



การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของแอนติเจนที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา
ต่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*



โดย
นางสาวมะนาว แสงเฟื่อง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของแอนติเจนที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา
ต่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SPECIFIC ANTIGEN FOR
SERODIAGNOSIS OF *SCHISTOSOMA MEKONGI*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in Animal science

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การระบุและบ่งบอก
คุณลักษณะของแอนติเจนที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma
mekongi*” เสนอโดย นางสาวมะนาว แสงเฟื่อง เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปานใจ ธารทัศน์วงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิษณุภักดิ์
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรูญโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันท์ เชาว์เครือ)

...../...../.....

..... กรรมการ
(พันเอกหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีรานุช ตันคณิตเลิศ)

...../...../.....

..... กรรมการ กรรมการ
(อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิษณุภักดิ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรูญโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล)

...../...../.....

...../...../.....

54751203 : สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้เลือด / การตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา / แอนติเจน

মননননন ননননন : การระบุและบ่งบอกคุณลักษณะของแอนติเจนที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อ. น.สพ. ดร. นรินทร์ ปรีวีชัยภักดิ์ และ ผศ. ดร. จริญญาโรจน์ โชติวิวัฒนกุล. 95 หน้า.

โรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* เป็นโรคพยาธิในคนที่มีความสำคัญในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบการระบาดของพื้นที่ที่ติดกับแม่น้ำโขงของประเทศลาวและกัมพูชา โดยพยาธิชนิดนี้สามารถก่อโรคในสุนัขและสุกรด้วย การตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้มีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมโรค การศึกษาในครั้งนี้ต้องการหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค Western blot และระบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS) จากผลการศึกษาพบว่า มีแถบโปรตีน 2 แถบที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิ โดยน้ำหนักอยู่ที่ 22 และ 31 กิโลดาลตัน (kDa) ซึ่งแถบโปรตีนน้ำหนักที่ 31 กิโลดาลตัน มีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของหนูที่ติดเชื้อพยาธิดีที่สุด เมื่อนำมาศึกษาพบว่าแถบโปรตีนดังกล่าวมีความคล้ายกับโปรตีน Cathepsin B จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของโปรตีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ได้ขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,123 base pair (bp) และขนาดลำดับกรดอะมิโน 342 กรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุล 38.30 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีน recombinant rSmekCatB (rSmekCatB) ที่ติดด้วย hexahistidine ถูกผลิตภายใต้สภาวะระบบ *Escherichia coli* และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA agarose โดยโปรตีน rSmekCatB สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และไม่มีปฏิกิริยาค้ำกับแอนติเจนของพยาธิตัวอื่น จากการทดสอบด้วยเทคนิค Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect ELISA) พบว่าโปรตีน rSmekCatB ให้ค่าความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 91.67% และ 100% ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีน rSmekCatB มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1.....2.....

54751203 : MAJOR : ANIMAL SCIENCE

KEY WORD : *SCHISTOSOMA MEKONGI* / SERODIAGNOSIS / ANTIGEN

MANAW SANGFUANG : IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SPECIFIC ANTIGEN FOR SERODIAGNOSIS OF *SCHISTOSOMA MEKONGI*. THESIS ADVISORS : D.V.M. NARIN PREYAVICHYAPUGDEE, Ph.D. AND ASST. PROF. CHAROONROJ CHOTWIWATTHANAKUN, Ph.D. 95 pp.

Schistosoma mekongi is one of the most important human parasitic diseases in South-east Asia. The endemic area is especially reported along the Mekong River sub-region from Laos to Cambodia. This parasite is also infects in dogs and pigs as its alternative host species. Up to present, in the lack of reliable rapid diagnostic techniques makes this disease become difficult to control. In this study, we employed the screening of serological antigens of parasite using Western immunoblotting and identified our interested proteins using LC-MS/MS to obtain potential candidate protein for diagnostic tool development. This serological proteome assay yielded 2 immunoreactivity bands at molecular mass 31 and 22 kDa, respectively. The 31 kDa protein considered as the most interested protein from the screening assay was identified as cathepsin B and was further cloned for a full cDNA sequence. Full cDNA sequence of SmekCatB was consisted of 1,123 bp and its longest reading frame encoded for 342 amino acids with some putative post translation modifications. Full sequence of SmekCatB with hexahistidine at C-terminus was recombinantly expressed in *Escherichia coli* and purified by Ni-NTA agarose resin under denaturing conditions. rSmekCatB showed its positive reactivity with sera of infected mice whereas no cross reactivity with other parasite antigens. Indirect ELISA was developed using rSmekCatB as antigens. The ELISA results revealed sensitivities of 91.67 % for schistosomiasis mekongi with rSmekCatB, whereas the assays showed a specificity of 100% with rSmekCatB. Our data suggested that SmekCatB was identified as one of serological parasitic antigens and had a high efficacy for the diagnosis of *S. mekongi* infection.

Program of Animal Science

Graduate School, Silpakorn University

Student's signature

Academic Year 2015

Thesis Advisors's signature 1. 2.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากอาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. นรินทร์ ปรียวิชญภักดิ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรุงโรจน์ โชติวิวัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้วิจัย รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันท์ เซาว์เครือ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ พันเอกหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีรานุช ตันคณิตเลิศ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และ ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ส่งผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของท่านเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรทุกท่านที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำและประสบการณ์อันมีค่าแก่ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าของหนังสือ วารสาร เอกสาร และวิทยานิพนธ์ทุกเล่ม ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรทุกคนที่ให้คำแนะนำและกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ นางสาวนิตา สันติมานะวงศ์ และพี่ ๆ ทุกคน ห้อง K458 หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ ส่งผลให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณแม่ น้องสาว และน้องชาย ที่เป็นกำลังใจและรวมทั้งเป็นแรงผลักดันอย่างดียิ่งที่ทำให้ผู้วิจัยสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คุณค่าหรือประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาแด่พระคุณบิดา มารดา ครูอาจารย์ที่อบรมสั่งสอน แนะนำ ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจอย่างดียิ่งเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	4
สมมติฐานของการศึกษา.....	4
ขอบเขตของการศึกษา.....	4
2 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis).....	6
พยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma mekongi</i>	12
ยาที่ใช้รักษาโรคพยาธิใบไม้เลือด.....	19
การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด.....	20
เทคนิค Western blot.....	24
เทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.....	26
เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends.....	29
การแสดงออกของโปรตีน (Expression Protein).....	31
เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay.....	33
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	35
สัตว์ทดลอง.....	35
อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	35
วิธีการทดลอง.....	36
การเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	36
การเก็บตัวอย่างซีรัม.....	37
การเตรียมแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิ.....	38

บทที่	หน้า
การแยกแอนติเจนชนิดสารสกัดของพยาธิด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	38
การหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะด้วยเทคนิค Western blot.....	41
การหาชนิดของโปรตีนแอนติเจนที่จำเพาะด้วยวิธี LC/MS-MS.....	42
การออกแบบ primer สำหรับโคลนยีน Cathepsin B.....	42
การโคลนยีน Cathepsin B.....	44
การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์.....	46
การผลิตโปรตีน Recombinant Cathepsin B.....	47
การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมด้วยเทคนิค indirect ELISA.....	48
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	50
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	51
ผลการแยกชนิดของแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	51
ผลการศึกษาชนิดของโปรตีน ด้วยเทคนิค LC/MS-MS.....	53
ผลการศึกษายีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	53
ผลของการผลิตและทดสอบความจำเพาะของโปรตีน rSmekCatB.....	58
ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดของโปรตีน rSmekCatB ด้วยเทคนิค indirect ELISA.....	59
วิจารณ์ผลการทดลอง.....	61
5 สรุปผลการทดลอง.....	65
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	78
ภาคผนวก ก.....	79
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	86
ภาคผนวก ง.....	90
ภาคผนวก จ.....	93
ประวัติผู้วิจัย.....	95

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ข้อแตกต่างของพยาธิใบไม้เลือด <i>Schistosoma</i> แต่ละชนิด.....	9
2	โปรตีนที่ใช้ในการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด.....	22
3	ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ.....	32
4	การระบุ Immunoreactive proteins ด้วยเทคนิค LC/MS-MS.....	53
5	คำนวณค่าการตรวจวินิจฉัยของโปรตีน rSmekCatB ด้วยเทคนิค indirect ELISA....	61



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ <i>Schistosoma</i> spp.....	11
2	ลักษณะตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเต็มวัยตัวเมียของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	14
3	ลักษณะของไข่พยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	14
4	วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	15
5	หอย <i>N. aperta</i> พาหะกึ่งกลางของโรคพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	17
6	พื้นที่การระบาดของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	18
7	เทคนิค RT-PCR.....	27
8	เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends.....	30
9	แผนภูมิการเตรียมแอนติเจนชนิดสารสกัดจากตัวพยาธิ.....	40
10	แผนภูมิการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมด้วยเทคนิค indirect ELISA.....	49
11	ภาพย้อมสี Coomassie brilliant blue ของแอนติเจนจากพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	51
12	ภาพแบบแผนของการวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ของแอนติเจนจากพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	52
13	ภาพแบบแผนของการวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ของแอนติเจนจากพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	52
14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i>	55
15	แผนภาพแสดงผลการทำ sequences alignment ของยีน SmekCatB กับยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ.....	56
16	แผนภาพแสดงผลของการทำ neighbor-joining method โดยโปรแกรม MEGA6....	57
17	โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน SmekCatB ที่ถูกทำนายด้วยโปรแกรม I-TASSER.....	57
18	ภาพย้อมสี Coomassie brilliant blue ของโปรตีน rSmekCatB.....	58
19	แบบแผนของการวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ของโปรตีน rSmekCatB และแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิต่าง ๆ.....	59
20	กราฟแสดงผลการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด <i>S. mekongi</i> ด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อโปรตีน rSmekCatB.....	60

ภาพที่		หน้า
21	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	87
22	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) กับค่า log ฐาน 10 ของน้ำหนักโมเลกุลของ standard marker.....	88
23	ผลงานทางวิชาการที่เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร วิชาการ.....	94



บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. ซึ่งสามารถก่อโรคได้ในคนและสัตว์ องค์การอนามัยโลกจัดลำดับให้โรคพยาธิใบไม้เลือดในคนเป็นโรคที่มีความรุนแรงเป็นอันดับ 2 รองจากโรคมาลาเรีย (WHO, 2002; Moraes et al., 2011) โดยพบการระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือดในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย (Moraes et al., 2011) จากสถิติพบว่ามีประชากรมากกว่า 207 ล้านคนทั่วโลกที่ติดโรคพยาธิใบไม้เลือด และมีประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการติดโรคนี้อีก 779 ล้านคน (Steinmann et al., 2006) ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีอุบัติการณ์ของโรคพยาธิใบไม้เลือดที่เกิดจากพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* ซึ่งถือว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญในประเทศบริเวณภูมิภาคนี้ (Ohmae et al., 2004; Urbani et al., 2002; Sinuon et al., 2007) พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* สามารถก่อโรคได้ในคน สุนัข และสุกร (Ohmae et al., 2004; Urbani et al., 2002; Strandgaard et al., 2001) โดยพบการระบาดในเขตประเทศลาว และประเทศกัมพูชา (Fukuhara et al., 2011; Hirose et al., 2007; Hisakane et al., 2008; Kirinoki et al., 2011; Matsumoto et al., 2002; Urbani et al., 2002; Zhou et al., 2002) โดยมีหอย *Neotricula aperta* เป็นพาหะกึ่งกลางของโรค (Conlan et al., 2011; Shimada et al., 2007) ซึ่งหอย *N. aperta* มี 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์แกมมา (gamma) สายพันธุ์แอลฟา (alpha) ทั้งสองสายพันธุ์นี้จะพบในแม่น้ำโขง และสายพันธุ์เบต้า (beta) จะพบในแม่น้ำมูล (Sommani, 1976) จากรายงานของ Attwood et al. (2008) พบว่าจำนวนหอยที่เป็นพาหะกึ่งกลางของโรคในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดในประเทศลาวและกัมพูชามีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งมีโอกาสทำให้ประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการติดโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เพิ่มขึ้นถึง 1.5 ล้านคน จากการประมาณในปี พ.ศ. 2545 ว่ามีประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการติดโรคจำนวน 140,000 คน (Urbani et al., 2002)

ปัจจุบันมีปัจจัยเสี่ยงสามประการที่อาจทำให้เกิดการระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในเขตประเทศไทยได้ในอนาคต ปัจจัยที่หนึ่ง คือ ประเทศไทยมีหอย *N. aperta* ที่เป็นพาหะกึ่งกลางของโรคพยาธิชนิดนี้ ซึ่งพบหอย *N. aperta* สายพันธุ์เบต้า ในแม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี โดยหอยที่พบดังกล่าวนี้ยังไม่เคยมีรายงานการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

(Attwood et al., 2008) และพบหอย *N. aperta* สายพันธุ์แอลฟาและแกรมมาในกลุ่มแม่น้ำโขงทางฝั่งของประเทศไทย ซึ่งยังไม่พบรายงานการติดเชื้อของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เช่นเดียวกัน (Attwood et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหอย *Tricula bollingi* ที่พบในพื้นที่ทางภาคเหนือของประเทศไทย เป็นหอยอีกชนิดที่มีศักยภาพในการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วย (Yuan et al., 1984) ปัจจัยที่สอง คือ การเปิดประเทศภายใต้ข้อตกลงของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (ASEAN Economic Community) ในปี พ.ศ. 2558 ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อแรงขับเคลื่อนทางด้านเศรษฐกิจ ทำให้มีการเคลื่อนย้ายของประชากรมากขึ้น ทั้งในด้านการท่องเที่ยว และตลาดแรงงาน ซึ่งจากสถิตินักท่องเที่ยวชาวลาวและกัมพูชาที่มาท่องเที่ยวในประเทศไทย พ.ศ. 2554 มีจำนวน 891,950 และ 265,903 คน ตามลำดับ (Ministry of Tourism and Sports, Department of Tourism, 2012) ขณะที่นักท่องเที่ยวชาวไทยที่เดินทางไปยังประเทศลาวและกัมพูชา พ.ศ. 2553 มีจำนวน 1,517,064 และ 96,277 คน ตามลำดับ (องค์การการท่องเที่ยวแห่งชาติ สปป.ลาว, แผนกท่องเที่ยวแขวงสะหวันนะเขต จำปาสัก และคำม่วน, 2555; Statistics and Tourism Information Department, 2010) Leshem et al. (2009) รายงานกรณีตัวอย่างของนักท่องเที่ยวที่เข้าไปในพื้นที่ประเทศลาวและได้รับการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยพบว่านักท่องเที่ยวชาวอิสราเอลที่เดินทางมาเที่ยวในประเทศลาวระหว่างปี ค.ศ. 2002-2008 มีนักท่องเที่ยวจำนวน 12 คนที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยนักท่องเที่ยวในจำนวนนี้ 7 คนที่ติดเชื้อแสดงอาการของโรคแบบเฉียบพลัน มีประวัติการเดินทางไปทางตอนใต้ของประเทศลาวซึ่งเป็นเขตระบาดของโรคนี้ และในขณะที่นักท่องเที่ยวอีก 4 คน แสดงอาการของโรคแบบเรื้อรัง ซึ่งจากการสอบประวัติมีความเป็นไปได้ที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือดมาจากการเดินทางไปทางตอนเหนือของประเทศลาว ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการระบาดของโรค และปัจจัยที่สาม ได้แก่ ภาวะน้ำท่วมที่เกิดในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ดังเช่นที่เกิดในปี พ.ศ. 2554 ซึ่งภาวะเสี่ยงดังกล่าวอาจส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของหอยที่เป็นพาหะกึ่งกลางของโรคได้ ซึ่งกรณีตัวอย่างจากผลของภาวะน้ำท่วมที่บริเวณแม่น้ำ Yangtze ของประเทศจีน ทำให้หอย *Oncomelania hupensis* ที่เป็นพาหะกึ่งกลางของโรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma japonicum* มีจำนวนและอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ของหอย *O. hupensis* เพิ่มขึ้นหลังจากเกิดน้ำท่วมแล้ว 3 ปี (Wu et al., 2008) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศในลุ่มน้ำ เช่น การสร้างเขื่อนกั้นน้ำอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของหอยที่เป็นพาหะกึ่งกลางและมีผลต่อการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งเห็นได้จากกรณีตัวอย่างการสร้างเขื่อนกั้นน้ำ Aswan ในลุ่มแม่น้ำไนล์ในประเทศอียิปต์ พบว่าทำให้มีการแพร่ระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* อย่างรวดเร็ว (อุงุ่น เกียรติวุฒิ และคณะ 2545) ดังนั้นตัวแปรจากทั้งสามปัจจัย ประเทศไทยจึงอยู่บนความเสี่ยง ในอนาคตหากมีผู้ป่วยจากประเทศเพื่อนบ้านหรือคนไทยที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* แล้วมีการขับถ่ายอุจจาระลงในแหล่งน้ำในประเทศไทยที่มีหอย

N. aperta อาศัยอยู่ก็อาจมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้เกิดการระบาดของโรคไปได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น การเฝ้าระวังด้วยการตรวจหาผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อาจเป็นมาตรการหนึ่งที่สำคัญ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ผ่านข้ามชายแดนมาจากประเทศที่มีการระบาดของโรค ซึ่งคือประเทศลาวและกัมพูชา ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยเห็นความสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อการติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อทางสาธารณสุขทั้งต่อประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน

การตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้มีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมโรค (Hamilton et al., 1998; Doenhoff et al., 2004) ปัจจุบันวิธีการที่ใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด คือ การตรวจหาไข่ของพยาธิในอุจจาระ เรียกเทคนิคนี้ว่า Kato-Katz (Feldmeier and Poggensee, 1993) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคต่ำ เนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในถ้าผู้ป่วยมีติดพยาธิใบไม้เลือดในจำนวนที่น้อย (Utzing et al., 2001; Yu et al., 1998; Zhu, 2005) การตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญและยังเป็นเครื่องมือหนึ่งในการควบคุมโรคพยาธิใบไม้เลือด (Noya et al., 2006; Alarcón et al., 2007) ในปัจจุบันเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่การตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยานิยมใช้กันมากที่สุด (Doenhoff et al., 2004; Ohmae et al., 2004) โดยที่เทคนิค ELISA เข้ามามีบทบาทสำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมา (Xiang et al., 2003; Zhu et al., 2002, Zhu, 2005; Sorgho et al., 2005) การพัฒนาในช่วงแรกการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาจะใช้แอนติเจนที่เตรียมมาจากไข่และตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้เลือด (Wu, 2002; Zhu, 2005) แต่มักพบปัญหาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่นด้วย (Jin et al., 2010) จึงได้มีการพัฒนาการใช้แอนติเจนบริสุทธิ์และแอนติเจนที่ได้มาจากเทคนิค recombinant มาใช้ในการใช้ตรวจวินิจฉัย ซึ่งให้ผลที่มีประสิทธิภาพดีกว่าแอนติเจนที่เตรียมมาจากไข่และตัวเต็มวัยของพยาธิ (Doenhoff et al., 2004) ด้วยเหตุนี้การหาแอนติเจนที่มีศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยที่สามารถเพิ่มความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) หรือสามารถแยกการติดเชื้อในผู้ป่วยปัจจุบันกับผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อได้ ยังเป็นสิ่งที่ต้องการ (Jin et al., 2010) จากการรวบรวมเอกสารเกี่ยวกับความก้าวหน้าในการศึกษาแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด พบว่า มีการศึกษาและพัฒนาการใช้แอนติเจนที่มีจำเพาะจากพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* เช่น rSj26GST, rSj23HD, rSj32, rSj31-b, SJFBPA และ Sj14-3-3 (Zhu, 2005; Cheng et al., 2007; Luo et al., 2009) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ให้ความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาของโรคพยาธิใบไม้เลือด ขณะที่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้แอนติเจนที่จำเพาะจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในการตรวจวินิจฉัย (Kirinoki et al., 2011; Nickel et al., 2015) ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาชนิดและ

คุณลักษณะของแอนติเจนที่จำเพาะจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เพื่อหาแอนติเจนที่ดีที่สุด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ให้ประสิทธิภาพ ถูกต้อง และแม่นยำต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

2.1 เพื่อศึกษาโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีของเจ้าบ้าน (Host) ที่มีการติดเชื้อพยาธิ

2.2 เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา โดยวิธี Indirect ELISA

3. สมมติฐานของการศึกษา

การติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* จะทำให้ร่างกายของเจ้าบ้านมีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มุ่งหาแอนติเจนของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาแอนติบอดีของเจ้าบ้านด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อบ่งบอกการติดเชื้อของเจ้าบ้านต่อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

4. ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อจำแนกชนิดและคุณลักษณะของแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทำการวิจัยโดยนำพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัยจากหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* นำมาบดทั้งตัวเพื่อเตรียมโปรตีนแอนติเจน แล้วนำโปรตีนแอนติเจนนั้นมาศึกษาแยกชนิดโดยใช้เทคนิค Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นหาแถบโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยใช้เทคนิค Western blot โดยใช้ซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* จากนั้นเมื่อได้โปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะแล้ว ทำการตัดแถบโปรตีนแอนติเจนดังกล่าวจากแผ่น SDS-PAGE gel ที่ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue R-250 เพื่อนำไปทำ protein sequencing ด้วยเทคนิค LC/MS-MS หลังจากทราบชนิดของโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะแล้ว ทำการโคลนยีนโดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายนั้นเพื่อศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด และทำการศึกษาคูณลักษณะของยีนเป้าหมายโดยใช้การวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ (โปรแกรม basic local alignment search tool, Clustal W, ExPASy Tool และ I-TASSER) จากนั้นทำการผลิตโปรตีน recombinant ที่ติดด้วย hexahistidine โดยผลิตภายใต้สภาวะระบบ

E. coli และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA agarose เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยวิธี indirect ELISA แล้วประเมินการวินิจฉัยโรค โดยหาค่าความถูกต้อง ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และวิเคราะห์ข้อมูล



บทที่ 2

ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomiasis)

โรคพยาธิใบไม้ในเลือด หรือ Schistosomiasis มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า Biharziasis เป็นโรคที่เกิดจากพยาธิในกลุ่ม *Schistosoma* spp. ซึ่งจัดอยู่ใน Superfamily Schistosomatoidea และ Family Schistosomatidae เป็นปรสิตของสัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

พยาธิใบไม้เลือดที่อยู่ใน Genus *Schistosoma* เป็นปรสิตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อาจแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะรูปร่างของไข่และหนามบนเปลือกไข่ ความจำเพาะต่อชนิดของพาหะกึ่งกลางและตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ *haematobium* group ไข่ของพยาธิใบไม้เลือดกลุ่มนี้จะมีหนามหนึ่งอันอยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง (terminal spine) โฮสต์ตัวกลางมักเป็นหอยใน Genus *Bulinus* พบในทวีปแอฟริกา เมดิเตอร์เรเนียน และตะวันออกกลาง กลุ่มที่ 2 คือ *mansoni* group ไข่จะมีหนามหนึ่งอันอยู่ด้านข้าง (lateral spine) พาหะกึ่งกลางคือ หอยใน Genus *Biomphalaria* พบในทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้ แคริบเบียน กลุ่มที่ 3 คือ *japonicum* group ไข่จะมีปุ่มเล็ก ๆ อยู่ด้วยข้าง (lateral knob) พาหะกึ่งกลางได้แก่ หอยใน Genus *Oncomelania* และ *Tricula* พบในทวีปเอเชีย และกลุ่มที่ 4 คือ *indicum* group โฮสต์ตัวกลางของพยาธิใบไม้เลือดกลุ่มนี้ ได้แก่ หอยใน Genus *Indoplanorbis* และ *Lymnea* พบในทวีปเอเชีย

1.1 รูปร่างลักษณะและถิ่นที่พบ

1.1.1 *Schistosoma japonicum* ถิ่นที่พบ คือ ประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน และบางประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ฟิลิปปินส์ และ อินโดนีเซีย รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัย เพศผู้มีขนาด 12-20 × 0.5-0.55 มิลลิเมตร ผิวเรียบ (non-tuberculated cuticle) มีอันทะ 6-8 อันเรียงตัวกันเป็นแถวเดียว intestinal reunion อยู่ส่วนหลังของลำตัว เพศเมียมีขนาด 12-28 × 0.3 มิลลิเมตร ฝังไข่อยู่กึ่งกลางลำตัว vitelline กระจายอยู่บริเวณด้านข้างในส่วนสุดท้ายหนึ่งของลำตัว มดลูกยาวมีรังไข่บรรจุอยู่ประมาณ 50-100 ฟอง ไข่สีโปร่งใสถึงเหลืองอ่อน ขนาด 65-103 × 50-72 ไมโครเมตร รูปร่างไม่มีฝาปิด มีปุ่มเล็ก ๆ อยู่ด้านข้างและมีตัวอ่อนที่เรียกว่า ไมราซีเดียม (miracidium) อยู่ภายใน เซอร์คาเรีย (cercariae) รูปร่างเรียวยาว ลำตัวมีขนาด 100-160 × 40-66 ไมโครเมตร ส่วนหางมีขนาด 140-160 × 20-35 ไมโครเมตร ปลายหางแยกออกเป็นสองแฉกยาว 50-75 ไมโครเมตร

1.1.2 *Schistosoma mansoni* พบในแถบประเทศในคาบสมุทรคาราเบียน เช่น อียิปต์ ลิเบีย ชูตาน ประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกา บราซิล เกาะบางแห่งในทะเลแคริบเบียน สุรินาม เวเนซุเอลา รวมทั้งจิบูตี มอริเตเนีย เซเนกัล และโซมาเลีย รูปร่างลักษณะ ตัวเต็มวัย เพศผู้มีขนาด $6-13 \times 1$ มิลลิเมตร ผิวมีลักษณะเป็นตุ่มหยาบ (grossly tuberculated) มี intestinal reunion อยู่ส่วนหน้าของลำตัว มีอณฑะ 4-13 อัน (ส่วนมาก 6-9 อัน) อยู่กันเป็นกลุ่ม เพศเมียมีขนาด $7-17 \times 0.25$ มิลลิเมตร รั้งไข้อยู่ส่วนหน้าของลำตัว มดลูกสั้นมีไข่น้ำบรรจุอยู่ 1-2 ฟอง vitelline กระจายอยู่บริเวณข้างในส่วนครึ่งท้ายของลำตัว ไข่น้ำตาลอมเหลือง มีขนาด $115-175 \times 45-70$ ไมโครเมตร รูปร่างยาวรีมีหนามหนึ่งอันอยู่ด้านข้าง มีไมราซิเดียมที่เจริญเต็มที่อยู่ภายใน เซอร์คาเรียคล้ายกับ เซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ลำตัวมีขนาด $185-230 \times 75-110$ ไมโครเมตร ส่วนหางมีขนาด $185-300 \times 65-75$ ไมโครเมตรปลายหางสองแฉกยาว $90-130$ ไมโครเมตร

1.1.3 *Schistosoma haematobium* พบในทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลาง รวมทั้ง เกาะมาดากัสการ์ และมอริเชียส รูปร่างลักษณะ ตัวเต็มวัย เพศผู้มีขนาด $10-15 \times 0.75-1$ มิลลิเมตร ผิวมีลักษณะเป็นตุ่มละเอียด (finely tuberculated) มี intestinal reunion อยู่บริเวณกลางลำตัว มีอณฑะ 4-5 อันอยู่เป็นกลุ่ม เพศเมียมีขนาด $20-26 \times 0.25$ มิลลิเมตร รั้งไข้อยู่ส่วนกลางของลำตัว มดลูกยาว มีไข่น้ำบรรจุอยู่ 10-50 ฟอง เปลือกไข่น้ำตาลอ่อนใสอมเหลือง มีขนาด $83-187 \times 40-70$ ไมโครเมตร รูปร่างยาวรีมีหนามหนึ่งอัน อยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง มีไมราซิเดียมที่เจริญเต็มที่อยู่ภายใน เซอร์คาเรียรูปร่างรี ยาวเรียว ลำตัวมีขนาด $140-240 \times 57-100$ ไมโครเมตร บรรจุด้วย penetration (lytic) glands ห้าคู่ ส่วนหางมีขนาด $175-250 \times 35-50$ ไมโครเมตร ปลายหางสองแฉกยาว $60-100$ ไมโครเมตร

1.1.4 *Schistosoma intercalatum* พบในประเทศของทวีปแอฟริกา เช่น ประเทศ กาบอง คองโก (ซาอีร์) และ แคเมอรูน รูปร่างลักษณะ ตัวเต็มวัย เพศผู้มีขนาด $11-14 \times 0.3-0.4$ มิลลิเมตร ผิวมีลักษณะเป็นตุ่มละเอียด (finely tuberculated) มี intestinal reunion อยู่ส่วนกลางของลำตัว มีอณฑะ 2-7 อัน (ส่วนมาก 4-6 อัน) อยู่เป็นกลุ่ม เพศเมียมีขนาด $13-24 \times 0.2$ มิลลิเมตร รั้งไข้อยู่ส่วนกลางของลำตัว มดลูกยาว มีไข่น้ำบรรจุอยู่ 5-50 ฟอง ไข่ คล้ายกับไข่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. haematobium* แต่โตกว่าเล็กน้อย มีขนาด $104-203 \times 50-85$ ไมโครเมตร รูปร่างยาวรี หนามหนึ่งอันอยู่ที่ปลายข้างหนึ่ง มีไมราซิเดียมที่เจริญเต็มที่อยู่ภายใน เซอร์คาเรียคล้ายกับเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้เลือด *S. haematobium*

1.1.5 *Schistosoma mekongi* พบในประเทศลาวและกัมพูชา รูปร่างลักษณะตัวเต็มวัย เพศผู้มีขนาด $10-18 \times 0.5-0.55$ มิลลิเมตร ผิวเรียบ มี intestinal reunion อยู่ส่วนกลางของลำตัว มีอณฑะ 6-7 อันเรียงเป็นแถวเดียว เพศเมียมีขนาด $14-20 \times 0.3$ มิลลิเมตร รั้งไข้อยู่กึ่งกลางลำตัว มดลูกยาว มีไข่น้ำบรรจุอยู่ 120-130 ฟอง ไข่ คล้ายกับไข่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* แต่

ค่อนข้างกลมและเล็กกว่า มีขนาด 67-97 × 50-76 ไมโครเมตร มีปุ่มเล็ก ๆ อยู่ด้านข้าง มีไมราซิเดียมที่เจริญเต็มที่อยู่ภายใน เซอร์คาเรียคล้ายกับเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum*

1.2 การแยกชนิดของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. (ตารางที่ 1)

1.2.1 เพศผู้ แยกได้จากลักษณะ tubercle ที่ผิว จำนวนและ arrangement ของอวัยวะ และตำแหน่ง reunion ของลำไส้

1.2.2 เพศเมีย แยกได้จากตำแหน่งของรังไข่ ความยาวของมดลูก จำนวนไข่ และลักษณะของไข่มดลูก

1.2.3 ไข่ไม่มีฝา (non-operculated egg) แยกได้จากลักษณะของไข่ และตำแหน่งของหนาม

1.2.4 ขนาดของไข่ ซึ่งไข่พยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* มีขนาด 90 × 65 ไมครอน ไข่พยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* มีขนาด 45 × 40 ไมครอน ไข่พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีขนาด 150 × 60 ไมครอน และไข่พยาธิใบไม้เลือด *S. haematobium* มีขนาด 150 × 60 ไมครอน

1.3 ตำแหน่งของตัวเต็มวัยอยู่ในหลอดเลือด (venule) ต่างกัน ซึ่งพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ส่วนมากอยู่ใน inferior mesenteric veins พยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ส่วนมากอยู่ใน superior mesenteric vein (venules ของลำไส้เล็ก) พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ส่วนมากอยู่ใน superior mesenteric veins (portal veins) และพยาธิใบไม้เลือด *S. haematobium* ส่วนมากอยู่ใน venule ของ pelvic region ได้แก่ vesical & hemorrhoidal veins (เช่น Urinary bladder และ rectum)

1.4 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp.

