



การหาตำแหน่งของแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดัลตัน

ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*

The localization of 21 kDa antigen in the liver fluke (*Fasciola gigantica*)

โดย

ศรียัฐ ภักดีรณชิต

อุดมศรี โชว์พิทธรพรัชัย

ธาริณี สวัสดิ์พาณิชย์

วิฑูร ขาวสุข

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2556

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบรายได้

ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553



งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนตามโครงการวิจัยจากงบรายได้
ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

บทคัดย่อ

การวิจัยเรื่อง การหาตำแหน่งของแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดัลตันในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ในตับ *Fasciola gigantica* มีจุดมุ่งหมายเพื่อเพื่อศึกษาตำแหน่งและการกระจายของโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa ภายในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย และรวมถึงศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแอนติเจนดังกล่าว เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis เขตร้อนในมนุษย์และสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยการนำ polyclonal antibody ที่ต้านต่อแอนติเจนของชั้นผิวพยาธิที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa มาศึกษาตำแหน่งการกระจายของแอนติเจนดังกล่าวในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพยาธิด้วยวิธี Immunohistochemistry

การวิจัยหาตำแหน่งของแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดัลตันในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. Total tegumental antigen สามารถพบได้ใน tegument, parenchyma, digestive tract และ reproductive tract ต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย และใน tegument parenchyma และ caecum ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ รวมถึงใน miracidium
2. 21 kDa tegumental antigen พบได้ใน tegument, digestive tract และ reproductive tract ต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย และใน tegument และ caecum ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ รวมถึงใน miracidium

Abstract

The research on the localization of 21 kDa antigen in the liver fluke (*Fasciola gigantica*) has objectives to localize the 21 kDa antigen on the tissue of *F. gigantica* including the basic characteristic of the antigen to develop the diagnosis kit for the fasciolosis in the human and cattle in tropical continent which caused by *F. gigantica*. Using polyclonal antibody that anti 21-kDa antigen and total tegumental antigen by immunohistochemical technique, the results are shown as

1. Total tegumental antigen is found on tegument, parenchyma, digestive tract and reproductive tract of adult fasciola. In the 4 weeks-old fasciola including miracidium, the tegumental antigen is found on tegument parenchyma and caecum
2. 21 kDa tegumental antigen is found on the tegument, digestive tract and reproductive tract of adult fasciola. In the 4 weeks-old fasciola including miracidium, the tegumental antigen are found on tegument and caecum.

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรค	6
2.2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยโรค	7
2.3 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับระบบปกคลุมร่างกาย	8
2.4 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับ Tegument-surface associated antigens	11
2.5 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับ Immunodiagnosis	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.1 การเก็บตัวอย่างพยาธิ	15
3.2 การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ tegumental Antigen ด้วยวิธี Immunoperoxidase	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย	17
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	44
อภิปรายผลการวิจัย	44
สรุปผลการวิจัย	47
บรรณานุกรม	48
ประวัติผู้วิจัย	55

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
<u>ภาพที่ 1</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ระยะตัวเต็มวัยในกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ preimmunize rat sera เป็น primary antibody แล้ว counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin แสดง negative staining ในเนื้อเยื่อต่างๆ	24-25
<u>ภาพที่ 2</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ระยะ unembryonated egg (uEg), embryonated egg (Eg) และพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (Ju) ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin	26-27
<u>ภาพที่ 3</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ระยะตัวเต็มวัยในเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin	28-29
<u>ภาพที่ 4</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ระยะตัวเต็มวัยใน parenchyma (Pc), caecum (Ca) และ bladder (Bl) ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin	30-31
<u>ภาพที่ 5</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ตัวเต็มวัยในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin	32-33
<u>ภาพที่ 6</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ตัวเต็มวัยในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin	34-35

<u>ภาพที่ 7</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ระยะ unembryonated egg (uEg), embryonated egg (Eg) และพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (Ju) ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin	36-37
<u>ภาพที่ 8</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ระยะตัวเต็มวัย ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin	38-39
<u>ภาพที่ 9</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ระยะตัวเต็มวัยใน caecum (Ca) และ bladder (Bl) ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin	40-41
<u>ภาพที่ 10</u>	ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ F. gigantica ตัวเต็มวัยในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin	42-43

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* เป็นสาเหตุของโรค Fasciolosis ในปศุสัตว์และมนุษย์ ซึ่งมีการระบาดค่อนข้างมากในประเทศเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยพบว่าคนเป็นโรคนี้สูงถึง 72-87% เนื่องจากลักษณะในการรับประทานอาหาร การเกิดโรค Fasciolosis ทำให้ผลผลิตทางปศุสัตว์ลดลงรวมถึงเป็นสาเหตุการตายของสัตว์ในรายที่มีการติดเชื้อรุนแรง เช่นเดียวกับมนุษย์ที่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนอื่นๆตามมาได้เช่น ตับแข็ง และมะเร็งเป็นต้น โรคพยาธิชนิดนี้รักษาได้โดยการให้ยา Triclabendazole แก่สัตว์ที่ติดเชื้อ แต่ยาชนิดนี้มีราคาค่อนข้างแพงและต้องใช้ในปริมาณมากถึงจะฆ่าพยาธิได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า พยาธิชนิดนี้สามารถพัฒนาตัวเองให้สามารถต้านยาดังกล่าวได้ ซึ่งทำให้ในแต่ละปีจะต้องใช้ยาฆ่าพยาธิในปริมาณที่มากขึ้นทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคพยาธิสามารถทำได้โดยการตรวจไข่ของพยาธิชนิดนี้ในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยการติดเชื้อด้วยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องการผู้ที่มีความชำนาญสูงในการตรวจวิเคราะห์ และไข่พยาธิ *F. gigantica* มีลักษณะคล้ายคลึงกับไข่พยาธิ *Fasciolopsis spp.* และ *Echinostoma spp.* ทำให้การตรวจอาจเกิดความผิดพลาดได้ และที่สำคัญที่สุดคือการตรวจพบไข่พยาธิ แสดงให้เห็นว่าเป็นการติดเชื้อพยาธิในช่วงท้ายของการติดเชื้อ ซึ่งในระยะนี้พยาธิตัวเต็มวัยได้เข้าไปอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีของสัตว์ที่ติดเชื้อ ทำให้การรักษาโดยการให้ยาฆ่าพยาธิไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร นักวิทยาศาสตร์จึงคิดค้นวิธีใหม่ ๆ ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิชนิดนี้ คือวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิใน serum และในอุจจาระ ซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิในระยะแรกของการติดเชื้อ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะเป็วิธีที่มีผู้ได้ศึกษากันมากแต่ยังคงอยู่ในช่วงพัฒนาให้มีความไว เทียงตรงและแม่นยำสูง แต่ก็มีข้อเสียคือไม่สามารถแยกผู้ป่วยหรือสัตว์ที่กำลังติดเชื้กับผู้ป่วยหรือสัตว์ที่หายจากโรคได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิมาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติเจนที่พยาธิสร้างขึ้นและขับออกมาจากตัวพยาธิ (excretory-secretory materials, ES) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งใน serum และในอุจจาระของผู้ป่วย

จากการศึกษาพบว่า ES antigens สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี ซึ่ง ES antigen ดังกล่าวถูกปลดปล่อยออกมาจากทางเดินอาหาร ระบบขับถ่าย และระบบชั้นผิวของพยาธิ จากการศึกษ immunodiagnosis โดยใช้การตรวจหาแอนติเจน cathepsin L ของพยาธิ *Fasciola* ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ปลดปล่อยออกมาจากทางเดินอาหาร พบว่าให้ sensitivity ที่ดี แต่พบว่ามี specific ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาแบบ cross reaction กับพยาธิชนิดอื่นได้ ได้แก่ *Schistosoma sp.* และ *Echinococcus sp.* ดังนั้นการตรวจหาแอนติเจนที่ปลดปล่อยออกมาจากชั้นผิวของพยาธิจึงเป็นทางเลือกใหม่ เนื่องจากชั้นผิวเป็นโครงสร้างที่สัมผัสกับเนื้อเยื่อของโฮสต์โดยตรง และทำหน้าที่ในการคัดหลั่งสารเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์ในรูปของ ES antigen จึงทำให้โปรตีนจากชั้นผิวสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี

จากการศึกษาโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 22 kDa บริเวณชั้นผิวของ *S. japonicum* (Sj22) และ *S. mansoni* (Sm22) พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ และสามารถบ่งบอกถึงการผลิต antigen-specific IgE antibody ของการติดเชื้อพยาธิ schistosome และการติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น ๆ ได้ จากการศึกษโดยการตรวจหาแอนติเจนของชั้นผิวพยาธิ *F. gigantica* ที่น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa พบว่าสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 – 32 ของการติดเชื้อ และให้ sensitivity ประมาณ 86.6% จากการศึกษโดยการนำซีรัมของวัวที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในธรรมชาติ (Cow's infected serum, CIS) มาทำปฏิกิริยากับ tegument antigen (TA) ของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี western immunoblotting พบว่าแถบโปรตีนของ TA ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ CIS ค่อนข้างเข้มคือที่น้ำหนักโมเลกุล 16, 21, 29, 33 และ 52 kDa ซึ่งแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถพบได้ในระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และ crude extract ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย นอกจากนี้จากการนำแอนติเจนที่ 21 kDa มาฉีดให้หนูเพื่อผลิต polyclonal antibody เมื่อนำ polyclonal antibody ดังกล่าวมาศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบโปรตีน 21 kDa ได้ใน excretory secretory antigen ของพยาธิตัวเต็มวัยอีกด้วย และ crude extract ของพยาธิระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และพยาธิระยะตัวเต็มวัย จากการศึกษข้างต้นแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa น่าจะถูกคัดหลังจากตัวพยาธิและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี จึงเป็นโปรตีนตัวเลือกที่น่าสนใจที่จะทำมาศึกษาเพื่อการตรวจวินิจฉัยพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนามต่อไปในอนาคต

อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณลักษณะพื้นฐานของ 21 kDa antigen ยังมีการศึกษากันค่อนข้างน้อย ทั้งในเรื่องของเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ผลิต 21 kDa antigen และศักยภาพในการทำไปตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานในแง่ของเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ในการสร้าง 21 kDa antigen ด้วยวิธี immunoperoxidase เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาเรื่อง immunodiagnosis ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาตำแหน่งและการกระจายของโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa ภายในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยในครั้งนี้เป็นศึกษาหาแอนติเจนจากชั้นผิวหนังพยาธิ และรวมถึงศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแอนติเจนดังกล่าวเป็นสำคัญ เพื่อนำมาพัฒนาการวินิจฉัยโรคพยาธิ fasciolosis เชื้อร่อนในมนุษย์และสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำ polyclonal antibody ที่ต้านต่อแอนติเจนของชั้นผิวหนังพยาธิที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa มาศึกษาตำแหน่งการกระจายของแอนติเจนดังกล่าวในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพยาธิ ซึ่ง polyclonal antibody ดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.วิฑูร ชาวสุข อาจารย์ประจำ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งการทดลองก่อนหน้าได้มีการทดสอบลักษณะเบื้องต้นของ polyclonal antibody ดังกล่าวยังมีความจำเพาะค่อนข้างสูง และมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นแอนติเจนในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิได้ โดยการทดลองจะประกอบด้วยหัวข้อคือ

ตรวจหาตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa ภายในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ด้วยวิธี immunohistochemistry

ทฤษฎี สมมติฐาน กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากการศึกษาข้อมูลที่ผ่านมาพบว่า มีการศึกษาลักษณะแอนติเจนของชั้นผิวเพื่อนำมาพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ค่อนข้างน้อยมาก และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาที่ผ่านมานั้นยังไม่สามารถนำมาใช้ได้จริงในภาคสนาม และยังคงอยู่ในขั้นตอนการศึกษาหาโปรตีนที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิ เพราะฉะนั้นเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาหาแอนติเจนตัวใหม่ ๆ เพื่อใช้เป็นตัวเลือกในการนำไปพัฒนาดังกล่าว โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa จากชั้นผิวนับว่าเป็นแอนติเจนที่มีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาดังกล่าว ซึ่งพบว่า 21 kDa เป็นแอนติเจนที่พบได้ในพยาธิทุกระยะ รวมทั้งพยาธิระยะตัวอ่อนที่เพิ่งติดเชื้อเข้าสู่โฮสต์ เมื่อพยาธิตัวอ่อนซ่อนไซเข้าสู่เนื้อเยื่อของโฮสต์จะมีการปลดปล่อย 21 kDa แอนติเจนออกมาทันที ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์สามารถตรวจสอบได้และจะสร้างแอนติบอดีต้านต่อ 21 kDa ดังกล่าว แสดงว่า 21 kDa เป็นแอนติเจนที่หลังจากพยาธิในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี ดังนั้นถ้ามีการตรวจวินิจฉัยพบ 21 kDa ภายใน serum ของโฮสต์ได้ตั้งแต่วะยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ ซึ่งเป็นระยะที่พยาธิมีความไวต่อยาฆ่าพยาธิและมีการต้านยาฆ่าพยาธิได้น้อย ซึ่งจะมีความไวกว่าการตรวจหาไซของพยาธิในอุจจาระของผู้ป่วย จะทำให้การรักษาโดยการให้ยาฆ่าพยาธิมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จะเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาและลดพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้ดี งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ 21 kDa ในแง่ของตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่มีการสร้าง 21 kDa ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะสามารถเข้าใจกลไกในการผลิตของ 21 kDa ก่อนที่จะนำไปศึกษาในระดับของการตรวจวินิจฉัยโรคต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Fasciola gigantica เป็นพยาธิใบไม้ตับเขตร้อน ก่อให้เกิดโรค Fasciolosis ซึ่งมีการติดเชื้อในสัตว์ที่กินหญ้าและพืชน้ำเป็นอาหาร เช่น โคและกระบือ(1) โรคพยาธิชนิดนี้เป็นปัญหาที่สำคัญของการปศุสัตว์ในเขตร้อนทั่วโลก(2) โดยแหล่งระบาดส่วนใหญ่พบในทวีปเอเชีย แอฟริกาและแถบอเมริกาใต้ เช่น ในประเทศโคลัมเบีย ฮาวาย อิรัก อิหร่าน รัสเซีย ปากีสถาน อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย รวมทั้งประเทศไทย (3-5) พยาธิชนิดนี้อาศัยอยู่ในท่อน้ำดีและตับของโฮสต์ซึ่งก่อให้เกิดพยาธิสภาพอย่างรุนแรงที่ตับโดยเฉพาะส่วนของ parenchyma และทำให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำดี สัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิจะมีการเจริญเติบโตช้า ให้ผลผลิตโดยเฉพาะเนื้อและนมลดลง (6) ถ้ามีการติดเชื้อพยาธิในจำนวนมากหรือสัตว์ที่ติดเชื้ออายุน้อย อาจทำให้สัตว์ตายได้ ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจทั่วโลก (2) ปัจจุบันโรคพยาธิชนิดนี้ยังเป็นปัญหาที่สำคัญของการปศุสัตว์ในประเทศไทย โดยมีอัตราการแพร่กระจายของโรคในโคและกระบือ ประมาณ 4-24 % (7) ซึ่งพบมากที่สุดใภูมิภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ตามลำดับ ทำให้ประเทศไทยต้องสูญเสียรายได้ถึง 350-400 ล้านบาทต่อปี (5) นอกจากนี้พบว่าพยาธิ *F. gigantica* สามารถติดเชื้อในคนได้เช่นกัน ซึ่งพบผู้ป่วยจำนวน 16 คนที่ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (3)

พยาธิ *F. gigantica* เป็นพยาธิที่จัดอยู่ใน Phylum *Platyhelminthes*, Class *Trematoda*, Subclass *Digenea*, Superorder *Anepithelocystida*, Order *Echinostomatida*, Family *Fasciolidae* และ Genus *Fasciola* โดยมีวงจรชีวิตเริ่มจากเมื่อไข่ถูกปล่อยออกมาจากอุจจาระของโฮสต์ ตัวอ่อนภายในไข่จะยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งจะใช้เวลาอยู่ในน้ำประมาณ 10-15 วัน ที่อุณหภูมิ 22-27 องศาเซลเซียส ตัวอ่อนจะเจริญไปเป็น miracidium อยู่ในไข่ หลังจากฟักออกมาจากไข่ miracidium จะว่ายน้ำในน้ำ เมื่อพบหอยที่เป็น intermediate host ซึ่งได้แก่ *Lymnaea rubiginosa* miracidium จะไชเข้าไปภายในตัวของหอยแล้วเจริญเป็น sporocyst redia และ cercaria ตามลำดับ ภายใน 3-6 สัปดาห์ cercaria จะไชออกมาจาก intermediate host และว่ายน้ำในน้ำเป็นระยะเวลาสั้น ๆ หลังจากนั้นจะเกาะอยู่ตามพืช เช่น ผักแว่น ผักบุ้ง ผักกระเฉด หรือหญ้า เมื่อสลัดหางออกจะสร้างผนังหุ้มลำตัวเรียกว่า cyst กลายเป็นพยาธิระยะ metacercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อ เมื่อคนหรือสัตว์ที่เป็น specific host กินพืชที่มีตัวอ่อนระยะ metacercaria ปะปนอยู่โดยไม่ทำให้สูญเสียก่อนก็จะติดเชื้อพยาธิเข้าสู่ร่างกาย cyst ของ metacercaria

