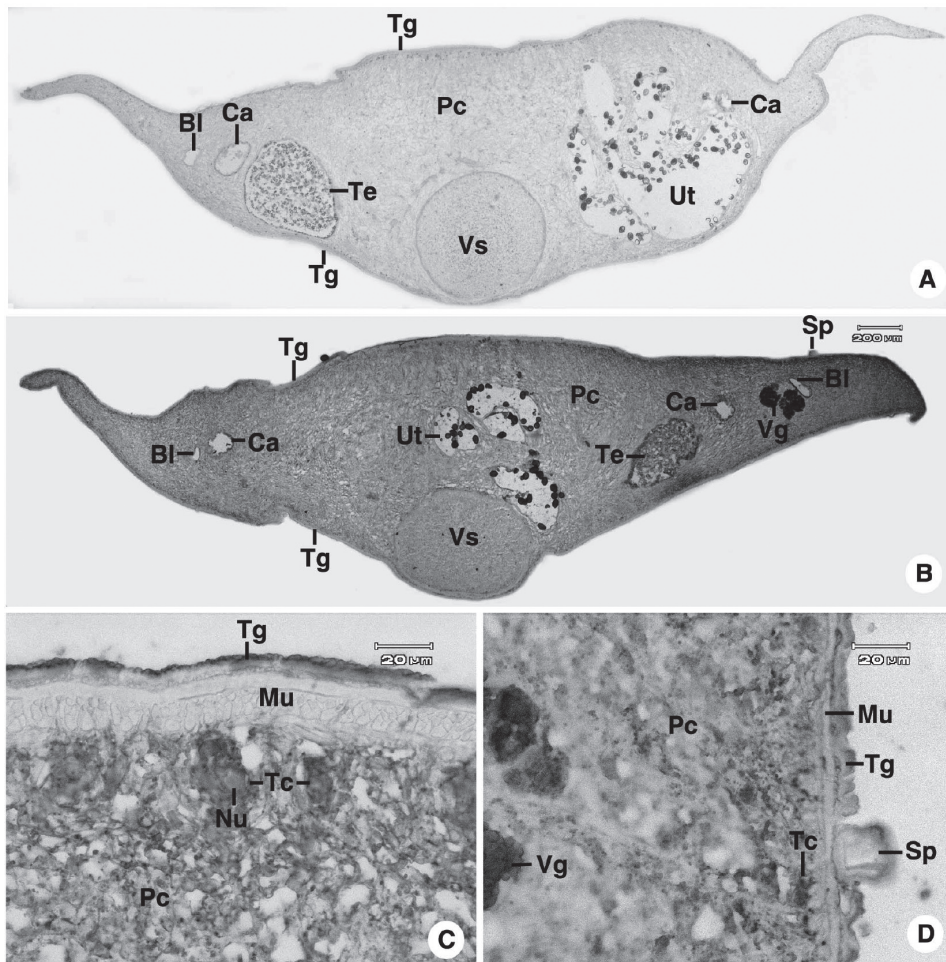
ท่อระบบขับถ่ายเป็นระบบท่อที่มีการแตกแขนงจำนวนมากแทรกตัวอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อค้ำจุนและทั้งหมดจะรวมตัวกันไปเปิดออกนอกร่างกายที่ส่วนท้ายของลำตัวพยาธิ จากการย้อมด้วย immunoperoxidase technique พบตะกอนสีกระจายตัวอย่างหนาแน่นในไซโตพลาซึมของเยื่อบุผิวของท่อระบบขับถ่ายทั้งส่วนที่เป็นท่อหลักซึ่งมีขนาดใหญ่ และแขนงที่มีขนาดเล็ก (รูปที่ 3F)