ตัวแก่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum*, *S. mansoni* และ *S. mekongi* ทั้งเพศผู้และเพศเมียอาศัยอยู่ในเส้นเลือดรอบ ๆ ลำไส้ (mesenteric plexus) ส่วนพยาธิใบไม้เลือด *S. haematobium* จะอาศัยอยู่ที่เส้นเลือดรอบ ๆ กระเพาะปัสสาวะ ตัวแก่ของพยาธิทั้งเพศผู้และเพศเมียจะผสมพันธุ์แล้วออกไข่ ไข่จำนวนหนึ่งจะถูกกระแสเลือดพัดกลับไปติดอยู่ที่ตับ อีกจำนวนหนึ่งถูกแรงขับของลำไส้ (peristalsis movement) ผ่านมาในลำไส้ ออกมากับอุจจาระ นอกจากนี้ไข่ที่ผ่านในลำไส้จำนวนหนึ่งจะฝังอยู่ที่ผนังลำไส้ ไข่ที่ออกมากับอุจจาระเป็นไข่ที่เจริญเต็มที่แล้ว มีไมราซิเดียมอยู่ภายใน เมื่อสัมผัสกับน้ำ ฟักตัวออกไข่ได้ภายในเวลา 2-3 นาที เข้าสู่หอยซึ่งเป็นพาหะนำโรคนี้โดยเฉพาะแล้วเจริญต่อไป ไมราซิเดียมเมื่อไข่เข้าหอย จะเข้าไปเจริญอยู่ในอวัยวะย่อยอาหารของหอยเป็นสปอโรซิสต์ (sporocyst) สปอโรซิสต์ลูก (daughter sporocyst) และริเดีย ในที่สุดเจริญเป็นเซอร์คาเรียซึ่งจะหลุดออกจากหอยเป็นระยะติดต่อกัน (infective stage) ที่คอยไข่เข้าคนหรือสัตว์ต่อไป การเจริญเติบโตในหอยนี้ใช้เวลาประมาณ 4-6 สัปดาห์ และไมราซิเดียมจะเจริญได้เฉพาะในหอยที่เป็นพาหะกึ่งกลางของมันเท่านั้น

ตารางที่ 1 ข้อแตกต่างของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* แต่ละชนิด

Character	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>S. mekongi</i>	<i>S. haematobium</i>
Male adult size (mm)	6.4-12 × 1	12-20 × 0.5	15 × 0.41	10-17 × 0.8-1
Female adult size (mm)	7.2-17 × 0.25	26 × 0.3	12 × 0.23	20 × 0.25
Cuticle	Grossly tuberculated	Non-tuberculated except minute on anterior sucker & gynecophoric canal	Minute spine anterior to gynecophoric canal	Fine tuberculated
Testes	6-9 small	7 ovoid slightly lobate compressed in single column	7 round in series	4-5 in group
Ova	Oval shape lateral spine 150×60 μm	Rounded lateral spine (knob-like) 100 × 65 μm	Rounded lateral spine (knob-like) 100 × 45 μm	Oval shape terminal spine 150 × 60 μm
Intestine	Anterior half	Posterior half	Unite late near posterior end of body	Middle of body
Uterus	Short 1 - 4 ova	Long 50 - 300 ova	Long winding	Long voluminous
Intestine	Anterior half	Posterior half	Unite late near posterior end of body	Middle of body
Uterus	Short 1 - 4 ova	Long 50 - 300 ova	Long winding	Long voluminous
Intermediate host	<i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria alexandrina</i> , <i>Australorbis</i> , <i>Biomphalaria pfeifferi</i>	<i>Onchomelania hupensis</i>	<i>Tricula aperta</i> (<i>Lithoglyphosis aperta</i>)	<i>Bulinus</i> <i>Planorbis</i> <i>Bulinus truncatus</i> <i>Bulinus globosus</i>
Form of the disease	Intestinal bilharziasis	Intestinal bilharziasis	Intestinal bilharziasis	Urogenital bilharziasis

ตารางที่ 1 ข้อแตกต่างของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* แต่ละชนิด (ต่อ)

Character	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>	<i>S. mekongi</i>	<i>S. haematobium</i>
Main distribution	Africa, Eastern Mediterranean, Caribbean, South America	Philippines, Indonesia, China	Laos, Cambodia	Africa, Eastern Mediterranean
Natural definitive host species	(waterbuck), procyonids (raccoon)	rodents, perissodactylids (horses)	dog, pig	
Health importance	High	High	Moderate	High

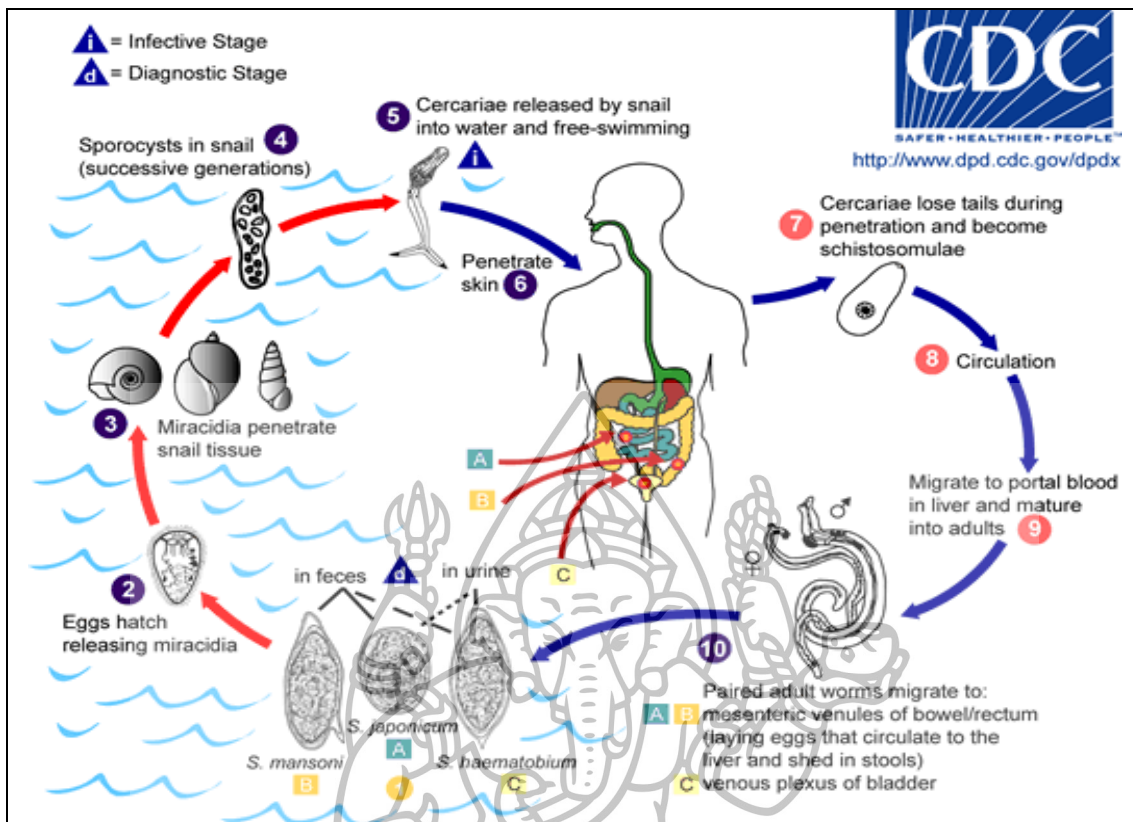
ที่มา : ดัดแปลงจาก Manal A. Hamed, “Strategic Control of Schistosome Intermediate Host.” *Asian Journal of Epidemiology* 3, 3 (2010): 123-140.

เชอร์คาเรียที่ออกมาจากหอยจะว่ายน้ำ และมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีโอกาสไชเข้าคนหรือสัตว์ จะตายไปเอง การติดโรคของคนหรือสัตว์โดยลงไปในพื้นที่ที่มีเชอร์คาเรียอยู่ เชอร์คาเรียของ schistosome มีลักษณะสำคัญ คือ มีหางแฉกขนาดประมาณ 275×51 ไมครอน อาจมองเห็นด้วยตาเปล่า เมื่อเชอร์คาเรียไชเข้าสู่ผิวหนังของคนหรือสัตว์ จะทิ้งส่วนหางเหลือแต่ส่วนหัวไชเข้าเส้นน้ำเหลืองหรือเส้นเลือดฝอย เข้าสู่ทางเดินของเลือดไปสู่หัวใจ สูดฝัดผ่านไปปอดแล้ว เจริญอยู่ที่เส้นเลือดพอร์ทัล (portal vein) ในระยะนี้พยาธิใบไม้เลือดเจริญเป็นตัวแก่ แล้วเพศผู้จะห่อหุ้มเพศเมียในไคนิโครริกแคนัล (gynaecophoric canal) และผสมพันธุ์เรียกว่า โคพูเลชัน (copulation) ต่อมาเพศผู้จะค้ำค้ำคานทวนกระแสเลือดไปเกาะอยู่ที่ในเส้นเลือดรอบ ๆ ลำไส้ (inferior mesenteric plexus) โดยพาเพศเมียไปด้วย และวางไข่ออกมาในลำไส้เล็ก ระยะเวลาที่เชอร์คาเรียไชเข้าผิวหนังเติบโต จนออกไข่เป็นเวลาประมาณ 6-8 สัปดาห์ (ภาพที่ 1)

1.5 พยาธิสภาพและลักษณะทางคลินิก

1.5.1 ระยะที่เกิดจากตัวอ่อนพยาธิไชเข้าสู่ผิวหนังคน

ทำให้ผิวหนังเกิดเป็นตุ่มแดง เป็นลมพิษ เกิดอาการคัน หรือบางทีเกิดเป็นตุ่มแดงเป็นทางยาว ถ้าผู้ป่วยเกาอาจทำให้มีการติดเชื้อเกิดการอักเสบ หลังจากนั้น 24-36 ชั่วโมง ตัวอ่อนจะไชเข้าสู่กระแสเลือดเข้าหัวใจและปอด พยาธิสภาพที่ปอดจะพบว่า มีจุดเลือดออกเล็ก ๆ มีเซลล์ eosinophil, lymphocyte, epithelioid และ giant อยู่รอบ ๆ พยาธิ ตัวอ่อนจะไชเข้าสู่หัวใจ



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ *Schistosoma* spp.

ที่มา : Centers for Disease Control & Prevention Schistosomiasis, Parasites and Health. accessed August 15, 2010, available from <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>

อีกครั้ง แล้วเข้าสู่กระแสเลือดไปเจริญเป็นตัวเต็มวัยที่หลอดเลือดดำในตับ โดยอาศัยอยู่บริเวณ mesenteric ผู้ป่วยจะมีอาการต่าง ๆ และมีปฏิกิริยาภูมิไวต่อพยาธิและไข่พยาธิร่วมด้วย ซึ่งจะเกิดอาการหลังจากได้รับตัวอ่อนเข้าไปประมาณ 15-73 วัน หรือโดยเฉลี่ย 40 วัน พบอาการส่วนใหญ่ได้แก่ เป็นไข้ จุกแน่นหน้าอก ลมพิษ อาจมีอาการหน้าบวม คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดินบ้างเล็กน้อย มีอาการทางปอดแบบหลอดลมอักเสบ และลักษณะทางกายภาพรังสีของปอดพบแผลเป็น (Scattered soft mottling) กระจายอยู่ทั่วไป ตับและม้ามโต เจ็บบริเวณตับ การตรวจเลือดพบ eosinophil สูง ซึ่งเป็นอาการไข้ ที่เรียกว่า คาทายามา (Katamaya fever) โดยจะมีไข้สูงถึง 41 องศาเซลเซียส จะเป็นในตอนเย็นและจะกลับเป็นปกติในตอนเช้า อาจเป็น 1-2 วัน หรือหลายเดือน และอาจถึงตายในรายที่เป็นหนัก นอกจากนี้ยังมีอาการทางประสาท เช่น ชี้น อัมพาต หมดสติ โดยอาการจะดีขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังการรักษา

1.5.2 ระยะที่มีสาเหตุจากไขพยาธิ

เนื่องจาก lytic gland ของตัวอ่อนที่อยู่ในไขพยาธิจะผลิตสารและหลั่งออกภายนอกผ่านทางผนังเปลือกไข่ เพื่อไปทำลายเซลล์หลอดเลือดดำหรือผนังลำไส้ให้สามารถไขทะลุออกไปได้ ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณนั้นจะเป็นโพรงหนองเล็ก ๆ ล้อมรอบด้วยเม็ดเลือดขาว PMN และ eosinophil โพรงหนองและแผลเหล่านี้จะเกิดขึ้นจำนวนมากที่ผนังลำไส้ ผู้ป่วยจะมีอาการถ่ายเป็นมูกเลือด ไขของพยาธิที่อยู่ในหลอดเลือด หากถูกพัดพาตามกระแสเลือดไปยังตับ ปอด หรืออวัยวะอื่น ๆ จะทำให้เกิดพยาธิสภาพและอาการในตำแหน่งเหล่านั้น ถ้าไขจำนวนมากไปยังตับก็จะมี การอุดตันของระบบหลอดเลือดของตับทำให้ตับโตและมีผลให้ม้ามโตด้วย ร่างกายจะมีปฏิกิริยาภูมิไว เกินต่อพยาธิเช่นกัน ทำให้ผู้ป่วยมีไข้และเป็นลมพิษ จำนวน eosinophil สูงถึงร้อยละ 60-80 ในราย ที่เป็นรุนแรงมี serum globulin ขึ้นสูงมาก ปฏิกิริยาเหล่านี้อาจจะมีอยู่นาน 15-73 วัน แล้วอุณหภูมิจึง ร่างกายจะค่อย ๆ ลดลงสู่ระดับปกติ แต่อาจจะมีอาการกลับเป็นซ้ำอีก

1.5.3 ระยะที่มีการซ่อมแซมของร่างกาย

เมื่อเกิดแผลเนื่องจากสารจากไข่หรือตัวอ่อนของพยาธิที่ไปทำลายเนื้อเยื่อให้ เป็นโพรงหนอง ร่างกายก็จะสร้างเนื้อเยื่อซ่อมแซมส่วนต่างๆ มีเม็ดเลือดขาว PMN แทนที่ด้วยเซลล์ epithelioid ทำให้เกิดเป็น pseudotubercle ขึ้น เซลล์ giant จะปรากฏในส่วนกลางของกลุ่มเซลล์ และล้อมรอบไข่ที่ตายแล้ว สุดท้ายไข่ที่ตายแล้วจะมีหินปูนมาจับหรืออาจหายไปเลย ผนังลำไส้หนาขึ้น เกิดมีพังผืดยึดกับเยื่อช่องท้อง หลอดเลือดดำของตับอุดตันทำให้ตับแข็ง และมีภาวะขาดอาหารร่วม ด้วย เนื่องจากผู้ป่วยเบื่ออาหาร ผู้ป่วยจะมีอาการและแสดงอาการของภาวะตับแข็ง เช่น บวม มีน้ำใน ช่องท้อง ท้องมาน อาเจียนเป็นเลือด หรืออุจจาระดำ โลหิตจาง ม้ามโต ปอดเต็มไปด้วยแผลเป็นเกิด การอุดตันของหลอดเลือดฝอยเป็นผลทำให้เกิด corpulmonale

2. พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*

พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* สามารถจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ ดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Class: Trematoda

Subclass: Digenea

Order: Strigeidida

Genus: *Schistosoma*

Species: *Schistosoma mekongi*

2.1 ประวัติและถิ่นที่พบ

จากการรายงานของ Chaiyaporn et al. (1959) ระบุว่า พบผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทยที่ป่วยเป็นโรคพยาธิใบไม้เลือดชนิดคล้ายกับพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (*S. japonicum*-like) ถูกรายงานไว้ในปี ค.ศ. 1950 จากการชันสูตรผู้ป่วยจากจังหวัดนครศรีธรรมราชที่เข้ามารักษาตัวในโรงพยาบาลศิริราช และในปีเดียวกัน Vic-Dupont et al. (1957, อ้างถึงใน Hirose et al., 2007) รายงานว่าพบผู้ป่วยรายแรกจากประเทศลาวที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดชนิด *S. japonicum*-like โดยพบไข่ใน biopsy ของตับจากนักศึกษาลูกครึ่งลาวอายุ 18 ปี ซึ่งมาอาศัยอยู่ที่กรุงปารีส จากนั้นในปี ค.ศ. 1968 มีรายงานผู้ป่วยรายแรกจากประเทศกัมพูชาที่เมือง Kratie (Kracheh) โดยพบไข่แบบเดียวกันนี้ในเด็กหญิงเชื้อชาติเวียดนาม อายุ 12 ปี ต่อมาพบว่าแหล่งระบาดที่แท้จริงของโรคนี้อยู่ที่เกาะโขง ซึ่งอยู่ในแม่น้ำโขงบริเวณตอนใต้ของประเทศลาว และในบางพื้นที่ทางภาคเหนือและภาคกลางของประเทศกัมพูชา โดยมีหอย *Lithoglyphopsis aperta* เป็นพาหะกึ่งกลางซึ่งปัจจุบันเรียกหอยชนิดนี้ว่า *Neotricula aperta* หลังจากนั้นมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงพื้นที่ของการระบาดและพาหะกึ่งกลาง Vogt et al. (1978, อ้างถึงใน Shimada et al., 2007 และ Hirose et al., 2007) ได้จำแนกพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum*-like นี้เป็นพยาธิใบไม้เลือดชนิดใหม่ โดยให้ชื่อว่าพยาธิ *S. mekongi* ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้เลือดที่ก่อโรคในแถบประเทศที่มีพื้นที่ติดกับแม่น้ำโขง ได้แก่ ประเทศลาว กัมพูชา และไทย และ Litiprasert et al. (1999) ได้รายงานว่ถิ่นของระบาดพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* คือ ลุ่มแม่น้ำโขงโดยเฉพาะบริเวณเกาะโขงหรือทางตอนใต้ของประเทศลาว ปัจจุบันพบการระบาดของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในประเทศลาวและกัมพูชา

2.2 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

2.2.1 ตัวเต็มวัย (Adult)

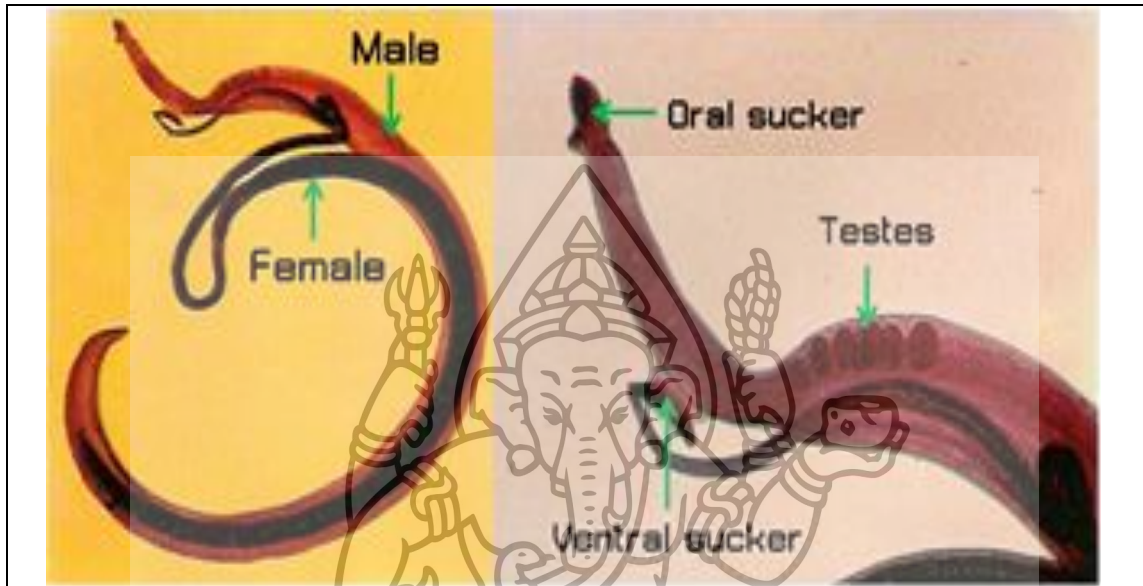
ตัวเต็มวัย เพศผู้มีขนาด 12-20 × 0.5-0.55 มิลลิเมตร ผิวเรียบ (non-tuberculated cuticle) มีอวัยวะ 6-8 อันเรียงตัวกันเป็นแถวเดี่ยว intestinal reunion อยู่ส่วนหลังของลำตัว เพศเมียมีขนาด 12-28 × 0.3 มิลลิเมตร ฝังไข่อยู่กึ่งกลางลำตัว vitellaria กระจายอยู่บริเวณด้านข้างในส่วนท้ายสุดหนึ่งในสี่ของลำตัว มดลูกยาวมีไข่บรรจุอยู่ประมาณ 50-100 ฟอง ดังแสดงในภาพที่ 2

2.2.2 ไข่ (Egg)

ไข่คล้ายกับไข่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* แต่ค่อนข้างกลม และเล็กกว่า มีขนาด 62-97×50-76 ไมโครเมตร มีปุ่มเล็กเล็ก ๆ อยู่ด้านข้าง มีไมราซีเดียมที่เจริญเต็มที่อยู่ภายใน ดังแสดงในภาพที่ 3

2.2.3 เซอร์คาเรีย (Cercariae)

เซอร์คาเรีย รูปร่างรี ยาว ลำตัวมีขนาด 100-160 × 40-66 ไมโครเมตร หางมีขนาด 140-160×20-35 ไมโครเมตร และหางแยกออกเป็นสองแฉกยาว 50-70 ไมโครเมตร



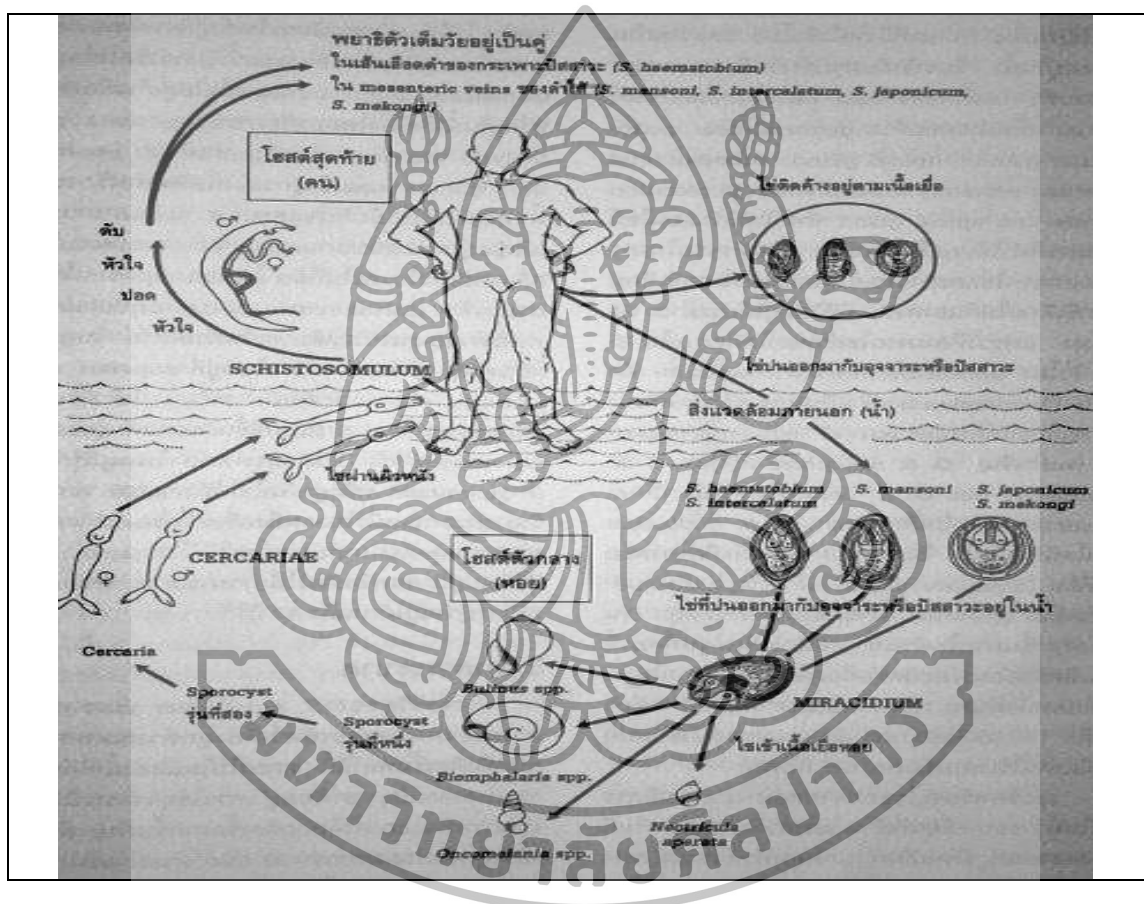
ภาพที่ 2 ลักษณะตัวเต็มวัยเพศผู้และตัวเต็มวัยเพศเมียของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่มา : ประยงค์ ระดมยศ และคณะ, Atlas of medical parasitology (กรุงเทพฯ: เมดิคัลมีเดีย, 2545).



ภาพที่ 3 ลักษณะของไข่พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่มา : ประยงค์ ระดมยศ และคณะ, Atlas of medical parasitology (กรุงเทพฯ: เมดิคัลมีเดีย, 2545).

2.3 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

วงจรชีวิตจะคล้ายกับพยาธิใบไม้เลือดชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* ซึ่งตัวเต็มวัยของพยาธิจะอาศัยอยู่ที่ superior mesenteric vein และ portal vein โดยมีหอย *N. aperta* เป็นพาหะกึ่งกลางซึ่งมีอยู่ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์แกรมมา แอลฟา และเบต้า โดยระยะ prepatent ในหอยเท่ากับ 42-53 วัน และมีสัตว์ที่เป็นโฮสต์กักตุน ได้แก่ สุนัข และสุกร โดยมีระยะ prepatent เท่ากับ 43-49 วัน



ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

ที่มา : ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล และคณะ, ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์ (กรุงเทพฯ: เมดิคอลมีเดีย, 2549).

จากภาพที่ 4 พยาธิตัวแก่ในคนหรือสัตว์จะปล่อยไข่ออกมาในกระแสเลือด และจะถูกขับออกมาทางอุจจาระ ไข่ที่ออกมาจะมีไมราซีเดียมเจริญเต็มที่ที่อยู่ภายใน เมื่อไข่ลงไปใต้น้ำจะฟักตัวออกมาว่ายอยู่ในน้ำเป็นไมราซีเดียมแล้ว จะไปฝังตัวในหอยที่เป็นพาหะกึ่งกลางเจริญเติบโตเปลี่ยนเป็น sporocyst 2 ครั้ง จะได้ fork-tailed cercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อจะว่ายออกจากหอยไป

อาศัยอยู่ในน้ำ เมื่อคนหรือสัตว์ลงไปเล่นน้ำอาบน้ำที่มีระยะติดต่อเชอร์คาเรียอยู่ เชอร์คาเรียจะไผ่ผ่านผิวหนังเข้าสู่หลอดเลือดดำเล็ก เข้าสู่กระแสเลือดไปยังหัวใจซีกขวาสู่อุด กลับมายังหัวใจซีกซ้ายแล้วกระจายไปทั่วร่างกายเข้าสู่เส้นเลือด portal vein พยาธิจะเจริญเติบโตที่ตับเป็นตัวเต็มวัยจะเริ่มจับคู่ระหว่างเพศผู้และเพศเมียแล้วพากันออกจากตับไปอาศัยอยู่ในหลอดเลือดดำตามตำแหน่งต่าง ๆ แล้วแต่ชนิดของพยาธิ หลังจากผสมพันธุ์แล้วไข่จะถูกวางในเส้นเลือดเล็ก ๆ ซึ่งพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* และพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* จะวางไข่ใน mesenteric vessel แล้วไผ่ผ่านไปตามอวัยวะต่าง ๆ คือ ลำไส้ หลังจากนั้นไข่จะถูกปล่อยออกมาที่อุจจาระ

2.4 หอย *Neotricula aperta*

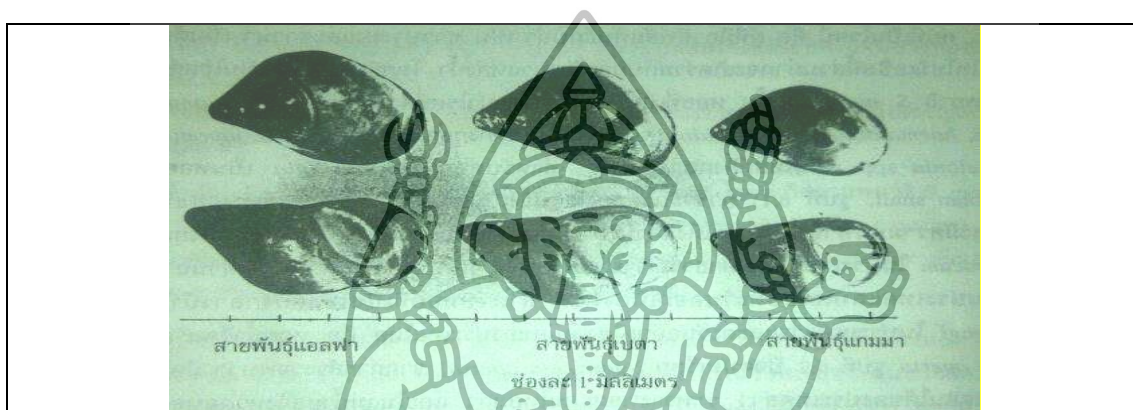
หอย *N. aperta* เป็นหอยขนาดเล็ก ขนาด 0.13–0.3 x 0.2–0.5 เซนติเมตร มีฝาปิด ฐานกว้างใหญ่ ปลายยอดสั้น เปลือกเรียบสีน้ำตาลปนเหลือง ซึ่งเป็นพาหะกึ่งกลางของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ซึ่งมี 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์แกรมมา แอลฟา และเบต้า (ภาพที่ 5) Ohmae et al. (2004) กล่าวว่า หอยที่เป็นโฮสต์ตัวกลางสายพันธุ์แกรมมาและแอลฟา จะสามารถพบได้ปกติตลอดสายแม่น้ำโขงไปจนถึงจังหวัด Kratie ประเทศกัมพูชา แต่สายพันธุ์เบต้าจะพบเฉพาะในแม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งพบได้ในประเทศไทยเท่านั้น แม้ว่าหอยที่เป็นโฮสต์ตัวกลางทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีการระบาดในพื้นที่ที่ต่างกัน จะพบว่ามีเพียงสายพันธุ์แกรมมาที่สามารถติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ได้ตามธรรมชาติ ในขณะที่เดียวกันจากการศึกษาความไวต่อการติดเชื้อพยาธิของหอย *N. aperta* พบว่า สายพันธุ์แกรมมามีความไวต่อการติดเชื้อพยาธิได้มากกว่าสายพันธุ์เบต้า ในปี ค.ศ. 1973 พบว่าหอย *N. aperta* สายพันธุ์แกรมมา ที่แม่น้ำ Xe Kong หมู่บ้าน Sadao ประเทศกัมพูชามีการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในธรรมชาติ (0.3%) และในปี ค.ศ. 2003 พบหอย *N. aperta* สายพันธุ์แกรมมาติดเชื้อในธรรมชาติ 0.14% (3/2,200) ที่จังหวัด Stung Treng โดยการแพร่ระบาดของโรคจะเกิดขึ้นในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่น้ำในแม่น้ำโขงลดระดับลง

2.5 วิทยาการระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

ปัจจุบันพบว่านอกจากคนแล้วยังมีสัตว์อีกสองชนิด คือ สุนัขและสุกร ที่เป็นโฮสต์สุดท้ายของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ซึ่งการระบาดของโรคนี้อาจอยู่ในช่วงน้ำน้อย Urbani et al. (2002) ได้รายงานว่าการระบาดของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ส่วนใหญ่ในประเทศกัมพูชาจะอยู่ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ส่วนประเทศลาวและประเทศไทยจะอยู่ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน โดยแสดงพื้นที่การระบาดของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในภาพที่ 6

ในประเทศลาว ถิ่นระบาดที่สำคัญของโรคพยาธิใบไม้เลือดอยู่ที่เกาะโขง ซึ่งอยู่ทางตอนใต้ของประเทศลาวใกล้กับประเทศกัมพูชา ความชุกของโรคระหว่างปี ค.ศ. 1971-1976 เท่ากับ

14.4-62.5% สำหรับความชุกของโรคตลอดแนวแม่น้ำโขงใกล้เขตประเทศกัมพูชาได้มีการสำรวจในปี ค.ศ. 1987 พบว่า เท่ากับ 15.3-92.3% (ค่าเฉลี่ย 42%) โดยมีประชากรที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด ประมาณ 11,000 คน และประมาณ 60,000 คน ที่มีความเสี่ยงต่อการติดโรค ภายหลังจากการควบคุม โรคอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 9 ปี อัตราความชุกของโรคที่เกาะโขงในโฮสต์กักตุนลดลงเหลือ 2.1% ขณะที่อัตราความชุกของโรคในสุนัขที่เกาะโขงในปี ค.ศ. 1971 เท่ากับ 11.0% ผลบวกของอุจจาระ สุกรที่เมืองโขงในปี ค.ศ. 2001 เท่ากับ 12.2%



ภาพที่ 5 หอย *N. aperta* พาหะกึ่งกลางของโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่มา : อุ่น เกียรติวุฒิ และคณะ, หนอนพยาธิใบไม้ พยาธิติดต่อ ปรสิตอื่นๆ และแมลงที่สำคัญทางการแพทย์, (กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545).