จะถูกย่อยภายในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ทำให้ตัวอ่อนพยาธิสามารถออกมาจาก cyst และไชผ่านผนังลำไส้เข้าสู่ช่องท้อง หลังจากนั้นจะเดินทางไปยังตับผ่านเข้าสู่เนื้อตับและเข้าสู่ท่อน้ำดีเจริญไปเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (8)

การควบคุมโรค

การควบคุมโรค Fasciolosis สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การใช้ยาฆ่าพยาธิ การควบคุมอาหารและน้ำที่ให้สัตว์กิน ควบคุมบริเวณที่ใช้เลี้ยงสัตว์ และการทำลายหอยที่เป็น intermediate host ของพยาธิ นอกจากนี้การควบคุมโรคนี้อยู่กันสภาพเศรษฐกิจและการศึกษาของผู้เลี้ยงสัตว์ซึ่งยังขาดความรู้ความเข้าใจในการป้องกันโรค และไม่ทราบถึงประโยชน์ที่จะได้รับหากสามารถป้องกันและควบคุมโรคพยาธิได้ ในปัจจุบันการควบคุมโรคส่วนมากจะให้ยาฆ่าพยาธิแก่สัตว์ โดยยาที่นิยมใช้ คือ Triclabendazole (6, 9) แต่การใช้ยาฆ่าพยาธิชนิดนี้มีข้อเสีย คือเมื่อใช้ยาในระยะเวลาสั้น ๆ จะทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมลดลงเนื่องจากพยาธิเกิดการดื้อยา (10) นอกจากนี้การใช้ยาฆ่าพยาธิและการใช้สารเคมีกำจัดหอยจะทำให้มีสารตกค้างอยู่ในร่างกายของ host และมีกรปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการคิดค้นวัคซีนขึ้นมาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพยาธิซึ่งเชื่อว่าจะสามารถควบคุมโรคนี้ได้ในระยะยาวและมีราคาถูกลง (6)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับชีววิทยามูมิคุ้มกันของโรคพยาธิใบไม้ตับที่ติดเชื่อในสัตว์เคี้ยวเอื้องมากขึ้น เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิใบไม้ตับกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็น Specific host วิธีการหนึ่งคือการศึกษาในระดับโมเลกุลมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวัคซีนสำหรับใช้ในการควบคุมและป้องกันการติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับและการวินิจฉัยโรค ก่อนปี ค.ศ. 1987 ได้มีการทดลองฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อต้านต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ซึ่งสกัดได้จากตัวพยาธิตามธรรมชาติและเอนไซม์ protease ที่ปล่อยออกมาจากพยาธิ(11) จากผลการพิสูจน์และแสดงลักษณะเฉพาะของโปรตีนที่สกัดได้จากพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ที่ได้ทดสอบการใช้วัคซีนแล้วนี้ พบว่าสามารถลดการติดเชื่อได้และพยาธิที่พบจะมีขนาดเล็กลงซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการฉีดวัคซีนให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ต้านต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยใช้ metacercaria ที่ผ่านการฉายรังสีและหนูที่ถูกฉีดวัคซีนที่สกัดได้จาก metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*(12) แอนติเจนบริสุทธิ์ 4 ชนิดที่สกัดได้จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* นั้นประกอบด้วย fatty acid binding protein (FABP), glutathione S-transferase (GST), cathepsin L

และ paramyosin ถูกนำมาทดสอบวัดขึ้นในโคพันท์ Brahman-cross ในประเทศอินโดนีเซียให้ผลการทดลองที่สามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ได้(13) ปัจจุบันพบโปรตีนหลายชนิดที่มีแนวโน้มและมีศักยภาพที่จะเป็นวัคซีนตัวเลือก ได้แก่ 1. Fatty acid-binding protein (Fh12) พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *S. mansoni* และ *F. hepatica* ในหนูได้ 31-100 % (14) 2. Glutathione S-transferase พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ในแกะ 57 % (15) และในโค 41-69 % (16) 3. Cathepsin L พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ในแกะได้ 69 % (17) 4. Haemoglobin พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ในโคได้ 42-69 % 5. Cathepsin L และ haemoglobin พบว่าสามารถลดการติดเชื้อพยาธิ *F. hepatica* ได้ 72 % (18).

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* สามารถทำได้ทั้งวิธีทางปรสิตวิทยาและวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน วิธีทางปรสิตวิทยาทำได้โดยการตรวจหาไข่พยาธิที่ออกมากับอุจจาระ แม้ว่าจะเป็นวิธีที่แม่นยำที่สุดแต่ก็มีปัญหาด้านความไวในการตรวจวิเคราะห์ซึ่งจะเป็นการตรวจพบโรคนี้ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ เนื่องจากในระยะแรกของการติดเชื้อมันพยาธิยังเจริญไม่เต็มที่จึงไม่มีไข่ปนออกมากับอุจจาระทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาไข่พยาธิได้ นอกจากนี้ถ้ามีการติดเชื้อจำนวนน้อยไข่พยาธิก็จะมีในอุจจาระน้อยเช่นกัน จึงอาจต้องตรวจซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง อีกทั้งไข่ของพยาธิ *F. gigantica* ยังมีลักษณะคล้ายคลึงกับไข่พยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น *Fasciolopsis sp.* และ *Echinostoma sp.*(19) เป็นต้น จึงอาจทำให้ผลการวินิจฉัยผิดพลาดได้ อีกวิธีหนึ่งคือวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อพยาธิใน serum และหาแอนติเจนของพยาธิใน serum และในอุจจาระซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคในระยะแรกของการติดเชื้อ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะเป็นวิธีที่มีผู้ได้ศึกษากันมากแต่ยังคงอยู่ในช่วงพัฒนาให้มีความไว เทียบตรงและแม่นยำสูง แต่ก็ยังมีข้อเสีย คือไม่สามารถแยกผู้ป่วยหรือสัตว์ที่กำลังติดเชื้อมกับผู้ป่วยหรือสัตว์ที่หายจากโรคได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนของพยาธิมาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ โดยการตรวจหาแอนติเจนที่พยาธิสร้างขึ้นและขับออกมาจากตัวพยาธิ (excretory-secretory materials, ES) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งใน serum (20) และในอุจจาระของผู้ป่วย (21)

จากการศึกษาข้างต้นโปรตีนที่มีศักยภาพเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีน หรือ immunodiagnosis ส่วนใหญ่ ถูกปลดปล่อยออกมาจากตัวพยาธิแล้วสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งโปรตีนดังกล่าวอยู่ในรูปของ excretory-secretory (ES) material (22, 23) ซึ่ง ES antigen ดังกล่าวถูกปลดปล่อยออกมาจากระบบอวัยวะต่าง ๆ ของพยาธิโดยเฉพาะอย่างยิ่งชั้นผิว (tegument) และทางเดินอาหาร (caeca) (24)

ระบบย่อยอาหารแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหน้าประกอบด้วย oral sucker, pharynx และหลอดอาหาร ส่วนหลังประกอบด้วยลำไส้ที่แตกแขนงจำนวนมากจนถึงท้ายสุดของลำตัว (25) เยื่อบุผิวลำไส้ของพยาธิ *F. gignatica* ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างคล้ายพีระมิด ภายในไซโตพลาสซึมมี RER และ zymogen granules จำนวนมาก (25) ซึ่ง zymogen granules เหล่านี้จะถูกปลดปล่อยออกมาจากตัวพยาธิในรูปของ ES material (26) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ES materials นี้ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 กลุ่ม ได้แก่ serine, cysteine, metallo และ aspartic protease (27) เอนไซม์ protease เหล่านี้มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของพยาธิเนื่องจากพยาธิใช้เอนไซม์ protease ในการย่อยอาหาร ย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์ในขณะ migration นอกจากนี้พบว่าพยาธิยังใช้เอนไซม์ protease ในการหลบหลีกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ host อีกด้วย ซึ่งเอนไซม์ที่พบมากที่สุด ใน ES material คือ กลุ่ม cysteine protease (28)

ระบบปกคลุมร่างกาย (Tegument)

ชั้นผิว (Tegument) เป็นอวัยวะที่สัมผัสกับเนื้อเยื่อและ body fluids ของ host ซึ่งถูกปกคลุมด้วย spines จำนวนมาก ยกเว้นบริเวณของ oral sucker ventral sucker และ excretory pore ชั้นของ tegument มีลักษณะเป็น syncytium เชื่อมต่อกับตัวเซลล์ด้วย cytoplasmic process ของเซลล์ tegument ซึ่งตั้งอยู่ใกล้กับ parenchyma ได้ชั้น peripheral muscle ผิวของ tegument จะมีลักษณะยื่น ซึ่งเกิดจาก transverse fold สลับกับ groove (29) ชั้นผิวเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญซึ่งมีหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ สังเคราะห์และหลั่งสารต่าง ๆ มาเคลือบผิวทั่วร่างกายของพยาธิ ดูดซึมอาหาร osmoregulation ป้องกันการถูกย่อยโดย enzyme ในระบบทางเดินอาหารของ host และสาร surfactant ของน้ำดี ป้องกันพยาธิจากระบบภูมิคุ้มกันของ host และรับรู้ความรู้สึก (29) อย่างไรก็ตามโครงสร้างพื้นฐานของ tegument จะแตกต่างกันไปในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต (30)

การศึกษา ultrastructure ของ tegument ใน *F. gigantea* ตัวเต็มวัย (31) พบว่ามีลักษณะ พื้นฐานที่คล้ายคลึงกับ tegument ใน *F. hepatica* ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 4 ชั้น ชั้นที่ 1 ประกอบด้วย microfold หรือ ridge และ pits ซึ่งถูกคลุมด้วย trilaminar membrane หนาประมาณ 8 nm. surface membrane ถูกคลุมด้วย glycocalyx ซึ่งประกอบด้วย 2 ชั้นคือ inner dense homogeneous layer หนาประมาณ 9-14 nm และ outer fibrillar layer หนาประมาณ 50-280 nm ภายใน cytoplasmic syncytium ของ tegument ประกอบด้วย densely-packed microtrabecular network และ granule ลักษณะกลม (G1) ขนาด 90x180 nm. และ granule ที่มีลักษณะคล้าย disc (G2) ขนาดประมาณ 40x250 nm G1 มี matrix เป็นลักษณะ dense ruthenium-red positive matrix ซึ่งมี glycocalyx สะสมอยู่ภายใน ส่วน G2 จะมี matrix ใส glycocalyx ภายใน G1 จะถูก exocytose และเคลือบอยู่บริเวณส่วนนอกของ tegument ส่วน G2 จะทำหน้าที่หลักในการสร้าง surface membrane tegument ชั้นที่ 2 ค่อนข้างแคบ ซึ่งมี G1 และ G2 สะสมอยู่จำนวนมาก รวมทั้ง lysosome ชั้นที่ 3 เป็นชั้นที่กว้างที่สุดประกอบด้วย mitochondria จำนวนมาก ปริมาณ G1 และ G2 ลดลง ชั้นที่ 4 อยู่ล่างสุดติดกับ basal lamina cytoplasm ในชั้นนี้มีลักษณะหลวมและมีการพับ (infolding) ของ basal plasma membrane จำนวนมาก รวมทั้งพบ mitochondria G1 และ G2 เช่นกัน เซลล์ tegument ที่อยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อจะส่ง process ขึ้นไประหว่างชั้นกล้ามเนื้อและเชื่อมรวมกับ tegumental syncytium ในชั้นที่ 4 ซึ่งเซลล์ tegument จะส่ง granules G1 G2 ไปยัง tegument โดยอาศัย microtubules ภายในเซลล์ (31)

เซลล์ tegument เรียงตัวเป็นแถวอยู่ใต้กล้ามเนื้อ ภายใน cytoplasm ประกอบด้วย mitochondria RER polysome และ Golgi complex เซลล์ tegument ในพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยมี 2 ชนิดด้วยกัน คือเซลล์ T1 และ T2 โดยจะพบกลุ่มเซลล์ชนิด T1 มากกว่า T2 คิดเป็นสัดส่วน T1:T2 ประมาณ 4:1 เซลล์ชนิด T1 มี nucleus ขนาดใหญ่และเห็นได้ชัดเจน มี mitochondria เป็นจำนวนมาก พบ RER และ Golgi complexes ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้าง secretory bodies จึงเห็นได้ว่าเซลล์ชนิด T1 เป็น active secretory cell เซลล์ชนิด T2 มีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์ชนิด T1 แต่มีปริมาณ RER Golgi complex และ mitochondria น้อยกว่าแต่มี secretory bodies ในปริมาณที่มากกว่าเซลล์ชนิด T1 เก็บสะสมอยู่ใน cytoplasm (32) ส่วนเซลล์ tegument ของพยาธิ *F. gigantea* พบว่ามีเพียงหนึ่งชนิดเท่านั้นซึ่งสามารถสร้าง G1 และ G2 granule ได้ภายในเซลล์เดียวกัน (31)

ชั้นผิวของพยาธิ *F. gigantica* ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile ปกคลุมด้วยหนามปลายเดี่ยวทั่วร่างกาย ชั้นผิวมีความหนาประมาณ 1-1.5 ไมครอน สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชั้นย่อย คือส่วนนอกมีลักษณะของ invagination ของผิว ส่วนชั้นภายในมีความกว้างมากกว่า ซึ่งภายในประกอบด้วย granules จำนวนมากและ mitochondria โดย granules ภายในชั้นผิวสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ G0 และ G2 ซึ่งคาดว่า G0 เป็น granule ที่ทำหน้าที่ในการหลังสารที่เป็น glycocalyx ในขณะที่ G2 ทำหน้าที่ในการสร้าง membrane ให้ชั้นผิว เมื่อพยาธิมีการพัฒนาเพิ่มมากขึ้น พบว่ามี granule ชนิด G1 เกิดขึ้นในขณะที่ G0 มีปริมาณลดลงและหายไปมากที่สุด โดย G1 เริ่มปรากฏเมื่อพยาธิเข้าไปอยู่ในเนื้อตับ (1 สัปดาห์หลังจากการติดเชื้อ) ซึ่ง G1 นี้จะทำหน้าที่ในการหลัง glycocalyx แทน G0 ในขณะนี้ G2 ก็มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากพยาธิจะถูกโจมตีโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ พยาธิจำเป็นต้องมีการสลัดผิวออกตลอดเวลาเพื่อป้องกันการจับของเม็ดเลือดขาวบริเวณชั้นผิว ซึ่งการสลัด membrane ของชั้นผิวดังกล่าวจะทำงานร่วมกับการสลัด glycocalyx ของชั้นผิวเช่นกัน ในขณะเดียวกันขณะที่พยาธิตัวอ่อนซ่อนไข่ไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของโฮสต์นั้น พยาธิก็จะมีการปล่อย protease enzymes ออกมาจากทางเดินอาหารเพื่อใช้ในการย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อใช้เป็นอาหาร เพื่อซ่อนไข่ไปตามส่วนต่าง ๆ และเพื่อทำลายระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (30)

นอกจากนี้พบว่า tegument ของพยาธิ *F. hepatica* มีเอนไซม์สะสมอยู่ภายในมากมายได้แก่ acid phosphatase, Na⁺/K⁺-ATPase, esterase, peroxidase, cytochrome oxidase และ succinic dehydrogenase(33-38) activity ของเอนไซม์ acid phosphatase จะพบในบริเวณ syncytium โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ apical plasma membrane และยังพบเอนไซม์ภายใน tegument ทางด้าน dorsal มากกว่าด้าน ventral(37, 39) activity ของเอนไซม์ Na⁺/K⁺-ATPase จะพบในบริเวณ invagination ของ apical plasma membrane และ infoldings ของ basal plasma membrane ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิด ion pump ของ tegument membranes โดยจะพบ Na⁺/K⁺-ATPase ด้าน ventral มากกว่า dorsal tegument (36, 38)

จากการศึกษาพบว่า tegument ในแต่ละบริเวณของพยาธิมีลักษณะที่แตกต่างทั้งทางด้านรูปร่าง ลักษณะการกระจายของ spine และการกระจายของเอนไซม์ acid phosphatase และ Na⁺/K⁺-ATPase ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น sensory receptor ใน tegument ก็พบว่าการกระจายที่แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณเช่นกัน นอกจากนี้พบว่า tegument ก็มีการตอบสนองต่อ anthelmintic induce damage ซึ่ง

แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณ แสดงให้เห็นว่า tegument ในแต่ละส่วนของร่างกายพยาธิมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไปซึ่งต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป (32)

