

ชื่อวิทยานิพนธ์ การจำแนกชนิดแอนติเจนที่จำเพาะของหนอนพยาธิตัวจิ๋ว(*Gnathostoma spinigerum*) โดยวิธี Two dimensional gel electrophoresis และ Western blot analysis

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นายโกศล เอี่ยมวิถีนิช

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. วันชัย มาลีวงษ์)
.....กรรมการ
(ผศ. ชัยศิริ วงศ์คำ)

บทคัดย่อ

โรคพยาธิตัวจิ๋วในคน (Human gnathostomiasis) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อพยาธิตัวกลม *Gnathostoma spinigerum* ซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย การวินิจฉัยโรคเป็นเพียงการสันนิษฐานจากอาการทางคลินิก , จากประวัติการบริโภคอาหารพวกเนื้อที่ปรุงไม่สุกของผู้ป่วยและการตรวจทางห้องปฏิบัติการบางอย่างที่ไม่จำเพาะ การได้ตัวพยาธิจากผู้ป่วยเป็นวิธีเดียวที่จะสามารถบอกได้ว่า ผู้ป่วยเป็นโรคพยาธิตัวจิ๋วหรือไม่ ดังนั้นจึงได้มีการพยายามพัฒนาวิธีตรวจทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยาเพื่อช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๋ว แต่ความไวและความจำเพาะของการตรวจทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยาในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะนั้น ขึ้นกับความบริสุทธิ์และความจำเพาะของแอนติเจนที่ใช้ สำหรับแอนติเจนที่ได้จากตัวพยาธิตัวจิ๋วและสารขับถ่าย มีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อน และมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะต่างๆของพยาธิที่อยู่ในโฮสต์ จึงสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามได้กับซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิชนิดอื่นๆได้ แต่อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดของแอนติเจนของพยาธิตัวจิ๋วโดยวิธี two dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) และ western blotting technique ยังไม่มี

รายงาน การศึกษาครั้งนี้เพื่อจำแนกชนิดของแอนติเจนของพยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum* ในการหาส่วนของแอนติเจนที่มีศักยภาพและความจำเพาะสูง เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน

ผลการศึกษาจากการจำแนกชนิดแอนติเจนของตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด โดยวิธี 2D-PAGE พบว่า แอนติเจนของพยาธิมีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อน ประกอบด้วยแถบหรือจุดโปรตีน (polypeptides) มากกว่า 75 ชนิด ซึ่งมีแถบหรือจุดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20-30 kD อย่างน้อย 12 ชนิด และมีประมาณ 5 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 23-25 kD โดยมีค่า pI ประมาณ 5.2, 5.7, 6.4, 6.9 และ 8.3 ตามลำดับ และเมื่อย้ายโปรตีนแอนติเจนจาก 2D-PAGE gel ลงสู่แผ่น nitrocellulose แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด จำนวน 6 ราย โดยวิธี western blotting พบว่าเกิดปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนแอนติเจนหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 30-43 kD และค่า pI ระหว่าง 4.65-6.5 เหมือนกันทุกราย และที่น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 20-30 kD พบว่ามีแถบหรือจุดโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมแต่ละรายแตกต่างกัน อยู่ระหว่าง 3-16 ชนิด มีค่า pI ระหว่าง 4.65-9.0 และมีเพียง 5 ราย (83.3%) ของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ดที่ทำปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 23-25 kD และมีค่า pI ระหว่าง 8.3-8.5 และเมื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกคล้ายติดเชื้อพยาธิตัวจิ๊ด 5 ราย พบว่ามีเพียง 4 ราย (80%) ที่ทำปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ระหว่าง 23-25 kD และมีค่า pI ระหว่าง 8.3-8.5 และไม่พบการเกิดปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนแอนติเจนดังกล่าวข้างต้น เมื่อทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง, โรคพยาธิคืดหมู และซีรัมรวมของคนปกติ