เนื้อเยื่อค้ำจุนเป็นเนื้อเยื่อที่แทรกตัวอยู่ภายในตัวพยาธิและทำหน้าที่ในการยึดและเชื่อมโยงอวัยวะต่างๆ จากการศึกษาค้นพบตะกอนสีจำนวนมากกระจายในไซโตพลาซึมของเซลล์ค้ำจุนทั่วทั้งร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ที่อยู่ชิดกับลำไส้ ท่อระบบขับถ่าย และเนื้อเยื่อปกคลุมมีความเข้มมากที่สุด (รูปที่ 2B-D, 3A-F, 4A-F)

พยาธิชนิดนี้เป็น hermaphrodite ซึ่งมีอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งสองเพศในตัวเดียวกัน ซึ่งอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่ให้ผลบวกของปฏิกิริยา คือ อัณฑะ seminal vesicle และเซลล์อสุจิ (spermatozoa) (รูปที่ 2B, 3A-B) โดยในอัณฑะพบที่เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมของ epithelial cells, spermatogonia, spermatocyte, spermatid และเซลล์อสุจิ (รูปที่ 3C-D)

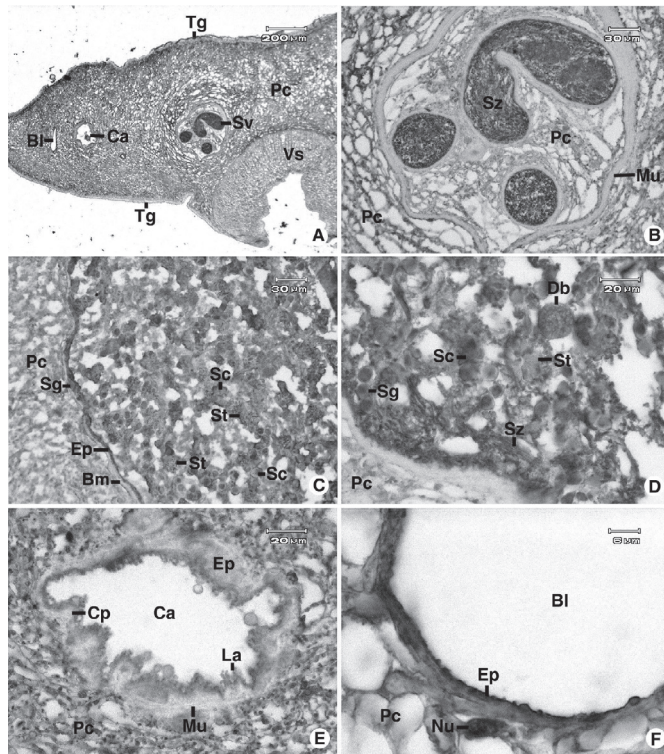
และใน seminal vesicle พบตะกอนไนโซโตพลาซึมของเซลล์เยื่อของ seminal vesicle และเซลล์อสุจิที่บรรจุอยู่ภายใน (รูปที่ 3A-B)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียพบตะกอนสีอยู่ในรังไข่ Mehlis' gland-ootype complex มดลูก (รูปที่ 4C-E) และ vitelline gland (รูปที่ 2B, 2D, 4A-B) โดยในรังไข่พบตะกอนไนโซโตพลาซึมโดยเฉพาะบริเวณชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ของ oogonia เข้มที่สุด developing oocyte มีความเข้มปานกลาง และ mature oocyte เข้มน้อยที่สุด (รูปที่ 4E) สำหรับ Mehlis' gland-ootype complex พบตะกอนไนโซโตพลาซึมและแขนงของ Mehlis' gland cell (รูปที่ 4F) ส่วนมดลูกนั้นพบตะกอนไนโซโตพลาซึมของเซลล์เยื่อรวมทั้งส่วนที่อยู่ภายใน (รูปที่ 4F) และภายนอก (รูปที่ 2B, 4A) Mehlis' gland ตลอดจนเปลือกไข่และสิ่งคัดหลั่งที่อยู่ภายในท่อของมดลูก (รูปที่ 2B, 4A) และใน vitelline gland พบตะกอนไนโซโตพลาซึมของ intermediate vitelline cell และ mature vitelline cell โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ eggshell globules (รูปที่ 4A-B) ในขณะที่ immature vitelline cell ไม่พบตะกอนสี