Tegument-surface associated antigens

Tegumental-associated antigens เป็นแอนติเจนหลักที่ปลดปล่อยออกมาจากพยาธิตัวแบนจากการศึกษา tegumental antigens ของพยาธิ *Schistosoma japonicum* และ *S. mekongi* ด้วยวิธี western immunoblotting พบว่ามีแถบโปรตีนเด่นประมาณ 15-20 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26-205 kDa (40, 41) ในขณะที่ *S. mansoni* มีแถบโปรตีนเด่นที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 97, 86, 68, 50 และ 38 kDa(42) ซึ่งเชื่อว่าโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่มาจากชั้นผิวหรือสัมพันธ์กับชั้นผิวของพยาธิ การศึกษา specific โปรตีนของพยาธิไปไม่เลือดพบว่า พบ phosphoglycerate kinase (SmPGK) ในส่วนต่าง ๆ ของ *S. mansoni* รวมถึงชั้นผิว โดย SmPGK นี้จะถูกปลดปล่อยออกมาจากชั้นผิวของพยาธิเข้าสู่กระแสเลือดของสัตว์ที่ติดเชื้อมนุษย์(43) โดย SmPGK นี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้เป็นอย่างดีและไม่มีผล cross reaction กับ PGK ของโฮสต์(43) นอกจากนี้มีการศึกษาพบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 22 kDa บริเวณชั้นผิวของ *S. japonicum* (Sj22) โดยจากการศึกษาการฉีด cDNA ของ Sj22 ในสัตว์ทดลองพบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีเช่นกัน(44) มีการตรวจพบโปรตีน 20.8 kDa ในชั้นผิวของ *S. mansoni* ระยะ sporocyst และ ตัวเต็มวัย(45, 46) ซึ่ง rSm20.8 สามารถทำปฏิกิริยากับ serum ของคนและกระต่ายที่ immunized ด้วย irradiated cercariae (46) นอกจากนี้พบว่า polyclonal antibodies ที่ต้านต่อ Sm20.8 สามารถตรวจพบ Sm20.8 ในทุกระยะของการพัฒนาของพยาธิ และจากการศึกษา in vitro killing โดยใช้ IgG fraction พบว่าสามารถฆ่าพยาธิ schistosomules ของ *S. mansoni* ได้ 34% โดยอาศัยการทำงานร่วมกับ complement (46) และจากการ immunize สัตว์ทดลองด้วย cDNA ของ Sm20.8 พบว่าสามารถลดการติดเชื้อมนุษย์ได้ประมาณ 30% หลังจากการติดเชื้อมนุษย์ด้วย cercariae(46) จากการศึกษาโดยการ screening cDNA libraries ของ *S. mansoni* โดยใช้ polyclonal antibodies ที่ต้านต่อ tegument ของ schistosomules พบ 30S โปรตีนซึ่งสามารถตรวจพบได้ใน serum ของสัตว์ที่ติดเชื้อมนุษย์ด้วย irradiated cercariae(47)

การศึกษาในพยาธิ *F. hepatica* ตัวเต็มวัยพบว่า major antigen มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64-52, 38-24, 17, 15, 13 และ 12 kDa ที่โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 kDa พบได้เฉพาะใน

ระยะแรกของการติดเชื้อเท่านั้น ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยสามารถพบได้ในช่วงท้ายของการติดเชื้อ(48) ในขณะที่ ES fraction ของ *F. gigantica* ประกอบด้วยโปรตีนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้ดีมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66, 64, 58, 54, 27 และ 26 kDa (49, 50) ซึ่งเชื่อว่า 66, 64, 58 และ 54 kDa เป็นโปรตีนที่หลั่งมาจากชั้นผิว ในขณะที่ 27 และ 26 kDa หลั่งมาจากทางเดินอาหาร (51, 52) จากการศึกษา tegumental antigens ของ *F. gigantica* โดยใช้ monoclonal antibodies พบว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 66(51) และ 28.5 kDa(53) เป็นโปรตีนที่ตรวจพบได้เฉพาะที่ชั้นผิวเท่านั้น เชื่อว่า tegumental membrane antigens เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะภายใน species ค่อนข้างมาก ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนหรือใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาโดยการนำซีรัมของวัวที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* ในธรรมชาติ (Cow's infected serum, CIS) มาทำปฏิกิริยากับ tegument antigen (TA) ของพยาธิตัวเต็มวัยด้วยวิธี western immunoblotting พบว่าแถบโปรตีนของ TA ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ CIS ค่อนข้างเข้มคือที่น้ำหนักโมเลกุล 16, 21, 29, 33 และ 52 kDa ซึ่งแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถพบได้ในระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และ crude extract ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย นอกจากนี้จากการนำแอนติเจนที่ 21 kDa มาฉีดให้หนูเพื่อผลิต polyclonal antibody เมื่อนำ polyclonal antibody ดังกล่าวมาศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบโปรตีน 21 kDa ได้ใน excretory secretory antigen ของพยาธิตัวเต็มวัยอีกด้วย และ crude extract ของพยาธิระยะ miracidium ตัวอ่อนอายุ 14 สัปดาห์ และพยาธิระยะตัวเต็มวัย จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa น่าจะถูกคัดหลังจากตัวพยาธิและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี(54)

Immunodiagnosis

แอนติเจนที่นิยมนำมาศึกษา immunodiagnosis ในปัจจุบันได้แก่ ES product ของพยาธิ เนื่องจากเป็นแอนติเจนที่หลั่งออกมาจากตัวพยาธิ และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้เป็นอย่างดี จากการศึกษา circulating antibodies ใน serum ของผู้ป่วยด้วยวิธี ELISA โดยใช้ ES product สามารถตรวจพบ antibodies ได้ในปริมาณที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน (55) และจากการตรวจวินิจฉัย human fasciolosis โดยใช้ ES product ของ *F. hepatica* ด้วยวิธี ELISA พบว่ามี

sensitivity และ specificity 100%(56, 57) ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี indirect haemagglutination test (IHAT) มี sensitivity และ specificity ที่ต่ำกว่าวิธี ELISA(57) ES product ของพยาธิ Fasciola มีองค์ประกอบหลักคือเอนไซม์ในกลุ่ม protease โดยเฉพาะ cysteine protease เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่มีการนำมาศึกษากันมากได้แก่ cathepsin (Cat) L, B การศึกษา diagnosis ด้วย ELISA โดยใช้ recombinant Cat L ในการตรวจหาแอนติบอดีใน serum ของแกะและโคที่ติดเชื้อในธรรมชาติ ให้ sensitivity 99.1 และ 100% ในแกะและโค ตามลำดับ ในขณะที่ sensitivity ของการตรวจหาแอนติบอดีใน serum ของแกะและโคที่ติดเชื้อในห้องทดลองมีค่าประมาณ 98.5% ในโค และ 96.5% ในแกะ ซึ่งสามารถตรวจพบแอนติบอดีใน serum ของโคและแกะประมาณสัปดาห์ที่ 5 และ 7 หลังจากการติดเชื้อตามลำดับ ซึ่งเป็นระยะก่อนการตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ โดยยังคงตรวจพบแอนติบอดีใน serum ของสัตว์จนถึงสัปดาห์ที่ 23 หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้ rFhcat L ใน serum ของสัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* คือพบแอนติบอดีได้ในสัปดาห์ที่ 5-20 หลังจากการติดเชื้อ (58)

การศึกษาในพยาธิ *F. gigantica* พบว่าการวินิจฉัยการติดเชื้อด้วยวิธี ELISA โดยตรวจหาแอนติบอดีของ somatic antigen เปรียบเทียบกับ cysteine protease (CP) พบว่า specificity ของการใช้ CP มีประมาณ 98.4% ซึ่งสูงกว่าการใช้ somatic antigen (96.9%) (59) มีการศึกษานำ purified protein มาศึกษา immunodiagnosis เมื่อให้ได้ sensitivity ที่เพิ่มมากขึ้น โดยการนำ rcat L 1 มาทำ cystatin capture ELISA โดยใช้ serum ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *F. gigantica* 13 คน ติดเชื้อพยาธิชนิดอื่น ๆ 209 คนป่วยเป็นโรค cholangiocarcinoma 32 คนและคนปกติ 42 คน พบว่ามี sensitivity, specificity, accuracy และ positive และ negative values ของวิธีการตรวจสอบประมาณ 100% , 99.3%, 99.3%, 86.7% และ 100% ตามลำดับ โดย IgG4-ELISA ให้ผลการตรวจได้สูงสุด (60) โดยการใช้ specific epitope ของ rcat L1 ดังกล่าว (DKIDWRESGYVTEVKDQGNC และ DKIDWRESGYVTEVKDQGNC) ในการตรวจการติดเชื้อ พบว่าให้ sensitivity, specificity, accuracy และ positive และ negative values ประมาณ 100%, 97.3%, 97.5%, 61.9% และ 100% ตามลำดับ(61) มีการนำ purified protein ชนิดอื่น ๆ จาก ES product มาศึกษา immunodiagnosis เช่นกัน นำโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 49.5 kDa มาตรวจหา circulating antibodies ต่อโปรตีนชนิดนี้ด้วยวิธี enzyme-linked immunoelectro-transfer blot (EITB), counter electrophoresis (CIEP) และ ELISA พบว่าวิธี ELISA ให้ผลการตรวจที่ดีที่สุดคือ sensitivity 91.4%, specificity 92.3%, accuracy 91.8%, negative predictive value 88.9% และ positive predictive value 94.1% (62) ส่วนโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 26-28 kDa circulating antigens

ของ *F. gigantea* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตมาจาก gut และชั้นผิวของพยาธิตัวเต็มวัย ภายในโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophilic ประมาณ 47.5% hydrophobic ประมาณ 29.3% และจากการทำ dot-ELISA เพื่อตรวจหา circulating 26-28 kDa ใน serum ของโค 9 ตัวซึ่งติดเชื้อด้วย *F. gigantea* โดยมีกลุ่มควบคุมจำนวน 27 ตัว ด้วย polyclonal antibody ที่ต้านต่อ 26-28 kDa ให้ sensitivity 100% (63) ในขณะที่การนำ 28 kDa cystein protease มาตรวจหาแอนติบอดีใน serum ของแกะด้วยวิธี ELISA, western blotting และ Dipstick-ELISA ซึ่งติดเชื้อ *F. gigantea* ในห้องทดลองพบว่าให้ sensitivity 100% ซึ่งสามารถตรวจพบแอนติบอดีด้วยวิธี western blotting ได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งพบพยาธิภายในสัตว์ทดลองจำนวน 38 ตัว ในขณะที่สัตว์ทดลองที่พบพยาธิในตับจำนวน 3-8 ตัวนั้น สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ 28 kDa ประมาณสัปดาห์ที่ 10th หลังจากการติดเชื้อ(64) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ El-Kerdany และคณะ(65) พบว่า tegumental antigen ของพยาธิ *F. gigantica* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีกว่า ES หรือ somatic extract หลังจากการศึกษาด้วยวิธี ELISA immunohistochemical staining และ CIEP จากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการนำแอนติเจนของชั้นผิวมาศึกษา immuodiagnosis กันค่อนข้างน้อย Vivanant และคณะ ทำการผลิต monoclonal antibody ต่อ circulating 66 kDa tegumental antigen ของ *F. gigantea* แล้วนำมาตรวจหาโปรตีน 66 kDa ใน serum ของสัตว์ที่ติดเชื้อในธรรมชาติด้วยวิธี sandwich ELISA โดยการ coat microtiter plate ด้วย monoclonal antibody และ probe ด้วย polyclonal rabbit sera anti 66 kDa พบว่าให้ sensitivity ประมาณ 86.6-100 % ซึ่งสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1- 32 ของการติดเชื้อในธรรมชาติ (51)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

1. การเก็บตัวอย่างพยาธิ *F. gigantica*

1.1 ไข่ (eggs)

เก็บไข่พยาธิจาก *F. gigantica* ตัวเต็มวัยและน้ำดีของวัวที่มีการติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* โดยนำตัวเต็มวัยของพยาธิ *F. gigantica* และน้ำดีของวัวที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มาล้างในสารละลาย normal saline เพื่อให้พยาธิปล่อยไข่ออกมาและตั้งทิ้งไว้จนไข่พยาธิตกตะกอน แล้วล้างด้วยสารละลาย normal saline จนกว่าสารละลาย normal saline ใส จากนั้นนำไปกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยแสงจนกว่าตรวจพบตัวอ่อนระยะ miracidium เจริญอยู่ในไข่ และมีการฟักออกจากไข่บางส่วน แล้วล้างไข่ด้วย normal saline หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำไป centrifuge แล้วนำไปทำการทดลองต่อไป

1.2 ระยะเวลาตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (4 week-old juvenile)

พยาธิระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ได้จากคุณปิยวัฒน์ ดุริยานนท์ โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่างพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ พอสรุปได้ดังนี้ ป้อนตัวอ่อนระยะ metacercaria ของพยาธิ *F. gigantica* จำนวน 20 ตัว ผสมกับ normal saline 0.5 ml ให้กับหนู mice เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ด้วย feeding tube วันที่ 28 หลังจากการ infection ทำการสลบหนูด้วย diethyl ether แล้วเก็บตัวอ่อนของพยาธิจากตับ ล้างด้วย normal saline นำไปทำการทดลองต่อไป

1.3 ระยะเวลาตัวเต็มวัย (adults)

เก็บพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยจากท่อน้ำดีและถุงน้ำดีของวัวที่ถูกฆ่าจากโรงฆ่าสัตว์ จากนั้นนำพยาธิมาล้างเพื่อให้เลือดและน้ำดีออกจากตัวพยาธิด้วย normal saline หลาย ๆ ครั้ง หลังจากนั้นทำการแยกพยาธิออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 นำพยาธิระยะ embryonated egg และระยะเวลาตัวเต็มวัยเก็บในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปเตรียมเป็น whole body antigen ต่อไป กลุ่มที่ 2 นำพยาธิระยะ embryonated egg ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยไป fix ด้วย 4% paraformaldehyde + 0.5% glutaraldehyde

ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) ที่ 4°C นาน 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำไปศึกษาด้วยวิธี immunoperoxidase ต่อไป

2. การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ tegumental antigen ด้วยวิธี immunoperoxidase

นำพยาธิ *F. gigantica* ระยะไข่ ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ และตัวเต็มวัยที่ fixed ด้วย 4% paraformaldehyde และ 0.5 % glutaraldehyde แล้ว มา dehydrate โดยแช่ใน 70%, 80%, 95% ethyl alcohol ขึ้นตอนละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ และแช่ใน 100% ethyl alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที clearing ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แล้ว infiltrate ด้วย xylene : paraffin ในอัตราส่วน 1:1 และ pure paraffin ขึ้นตอนละ 30 นาที ตามลำดับ จากนั้นฝังพยาธิในพาราฟินด้วยเครื่อง tissue embedding (Tissue-Tek[®] TECT^M) นำ block พาราฟินมาตัดด้วยเครื่อง rotary microtome (Accu-cut[®] SRMT^M) หนา ประมาณ 5 ไมครอน นำ section ของพยาธิวางบนสไลด์ที่เคลือบด้วย 1% gelatin-chromalum ตากสไลด์ ที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 12 ชั่วโมง นำ section ของพยาธิ *F. gigantica* มา rehydrate โดยแช่ใน xylene 2 ครั้ง แล้วแช่ใน 100%, 95%, 80%, 70% ethyl alcohol และน้ำกลั่นขึ้นตอนละ 5 นาที จากนั้นแช่ section ใน 3% H₂O₂ ในน้ำกลั่น นาน 30 นาที เพื่อทำลาย endogenous peroxidase แล้วล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำ section ไปต้มใน 10 mM citrate buffer 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ปล่อยให้ อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง incubate ด้วย 0.1% glycine ใน 0.1 M PBS นาน 30 นาที และ 1% BSA นาน 30 นาที เพื่อ block nonspecific binding หลังจากนั้น incubate section ใน primary antibody (rat sera) ซึ่งละลายใน 0.1 M PBS-T + 1%BSA ด้วยอัตราส่วน 1:10,000 นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง หลังจากนั้น incubate section ใน secondary antibody (HRP-conjugated goat anti rat IgG) ด้วยอัตราส่วน 1:1,000 นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง จากนั้น incubate section ใน aminoethyl carbazole substrate (AEC substrate kit, Zymed) นาน 10 นาที ในที่มืด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำสไลด์มา counterstain ด้วยสี Mayer's hematoxylin นาน 30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา นำ section มา mounting ด้วย 90% buffered-glycerol แล้วนำไปศึกษาและถ่ายภาพด้วย กล้องจุลทรรศน์ Olympus BX51

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ tegumental antigen ด้วยวิธี immuno- peroxidase

1. Preimmunize rat sera

จากการย้อมกลุ่ม control โดยใช้ preimmunize rat sera เป็น primary antibody พบว่าในอวัยวะส่วนใหญ่ไม่ปรากฏ positive reaction (ภาพที่ 1) ยกเว้นบริเวณ luminal projection ของ bladder (ภาพที่ 1C) นอกจากนี้ยังพบ positive reaction ใน spermatozoa ภายใน testis (ภาพที่ 1D) และบริเวณขอบของ oocyte ภายใน ovary (ภาพที่ 1E)

2. Total tegumental antigen (TA)

2.1 ระยะเวลา unembryonated egg

พบ positive reaction ของ total TA มีลักษณะสีส้มเข้มมากบริเวณเปลือกไข่ (ภาพที่ 2 A-C) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction สีส้มจาง ๆ กระจายอยู่ภายใน vitelline cell ภายในไข่ (ภาพที่ 2C)

2.2 ระยะเวลา embryonated egg

พบ positive reaction ของ total TA มีลักษณะเป็นจุดสีส้มเข้มบนเปลือกไข่ (ภาพที่ 4-21 D) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction สีส้มเข้มบริเวณขอบนอกของ miracidium (ภาพที่ 2E)

2.3 ระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ พบ positive reaction ของ total TA ภายใน tegument, parenchyma, ventral sucker, pharynx, caecum และ bladder (ภาพที่ 2 F, G) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบว่า positive reaction สีเข้มเข้มมากบริเวณขอบนอกของ tegument และพบ positive reaction ลักษณะเป็นจุดสีเข้มกระจายอยู่ภายใน syncytium (ภาพที่ 2H) บริเวณ caecum พบ positive reaction เฉพาะบริเวณ luminal projection ในขณะที่ cytoplasm ไม่ปรากฏ positive reaction (ภาพที่ 2) นอกจากนี้พบว่า bladder ก็ปรากฏ positive reaction เช่นกัน โดยพบ positive reaction บริเวณเยื่อของ bladder (ภาพที่ 2J)