ในประเทศกัมพูชา ถิ่นระบาดสำคัญอยู่ที่เมือง Kratie และ Stung Treng ความชุกของโรคพยาธิใบไม้เลือดระหว่างปี ค.ศ. 1966-1970 เท่ากับ 3.6-47.0% ปี ค.ศ. 1982 และ 1983 มีการตรวจพบไข่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในอุจจาระของชาวแกมพูชาอพยพที่จังหวัดปราจีนบุรี ด้วยอัตราความชุกเท่ากับ 0.34 (74/21,496) และ 0.26% (62/24,169) ตามลำดับ ปี ค.ศ. 1994-1995 พบว่าที่เมือง Kratie มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยมีอัตราความชุกเท่ากับ 26.3-72.9% และภายหลังจากการควบคุมโรคอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 ปี ทำให้อัตราความชุกเฉลี่ยของโรคลดลงเหลือต่ำกว่า 10% ใน ค.ศ. 2001 ปัจจุบันประชากรประมาณ 80,000 คน ยังมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในโฮสต์กักตุน พบผลบวกของอุจจาระสุนัขที่เมือง Kratie ระหว่างปี ค.ศ. 2000-2001 เท่ากับ 0.32-3.6%

ในประเทศไทยมีรายงานการพบผู้ป่วยติดเชื้อพยาธิ *S. japonicum-like* ระหว่างปี ค.ศ. 1959-1984 พบไข่ของพยาธิ *S. japonicum-like* ใน biopsy (ส่วนใหญ่เป็น rectal biopsy) ของผู้ป่วยและจาก autopsy ประมาณ 60 ราย จากจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ นครศรีธรรมราช (51 ราย),

สุราษฎร์ธานี (2 ราย), พิษณุโลก (3 ราย), พิจิตร (1 ราย), เชียงราย (1 ราย), พะเยา (1 ราย) และ อุบลราชธานี (1 ราย) ปี ค.ศ. 1986 พบไข่จากก้อนเนื้อบริเวณรอยต่อของลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ และจาก rectal biopsy ของผู้ป่วย 2 รายจากจังหวัดพิจิตร ระหว่างปี ค.ศ. 1982-1984 และปี 1985-1988 จากการศึกษาโรคพยาธิใบไม้เลือดในโครงการเขื่อนรัชชประภา (เดิมชื่อเขื่อนเชี่ยวหลาน) จังหวัดสุราษฎร์ธานี มีการตรวจพบไข่ของพยาธิในกลุ่ม *S. japonicum complex* ในอุจจาระของเด็กชายอายุ 11 ปี 1 ราย (1/1,007 คน) และในสุนัข 3 ราย (3/21 ตัว) แต่ไม่พบหอยที่เป็นโฮสต์ตัวกลางที่ติดเชื่อตามธรรมชาติ หรือหอยชนิดอื่น ๆ ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิใบไม้เลือดในคน เมื่อนำไม้ราชีเดียมจากไข่ในอุจจาระเหล่านี้ไปทำการทดสอบความไวกับหอยชนิดต่าง ๆ พบว่าหอย *N. aperta* สายพันธุ์เบต้า และหอย *Tricula bollingi* เท่านั้นที่ติดเชื่อได้ แต่ในปี ค.ศ. 2007 มีการรายงานว่าหอย *N. aperta* สายพันธุ์แกรมมา เป็นชนิดแรกที่มีการติดเชื่อ Schistosomes บริเวณแม่น้ำโขง (Shimada et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่ามีเฉพาะสายพันธุ์แกรมมาเท่านั้นที่มีการติดเชื่อ *S. mekongi* ในธรรมชาติ ส่วนสายพันธุ์เบต้าไม่พบการติดเชื่อ หลังจากนั้นก็ไม่พบอุบัติการณ์ของโรคในคนอีกเลย โอกาสที่จะได้ศึกษาพยาธิตัวเต็มวัยจึงไม่มี อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่พบหอย *Oncomelania spp.* ในประเทศไทย แต่พบหอย *N. aperta* ที่ลุ่มแม่น้ำมูลและแม่น้ำโขง และการที่พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* สามารถใช้หอย *N. aperta* เป็นโฮสต์ตัวกลางได้ดี จึงอนุมานว่าพยาธิที่เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้เลือดในประเทศไทย คือ พยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*



ภาพที่ 6 พื้นที่การระบาดของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

ที่มา : Shimada, M. et al., "High susceptibility of *Neotricula aperta* gamma-strain from Krakor and Sdau in Cambodia to *Schistosoma mekongi* from Khong Island in Laos," *Parasitology International* 56 (2007): 158.

2.6 พยาธิสภาพและลักษณะทางคลินิก

โดยลักษณะทางคลินิกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* จะคล้ายกับพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* แต่ความรุนแรงของโรคจะน้อยกว่า โดยอาจพบอาการท้องเดินเล็กน้อย และที่พบบ่อย คือ ตับโต ม้ามโต บางรายอาจเกิดความดันโลหิตในตับสูง ซึ่งมักพบอาการท้องมานในเด็กนักเรียนชั้นประถม อัตราความชุกของโรคจะมีความสัมพันธ์อย่างสูงกับระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ ซึ่งระดับความรุนแรงของการติดเชื้อจะมีความสัมพันธ์กับอัตราของอาการตับโตและการมีเลือดออกในอุจจาระ ต่อมาพบว่าอาการม้ามโตที่เกิดจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* จะมีความรุนแรงมากกว่าที่เกิดจากพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วยที่มีอาการทางสมอง เช่น อาการชา ที่แขน ขา พูดลำบาก และมะเร็งกล้ามเนื้อเรียบในลำไส้เล็ก

3. ยาที่ใช้รักษาโรคพยาธิใบไม้เลือด

3.1 สารอินทรีย์สังเคราะห์

3.1.1 Praziquantel เป็นสารประกอบสีขาว มีรสขม ไม่มีกลิ่น ในสภาวะปกติเป็นผลึกคงรูป แต่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 136-139 °C เป็นสารดูดความชื้นได้ดี ละลายได้ดีใน chloroform และ dimethyl sulfoxide (อภิธรรมย์ เจริญไชย, 2543) praziquantel เป็นยาที่เลือกใช้เป็นอันดับแรกในการกำจัดพยาธิใบไม้เกือบทุกชนิดและพยาธิตัวตืด โดยเฉพาะพยาธิตืดหมู โดยมีผลให้พยาธิหดตัวอย่างรุนแรง และเป็นอัมพาตแบบหดเกร็ง พยาธิจึงเกาะติดเนื้อเยื่อไม่ได้ และถูกขับออกมา กลไกการออกฤทธิ์ ถูกดูดซึมเข้าสู่ภายในตัวพยาธิอย่างรวดเร็ว เบื้องต้นพบว่าทำให้เกิด vacuolization ที่ชั้นผิวตัวของพยาธิ การออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ ทำให้เกิด Ca^{2+} ไหลเข้าสู่ cell membrane ของพยาธิส่งผลให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อจนเกิดอัมพาต พยาธิไม่สามารถยึดเกาะผนังหลอดเลือดได้จึงถูกขับออกจากโฮสต์ กล้ามเนื้อของพยาธิจะหดตัวทันที เกิดตุ่มพองจะขยายใหญ่และแตกออกในที่สุด การดูดซึมจะได้ผลดีและรวดเร็วเมื่อได้รับยาโดยการกิน ยาจะกระจายไปสู่อวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ยาจะถูกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในบริเวณตับ ขับออกทางน้ำปัสสาวะในรูปแบบที่ไม่มีฤทธิ์

3.1.2 Oxamniquine เป็นสารประกอบ tetrahydroquinolone เป็นยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคพยาธิใบไม้เลือดที่มีสาเหตุจาก *S. mansoni* (Callahan, 2007) แต่ก็ยังไม่มีรายงานกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอน อัตราการรักษาหายสำหรับการติดเชื้อในแคริบเบียนและอเมริกาใต้ อยู่ที่ 60-90% (Esmat and El Raziky, 2009) และจะมีผลกับพยาธิเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ฤทธิ์กับพยาธิเพศเมียจะทำให้ไม่สามารถออกไข่ ได้รับการใช้อย่างกว้างขวางในประเทศบราซิล และประเทศอื่นที่มีโรคพยาธิใบไม้เลือด แต่ไม่เป็นที่นิยมใช้ในแอฟริกา อย่างไรก็ตามในส่วนของการศึกษาประสิทธิภาพ Praziquantel มีผลมากกว่า oxamniquine ในรักษาโรคพยาธิใบไม้เลือดที่ลำไส้

3.2 สารอินทรีย์จากธรรมชาติ

3.2.1 Artemisinins หรือ qinghoazu เป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากพืช *Artemisia annua* เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศจีนและใช้ลดไข้มานานกว่าพันปี Artemisinin ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1971 มีโครงสร้างทางเคมีเป็น sesquiterpene lactone โดยมีพันธะเอนโดเปอร์ออกไซด์ (-O-O-) เป็นส่วนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Woodrow et al., 2005) จึงมีการใช้อย่างแพร่หลายในถิ่นที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย พบว่ามีผลข้างเคียงต่ำและไม่มีรายงานพิษต่อผู้ใช้นัก (Ribeiro and Olliaro, 1998) ทำให้ยากกลุ่ม Artemisinin เป็นที่สนใจในการศึกษาอย่างกว้างขวางในด้านต่างๆ รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์การต้านโรคพยาธิใบไม้เลือด เนื่องจาก artemisinin มีคุณสมบัติที่ละลายได้ไม่ดีทั้งในน้ำและน้ำมัน ทำให้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ขึ้นมาเพื่อให้ได้สารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี เช่น artesunate และ dihydroartemisinin และสารที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดี เช่น artemether และ arteether เป็นต้น ซึ่ง artemether และ artesunate ถูกรายงานครั้งแรกในปี 1982 และ 1983 ตามลำดับ เกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (Le et al., 1982; Le et al., 1983 อ้างโดย Xiao, 2005) หลังจากนั้นมีการศึกษาฤทธิ์ของยากกลุ่ม artemisinin กับ การต่อต้านพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* spp. โดยจากการศึกษาภายในตัวสัตว์ พบว่า artemether และ artesunate มีผลอย่างมากกับระยะตัวอ่อนของพยาธิ *Schistosoma* spp. (Xiao, 2005)

3.2.2 Mirazid เป็นยาสมุนไพรที่ได้จากยางไม้ของลำต้น *Commiphora molmol* มีคุณสมบัติในการต่อต้านพยาธิใบไม้เลือด โดยทำให้พยาธิเพศผู้กับเพศเมียไม่จับคู่กัน (Esmat and El Raziky, 2009) มีฤทธิ์ทำลายกล้ามเนื้อของพยาธิ และจากการทดลองทางคลินิกในประเทศอียิปต์ ไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรง บริษัทยาในประเทศอียิปต์ได้นำสารสกัดจาก *Commiphora* มาผลิตในรูปยาเม็ดที่มีสารบริสุทธิ์ Mirazid ปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อแคปซูล

4. การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด

การวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด สามารถทำได้ทั้งวิธีทางปรสิตวิทยาและวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน วิธีทางปรสิตวิทยาทำได้โดยการตรวจหาไข่พยาธิที่ออกมากับอุจจาระหรือปัสสาวะ วิธีที่จัดได้ว่าให้ผลดีที่สุด ได้แก่ การตรวจบนแผ่นฟิล์มหนาของอุจจาระตามวิธีของ Kato (Kato thick smear technique) เนื่องจากสามารถทำได้ทั้งการตรวจหาไข่ และนับจำนวนไข่ในอุจจาระ แม้ว่าจะเป็นวิธีที่แม่นยำที่สุด แต่ก็มีปัญหาด้านความไวในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้จะตรวจพบไข่ในอุจจาระเมื่อผู้ป่วยอยู่ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ ซึ่งมีการดำเนินของโรคจนทำให้เกิดการเจ็บป่วยแล้ว เนื่องจากในระยะแรกของการติดเชื้อนั้นพยาธิยังเจริญไม่เต็มที่จึงไม่มีไข่ปนออกมากับอุจจาระหรือปัสสาวะ ทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาไข่พยาธิได้ นอกจากนี้ถ้ามีการติดเชื้อจำนวน

น้อยไขพยาธิก็จะมีในอุจจาระน้อยเช่นกัน จึงอาจต้องตรวจซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง อาจตรวจไม่พบไข่ในอุจจาระ อีกทั้งไข่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ยังมีลักษณะคล้ายคลึงกับไขพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* การใช้เครื่องมือสอดเข้าทวารหนักเพื่อช่วยขลิบเอาเนื้อเยื่อจากบริเวณผนังลำไส้ใหญ่ตอนปลายมาตรวจ (rectal biopsy หรือ rectal spin) โดยนำเนื้อเยื่อที่ขลิบออกมานี้ตรวจบนกระจกสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์จะช่วยให้โอกาสการตรวจพบมีมากขึ้น (วิฑูรย์ ไวยนันท์ และพีรพรรณ ตันอารีย์, 2546)

วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นอีกวิธีหนึ่งในการตรวจหาการติดเชื้อ วิธีแรกเป็นการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมต่อพยาธิ การตรวจหาแอนติบอดี คือ ไม่สามารถบอกได้ว่าผู้ป่วยกำลังติดเชื้ออยู่หรือไม่ ไม่สามารถบอกระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ และยังตรวจพบแอนติบอดีในระดับที่สูงอีกนานหลายปีหลังการรักษาให้หายด้วยยา อีกวิธีเป็นการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิในซีรัมและในอุจจาระ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคในระยะต้นของการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติเจนที่พยาธิสร้างขึ้นและขับออกมาจากทางเดินอาหาร (excretory-secretory materials, ES) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งในซีรัมและในอุจจาระของผู้ป่วย หรือแอนติเจนที่เป็นส่วนของชั้นผิว (tegument) จากการรวบรวมงานที่ศึกษาการใช้โปรตีน recombinant ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพยาธิใบไม้เลือดด้วยเทคนิค indirect ELISA (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่ามีโปรตีน recombinant หลายตัวที่ให้ค่าความไว (80-100%) และความจำเพาะ (>89%) สูงในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* เช่น rSj26GST, rSj23HD, rSj32, rSj31-b, SjFBPA และ Sj14-3-3 (Zhu, 2005; Cheng et al., 2007; Luo et al., 2009)

ทั้งนี้ยังมีการใช้ Monoclonal antibody กับวิธี sandwich ELISA (mAb-based ELISA) ช่วยให้การตรวจหาแอนติเจนของพยาธิ schistosome โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับแอนติเจน circulating anodic antigen (CAA) และ circulating cathodic antigen (CCA) ในกระแสโลหิต และในน้ำปัสสาวะได้ วิธีนี้จะมีความไวและความจำเพาะสูงมาก การตรวจพบแอนติเจนนี้นอกจากช่วยในการวินิจฉัยแล้วยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการประเมินประสิทธิภาพของการรักษาโรคด้วย เนื่องจากพบว่าระดับของแอนติเจน CCA ลดลงอย่างรวดเร็วหลังรับการรักษาหายด้วยยา โดยระดับของ CCA ในซีรัมและปัสสาวะจะลดลงมากใน 1 สัปดาห์หลังการรักษา และหลังการรักษา 3-6 สัปดาห์ จะตรวจไม่พบในซีรัม แต่ยังคงตรวจพบในระดับต่ำ ๆ ในน้ำปัสสาวะ

ตารางที่ 2 โปรตีนที่ใช้ในการวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด

No	Recombinant Protein	kDa	Expression Stage	Localization	Function	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Cross reaction	References
1	SjLAP		Egg, Cercariae, Schistosomula, Adult	eggs, gut, tegument	absorption of nutrients and immunoregulation	87.8-98.1	96.7	<i>C. sinensis</i> , <i>P. westermani</i> , Hookworms	Zhong et al., 2010; Gardiner et al., 2006; Auriault et al., 1982
2	SjFBPA				central glycolytic enzyme in carbohydrate metabolism	84.7-100	96.7	<i>C. sinensis</i> , <i>P. westermani</i> , Hookworms	Zhong et al., 2010; Marques et al., 2008
			Cercariae, Schistosomula, Adult			100	100		Peng et al., 2008
3	SjGcp-Sj23-Sj28	43.4	Schistosomula, male adult. All stage. All stage.			89.9	93.4		Jin et al., 2010; Bostic and Strand., 1996 Davern et al., 1991; Trottein et al., 1992
4	SjGcp-SJ23	39.1	Schistosomula, male adult. All stage			91.0	97.8		Jin et al., 2010 Bostic and Strand., 1996 Davern et al., 1991
5	Sj23-LHD	23	All stage	membrane protein		89.9	91.2		Jin et al., 2010 Davern et al., 1991
6	SjTPX1	71	Schistosomula, male adult			84.0	89.0		Jin et al., 2010; Kumagai et al., 2006
7	SjEF1	140	Schistosomula, male adult			83.5	89.0		Jin et al., 2010

ตารางที่ 2 โปรตีนที่ใช้ในการวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด (ต่อ)

No	Recombinant Protein	kDa	Expression Stage	Localization	Function	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Cross reaction	References
8	Sj14-3-3& Sj26GST					80.7-94.4	94.7	<i>C. sinensis</i> , Hookworms	Luo et al., 2009
	Sj14-3-3	30	development stages		acidic protein				Liu and Shen, 2003; Li et al., 2004; Zheng et al.,2007
	Sj26GST	26	Egg, Schistosomula, Adult	Surface and Gut	intracellular binding proteins				Mannervik and Danielson, 1988; Precious and Barrett, 1989; Cheng et al., 2007 Trottein et al., 1990; Liu et al., 1993
9	Sj13	13	Egg, Cercariae, Adult	Tegument		92.50	92.11	No report	Zhou et al.,2009
10	Sjmyophilin-like protein	25	Egg, Cercariae, Schistosomula, Adult	Muscle	important role in the developmental biology of the worm	57.4	93.94	No report	Peng et al., 2008; Liu et al., 2006
11	Sjp40	40	Egg, Cercariae, Schistosomula, Adult					No report	Zhou et al., 2010
						These findings indicated that Sjp40 and its antibodies are detectable from the host at a relatively early phase (21day post infection)			

5. เทคนิค Western blot

เทคนิค Western blot หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Immunoblot เป็นเทคนิคที่ใช้ติดตามโปรตีนที่สนใจในสารตัวอย่าง เช่น homogenate tissue หรือโปรตีนที่สกัดมา เป็นวิธีการคล้ายการทำ southern blot hybridization แต่เปลี่ยนจากการหา DNA ที่มีความจำเพาะในตัวอย่างมาเป็นโปรตีนแทน ขบวนการในการทำ Western blot ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเนื้อเยื่อหรือโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการ (tissue/protein preparation) ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการทำ Western blot อาจได้มาจากเนื้อเยื่อของเซลล์ หรือทำการสกัดโปรตีนออกมาจากเนื้อเยื่อออกมาทั้งหมด ซึ่งการขั้นตอนนี้การสกัดโปรตีนนั้นจะต้องมีการเติมสาร protease inhibitor ด้วยเป็นการป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์

ขั้นตอนที่ 2 การทำ gel electrophoresis เป็นการแยกโปรตีนตัวอย่างโดยอาจจะแยกตามค่า isoelectric point (pI) หรือแยกตามขนาดโปรตีน (molecular weight) ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างนิยมทำกันมาก เพราะง่าย เจลที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีนส่วนใหญ่ใช้ gel acrylamide ซึ่งในการแยกโปรตีนทำได้ทั้งแบบ native gel หรือ denature gel หรือที่เรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) SDS เป็นสาร ionic detergent ที่จะเข้าไปจับกับโปรตีนทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพและกลายเป็นประจุลบ จึงทำให้การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จะเป็นการแยกตามขนาดโมเลกุล

ขั้นตอนที่ 3 การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer) เป็นการย้ายโปรตีนผ่านการแยกด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วย้ายสู่เมมเบรนที่มีประจุบวกเช่น nitrocellulose หรือ polyvinylidene fluoride (PVDF) ในปัจจุบันวิธีการย้ายโปรตีนสามารถทำได้ 3 แบบ คือ wet tank transfer เป็นการย้ายโดยอาศัย buffer tank ซึ่งวิธีค่อนข้างต้องใช้อุปกรณ์จำนวนมากและใช้เวลานานพอสมควรในการย้ายโปรตีน วิธีที่สอง semi-dry transfer เป็นวิธีนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เนื่องจากไม่ต้องใช้อุปกรณ์จำนวนมากและสามารถทำการย้ายโปรตีนได้หลายแผ่นในเวลาเดียวกัน และสามารถย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนได้เกือบ 100% วิธีสุดท้ายเป็นการย้ายแบบ dry bufferless transfer คือทำการย้ายโปรตีนโดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์และใช้เวลาน้อยประมาณ 7 นาที ทำให้ลดกระบวนการเตรียมสารต่าง ๆ รวมถึงให้ประสิทธิภาพในการย้ายดีมาก

ขั้นตอนที่ 4 Blocking เป็นวิธีการป้องกันการเกิด non-specific โปรตีนอื่น ๆ เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน หลังจากย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนแล้ว โปรตีนจะจับอยู่กับเมมเบรน แต่ยังมีพื้นที่ของแผ่นเมมเบรนอยู่ที่โปรตีนไม่ได้เข้าจับ ดังนั้นเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนตัวอื่นหรือแอนติบอดีกับแผ่นเมมเบรน จึงต้องทำการ blocking ด้วย bovine serum albumin (BSA) หรือ

non-fat dry milk ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่นเมมเบรนยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว ดังนั้นการทำ blocking จึงมีความสำคัญ โดยจะช่วยลดการเกิด false positives ด้วย

ขั้นตอนที่ 5 การติดตามผล (detection) ในขั้นตอนการติดตามผลนั้นจะมีการ probe เมมเบรนเพื่อหาโปรตีนที่สนใจด้วยแอนติบอดีซึ่งอาจมีการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ หรือสารเรืองแสงอื่น และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีเกิดขึ้นหรือมีการเปล่งแสงออกมา ซึ่งแบ่งเป็น two step detection และ one-step detection

1. Two-step detection เป็นการใช้อันติบอดีเข้าไปจับโปรตีนที่มีความจำเพาะ เช่นใช้ primary antibody (1° Ab) จับโปรตีนที่สนใจ บ่มเอาไว้เพื่อให้เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นทำการล้างเพื่อชะ non-specific binding ออกไป แล้วจึงใช้ secondary antibody (2° Ab) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สารรังสี หรือสารอื่น ๆ ที่สามารถติดตามการเกิดสีหรือเรืองแสงได้ ซึ่ง 2° Ab จะเข้าจับกับ 1° Ab อย่างจำเพาะ

2. One-step detection เป็นการใช้อันติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์เรียบร้อยแล้ว ให้เข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายได้และสามารถทำให้เกิดสีได้ทันทีหลังจากเติมสารตั้งต้น โดยไม่ต้องผ่านการใช้ 2° Ab เข้าจับอีกที

ขั้นตอนที่ 6 การวิเคราะห์ผล (analysis) หลังจากทำการบ่มแผ่นเมมเบรนด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแล้ว จากนั้นจะเป็นวิธีการติดตามว่าแอนติบอดีไปเกาะกับโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งใด ซึ่งการติดตามวิเคราะห์ผลก็ขึ้นอยู่กับว่าแอนติบอดีที่ใช้ ติดฉลากด้วยสารอะไร แบ่งได้เป็น

1. Colorimetric detection เป็นการติดตามผลโดยดูการเกิดสี ที่เกิดจากเอนไซม์ย่อยสารตั้งต้นแล้วเกิดขึ้นบนแผ่นเมมเบรน

2. Chemiluminescent detection เป็นการติดตามผลโดยการเรืองแสงซึ่ง substrate ที่ใช้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นมา อาจต้องติดตามด้วย photographic filter หรือกล้อง Charge Coupled Device (CCD) เพื่อจับภาพของเมมเบรน

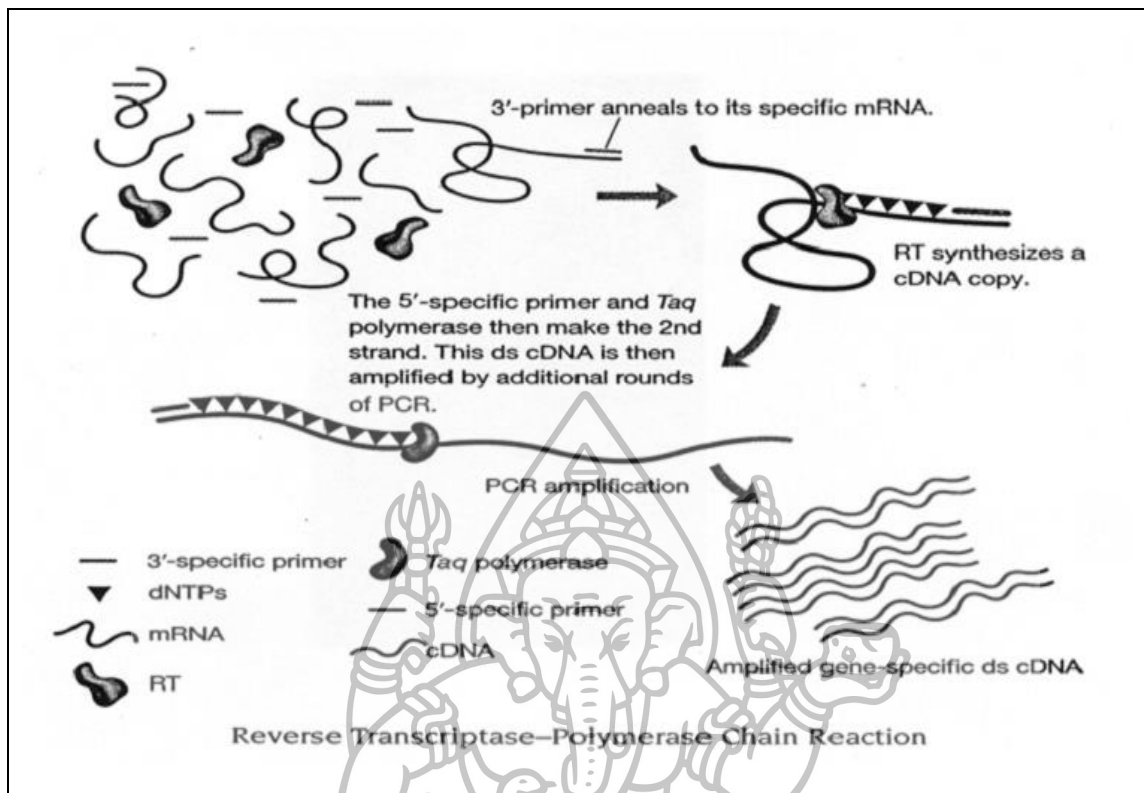
3. Radioactive detection การติดตามเป็นวิธีนี้ไม่ต้องใช้ substrate เพราะแอนติบอดี ถูกติดฉลากด้วยสารรังสีซึ่งจะเกิดการเปล่งแสงออกมา ต้องติดตามผลด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์

4. Fluorescent detection การวิเคราะห์และติดตามผลแบบนี้แอนติบอดีจะถูกติดฉลากมาด้วยสารเรืองแสง (fluorescent) ซึ่งจะต้องมีการกระตุ้น (excitation) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมและมีการปล่อยแสง (emission) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน ดังนั้นจะต้องดูผลโดยใช้กล้อง photosensor เช่น กล้อง CCD ที่มี filter ในช่วงความยาวคลื่นตรงกันกับสารเรืองแสงเหล่านั้นในการจับภาพ

การประยุกต์ใช้เทคนิค Western blot นั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการทำงานแต่ทั้งนี้ โดยหลักการพื้นฐานแล้วคือต้องการดูความจำเพาะของโปรตีนเป้าหมายในตัวอย่างกับแอนติบอดีที่ติดฉลาก การนำหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้ เช่น งานทางด้าน immunohistochemistry, ELISA หรือการทำตรวจยืนยัน HIV test, RNAi และงานอื่น ๆ ที่ต้องการดูการแสดงออกของโปรตีน

6. เทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์กับการทำงานวิจัยในปัจจุบัน ซึ่งในงานวิจัยต่าง ๆ นั้น ต้องการผลการทดลองจากการทำ PCR ที่เชื่อถือได้ ดังนั้นในการทำการทดลองจึงต้องมีการปรับสภาพที่เหมาะสมในการทำงานที่เชื่อถือได้ เพื่อให้ผลการทดลองที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ ให้ผลิตภัณฑ์ PCR มาก และมีความไวสูง รวมทั้งลดเวลาในการทำงานที่ยืดยาวได้ องค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในการทำการทดลองทางด้าน PCR ให้ประสบความสำเร็จ คือ เอนไซม์ โดยจะต้องเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมกับการใช้งานนั้น ๆ เช่น การใช้ hot start enzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะสูงในการสังเคราะห์ DNA และยังเพิ่มความไวและผลผลิตที่ได้ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับงาน PCR ทั่วไป และงานด้าน gene expression and analysis เป็นต้น สำหรับการทำงานด้าน RT-PCR ก็เช่นเดียวกัน เอนไซม์ที่ใช้ในการทำงานกลุ่ม reverse transcriptase (RT) ก็ต้องมีคุณสมบัติที่ดีและมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์ RT ที่ถูกกำจัดเอา activity ของ RNase H ที่สามารถย่อย RNA ต้นแบบได้ออกไป จึงทำให้ได้สาย full length cDNA ที่สมบูรณ์มากขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์ในกลุ่มนี้ยังมีคุณสมบัติที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงประมาณ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้เพิ่มความจำเพาะและเพิ่มปริมาณของ DNA เมื่อนำไปทำ PCR ต่อไปได้มากขึ้น และยังมีประโยชน์กับงานวิจัยบางงานที่ต้นแบบมี GC เป็นองค์ประกอบมาก ซึ่งก่อให้เกิด secondary structure ซึ่งจะขวางกั้นไม่ให้เอนไซม์ RT ทำงานหรือ primer มาจับกับ ต้นแบบได้ การทำ RT-PCR ที่อุณหภูมิสูง ๆ จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ นอกจากนี้ถ้าต้องการศึกษาหาปริมาณของยีนจากตัวอย่างเพียงแค่ 1 ตัวอย่าง อาจทำ RT-PCR แบบ Two-step แต่ถ้าต้องการความรวดเร็ว และต้องการนำตัวอย่างไปทำ quantitative PCR ต่อไป อาจใช้วิธี one-step RT-PCR (ภาพที่ 7) ซึ่งจะสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR จากสาย RNA เริ่มต้นได้เลย โดยทำในหลอดทดลองเพียงหลอดเดียว เพื่อลดขั้นตอนในการทำงาน และสามารถลดโอกาสที่จะปนเปื้อนได้อีกด้วย เทคนิค RT-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ RNA ที่ประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสร้างสาย DNA คู่สม (complementary DNA, cDNA) จากแม่พิมพ์ RNA โดยอาศัยเอนไซม์ RT และปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์



ภาพที่ 7 เทคนิค RT-PCR

ที่มา : Brown T. A, *Essential Molecular Biology*, (New York: Oxford University Press, 2001).

