

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพยาธิตัวจิ๊ด (gnathostomiasis) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อหนอนพยาธิ ใน Genus *Gnathostoma* ซึ่งมีอยู่ทั้งหมด 13 species ตามที่มีรายงานจากทั่วโลก (Daengsvang, 1980; Almeyda-Artigas, 1991) แต่ species ที่ทำให้เกิดโรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน (human gnathostomiasis) มีรายงานเพียง 5 species ได้แก่ *Gnathostoma spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* และ *G. binucleatum* (Daengsvang, 1980; Miyazaki, 1991; Almeyda-Artigas, 1991) แต่พยาธิตัวจิ๊ดที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย มีรายงานเพียงชนิดเดียวเท่านั้น คือ *G. spinigerum* (Daengsvang, 1981)

คนเป็นโรคพยาธิตัวจิ๊ดจากการกินอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ปรุงไม่สุก ซึ่งมีตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 3 ขั้นก้าวหน้า (advanced third stage larvac) ได้แก่พวกปลาน้ำจืด กบ และงู เป็นต้น ตัวอ่อนจะซ่อนไขไปตามส่วนต่างๆของร่างกายโดยไม่มีทิศทางที่แน่นอน ถ้าเคลื่อนที่อยู่ตามบริเวณใต้ผิวหนัง จะทำให้เกิดอาการบวมแดงเคลื่อนที่ ปวด เจ็บจี๊ดๆ หากพยาธิไชเข้าสู่อวัยวะที่สำคัญ เช่น สมอง อาจทำให้ถึงเสียชีวิตได้ (Chitanondh and Rosen, 1967; Punyagupta *et al.*, 1968; Boongrid *et al.*, 1977) พยาธิตัวจิ๊ดในระยะที่อยู่ในร่างกายคนไม่สามารถเจริญเป็นตัวแก่ที่สมบูรณ์ได้ จึงไม่มีการผสมพันธุ์และวางไข่ เป็นเหตุให้ไม่สามารถตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระของผู้ป่วยโรคพยาธิตัวจิ๊ด การตรวจวินิจฉัยจึงต้องอาศัยจากอาการทางคลินิก และ การได้ตัวพยาธิจากผู้ป่วยเป็นวิธีเดียวที่จะสามารถบอกได้ว่าผู้ป่วยเป็นโรคพยาธิตัวจิ๊ดหรือไม่ ดังนั้นทำให้การยืนยันการติดเชื้อหนอนพยาธิชนิดนี้ในผู้ป่วยมีน้อยมาก ทั้งๆที่มีผู้ป่วยจำนวนมากที่มีลักษณะอาการคล้ายกับการติดเชื้อหนอนพยาธิตัวจิ๊ด แต่แพทย์ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยยืนยันสาเหตุของอาการนั้นได้

การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้ช่วยยืนยันการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ด โดยเฉพาะการตรวจหาแอนติบอดีของ

ผู้ป่วยต่อแอนติเจนที่สกัดจากหนองพยาธิตัวจี๊ดทั้งตัว (crude somatic extract)

(Morishita *et al.*, 1969; Tada *et al.*, 1966; Suntharasamai *et al.*, 1985; Dhamrong-At *et al.*, 1986; Malcewong *et al.*, 1988) แต่การใช้แอนติเจนที่สกัดจากหนองพยาธิทั้งตัว มักจะเกิดปฏิกิริยาข้ามเกี่ยว (cross reaction) กับซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อหนองพยาธิชนิดอื่น ต่อมาในกลุ่มนักวิจัยได้จำแนกชนิดของแอนติเจนที่สกัดจากหนองพยาธิตัวจี๊ดทั้งตัว โดยวิธี one dimensional gel electrophoresis (1D-PAGE) โดยใช้ระบบรีคิวซิงค์ ของ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ western blot analysis พบว่าได้ชิ้นส่วนที่มีความจำเพาะ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วนำมาทำการทดสอบโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าผลการทดสอบแอนติเจนชนิดดังกล่าวนี้ให้ผลดีทั้งความไวและความจำเพาะสูง (Noparatana *et al.*, 1988; Noparatana *et al.*, 1991; Tapchisri *et al.*, 1991) แต่การสกัดแอนติเจนที่จำเพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kD และทำให้บริสุทธิ์ได้ปริมาณน้อยมาก (Noparatana *et al.*, 1991) การอาศัยเทคโนโลยี recombinant DNA เพื่อโคลนยีนที่จะผลิตแอนติเจนที่จำเพาะนี้ให้มีปริมาณมากพอสำหรับจะนำไปใช้งานนั้น น่าจะเป็นทางออกที่เหมาะสม แต่เนื่องจากการจำแนกชนิดแอนติเจนโดยวิธี 1D-PAGE และ western blot analysis ได้ข้อมูลเพียงน้ำหนักโมเลกุลของแอนติเจนที่จำเพาะ ซึ่งตรงที่น้ำหนักโมเลกุล 24 kD นี้ อาจมีโปรตีนหรือ polypeptides หลายชนิด ที่มีน้ำหนักเท่ากับหรือใกล้เคียง 24 kD แต่อาจมีความแตกต่างกันในคุณสมบัติอื่น เช่น มีค่า isoelectric point (pI) ต่างกัน