2.4 ระยะตัวเต็มวัย

2.4.1 ระบบปกคลุมร่างกาย

พบ positive reaction ของ total TA มีลักษณะเป็นสีเข้มเข้มบริเวณขอบนอกของ tegument (ภาพที่ 3C) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction ลักษณะเป็นจุดสีเข้มจาง กระจายอยู่ภายในชั้น tegument เล็กน้อย (ภาพที่ 3D) แต่ไม่ปรากฏ reaction ใน spine ยังปรากฏ positive reaction ภายใน cytoplasm และ processes บางเซลล์ของ tegument ที่อยู่ใต้ชั้นกล้ามเนื้อ แต่ไม่ปรากฏในนิวเคลียส (ภาพที่ 3E)

2.4.2 Parenchyma

พบ positive reaction ของ total TA ลักษณะสีเข้มเข้มภายในเซลล์ และ processes ของเซลล์ส่วนที่ขึ้นไปเชื่อมกับ tegument (ภาพที่ 3C, E) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงสามารถแบ่งตามความเข้มของสีได้เป็น 3 ชนิดคือ ชนิดที่ 1 (Pc1) จะมีสีเข้มเข้มสม่ำเสมอเท่ากันทั้งเซลล์และเข้มมากบริเวณขอบเซลล์ พบมากบริเวณชั้นนอกติดกับ tegument ชนิดที่ 2 (Pc2) จะมีสีเข้มเข้มปานกลางสม่ำเสมอเท่ากันทั้งเซลล์และมีสีเข้มเข้มมากบริเวณขอบเซลล์ ชนิดที่ 3 (Pc3) จะมีสีเข้มเข้มปานกลางเท่ากับกลุ่มที่ 2 แต่บริเวณส่วนท้าย

ของเซลล์มีสีส้มเข้มและสีส้มเข้มมากบริเวณขอบของเซลล์ ทั้งเซลล์ชนิดที่ 2 และ 3 พบกระจายอยู่ทั่วไป บริเวณกลางลำตัว (ภาพที่ 3F, 3A, D)

2.4.3 ระบบทางเดินอาหาร

พบ positive reaction ของ total TA ใน esophagus และ caecum (ภาพที่ 3B, 4A, B) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ reaction ลักษณะเป็นจุดสีส้มขนาดเล็กกระจายอยู่ในเยื่อของ esophagus ส่วนภายใน caecum พบว่ามี positive reaction มีสีส้มเข้มมากบริเวณ luminal projection แต่ไม่ปรากฏ positive reaction ใน cytoplasm (ภาพที่ 4C)

2.4.4 ระบบขับถ่าย

พบ positive reaction ของ total TA มีลักษณะเป็นจุดสีส้มใน bladder (ภาพที่ 4D, E) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction มีลักษณะสีส้มเข้มกระจายอยู่บริเวณเยื่อของ bladder อย่างไรก็ตามบริเวณ luminal projection จะเข้มมากที่สุด แต่ละบริเวณของเยื่อ bladder จะมีความเข้มของ positive reaction ไม่เท่ากัน (ภาพที่ 4F)

2.4.5 ระบบสืบพันธุ์

ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

Ovary พบ positive reaction ของ total TA ลักษณะสีส้มจาง ๆ กระจายอยู่ใน ovary (ภาพที่ 5A, B) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction ลักษณะสีส้มกระจายอยู่ระหว่างเซลล์ oocyte ระยะที่ 4 เล็กน้อย ในขณะที่เซลล์ oocyte ระยะอื่น ๆ ไม่ปรากฏ positive reaction (ภาพที่ 5C)

Vitelline gland พบ positive reaction ของ total TA ลักษณะเป็นสีส้มจาง ๆ ภายใน vitelline cell ที่เจริญเต็มที่ (ภาพที่ 5 D, E) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction เป็นจุดสีส้มอยู่ภายใน glycogen area ภายใน cytoplasm แต่ไม่ปรากฏ positive reaction ในนิวเคลียส shell globules และใน

vitelline cell ระยะเวลาอื่น ๆ (ภาพที่ 5 F) นอกจากนั้นยังพบ positive reaction สีส้มจาง ๆ ใน vitelline cell ที่ อยู่ภายใน vitelline duct เช่นกัน (ภาพที่ 5G, H)

Uterus พบ positive reaction ของ total TA มีลักษณะสีส้ม 2 บริเวณ คือในเปลือกไข่ของ unembryonated egg และเยื่อผนังของ uterus (ภาพที่ 2 A) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction มีลักษณะสีส้มเข้มมากบริเวณ luminal projection ของเยื่อผนัง uterus และนอกจากนี้ยังพบ positive reaction สีส้มเข้มในกลุ่มของ sperm ที่อยู่ภายใน uterus (ภาพที่ 2C)

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้

Testis พบ positive reaction ของ total TA ลักษณะสีส้มกระจายอยู่ทั่วไปภายใน testis (ภาพที่ 6A) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงปรากฏ positive reaction ใน spermatid ระยะ 4 ที่อยู่บริเวณกลาง testis แต่ไม่พบ positive reaction ใน spermatid ระยะอื่น ๆ และใน spermatocyte (ภาพที่ 6 B, C) นอกจากนี้ยังปรากฏ positive reaction เข้มบริเวณ head ของ spermatozoa เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 6C)

Seminal vesicle พบ positive reaction ของ total TA ลักษณะสีส้มกระจายอยู่บริเวณ luminal projection ของเยื่อผนัง seminal vesicle แต่ไม่พบ positive reaction ภายในเซลล์ของ seminal vesicle (ภาพที่ 6D, E)

Prostate gland พบ positive reaction ของ total TA กระจายอยู่ทั่วไปภายใน prostate gland (ภาพที่ 6 D, F) เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงพบ positive reaction กระจายอยู่บริเวณด้านขอบนอกของ prostate gland cell แต่ไม่ปรากฏภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบ positive reaction สีส้มจาง ๆ บริเวณ luminal projection ของเยื่อผนัง prostate duct อีกด้วย (ภาพที่ 6F)

3. 21 kDa tegumental antigen

3.1 ระยะ unembryonated egg

พบ positive reaction ของ 21 kDa TA มีลักษณะเป็นสีส้มเข้มมากกระจายอยู่บริเวณเปลือกไข่ (ภาพที่ 7A, B) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงยังสามารถพบ positive reaction ลักษณะสีส้มจาง ๆ ภายใน vitelline cell ที่อยู่ภายในไข่เช่นกัน (ภาพที่ 7C)

3.2 ระยะ embryonated egg

พบ positive reaction ของ 21 kDa TA มีลักษณะสีส้มเข้มบริเวณ miracidium ที่อยู่ภายในไข่ (ภาพที่ 7 D, E) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงปรากฏ positive reaction เข้มบริเวณขอบนอกของ miracidium แต่ไม่ปรากฏ reaction บนเปลือกไข่ (ภาพที่ 7 E)

3.3 ระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์

ในระยะตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์พบ positive reaction ของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มกระจายอยู่ภายใน tegument, bladder และ parenchyma (ภาพที่ 7 F, G) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction ใน tegument โดยปรากฏสม่ำเสมอทั่วไปทั้งชั้นผิว ในขณะที่ spine ให้ผลเป็น negative (ภาพที่ 7 H) ส่วน bladder พบ positive reaction ค่อนข้างเข้มภายในเยื่อบุผิว (ภาพที่ 7 J) นอกจากนี้ยังปรากฏ positive reaction สีส้มจาง ๆ กระจายอยู่ทั่วไปภายใน parenchyma รวมถึง luminal projection ของ caecum ในขณะที่ cytoplasm ให้ผล negative (ภาพที่ 7 G, I)

3.4 ระยะตัวเต็มวัย

3.4.1 ระบบปกคลุมร่างกาย

พบ positive reaction ของ 21 kDa TA มีลักษณะเป็นสีส้มเข้มบริเวณ tegument (ภาพที่ 8 C) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงพบ positive reaction เป็นจุดกระจายอยู่ทั่วไปอย่างสม่ำเสมอภายในชั้น tegument แต่ไม่ปรากฏ positive reaction บน spine (ภาพที่ 8 D) นอกจากนี้ภายใน tegumental cell บางเซลล์ยังปรากฏ positive reaction อยู่ภายใน cytoplasm แต่ไม่ปรากฏในนิวเคลียส (ภาพที่ 8 E)

3.4.2 Parenchyma

พบ positive reaction ของ 21 kDa TA มีลักษณะสีส้มจาง ๆ เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูง พบว่า บริเวณขอบเซลล์และรอบ ๆ นิวเคลียสจะมีสีส้มเข้มมากกว่าตรงกลางเซลล์ (ภาพที่ 8 F)

3.4.3 ระบบทางเดินอาหาร

พบ positive reaction ทั้งในทางเดินอาหารส่วนต้น ซึ่งได้แก่ pharynx และทางเดินอาหารส่วนปลาย ซึ่งได้แก่ caecum (ภาพที่ 8 A, 9 A,B) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงปรากฏ positive reaction ลักษณะสีส้มเข้มกระจายอยู่ภายในเยื่อบุผิว pharynx (ภาพที่ 8 B) ส่วนเยื่อบุผิว caecum พบสีส้มของ positive reaction กระจายอยู่บริเวณ luminal projection เพียงเล็กน้อย โดย cytoplasm และนิวเคลียส ให้ผลเป็น negative (ภาพที่ 9 C)

3.4.4 ระบบขับถ่าย

พบ positive reaction ของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มเข้มมากกระจายอยู่บริเวณเยื่อบุผิวของ bladder (ภาพที่ 9 D, E) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูง ปรากฏ positive reaction ลักษณะสีส้มเข้มมากในบริเวณ luminal projection ของ bladder ส่วนภายใน cytoplasm มี reaction ค่อนข้างจาง (ภาพที่ 9 F)

3.4.5 ระบบสืบพันธุ์

ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

Ovary พบ positive reaction ของ 21 kDa TA กระจายอยู่ภายใน ovary เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูง (ภาพที่ 10 A, B) ปรากฏ positive reaction มีลักษณะสีส้มกระจายอยู่ขอบเซลล์ oocyte โดยเฉพาะ oocyte ระยะที่ 4 จะมีความเข้มของ positive reaction มาก (ภาพที่ 10 C)

Vitelline gland พบ positive reaction ของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มกระจายอยู่ภายใน vitelline cell (ภาพที่ 4-35 D, E) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงปรากฏว่า positive reaction มีลักษณะสีส้มกระจายอยู่บริเวณ glycogen area ภายใน cytoplasm ของ vitelline cell ที่พัฒนาเต็มที่และมีความเข้มมากใน

บริเวณรอบ ๆ นิวเคลียส และนอกจากนี้ยังปรากฏ reaction ใน glycogen area ของ vitelline cell ที่อยู่ใน vitelline duct ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 10 G, H)

Uterus พบ positive reaction ของ 21 kDa TA ในเยื่อของ uterus โดยมีลักษณะสีส้มเข้มกระจายอยู่บริเวณ luminal projection ของเยื่อบุผิว นอกจากนี้ยังปรากฏ positive reaction ในเปลือกไข่ และ vitelline cell ของ unembryonated egg อีกด้วย (ภาพที่ 7 A, B)

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้

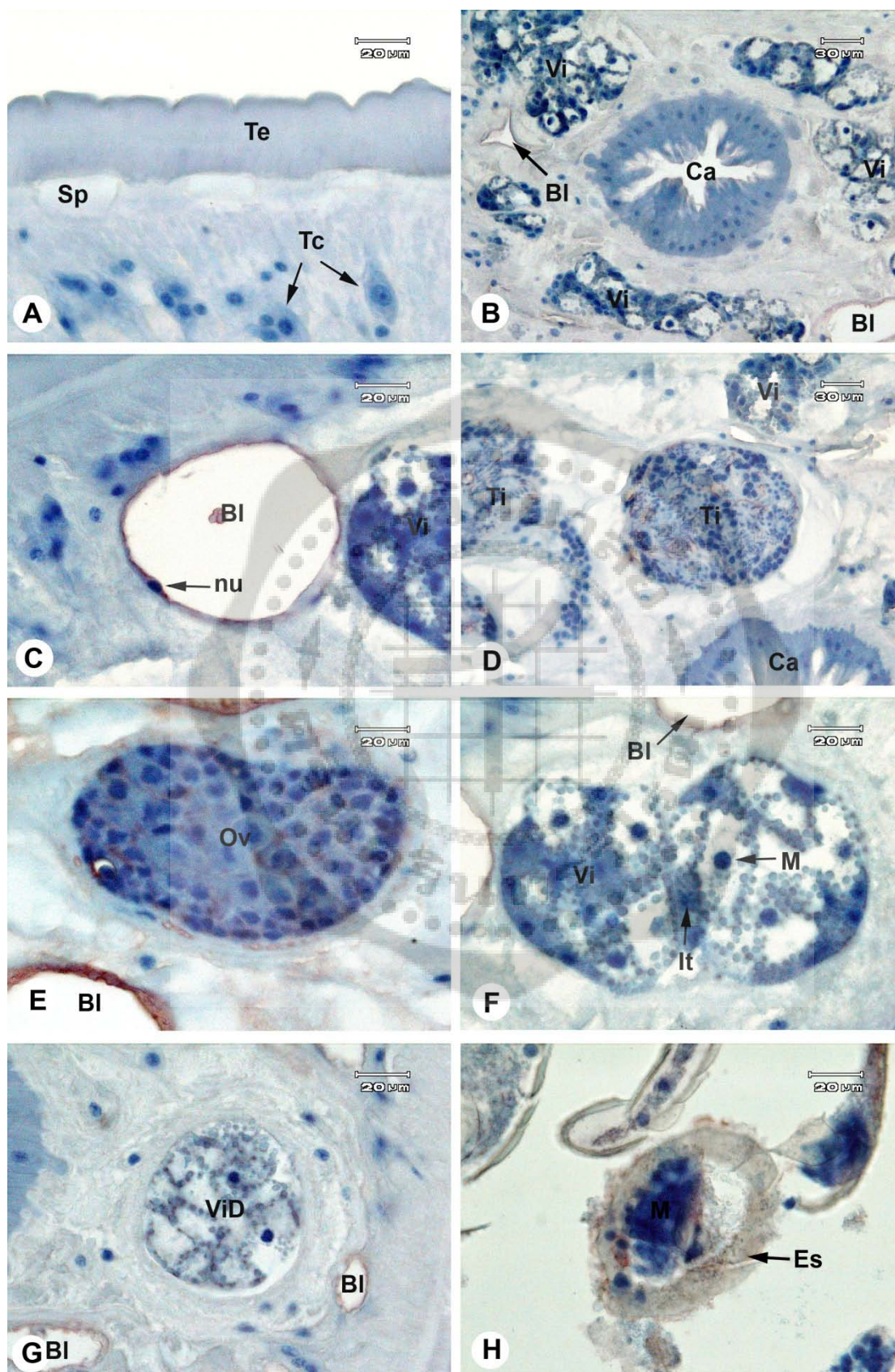
Testis พบ positive reaction ของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มเล็กน้อยภายใน testis (ภาพที่ 11A, B) เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงปรากฏ positive reaction บริเวณ head ของ spermatozoa และภายใน cytoplasm ของ spermatid ที่อยู่ภายใน testis แต่ไม่ปรากฏ positive reaction ภายใน spermatocyte (ภาพที่ 11 C)

Seminal vesicle พบ positive reaction ของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มค่อนข้างเข้มบริเวณเซลล์เยื่อบุผิว ในขณะที่กลุ่มเซลล์ที่อยู่รอบ ๆ ท่อ seminal vesicle ไม่ปรากฏ positive reaction (ภาพที่ 11 F)

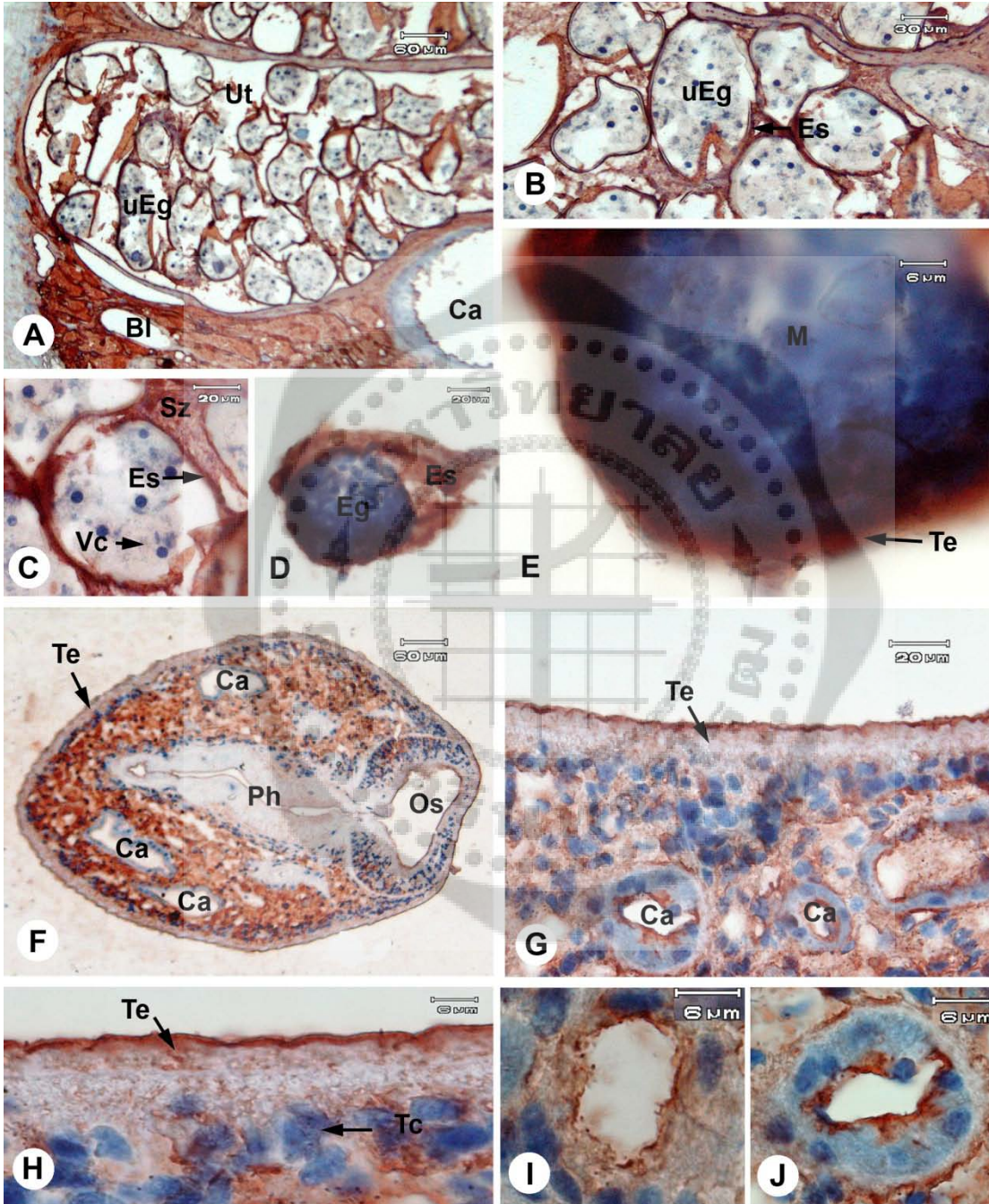
Prostate gland พบ positive reaction ของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มบริเวณขอบของเซลล์ prostate แต่ไม่ปรากฏ positive reaction ภายใน cytoplasm และนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพที่ 11 H) และ ยังปรากฏ positive reaction ลักษณะสีส้มภายใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิวของท่อ prostate gland อีกด้วย (ภาพที่ 11 G)