สำหรับ RT ส่วนใหญ่ได้มาจาก retrovirus ซึ่งมีคุณสมบัติ โดยทั่ว ๆ ไป ดังนี้ คือ เป็น RNA-dependent DNA polymerase และ DNA-dependent DNA polymerase โดยต้องใช้ primer ร่วมในการสร้างสาย cDNA ไม่มี proof reading หรือ 3'-5' exonuclease activity และมี RNase H activity ในปัจจุบันมี RT หลายชนิดที่นำมาใช้ในการสร้างสาย cDNA ได้แก่

1. Maloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase

2. Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase

3. Taq DNA Polymerase เป็น thermostable DNA polymerase จาก *Thermus thermophilus* ที่มี reverse transcriptase activity ในภาวะที่มี Mn^{2+} อยู่ แต่ไม่มี RNase H activity

เนื่องจาก RT แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่ต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้การสร้าง cDNA จาก RNA มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับงาน จึงมีข้อพิจารณาในการเลือก RT ดังนี้

1. อุณหภูมิ การใช้อุณหภูมิสูง (50-70°C) ในปฏิกิริยา reverse transcription จะช่วยขจัดปัญหาการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของแม่พิมพ์ RNA และช่วยเพิ่มความจำเพาะของ primer ในการจับกับแม่พิมพ์ อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิสูงจะใช้ได้ในกรณี gene specific primers เท่านั้นไม่สามารถใช้ได้กับ primer ประเภท oligo (dT) หรือ random hexamers

2. RNase H activity ใน AMV และ MMLVRT เป็นเอนไซม์ที่มี RNase H activity ซึ่งสามารถย่อยสลาย RNA ในสาย RNA : DNA hybrid ในขณะที่มีการสร้างสาย cDNA ดังนั้นในการทำ RT-PCR จำเป็นต้องคำนึงถึงขนาดของ cDNA ที่ต้องการว่ามีขนาดยาวมากน้อยเพียงใด ถ้าต้องการ cDNA ที่มีความยาวสมบูรณ์ ควรจะเลือกใช้ RT ที่ปราศจาก RNase H activity

3. ความต้องการ divalent ion เอนไซม์ส่วนใหญ่ต้องการ divalent ion ในการทำงาน เอนไซม์ที่ใช้ Mg^{2+} สามารถสร้างสาย cDNA ได้ถูกต้องแม่นยำกว่าเอนไซม์ที่ใช้ Mn^{2+} เนื่องจาก Mn^{2+} มีผลต่อความถูกต้องแม่นยำในการสร้างสาย cDNA

การเลือกชนิดของ primer มีผลต่อขนาดและความจำเพาะของสาย cDNA ที่สร้างขึ้นในขั้นตอน reverse transcription primer ที่ใช้ในการสร้างสาย cDNA มี 3 แบบ คือ

1. Random hexamers เป็นไพรเมอร์ที่มักใช้ในกรณีที่แม่พิมพ์ RNA มีโครงสร้างทุติยภูมิ ซึ่งทำให้การสร้างสาย cDNA ทำได้ลำบาก การใช้ primer แบบนี้ RNA ทั้งหมดสามารถทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์สำหรับสร้างสาย cDNA ได้ ประมาณ 90% ของ cDNA ทั้งหมดได้จาก ribosomal RNA ส่วนขนาดของ cDNA ที่สร้างขึ้น จะขึ้นกับอัตราส่วนระหว่าง primer กับแม่พิมพ์ RNA ในปฏิกิริยา ซึ่งจะต้องปรับอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ cDNA ในขนาดที่ต้องการ

2. Oligo (dT) primer เป็น primer ที่จำเพาะต่อสาย RNA ที่มี poly (A) ซึ่งมีปริมาณ 1-4% ของ eukaryotic RNA ทั้งหมด ปริมาณของ cDNA ที่ได้จากการใช้ primer แบบนี้จะน้อยกว่าการใช้ random hexamers แต่ cDNA ที่ได้ส่วนใหญ่มีความยาวที่สมบูรณ์ (full length cDNA)

3. Gene specific primers การใช้ primer ชนิดนี้จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของแม่พิมพ์ RNA ที่สนใจอยู่ เพื่อใช้ในการออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อแม่พิมพ์ RNA ที่สนใจเท่านั้น cDNA ที่สร้างขึ้นจึงเป็น cDNA ที่ต้องการเท่านั้น ซึ่งช่วยให้ความจำเพาะในการทำ PCR มีมากขึ้น

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในพวุกยูคาริโอตโดยใช้ RT-PCR มีข้อพึงระวังการเกิดผลบวกเท็จจากการเตรียมตัวอย่าง RNA ที่ไม่บริสุทธิ์ ทำให้มี DNA ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง วิธีการในการป้องกันปัญหานี้มี 2 แบบ คือ

1. การใช้ DNase เพื่อขจัด DNA ในตัวอย่าง

2. การออกแบบ primer ซึ่งสามารถแยกได้ว่า PCR products ที่สร้างขึ้นมาจากแม่พิมพ์ RNA หรือ DNA ซึ่งการออกแบบ primer มีได้ 2 วิธี คือ

2.1 ออกแบบ primer ให้มีตำแหน่งอยู่ใน exon ที่ต่างกัน เช่น primer เส้นแรกมีตำแหน่งใน exon 1 และ primer อีกเส้นมีตำแหน่งอยู่ใน exon 2 การออกแบบ primer ในลักษณะนี้ จะทำให้สามารถแยกได้ว่า PCR product มาจากแม่พิมพ์ DNA หรือ RNA โดย PCR product จากแม่พิมพ์ DNA จะมีขนาดใหญ่กว่า PCR product ที่สร้างจากแม่พิมพ์ RNA

2.2 ออกแบบ primer ให้มีตำแหน่งคร่อมสอง exons ซึ่งจะทำให้ primer ลักษณะนี้ไม่สามารถเพิ่มขยายแม่พิมพ์ที่เป็น DNA ได้

รูปแบบการทำ RT-PCR มี 2 รูปแบบ คือ

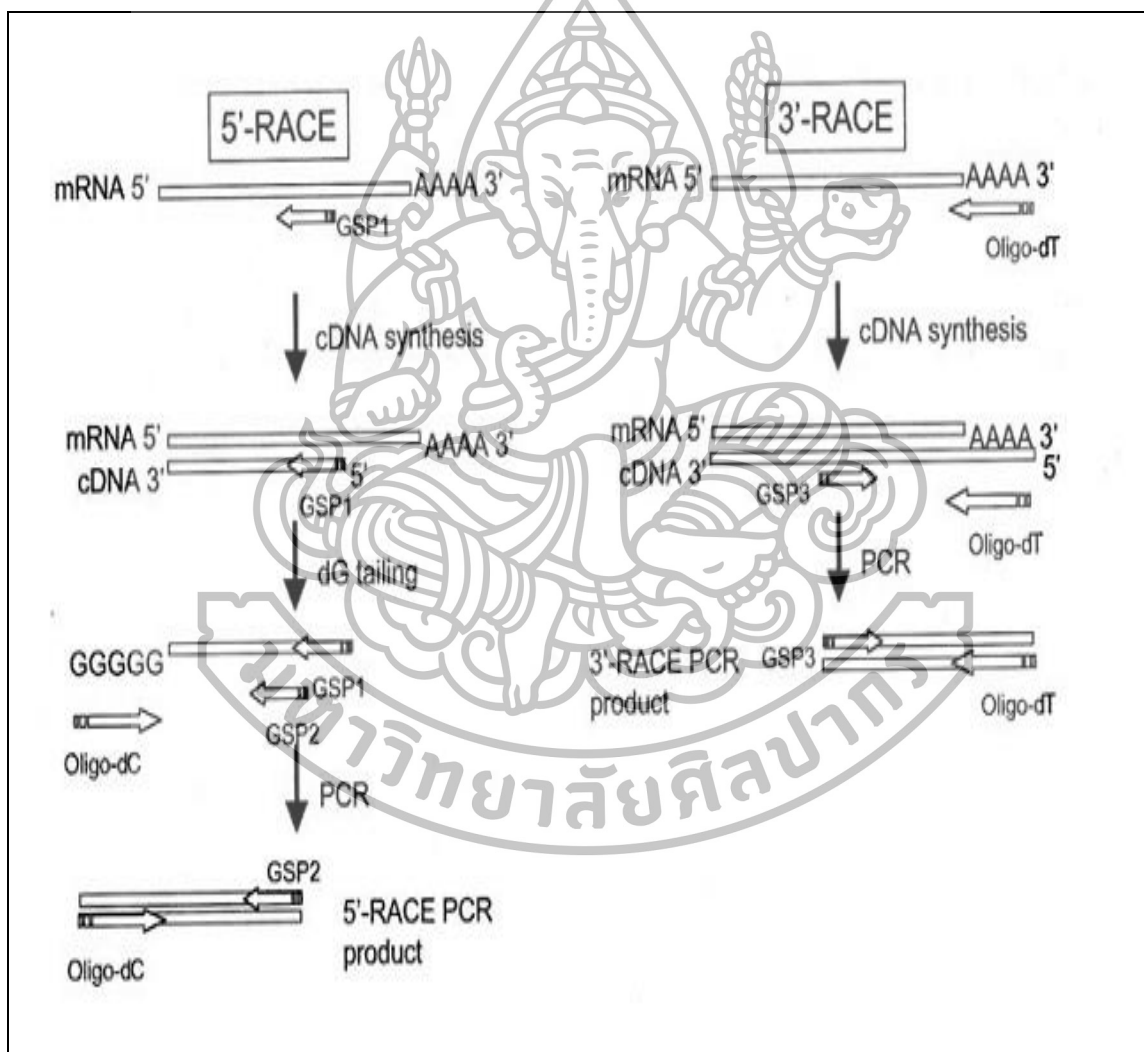
1. แบบขั้นตอนเดียว (One-step RT-PCR) RT-PCR แบบนี้ ทั้งปฏิกิริยา reverse transcription และ PCR จะเกิดต่อเนื่องภายในหลอดเดียวกัน primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription จะต้องใช้ gene specific primers เท่านั้น จะใช้ primer ชนิดอื่นไม่ได้ ข้อดีของการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว คือ ลดระยะเวลาที่ใช้ในการทำเนื่องจากปฏิกิริยาเกิดในหลอดเดียว การดูดถ่ายสารละลายต่าง ๆ จึงน้อยกว่า และยังช่วยลดความผิดพลาดในการดูดถ่ายด้วย ลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน เนื่องจากไม่ต้องมีการดูดถ่ายสารละลายจากหลอดปฏิกิริยาแรกไปทำปฏิกิริยาต่อในหลอดที่สอง เพิ่มความไวและความจำเพาะของการสร้างสาย cDNA เนื่องจากขั้นตอนการสร้างสาย cDNA สามารถใช้อุณหภูมิสูงได้ (เนื่องจากเอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง) ทำให้สามารถลดปัญหาแม่พิมพ์เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ cDNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในหลอดจะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR

2. แบบสองขั้นตอน (Two-step RT-PCR) ในขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนการทำ reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA โดยใช้แบบใดก็ได้ ในขั้นตอนที่สอง cDNA ที่ได้จากหลอดแรกจะถูกนำมาใช้ในการทำ PCR ต่อในหลอดที่สอง ข้อดีของการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน คือ สามารถปรับสภาพให้เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา reverse transcription และ PCR เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดทั้งสองปฏิกิริยา สามารถนำ cDNA ที่ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription ไปใช้ประยุกต์ในการทำ PCR ที่จำเพาะต่อยีนต่าง ๆ และใช้ในงานวิเคราะห์ต่าง ๆ ได้มากมาย เมื่อใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ร่วมกับ thermostable DNA polymerase ที่เหมาะสม สามารถใช้เพิ่มขยาย RNA ที่มีขนาดยาวถึง 14 กิโลเบสได้

7. เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) เป็นวิธีการที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA จาก mRNA ส่วนหนึ่ง จากบริเวณภายในโมเลกุลที่ทราบลำดับเบสถึงปลาย 3' หรือปลาย 5' ของ mRNA ข้างใดข้างหนึ่ง (ภาพที่ 8) วิธีที่กล่าวมานี้เคยมีผู้อธิบายไว้ เรียกว่า one-sided PCR หรือ anchored PCR 3' และ 5' ซึ่ง RACE เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้กับยีนที่ทราบลำดับเบสช่วงสั้น ๆ ที่อยู่

ส่วนกลางของโมเลกุลของ mRNA ชนิดหนึ่ง กระบวนการดังกล่าวนี้ช่วยให้สามารถเพิ่มปริมาณส่วนของ cDNA ที่ยังไม่ทราบลำดับเบสตั้งแต่ช่วงกลางที่มี primer ที่จำเพาะ (gene specific primer; GSP) สำหรับยีนนั้นถึงปลาย 5' หรือปลาย 3' โดยต้องทราบลำดับเบสในช่วงกลางของยีนนั้นเป็นช่วงสั้น ๆ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ primer ที่จำเพาะ (GSP) ดังกล่าว ทั้ง 2 วิธีเริ่มจากสังเคราะห์ cDNA สายแรกจาก mRNA โดยใช้เอนไซม์ RT แล้วจึงเพิ่มปริมาณ cDNA สายนี้โดยวิธี PCR ซึ่งวิธี RACE นี้ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณและโคลน mRNA ที่มีปริมาณน้อย ๆ ผลผลิตที่ได้สามารถนำไปหาลำดับเบสโดยตรง ใช้เป็นโพรบหรือนำมารวมกันเพื่อทำให้เกิด cDNA ที่สมบูรณ์ก็ได้



ภาพที่ 8 เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

ที่มา: White A. B, PCR Cloning Protocols from Molecular Cloning to Genetic Engineering. (New Jersey: Humana Press, 1997).

3' RACE เริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้เอนไซม์ RT มีเบส T สายสั้น ๆ ต่ออยู่กับ anchor base เป็น primer (anchor base คือ oligonucleotides ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยมีลำดับเบสที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2-3 ชนิด เพื่อใช้ในการต่อขึ้น DNA ที่ได้กับเวกเตอร์ในภายหลัง อาจจะเรียกว่า anchor primer ก็ได้) เมื่อได้ cDNA สายแรกแล้วจึงย่อย RNA ต้นแบบออกไป โดยใช้เอนไซม์ RNase H แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA สายเดี่ยวที่ได้โดยวิธี PCR ใช้ primer 2 ชนิด คือ anchor primer กับ primer ที่จำเพาะสำหรับบริเวณส่วนกลางของยีน (internal sense primer) ผลผลิตที่ได้คือ บริเวณปลาย 3' ของยีนที่ต้องการ

5' RACE เริ่มโดยสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยเอนไซม์ RT โดยใช้ primer ที่จำเพาะ (internal antisense primer) เติมเบส A เข้าที่ปลาย 3' โดยใช้เอนไซม์ terminal transferase (TdT) ย่อย RNA โดยใช้เอนไซม์ RNaseH แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ได้นี้ โดยเทคนิค PCR ใช้ primer ที่จำเพาะร่วมกับ anchor primer (primer ที่มีส่วนของบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2-3 ชนิดต่ออยู่กับเบส T สายสั้น ๆ) จะได้ขึ้น DNA จากบริเวณปลาย 5' ของยีนถึงส่วนของ primer ที่ใช้

8. การแสดงออกของโปรตีน (Expression Protein)

การทำ protein expression เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่เป็นทางเลือกให้กับนักพันธุวิศวกรรมที่ต้องการจะผลิตโปรตีนที่ต้องการศึกษาในเวกเตอร์ที่ต้องการ โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยปกติแล้วในสิ่งมีชีวิตทั่วไปมีการผลิตโปรตีนในเซลล์อยู่แล้ว ซึ่งโปรตีนบางตัวถูกผลิตมากบ้าง น้อยบ้าง ดังนั้นหากจะทำการสกัดโปรตีนเหล่านั้นออกมาเพื่อศึกษาอาจจะเป็นการยากหรือต้องใช้เวลาาน ดังนั้นจึงมีเทคนิคที่เรียกว่าการตัดต่อยีนเข้าเวกเตอร์และทำการย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (ตารางที่ 3) ที่มีให้เลือกทั้งโปรคาริโอต เช่น *E.coli* หรือ ยูคาริโอต เช่น yeast, insect cell, mammalian cell เรียกโปรตีนที่ได้ว่าโปรตีนเชื่อมต่อหรือโปรตีนลูกผสม (recombinant protein)

การแสดงออกของยีน เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ protein expression เพราะยีนเป็นแม่พิมพ์หรือต้นแบบให้มีการสร้าง RNA และโปรตีนออกมา ดังนั้นการแสดงออกของยีนจึงมีผลผลิตเป็นโปรตีน ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของยีน ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการถอดรหัสจาก DNA เป็น RNA ส่งข่าว (mRNA) และขั้นตอนการแปลรหัสจากลำดับเบสของ mRNA เป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ส่วนใหญ่ในแบคทีเรียจะเกิดการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนการแปลรหัส ส่วนในยูคาริโอตมีการควบคุมที่ซับซ้อนกว่าเนื่องจากโปรตีนมีความซับซ้อน

ตารางที่ 3 ข้อดีและข้อเสียของการใช้เซลล์เจ้าบ้านต่าง ๆ

เซลล์เจ้าบ้าน	ข้อดี	ข้อเสีย
1. <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้ได้กับ DNA ทั่วไป - ควบคุมการแสดงออกของยีนได้ง่าย - ผลผลิตของโปรตีนสายผสมสูงถึง 50%ของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ - เจริญเติบโตง่าย - โปรตีนลูกผสมอยู่ในรูปของโปรตีนเชื่อมต่อ - ออกแบบให้มีการสร้างโปรตีนสายผสมออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ (extracellular) 	<ul style="list-style-type: none"> - โปรตีนสายผสมไม่มี post-translational modification - คุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนต่างจากโปรตีนในธรรมชาติ - แบคทีเรียแกรมลบมี endotoxin สูง - ถ้ามีการแสดงออกมากเกินไป (over expression) จะเกิดการรวมตัวของโปรตีนในรูป inclusion bodies ทำให้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ยาก
2. Yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่มี endotoxins - ไม่ทำให้เกิดโรคในคน - มีกระบวนการ glycosylation - นำไปใช้ในระบบ large scale ได้ 	<ul style="list-style-type: none"> - ควบคุมการแสดงออกของยีนได้ยาก - การใช้ดีเอ็นเอพาหะสำหรับยีสต์ยังยุ่งยากและไม่สะดวก - กระบวนการ glycosylation ไม่เหมือนในสัตว์
3. เซลล์แมลง (cultured in insect cells)	<ul style="list-style-type: none"> - baculovirus vector - มีกลไกในการสร้างโปรตีนได้หลายชนิดเหมาะสำหรับโปรตีนของยูคาริโอตชั้นสูง - ปลอดภัย เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตจาก baculovirus ผ่าน FDA approved 	<ul style="list-style-type: none"> - ขาดข้อมูลของกระบวนการ glycosylation - โปรตีนสายผสมมีคุณสมบัติไม่ถึง 100%
4. mammalian cell	<ul style="list-style-type: none"> - คุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนเหมือนกับโปรตีนในธรรมชาติ - การเพาะเลี้ยงสามารถทำได้ในปริมาณมากๆ 	<ul style="list-style-type: none"> - มีความยุ่งยากในการเพาะเลี้ยงเซลล์และราคาแพง - การเจริญเติบโตของเซลล์ช้า - พันธุกรรมของเซลล์ไม่เสถียรภาพ - ปริมาณโปรตีนสายผสมที่ได้มีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์

ในแบคทีเรียการแสดงออกของโปรตีนจะมีการแสดงออกที่มีผลควบคุมมาจากยีนที่เป็นลักษณะเป็นกลุ่มเรียกว่า โอเพอรอน (operon) ซึ่งประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) ยีนควบคุม (regulatory gene) และบริเวณบังคับการ (control site) ซึ่งแบ่งเป็นสองส่วนย่อยคือ ยีนส่งเสริม (promoter gene, p) และยีนดำเนินการ (operator gene, o) ยีนควบคุมและยีนโครงสร้างจะมีข้อมูลพันธุกรรมที่จะถูกถอดรหัสเป็น mRNA แล้วแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต่อไป ในกระบวนการแสดงออก (expression) ของยีนโครงสร้างหรือการสร้างโปรตีนจากยีนโครงสร้าง เอนไซม์ RNA polymerase จะเข้าจับที่ promoter แล้วเคลื่อนไปยังยีนโครงสร้างเพื่อสังเคราะห์ mRNA แต่ถ้ามีตัวกีดกันมาจับที่ operator gene จะทำให้ RNA polymerase เข้าจับที่ promoter ไม่ได้ การสร้างโปรตีนก็จะถูกยับยั้งซึ่งเป็นที่มาของทฤษฎีโอเพอรอน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงใช้หลักการนี้ในการสร้างโปรตีนลูกผสมที่ต้องการในเซลล์แบคทีเรียได้ โดยใช้ inducer ชักนำให้มีการผลิตโปรตีนให้มาก ๆ

9. เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) คือ ปฏิกริยาการใช้ แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ หลักการของวิธีนี้คือ แอนติเจนหรือแอนติบอดีเกาะอยู่บน solid phase เช่น cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl หรือ polypropylene solid phase เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของ tube bead หรือ microplate และปฏิกริยาในแต่ละขั้นตอนจะต้องมีการแยกเอาสารส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกริยาออกไป จึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง เอนไซม์ที่นิยมใช้ในวิธีการ ELISA คือ Horseradish peroxidase (substrate ที่นิยม คือ O-phenylene diamine ให้สีน้ำตาล), alkaline phosphatase (substrate ที่นิยมคือ p-nitrophenyl phosphate ให้สีเหลือง) เป็นต้น สำหรับวิธีการ ELISA แบ่งได้หลายวิธีคือ

9.1 Indirect method เป็นวิธีการวิธีสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่าง ๆ มีหลักการ คือ แอนติบอดีจะทำปฏิกริยากับแอนติเจนที่ติดอยู่กับพื้นผิวของ solid phase และใช้ anti-human immunoglobulin ซึ่งติดฉลาก (conjugate) ด้วยเอนไซม์ (enzyme-labelled detector antibody) หรืออาจใช้ anti-human immunoglobulin ที่ไม่ได้ติดฉลากเป็น detector antibody แล้วตามด้วย enzyme-labeled anti-detector antibody เข้าทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหา นั่นการย่อย substrate จะมากขึ้นเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณของ antibody ในสิ่งส่งตรวจ

9.2 Double antibody sandwich method เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจน โดยการเคลือบพื้นผิว solid phase ด้วยแอนติบอดี แอนติเจนในสิ่งส่งตรวจทำปฏิกริยากับแอนติบอดี หลังจากนั้นจะเติมแอนติบอดีซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme-labelled detector antibody)

แล้วตามด้วย enzyme-labelled anti-detector ลงไปให้ทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง วิธีนี้แอนติเจนจะอยู่ตรงกลางมี antibody ประกอบด้านล่างและด้านบน

9.3 Competitive method วิธีการนี้ตรวจหาได้ทั้งแอนติเจนหรือแอนติบอดี ถ้าต้องการหาแอนติบอดีทำได้ 2 วิธี คือ

9.3.1 เคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจน หลังจากนั้นจะเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ปริมาณแน่นอนลงไปพร้อมกับสิ่งส่งตรวจซึ่งคาดว่าจะมีแอนติบอดีอยู่ลงไป ให้แย่งกันจับแอนติเจนที่อยู่ใน solid phase

9.3.2 เคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดี หลังจากนั้นจะเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป พร้อมกับสิ่งส่งตรวจซึ่งคาดว่าจะมีแอนติบอดีอยู่ลงไปให้แอนติบอดีทั้งสองแย่งกันจับกับแอนติเจนที่ติดฉลาก และมีปริมาณจำกัดที่เติมลงไปนั้น ถ้าต้องการหาแอนติเจนก็ทำได้ 2 วิธี เช่นกัน คือ

9.3.2.1 เคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดี หลังจากนั้นจะเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ปริมาณแน่นอนลงไปพร้อมกับสิ่งส่งตรวจซึ่งคาดว่าจะมีแอนติเจนอยู่ลงไป ให้แย่งกันจับกับแอนติบอดีที่อยู่ใน solid phase

9.3.2.2 เคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจน หลังจากนั้นจะเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ไปพร้อมกับสิ่งส่งตรวจซึ่งคาดว่าจะมีแอนติเจนอยู่ลงไป โดยให้แอนติเจนทั้งสองแย่งกันจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากและมีปริมาณจำกัดที่เติมลงไปนั้น

ปริมาณ substrate ที่ถูกย่อยจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณแอนติเจนหรือแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจนั้นนอกจากนี้ ยังมีการดัดแปลงวิธีการ ELISA ออกไปอีก เช่น การใช้วิธี anti-IgM method เพื่อการตรวจหา specific IgM หรือ inhibition method ในการตรวจหาแอนติเจนต่าง ๆ เป็นต้น

เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูงมากทั้งนี้ยังไม่มีอันตรายจากสารที่ได้ จึงเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการหาแอนติเจนและแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอนติบอดีต่อเชื้อจุลชีพต่าง ๆ เช่น แอนติบอดีต่อ Rubella ไวรัสตับอักเสบบี หรือ โรคติดต่อเชื้อปรสิตต่าง ๆ เป็นต้น autoantibodies ชนิดต่าง ๆ เช่น anti DNA, antithyroglobin, rheumatoid factor เป็นต้น oncofetal antigen เช่น alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen เป็นต้น แอนติเจนต่อจุลชีพ เช่น HBs Ag, Rotavirus เป็นต้น และฮอร์โมนและยาต่าง ๆ

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ หนูถีบจักรสายพันธุ์ Institute of Center Research (ICR) เพศเมีย อายุประมาณ 7 สัปดาห์ จำนวน 50 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อใช้ในการติดเชื้อระยะติดต่อเซอร์คาเรีย (cercariae) ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* และเก็บตัวอย่างซีรัมจากหนูถีบจักรที่ติดเชื่อดังกล่าว เพื่อใช้ในการทดสอบกับแอนติเจนที่จำเพาะของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยนำมาเลี้ยงที่ห้องควบคุมแสง วงจรความสว่าง-ความมืด (light-dark cycle) เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส และควบคุมไฟให้เปิดในช่วงเวลา 6.00-18.00 น. หนูทดลองได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ขั้นตอนการใช้สัตว์ทดลองจะดำเนินการตามข้อกำหนดจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สภาวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) โดยงานวิจัยนี้ได้ขออนุมัติจรรยาบรรณการทำวิจัยในสัตว์จากคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดลแล้ว (FTM-ACUC 006/2005)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 เชื้อแบคทีเรีย

2.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอสายผสมในการโคลนยีน (gene cloning)

2.1.2 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการโคลนดีเอ็นเอสายผสมในการแสดงออกของยีน (gene expression)

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 Luria-Bertani (LB) Broth medium

2.2.2. Luria-Bertani (LB) Broth agar

2.3 เอนไซม์

2.3.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI

2.3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI

- 2.3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI
- 2.3.4 เอนไซม์ T4 DNA ligase
- 2.3.5 เอนไซม์ Taq DNA Polymerase

2.4 เครื่องมือ

- 2.4.1 กล้องจุลทรรศน์ แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)
- 2.4.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (The balance of quality)
- 2.4.3 เครื่องแยก Protein (Polyacrylamide gel electrophoresis)
- 2.4.4 เครื่องแยก DNA (Agarose gel electrophoresis)
- 2.4.5 เครื่องเคลื่อนย้ายโมเลกุลของโปรตีน ชนิดกึ่งแห้ง (Semi-Dry Transfer)
- 2.4.6 ตู้เขี่ยเชื้อ (Air laminar flow)
- 2.4.7 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 2.4.8 เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)
- 2.4.9 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 2.4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 2.4.11 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)
- 2.4.12 เครื่องให้ความร้อนแบบแห้ง (Heat block)
- 2.4.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 2.4.14 เครื่องมือที่ใช้วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 2.4.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 2.4.16 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (ELISA Reader)
- 2.4.17 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 2.4.18 เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycle)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

นำไข่ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ได้มีการรักษาตามวงจรชีวิตในหนูทดลอง ที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล มาเพาะเลี้ยงในถาดที่มีน้ำกรองปราศจากคลอรีน ส่องไฟเพื่อกระตุ้นให้ตัวอ่อนระยะไมราซิเดียม (miracidium) ออกมา เพื่อนำตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมใส่ในถาดที่เลี้ยงหอย *N. aperta* อยู่ หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงหอยที่มีตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมประมาณ 6-7 สัปดาห์ นำหอยดังกล่าวมาส่องไฟทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจะเห็นพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะติดต่อเซอร์คาเรีย (cercariae) ว่ายนํ้าอยู่ จากนั้นนำพยาธิระยะติดต่อ

เซอร์คาเรียทำให้เกิดการมาติดเชื้อในหนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR ด้วยวิธีการทำให้หนูสลบด้วยยาสลบ Pentobarbital (Nembutal®) ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยการฉีดยาสลบเข้าทางช่องท้องหนู เมื่อประเมินว่าหนูสลบแล้วจึงโกนขนที่หน้าท้องของหนู เพื่อนำพยาธิระยะติดต่อเซอร์คาเรียไปผ่าน ผิวหนังหน้าท้องของหนู ซึ่งหนูแต่ละตัวจะได้รับการติดเชื้อพยาธิระยะติดต่อเซอร์คาเรีย จำนวน 30 ตัว หลังจากนั้นเลี้ยงหนูโดยให้น้ำและอาหารตามปกติ จากนั้นจะเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย จากหนูตามระยะเวลาภายหลังการติดเชื้อ 8 สัปดาห์ โดยทำให้หนูสลบ ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide; CO₂) และเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยใช้วิธีการ perfusion ด้วยน้ำเกลือ (Normal saline solution) ความเข้มข้น 0.85% เพื่อให้พยาธิออกจากเส้นเลือด mesentery ในลำไส้หนูออก แล้วล้างพยาธิที่ได้ล้างด้วย น้ำเกลือ ความเข้มข้น 0.85% หลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้ตัวพยาธิสะอาด เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนการเตรียม แอนติเจนจากตัวพยาธิโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

ตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ถูกเก็บรวบรวมจากท่อน้ำดีในตับของโคที่ติด เชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จากโรงฆ่าสัตว์หุบกะพง อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี โดยใช้มีดกรีดตาม ทางเดินน้ำดีในตับ ถ้ามีการติดเชื้อพยาธิจะพบตัวพยาธิอยู่ในท่อน้ำดี ระวังไม่ให้มีดกรีดโดนตัวพยาธิ แล้วเก็บเอาตัวพยาธิใส่ในขวดที่มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ที่ปลอดเชื้อโรค จากนั้นคัดเลือกเอา เฉพาะพยาธิที่ยังมีชีวิตอยู่ และไม่มีอาการฉีกขาดของตัวพยาธิ ตลอดจนมีการเคลื่อนไหวที่ดี มาล้างด้วย น้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% หลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้ตัวพยาธิสะอาด ตัวอย่างพยาธินำมาใช้ในการ ทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่นในขั้นตอนต่อไป โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศา เซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.3 การเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

ตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะ เวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ตัวอย่างพยาธินำมาใช้ในการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับ พยาธิชนิดอื่นในขั้นตอนต่อไป โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การเก็บตัวอย่างชีรรม

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างชีรรมของหนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR ก่อนที่จะ ได้รับการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และหลังจากหนูได้รับการติดเชื้อพยาธิแล้ว จะเก็บ ตัวอย่างชีรรมทุก ๆ สัปดาห์ จนถึงสัปดาห์ที่ 8 ภายหลังจากการติดเชื้อ โดยใช้วิธีเก็บเลือดจากทางหางของ หนู ซึ่งหนู 1 ตัวจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 100-200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจะปล่อยให้เลือด แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนชีรรม แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งานในขั้นตอนการตรวจหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดี

3.5 การเตรียมแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิ

นำพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* อายุ 8 สัปดาห์ ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้ในข้อ 3.3.1 มาบดในสารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA) ที่มี protease inhibitors (1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 0.01 nM pepstain A) บดตัวพยาธิจนละเอียดทำในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกตีมากยิ่งขึ้น โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ultrasonic disintegrator (vibra cell amplitude) ซึ่งใช้ความถี่สูงครั้งละ 1 นาที แล้วพัก 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 10 ครั้ง ด้วยการทำในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลาเช่นกัน หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บสารละลายใสส่วนบน ซึ่งเป็นแอนติเจนชนิดสารสกัดจากตัวพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* นำตัวอย่างโปรตีนที่ได้ไปหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay แล้วจึงเก็บตัวอย่างโปรตีน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนการหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

ตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ที่ได้ในข้อ 3.2 และพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ได้ในข้อ 3.3 ดำเนินการเตรียมตัวอย่างโปรตีนแอนติเจนในขั้นตอนเดียวกันนี้เพื่อใช้ในการทดสอบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น