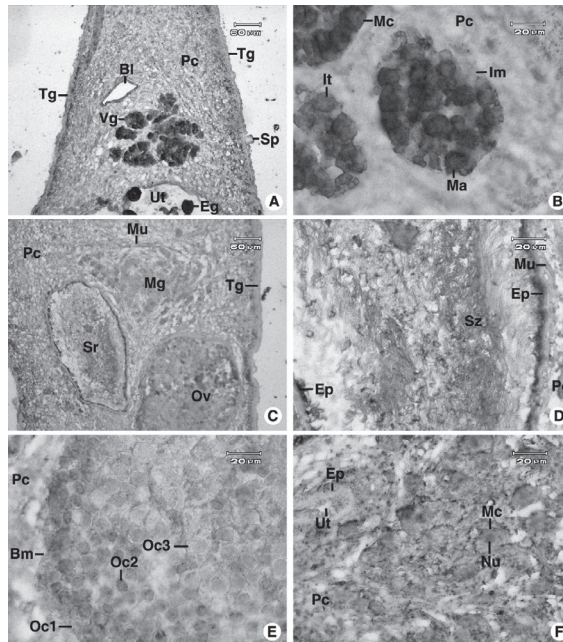
รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อพยาธิ *E. pancreaticum* ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase staining

- A) ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิตัดผ่านอวัยวะ และ ventral sucker (Vs) โดยใช้เซรุ่มของก่อนการปลูกภูมิคุ้มกันซึ่งไม่พบการสะสมตะกอนสีในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพยาธิ เช่น เซลล์ค้ำจุน (Pc), ท่อระบบขับถ่าย (Bl), ลำไส้ (Ca), อวัยวะ (Te), มดลูก (Ut) และเนื้อเยื่อปกคลุม (Tg)
- B) ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์ของพยาธิตัดผ่านอวัยวะ และ ventral sucker (Vs) โดยใช้เซรุ่มของหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกัน แสดงการสะสมตะกอนสีในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพยาธิ ได้แก่ เซลล์ค้ำจุน (Pc), ท่อระบบขับถ่าย (Bl), ลำไส้ (Ca), อวัยวะ (Te), มดลูก (Ut), vitelline gland (Vg) และเนื้อเยื่อปกคลุม (Tg)
- C, D) ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์สูงบริเวณเนื้อเยื่อปกคลุมด้านหลัง (C) และด้านหน้า (D) แสดงการสะสมตะกอนสีในผิวหนังส่วนนอกและบริเวณรอบๆ หนาม (Sp) ของชั้นนอกของเนื้อเยื่อปกคลุม (Tg), ไซโตพลาซึมของเซลล์เนื้อเยื่อปกคลุม (Tc) และ เซลล์ค้ำจุน (Pc) และผลลบบของปฏิกิริยาในกล้ามเนื้อ (Mu)



รูปที่ 3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อพยาธิ *E. pancreaticum* ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase staining