การศึกษาวិชาญครั้งนี้ ใช้เทคนิค two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และ western blot analysis ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความละเอียดมากขึ้น เพื่อหาและจำแนกชนิดของแอนติเจนที่จำเพาะของหนองพยาธิตัวจี๊ด โดยทำให้สามารถทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ของแอนติเจนที่จำเพาะ หลังจากนั้นจึงจะหาวิธีที่จะผลิตแอนติเจนดังกล่าว ให้มีปริมาณมาก และมีความจำเพาะ เพื่อนำมาทำการทดสอบและใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจี๊ดในคนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อหาชนิดแอนติเจนที่จำเพาะของหนองพยาธิตัวจี๊ด *G. spinigerum*

1.2.2 เพื่อศึกษาโครงสร้างบางประการของแอนติเจนที่จำเพาะของหนองพยาธิตัวจี๊ด

1.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาทดลองเพื่อ จำแนกชนิดและลักษณะโครงสร้างบางประการของแอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ด ทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา ซึ่งทำการวิจัยโดยเก็บตัวอย่างพยาธิตัวแก่จากกระเพาะอาหารสุนัข นำพยาธิตัวแก่ตัวเมียมาเลี้ยงเพื่อเก็บไข่และฟักไข่จนเป็นตัวอ่อน นำตัวอ่อนที่ได้มาเลี้ยง โดยให้ไรน้ำซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางกิน แล้วจึงป้อนไรน้ำให้หนูถีบจักรกิน เพื่อเก็บตัวอ่อนระยะที่ 3 ขึ้นก้นหน้า นำตัวอ่อนที่ได้มาบดทั้งตัวเพื่อเตรียมแอนติเจน แอนติเจนที่ได้นำมาศึกษาแยกชนิดโดยเทคนิค two dimensional gel electrophoresis และ western blot analysis โดยตอนแรกจะแยกแอนติเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค isoelectric focusing จากนั้นนำมาแยกครั้งที่ 2 ในแนวตั้งฉากกับแนวเดิมด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วย้ายแอนติเจนทั้งหมดลงบนแผ่น nitrocellulose ด้วยเทคนิค western blotting หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๊ด ซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่นๆ และซีรัมของคนปกติ ตรวจปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น โดยใช้เอ็นไซม์ (enzyme reacted immunoblots) ผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกัน วิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ คาดว่า จะได้ชนิดของแอนติเจนที่จำเพาะของพยาธิตัวจิ๊ด และไม่เกิดปฏิกิริยาคาบเกี่ยวกับแอนติเจนของหนอนพยาธิชนิดอื่น เมื่อนำมาตรวจทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อได้ทราบถึงชนิดและลักษณะโครงสร้างบางประการของแอนติเจนที่จำเพาะของหนอนพยาธิตัวจิ๊ด *G. spinigerum* อาจนำมาประยุกต์ใช้ดังนี้

1.4.1 นำไปสู่การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน ทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา ที่ให้ผลการตรวจที่มีความไวและความจำเพาะที่ดี

1.4.2 ใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการผลิต หรือเตรียมแอนติเจนให้มีความบริสุทธิ์ และมีความจำเพาะ