3.6 การแยกแอนติเจนชนิดสารสกัดของพยาธิ ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำแอนติเจนของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มาแยกวิเคราะห์จำแนกองค์ประกอบโดยใช้วิธี SDS-PAGE ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Laemmli (1970) เป็นวิธีการแยกสารชีวโมเลกุลออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยคุณสมบัติของความแตกต่างกันของชนิดและปริมาณประจุ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ polyacrylamide gel แบบ discontinuous โดยเตรียม polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 12.5% SDS-PAGE separating gel และ 4% SDS-PAGE stacking gel สำหรับวิธีการทดลองจะอธิบายพอสังเขปดังนี้ การเตรียมสารละลายผสม 12.5% SDS-PAGE separating gel ที่มีความหนาของแผ่นเจล 0.75 มิลลิเมตร ค่อย ๆ เติมสารละลายผสม 12.5% SDS-PAGE separating gel ลงระหว่างแผ่นกระจก (ปริมาตร 3.6 มิลลิลิตรต่อ SDS-PAGE gel 1 แผ่น) จากนั้นปิดด้านหน้าของเจลด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50-100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้แข็งตัว (complete polymerization) ประมาณ 45-60 นาที แล้วเติมสารละลาย 4% SDS-PAGE stacking gel ลงไปด้านบนของ SDS-PAGE separating gel จึงใส่ comb ลงไปพยายามอย่าให้เกิด

ฟองอากาศ จากนั้นปล่อยให้แข็งตัวอย่างสมบูรณ์ประมาณ 45-60 นาที จากนั้นนำไปทำการแยกแอนติเจนต่อไป

การเตรียมแอนติเจนที่จะนำมาแยกส่วน polypeptides ทำได้โดยทำการผสมแอนติเจนชนิดสารสกัดของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับสารละลาย loading buffer 2X (bromphenol blue) ในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มใน heat block ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำสารละลายตัวอย่างแอนติเจนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปหยอดลงในช่องเจลของ 12.5% SDS-PAGE gel ที่ผ่านการเตรียมมาเรียบร้อยแล้ว โดยให้ความเข้มข้นอยู่ที่ 30 ไมโครกรัมต่อช่องเจล ทำการแยกองค์ประกอบโดยใช้ชุด mini vertical electrophoresis system (Hofer) และ power supply (Hofer) ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 120 volts, 400 mA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ Tris-glycine ที่มี SDS อยู่ด้วยเป็น running buffer และมี standard molecular weight marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) ทำการแยกควบคู่ไปด้วยมีปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อช่องเจล หลังจากแยกแอนติเจนเรียบร้อยแล้ว นำแผ่นของ SDS-PAGE gel ไปย้อมสี coomassie brilliant blue R-250 เพื่อดูแถบโปรตีนแอนติเจนที่แยกได้แต่ละแถบและหาน้ำหนักโมเลกุล หรือนำไปทำการย้ายแถบของโปรตีนจากแผ่น SDS-PAGE gel ลงสู่แผ่น polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane เพื่อนำไปทำ western blot เพื่อหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ต่อไป

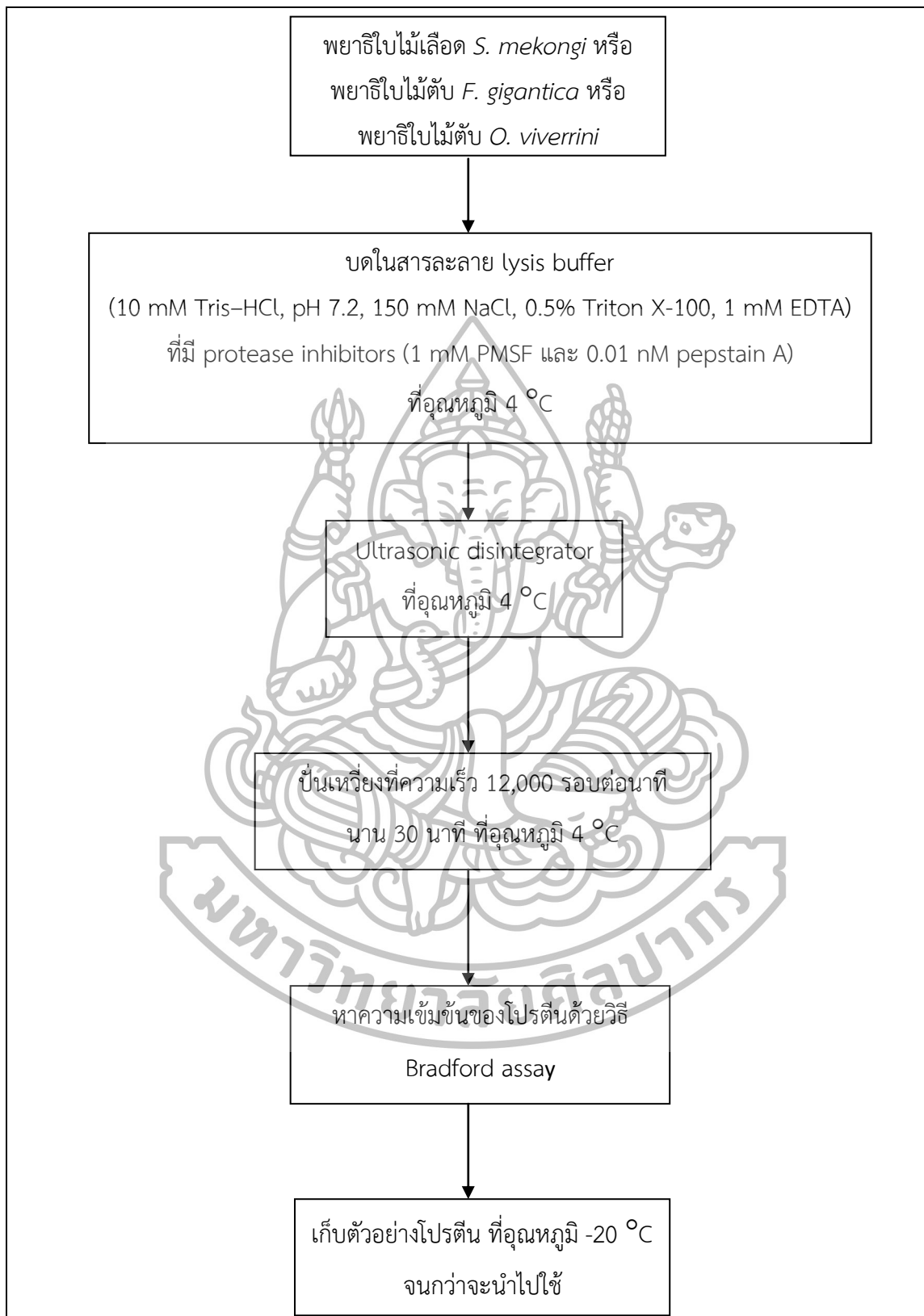
ตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้ถูกนำมาวิเคราะห์จำแนกแอนติเจนด้วยวิธีเดียวกันกับขั้นตอนในข้างต้น เพื่อใช้ในการทดสอบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น

3.7 การย้อมสี SDS-PAGE gel ที่แยกแอนติเจนชนิดสารสกัดของพยาธิ

นำแถบโปรตีนของแอนติเจนชนิดสารสกัดพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ใน SDS-PAGE gel ที่ถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว จะถูกนำมาย้อมสีด้วยสารละลาย 0.1% coomassie brilliant blue R-250 ไม่น้อยกว่า 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไป destaining ด้วยสารละลาย destaining solution จนกระทั่งเจลบริเวณที่ไม่มีโปรตีนสี โดยการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลจะเทียบกับ standard molecular weight marker ที่ทำควบคู่กันไป

3.8 การย้ายแถบของโปรตีนแอนติเจนจากแผ่น SDS-PAGE gel ลงสู่แผ่น PVDF

ทำการย้ายแถบของโปรตีนจากแผ่น SDS-PAGE gel ลงสู่แผ่น PVDF membrane โดยวิธี electrotransblot ซึ่งการย้ายแถบโปรตีนแอนติเจนนี้ใช้เครื่อง Semi Dry transfer unit (Hofer) และเครื่อง power supply (Hofer) มีวิธีการดังนี้ คือ นำเอาแผ่น PVDF membrane ที่มีขนาด 7 x 8 เซนติเมตร และแผ่นกระดาษ Whatman ที่มีขนาดเดียวกัน มาแช่ในสารละลาย



ภาพที่ 9 แผนภูมิการเตรียมแอนติเจนชนิดสารสกัดจากตัวพยาธิ

transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol pH 8.3) นาน 30 นาที และเมื่อการแยกแถบโปรตีนแอนติเจนโดยวิธี SDS-PAGE เมื่อครบเวลาแล้ว นำเอา SDS-PAGE gel ออกมาจากเครื่อง Mini vertical electrophoresis system (Hofer) แล้ว จากนั้นนำมาประกอบเข้าด้วยกัน โดยให้อยู่ระหว่างกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย transfer buffer การวางซ้อนทับกันระวางอย่าให้มีฟองอากาศและขอบของแผ่นที่ซ้อนทับกันต้องเท่ากัน ทำการย้ายแถบโปรตีนแอนติเจนจากแผ่น SDS-PAGE gel ลงแผ่น PVDF membrane ด้วยเครื่อง Semi Dry transfer unit (Hoefer) โดยการเรียงลำดับจากด้านบนลงสู่ด้านล่างดังนี้

ชั้นลบ-กระดาษกรอง- SDS-PAGE gel- PVDF membrane-กระดาษกรอง-ขั้วบวก

จากนั้นต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง power supply (Hoefer) โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 1-1.5 mA/cm² และความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า 300 volt เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ภายหลังจากที่ย้ายแถบโปรตีนแอนติเจนแล้ว นำแผ่น PVDF membrane มาตัดแยกเป็นแผ่น strip ขนาดกว้างประมาณ 1 ช่องของเจล เพื่อสะดวกในการใช้งานต่อไป

3.9 การหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค Western blot

วิธีการ Western blot เป็นวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยาที่ถูกนำมาใช้ในการหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยนำแผ่น PVDF membrane strip ที่ผ่านการย้ายโปรตีนแอนติเจนของพยาธิ ในข้อ 3.3.8 แล้ว มาทำการปิดส่วน non-specific binding site โดยนำมาแช่ในสารละลาย blocking solution (5% skim milk, 2% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T)) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำแผ่น PVDF membrane แต่ละแผ่น strip จะถูกบ่มด้วยซีรัมของหนูทดลองที่ไม่มีการติดเชื้อ และซีรัมหนูทดลองที่มีการติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยใช้ซีรัมของหนูที่ติดเชื้อ 1 สัปดาห์ไปจนถึง 8 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ (สัดส่วนที่เจือจาง คือ 1:1000 ในสารละลาย blocking solution) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (Thermo Electron Corporation) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นแล้วล้างออกด้วยสารละลาย washing buffer (PBS-T) 4 รอบ รอบละ 5 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ goat anti-mouse IgG labeled horseradish peroxidase conjugate สัดส่วนเจือจาง คือ 1:5000 ในสารละลาย blocking solution ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเอา conjugate ส่วนเกินออกด้วยสารละลาย washing buffer อีก 4 รอบ รอบละ 5 นาที หลังจากนั้นดูการเกิดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย substrate solution (enhanced chemiluminescent, ECL) แล้วนำแผ่นฟิล์มมาประกบกับ PVDF membrane ที่เติมสารละลาย substrate solution แล้ว ล้างฟิล์มในห้องมืดด้วยสารละลาย

developer และสารละลาย fixer จากนั้นล้างฟิล์มด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง อ่านผลที่เกิดขึ้น แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูล โดยการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น โดยคำนวณจากค่า Rf เทียบกับ standard molecular weight marker ที่อยู่บนแผ่นเจลที่ทำการแยกโปรตีนคราวเดียวกัน

3.10 การหาชนิดของโปรตีนแอนติเจนที่จำเพาะของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยวิธี Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS)

จากผลการทำ Western blot พบว่า มีแถบโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่น่าสนใจ 2 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 31 และ 22 กิโลดาลตัน ทำการตัด gel ที่ตำแหน่งโปรตีนทั้งสองขนาด แล้วส่งวิเคราะห์ที่ proteomics service center ของ Bioservice Unit, Biotech Thailand, National and Technology Development Agency, Thailand

การวิเคราะห์ข้อมูล ion spectra ของชิ้น peptide ที่เกิดจาก mass spectrometer จะนำไประบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT (Matrix Science Ltd., London, UK) โดยใช้ฐานข้อมูล NCBI 20121026 (21171493 sequences) กำหนดค่า Taxonomy: schistosome, Fixed Modification Carbamidomethyl (C), Variable modification: Oxidation (M), peptide charge: 1+, 2+ and 3+ หลังจากที่ทำทราบชนิดของโปรตีนแล้ว ทำการวิเคราะห์ข้อมูลต่อโดยเลือกใช้ฐานข้อมูล Invertebrates EST 20121211 (95072190 sequences) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่ตรงกับโปรตีนดังกล่าว

3.11 การออกแบบ primer สำหรับโคลนยีน Cathepsin B

จากการทำนายลำดับของกรดอะมิโนในขั้นตอน LC-MS/MS และเทียบกับฐานข้อมูลชีวสารสนเทศศาสตร์ต่าง ๆ แล้ว ทำให้ทราบว่าโปรตีนแอนติเจนที่สนใจนั้นคือ โปรตีน Cathepsin B ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน Cathepsin B จึงทำการโคลนยีน Cathepsin B ซึ่งในการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนที่สร้างโปรตีน Cathepsin B ได้ ดังนี้ เริ่มจากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ฐานข้อมูล Invertebrates EST ในข้อ 3.3.10 ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Cathepsin B คือ SJS_006_19.T7 SJS *Schistosoma japonicum* cDNA, mRNA sequence (GenBank accession no. CV693366.1) จากนั้นนำไปเทียบกับข้อมูลสารสนเทศศาสตร์จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม basic local alignment search tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และโปรแกรม Clustal W (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) เพื่อหาเอ็นที่มีควมเหมือนกับยีน SJS_006_19.T7 SJS *Schistosoma*

japonicum มากที่สุด เพื่อใช้เป็นแบบในการออกแบบ primer หลังจากเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวแล้ว จึงเลือกใช้ยีน *Schistosoma japonicum* cathepsin B cDNA sequence clone SJCHGC00054 (GenBank accession no. AY814659.1) เป็นแบบในการออกแบบ primer ดังนี้

Cathepsin B forward primer (CatBFw): 5'-ATGTTGAAAATCGCAGTTTGTATTG-3'

Cathepsin B reverse primer (CatBRw): 5'-TTAGGTTTTTATAAGTCCAGCCACA-3'

3.12 การสกัด RNA จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย

ตัวอย่างพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย ถูกนำมาบดในหลอดที่มีสารละลาย TRIzol Reagent (Molecular research center, INC) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ผสมกับสารละลาย Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอด 15 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นดูดส่วนบนของสารละลายใส่หลอดใหม่โดยไม่ให้ติดตะกอนระหว่างชั้นที่เกิดขึ้น ผสมกับสารละลาย isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นล้างตะกอนอีกครั้งด้วย 100% ethanol ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำ 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) และวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ RNA ด้วยเทคนิค spectrophotometry เก็บตัวอย่าง RNA ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

3.13 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription (RT)

ผสม 50 มิลลิโมลาร์ oligo (dT)₆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ RNA ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่สกัดได้จากข้อ 3.3.12 จำนวน 1-2 ไมโครกรัม, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP (ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ 0.1% DEPC ปริมาตร 13 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ต่อมาใส่ส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ 5X first-strand buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 0.1 โมลาร์ dithiothreitol (DTT) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ III RT (200 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทำ Polymerase chain reaction (PCR)

3.14 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 3.3.13 มาเพิ่มปริมาณยีน Cathepsin B ด้วยวิธี PCR โดยออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อยีน Cathepsin B ซึ่งใช้ฐานข้อมูลสารสนเทศจาก NCBI ได้ primer ดังนี้ Forward primer (CatBFw): 5'-ATGTTGAAAATCGCAGTTTGTATTG-3' และ Reverse primer (CatBRw): 5'-TTAGGTTTTATAAGTCCAGCCACA-3' ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอมไซม์ Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และใส่ cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปรับให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มจาก Denature สายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงเข้าสู่รอบของการเพิ่มสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งหมด 35 รอบ โดยเริ่มที่การ Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที ตามด้วยขั้นตอน Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เมื่อทำการสังเคราะห์ครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อไปที่ 72 องศาเซลเซียสอีก 10 นาที นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ตรวจสอบการเรืองแสงของ DNA โดย UV transilluminator

3.15 การโคลนยีน Cathepsin B

3.15.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน Cathepsin B กับพลาสมิด pGEM[®]-T easy

คัดเลือกแถบ DNA และตัดแถบ DNA ของยีน Cathepsin B ที่ได้จากการทำ PCR ออกจาก agarose gel แยกชิ้น DNA จากเจล โดยใช้ PCR clean-up Gel extraction (NucleoSpin, Germany) โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต ซึ่งเจลและบัฟเฟอร์ที่กั้นน้ำหนักรวมแล้ว เติมน้ำบัฟเฟอร์ NT1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที เพื่อให้เจลละลาย ดูดสารละลายใส่ลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม เทสารละลายส่วนใสทิ้ง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นปั่นคอลัมน์อีกครั้ง เพื่อให้คอลัมน์แห้ง โดยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม นาน 3 นาที หลังจากนั้นนำคอลัมน์ย้ายลงในหลอดใหม่ เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัด DNA ออกจากเจลมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T easy vector ซึ่งเป็น Cloning vector (Promega, USA) โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต โดยใช้

insert DNA (ยีนโปรตีน Cathepsin B) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, pGEM[®]-T easy vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2X ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ T4 DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

3.15.2 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยกระบวนการ Transformation

นำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยวิธี heat shock transformation ดังนี้ นำ DNA สายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube ที่มี competent cells ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำกลับมาแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นแบ่งเชื้อแบคทีเรียในหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติม 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับ Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (Blue/white Screening) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.15.3 การคัดเลือกและตรวจสอบโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

คัดเลือกโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่สามารถเจริญบนอาหาร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicilin, X-gal และ IPTG (Blue/White Screening) ซึ่งใช้เป็น selective medium ใช้ไม้จิ้มฟันที่อบฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.15.4 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit

การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit ตามวิธีการของผู้ผลิต (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนแบคทีเรียด้วย Resuspension solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดเซลล์ใส่ในหลอด microtube แล้วเติม Lysis solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับ

หลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง จากนั้นเติม Neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่ลงใน column GeneJET spin และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้างโปรตีนที่เหลืออยู่ด้วย Wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม เทสารละลายใส่ทิ้ง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วเท่าเดิม เพื่อเอา Wash solution ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ ล้างดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.15.5 การตัดพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM[®]-T easy cloning vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

ทำการตัด DNA พาหะสายผสมด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยใช้พลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 3.3.15.4 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10x EcoRI Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, BSA ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 10.5 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA โดยเทคนิค Electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัด พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มาทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน DNA โดยใช้ 1.5% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้

3.16 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ศึกษาลักษณะสมบัติของยีน Cathepsin B จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยนำข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Clustal W วิเคราะห์โครงสร้างขนาด และลักษณะทางกายภาพของยีน Cathepsin B ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ExPASy Tool (<http://www.expasy.ch/tools>) และ I-TASSER program (Yang Zhang, 2008)

3.17 การออกแบบ primer สำหรับผลิตโปรตีน Recombinant Cathepsin B

ออกแบบ primer สำหรับการผลิตโปรตีน Recombinant Cathepsin B เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ดังนี้

Forward primer: 5' CATATGTTAAAATCGCAGTTTTGTATTGT3'

Reverse primer: 5' CTCGAGTTAATGATGATGATGATGATGGGTTTTATAAGTCCAGCCACAACA3'

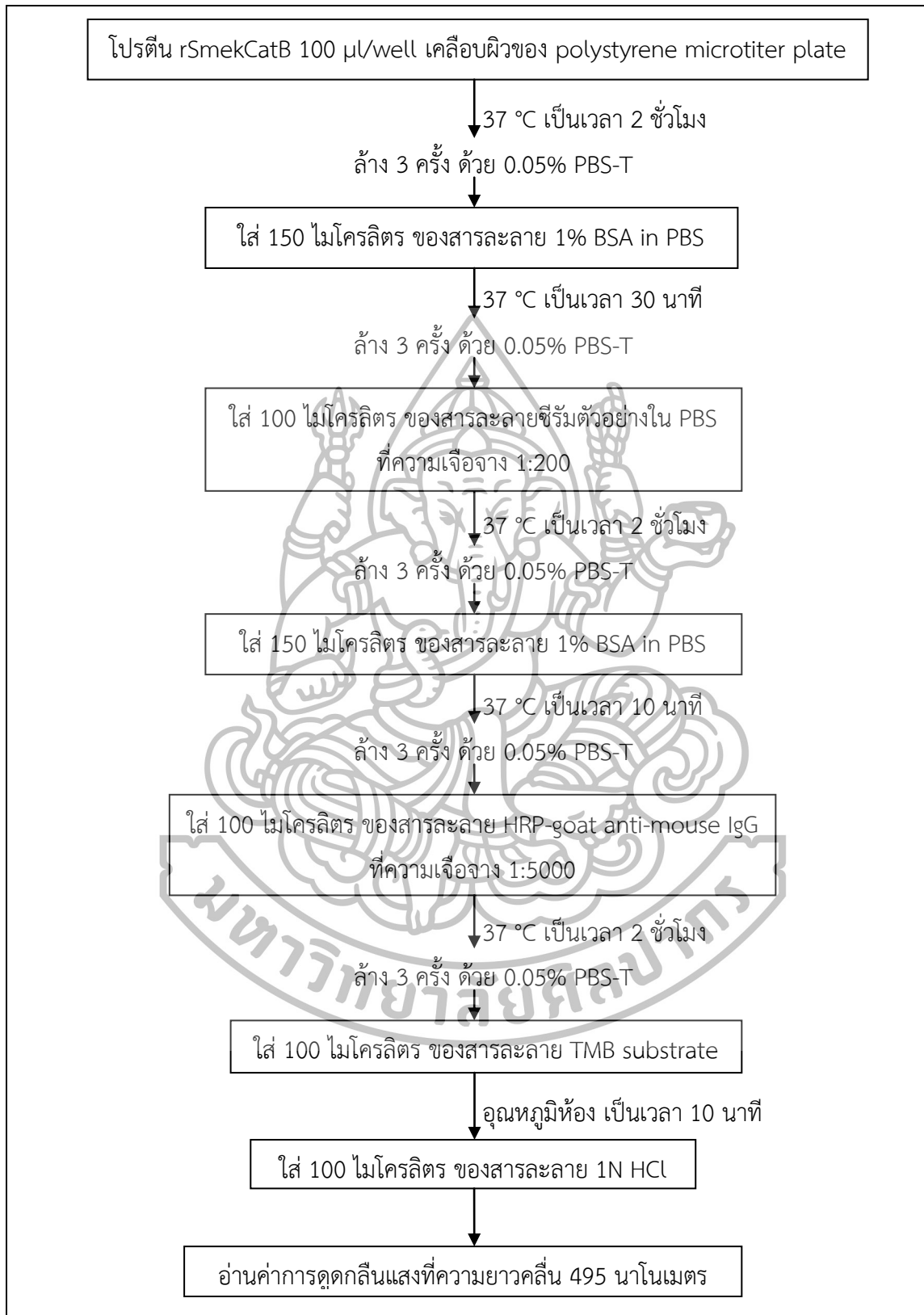
3.18 การผลิตโปรตีน Recombinant *S. mekongi* Cathepsin B (rSmekCatB)

ทำการผลิตโปรตีน rSmekCatB โดยใช้ forward primer และ reverse primer ที่ได้จากข้อ 3.317 ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอ็มไซม์ Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ Forward primer และ 10 มิลลิโมลาร์ Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และใส่ cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปรับให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นใส่หลอด PCR ลงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และตั้งอุณหภูมิเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยเริ่มจาก Denature สายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงเข้าสู่รอบของการเพิ่มสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งหมด 35 รอบ โดยเริ่มที่การ Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที ตามด้วยขั้นตอน Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นตอน Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เมื่อทำการสังเคราะห์ครบ 35 รอบ จะทำการสังเคราะห์ต่อไปที่ 72 องศาเซลเซียสอีก 10 นาที นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ตรวจสอบการเรียงแสงของ DNA โดย UV transilluminator จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัด DNA ออกจากเจลมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ PET17b ซึ่งเป็น Expression vector โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต โดยใช้ insert DNA (ยีนโปรตีน Cathepsin B) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร, PET17b ปริมาตร 8 ไมโครลิตร, 10X ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ T4 DNA Ligase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยวิธี heat shock transformation ดังนี้ นำ DNA สายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube ที่มี competent cells ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำกลับมาแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นแบ่งเชื้อแบคทีเรียในหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด PET17b มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย LB-Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ LB-Ampicillin ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นให้เซลล์แบคทีเรีย

สร้างโปรตีนด้วย IPTG (1 มิลลิโมลาร์) เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาปั่นในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาทีนาน 8-10 นาทีเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน รวบรวมเซลล์ที่ได้แล้วเติมสารละลาย PBS ในสัดส่วน 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator เติม 10% triton X-100 จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1% ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วน supernatant ที่ได้ ผ่านคอลัมน์ของ Ni-NTA Agarose resin (QIAGEN) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วแยกโปรตีนบริสุทธิ์ ด้วย 250 mM imidazole buffer โปรตีนที่ได้ถูกนำมาแยกด้วย 12.5% SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบขนาดโปรตีน และ ศึกษาการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot และนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้ไปหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay แล้วจึงเก็บตัวอย่างโปรตีนที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.19 การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในซีรัมด้วยเทคนิค indirect ELISA

ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งก่อนทำการทดสอบจะต้องทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละความเข้มข้นของน้ำยาที่ใช้ ตลอดจนทั้งความเจือจางของซีรัมที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาที่จะทำให้ผลการทดสอบได้ผลดีที่สุดโดยการทำ checker-board titration เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ก็ทำการทดสอบกับซีรัมต่าง ๆ ของกลุ่มตัวอย่าง โดยนำโปรตีน Recombinant Cathepsin B เจือจางในสารละลาย coating buffer (50 mM carbonate buffer, pH 9.6) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเคลือบผิวของ polystyrene microtiter plate ปริมาตร 100 ไมโครกรัมต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย washing solution (PBS-T, pH 7.4) 3 ครั้ง แล้ว block non-specific binding ของแอนติบอดีด้วย blocking solution (1% BSA in PBS, pH 7.4) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง จากนั้นทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองที่ไม่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* หรือซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำปฏิกิริยากับ HRP-goat anti-mouse IgG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย washing solution 3 ครั้ง และเติม 3, 3', 5', 5'-tetramethyl benzidinedihydrochloride (TMB) substrate แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม HCl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microtiter plate reader (VERSAmax, Molecular Devices, USA) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



ภาพที่ 10 แผนภูมิการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมด้วยเทคนิค indirect ELISA

3.20 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การอ่านผลการทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ในซีรัมด้วยเทคนิค indirect ELISA จะใช้ค่า cut-off optical density (OD) ที่คำนวณจากค่าเฉลี่ยของ ELISA OD สูงสุด บวก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของซีรัมหนูทดลองที่ไม่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยซีรัมของหนูทดลองตัวใดให้ค่า ELISA OD เท่ากับหรือสูงกว่าค่า cut-off OD ดังกล่าว จะถือว่าเป็นผลบวกกับวิธีทดสอบ และการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความไว (sensitivity) เปอร์เซ็นต์ความจำเพาะ (specificity) เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (accuracy) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ใช้การคำนวณตามวิธีของ Galen (1980) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความไว} = \frac{\text{จำนวนผลบวกจริง}}{\text{จำนวนผลบวกจริง} + \text{จำนวนผลลบปลอม}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความจำเพาะ} = \frac{\text{จำนวนผลลบจริง}}{\text{จำนวนผลลบจริง} + \text{จำนวนผลบวกปลอม}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง} = \frac{\text{จำนวนผลบวกจริง} + \text{จำนวนผลลบจริง}}{\text{จำนวนผลบวกจริง} + \text{จำนวนผลลบปลอม} + \text{จำนวนผลบวกปลอม} + \text{จำนวนผลลบจริง}} \times 100$$

$$\text{ค่าทำนายผลบวก} = \frac{\text{จำนวนผลบวกจริง}}{\text{จำนวนผลบวกจริง} + \text{จำนวนผลบวกปลอม}} \times 100$$

$$\text{ค่าทำนายผลลบ} = \frac{\text{จำนวนผลลบจริง}}{\text{จำนวนผลลบจริง} + \text{จำนวนผลลบปลอม}} \times 100$$

โดยที่

$$\text{ผลบวกจริง} = \text{จำนวนซีรัมของหนูที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด } S. mekongi \text{ ที่ให้ผลบวก}$$

$$\text{ผลลบจริง} = \text{จำนวนซีรัมของหนูที่ไม่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด } S. mekongi \text{ ที่ให้ผลลบ}$$

$$\text{ผลลบปลอม} = \text{จำนวนซีรัมของหนูที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด } S. mekongi \text{ ที่ให้ผลลบ}$$

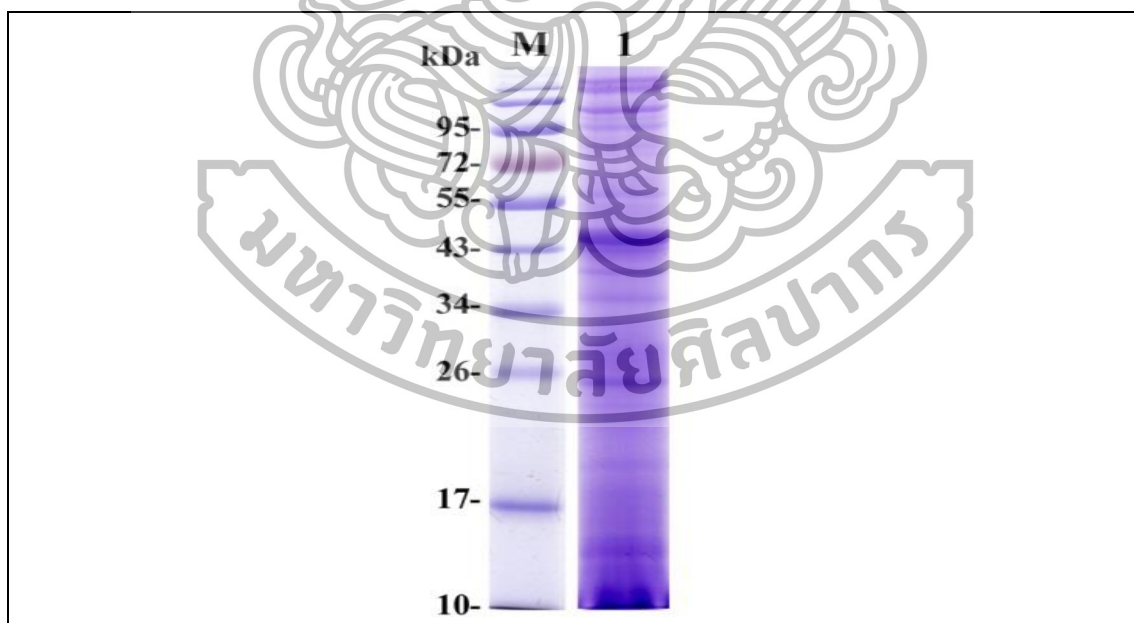
$$\text{ผลบวกปลอม} = \text{จำนวนซีรัมของหนูที่ไม่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด } S. mekongi \text{ ที่ให้ผลบวก}$$