ภาพที่ 1 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัยในกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ preimmunize rat sera เป็น primary antibody แล้ว counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin แสดง negative staining ในเนื้อเยื่อต่างๆ

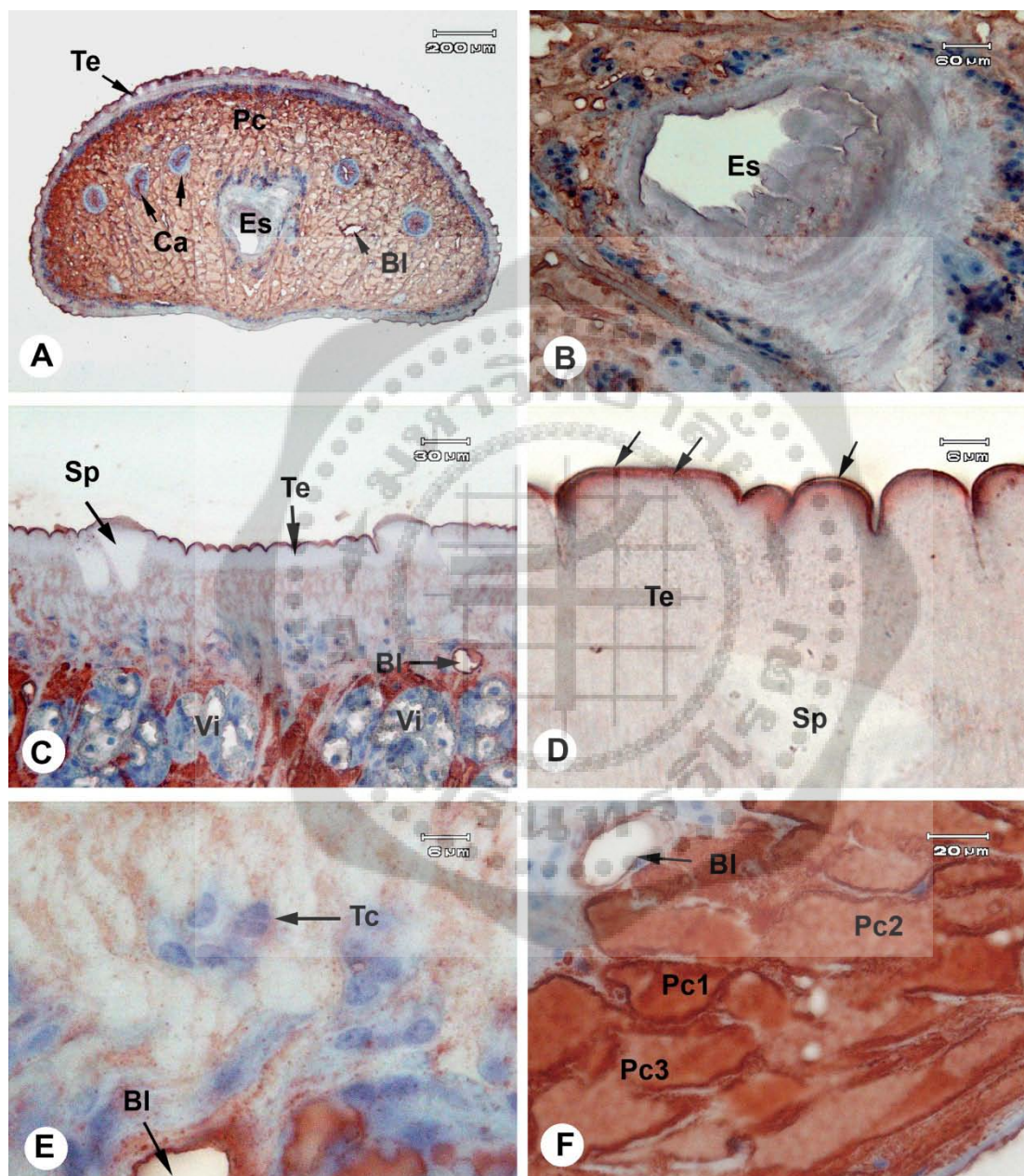
- A ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง tegument (Te), spine (Sp) และ tegumental cell (Tc)
- B ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง caecum (Ca)
- C ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลาง แสดง bladder (Bl), (nu=nucleus)
- D ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง testis (Ti)
- E ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง ovary (Ov)
- F ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง vitelline gland (Vi)
- G ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง vitelline duct (ViD)
- H ภาพกำลังขยายปานกลาง แสดง egg (Eg)



- ภาพที่ 2 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะ unembryonated egg (uEg), embryonated egg (Eg) และพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (Ju) ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin
- A-C ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และปานกลาง (B, C) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ใน unembryonated egg (uEg) ที่อยู่ใน uterus (Ut) ลักษณะเป็นสีส้มเข้มบริเวณ eggshell (Es) และสีส้มจาง ๆ ใน vitelline cell (Vc)
- D-E ภาพกำลังขยายปานกลาง (D) และสูง (E) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ใน embryonated egg (Eg) ลักษณะเป็นสีส้มเข้มบริเวณเปลือกไข่ และผิวของ miracidium (M) ภายในไข่
- F ภาพกำลังขยายต่ำของ oblique section พยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะเป็นสีส้มเข้มบริเวณขอบนอกของ tegument (Te) parenchyma (Pc) และบริเวณ luminal projection ของ pharynx (Ph) และ oral sucker (Os)
- G-H ภาพกำลังขยายปานกลาง (G) และสูง (H) ของ cross section ของตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะสีส้มเข้มบริเวณขอบนอกของ tegument (Te) และภายใน cytoplasm ของ tegumental cell (Tc) นอกจากนี้พบสีส้มเข้มบริเวณเซลล์เยื่อของ caecum (Ca)
- I ภาพกำลังขยายสูงของ bladder (Bl) แสดงการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะสีส้มเข้มบริเวณ epithelium
- J ภาพกำลังขยายสูง แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะสีส้มเข้มบริเวณเซลล์เยื่อของ caecum (Ca)



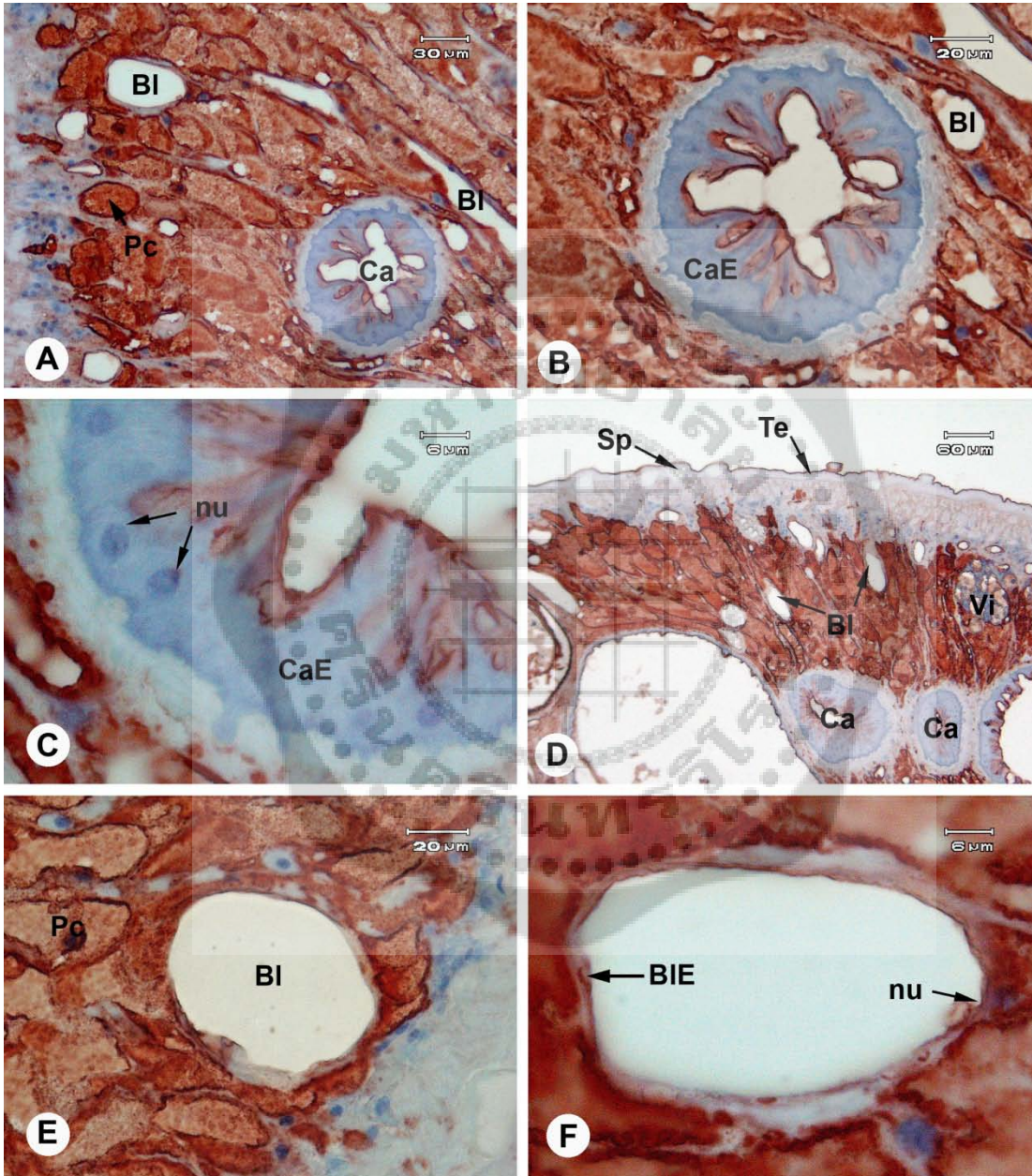
- ภาพที่ 3 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัยในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin
- A ภาพกำลังขยายต่ำของพยาธิตัวเต็มวัยตัดตามขวางบริเวณส่วนหัว แสดงการกระจายของ total tegumental antigen บริเวณ esophagus (Es) caecum (Ca) bladder (Bl) parenchyma (Pc) และ tegument (Te)
- B ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะเป็นจุดสีส้มใน epithelium ของ esophagus (Es)
- C-D ภาพกำลังขยายปานกลาง (C) และสูง (D) ของชั้นผิว (Te) แสดงการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะเป็นจุดสีส้มทั่วทั้งชั้นผิวและมีสีเข้มที่สุดบริเวณขอบนอกของชั้นผิว (ลูกศร) แต่ไม่พบใน spine (Sp) (Vi=vitelline gland)
- E ภาพกำลังขยายสูงของ tegumental cell (Tc) แสดงตำแหน่ง positive reaction ลักษณะเป็นจุดสีส้มกระจายใน cytoplasm และแขนงของเซลล์ที่อยู่ในชั้นกล้ามเนื้อ
- F ภาพกำลังขยายปานกลางของ parenchyma (Pc) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะสีส้มเข้มใน parenchyma (Pc) ซึ่งมีความเข้มที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์



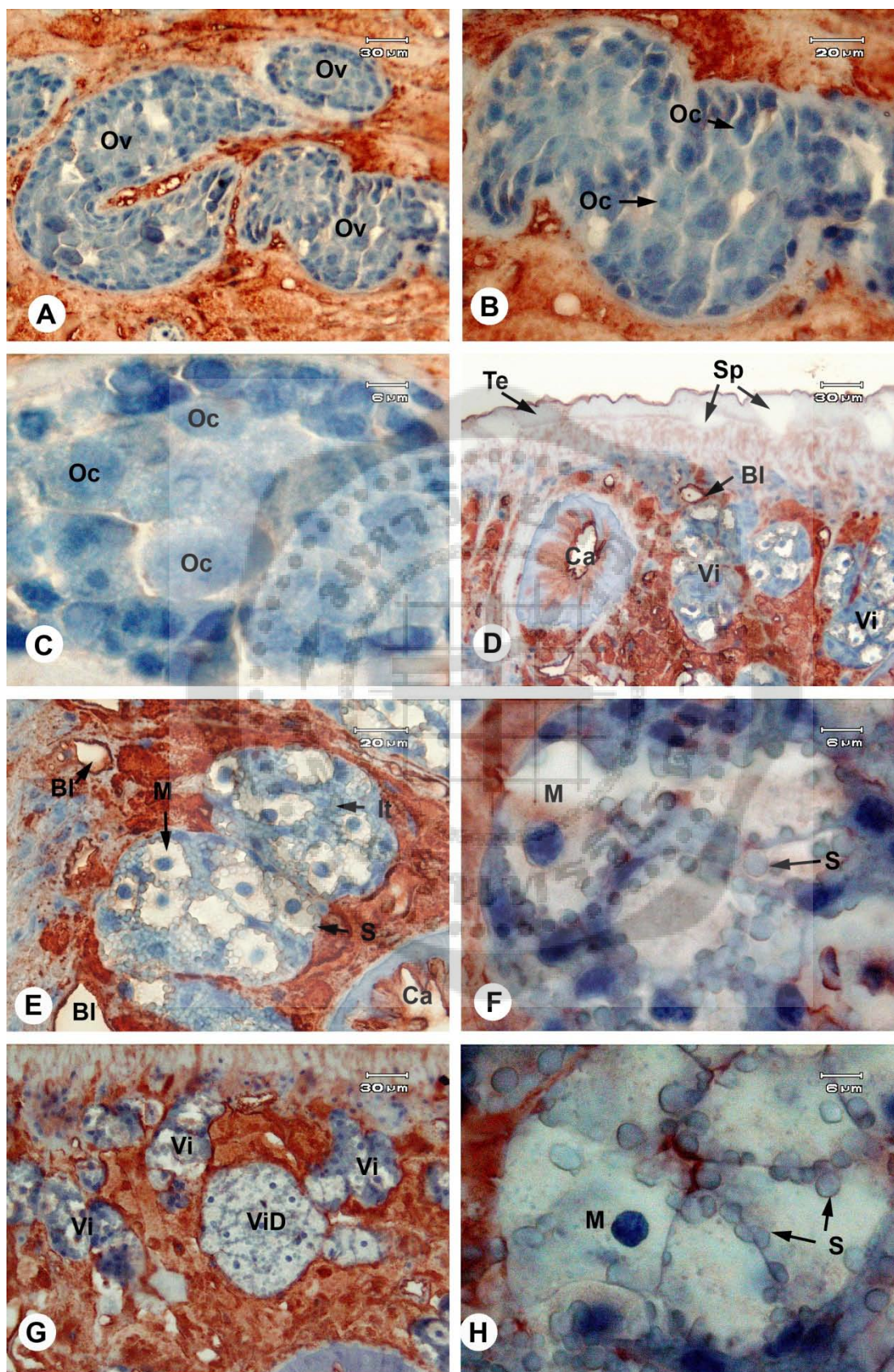
ภาพที่ 4 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัยใน parenchyma (Pc), caecum (Ca) และ bladder (Bl) ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin

A-C ภาพกำลังขยายปานกลาง (A, B) และสูง (C) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen บริเวณของ caecum (Ca) โดยเฉพาะบริเวณ luminal projection ของ epithelium (CaE) แต่ไม่พบใน nucleus (nu), (Pc=parenchyma)