สำหรับแอนติเจนที่สกัดจากตัวแก่เพศผู้และเพศเมียของพยาธิตัวจิ๊ด เมื่อนำมาจำแนกโดยวิธี 2D-PAGE และ weatern blot analysis กับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด, ผู้ป่วยโรคพยาธิหอยโข่ง, ผู้ป่วยโรคคืดหมู และซีรัมรวมของคนปกติ ไม่พบว่าเกิดปฏิกิริยากับแถบหรือจุดโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 23-25 kD และค่า pI ระหว่าง 8.3-8.5

จากผลการศึกษาข้างต้นอาจกล่าวได้ว่า แอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้านหน้าของพยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 23-25 kD และมีค่า pI ระหว่าง 8.3-8.5 อาจนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน ทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยาได้

THESIS TITLE : CHARACTERIZATION OF *Gnathostoma spinigerum* SPECIFIC
ANTIGEN BY TWO DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS
AND WESTERN BLOT ANALYSIS

AUTHOR : MR. KOSOL IEAMVITEEVANICH

THESIS ADVISORY COMMITTEE :

.....*Wanchai Maleewong*.....Chairman

(Associate Professor Dr. Wanchai Maleewong)

.....*Chaisiri Wongkham*.....Member

(Assistant Professor Chaisiri Wongkham)

ABSTRACT

Human gnathostomiasis caused by the round worm *Gnathostoma spinigerum* is an endemic disease in Thailand and many Asian countries. The diagnosis is usually presumptive on the basis of clinical features, the history of consuming raw or half cooked meat and nonspecific laboratory findings. Definitive diagnosis can only be made by recovery of the worm from the patients body which is hardly ever accomplished. Thus the immunological test has been used in an attempt to develop a specific immunodiagnosis method for human gnathostomiasis. It is generally accepted that the specificity and sensitivity of the immunodiagnostic procedures aimed at detecting specific antibodies depend on purity and specificity of the antigens and the kind of the serological test used. Worm and their products are antigenically complex and also exist in different development stages with the host, thus, expressing a degree of cross-reactivity with other parasitosis sera. However, its antigenic profile demonstrated by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and westernblotting technique has not been described.

This study is aimed at characterization of *G. spinigerum* somatic extract antigens by the method above in order to find its value in diagnosis of human gnathostomiasis.

By the 2D-PAGE, the *G. spinigerum* third stage larval extract was highly complex and consisting of more than 75 polypeptides. It was also revealed that the polypeptide patterns with apparent molecular mass ranging from 20 to 30 kD was at least 12 spots and ranging from 23 to 25 kD was at least 5 spots with pI were 5.2, 5.7, 6.4, 6.9 and 8.3, respectively. Western blot analysis of the larval antigen after reaction with each of 6 proven gnathostomiasis sera revealed the similar patterns of immunodominant antigen at molecular mass ranging from 30 to 40 kD with pI between 4.65 to 6.5. The low molecular mass components ranging from 20 to 30 kD revealed that the antigenic spots reacted with the individual proven gnathostomiasis sera, varied from 3 to 16 spots with pI from 4.65 to 9.6. Only 5 proven gnathostomiasis sera (83.3%) showed the reacted spots at molecular mass ranging from 23 to 25 kD with pI from 8.3 to 8.5. These antigenic spots also reacted in 4 of 5 presumptive gnathostomiasis patient sera. None of these patterns were visualized by immunoblotting with angiostrongyliasis, cysticercosis and pooled normal sera.

Crude somatic extract from *G. spinigerum* adults male and female were also characterized by 2D-PAGE and western blot analysis with each of sera from proven gnathostomiasis patients, cysticercosis, angiostrongyliasis and pooled normal sera. It was found that these sera did not produce detectable spots at the molecular mass ranging from 23 to 25 kD with pI from 8.3 to 8.5.

The present findings suggest that the somatic antigen from *G. spinigerum* advanced third stage larvae at approximate molecular mass ranging from 23 to 25 kD with pI from 8.3 to 8.5 might be used for diagnosis of human gnathostomiasis.