บทที่ 4

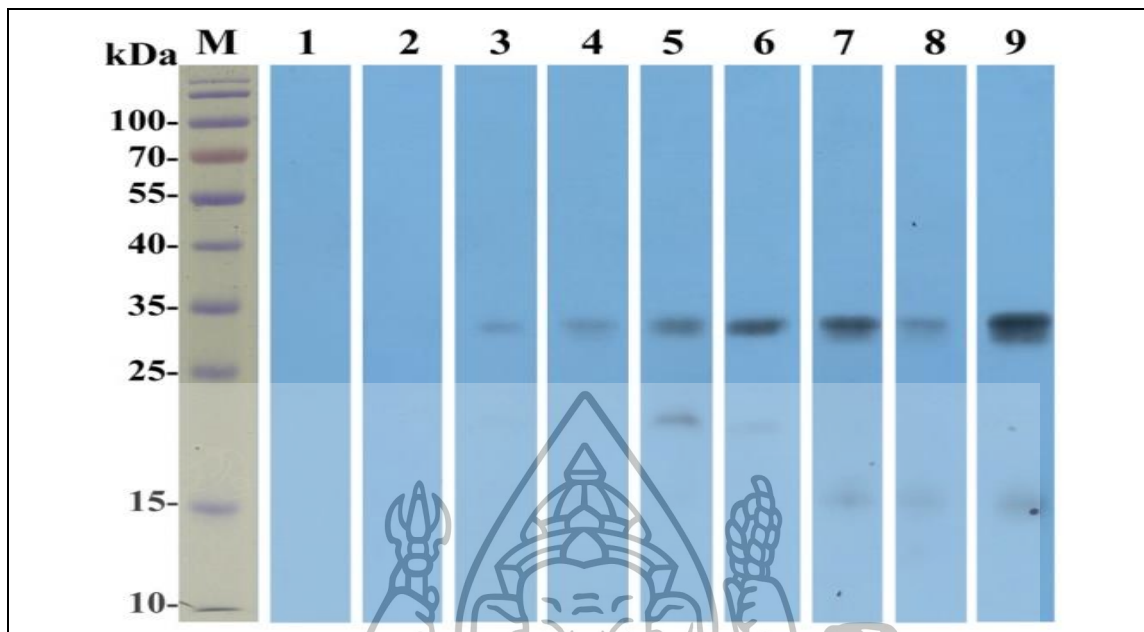
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการแยกชนิดของแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

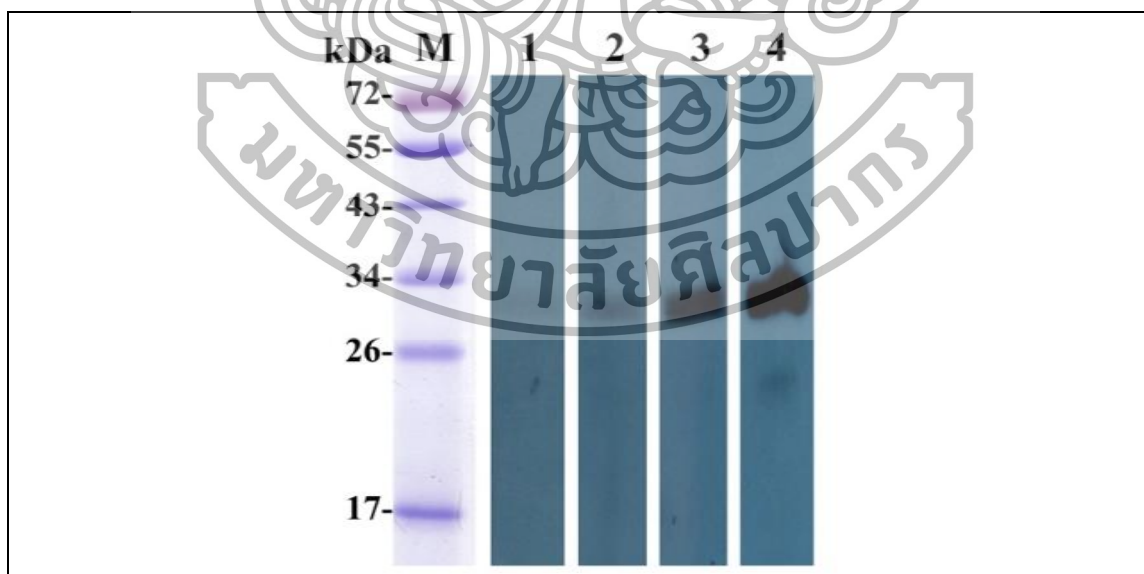
จากการทำ SDS-PAGE และย้อมสี Coomassie brilliant blue ของแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย พบว่ามีอย่างน้อย 9 แถบของชิ้น polypeptides ที่น้ำหนักระหว่าง 10 kDa ถึง 190 kDa (ภาพที่ 11) และจากการทำ Western blot กับซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* พบว่าสามารถตรวจพบ 2 แถบแอนติเจน ที่มีน้ำหนักอยู่ที่ 22 kDa ถึง 31 kDa (ภาพที่ 12) ในขณะที่ทั้ง 2 แถบแอนติเจนดังกล่าวไม่พบว่ามีปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพยาธิ (กลุ่มควบคุม) โดยมีแถบแอนติเจนที่น่าสนใจ คือ แถบโปรตีนขนาด 31 kDa ที่สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ตั้งแต่ 28 วันหลังการติดเชื้อ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 11 ภาพย้อมสี Coomassie brilliant blue ของแอนติเจนจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* แถว M: น้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน; แถวที่ 1: แอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* (30 ไมโครกรัม)



ภาพที่ 12 ภาพแบบแผนของการวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ของแอนติเจนจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองที่ไม่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือดเป็นรายตัวและแบบรวม (แถวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) และกับซีรัมของหนูทดลอง 7 ตัว ที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* (แถวที่ 3 ถึง 9)



ภาพที่ 13 ภาพแบบแผนของการวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ของแอนติเจนจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เป็นระยะเวลา 28, 35, 42, และ 49 วันหลังการติดเชื้อ (แถวที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับ)

2. ผลการศึกษาชนิดของโปรตีน ด้วยเทคนิค LC/MS-MS

แถบโปรตีนแอนติเจนที่สนใจทั้ง 2 แถบแอนติเจน ที่มีน้ำหนักอยู่ที่ 31 กิโลดาลตัน ถึง 22 กิโลดาลตัน ถูกนำมาตัดและย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin และนำวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค LC/MS-MS โดยที่ผลการวิเคราะห์ระบุลักษณะว่าแถบโปรตีนแอนติเจนดังกล่าวมีความคล้ายกับ cathepsin B-like และ thioredoxin peroxidase-1 ตามลำดับ ดังที่แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การระบุ Immunoreactive proteins ด้วยเทคนิค LC/MS-MS

Band (kDa)	Putative protein	Species	Unique peptides	Coverage (%)	Mr (kDa) (Exp/Obs) ^a	Protein score	GI number
31	Cathepsin B-like	<i>S. japonicum</i>	46	13	36.43/39.57	124	gi 1169189
22	thioredoxin peroxidase-1	<i>S. japonicum</i>	16	10	21.76/20.99	107	gi 38259184

^a Expected and observed molecular mass (Mr)

3. ผลการศึกษายีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

การออกแบบไพรเมอร์ยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* (GenBank accession no. AY14659.1) ซึ่งพยาธิที่มีความอนุรักษ์ (conserved) มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีน Cathepsin B ของพยาธิอื่น ๆ ฐานข้อมูลใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้ในการทำ PCR โดยใช้ cDNA ที่เตรียมจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ระยะตัวเต็มวัย พบว่าได้แถบของ PCR product จำนวน 1 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,029 bp หลังจากส่ง PCR product ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cathepsin B ซึ่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 1,029 bp และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์นี้กับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าซีเอ็นยีนที่ได้คล้ายคลึงกับยีน Cathepsin B ในพยาธิใบไม้เลือด ได้แก่ *S. japonicum* และ *S. mansoni* ในขณะที่ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนอื่น ๆ ในพยาธิ

ดังนั้นกล่าวได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่กำลังศึกษาดังกล่าวเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* จากนั้นจึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,029 bp นี้เพื่อออกแบบ specific primers ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* เพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยวิธีการ Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) โดยการสร้างสาย first-strand cDNA โดยการใช้ reverse transcriptase และใช้ 5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends, Version 2.0 (Invitrogen), และ 3' -Full RACE core set (Tagara) ตามขั้นตอนของบริษัท โดยผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ได้ขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,123 bp และเมื่อถอดรหัสลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Cathepsin B มีขนาดลำดับกรดอะมิโน 342 กรดอะมิโน และสามารถทำนายน้ำหนักโมเลกุลได้ 38.30 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 14)

ลำดับกรดอะมิโน SmekCatB (GenBank: KP317840) ถูกนำมาทำ alignment เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกับโปรตีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้ต่างๆ ประกอบไปด้วย พยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* cathepsin B1 (GenBank: CAD44624.1), พยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* cathepsin B2 (GenBank: CAC85211.2), พยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* cathepsin B (GenBank: CAA50305.1), พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* Cathepsin B (GenBank: AAO73002.1), พยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* cathepsin B (GenBank: ABU62925.1) และพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* cathepsin B2 (GenBank: ACT99885.1) โดยใช้โปรแกรม Clustal W2 และโปรแกรม MEGA6 (Tamura et al., 2013) ในการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 15 ผลการวิเคราะห์พบว่า ลำดับกรดอะมิโน SmekCatB คล้ายคลึงกับ *S. mansoni* cathepsin B1, *S. mansoni* cathepsin B2, *S. japonicum* cathepsin B, *F. gigantica* cathepsin B, *F. hepatica* cathepsin B และ *O. viverrini* cathepsin B2 อยู่ที่ 76.18, 51.78, 87.13, 48.80, 50.00 และ 49.70% ตามลำดับ โดยมี 3 thiol consensus patterns ดังนี้ (Gln-X(3)-[Gly]-X-Cys-Trp-X(2)-[Ser, Gly]-[Ser Thr Ala]); ([Gly]-X-His-[Gly Ala]-[Ile Val]-X-[Leu Ile Val](2)-Gly-X-[Gly]); ([Tyr]-[Trp]-[Leu]-x-[Ala]-Ans-[Ser]-Trp-x(3)-[Trp]-Gly-x(2)-Gly-[Leu Tyr]-[Phe]-x-[Ile Met]) โดยที่ X แทนกรดอะมิโนตัวหนึ่งตัวใดก็ได้ และมีตำแหน่ง active site คือ Cys, His, Asn ซึ่งทั้งสาม thiol consensus มีความคล้ายคลึงกับยีน Cathepsin B ของพยาธิในกลุ่ม Schistosome มากที่สุด (ภาพที่ 15) ซึ่งมีตำแหน่ง occluding loop (residues 175–194, *S. mansoni* cathepsin B numbering) และมี cysteine residues 12 ตำแหน่งที่จะสร้างพันธะ disulfide ซึ่งเหมือนกับยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และตำแหน่งที่ 180/181 ของ His residues ที่ติดกัน ส่งผลต่อปฏิกิริยาของ exopeptidase ที่พบในพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* (Jilkova et al., 2011) ผลการทำ neighbor-joining method พบว่า ยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* กับยีน cathepsin B ของพยาธิอื่น ๆ โดยที่พบว่า ยีน Cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มี

ความใกล้เคียงกับยีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. japonicum* และยีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

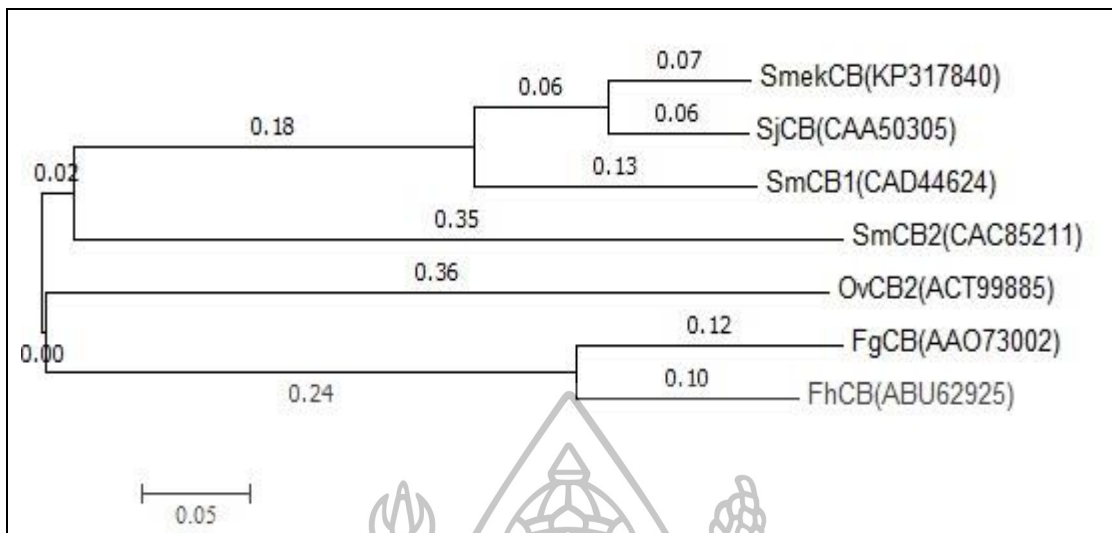
โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน SmekCatB ที่ถูกทำนายด้วยโปรแกรม I-TASSER (Zhang, 2008) แสดงในรูปที่ 17 ซึ่งประกอบไปด้วย 9 β -stands (แถบสี่เหลี่ยม), 9 α -helix (แถบสี่เหลี่ยม) และสัณฐานแสดง turns ของ peptide backbone (TM-score = 0.73 ± 0.11 , RMSD = $6.2 \pm 3.8 \text{ \AA}$).

80	CGTCTACACAACATTGTACC ATG TTGAAAATCGCAGTTTGTATTGTTTCATTGTTTACTCCTCTCAAAGCACATGTCACA	
	M L K I A V C I V S L F T P L K A H V T	20
160	ACGAGAAAACATGAACATATTGAACCATTTGCAGATGAGATGATTCATTCAATCAACATCCAATGCTGGATGGAA	
	T R N N E H I E P L S D E M I S F I N Q H P N A G W K	47
240	AGCGGACAAGAGTGTGATCGATTCCATTCACTGGATGATGCACGAATTCATGGGTGCGAGAAGGGAGGATCCAGACGTGA	
	A D K S D R F H S L D D A R I L M G A R R E D P D V	73
320	AACGGAAGCAGCGACCAACTGTAGATCATCATGTGTGGATGTCGGAAATACCATCATACTTTGATTACGAAAAGAAATGG	
	K R K Q R P T V D H H D V D V G I P S Y F D S R K K W	100
400	CCTCGTTGTAAGAGTATCTCAGAAATTCGTGATCAATCTCGATGTGGATCGTGTGGGCATTTGGCGTGTGCAAGCTAT	
	P R C K S I S E I R D Q S R C G S C W A F G A V E A M	127
480	GACTGATCGAATTTGTATCCAATCGGGTGCAAAACAATCAGTGGATTGACTGCTGTGGATTTAATCAGCTGTTGTAAG	
	T D R I C I O S G A K Q S V D L S A V D L I S C C K	153
560	ATTGGCGTGATGGTTGTAATGGTGGTTTCTTGGTCAGGCATGGGACTATTGGGTAACAAATGGGATTGTCACTGGAGGT	
	D C G D G C N G G F L G Q A W D Y W V T N G I V T G G	180
640	TCAAAGAAAATCATACTGGTTGTCAACCGTATCCATTTCCGAAATGTGAACATCATAAGAAAGGAAAGTATCCTCGCTG	
	S K E N H T G C Q P Y P F P K C E H H T K G K Y P A C	207
720	TGGACCGAAAATTTACAAAACACCTCAATGTAAGCAGAAATGTCAGAAGGATACAAAACGCCTTATGAACAAGACAAGC	
	G P K I Y K T P Q C K Q K C Q K G Y K T P Y E Q D K	233
800	ATTATGGTGGTATGCTTACAATGTTCCCAATAATGCCAAAGCTATTGAGAAAGAAATATGATGAATGGACCAGTGGAA	
	H Y G G M S Y N V P N N A K A I O K E I M M N G P V E	260
880	GCTGCTATCGATGTTATGAAGACTTCCTCAATTACAAGTCAGGAATCTACAGACATGTGACTGGTTCAATAGTTGGTGG	
	A A I D V Y E D F L N Y K S G I Y R H V T G S I V G G	287
960	ACATGCTATACGCATAATTGGATGGGTGTTGAGAGAAAACCGCTTACTGGTTGGTTGCCAATTCATGGAATGAAGATT	
	H A I R I I G W G V E K K T P Y W L V A N S W N E D	313
1040	GGGGTGAGAAGGATTATTTCCAATAGTACGTGGAAGCGATGAATGTCAATGAATCTGATGTTGTGGCTGGACTTATA	
	W G E K G L F R I V R G S D E C S I E S D V V A G L I	340
1120	AAAACC TAA TGAAGACTTGTAAATTGTGAGTA AATAAA TAAATAGTTGAAC TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	
	K T *	342
1123	AAA	

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* (GenBank: KP317840) ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงรหัสเริ่มต้น (ATG) และรหัสหยุด (TAA) ส่วนตัวอักษรตัวหนาที่เอียงมีขีดเส้นใต้แสดงรหัสการเติมโพลีเอ (AATAAA) และการทำนายตำแหน่ง signal peptide, pro-peptide และ mature ของโปรตีน Cathepsin B พบว่าเป็นตำแหน่งที่ 1-18 (กล่อง) ตำแหน่งที่ 30-71 (ขีดเส้นใต้) และตำแหน่งที่ 91-338 (แถบสีเทา) ตามลำดับ

SmekCB_KP317840	-----MLKIAVCIIVSLFTPLKAHVTTTRNNEHIEPLSDEMISFINQHPNAGWKADKSDR	53
SjCB_CAA50305	-----MLKIAVYIVSLFTFLEAHVTTTRNNQRIEPLSDEMISFINEHPDAGWKADKSDR	53
SmCB1_CAD44624	-----MLTSLICIASLITFLEAHISVKN-EKFEPLSDDIISYINEHPNAGWRAEKSNR	52
SmCB2_CAC85211	MNQYSCYLLQLYIIILLSYGTLINEIDARRHKRMYQPLSMELINFINYEANTTWAAPTTR	60
FgCB_AAO73002	-----MSWLLIFATTIVVVQAAPNHKQFEPFSDDELTRYVNEESGASWKAARSTR	49
FhCB_ABU62925	-----MSWLLIFAAIVVAQAKPNYKRQFEPFSDDELHYINEESGASWKAAPSTR	49
OvCB2_ACT99885	-----MPWLLIVFGTVLAAAGEVTG-----SIGMREYVDSSETGAKWIYAEPP	43
	: : * : : : . . .	
SmekCB_KP317840	FHSLDDARILMGARRED PVDRKQRPTVDHHDVDVG- IPSYFDSRKKWPRCKSISEIRDO	112
SjCB_CAA50305	FHSLDDARILMGARKEDAEMKRNRRPTVDHHDNLVE-IPSOQFDSRKKWPKCSISQIRDO	112
SmCB1_CAD44624	FHSLDDARIQMGARREPDRLRTRRPITVDHNDWNVE-IPSSFDSRKKWPRCKSIATIRDO	111
SmCB2_CAC85211	FRTVSDIRRLGAL---PDPNGEQLETLCTGYISDE-LPKSFDARVEWPHQPSISEIRDO	116
FgCB_AAO73002	FNNIEQFKKHLGALEETPEERNTRRPTVRYSVSEND-LPESFDAREKWPNCSSISEIPDO	108
FhCB_ABU62925	FNNIDQVKQNLGVLEETPEDRNTQRQTVRYSVSEND-LPESFDARQKWANGPSISEIRDO	108
OvCB2_ACT99885	TFRQGNLQMFRAIRE-PEEQRSKRPTVSHESLGDENIPKTFDAREQWPHQPTIGQIRDO	102
	: : : : * : : : * : : : * : : *	
SmekCB_KP317840	SRCGSCWAFGAVEAMTDRICIQSGAKQSVDL SAVDLISCCCKDCGDCGNGGFLGQAWDYWV	172
SjCB_CAA50305	SRCGSCWAFGAVEAMTDRICIQSGGGQSAELSALDLISCCCKDCGDCGQGGFPGVANDYWV	172
SmCB1_CAD44624	SRCGSCWAFGAVEAMSRSQIQSGGKQNVLSAVDLLSCCESCGLGCEGGILGPAWDYWV	171
SmCB2_CAC85211	SSCGSCWAFGAVEAMSDRICKSKGKHPFLSAENLVSCSSCGMGCNGGEPHSAWLWYK	176
FgCB_AAO73002	SSCSSCWAAGTASAMTDFICTHSNGEKKPRLSAVDLVSCCPYCGYCGEGYPSMAWDYWW	168
FhCB_ABU62925	SSCSSCWAIVSSASAITDRICTHSNGKPKRLSAIDIVSCCAYCGYGCNGGIPAMSWDYWT	168
OvCB2_ACT99885	SSCGSCWAFGAVEAMSRLCLHSNGFTKLSLSDLVSCCGYCGFGCGGYPAAWDFWQ	162
	* * . * * * . . . *	
SmekCB_KP317840	TNGIVTGGSKENHTGCQPYPPFKCEHHTK GK- YPACGPKIYKTPQCKQKQKGYKTPYEQ	231
SjCB_CAA50305	KRGIVTGGSKENHTGCQPYPPFKCEHHTKCK-YPACGPKIYKTPQCKQKQKGYKTPYEQ	231
SmCB1_CAD44624	KEGIVTGGSKENHTGCQPYPPFKCEHHTKCK-YPACGPKIYKTPQCKQKQKGYKTPYEQ	230
SmCB2_CAC85211	NOGIVTGDLYNTTNGCQPYPPFKCEHHTKCK-YPACGPKIYKTPQCKQKQKGYKTPYEQ	234
FgCB_AAO73002	RHGIVSGGTLENPTGCLPYPPFKCSHLEETPGLAPCPRELYATPKCKEQCQAGYKTPYEQ	228
FhCB_ABU62925	REGVVTGGTLENPTGCLPYPPFKCSHGVVTPGLFPQPRDTPYTPKCEKCKHAGYKTPYEQ	228
OvCB2_ACT99885	AYGIVTGGSKEDMGCRSYPPFKCSHHSKCK-YPACPHRIYDTPKVPKCDT-PNIDYET	220
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SmekCB_KP317840	DKHYGMSYVNPNAKAIQKEIMMNGVVEAA IDVYEDFLNYKSGIYRHVTSIVGGHAIR	291
SjCB_CAA50305	DKHYGDESYNVONNEKVIORDIMMYGVEAAFDVYEDFLNYKSGIYRHVTSIVGGHAIR	291
SmCB1_CAD44624	DKHRGKSSYNVKNDEKATQKEMKYGVEAGFTVYEDFLNYKSGIYKHITGETLGGHAIR	290
SmCB2_CAC85211	DKWYGEKVYRIHSNPEAIMLELMRNGPVEVDPEVYADPEPNYKSGVYQHVSGALLGGHAIR	294
FgCB_AAO73002	DKIKKSSYNVGDRETDIMMELITNGPVSTIYYTFEEDFTVYKSGIYQYTSGLMGGHGI-	287
FhCB_ABU62925	DKVKGKSSYNVGGQETDIMMELMKNGPVDGLFYMFEEDFLVYKSGIYHYTTGRLVGGHAIR	288
OvCB2_ACT99885	DKTRANITYNVORSQAIMKEIMINGVVEAAFEVYEDFFGYKQGVYFHSTGEFVGGHAIR	280
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SmekCB_KP317840	IIGWGVKKTPTWLIANSWNEDWGEKGLFR IVRGSDECSIESDVAAGLIKT-----	342
SjCB_CAA50305	IIGWGVKRTPTWLIANSWNEDWGEKGLFRMVRGRDECSIESDVAAGLIKT-----	342
SmCB1_CAD44624	IIGWGVENKTPWLIANSWNEDWGENCYFRIVRGRDECSIESEVTAGRIN-----	340
SmCB2_CAC85211	LLGWGEENNVPWLIANSWNEDWGDGKYEKTVRGNKNEGGIESDVAAGIPIKIN----	347
FgCB_AAO73002	-IIGWGVENGKYLWLIANSWNEGWGNGYFRIRRGNTNECGLPESRINAGLP-----	335
FhCB_ABU62925	VIGWGVENGKYLWLIANSWNEGWGNGYFRMRRGNNNEGGIEARINAGLP-----	337
OvCB2_ACT99885	LLGWGEENGTPTWLIANSWNEGWGEDGYFKMLRGNKNEGGIEDEVTAGLPELSIIPPK	337
	: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	

ภาพที่ 15 แผนภาพแสดงผลการทำ sequences alignment ของยีน SmekCatB กับยีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ แถบสีดำแสดงบริเวณที่มีความอนุรักษ์ 100% โดยที่ Smek: *Schistosoma mekongi*; Sj: *Schistosoma japonicum*; Sm: *Schistosoma mansoni*; Fg: *Fasciola gigantica*; Fh: *Fasciola hepatica*; Ov: *Opisthorchis viverrini*. KP317840 (unpublished); CAA50305.1 (Merckelbach et al., 1994); CAD44624.1 (Sajid et al., 2003); CAC85211.2 (Caffrey et al., 2002); AAO73002.1 (Meemon et al., 2004); ABU62925.1 (unpublished) และ ACT99885.1 (Sripa et al., 2010) ทั้งหมดคือ accession numbers ของยีน cathepsin B จาก GenBank™



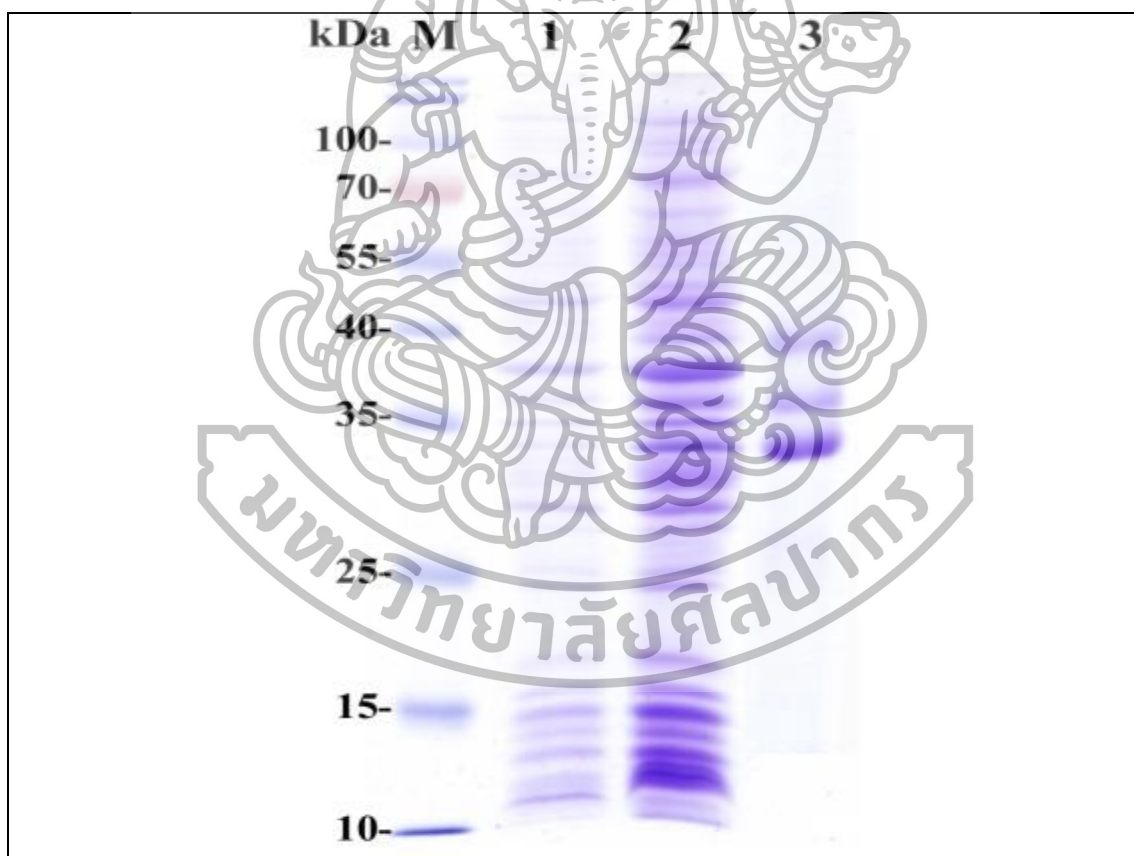
ภาพที่ 16 แผนภาพแสดงผลการทำ neighbor-joining method โดยโปรแกรม MEGA6



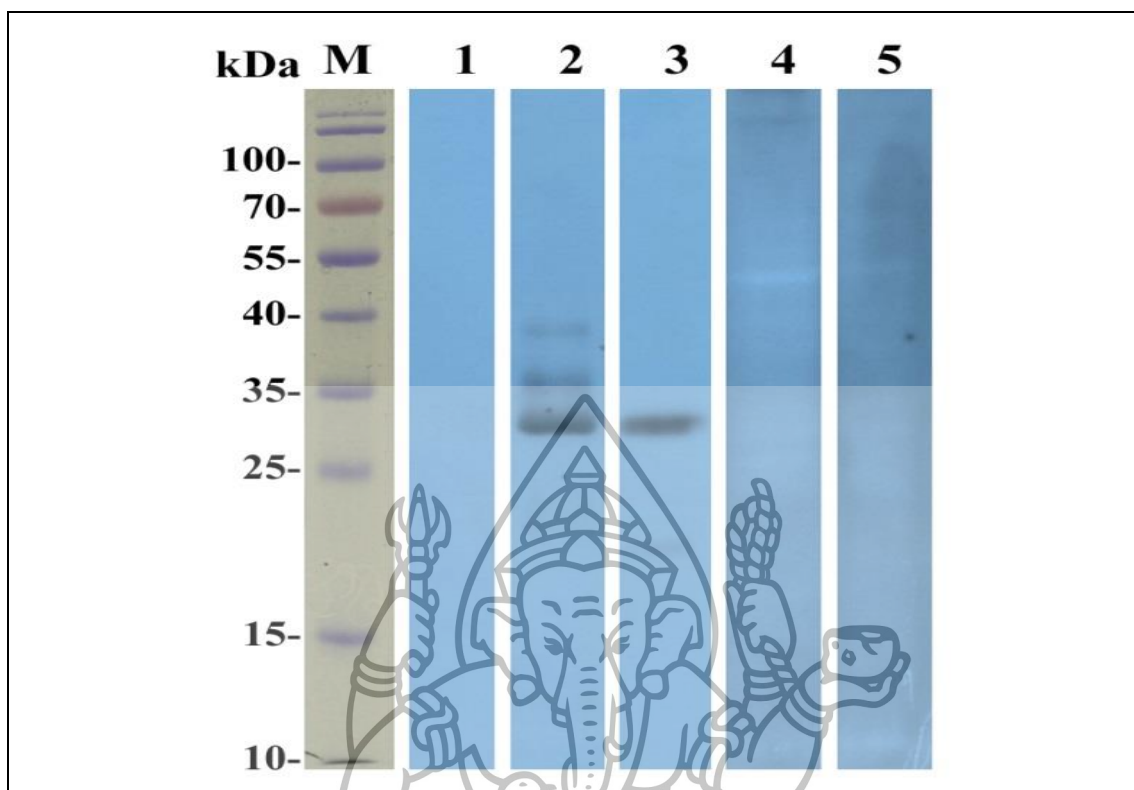
ภาพที่ 17 โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน SmekCatB ที่ถูกทำนายด้วยโปรแกรม I-TASSER ประกอบด้วย 9 β -stands (แถบสีเหลือง), 9 α -helix (แถบสีเหลือง) และสีน้ำเงินแสดง turns ของ peptide backbone

4. ผลของการผลิตและทดสอบความจำเพาะของโปรตีน rSmekCatB

โปรตีน rSmekCatB ถูกผลิตและทำให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะระบบ *E.coli* หลังจากนั้นนำมาแยกโดย SDS-PAGE พบว่า มีแถบโปรตีน 3 ขนาด คือ 38, 36 และ 31 กิโลดาลตัน แสดงดังภาพที่ 18 โปรตีน rSmekCatB ถูกนำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองที่ติดโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค Western blot โดยพบว่าซีรัมของหนูที่ติดเชื้อทำปฏิกิริยากับโปรตีนทั้งสามแถบ ในขณะที่โปรตีนทั้งสามแถบไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูที่ไม่ติดเชื้อ และไม่ปรากฏในปฏิกิริยาระหว่างซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิ *S. mekongi* กับแอนติเจนชนิดสารสกัดของพยาธิใบไม้ตับ *O.viverrini* และ *F. gigantiga* (ภาพที่ 19) ซึ่งจากการตรวจสอบ พบว่า โปรตีน rSmekCatB ขนาด 31 กิโลดาลตัน เป็นตำแหน่งเดียวกับแถบโปรตีนของแอนติเจนชนิดสารสกัดของพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*



