

การศึกษานี้เป็นการตรวจวัดหาแอนติเจนของพยาธิ *Angiostrongylus cantonensis* ในน้ำไขสันหลังจากผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิกที่คาดว่ามีความเสี่ยงจากพยาธิ *A. cantonensis* (eosinophilic meningitis associated angiostrongyliasis) โดยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ immunoblotting

ในการศึกษานี้ได้ใช้ rabbit hyperimmune serum (RHIS) ซึ่งเตรียมจากกระต่ายที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดสารสกัดของพยาธิ *A. cantonensis* ระยะตัวเต็มวัยไม่สมบูรณ์เพศเมีย เป็นช่วงระยะเวลาห่างกันจำนวน 4 ครั้ง และทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยแอนติเจนของพยาธิ *A. cantonensis* ชนิดเต็มวัยได้ RHIS ที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของพยาธิ *A. cantonensis* ระดับไตเตอร์เท่ากับ 1:78,125 เมื่อทดสอบด้วยวิธี ELISA และแอนติบอดีใน RHIS จะทำปฏิกิริยากับแถบโพลีเปปไทด์ของแอนติเจนพยาธิ ปอดหนู *A. cantonensis* ตั้งแต่น้ำหนักโมเลกุล 18.5 ถึงมากกว่า 94 กิโลดาลตัน อย่างน้อย 16 แถบเมื่อทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting RHIS ที่ได้จะใช้เป็นแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดหาแอนติเจนของพยาธิ *A. cantonensis* ในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิก ตัวอย่างน้ำไขสันหลังทั้งหมดจะนำมาทำการแยกแถบโปรตีนแอนติเจน โดยใช้ 7-15% gradient gel โดยวิธี SDS-PAGE และทำการย้ายแถบโปรตีนสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาทำปฏิกิริยากับ RHIS ที่เจือจาง 1:50 ด้วย 1% skimmed milk ใน 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.4 ที่มีส่วนผสมของ 0.01% Tween-20 (PBST) ให้ทำปฏิกิริยากับ goat anti-rabbit IgG peroxidase ที่เจือจาง 1:1,000 ด้วย 1% skimmed milk ใน PBST ติดตามผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีด้วยการเติม diaminobenzidine ที่มี hydrogen peroxide เมื่อทำการทดสอบน้ำไขสันหลังผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิกที่คาดว่ามีความเสี่ยงจากพยาธิ *A. cantonensis* จำนวน 32 ราย น้ำไขสันหลังผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิกที่คาดว่ามีความเสี่ยงจากพยาธิตัวจัด จำนวน 1 ราย น้ำไขสันหลังผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่มีสาเหตุมาจากโรคอื่นๆ แต่ไม่ใช่จากพยาธิปอดหนู ประกอบด้วย ผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ร่วมกับการติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) จำนวน 5 ราย ผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จำนวน 4 ราย ผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบปลอดเชื้อ จำนวน 3 ราย ผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อซิฟิลิส จำนวน 3 ราย ผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่คาดว่ามีความเสี่ยงจากเชื้อวัณโรค จำนวน 2 ราย ผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 1 ราย ผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมกับมีสมองบวม น้ำ จำนวน 1 ราย ผู้ป่วยที่มีภาวะ retrobulbar optic neuritis จำนวน 1 ราย และผู้ป่วยที่ติดเชื้อราเรื้อรัง จำนวน 1 ราย รวมทั้งหมด 21 ราย

และศึกษาในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายเยื่อหุ้มสมอง-อักเสบแต่น้ำไขสันหลังมีลักษณะปกติ (normal CSF profile) จำนวน 15 ราย ผลการตรวจวัดแถบปฏิกิริยาแอนติเจนในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิกเมื่อทำปฏิกิริยากับ RHIS ได้แถบปฏิกิริยาอย่างน้อย 12 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 14 ถึงมากกว่า 94 กิโลดาลตัน โดยมีเพียงแถบปฏิกิริยาเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน ที่ส่วนใหญ่พบในน้ำไขสันหลังผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิกที่คาดว่ามีความเสี่ยงจากพยาธิ *A. cantonensis* (23 ใน 32 ราย) คิดเป็นร้อยละ 71.87 มีเพียง 1 รายของน้ำไขสันหลังผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ให้ผลบวกกับแถบปฏิกิริยาที่น้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน สำหรับน้ำไขสันหลังผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่มีสาเหตุจากโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่จากพยาธิ *A. cantonensis* และน้ำไขสันหลังผู้ป่วยที่มีอาการคล้ายเยื่อหุ้มสมองอักเสบ แต่มิใช่จากพยาธิ *A. cantonensis* และน้ำไขสันหลังมีลักษณะปกติ รวมทั้งน้ำไขสันหลังผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิกทุกราย พบให้แถบปฏิกิริยาที่น้ำหนักโมเลกุล 56 และ 22.5 กิโลดาลตัน คิดเป็นร้อยละ 100 จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน เป็นแอนติเจนส่วนใหญ่ที่พบเฉพาะในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิก โดยให้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าความถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 71.87, 97.3, 95.83, 80.0 และ 85.51 ตามลำดับ

จากการศึกษาในครั้งนี้คาดว่าแถบปฏิกิริยาที่น้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน ที่ตรวจวัดได้ในน้ำไขสันหลังน่าจะมีคุณค่าเพียงพอที่จะใช้ในการวินิจฉัยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอีโอสิโนฟิลิกที่มีสาเหตุจากพยาธิ *A. cantonensis* และเป็นการตรวจหาแอนติเจนที่จะบอกถึงการติดเชื้อในปัจจุบันของผู้ป่วยได้ดีกว่าการตรวจหาแอนติบอดี

This study detected the *Angiostrongylus cantonensis* antigen in cerebrospinal fluid (CSF) from eosinophilic meningitis associated angiostrongyliasis patients using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting.

This assay used rabbit hyperimmune serum (RHIS) prepared from rabbit four-time interval immunization and one booster with crude somatic young adult female *A. cantonensis* antigen. The RHIS gave the ELISA antibody titer of 1:78,125 against homologous antigen and revealed at least 16 antigenic component of *A. cantonensis* somatic extract with approximate molecular weight of 18.5 to more than 94 kDa by SDS-PAGE and immunoblotting. This RHIS was used as the antibody capture for detection *A. cantonensis* antigen in CSF. The CSF samples were separately characterized by 7–15% gradient SDS-PAGE and followed elector-transfer to nitrocellulose membrane. The blots were probed with 1:50 RHIS diluted in 1% skimmed milk in 0.1 M phosphate buffered saline pH 7.4 containing 0.01% Tween-20 (PBST) and followed incubation with 1:1,000 goat anti-rabbit IgG linked peroxidase in 1% skimmed milk in PBST. For visualization of the antigen-antibody reaction, hydrogen peroxide and diaminobenzidine were used as substrate and chromogen. The CSF from 32 patients with eosinophilic meningitis associated angiostrongyliasis, 1 of suspected cerebral gnathostomiasis and 22 non-eosinophilic meningitis (5 of HIV infection with cryptococcal meningitis, 4 of cryptococcal meningitis, 3 of aseptic meningitis, 3 of neurosyphilis, 2 of suspected tuberculous meningitis, 1 of bacterial meningitis, 1 of hydrocephalus, 1 of retrobulbar optic neuritis and 1 of alcoholic dependent patients) as well as 15 normal CSF profile patients were separately tested. The CSF from eosinophilic meningitis associated angiostrongyliasis reacted with the RHIS at least 12 major bands with the molecular weights scattering from less than 14 to more than 94 kDa. One antigenic component at approximate molecular weight of 75 kDa was found to give consistent reaction in 23 of 32 (71.87%) CSF from eosinophilic meningitis associated angiostrongyliasis patient. Only one CSF sample from patient with cryptococcal meningitis gave the reaction with this 75 kDa antigenic band. The antigenic bands of 56 and 22.5 kDa found to give reaction (100%) with the other CSF samples (non-eosinophilic meningitis and normal CSF profile cases) and eosinophilic meningitis associated angiostrongyliasis and associated cerebral gnathostomiasis samples. The sensitivity, specificity, positive predictive and negative predictive values and accuracy for the detection of the 75 kDa band were 71.87, 97.3, 95.83, 80.0 and 85.51%, respectively.

The present finding suggests that the detection of 75 kDa *A. cantonensis* antigen in the CSF might serve as a reliable marker for the diagnosis of eosinophilic meningitis associated angiostrongyliasis.