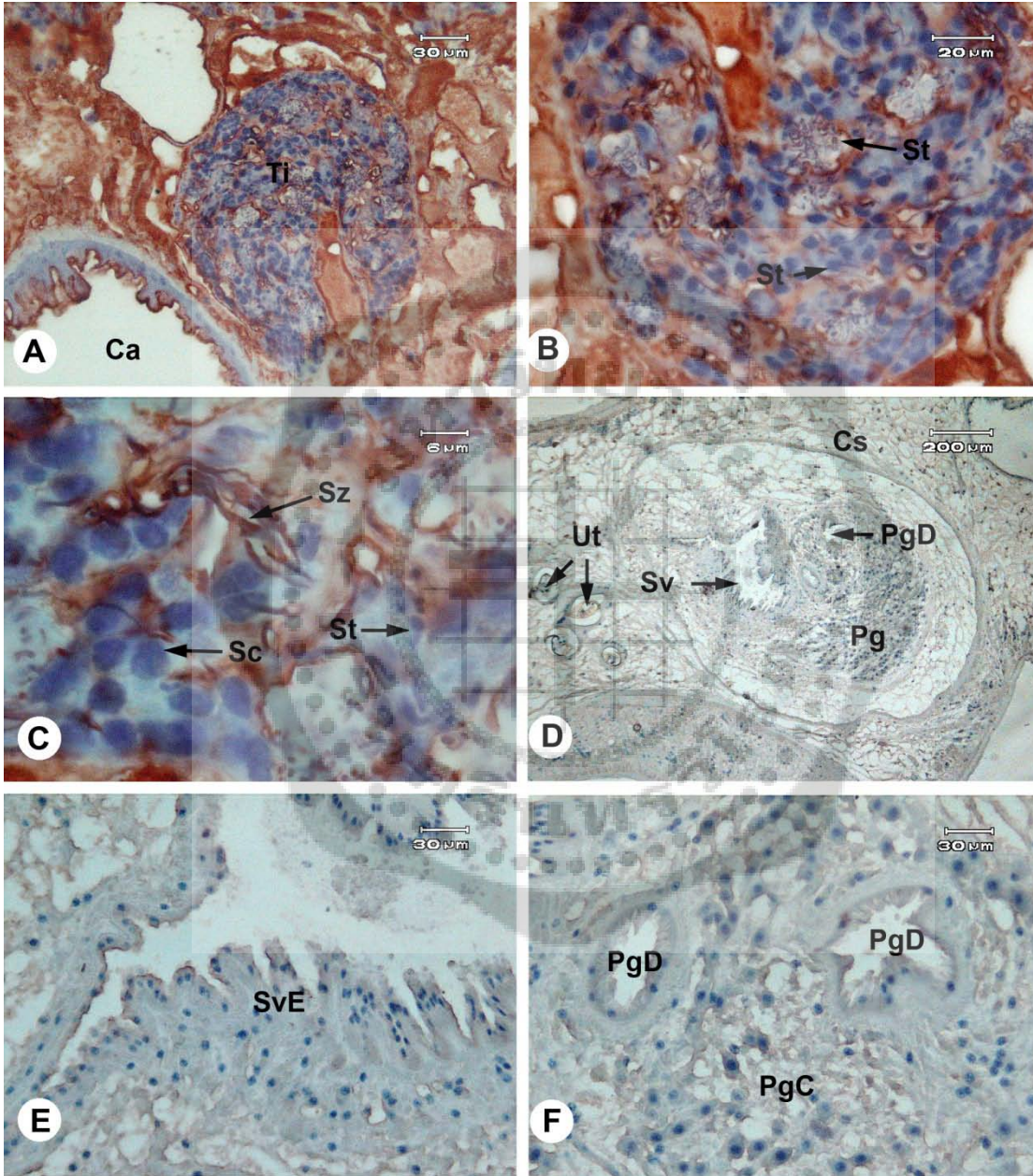
D-F ภาพกำลังขยายต่ำ (D) กำลังขยายปานกลาง (E) และกำลังขยายสูง (F) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ใน bladder (Bl), (Te=tegument, Sp=spine)



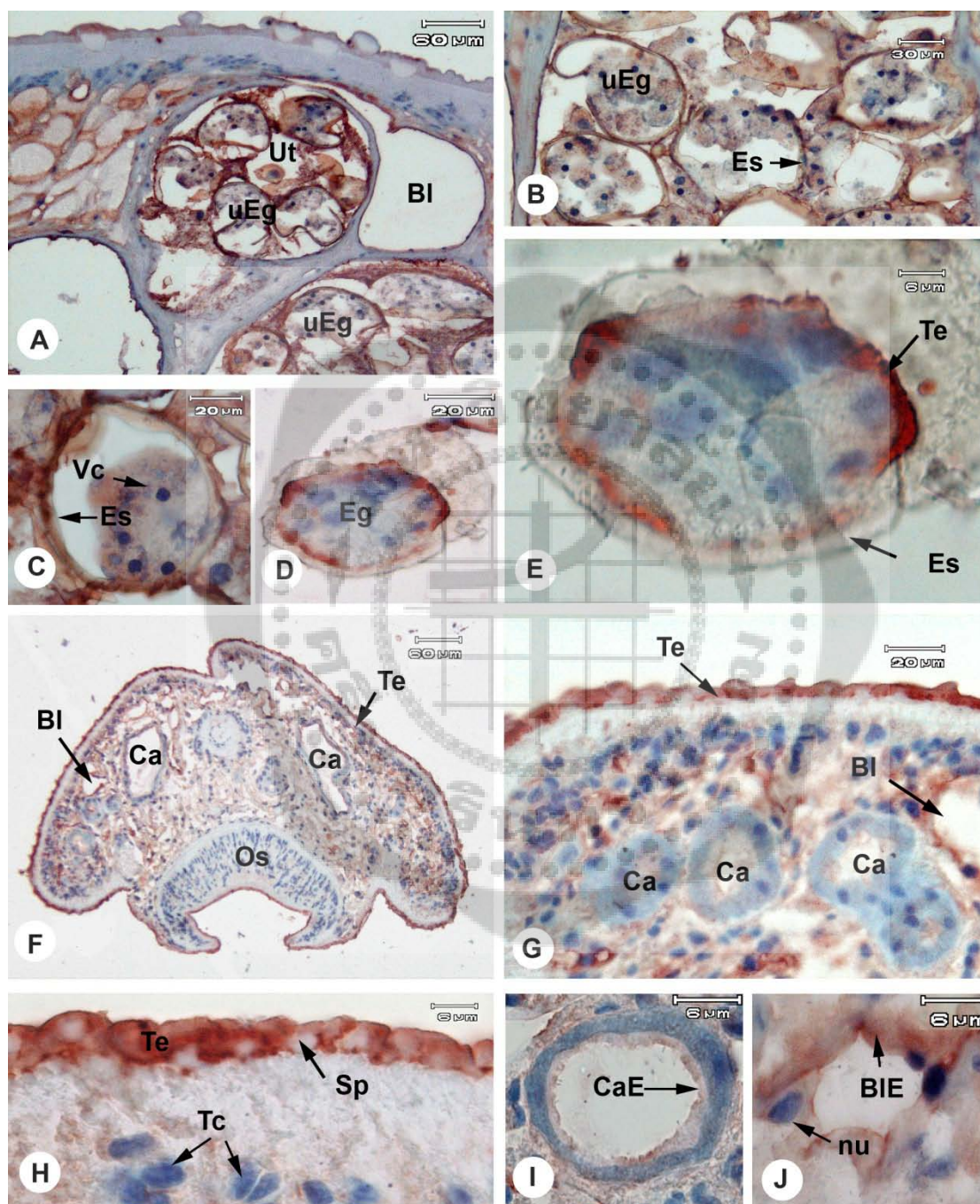
- ภาพที่ 5 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin
- A-C ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะสีส้มกระจายอยู่เล็กน้อยบริเวณขอบเซลล์ oocyte (Oc) ภายใน ovary (Ov)
- D-F ภาพกำลังขยายต่ำ (D) ปานกลาง (E) และสูง (F) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ใน vitelline gland (Vi) มีลักษณะเป็นจุดสีส้มภายใน mature vitelline cell (M), (Te=tegument, Sp=spine, Bl=bladder, Ca=caecum, S=shell globules, It=intermediate vitelline cell)
- G-H ภาพกำลังขยายต่ำ (G) และสูง (H) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะสีส้มเล็กน้อยกระจายอยู่ใน cytoplasm ของ mature vitelline cell (M) ภายใน vitelline duct (ViD)



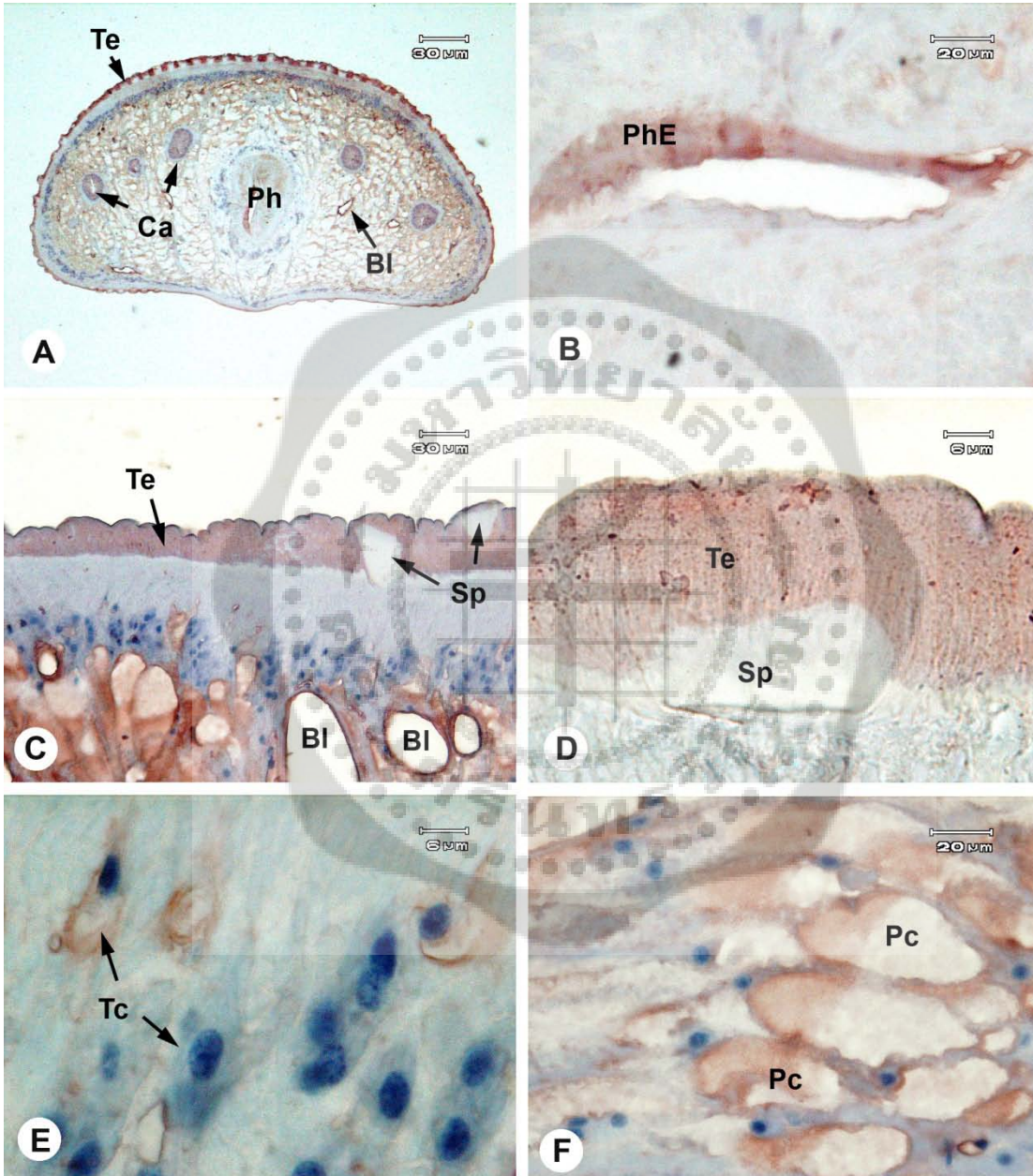
- ภาพที่ 6 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยในอวัยวะสืบพันธุ์ เพศผู้ ซึ่งใช้ rat sera anti total tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin
- A-C ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ใน testis (Ti) ลักษณะเป็นแถบสีส้มเข้มมากในภายใน spermatozoa (Sz), (Ca=caecum, Sc=spermatocyte, St=spermatid)
- D ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงการกระจายของ total tegumental antigen ลักษณะสีส้ม ภายใน cirrus sac (Cs), (Ut=uterus)
- E ภาพกำลังขยายปานกลางของ seminal vesicle แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen มีลักษณะสีส้มเล็กน้อยบริเวณ luminal projection ของเยื่อ seminal vesicle (SvE)
- F ภาพกำลังขยายปานกลางของ prostate gland (Pg) แสดงตำแหน่งการกระจายของ total tegumental antigen ภายใน prostate gland duct (PgD) บริเวณ luminal projection นอกจากนี้ยังพบสีส้มกระจายรอบ ๆ ขอบนอกของ prostate gland cell (PgC)



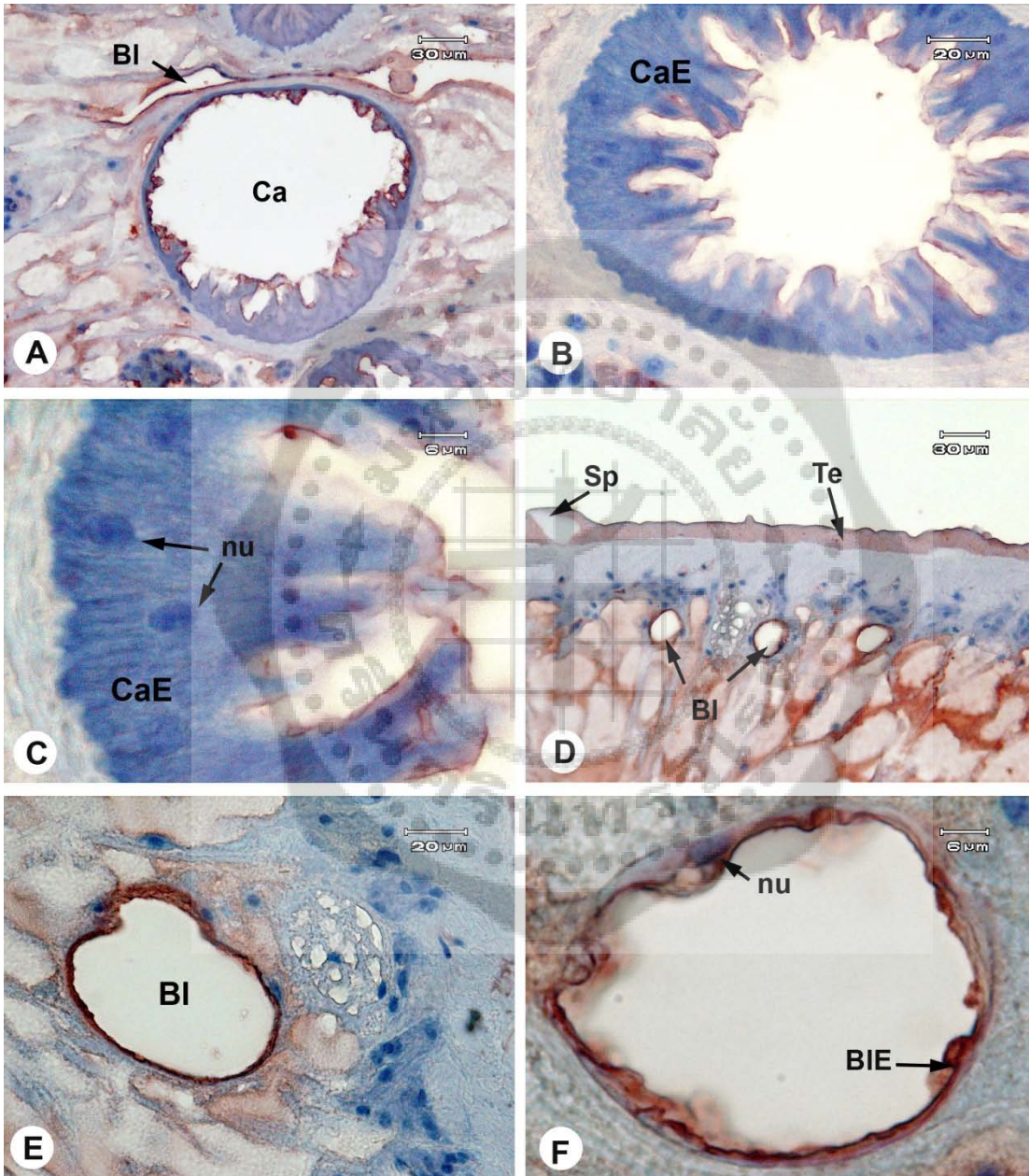
- ภาพที่ 7 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantica* ระยะ unembryonated egg (uEg), embryonated egg (Eg) และพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ (Ju) ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin
- A-C ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และปานกลาง (B, C) แสดงตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa TA ใน unembryonated egg (uEg) ที่อยู่ภายใน uterus ลักษณะสีส้มเข้มบริเวณเปลือกไข่ (Es) และสีส้มเล็กน้อยภายใน vitelline cell (Vc)
- D, E ภาพกำลังขยายปานกลาง (D) และสูง (E) แสดงตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa TA ใน embryonated egg (Eg) ลักษณะเป็นสีส้มเข้มบริเวณผิว (Te) ของ miracidium (M) ภายในไข่ และสีส้มจาง ๆ ในเปลือกไข่ (Es)
- F ภาพกำลังขยายต่ำของ oblique section ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ แสดงตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะเป็นสีส้มเข้มบริเวณชั้นผิว (Te) และสีส้มจาง ๆ ภายใน parenchyma (Pc)
- G-H ภาพกำลังขยายปานกลาง (G) และสูง (H) ของ cross section ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ แสดงตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มเข้มบริเวณ tegument (Te) และสีส้มเล็กน้อยบริเวณเยื่อบุผิวของ caecum (Ca) และ oral sucker (Os)
- I ภาพกำลังขยายสูง แสดงตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa TA ใน caecum (Ca) ลักษณะสีส้มจาง ๆ บริเวณเซลล์เยื่อบุผิว (CaE)
- J ภาพกำลังขยายสูงของ bladder (Bl) แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มบริเวณเซลล์เยื่อบุผิว (BlE), (nu=nucleus)