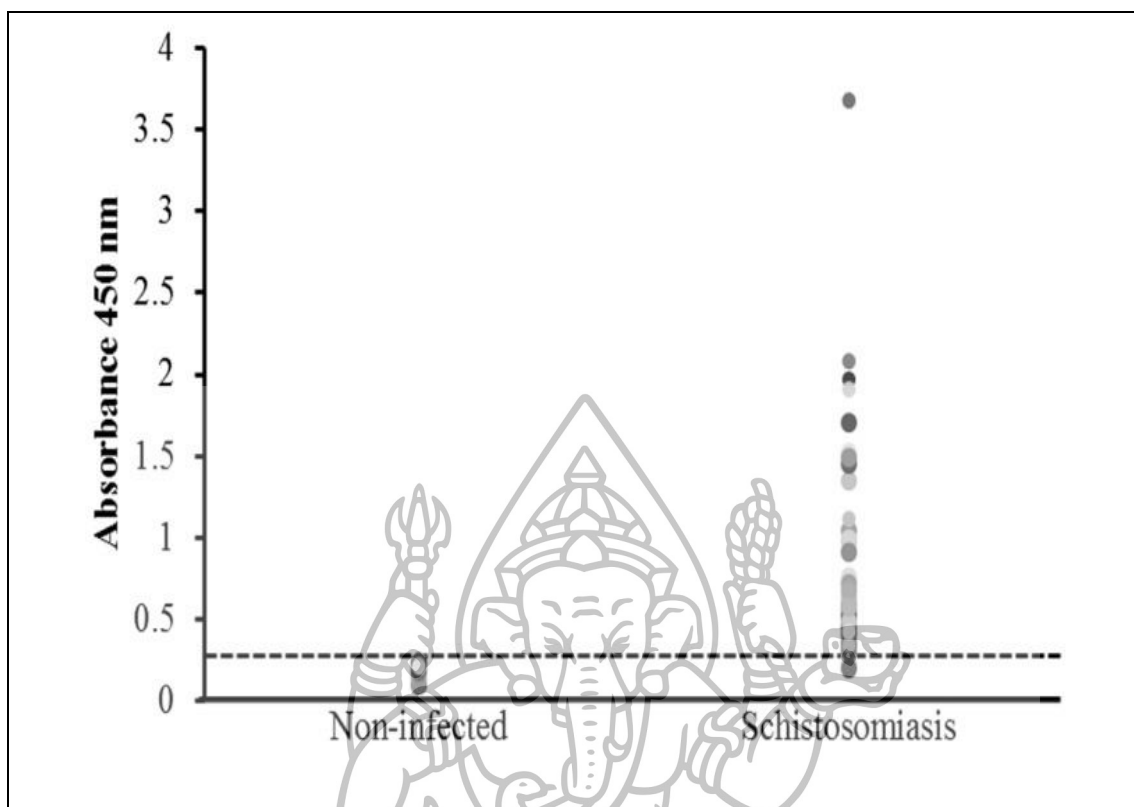
ภาพที่ 18 ภาพย้อมสี Coomassie brilliant blue ของโปรตีน rSmekCatB แถว M คือ น้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน แถวที่ 1 คือ สารที่สกัดจาก pET-17b ใน *E. coli* BL21 strain แถวที่ 2 คือ สารที่สกัดจาก pET-17b-SmekCatB ใน *E. coli* BL21 strain แถวที่ 3 คือ ผลผลิตโปรตีน rSmekCatB



ภาพที่ 19 แบบแผนของการวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ของโปรตีน rSmekCatB และแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิต่าง ๆ แถว M คือ น้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน โดยแถวที่ 1 คือ แสดงซีรัมของหนูทดลองที่ไม่ติดเชื้อไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน rSmekCatB แถวที่ 2 คือ ซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทำปฏิกิริยากับโปรตีน rSmekCatB แถวที่ 3-5 คือ ซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดสารสกัดจากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*, พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และ *F. gigantica* ตามลำดับ

5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดของโปรตีน rSmekCatB ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้โปรตีน rSmekCatB เป็นแอนติเจน กับซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* หรือหนูทดลองที่ไม่ได้รับการติดเชื้อ เพื่อหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน rSmekCatB โดยมีค่าจุดตัดหรือ cut-off ที่ 0.279 (mean \pm 3SD; mean = 0.156, SD = 0.041) (ภาพที่ 20) ซีรัมใดที่ให้ค่าดูดกลืนแสงมากกว่า 0.279 จัดว่าให้ผลบวก



ภาพที่ 20 กราฟแสดงผลการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อโปรตีน rSmekCatB
 แกน X แสดงค่าดูดกลืนแสงของซีรัมหนูทดลอง
 แกน Y แสดงกลุ่มตัวอย่างซีรัมหนูทดลองที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

การทดสอบซีรัมหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* จำนวน 48 ตัว และหนูทดลองที่ไม่ติดเชื้อ จำนวน 30 ตัว กับโปรตีน rSmekCatB ด้วยเทคนิค indirect ELISA อาศัยจุด cut-off ที่เลือกไว้คือ 0.279 พบว่า ซีรัมหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ให้ผลบวก 44 ตัว คิดเป็นความไวร้อยละ 91.67 และซีรัมหนูทดลองที่ไม่ติดเชื้อ ให้ผลลบ 30 ตัว คิดเป็นความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 จากการทดสอบด้วยวิธีนี้ให้ค่าความไว และความจำเพาะ เท่ากับ 91.67% และ 100%, ตามลำดับ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 100% และ 88.23% ตามลำดับ และค่าความถูกต้อง เท่ากับ 94.87% ดังที่แสดงในตารางที่ 5 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีน rSmekCatB มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด

ตารางที่ 5 คำนวณค่าการตรวจวินิจฉัยของโปรตีน rSmekCatB กับซีรัมของหนูที่ไม่ติดเชื้อและหนูที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค indirect ELISA

Indirect ELISA results	Disease status		Total
	Present	Absent	
Positive	44	0	44 ^c
Negative	4	30	34 ^d
Total	48 ^a	30 ^b	78 ^e

^a Sensitivity = $[44/(44 + 4)] \times 100 = 91.67\%$

^b Specificity = $[30/(30 + 0)] \times 100 = 100\%$

^c Positive predictive value = $[44/(44 + 0)] \times 100 = 100\%$

^d Negative predictive value = $[30/(30 + 4)] \times 100 = 88.23\%$

^e Accuracy = $[(44 + 30)/78] \times 100 = 94.87\%$

วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือดสามารถทำได้โดยการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อ หรือจะเป็นการตรวจหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนของพยาธิ อย่างไรก็ตาม เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ Kato-Katz ต้องใช้บุคคลที่มีความชำนาญ และยังให้ค่าความไวในการตรวจวินิจฉัยต่ำ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการระบาดน้อย (Pontes et al., 2003; Yu et al., 2007; Zhu, 2005) เทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาเป็นอีกเทคนิคที่สามารถพัฒนาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค โดยหลังจากที่ cercariae ไข่ผ่านผิวหนัง และเคลื่อนที่ไปยังตับ จะทำให้ถูกระบบภูมิคุ้มกันตอบสนอง เพื่อสร้างแอนติบอดีมาต่อต้านแอนติเจนที่ถูกสร้างมาจากพยาธิ schistosome จึงทำให้แอนติบอดีที่ตอบสนองต่อการติดพยาธิถูกนำมาใช้ในการบ่งบอกการติดโรคพยาธิใบไม้เลือด

จากผลการทดลองในการหาแอนติเจนเป้าหมายสำหรับการวินิจฉัยโรค โดยการใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Western blot พบว่า มีแถบโปรตีน 2 ขนาด คือ 31 และ 22 กิโลดาลตัน ที่มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี และหลังจากที่นำแถบโปรตีนดังกล่าวไปศึกษาด้วยเทคนิค LC/MS-MS พบว่า โปรตีนเป้าหมายคล้ายกับ cathepsin B-like cysteine proteinase และ thioredoxin peroxidase-1 ตามลำดับ

Cathepsin B (EC3.4.22.1) เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม cysteine proteases และในพยาธิเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยฮีโมโกลบิน (Caffrey et al., 1997; Brindley et al., 1997) รายงานก่อนหน้านี้ พบว่า ซึ้นเพปไทด์ขนาด 31 กิโลดาลตัน จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ถูกตรวจสอบและระบุว่าคือโปรตีน cathepsin B cysteine proteinase และยังพบว่ามีความสามารถตอบสนองกับระบบภูมิคุ้มกันได้ดีมากทั้งในคนและหนู (Chappell and Dresden, 1988; Chappell et al., 1989; Grogan et al., 1997; Klinkert et al., 1989; Klinkert et al., 1991; Noya et al., 1995; Ruppel et al., 1985a; Ruppel et al., 1985b; Ruppel et al., 1987a) ต่อมายังมีอีกหลายรายงานที่พบว่าโปรตีน Cathepsin B มีศักยภาพในการเป็นแอนติเจนที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ *S. mansoni*, *S. japonicum* และ *S. haematobium* (Idris and Ruppel, 1988; Idris and Ruppel, 1991; Klinkert et al., 1987; Noya et al., 1995; Ruppel et al., 1985b; Ruppel et al., 1987b) ซึ่งจากผล western blot พบว่า โปรตีนขนาด 31 กิโลดาลตัน ทำปฏิกิริยากับซีรัมทั้งหมดของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* และนอกจากนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองได้หลังการติดเชื้อ 28 วัน (ภาพที่ 13) สอดคล้องกับรายงานของ Ruppel et al (1985a, 1985b) ที่พบว่า โปรตีนขนาด 31 กิโลดาลตันของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* หลังการติดเชื้อ 28 วัน

Thioredoxin peroxidase เป็นหนึ่งในสมาชิกในกลุ่ม antioxidants ซึ่งพบเมื่อไม่นานมานี้ มีทำหน้าที่ในการกำจัดพิษไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และในปัจจุบันพบว่าเป็นหนึ่งในสารคัดหลั่งจากไข่พยาธิ (McGonigle et al., 1998; Williams et al., 2001) ซึ่งผลการศึกษา พบว่า แอบโปรตีนของโปรตีน thioredoxin peroxidase จะทำปฏิกิริยากับซีรัมของหนูทดลองที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ได้ดีในระยะตัวเต็มวัยหรือระยะที่มีการปล่อยไข่แล้วหรือประมาณ 49 วันหลังการติดเชื้อ จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค Western blot พบว่า จากซีรัมของหนูทดลอง 7 ตัวที่ติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* มีซีรัมจากหนูเพียง 2 ตัว ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน thioredoxin peroxidase ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 28.57 จะเห็นได้ว่าจากผลการศึกษาครั้งนี้ โปรตีน cathepsin B-like cysteine proteinase มีศักยภาพมากกว่าโปรตีน thioredoxin peroxidase-1 ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และถูกตรวจพบได้ตั้งแต่ 4 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ ทั้งโปรตีนตัวนี้จึงมีศักยภาพในการใช้ตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*

Cathepsin B1 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* (SmCB1) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการรับสารอาหารของพยาธิ โดยเฉพาะเกี่ยวกับการย่อยฮีโมโกลบินในพยาธิระยะตัวอ่อน (schistosomula) และระยะตัวเต็มวัย (for review, see Caffrey et al., 2004) จากรายงานของ Wasilewski et al. (1996) พบว่า ถ้ายับยั้งการทำงานของ papain-like cysteine protease

จะทำให้พยาธิไม่สามารถย่อยฮีโมโกลบินได้ ซึ่งผลการทดลอง พบว่า มีผลทำให้จำนวนของพยาธิลดลง และ SmCB1 ยังมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ซึ่งสนับสนุนรายงานของ Correnti et al. (2005) พบว่า การควบคุมระดับโปรตีน cathepsin B ด้วยเทคนิค RNA interference จะส่งผลต่อการเติบโตของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ให้เติบโตช้าลง นอกจากนี้ยังพบว่า SmCB1 มีการแสดงออกมากที่ส่วนต้นของลำไส้ใหญ่ (caecum) และท่อ protonephridia ของ cercariae (El Ridi et al., 2014; Skelly and Shoemaker, 2001) ในขณะที่ cathepsin B2 ของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* (SmCB2) พบการแสดงออกที่เนื้อเยื่อ parenchymal ของทั้งเพศผู้และเพศเมียในพยาธิระยะตัวเต็มวัย และชี้ให้ว่าโปรตีน SmCB2 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมุนเวียน (turnover) ของโปรตีน tegument และย่อยโปรตีนลำเลียงสาร (endocytosed proteins) นอกจากนี้ยังช่วยปกป้องตัวมันจากระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (host) (Caffrey et al., 2002) ซึ่งการศึกษาของเรา ได้ทำการโคลนยีน cathepsin B จากพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* พบสิ่งที่น่าสนใจ คือ เมื่อเรานำ SmekCatB เปรียบเทียบความคล้ายคลึง ด้วยโปรแกรม Clustal W2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับพยาธิ *S. japonicum* cathepsin B และ *S. mansoni* cathepsin B1 มากที่สุด ที่ 87.13% และ 76.18% ตามลำดับ

ยีน Cathepsin B ถูกสังเคราะห์ในรูปแบบของ precursor peptide คือ ประกอบไปด้วย signal peptide, propeptide และ mature protein โดยที่การศึกษาในครั้งนี้ทำการผลิตโปรตีน recombinant SmekCatB ภายใต้สภาวะของระบบ *E. coli* และหลังจากนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า โปรตีน rSmekCatB แสดงแถบโปรตีนที่ขนาด 31, 36 และ 38 กิโลดาลตัน ซึ่งผลการทำปฏิกิริยากับ anti-His antibodies ยืนยันได้ว่าโปรตีนทั้ง 3 ขนาด เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน recombinant cathepsin B ที่ผลิตขึ้น

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีน rSmekCatB ด้วยเทคนิค ELISA พบว่า โปรตีน rSmekCatB มีศักยภาพในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ดีมาก โดยค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของโปรตีน rSmekCatB ที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี ด้วยเทคนิค ELISA อยู่ที่ 91.67%, 100% และ 94.87% ตามลำดับ ซึ่งจากผลทดลองดังกล่าวบ่งบอกว่าโปรตีน rSmekCatB สามารถเป็นแอนติเจนที่ดีในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ทั้งนี้จากรายงานไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น เช่น *O. viverini*, *F. gigantica*, *F. hepatica*, *Cysticercus of Taenia solium*, และ *Wuchereria bancrofti* ซึ่งสอดคล้องกับงานของ El-Sayed et al. (1998) พบว่า 70% ของซีรัมผู้ป่วยที่ติดโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* 134 ราย ทำปฏิกิริยากับโปรตีน recombinant cathepsin B และมันจะเพิ่มขึ้นถึง 84.5% เมื่อใช้โปรตีนนี้เมื่อแยกมาจากพยาธิโดยตรง และมีรายงานที่ใช้ de-glycosylated recombinant cathepsin B ที่ผลิตจาก *Pichia pastoris* แสดงความไว 87.5% ในการตรวจวินิจฉัยจากซีรัมผู้ป่วยชาวเคนย่า (Stack et al., 2005)

จากผลของการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า โปรตีน recombinant SmekCatB มีศักยภาพที่จะใช้เป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi*



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อการวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ด้วยเทคนิค western blot พบ แอบริตีนที่ขนาดน้ำหนัก 31 กิโลดาลตัน เฉพาะในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* จากการระบุชนิดของโปรตีนนี้ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่า แอบริตีนดังกล่าวมีความคล้ายกับโปรตีน cathepsin B จากศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของโปรตีน *S. mekongi* cathepsin B มีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,123 bp และขนาดลำดับกรดอะมิโน 342 กรดอะมิโน และน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 38.30 กิโลดาลตัน จากนั้นเมื่อนำมาผลิตโปรตีน recombinant rSmekCatB (rSmekCatB) และทดสอบด้วยเทคนิค western blot และ indirect ELISA พบว่า โปรตีน rSmekCatB สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* โดยโปรตีน rSmekCatB ให้ค่าความไว และความจำเพาะ เท่ากับ 91.67% และ 100% ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีน rSmekCatB สามารถใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้เลือด *S. mekongi* ที่มีประสิทธิภาพสูงได้



รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล และคณะ. (2549). **ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เมติแมิ้ล มีเดีย.
- ประยงค์ ระดมยศ และคณะ. (2545). **Atlas of medical parasitology**. กรุงเทพฯ: เมติแมิ้ล มีเดีย.
- ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย. (2550). **ยาด้านปรสิตทางสัตวแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ตีรณสาร.
- วันชัย มาลีวงษ์, ผิวพรรณ มาลีวงษ์ และนิมิต มรกต. (2544). **ปรสิตวิทยาทางการแพทย์ : โปรโตซัว และหนอนพยาธิ**. ขอนแก่น: คลังน่านาวิทยา.
- วิฑูรย์ ไวยนันท์ และพีรพรรณ ตันอารีย์. (2546). **ปรสิตวิทยาทางการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ศักดิ์โสภณการพิมพ์.
- สุรินทร์ ปยะโชคณากุล. (2543). **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวรรณณี นิธิอุทัย และคณะ. (2541). **ปฏิบัติการหนอนพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์**. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- องค์การการท่องเที่ยวแห่งชาติ สปป.ลาว, แผนกท่องเที่ยวแขวงสะหวันนะเขต จำปาสัก และคำม่วน, (2555). **สถิตินักท่องเที่ยวไทย**. เข้าถึงเมื่อ 29 พฤศจิกายน. เข้าถึงได้จาก <http://www.thaisavannakhet.com/savannakhet/th/data-service/static-thai/>
- อรุณ เกียรติวุฒิ และคณะ. (2545). **หนอนพยาธิใบไม้ พยาธิติดต่อปรสิตอื่นๆ และแมลงที่สำคัญทางการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิรมย์ เจริญไชย. (2543). “ผลของยา Praziquantel, Triclabendazole และ Artesunate ต่อตัวเต็มวัยพยาธิใบไม้ตับ (*Fasciola gigantica*) ในหลอดทดลอง.” วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภาษาต่างประเทศ

- Alarcón de Noya, B., et al. (2007). “Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on scoprologic and serologic criteria the Venezuelan experience.” **Acta Tropica** 103, 1 (July): 41–49.
- Attwood, S. W. (2009). “Mekong Schistosomiasis: Where Did It Come from and where Is It Going?.” In **The Mekong**, 273-295. Edited by Campbell I. C. San Diego: Academic Press.

- Attwood, S. W., et al. (2008). "The distribution of Mekong schistosomiasis, past and future: preliminary indications from an analysis of genetic variation in the intermediate host." **Parasitology International** 57, 3 (September): 256–270.
- Auriault, C., et al. (1982). "Neutral protease activities at different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts." **Comparative Biochemistry and Physiology** 72, 3 (January): 377–384.
- Beckham, S. A., et al. (2006). "Production and processing of a recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin B-like enzyme (FhcatB1) reveals potential processing mechanisms in the parasite." **The Journal of Biological Chemistry** 387, 8 (August): 1053-1061.
- Bostic, J. R., and M. Strand. (1996). "Molecular cloning of a *Schistosoma mansoni* protein expressed in the gynecophoral canal of male worms." **Molecular and Biochemical Parasitology** 79, 1 (July): 79–89.
- Brindley, P. J., et al. (1997). "Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes." **Molecular and Biochemical Parasitology** 89, 1 (October): 1-9.
- Brown, T. A. (2001). **Essential Molecular Biology**, Volume 2. New York: Oxford University Press.
- Caffrey, C. R., et al. (1997). "*Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, and *S. rodhaini*: cysteine-class cathepsin activities in the vomitus of adult worms." **Parasitology Research** 83, 1 (February): 37-41.
- Caffrey, C. R., et al. (2002). "SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*." **Molecular and Biochemical Parasitology** 121, 1 (April): 49-61.
- Caffrey, C. R., et al. (2004). "Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases." **Trends in Parasitology** 20, 5 (May): 241-248.
- Callahan, S. (2007). "Therapies for Treating Schistosomiasis." **Medical Journal of Therapeutics Africa**. 1, 3 (September): 233-235.

- Centers for Disease Control & Prevention. Schistosomiasis. (2010). **Parasites and Health**. Accessed August 15. Available from <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>
- Chaiyaporn, V., L. Koonvisal., and A. Dharamadhach. (1959). "The first case of schistosomiasis japonica in Thailand." **Journal of the Medical Association of Thailand** 42: 438-441.
- Chappell, C. L., and M. H. Dresden. (1988). "Antibody response to a purified parasite proteinase (SMw32) in *Schistosoma mansoni* infected mice." **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 39, 1 (July): 66-73.
- Chappell, C.L., J. Hackel, and A. H. Davis. (1989). "Cloned *Schistosoma mansoni* proteinase (hemoglobinase) as a putative serodiagnostic reagent." **Journal of Clinical Microbiology** 27, 1 (January): 196-198.
- Cheng, P. C., J. C. Tsaihong, and K. M. Lee. (2007). "Application of recombinant Sj26GST for serodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in water buffalo (*Bos buffelus*)." **Veterinary Parasitology** 150, 4 (December): 314-320.
- Conlan, J. V., et al. (2011). "A review of parasitic zoonoses in a changing Southeast Asia." **Veterinary Parasitology** 182, 1 (November): 22-40.
- Correnti, J. M., P. J. Brindley, and E. J. Pearce. (2005). "Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth." **Molecular and Biochemical Parasitology** 143, 2 (October): 209-215.
- Davern, K. M., et al. (1991). "Further characterisation of the *Schistosoma japonicum* protein Sj23, a target antigen of an immunodiagnostic monoclonal antibody." **Molecular and Biochemical Parasitology** 48, 1 (September): 67-75.
- Department of Pathology, University of Cambridge. (2010). **Life Cycle of *Schistosoma mansoni* - The Adult Schistosome**. Accessed August 15. Available from http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/schistosoma/schisto_lifecycle_adult.html

- Doenhoff, M. J., P. L. Chiodini, and J. V. Hamilton. (2004). "Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies?." **Trends in Parasitology** 20, 1 (January): 35–39.
- El Ridi, R., et al. (2014). "Induction of protective immune responses against schistosomiasis using functionally active cysteine peptidases." **Frontiers in Genetics** 5 (May): 119.
- El-Sayed, L. H., et al. (1998). "Diagnostic significance of *Schistosoma mansoni* proteins Sm31 and Sm32 in human schistosomiasis in an endemic area in Egypt." **Tropical Medicine & International Health** 3, 9 (September): 721-727.
- Esmat, G., and M. El Raziky. (2009). "Antischistosomal therapy: Current status and recent developments." **Arab Journal of Gastroenterology** 10, 1 (March): 1-3.
- Feldmeier, H., and G. Poggensee. (1993). "Diagnostic techniques in schistosomiasis control: a review." **Acta Tropica** 52, 4 (January): 205–220.
- Fukuhara, K., et al. (2011). "Analysis of the effectiveness of control measures against *Schistosoma mekongi* using an intra- and inter-village model in Champasak Province, Lao PDR." **Parasitology International** 60, 4 (December): 452–459.
- Galen, R. S. (1980). "Predictive value and efficiency of laboratory testing." **Pediatric Clinics of North America** 27, 4 (November): 861-869.
- Gardiner, D. L., et al. (2006). "Overexpression of leucyl aminopeptidase in *Plasmodium falciparum* parasites, Target for the antimalarial activity of bestatin." **The Journal of Biological Chemistry** 281, 3 (January): 1741–1745.
- Grogan, J., et al. (1997). "Recognition of *Schistosoma mansoni* cathepsins B and L by human IgG1 and IgG4 antibodies." **Parasite Immunology** 19, 5 (May): 215-220.
- Hamilton, J. V., M. Klinkert, and M. J. Doenhoff. (1998). "Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods." **Parasitology** 117, supplement 7 (November): S41–S57.

- Hirose, Y., et al. (2007). "*Schistosoma mekongi* and *Schistosoma japonicum*: Differences in the distribution of eggs in the viscera of mice." **Parasitology International** 56, 3 (September): 239–241.
- Hisakane, N., et al. (2008). "The evaluation of control measures against *Schistosoma mekongi* in Cambodia by a mathematical model." **Parasitology International** 57, 3 (September): 379–385.
- Idris, M. A., and A. Ruppel. (1988). "Diagnostic Mr31/32,000 *Schistosoma mansoni* proteins (Sm31/32): reaction with sera from Sudanese patients infected with *S. mansoni* or *S. haematobium*." **Journal of Helminthology** 62, 2 (June): 95- 101.
- Idris, M. A., and A. Ruppel. (1991). "Diagnostic Mr 31/32000 proteins of *Schistosoma mansoni* (Sm31/32) and *S. haematobium* (Sh31/32): stability and reaction conditions for prospective field tests." **Journal of Helminthology** 65, 2 (June): 89- 94.
- Ministry of Tourism and Sports, Department of Tourism. (2012). **International Tourist Arrivals to Thailand By Nationality January-December 2011.**
- Ittiprasert, W., et al. (1999). "Prevalence of antibodies to *Schistosoma mekongi* among inhabitants of the high risk area of Thailand." **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology** 22, 105: 7-14.
- Jilkova, A., et al. (2011). "Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*." **The Journal of Biological Chemistry** 286, 41 (October): 35770–35781.
- Jin, Y., et al. (2010). "Comparison of Recombinant Proteins from *Schistosoma japonicum* for Schistosomiasis Diagnosis." **Clinical and Vaccine Immunology** 17, 3 (March): 476-480.
- Kirinoki, M., et al. (2011). "Efficacy of sodium metaperiodate (SMP)-ELISA for the serodiagnosis of schistosomiasis mekongi." **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 42, 1 (January): 25-33.
- Klinkert, M. Q., et al. (1989). "Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases." **Molecular and Biochemical Parasitology** 33, 2 (March): 113-122.

- Klinkert, M. Q., et al. (1991). "Immunological analysis of cloned *Schistosoma mansoni* antigens Sm31 and Sm32 with sera of schistosomiasis patients." **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology** 42, 4 (December): 319-324.
- Klinkert, M. Q., A. Ruppel., and E. Beck. (1987). "Cloning of diagnostic 31/32 kilodalton antigens of *Schistosoma mansoni*." **Molecular and Biochemical Parasitology** 25, 3 (October): 247-255.
- Kumagai, T., Y. Osada, and T. Kanazawa. (2006). "2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma japonicum*: the expression profile and localization in the life cycle." **Molecular and Biochemical Parasitology** 149, 2 (October): 135-143.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature**. 227, 5259 (August): 680-685.
- Leshem, E., et al. (2009). "Travel-related Schistosomiasis Acquired in Laos." **Emerging Infectious Diseases**. 15, 11 (November): 1823-1826.
- Li, D. F., et al. (2004). "Construction of a novel *Schistosoma japonicum* DNA vaccine pBK-Sj14-3-3 and studies on its immunoprotection in mice." **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi** 38, 3 (May): 193-195
- Liu, F., et al. (2006). "New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*." **PLOS Pathogens** 2, 4 (April): e29
- Liu, Q. Z., and J. L. Shen. (2003). "Protective immunity induced by recombinant signaling protein 14-3-3 vaccine of *Schistosoma japonicum*." **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi** 21, 5 (April): 257-260.
- Liu, S. X., et al. (1993). "The possibility of GST antigen from Chinese strain of *Schistosoma japonicum* for immunodiagnosis of schistosomiasis." **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 24, 1 (March): 70-73.
- Luo, Q. L., et al. (2009). "Application of signaling protein 14-3-3 and 26 kDa glutathione-S-transferase to serological diagnosis of Schistosomiasis japonica." **Acta Tropica** 112, 2 (November): 91-96.

- Manal A. Hamed. (2010). "Strategic Control of Schistosome Intermediate Host." **Asian Journal of Epidemiology** 3, 3 (June): 123-140.
- Mannervik, B., and U. H. Danielson. (1988). "Glutathione transferases-structure and catalytic activity." **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 23, 3: 283-337.
- Marques, H. H., et al. (2008). "Protective effect and granuloma down-modulation promoted by RP44 antigen a fructose 1,6 biphosphate aldolase of *Schistosoma mansoni*." **Immunobiology** 213, 5 (June): 437-446.
- Matsumoto, J., et al. (2002). "The first reported cases of canine schistosomiasis mekongi in Cambodia." **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 33, 3 (September): 458-461.
- McGonigle, S., J. P. Dalton, and E. R. James. (1998). "Peroxidoxins: A new antioxidant family." **Parasitology Today** 14, 4 (April): 139-145.
- Meemon, K., et al. (2004). "Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*." **Molecular and Biochemical Parasitology** 136, 1 (July): 1-10.
- Merckelbach, A., et al. (1994). "cDNA sequences of *Schistosoma japonicum* coding for two cathepsin B-like proteins and Sj32." **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology** 45, 3 (September): 193-198.
- Moraes, J., et al. (2011). "*Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine." **Experimental Parasitology** 127, 2 (February): 357-364.
- Nickel, B., et al. (2015). "*Schistosoma mansoni* antigen detects *Schistosoma mekongi* infection. *Acta Tropica* 141, Part B (January): 310-314.
- Noya, B. A., et al. (2006). "Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101, supplement 1 (September): 29-35.
- Noya, O., et al. (1995). "Humoral immune response of children with chronic schistosomiasis, Isotype recognition of adult worm antigens." **Parasite Immunology** 17, 6 (June): 319-328.

- Ohmae, H., et al. (2004). "Schistosomiasis mekongi: from discovery to control." **Parasitology International** 53, 2 (June): 135–142.
- Peng, H., et al. (2008). "Expression, immunolocalization and serodiagnostic value of a myophilin-like protein from *Schistosoma japonicum*." **Experimental Parasitology** 119, 1-5 (May): 117–124.
- Peng, S. Y., et al. (2008). "Evaluation of recombinant fructose-1, 6-bisphosphate aldolase ELISA test for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* in water buffaloes." **Research in Veterinary Science** 85, 3 (December): 527–533.
- Pontes, L. A. (2003). "Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*." **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68, 6 (July): 652-656.
- Precious, W. Y., and J. Barrett. (1989). "The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths." **Biochimica et Biophysica Acta** 992, 2 (August): 215–222.
- Pungerčar, J. R., et al. (2009). "Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity." **The FEBS Journal** 276, 3 (February): 660-668.
- Ribeiro, I. R., and P. Olliaro. (1998). "Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials." **Médecine tropicale** 58, supplement 3: 50-53.
- Ruppel, A., et al. (1985b). "*Schistosoma mansoni*: Immunoblot analysis of adult worm proteins." **Experimental Parasitology** 60, 2 (October): 195-206.
- Ruppel, A., et al. (1987b). "Sera of *Schistosoma japonicum*-infected patients cross-react with diagnostic 31/32 kD proteins of *S. mansoni*." **Clinical & Experimental Immunology** 69, 2 (August): 291-298.
- Ruppel, A., H. J. Diesfeld. and U. Rother. (1985a). "Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide." **Clinical & Experimental Immunology** 62, 3 (December): 499-506.

- Ruppel, A., U. Breternitz, and R. Burger. (1987a). "Diagnostic Mr 31,000 *Schistosoma mansoni* proteins: requirement of infection, but not immunization, and use of the "miniblot" technique for the production of monoclonal antibodies." **Journal of Helminthology** 61, 2 (June): 95-101.
- Sajid, M., et al. (2003). "Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase." **Molecular and Biochemical Parasitology** 131, 1 (September): 65-75.
- Shimada, M., et al. (2007). "High susceptibility of *Neotricula aperta* gamma-strain from Krakor and Sdau in Cambodia to *Schistosoma mekongi* from Khong Island in Laos." **Parasitology International** 56, 2 (June): 157-160.
- Sinuon, M., et al. (2007). "Control of *Schistosoma mekongi* in Cambodia: Results of eight years of control activities in the two endemic provinces." **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 101, 1 (January): 34-39.
- Skelly, P. J., and C. B. Shoemaker. (2001). "*Schistosoma mansoni* proteases Sm31 (cathepsin B) and Sm32 (legumain) are expressed in the cecum and protonephridia of cercariae." **Journal of Parasitology** 87, 5 (October): 1218-1221.
- Sobhon, P., and E. S. Upatham. (1990). **Snail host, Life-cycle, and tegumental structure of oriental schistosomes**. Bangkok: Lincoln Promotion.
- Sorgho, H., et al. (2005). "Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens." **Acta Tropica** 93, 2 (February): 169-180.
- Sornmani, S. (1976). "Current status of research on the biology of Mekong *schistosoma*." **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 7, 2 (June): 208-213.

