

APPLICATION OF ISO-ELECTRIC FOCUSING *BITHYNIA* SNAIL ANTIGEN
FOR ELISA IgG-SUBCLASS DETECTION OF HUMAN OPISTHORCHIASIS

WALLOP PAKDEE 4937698 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PARON DEKUMYOY, Ph. D., JITRA WAIKAGUL, Ph.D,
THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D.

ABSTRACT

A diagnosis of opisthorchiasis may be confirmed by the characteristic eggs and worms in feces or other clinical specimens, and genetic materials. However, misdiagnosis using these techniques may occur in light infections, and where the eggs are morphologically similar to those of other parasite species. A finding of immune mediators can help to confirm the type of infection. Therefore, this study used indirect ELISA to detect total IgG and IgG subclasses with partially purified *Bithynia siamensis goniomphalos* antigens, which were prepared by liquid-phase iso-electric focusing using Rotofor cells. Twenty isoelectric focusing fractions of snail antigens were first analyzed for a potential antigenic candidate, using OD-ELISA ratio comparison. The selection of iso-fractionated antigen (Iso-FAg) for ELISA was based on a high OD-ELISA ratio between pool-positive and pool-negative. Iso-F antigens 7, 6, 2, and 10 gave high OD-ratios to total IgG, IgG1, 2, 3, and 4, respectively. A full-scale ELISA was then conducted with serum samples from 50 opisthorchiasis cases, 196 other parasitic-disease cases, and 35 healthy controls. Only Iso-FAg 7 to IgG1 showed the best potential antigen for detecting opisthorchiasis, with 98% sensitivity and 89.17% specificity at cut-off point 0.221. Total IgG detection showed lower sensitivity (96.00%) and specificity (51.94%) at cut-off 0.498. However, low cross-reactivity to IgG1 was found for gnathostomiasis (2/12), trichinellosis (1/10), Bancroftian filariasis (1/10), enterobiasis (1/10), neurocysticercosis (3/10), taeniasis (2/10), echinococcosis (1/10), sparganosis (2/3), paragonimiasis heterotremus (3/10), schistosomiasis (2/10), fascioliasis (2/4), and haplorchiasis (3/10). It is summarized that Iso-FAg7 to IgG1 is a good candidate antigen to antibody against *O. viverrini* but not for cross-reactivity. Based on these results, Iso-FAg7 to IgG1 can be re-analyzed by cross-reactive sera encountering opisthorchiasis antibody, by comparing antigen-antibody banding; then, only antigens reactive to opisthorchiasis will be selected and then electroeluted from a polyacrylamide gel as an eluted antigen. Another method to provide an antigen, Iso-F antigen candidates can be selected by reacting all fractionated antigens with opisthorchiasis antibody, indicating no, or lesser, reaction with healthy controls; the selected antigens may be pooled to create a cocktail antigen.

KEY WORDS: *BITHYNIA SIAMENSIS GONIOMPHALOS* ANTIGENS/LIQUID-PHASE ISO-ELECTRIC FOCUSING/ OPISTHORCHIASIS/ IgG1-4-ELISA

114 pages

การใช้แอนติเจนจากหอย *Bithynia* ที่เตรียมด้วยวิธี Iso-electric focusing เพื่อตรวจหา IgG-subclass ของโรคพยาธิใบไม้ตับในคนโดยวิธี ELISA

APPLICATION OF ISO-ELECTRIC FOCUSING *BITHYNIA* SNAIL ANTIGEN FOR ELISA
IgG-SUBCLASS DETECTION OF HUMAN OPISTHORCHIASIS

วัลลภ กักดี 4937698 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: พารณ คีคำข้อย Ph.D., จิตรา ไวกกุล Ph.D., ธารีรัตน์ ทะลัมพะเหติ, Ph.D.

บทคัดย่อ

การวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับอาจได้รับการยืนยันจากการดูลักษณะของไข่และตัวพยาธิในอุจจาระหรือสิ่งส่งตรวจอื่นและยังอาจใช้ตัวอย่างทางพันธุกรรมก็ได้ อย่างไรก็ตามความผิดพลาดในการวินิจฉัยอาจเกิดขึ้นจากการติดเชื้อเพียงเล็กน้อยและรูปร่างของไข่ที่คล้ายกับไข่พยาธิใบไม้ชนิดอื่น ส่วนการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโรคก็สามารถนำมาช่วยได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้วิธี indirect ELISA เพื่อตรวจหา total IgG และ IgG subclass โดยใช้แอนติเจนจากหอย *Bithynia siamensis goniomphalos* ที่เตรียมโดยวิธี liquid-phase isoelectric focusing ด้วยเครื่อง Rotofor cells และแอนติเจน (Iso-FAg) ทั้งยี่สิบชนิดได้นำมาวิเคราะห์เพื่อหาแอนติเจนทางเลือกโดยการหาค่าสูงสุดของ OD-ELISA ratio ระหว่างซีรัมโรคพยาธิใบไม้ตับและคนปกติพบว่า Iso-FAg 7, 7, 6, 2, และ 10 ที่มีผลต่อการตรวจหา total IgG, IgG 1, IgG 2, IgG 3, และ IgG 4, ตามลำดับสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยซีรัมโรคพยาธิใบไม้ตับ (50 ราย) โรคอื่น ๆ (196) คนปกติ (35) จากการทดสอบ Iso-FAg 7 ต่อ IgG1 ให้ผลดีที่สุดด้วยค่า 98% sensitivity และ 89.17% specificity ส่วนการหา total IgG ผลจะต่ำกว่าทั้ง sensitivity (96%) และ specificity (54.11%) แต่ปฏิกิริยาข้ามต่อ IgG1 นั้นพบว่าโรคพยาธิตัวจิ๊ด (2/12) โรคทริชีเนลโลซิส (1/10) โรคเท้าช้าง (1/10) โรคพยาธิเข็มหมุด (1/10) โรคพยาธิเม็ดสาธุหนู (3/10) โรคพยาธิตัวตืด (2/10) โรคเอดโคโนคอกโคซิส (1/10) โรคพยาธิคืดปลา (2/3) โรคพยาธิใบไม้ปอด (3/10) โรคพยาธิใบไม้ในเลือด (2/10) โรคพยาธิฟาสซิโอล่า (2/4) และโรคพยาธิใบไม้ในลำไส้ (3/10) สรุปได้ว่า Iso-FAg 7 ต่อ IgG1 นั้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจจับแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับได้แต่จากปฏิกิริยาข้ามนี้คิดว่า Iso-FAg 7 น่าจะนำมาวิเคราะห์ใหม่เพื่อดึงเอาแอนติเจนจำเพาะต่อการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