- A) ภาพกำลังขยายต่ำตัดผ่านบริเวณ seminal vesicle (Sv) และ ventral sucker (Vs) แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc) ทั้งภายนอกและแทรกอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อของ ventral sucker, ท่อระบบขับถ่าย (Bl), ลำไส้ (Ca), seminal vesicle และเนื้อเยื่อปกคลุม (Tg)
- B) ภาพขยายบริเวณ seminal vesicle แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์อสุจิที่สะสมอยู่ใน seminal vesicle ที่มีกล้ามเนื้อ (Mu) หนาล้อมรอบ และเซลล์ค้ำจุน (Pc) ทั้งภายในและภายนอก seminal vesicle
- C, D) ภาพกำลังขยายปานกลาง (C) และสูง (D) บริเวณอวัยวะของพยาธิ แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc), spermatogonia (Sg) และเซลล์เยื่อ (Ep) ที่อยู่ติด basement membrane (Bm) ของอวัยวะ และ spermatocyte (Sc), spermatid (St), เซลล์อสุจิ (Sz) และ deciduas body (Db) ที่อยู่ภายในอวัยวะ
- E) ภาพกำลังขยายสูงบริเวณลำไส้ (Ca) ของพยาธิ แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc) ที่อยู่ด้านนอกลำไส้ และที่ cytoplasmic lamellae (La) ของเซลล์เยื่อลำไส้ (Ep) ในขณะที่ไซโทพลาซึมและแขนงเซลล์ (Cp) ของเซลล์เยื่อ และกล้ามเนื้อ (Mu) ให้ผลลบของปฏิกิริยา
- F) ภาพกำลังขยายสูงบริเวณท่อระบบขับถ่ายของพยาธิ แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์เยื่อ (Ep) ของท่อระบบขับถ่าย และเซลล์ค้ำจุน (Pc) ที่ล้อมอยู่ด้านนอก, Nu = นิวเคลียส



รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อพยาธิ *E. pancreaticum* ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase staining

- A, B) ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และสูง (B) บริเวณ vitelline gland ของพยาธิ แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc), ท่อระบบขับถ่าย (Bl), มดลูก (Ut), ไข่ (Eg) ภายในมดลูก เนื้อเยื่อปกคลุม (Tg) และ vitelline gland (Vg) ซึ่งเมื่อเพิ่มกำลังขยายพบว่าตะกอนสีเข้มมากใน mature vitelline cells (Ma) ปานกลางใน intermediate vitelline cells (It) และให้ผลลบใน immature vitelline cells (Im)
- C) ภาพกำลังขยายปานกลางบริเวณ Mehlis' gland ของพยาธิ แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc), Mehlis' gland (Mg), seminal receptacle (Sr), รังไข่ (Ov) และ เนื้อเยื่อปกคลุม (Tg) แต่ไม่พบตะกอนสีในกล้ามเนื้อ (Mu)
- D) ภาพขยายบริเวณ seminal receptacle แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc), epithelial cells (Ep) ของ seminal receptacle และเซลล์อสุจิ (Sz) ที่สะสมอยู่ภายใน ในขณะที่กล้ามเนื้อ (Mu) ที่หุ้มด้านนอกให้ผลลบ
- E) ภาพขยายบริเวณรังไข่ แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc), เซลล์ oögonia (Oc1) ที่อยู่ติดกับ basement membrane (Bm) ให้ผลบวกเข้มที่สุด เซลล์ developing oocyte (Oc2) ให้ผลบวกปานกลาง และ mature oocyte (Oc3) ให้ผลบวกจางที่สุด
- F) ภาพขยายบริเวณ Mehlis' gland แสดงการสะสมตะกอนสีในเซลล์ค้ำจุน (Pc) ที่แทรกตัวอยู่ระหว่าง Mehlis' gland cells (Mc) ที่ให้ผลบวกปานกลาง และเซลล์เยื่อบุผิว (Ep) ของมดลูก (Ut) ให้ผลบวกเล็กน้อย; Nu = นิวเคลียส