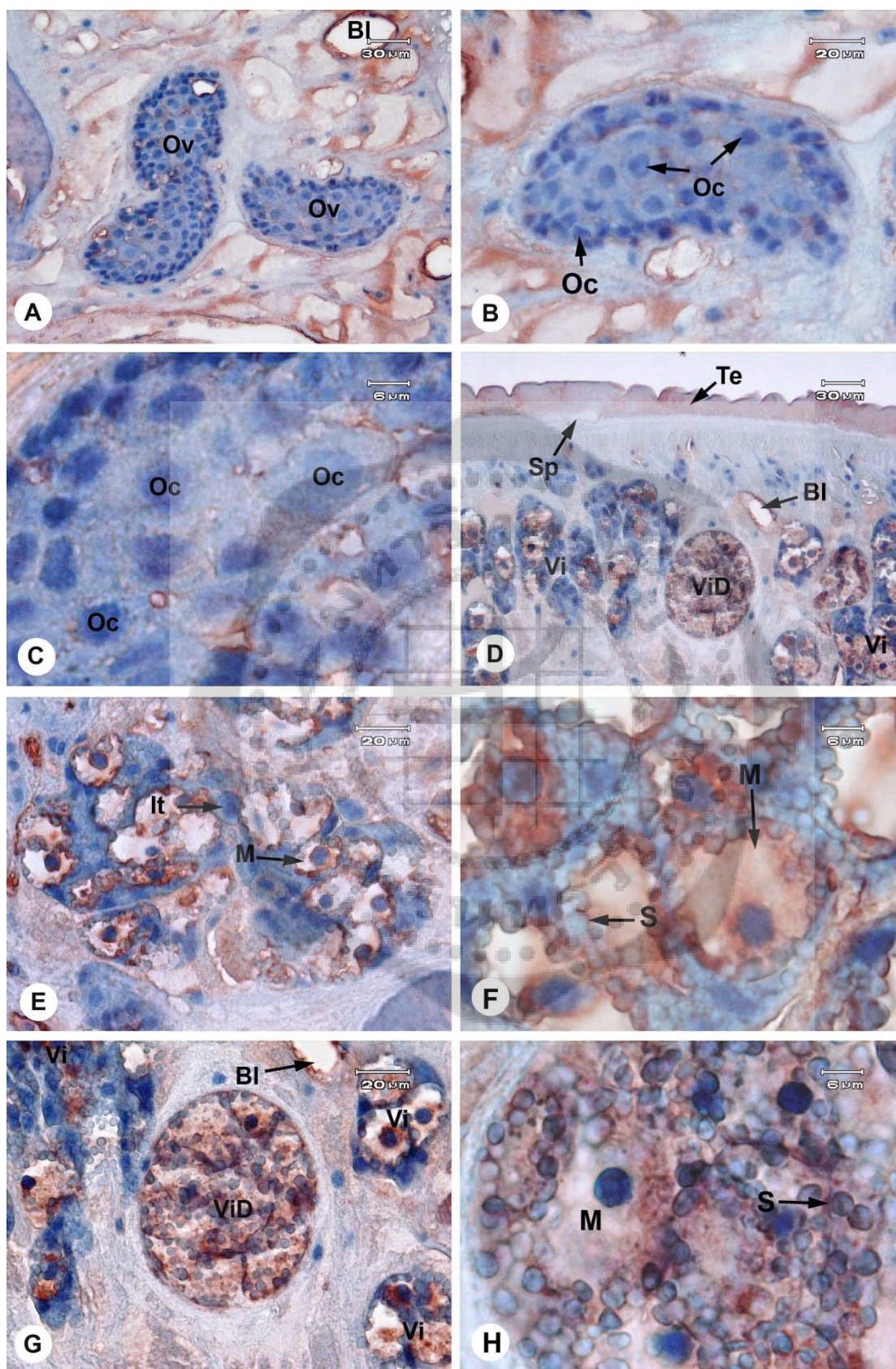
- ภาพที่ 8 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัย ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer's haematoxylin
- A ภาพกำลังขยายต่ำของส่วน anterior ของพยาธิตัวเต็มวัยที่ตัดตามขวาง แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพยาธิ
- B ภาพกำลังขยายปานกลางของ pharynx (Ph) แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มเข้มบริเวณเยื่อบุของ pharynx (PhE)
- C, D ภาพกำลังขยายปานกลาง (C) และสูง (D) ของชั้นผิวหนัง แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะเป็นจุดสีส้มเข้มกระจายทั่วทั้งชั้นผิว (Te), (Sp=spine)
- E ภาพกำลังขยายสูงของ tegumenta cell (Tc) แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มกระจายอยู่ในcytoplasm และแขนงของเซลล์
- F ภาพกำลังขยายปานกลางของ parenchyma (Pc) แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มกระจายอยู่ภายใน cytoplasm ของเซลล์



- ภาพที่ 9 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ระยะเวลาตัวเต็มวัยใน caecum (Ca) และ bladder (Bl) ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิ ระยะเวลาตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin
- A-C ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) ของ caecum (Ca) แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มเล็กน้อยบริเวณเยื่อบุผิว (CaE), (nu=nucleus, Pc=parenchyma)
- D-F ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) ของ bladder (Bl) แสดงตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มเข้มบริเวณเยื่อบุผิว (BlE), (Te=tegument, Sp=spine)



- ภาพที่ 10 ภาพ immunoperoxidase staining ของพยาธิ *F. gigantea* ตัวเต็มวัยในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งใช้ rat sera anti 21 kDa tegumental antigen ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody และ counterstain ด้วยสี Mayer' haematoxylin
- A-C ภาพกำลังขยายปานกลาง (A, B) และสูง (C) แสดงตำแหน่งการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มกระจายอยู่บริเวณขอบเซลล์ oocyte (Oc) ภายใน ovary (Ov)
- D-F ภาพกำลังขยายปานกลาง (A, B) และสูง (C) แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ภายใน vitelline gland (Vi) ลักษณะเป็นจุดสีส้มเข้มภายใน mature vitelline cell (M), (Bl=bladder, Te=tegument, Sp=spine, It=intermediate vitelline cell, S=shell globules)
- G, H ภาพกำลังขยายปานกลาง (G) และสูง (H) แสดงการกระจายของ 21 kDa TA ลักษณะสีส้มเข้มภายใน mature vitelline cell (M) ที่อยู่ใน vitelline duct (ViD)



บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ tegumental antigen ด้วยวิธี Immunoperoxidase

จากการศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ total tegumental antigen ของพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย โดยวิธี immunoperoxidase staining ซึ่งใช้ rat serum anti total TA ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยเป็น primary antibody ผลจากการทดลองพบว่าพบการกระจายของ total TA บริเวณ tegument ซึ่งมีความหนาแน่นมากบริเวณขอบนอกของ tegument ส่วนภายใน syncytium และ tegumental cell พบการกระจายของ total TA ทั่วไป ในขณะที่ 21 kDa พบกระจายทั่วไปภายใน tegument โดยโปรตีนที่พบบริเวณขอบของ tegument น่าจะมีความสัมพันธ์อยู่กับ apical plasma membrane ของ tegument จากการศึกษาน้ำที่ของ tegument พบว่าทำหน้าที่หลายประการหน้าที่สำคัญประการหนึ่งคือ การ absorb สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจาก host ภายใน tegument มีเอนไซม์สะสมอยู่หลายชนิดได้แก่ acid phosphatase ซึ่งพบมากภายใน cytoplasm โดยเฉพาะบริเวณ apical plasma membrane (66) และ Na^+/K^+ -ATPase ที่พบบริเวณ invagination ของ apical plasma membrane และบริเวณ infolding ของ basal plasma membrane ซึ่งทำหน้าที่เป็น ion pump ที่ tegument membrane ดังนั้นโปรตีนที่พบได้บริเวณนี้น่าจะมีหน้าที่สำคัญ เช่นในการขนส่งสารต่าง ๆ ผ่าน tegumental surface เป็น receptor protein หรือแม้กระทั่ง glycocalyx coating ซึ่งสร้างมาจาก G_1 granule ของ T1 tegumental cell และไป exocytose ที่บริเวณฐานของ pit แล้วปล่อย content ซึ่งเป็น glycocalyx coat บริเวณ external surface (24)

total TA และ 21 kDa TA ที่กระจายอยู่ทั่วไปใน tegumental syncytium นั้นอาจจะมี ความสัมพันธ์อยู่กับ granule ภายใน tegument หรืออาจจะเป็น structural protein ภายใน tegument ซึ่งจากการศึกษาลักษณะ ultrastructure ของ tegument พบว่ามีลักษณะเป็น syncytium และมี cytoplasmic processes ยื่นไปเชื่อมกับเซลล์ tegument ซึ่งอยู่ใต้ชั้น basal lamina และชั้นกล้ามเนื้อ ภายใน tegument syncytium ประกอบด้วย granule 2 ชนิด ได้แก่ G_1 และ G_2 กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่ง G_1 ทำหน้าที่ในการผลิต glycocalyx และ exocytose ไปยังส่วนฐานของ pit ส่วน G_2 ทำหน้าที่สร้าง surface membrane ซึ่งหลุดลอกออกไป (67) รวมถึงอาจมีการขนส่ง membrane protein ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งสาร receptor หรือเอนไซม์ บริเวณ apical membrane อย่างไรก็ตามการทดลองในครั้งนี้มีการผลิต TA จากการ extract ชั้น tegumental syncytium โดยการใช้ Triton-x 100 ซึ่งเป็นส่วนผสมอยู่ใน extraction buffer ในการสลาย surface membrane ของ tegument แล้วทำให้ส่วน cytoplasm ของ tegumental syncytium ละลายปะปนอยู่ใน extraction buffer ซึ่งรวมเรียกว่า tegumental antigen หรือ

TA ดังนั้นโปรตีนที่พบได้ใน TA อาจจะเป็นโปรตีนที่มาจากทั้งส่วนที่สัมพันธ์อยู่กับ membrane และส่วนที่เป็น structural protein ซึ่งสามารถพบกระจายได้ทั่วไปภายใน tegument

จากการศึกษา tegument ในพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ พบว่าให้ผลคล้ายคลึงกับที่พบในระยะตัวเต็มวัยคือ มี total TA และ 21 kDa ปริมาณมากบริเวณ apical surface ในขณะที่ภายในชั้น syncytium พบ total TA กระจายทั่วไป นอกจากนั้นยังพบ TA ของพยาธิตัวเต็มวัยบริเวณขอบของตัว miracidium ภายในไข่ด้วยเช่นกัน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า TA ที่พบในพยาธิตัวเต็มวัยมีการผลิตตั้งแต่ในระยะ miracidium และตัวอ่อน หรือโปรตีนใน TA อาจจะมี epitope คล้ายคลึงกับโปรตีนใน miracidium หรือพยาธิตัวอ่อน เมื่อทำการศึกษาการกระจายของ total TA และ 21 kDa ในอวัยวะอื่น ๆ ของพยาธิ *F. gigantica* พบว่าปรากฏ positive reaction เช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่พบได้ทั้งใน tegument และอวัยวะต่าง ๆ หรือมี epitope บนโมเลกุลคล้ายคลึงกัน

จากผลการทดลองพบว่า มี total TA ปริมาณมากภายใน cytoplasm และ processes ของเซลล์ parenchyma นอกจากนี้พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ parenchyma ตามความเข้มของ reaction ของ total TA ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Pc1 พบ total TA ปริมาณมากเสมอกันทั่วทั้งเซลล์ Pc2 พบ total TA ค่อนข้างจาง และ Pc3 พบ total TA กระจายภายในเซลล์ไม่สม่ำเสมอ ในขณะที่ 21 kDa พบปริมาณค่อนข้างน้อย แสดงให้เห็นว่าใน parenchyma แต่ละเซลล์มีปริมาณโปรตีนที่สร้างขึ้นแตกต่างกัน จากการศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ FABP ใน parenchyma ของ *F. gigantica* ตัวเต็มวัยพบว่ามีความเข้มที่แตกต่างกัน 3 ระดับเช่นเดียวกันกับการทดลองในครั้งนี้ (68) นอกจากนี้จากการศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ GST ใน พยาธิ *Cotylophoron cotylophorum* พบว่า GST กระจายอยู่ใน parenchyma ซึ่งสามารถแบ่ง parenchyma ได้ 5 กลุ่มตามความเข้มของ positive reaction (69) นอกจากนี้พบว่าปริมาณของ enzyme acid phosphatase ที่ปรากฏภายในเซลล์ parenchyma แต่ละเซลล์ก็แตกต่างกันเช่นกัน (66) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ parenchyma แต่ละเซลล์นั้นน่าจะมี activity ของเซลล์ที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาในระบบทางเดินอาหาร พบ total TA ทั้งในทางเดินอาหารส่วนต้น ซึ่งได้แก่ esophagus และทางเดินอาหารส่วนปลาย ซึ่งได้แก่ caecum โดยใน esophagus และ pharynx พบ total TA ลักษณะเป็นจุดกระจายอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ ส่วนใน caecum พบ total TA ปริมาณมากบริเวณ luminal projection ของเซลล์เยื่อผิว ในขณะที่ใน cytoplasm และนิวเคลียสไม่พบ total TA ส่วน 21 kDa พบการกระจายตัวลักษณะคล้ายคลึงกับ total TA จากการศึกษาลักษณะ ultrastructure ของเยื่อผิวของระบบทางเดินอาหารของพยาธิ *F. gigantica* พบว่ามีลักษณะแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ tegumental-type มีลักษณะเป็น syncytium เช่นเดียวกับ tegument ซึ่งพบได้ใน oral sucker, buccal tube, pharynx, esophagus และส่วน anterior ของ caecum ดังนั้นโปรตีนใน tegument ก็น่าจะพบได้ในทางเดินอาหารส่วนต้นเช่นกัน ในขณะที่ caecum ส่วนใหญ่มีเยื่อผิวเป็นชนิด digestive-type เยื่อผิวชนิดนี้มีลักษณะเด่น คือบริเวณส่วนฐานจะเว้าเป็นรอยลึกจำนวนมาก เซลล์มีรูปร่างเป็น cuboid จนถึง columnar

(Sriburee, 2000) ส่วนยอดมีการยื่นของ membrane เรียกว่า apical lamella โดยเซลล์เยื่อบุผิวแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ type 1 และ type 2 โดย type 1 cell เป็นชนิด tall columnar และ cytoplasm ย้อมติดสี methylene blue เข้ม ส่วน type 2 cell มีขนาดใหญ่กว่า ภายใน cytoplasm ประกอบด้วย RER และ zymogen enzyme จำนวนมาก ซึ่ง zymogen granule เหล่านี้จะถูกหุ้มเข้าสู่ lumen บริเวณ apical surface แต่จากการทดลองพบ TA เฉพาะบริเวณส่วนยอดของ caecal epithelial cell เท่านั้น ซึ่งเป็นบริเวณของ apical lamella ดังนั้นโปรตีนบริเวณดังกล่าวน่าจะมีความสัมพันธ์อยู่กับ apical membrane ของ caecal epithelium ซึ่งน่าจะทำหน้าที่ในการขนส่งสารผ่านเข้า-ออกบริเวณยอดของ caecal epithelial cell

จากการศึกษาในระบบสืบพันธุ์เพศเมียมีการกระจายของ total TA และ 21 kDa ในเกือบทุกอวัยวะ ได้แก่ vitelline gland vitelline duct Mehlis' gland และ uterus โดยภายใน vitelline gland จะมี total TA และ 21 kDa ใน vitelline cell ระยะ mature เท่านั้น โดยมีการกระจายบริเวณ glycogen area ภายใน cytoplasm และมีปริมาณมากบริเวณรอบ ๆ นิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบการกระจายของ total TA งาม ๆ ใน cytoplasm ของ vitelline cell ที่อยู่ภายใน vitelline duct จากการศึกษาลักษณะทาง ultrastructure ของ vitelline cell พบว่า ภายใน cytoplasm ประกอบด้วย glycogen จำนวนมาก และพบ RER บริเวณรอบ ๆ นิวเคลียสและ eggshell globules ซึ่งอยู่ใต้ชั้น cell membrane (70) โดยจากการทดลองในครั้งนี้บริเวณที่พบ TA น่าจะเป็นตำแหน่งของ RER ซึ่งอาจจะเป็นโปรตีนที่กำลังอยู่ในช่วงของการสังเคราะห์หรือการขนส่ง และอาจจะมีหน้าที่ในกระบวนการสร้าง glycogen เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไข่ หรืออาจจะมีส่วนช่วยในการพัฒนาของ miracidium ภายในไข่