- Sripa, J., et al. (2010). "Secreted cysteine proteases of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: regulation of cathepsin F activation by autocatalysis and trans-processing by cathepsin B." **Cellular Microbiology** 12, 6 (June): 781-795.
- Stack, C. M., et al. (2005). "De-glycosylation of *Pichia pastoris*-produced *Schistosoma mansoni* cathepsin B eliminates non-specific reactivity with IgG in normal human serum." **Journal of Immunological Methods** 304, 1-2 (September): 151-157.
- Ministry of Tourism, Cambodia, .Statistics and Tourism Information Department, (2010). **Tourism Statistics Report**.
- Steinmann, P., et al. (2006). "Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk." **Lancet Infectious Diseases** 6, 7 (July): 411-425.
- Strandgaard, H., et al. (2001). "The pig as a host for *Schistosoma mekongi* in Laos." **Journal of Parasitology** 87, 3 (June): 708-709.
- Tamura, K. et al. (2013). "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0." **Molecular Biology and Evolution** 30, 12 (December): 2725-2729.
- Trottein, F., et al. (1990). "Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase." **Molecular and Biochemical Parasitology** 41, 1 (June): 35-44.
- Trottein, F., et al. (1992). "Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases." **Molecular and Biochemical Parasitology** 54, 1 (August): 63-72.
- Urbani, C., et al. (2002). "Epidemiology and control of mekongi schistosomiasis." **Acta Tropica** 82, 2 (May): 157-168.
- Utzinger, J., et al. (2001). "Relative contribution of day-to-day and intraspecimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel." **Parasitology** 122, Pt 5 (May): 537-544.

- Wasilewski, M. M., et al. (1996). "Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo." **Molecular and Biochemical Parasitology** 81, 2 (October): 179-189.
- White, A. B. (1997). **PCR Cloning Protocols from Molecular Cloning to Genetic Engineering**. New Jersey: Humana Press.
- Williams, D. L., et al. (2001). "Schistosome infection stimulates host CD4(+) T helper cell and B-cell responses against a novel egg antigen, thioredoxin peroxidase." **Infection and Immunity** 69, 2 (February): 1134-1141.
- Woodrow, C. J., R. K Haynes, and S. Krishna. (2005). "Artemisinins." **Postgraduate Medical Journal** 81, 952 (September): 71-80.
- World Health Organization. (2002). **Prevention and control of schistosomiasis and soil-Transmitted helminthiasis: report of a WHO Expert Committee**. Geneva: WHO Technical Report Series. No. 912.
- Wu, G. (2002). "A historical perspective on the immunodiagnosis of schistosomiasis in China." **Acta Tropica** 82, 2 (May): 193-198.
- Wu, X. H., et al. (2008). "Effect of floods on the transmission of schistosomiasis in the Yangtze River valley, People's Republic of China." **Parasitology International** 57, 3 (September): 271-276.
- Xiao, S. H. (2005). "Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins." **Acta Tropica** 96, 2-3 (November-December): 153-167.
- Xiang, X., W. Tianping, and T. Zhigang. (2003). "Development of a rapid, sensitive, dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis: a colloidal dye immunofiltration assay." **Journal of Immunological Methods** 280, 1-2 (September): 49-57.
- Yu, J. M., et al. (1998). "Variations in fecal *Schistosoma japonicum* egg counts." **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 59, 3 (September): 370-375.

- Yu, J. M., et al. (2007). "Comparison of the Kato-Katz technique, hatching test and indirect hemagglutination assay (IHA) for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China." **Parasitology International** 56, 1 (March): 45-49.
- Yuan, H. C., et al. (1984). "Susceptibility of snail vectors to oriental anthropophilic *schistosoma*." **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 15, 1 (March): 86-94.
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." **BMC Bioinformatics** 9 (January): 40.
- Zheng, M. J., et al. (2007). "Secreted expression of signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum* in *Pichia pastoris* system with primary evaluation on its antigenicity." **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**. 25, 1 (February): 12-16.
- Zhong, Z. R., et al. (2010). "Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of Schistosomiasis japonica." **Acta Tropica** 116, 1 (October): 1-8.
- Zhou, X., et al. (2002). "Regional network for research, surveillance and control of Asian Schistosomiasis (RNAS)." **Acta Tropica** 82, 2 (May): 305-311.
- Zhou, X. H., et al. (2010). "Identification and characterization of *Schistosoma japonicum* Sjp40, a potential antigen candidate for the early diagnosis of schistosomiasis." **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 67, 4 (August): 337-345.
- Zhou, X. P., et al. (2009). "Cloning, molecular characterization of a 13-kDa antigen from *Schistosoma japonicum*, Sj13, a putative salivary diagnosis candidate for Schistosomiasis japonica." **Parasitology Research** 105, 5 (October): 1435-1444.
- Zhu, Y. C. (2005). "Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review." **Acta Tropica** 96, 2-3 (November-December): 130-136.
- Zhu, Y., et al. (2002). "Development of a rapid, simple dipstick dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis." **Journal of Immunological Methods** 266, 1-2 (August): 1-5.





ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. LB (Luria-Bertani) medium

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. LB (Luria-Bertani) agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ให้เสร็จก่อนแล้วจึงเติม agar นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหาร LB agar ที่มีการเติม ampicillin เตรียมโดยผสมสารละลาย ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย ampicillin มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียม ampicillin stock solution

ชั่ง ampicillin 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี SDS-PAGE

1.1 การเตรียมสารละลาย 10% SDS

การเตรียม : ชั่งสาร SDS น้ำหนัก 10 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมสารละลาย 10% APS

การเตรียม : ชั่งสาร APS น้ำหนัก 1 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน แล้วแบ่งเก็บในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

1.3 การเตรียมสารละลาย 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

การเตรียม : ชั่งสาร Tris base น้ำหนัก 184.5 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 8.8 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 การเตรียมสารละลาย 1 M Tris-HCl (pH 6.8)

การเตรียม : ชั่งสาร Tris base น้ำหนัก 60.6 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 6.8 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 การเตรียม polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 12.5% (separating gel)

ปริมาณที่ใช้สำหรับเตรียมเจล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้

30% acrylamide gel	4	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	3	มิลลิลิตร
10% SDS	120	ไมโครลิตร
10% APS	120	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร
TEMED	12	ไมโครลิตร

การเตรียม : ผสม 30% acrylamide, 1.5 M Tris-HCl, 10% SDS และน้ำกลั่นใน ปีกเกอร์ จากนั้นเติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระมัดระวังให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจก

1.6 การเตรียม polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 4% (stacking gel)

มีส่วนผสมดังนี้

30% acrylamide gel	800	ไมโครลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	750	ไมโครลิตร
10% SDS	60	ไมโครลิตร
10% APS	60	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	4.3	มิลลิลิตร
TEMED	6	ไมโครลิตร

การเตรียม : ผสม 30% acrylamide, 1.0 M Tris-HCl, 10% SDS และน้ำกลั่นในปิกเกอร์ จากนั้นเติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หัวลิงไปदानบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

1.7 การเตรียมสารละลาย loading dye 2X (bromphenol blue)

ปริมาตร 12 มิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้

1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	4.5	มิลลิลิตร
Glycerol	10	มิลลิลิตร
10% SDS	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.5	มิลลิลิตร
DTT	1.55	กรัม
Bromophenol blue	0.01	กรัม

การเตรียม : ผสม Glycerol, 1.0 M Tris-HCl, 10% SDS และน้ำกลั่นในปิกเกอร์ จากนั้นชั่งสาร DTT และสาร Bromophenol blue ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งเก็บในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

1.8 การเตรียมสารละลาย 10X Running buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tris base	30.2	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการย้อม SDS-PAGE ด้วยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250

2.1 การเตรียมสารละลาย 0.1% coomassie brillaiant blue R-250

ส่วนประกอบต่อลิตร

Coomassie brillaiant blue R-250	1	กรัม
Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร กรองผ่าน

กระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2.2 การเตรียมสารละลาย Destain solution

ส่วนประกอบต่อลิตร

	Destain solution I	Destain solution II
Methanol	300 มิลลิลิตร	50 มิลลิลิตร
Acetic acid	100 มิลลิลิตร	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600 มิลลิลิตร	850 มิลลิลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

3. การเตรียมสารละลาย 10X Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4

ส่วนประกอบต่อลิตร

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	14.4	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ แล้วละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 7.4 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สัดส่วนเจือจางให้เป็น 1X PBS, pH 7.4 เตรียมโดยผสม 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

ส่วนการเตรียม PBS ที่มี 0.05% Tween-20 (PBS-T) เตรียมโดยผสม Tween-20 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใน 1X PBS ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

4. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี Western blot

4.1 การเตรียมสารละลาย Transfer buffer

ส่วนประกอบต่อลิตร

1X Running buffer	800	มิลลิลิตร
Methanol	200	มิลลิลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้ได้ 1 ลิตร

4.2 การเตรียมสารละลาย Blocking solution

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้

Skim milk	5	กรัม
Bovine Serum Albumin (BSA)	2	กรัม
PBS-T	100	มิลลิลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ใน PBS-T ให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี Indirect ELISA

5.1 การเตรียมสารละลาย Coating buffer, pH 9.6

ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้

Na ₂ CO ₃	0.318	กรัม
NaHCO ₃	0.586	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

การเตรียม : ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ แล้วละลายในน้ำกลั่น 160 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 9.6 แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.2 การเตรียมสารละลาย Blocking solution

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้

Bovine Serum Albumin (BSA)	1	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

การเตรียม : ชั่งสาร BSA น้ำหนัก 1 กรัม ละลายใน PBS ให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5.3 การเตรียมสารละลาย 1 N HCl

เตรียมโดยนำกรด HCl ปริมาตร 41.46 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

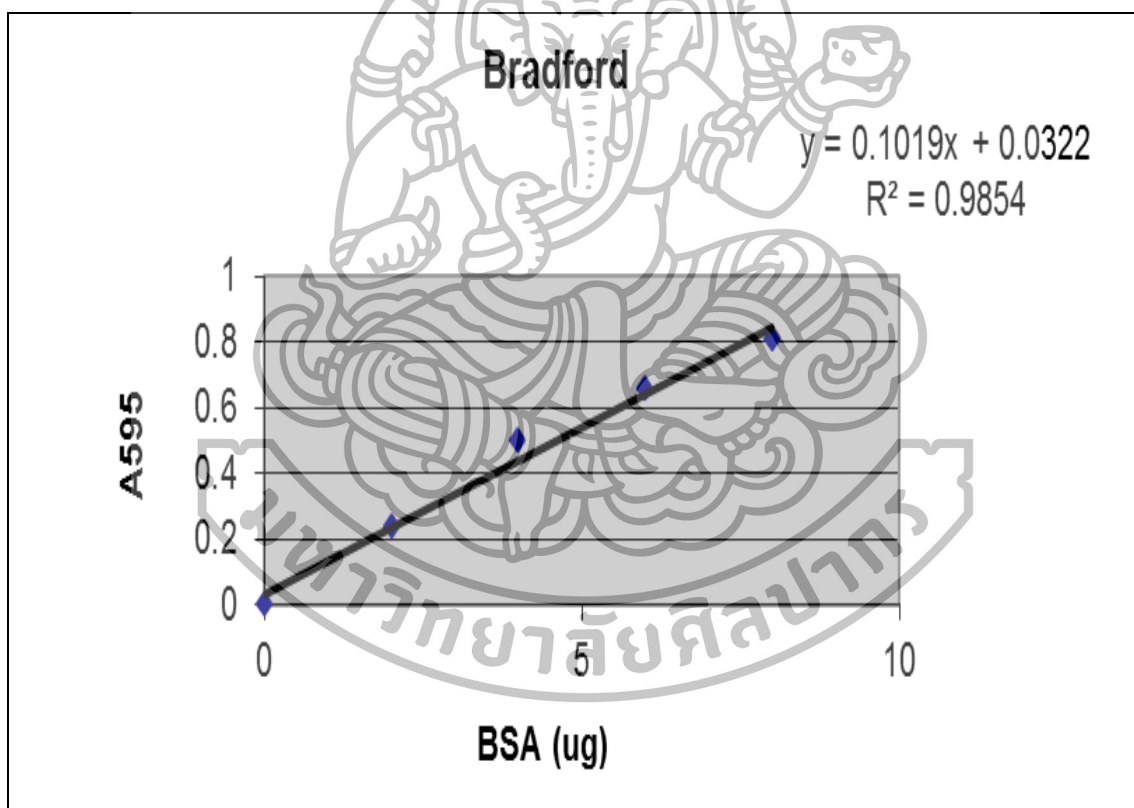


ขั้นตอนและวิธีการวิเคราะห์ต่าง ๆ

1. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Bradford assay

1.1 ทำกราฟการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นที่ 2-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 นำตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมได้มาเจือจางในสารละลาย Bradford reagent ผสมให้เข้ากัน โดยสังเกตให้สีของสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วงสีของสารละลายมาตรฐาน BSA แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟของสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin

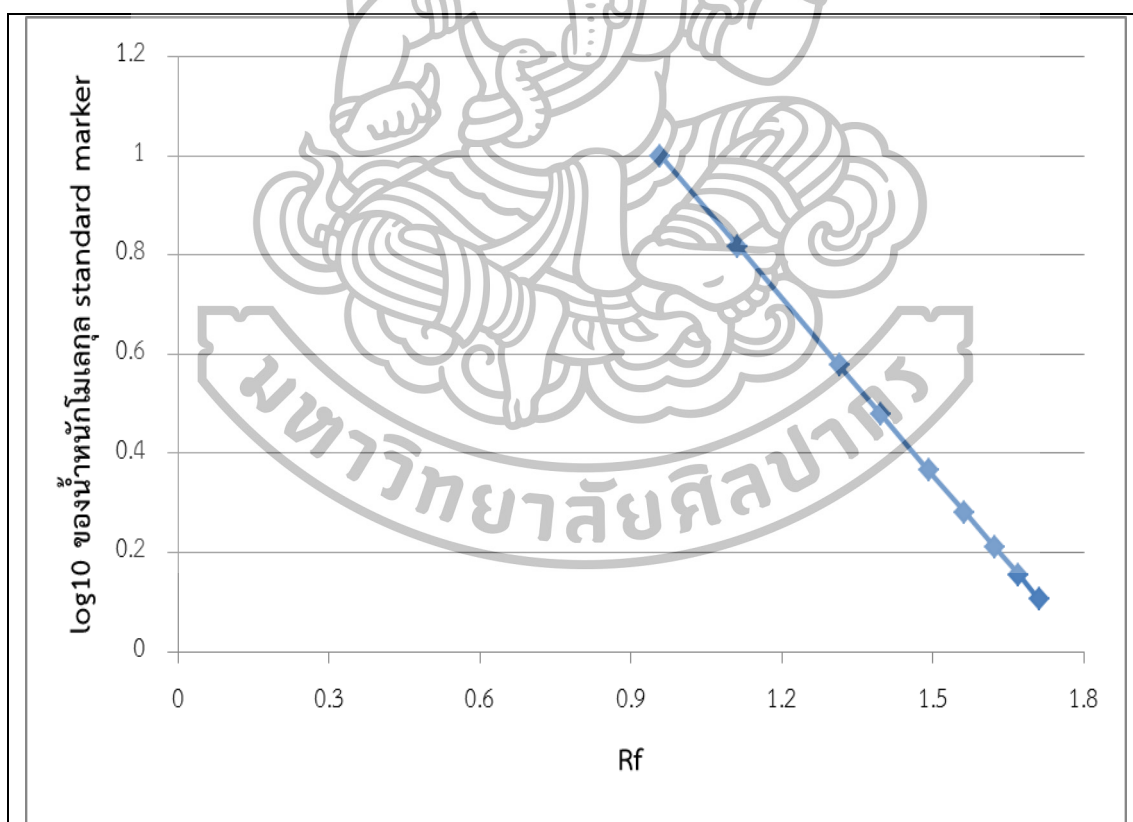


ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2. การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนหลังจากแยกด้วยวิธี SDS-PAGE

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน หลังจากแยกด้วยวิธี SDS-PAGE สามารถทราบได้โดยนำค่าสัมประสิทธิ์ของการเคลื่อนที่ (relative electrophoretic mobility, Rf) ของแถบโปรตีนที่สนใจ มาเปรียบเทียบกับค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) ของ standard molecular weight marker ที่ควบคู่บน slab gel แผ่นเดียวกันที่ย้อมสี coomassie brilliant blue R-250 จากกราฟเส้นตรงที่ได้จากการ plot ระหว่างค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) อยู่บนแกน X กับค่า \log_{10} ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดที่อยู่ใน standard molecular weight marker อยู่บนแกน Y โดยค่า Rf ของสารที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในสารละลายของ standard molecular weight marker ที่ใช้ หรือของโปรตีนแอนติเจนที่เราสนใจ จะคำนวณได้จาก

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงระยะทางที่ bromphenol blue เคลื่อนที่ไป}}$$



ภาพที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) กับค่า \log_{10} ของน้ำหนักโมเลกุลของ standard marker ใน 12.5% SDS-PAGE gel

3. การคำนวณหาปริมาณและคุณภาพของ RNA

1. การคำนวณหาปริมาณ RNA มีหลักการคือ การดูดกลืนแสง UV ของกรดนิวคลีอิกจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร โดยมีสารละลาย RNA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (absorbance, A_{260}) เท่ากับ 25 หน่วย absorbance (A_{260})

$$\text{กรดนิวคลีอิก หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)} = A_{260} \times 1/25$$

$$\begin{aligned} \text{กรดนิวคลีอิก หน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (\mu\text{g/ml})} &= (A_{260} \times 1/25) \times 1000 \\ &= A_{260} \times 40 \end{aligned}$$

หากใช้สารละลาย RNA ที่เจือจางในการตรวจ 100 เท่า (RNA 10 ไมโครกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) สามารถคำนวณปริมาณกรดนิวคลีอิก

$$\text{กรดนิวคลีอิก หน่วยไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (\mu\text{g}/\mu\text{l})} = (A_{260} \times 40 \times 100) / 1000$$

2. การหาคุณภาพของ RNA ค่าอัตราส่วนความยาวคลื่นที่ 260 กับ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ใช้บอกคุณภาพ RNA ว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ RNA ที่สกัดได้ควรมีสูงกว่า 2.00 ถ้าได้ค่าต่ำกว่านี้ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน และฟีนอล (phenol) อยู่ในปริมาณมาก

3. การหาคุณภาพของ RNA ค่าอัตราส่วนความยาวคลื่น 260 กับ 230 นาโนเมตร (A_{260}/A_{230}) ใช้บอกคุณภาพ RNA ว่ามีการปนเปื้อนโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) หรือไม่ RNA ที่สกัดได้ควรมีค่ามากกว่า 2.25 ถ้าต่ำกว่านี้ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโพลีแซคคาไรด์ มีผลทำให้สารละลาย RNA ที่ได้มีความหนืดและละลายน้ำได้ไม่ดี



ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของยีนต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับเบสของยีนต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GenBank

1. *Schistosoma mekongi* cathepsin B mRNA, complete cds

GenBank: KP317840.1

>gi|910268585|gb|KP317840.1| *Schistosoma mekongi*mkjkjj cathepsin B mRNA, complete cds

CGTCTACACAACATTGTACCATGTTGAAAAATCGCAGTTTGTATTGTTTCATTGTTTACTCCTCTCAAAG
CACATGTCACAACGAGAAACAATGAACATATTGAACCATTTGTCAGATGAGATGATTTTCATTCATCAATC
AACATCCAAATGCTGGATGGAAAGCGGACAAGAGTGATCGATTCCATTCCTGGATGATGCACGAATTC
TCATGGGTGCGAGAAGGGAGGATCCAGACGTGAAACGGAAAGCAGCGACCAACTGTAGATCATCATGATG
TGGATGTCGGAATACCATCATACTTTGATTCACGAAAAGAAATGGCCCTGTTGTAAGAGTATCTCAGAAA
TTCGTGATCAATCTCGATGTGGATCGTGTGGGCATTTGGCGCTGTCGAAGCTATGACTGATCGAATTT
GTATCCAATCGGGTGCAAAAACAATCAGTGGATTTGAGTGTGTGGATTTAATCAGCTGTTGTAAAGATT
GCGGTGATGGTTGTAATGGTGGTTTTCTTGGTCAGGCATGGGACTATTGGGTAACAAATGGGATTGTCA
CTGGAGGTTCAAAGAAAATCATACTGGTTGTCAACCGTATCCATTTCCGAAATGTGAACATCATAACGA
AAGGAAAGTATCCTGCGTGTGGACCGAAAATTTACAAAACACCTCAATGTAAGCAGAAATGTCAGAAGG
GATACAAAACGCCTTATGAACAAGACAAGCATTATGGTGGTATGTCTTACAATGTTCCCAATAATGCCA
AAGCTATTCAGAAAAGAAATATGATGAATGGACCAGTGAAGCTGCTATCGATGTTTATGAAGACTTCC
TCAATTACAAGTCAGGAATCTACAGACATGTGACTGGTTCAATAGTTGGTGGACATGCTATACGCATAA
TTGGATGGGGTGTGAGAAGAAAACGCCTTACTGGTTGGTTGCCAATTCATGGAATGAAGATTGGGGTG
AGAAGGGATTATTTGAAATAGTACGTGGAAGCGATGAATGTTCAATTGAATCTGATGTTGTGGCTGGAC
TTATAAAAACCTAATGAAGACTTGTAATTTGTGAGTAAATAAATAAATAGTTGAACTAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

2. SJS_006_19.T7 *SJS Schistosoma japonicum* cDNA, mRNA sequence

GenBank: CV693366.1

>gi|60258976|gb|CV693366.1|CV693366 SJS_006_19.T7 SJS *Schistosoma japonicum* cDNA, mRNA sequence

AATTAAGGGATTTGTTTATTTACTCACAATATACATGTATTCATTATGGGAACAATTTAGTTTGAATTA
GGTTTTTATAAGTCCAGCCACAACATTAGATTCAATTGAACATTCATCGCGTCCACGTACTATTCGAAA
TAGTCCCTTCTCACCCCAATCTTCATTCCATGAATTGGCAATCAACCAGTAAGGCGTTCTCTTCTCAAC
ACCCCATCCAATTATGCGTATGGCATGTCCACCAACTATTGAACCAGTCACATGTCTGTAGATTCCCTGA
CTTGTAATTCAGGAAGCTTCATAAACATCGAAAGCTGCTTCCACTGGTCCATACATCATTATATCTCT
CTGAATAACTTTCTCATTATTTTGAACATTTGAACTCTCATCACCATAATGCTTGTCTTGTTCATAAGG
GGTTTTGTATCCCTTCTGACATGTTTGTCTTACATTTGAGGGGTTTTGTAAATTTTCGTACCACACGCAGG
ATACTTTTCTTTTCGTATGATGCTCACATTTTGGAAAATGGATACGGGTGACAACCAGTATGATTTTCTTT
CGAACCTCCAGGGACTATCCCTCGTTTAAACCAATAGTCCCATGCTACACCAGGAAATCCACCTTGACA
ACCATCACCAATCTTCACAACAGCTTATTAATCTAATGCACTCAATTCTGCTGATTGTCCACCACC
TGATTGGATACAAATTCGATCAGTCATAGCTTCGACAGCTCCGAAAGCCCAACACGATCCACATCGAGA
ATGATCACGAATTTGTGCGATGCTNCTNACATGAGGGCCATTCTTTCTGTGAGTCAAATGGTGAGG

3. *Schistosoma japonicum* clone SJCHGC00054 unknown mRNA

GenBank: AY814659.1

```
>gi|56756435|gb|AY814659.1| Schistosoma japonicum clone SJCHGC00054
unknown mRNA
CATGTTGAAAATCGCAGTTTGTATTGTTTCATTCTTTGCTCTTCTCAAAGCACATGTTACAACGAGAAA
CAATGAACGTATTGAACCATTGTCAGATGAGATGATTTTCATTCAATTAATGAACATCCGGATGCTGGATG
GAAAGCTGACAAGAGTGATCGATTCCACTCATTGGATGATGCACGAATTTCTCATGGGTGCGAGAAAAGA
GGATGCAGAAAATGAAACGGAAGCGGCGTCCAACCTGTCGATCATCATGATTTGAAATGTTGAAATACCATC
ACAATTTGACTCACGAAAAGAAAATGGCCACATTGTAAGAGCATCTCACAAATTCGTGATCAATCTCGATG
TGGATCGTGTGGGGCTTTCGGAGCTGTCGAAGCTATGACTGATCGAATTTGTATCCAATCAGGTGGTCA
ACAATCAGCAGAATTGAGTGCATTAGATTTAATAAGCTGTTGTGAAGATTGTGGTGATGGTTGTAAAGG
TGGATTTCTTGGTCAAGCATGGGACTATTGGGTTAAACGAGGGATAGTCACTGGAGGTTCAGAAGAAAA
TCATACTGGTTGTCAACCGTATCCATTTCCAAAATGTGAGCATCTAACAAAAGGAAAGTATCCTGCATG
TGGTACGAAAATTTACAAAACACCTCAATGTAAGCAAACGTCTCAGAAGGGATACAAAACACCTTATGA
ACAAGACAAGCATTATGGTGATCAGCGTTACAATGTAATTAGTAATGAGAAAAGCTATTCAAAGAGAAAT
AATGATGTATGGACCAGTGGAAAGCAGCTTTCGATGTTTATGAAGACTTCTGAATTACAAGTCAGGAAT
CTACAGACATGTGACTGGTTCAATAGTTGGTGGACATGCCATACGCATAATTGGATGGGGTGTGAGAA
GGGAAAGCCTTACTGGTTGATTGCGAATTCATGGAATGAAGATTGGGGCTGAGAAGGGACTATTTCGAAT
GGTACGTGGACGCGATGAATGTTCAATTGAATCTCATGTTGTGGCTGGACTTATAAAAACCTAATTCAA
ACTAAATTGTTTACATAATGAATACATGTATATTGTGAGTAAATAAACAAATACCTTAATT
```





ภาคผนวก จ

ผลงานทางวิชาการที่เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผลงานทางวิชาการที่เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Acta Tropica 155 (2016) 11–19



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Schistosoma mekongi cathepsin B and its use in the development of an immunodiagnosis

Manaw Sangfuang^a, Yupa Chusongsang^b, Yanin Limpanont^b, Rapeepun Vanichviriyakit^{c,d}, Charoonroj Chotwiwatthanakun^e, Prasert Sobhon^{c,f}, Narin Preyavichyapugdee^{a,*}

^a Faculty of Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University, Phetchaburi Campus, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand
^b Applied Malacology Unit, Department of Social and Environmental Medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
^c Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand
^d Center of Excellence for Shrimp Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
^e Mahidol University, Nakhonsawan Campus, Nakhonsawan 60130, Thailand
^f Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Bangsuen, Chonburi 20131, Thailand



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 9 July 2015
 Received in revised form 17 November 2015
 Accepted 27 November 2015
 Available online 2 December 2015

Keywords:
 Schistosoma mekongi
 Serodiagnosis
 Cathepsin B (EC 3.4.22.1)

ABSTRACT

Schistosomiasis mekongi is one of the most important human parasitic diseases caused by *Schistosoma mekongi* in South-east Asia. The endemic area is the Mekong River sub-region from Laos to Cambodia. This parasite also infects dogs and pigs which are its alternative host species. Currently, the lack of reliable rapid diagnosis makes it difficult to monitor the infection and spreading of the disease. In this study, we screened the antigens of the parasite with sera of infected mice using Western blotting and identified proteins of interest with LC-MS/MS to obtain potential candidate proteins for diagnostic development. This assay yielded 2 immunoreactive bands at molecular masses of 31 and 22 kDa. The 31 kDa protein was the major band identified as cathepsin B, and its gene was cloned to obtain a full cDNA sequence (SmekCatB). The cDNA consisted of 1123 bp and its longest reading frame encoded for 342 amino acids with some putative post translation modifications. The recombinant SmekCatB (rSmekCatB) with hexahistidine tag at the C-terminus was expressed in *Escherichia coli* and purified by Ni-NTA resin under denaturing conditions. The rSmekCatB reacted with sera of *S. mekongi*-infected mice. Indirect ELISA using rSmekCatB as the antigen to detect mouse antibodies, revealed a sensitivity of 91.67% for schistosomiasis mekongi and the specificity of 100%. Our data suggested that SmekCatB is one of the most promising parasitic antigens that could be used for the diagnosis of *S. mekongi* infection.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis is an important global, socioeconomically devastating parasitic disease caused by *Schistosoma* species (WHO, 2006). The symptoms of the infected patients include abdominal pain, diarrhea, fever, bloody stool and finally the development of liver damage and possibly kidney failure (da Silva et al., 2013; Elbaz and Esmat, 2013). In Asia, the disease is caused by the oriental schistosomes including *Schistosoma japonicum* which is prevalent in China, the Philippines and Indonesia (Olveda et al., 2014; Satrija et al., 2015; Zhou et al., 2010), and *Schistosoma mekongi* which has been reported in the Mekong River sub-region, especially in Cambodia and Laos (Muth et al., 2010). In 2002, in Laos and Cambodia the number of people at risk from exposure to *S. mekongi* was estimated to be approximately 140,000 (Urbani et al., 2002) and continually increased to nearly 1.5 million people in 2008 (Attwood et al., 2008a,b). Moreover, domestic animals including dogs and pigs are also definitive hosts acting as reservoirs of infection (Matsumoto et al., 2002; Ohmae et al., 2004; Strandgaard et al., 2001; Urbani et al., 2002). The intermediate snail host, *Neotricula aperta*, is particularly prevalent in the areas of rocky bank along the Mekong River Basin. Three strains of *N. aperta* (γ , β , α) snails were differentiated by the appearance of pigmentation and sizes. All strains are potential intermediate hosts, but only γ -strain is the most epidemiologically significant (Attwood et al., 1997). These snails are especially abundant in Kratié and Stung-Treng Provinces in Cambodia, Khong Island in Laos, and around the juncture of the Mul and Mekong Rivers in Thailand (Attwood et al., 2008a; Sornmani,

dia and Laos (Muth et al., 2010). In 2002, in Laos and Cambodia the number of people at risk from exposure to *S. mekongi* was estimated to be approximately 140,000 (Urbani et al., 2002) and continually increased to nearly 1.5 million people in 2008 (Attwood et al., 2008a,b). Moreover, domestic animals including dogs and pigs are also definitive hosts acting as reservoirs of infection (Matsumoto et al., 2002; Ohmae et al., 2004; Strandgaard et al., 2001; Urbani et al., 2002). The intermediate snail host, *Neotricula aperta*, is particularly prevalent in the areas of rocky bank along the Mekong River Basin. Three strains of *N. aperta* (γ , β , α) snails were differentiated by the appearance of pigmentation and sizes. All strains are potential intermediate hosts, but only γ -strain is the most epidemiologically significant (Attwood et al., 1997). These snails are especially abundant in Kratié and Stung-Treng Provinces in Cambodia, Khong Island in Laos, and around the juncture of the Mul and Mekong Rivers in Thailand (Attwood et al., 2008a; Sornmani,

* Corresponding author. Fax: +66 3259 4038.
 E-mail address: jnarin@hotmail.com (N. Preyavichyapugdee).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.017>
 0001-706X/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

ภาพที่ 23 ผลงานทางวิชาการที่เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Schistosoma mekongi cathepsin B and its use in the development of an immunodiagnosis

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวমনาว แสงเฟื่อง
 ที่อยู่ 52/3 หมู่ 8 ต. กลอนโด อ. ด่านมะขามเตี้ย จ. กาญจนบุรี
 ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์และ
 เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
 พ.ศ. 2554 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์
 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ทุนที่เคยได้รับระหว่างการการศึกษา

1. ทุนนักศึกษาปริญญาโทผู้ช่วยวิจัย
2. ทุนอุดหนุนการศึกษาจากเงินบริจาคจากการประมูลถ่ายภาพบัณฑิต ประจำปี
 การศึกษา 2554
3. ทุนสนับสนุนค่าเล่าเรียน ระดับปริญญามหาบัณฑิต คณะสัตวศาสตร์และ
 เทคโนโลยีการเกษตร
4. ทุนสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานที่เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์
 วารสารวิชาการ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

ผลงานทางวิชาการที่ได้รับการตีพิมพ์

1. Sangfuang, M., Chusongsang, Y., Limpanont, Y., Vanichviriyakit, R.,
 Chotwiwatthanakun, C., Sobhon, P., and Preyavichyapugdee, N. (2016). “*Schistosoma
 mekongi* cathepsin B and its use in the development of an immunodiagnosis.” **Acta
 Tropica**. 155: 11-19.
2. Preyavichyapugdee, N., Sangfuang, M., Chaiyapum, S., Sriburin, S., Pootaeng-
 on, Y., Chusongsang, P., Jiraungkoorskul, W., Preyavichyapugdee, M., and Sobhon, P. (2016).
 “Schistosomicidal activity of the crude extract of *Artocarpus lakoocha*.” **The Southeast
 Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 47: 1-14.