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการใช้เซรุ่มของหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันตรวจหาแถบโปรตีนจาก ES-products และ WB-extracted protein พบว่ามีแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 5 และ 19 แถบตามลำดับ ในจำนวนนี้มีโปรตีนเพียง 4 แถบ (52, 37, 17 และ 12 kDa) ที่ให้ผลบวกตรงกันในโปรตีนจาก ES-products และ WB-extracted protein ซึ่งโปรตีนทั้ง 4 แถบนี้อาจจะเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่ผลิตได้ และพบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกจำนวน 1 แถบ (140 kDa) จาก ES-products แต่ให้ผลลบใน WB-extracted protein ในขณะที่พบแถบโปรตีนนี้ใน WB-extracted protein ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่ 140 kDa ใน ES-products และ WB-extracted protein เป็นโปรตีนต่างชนิดกัน นอกจากนี้ยังพบโปรตีนจำนวน 9 แถบ (120, 112, 89, 78, 68, 57, 54, 43 และ 29 kDa) ที่พบใน ES-products และให้ผลบวกกับโปรตีนจาก WB-extracted protein แต่ให้ผลลบใน ES-products และแถบโปรตีน จำนวน 6 แถบ (128, 123, 102, 99, 83 และ 81 kDa) จาก WB-extracted protein ที่ให้ผลบวกแต่ไม่พบแถบโปรตีนเหล่านั้นใน ES-products ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนั้นเกิดปฏิกิริยาข้ามโปรตีนเนื่องจากแอนติบอดีมีการจับกับโปรตีนเหล่านี้แบบไม่จำเพาะ เช่น การมี epitope ร่วมกับโปรตีนอื่น ประกอบกับ ES-products นั้นอาจมีสาร glycoprotein ปะปนอยู่และไม่มีสารละลาย carbohydrate ก่อนนำไปปลูกภูมิคุ้มกันซึ่งอาจมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ carbohydrate epitope อยู่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแถบโปรตีนที่ไม่พบใน ES-products เหล่านี้ได้ ในทางกลับกันพบว่ามีแถบโปรตีนจำนวน 8 แถบที่พบใน ES-products (36, 33, 27, 26, 25, 24, 13, และ 9 kDa) แต่ไม่สามารถตรวจได้โดยวิธี Western immunoblotting ใน ES-product และ WB-extracted protein ด้วยเซรุ่มหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีนเหล่านี้มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำ หรือมีการสร้างและคัดหลั่งออกมาในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีนใน ES-products ทั้งหมด ทำให้ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเหล่านี้มีปริมาณต่ำและไม่สามารถใช้ในการตรวจหาแถบโปรตีนเหล่านี้ได้ด้วยวิธีการที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่พบว่ามีโปรตีนจำนวน 14 แถบจาก WB-extracted protein ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเซรุ่มของวัวที่ติดเชื้อพยาธิตามธรรมชาติ ในจำนวนนี้มี 11 แถบที่พบใน tegument-extracted protein (TE-protein) และแถบโปรตีนเหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 17 ถึง 97 kDa ซึ่งมีความเข้มมากที่น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 47-66 kDa และพบเพียง 7 แถบใน ES-products และแถบโปรตีนที่มีความเข้มมากอยู่ระหว่าง 26 และ 27 kDa [10]

จากการใช้เซรุ่มของหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจหาตำแหน่งที่พบ ES-products ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ นั้น พบว่ามีตะกอนสีส้มแดงของปฏิกิริยาระหว่าง HRP และ substrate กระจายในเนื้อเยื่อปกคลุมซึ่งเป็นโครงสร้างที่สัมผัสโดยตรงกับสิ่งแวดล้อมภายนอกตัวพยาธิซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพยาธิ *F. gigantica* [10] และจากการศึกษา TE-protein ในพยาธิ *F. gigantica* พบว่าเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa พบได้ทั้งพยาธิตัวอ่อนและตัวเต็มวัยโดยพบกระจายตัวอยู่ในชั้นในและชั้นนอกของเยื่อปกคลุมร่างกายของพยาธิ [11] ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 kDa นั้นพบใน tegumental membrane ของพยาธิตัวเต็มวัย [12] และจากการศึกษาในพยาธิ

F. hepatica พบว่า tegumental antigen encoding gene มีการกระจายตัวในเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกาย มดลูก และผนังลำไส้ [7] นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ Catepsin L (Cat L) ในเนื้อเยื่อปกคลุมร่างกายของพยาธิ *S. mansoni* [13] และ Catepsin B (Cat B) ใน tegumental tubercle ของพยาธิ *S. mansoni* [14] และยังพบการกระจายตัวของ paramyosin ในของพยาธิ Schistosomes [15, 16] และ *Echinococcus granulosus* [17]

ลำไส้เป็นอีกอวัยวะหนึ่งที่มีการคัดหลั่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหาร และสามารถตรวจได้จากเซรุ่มของหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกัน เช่นเดียวกับลำไส้ของพยาธิ *F. gigantica* [10] และแอนติเจนที่สำคัญที่ผลิตจากลำไส้ คือ Cat L ซึ่งพบการกระจายอย่างหนาแน่นในเยื่ออุ้งลำไส้ของพยาธิทุกระยะ [18, 19], Cat B ในพยาธิ *F. hepatica* พบการกระจายใน secretory vesicle ภายในเยื่ออุ้งทางเดินอาหารของพยาธิทุกระยะของการเจริญเติบโต [20-22]

ระบบขับถ่ายเป็นระบบที่ทำหน้าที่ขับถ่ายของเสียจากกระบวนการ metabolism เช่น แอมโมเนีย ยูเรีย กรดอะมิโน และไขมัน จากอวัยวะต่างๆ และเซลล์ค้ำจุนรวมทั้งการดูดกลับสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต [23] แต่จากการตรวจสอบเอกสารต่างๆ ไม่พบโปรตีนที่จำเพาะกับท่อระบบขับถ่าย ดังนั้นการพบผลบวกในเยื่ออุ้งของท่อระบบขับถ่ายของพยาธิชนิดนี้นั้นสารต่างๆ ที่พบจากท่อระบบขับถ่ายอาจเป็นสารคัดหลั่งที่ลำเลียงมาจากอวัยวะอื่นๆ หรือเป็นสารที่สามารถพบได้ในเซลล์ทั่วไปของร่างกาย เช่น fatty acid binding protein (FABP) [5] และ glutathione S transferase (GST) ใน *F. gigantica* ซึ่งพบมากในเซลล์ค้ำจุนแต่ก็สามารถพบได้ในเซลล์เยื่ออุ้งของท่อระบบขับถ่าย

อวัยวะสืบพันธุ์ของพยาธิชนิดนี้เป็นแหล่งผลิต ES-products ที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง เนื่องจากพยาธิที่นำมาทำการศึกษาเป็นพยาธิตัวเต็มวัย แต่การศึกษาสารคัดหลั่งจากระบบสืบพันธุ์ของพยาธิชนิดอื่นยังมีค่อนข้างน้อย ซึ่งส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกไข่ ซึ่งสร้างมาจาก vitelline gland จากการศึกษาในพยาธิ *F. hepatica* พบว่าประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด คือ vitelline protein A, B และ C ซึ่ง vitelline protein B เป็น eggshell precursor protein หลัก และมีน้ำหนักโมเลกุล 31 kDa [24] vitelline protein C มีน้ำหนักโมเลกุล 16-17 kDa [25] และ vitelline protein A มีน้ำหนักโมเลกุล 70 kDa นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเอนไซม์ Cat L ใน Mehlis' gland cell และ uterine epithelium และ GST ใน uterine epithelium ของพยาธิ *F. gigantica* ด้วย [26]

เนื้อเยื่อค้ำจุนเป็นส่วนที่ให้ผลบวกของปฏิกิริยาเข็มที่ดูดทั้งๆ ที่ไม่มีส่วนเชื่อมต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอกเลย จึงเป็นไปได้ว่าเนื้อเยื่อค้ำจุนมีการคัดหลั่งสารผ่านอวัยวะอื่นๆ หรือเซลล์ค้ำจุนมีการสร้างและสะสมสารชนิดเดียวกันกับที่คัดหลั่งจากอวัยวะอื่นๆ เช่น GST ในพยาธิ *S. mansoni* และ *F. gigantica* [3, 27] และ FABP ในพยาธิ *F. gigantica* [5] และ Cat B ในพยาธิ *S. mansoni* [14]

อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้พบแถบโปรตีนจำนวน 4 แถบ (52, 37, 17 และ 12 kDa) ที่พบใน ES-products และสามารถตรวจสอบด้วยเซรุ่มของหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันจาก ES-products และ WB-extracted protein และเป็นแถบที่มีปริมาณโปรตีนสูงและให้ผลบวกเข็มมาก

กว่าแถบโปรตีนอื่นๆ ซึ่งแถบโปรตีนเหล่านี้น่าจะเป็นแอนติเจนหลักของพยาธิชนิดนี้ และน่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่งเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์และนำไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำไปตรวจหาแหล่งผลิตและทดสอบศักยภาพในการใช้เป็นสารตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิหรือวัคซีนก็จะเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์และปศุสัตว์ของไทยได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2549

เอกสารอ้างอิง

1. Min, H. K. 1981. An Epidemiological Study on Zoonoses in Korea. *Korean Journal of Parasitology* 19: 60-75.
2. Ishii, Y., Koga, M., Fujino, T., Hiigo, H., Ishibashi, J., Oka, K. and Saito, S. 1983. Human Infection with the Pancreas Fluke, *Eurytrema pancreaticum*. *American Journal of Tropical Medicine* 32: 1019-1022.
3. Khawsuk, W., Soonklang, N. and Grams, R. 2002. Production and Characterization of a Monoclonal Antibody against Recombinant Glutathione S-Transferase (GST) of *Fasciola gigantica*. *Asian Pacific Journal of Allergy* 20: 257-266.
4. Estuningsih, S. E., Smooker, P. M., Wiedosari, E., Widjajanti, S., Vaiano, S., Partoutomo, S. and Spithill, T. W. 1997. Evaluation of Antigens of *Fasciola gigantica* as Vaccines against Tropical Fasciolosis in Cattle. *International Journal for Parasitology* 27(11): 1419-28.
5. Sirisriro, A., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Ardseungneon, P., Pankao, V., Meepool, A., Chaithirayanon, K., Viyanant, V., Tan-Ariya, P., Upatham, E. S. and Sobhon, P. 2002. Production and Characterization of a Monoclonal Antibody against Recombinant Fatty Acid Binding Protein of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* 105: 119-129.
6. Hillyer, G. V. 2005. *Fasciola* Antigens as Vaccines against Fascioliasis and Schistosomiasis. *Journal of Helminthology* 79(3): 241-7.
7. Trudgett, A., McNair, A. T., Hoey, E. M., Keegan, P. S., Dolton, J. P., Rima, B. M., Miller, A. and Ramsamy, P. 2000. The Major Tegumental Antigen of *Fasciola hepatica* Contains Repeated Elements. *Parasitology* 121: 185-91.

8. Viyanant, V., Krailas, D., Sobhon, P., Upatham, E. S., Kusamran, T., Chompoochan, T., Thammsart, S. and Prasittirat, P. 1997. Diagnosis of Cattle Fasciolosis by the Detection of a Circulating Antigen Using a Monoclonal Antibody. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 15: 153-9.
9. อาดุลย์ มีพูล อัครพล อุดคำมี และชวลีพร เฟ็งจันทร์. 2549. เนื้อเยื่อวิทยาของผิวหนังของวัวแพะชนิดไม่ดัดแปลง *Eurytrema pancreaticum* ตัวเต็มวัย. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 11: 32-38
10. Sobhon, P., Anantavara, S., Dangprasert, T., Meepool, A., Wanichanon, C., Viyanant, V., Upatham, S., Kusanran, T. Chompoochan, T., Thammasart, S. and Prasittirat, P. 1996. *Fasciola gigantica*: Identification of Adult Antigens, Their Tissue Sources and Possible Origins. *Journal of the Science Society of Thailand* 22: 143-162.
11. Chaithirayanon, K., Wanichanon, C., Vichasri-Grams, S., Ardseungneom, P., Grams, R., Viyanant, V., Upatham, E. S. and Sobhon, P. 2002. Production and Characterization of a Monoclonal Antibody against 28.5 kDa Tegument Antigen of *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica* 1: 1-8.
12. Krailas, D., Viyanant, V., Ardseungnoen, P., Sobhon, P., Upatham, E. S. and Keawjam, R. 1999. Identification of Circulating Antibodies in Fasciolosis and Localization of 66 kDa Antigenic Target Using Monoclonal Antibodies. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 17(1): 53-8.
13. Michel, A., Ghoneim, H., Resto, M., Klinkert, M. Q. and Kunz, W. 1995. Sequence, Characterization and Localization of a Cysteine Proteinase Cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73: 7-18.
14. Lipps, G., Fllkrug, R. and Beck, E. 1996. Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*. Purification and Activation of the Recombinant Proenzyme Secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 1717-25.
15. Nara, T., Matsumoto, N., Janecharut, T., Matsuda, H., Yamamoto, K., Irimura, T., Nakamura, K., Aikawa, M., Oswald, I., Sher, A, Kita, K. and Kojima, S. 1994. Demonstration of the Target Molecule of a Protective IgE Antibody in Secretory Glands of *Schistosoma japonicum* Larvae. *International Immunology* 6: 963-71.
16. Pearce, P. S., Saunders, M. A., Creighton, D. E. and Sauve, R. S. 1988. Hearing and Verbal-Cognitive Abilities in High-Risk Preterm Infants Prone to Otitis Media with Effusion. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 9: 346-351

17. Muhlschlegel, F., Sygulla, L., Frosch, P., Massetti, P. and Frosch, M. 1993. Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA Sequence and Characterization of a Tegumental Antigen. *Parasitology Research* 79: 660-666.
18. Sriburee, S. 2000. Characterization of Epithelium Cells and the Expression of Cathepsin L Gene in the Digestive Tract of *Fasciola gigantiga*. M.Sc. Thesis, Mahidol University.
19. Dowd, A. J., Smith, A. M., McGonigle, S. and Dalton, J. P. 1994. Purification and Characterisation of a Second Cathepsin L Proteinase Secreted by the Parasitic Trematode *Fasciola hepatica*. *European Journal of Biochemistry* 223: 91-98.
20. Heussler, V. T. and Dobbela, D. A. 1994. Cloning of a Protease Gene Family of *Fasciola hepatica* by the Polymerase Chain Reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64(1): 11-23.
21. Wilson, R. A. and Coulson, P. S. 1998. Why Don't We Have a Schistosomiasis Vaccine? *Parasitology Today* 4(3): 97-99.
22. Creaney, J., Wilson, L., Dosen, M., Sandeman, R. M., Spithill, T. W. and Parsons, J. C. 1996. *Fasciola hepatica*: Irradiation-Induced Alterations in Carbohydrate and Cathepsin-B Protease Expression in Newly Excysted Juvenile Liver Fluke. *Experimental Parasitology* 83: 202-215.
23. Threadgold, L. T. 1968. Electron Microscope Studies of *Fasciola hepatica*. VI. The Ultrastructural Localization of Phosphatases. *Experimental Parasitology* 23: 264-276.
24. Waite, J. H. and Rice-Ficht, A. C. 1987. Presclerotized Eggshell Protein from the Liver Fluke *Fasciola hepatica*. *Biochemistry* 26: 7819-7825.
25. Waite, J. H. and Rice-Ficht, A. C. 1989. A Histidine-Rich Protein from the Vitellaria of the Liver Fluke *Fasciola hepatica*. *Biochemistry* 28: 6104-6110.
26. Meepool, A. 2004. Structural Organization of the Female Reproductive Organs in Relationship to the Formation of the Egg and Eggshell and Identification and Characterization of the Eggshell Protein Encoding Gene in *Fasciola gigantiga*. Master's Thesis. Department of Anatomy, Mahidol University.
27. Taylor, W. L. and Dixon, J. E. 1978. Characterization of Pyro-Glutamate Aminopeptidase from Rat Serum that Degrades Thyrotropin-Releasing Hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 253: 693-40.