ภายใน uterus พบว่ามีการกระจายของ total TA ใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งจะมีความหนาแน่นมากบริเวณส่วนยอดของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบการกระจายของ total TA ในไข่ระยะ unembryonated egg ที่อยู่ภายใน uterus เช่นกัน โดยพบว่าภายในเปลือกไข่มี reaction ปรากฏหนาแน่นมากกว่าภายใน vitelline cell ที่อยู่ภายในไข่ ในขณะที่ 21 kDa TA ปรากฏใน cytoplasm ของเซลล์เยื่อบุผิวของ uterus เช่นกันและมีความหนาแน่นมากบริเวณส่วนยอดของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบภายใน vitelline cell ที่อยู่ภายในไข่เช่นเดียวกับ total TA จากการศึกษาลักษณะ ultrastructure พบว่าผนังของ uterus ประกอบด้วย simple cuboidal epithelium ส่วนยอดมี cytoplasm processes คล้าย lamella ขนาดใหญ่ และล้อมรอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อ และมี cytoplasm processes ของ parenchymal cell ยื่นแทรกเข้ามา ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อเพื่อแลกเปลี่ยนสารอาหารและน้ำภายใน uterus และพบว่าส่วน dorsal part ของ uterus บริเวณตรงกลางของ cytoplasm มี zymogen granule จำนวนมาก (70) ซึ่งโปรตีนที่พบจากการทดลองในครั้งนี้ น่าจะมีความสัมพันธ์อยู่กับ lamella บริเวณส่วนยอดของ uterus ซึ่งอาจจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนาของไข่ที่อยู่ภายใน

จากการศึกษาระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ปรากฏการกระจายของ total TA และ 21 kDa ค่อนข้างน้อยใน prostate gland และ seminal vesicle โดยโปรตีนดังกล่าวน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์เยื่อ seminal vesicle หรือ prostate gland ในการกระตุ้นหรือหลังสารเพื่อเป็นอาหารของ spermatozoa (50)

จากการศึกษาด้วยวิธี immunofluorescence ในพยาธิ *F. gigantica* ตัวเต็มวัย โดยใช้ MoAb ที่จำเพาะต่อ 28.5 kDa TA เป็น primary antibody พบว่าให้ผล positive reaction บริเวณ tegument tegumental cell และ processes นอกจากนี้ยังปรากฏ 28.5 kDa บริเวณเยื่อผิวของ oral sucker caecum และในระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย รวมถึงยังพบในตัวอ่อนพยาธิอายุ 5 และ 7 สัปดาห์ ซึ่งมีลักษณะของตำแหน่งของ 28.5 kDa TA ที่คล้ายคลึงกัน และยังพบ 28.5 kDa TA ใน tegument และ cytoplasm ของ tegumental cell ในพยาธิระยะ newly excysted juvenile อีกด้วย (53) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า 21 kDa TA ของพยาธิ *F. gigantica* สามารถตรวจพบได้ใน ES antigen ของพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่ง 21 kDa TA อาจจะเป็น antigen ที่ถูกหลั่งออกมาจาก tegument (51, 71)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa เป็นโปรตีนจากชั้นผิวที่ตรวจพบได้ในพยาธิตัวเต็มวัยและพยาธิในระยะต้นของการพัฒนา แล้วถูกปลดปล่อยออกจากชั้นผิวของพยาธิ กลายเป็น ES antigen และสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้ดี แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 21 kDa นี้ เป็นโปรตีนที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาในการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิด้วยวิธี immunodiagnosis ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อนำมาศึกษาด้วยวิธี immunoperoxidase พบว่า

Total tegumental antigen

สามารถพบ total TA ได้ใน tegument, parenchyma, digestive tract และ reproductive tract ต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย และใน tegument parenchyma และ caecum ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ รวมถึงใน miracidium

21 kDa tegumental antigen

พบได้ใน tegument, digestive tract และ reproductive tract ต่าง ๆ ของพยาธิตัวเต็มวัย และใน tegument และ caecum ของพยาธิตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ รวมถึงใน miracidium

บรรณานุกรม

1. Sukhapesna V, Tantasuvan D, Sarataphan N, Imsup K. A study on the prevalence of liver fluke infection in cattle and buffaloes in Thailand. J Thai Vet Med Assoc 1989; 40(1-2): 13-19.
2. Boray JC. Flukes of domestic animal. In: Gaafar SM, Howard WE, Marsh RE, editors. Parasites, pests and predators. New York; Elsevier 1988; 179-218.
3. วัฒนา แสงวงกิจ. Clinical Syndrome of Fascioliasis. ใน : วิชาพัฒนการในโรคระบบทางเดินอาหาร 6. กรุงเทพฯ : กรุงเทพมหานคร, 2533;183-206.
4. Kachintorn, V, Atisook K, Tesjaroen S, Lertakyamane N, Plengvanit U. *Fasciola gigantica*: the second case of human infection in Thailand. J Med Assoc Thailand 1988; 71(8): 451-455.
5. Srihakim S, Pholpark M. Problem in fascioliasis in animal husbandary in Thailand (review). Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1991; 22 suppl: 352-355.
6. Togerson P. Clexton J. Epidemiology and control. In: Dalton JP editor. Fasciolosis. Cambridge: CAB International 1998; 113-139.
7. วิจิตร สุขเพ็ญ, ดร. ทนตสุวรรณ, นพพร ศุภารักษ์, กิ่งดาว อิมทรัพย์. การศึกษาอัตราการเกิดพยาธิใบไม้ตับของโคและกระบือในประเทศไทย. สัตวแพทยสาร 2532; 13-19.
8. วันชัย มาลีวงศ์ , ผิวพรรณ มาลีวงศ์ , นิमित มรกต . ปรสตีวิทยาทางการแพทย์: โปรโตซัวและหนอนพยาธิ. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คสังนานาวิทยา 2544; 198-207.
9. Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, von Orelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infection in sheep with triclabendazole. Vet Rec 1983; 113: 315-317.
10. Sanyal PK. Kinetic disposition of triclabendazole in buffalo compare to cattle. J Vet Phamacol Theraps 1995; 18: 370-374.
11. Haroun ET, Hillyer GV. Resistance to fascioliasis. A review. Vet Parasitol 1986; 20:63-93.
12. Yoshihara S, Nakagawa M, Suda H. Protection against *Fasciola gigantica* infection in rats administered metacercarial antigens. Res Vet Sci 1985; 39:383-4.
13. Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosati E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, Spithill TW. (1997) .Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. Int J Parasitol; 27:1419-28.

14. Tendler M, Brito CFA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diago CM, Almeida MS, et al. A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 269-73.
15. Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, et al. Glutathione S-transferase novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. J Immunol 1990; 145: 3905-10.
16. Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. Vaccine 1996; 14(17-18):1603-12.
17. Wijffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, et al. Vaccination of sheep with purified cystein proteinases of *Fasciola hepatica* decrease worm fecundity. Exp Parasitol 1994; 78: 132-48.
18. Spithill TW, Dalton JP. Progress in development of liver fluke vaccines. Parasitol Today 1998; 14(6): 224-8.
19. วิฑูรย์ ไวยนันท์. ปรสดีตวิทยาทางการแพทย. กรุงเทพฯ : ศักดีโสภการพิมพ์ 2540; 257-290.
20. Espino AM, Marcet R and Finlay CM. Detccion of circulating excretory secretory antigens in human with fascioliasis by sanwich enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbial 1990; 28: 2637-40.
21. Espino AM and Finlay CM. Sanwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in human with fascioliasis. J Clin Microbiol 1994; 32: 190-3.
22. Bennett CE. The identification of soluble adult antigen on the tegumental surface of juvenile *Fasciola hepatica*. Parasitol 1978;77: 325-32.
23. Behm CA, Sangster NC. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton JP, editor. Fasciolosis. Cambridge; CABI 1999;185-217.
24. Sobhon P, Anatavara S, Dangprasert T, Viyanant V, Krailas D, Upatham ES. *Fasciola gigantica*: studies of the tegument as a basis for the development of immunodiagnosis and vaccine. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1998; 29(2): 387-400.

25. Sriburee S. Characterization of epithelial cells and the expression of cathepsin L gene in the digestive tract of *Fasciola gigantica*. [M.Sc. Thesis]. Bangkok: Mahidol University 2000.
26. Dalton JP, Heffernan M. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. Mol Biochem Parasitol 1989; 35: 161-6.
27. McKerrow JH. Parasite proteases. Exp Parasitol 1981; 68:111-5.
28. Tort J, Brindely PJ, Knox D, Wolfe KH, Dalton JP. Proteinases and associated genes of parasitic helminthes. Adv Parasitol 1999; 43:L161-266.
29. Dangprasert T, Khawsuk W, Meepool A, Wanichanon C, Viyanant W, Upatham ES, et al. *Fasciola gigantica*: surface topography of the adult tegument. J Helmintol 2001; 75: 43-50.
30. Khawsuk, W. Development of *Fasciola gigantica* tegument, identification and localization of associated antigens. Ph.D. Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University 2003.
31. Sobhon P, Dangprasert T, Chuanchaiyakul S, Meepool A, Khawsuk W, Wanichanon C, et al. *Fasciola gigantica*: ultrastructure of the adult tegument. Sci Asia 2000; 26: 137-48.
32. Fairweather, I., Threadgold L.T. and Hanna R.E.B. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton, J.P. Fasciolosis. New York:CABI Publishing 1999; 47-111.
33. Barry, D. H., Mawdesley-Thomas, L. E., and Malone J. C. Enzyme histochemistry of the adult liver fluke, *Fasciola hepatica*. Exp Parasitol 1968; 23:355-360.
34. Thrope, E. Comparative enzyme histochemistry of immature and mature stages of *Fasciola hepatica*. Exp Parasitol 1967; 22:150-159.
35. Threadgold, L. T., and Read, C. P. Electron-microscopy of *Fasciola hepatica*. V. peroxidase localization. Exp Parasitol 1968; 23:221-227.
36. Threadgold L. T., and Brennan. *Fasciola hepatica*: basal infolding and associated vacuoles of the tegument. Exp Parasitol 1978; 46:300-316.
37. Fujino T and Ishii Y. Comparative histochemical studies of glycosidase activity in some helminthes. J Helminthol 1986; 60: 1-13.
38. Skuce PJ, Anderson HR, Fairweather I. The interaction between the deacetylated (amine) metabolite of diamphenethide (DAMD) and cytochemically demonstrable Na⁺/K⁺-

- ATPase activity in the tegument of *Fasciola hepatica*. Parasitol Res 1987; 74:161-167.
39. Threadgold, L. T. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica* VI the ultrastructural localization of Phosphatases. Exp parasitol 1968; 23:264-276.
 40. Sobhon P, Upatham ES. Snail hosts, life cycle, and tegument structure of oriental schistosomes. UNDP/World Bank/WHO special program for research and training in tropical diseases 1990.
 41. Sobhon P, Upatham ES, Viyanant V, Kusamran T, Mothong V, Anantavara S. Identification and localization surface antigens in adult *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mekongi*. National Research Council, USA, Aquaculture and Schistosomiasis. Proceedings of a network meeting held in Manila, Philippines, August 6-10, 1991. Washington DC; National Academic Press 1992; 178-195.
 42. Taylor JW, Hayunga EG, Vannier WE. Surface antigens of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 1981; 3: 157-168.
 43. Lee KW, Thakur A, Karim AM, LoVerde PT. Immune response to *Schistosoma mansoni* phosphoglycerate kinase during natural and experimental infection: identification of a schistosoma-specific B cell epitope. Infect Immun 1995; 63: 4307-11.
 44. Yang W, Waine GJ, Mcmanus DP. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian blood fluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. Biochem Biophys Res Commun 1995; 212: 1029-1039.
 45. Hoffmann KF, Strand M. Molecular characterization of a 20.8 kDa *Schistosoma mansoni* antigen. J Biol Chem 1997; 272: 14509-15.
 46. Mohamed MM, Shalaby KA, LoVerde PT, Karim AM. Characterization of Sm20.8, a member of a family of schistosome tegumental antigens. Mol Biochem Parasitol 1998; 96: 15-25.
 47. Shabaan AM, Mohamed MM, Abdallah MS Ibrahim HM and Karim AM. Cloning and characterization of a *Schistosoma mansoni* 1H and 30S clones as two tegumental vaccine candidate antigens. Acta Biochemica Polonica 2003; 50: 269-278.
 48. Itagaki T, Sakamoto T, Itagaki H. Analysis of *Fasciola* sp. antigen by enzyme-linked immunotransfer blot using sera from experimentally and naturally infected cattle. J Vet Med Sci 1995; 57: 522-13.

49. Sobhon P, Anantavara S, Dangprasert T, Meepool A, Wanichanon C, Viyanant V. *Fasciola gigantica*: Identification of adult antigens, their tissues sources and possible origins. J Sci Soc Thailand 1996; 22: 143-162.
50. Sobhon P, Viyanant V, Upatham ES, Kusamran T, Grams SV, Ardseungnoen P, et al. Development of immunodiagnosis of *Fasciola gigantica*. The Allergy and Immunology Society of Thailand and the Faculty of Science, Mahidol University under the auspices of FIMSA. Proceeding of The 2nd FIMSA congress, Immunology and Allergy in the Asia-Oceania: at the dawn of the new millenium; Jan 23-27; Bangkok, Thailand: Aksornsmat Press 2000.
51. Viyanant V, Krailas D, Sobhon P, Upatham ES, Kusamran T, Chompoochan T, et al. Diagnosis of cattle fasciolosis by the detection of a circulating antigen using a monoclonal antibody. Asia Pacific J Allerg Immunol 1998; 15: 153-159.
52. Viyanant V, Upatham ES, Sobhon P, Krailas D, Ardseungnoen P, Anantawara S. Development and characterization of monoclonal antibodies against excretory-secretory antigens of *Fasciola gigantica*. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1997; 28: 128-133.
53. Chaithirayanon K, Wanichanon C, Vichasri-Grams S, Ardseungneon P, Grams R, Viyanant V, Upatham ES, Sobhon P. Production and characterization of a monoclonal antibody against 28.5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica*. Acta Trop 2002; 84:1-8.
54. ปิยะฉัตร สงวนรัตน์ การผลิต polyclonal antibody การศึกษาคุณลักษณะและตำแหน่งการกระจายของ high immunogenic circulating tegumental antigen ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica*, โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 2548.
55. Shehab AY, Abou Basha LM, El-Morshedy HN, Abel-Fattah M, Osman MM and Farag HF. Circulating antibodies and antigens correlate with egg counts in human fasciolosis. Trop Med International Health 1999; 4: 691-694.
56. Carnevale S, Rodriguez MI, Santillan G, Labbe JH, Cabrera MG, Bellegarde EJ et al., Immunodiagnosis of human fasciolosis by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a micro-ELISA. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 174-177.

57. Haseeb AN, el-Shazly AM, Arafa MA and Morsy AT. Evaluation of excretory/secretory *Fasciola* (Fhes) antigen in diagnosis human fasciolosis. J Egypt Soc Parasitol 2003; 33: 123-138.
58. Cornelissen JBWJ, Gaasenbeek CPH, Borgsteede FHM, Holland WG, Harmsen MM and Boersma WJA. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. Internatl J Parasitol 2001; 31: 728-737.
59. Rokni MB, Massoud J and Hanilo A. Comparasion of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola gigantica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. Acta Tropica 2003; 88: 69-75.
60. Wongkham C, Tantrawatpan C, Intapan PM, Maleewong W, Wongkham S and Nakashima K. Evaluation of immunoglobulin G subclass antibodies against recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12: 1152-1156.
61. Intapan PM, Tantrawatwan C, Maleewong W, Wongkham S, Wongkham C and Nakashima K. Potent epitopes derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in peptide-based immunoassay for the serodiagnosis of human fasciolosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53: 125-129.
62. Arafa MS, Abaza SM, El-Shewy KA, Mohareb EW and El-Moamly AA. Detection of *Fasciola*-specific excretory/secretory (E/S) protein fraction band (49.5 kDa) and its utilization in diagnosis of early fasciolosis using different diagnostic techniques. J Eyp Soc Parasitol 1999; 29: 911-926.
63. Attallah AM, Karawia EA, Ismail S, Tabll AA, Nawar AA, Ragab WA. Identification and characterization of a 26- to 28- kDa circulating antigen of *Fasciola gigantica*. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96: 271-282.
64. Dixit AK, Yadav SC and Sharma. 28 kDa *Fasciola gigantica* cysteine protease in the diagnosis of prepatent ovine fasciolosis. Vet Parasitol 2002; 109: 233-247.
65. El-Kerdany ED, Abd-aalla NM and Sharki OA. Recognition of antigenic components of *Fasciola gigantica* and their use in immunodiagnosis. J Egypt Soc Parasitol 2002; 32: 675-690.

66. สรยา บุญมาก. (2547). การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของเอนไซม์ acid phosphatase และ peroxidase ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ตัวเต็มวัยด้วยวิธี enzyme histochemistry. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
67. Sobhon, P., Dangprasert, T., Chuanchaiyakul, S., Meepool, A., Khawsuk, W., Wanichanon, C., Viyanant, V., & Upahtam, E.S. (2000). *Fasciola gigantica*: ultrastructure of adult tegument. *Sci Asia*, 26, 137-148.
68. Sirisriro, A., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Ardseuneon, P., Pankao, V., Meepool, A., Chathirayanon, K., Viyanant, V., Tan-Ariya, P., Upatham, E.S., & Sobhon, P. (2002). Production and characterization of monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica*. *Vet Parasitol*, 105, 119-129.
69. จินันดา แสงทอง. (2546). การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ glutathione S-transferase in Adult Cotylophoron cotylophorum in lumen. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
70. Meepool, A. (2004). Structural organization of the female reproductive organs in relationship to the formation of the egg and eggshell, and identification and characterization of the eggshell protein encoding gene in *Fasciola gigantica*. Master's thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
71. Krailas, D., Viyanant, V., Ardseungnoen, P., Sobhon, P., Upatham, E.S., & Keawjam, R. (1999). Identification of circulating antibodies in fasciolosis and localization of 66 kDa antigenic target using monoclonal antibodies. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 17, 53-58.



ภาคผนวก

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.ศรัทธา ภัทธีรณชิต

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำวิทยาลัยนวัตกรรมการสื่อสารสังคม มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

วิทยาลัยนวัตกรรมการสื่อสารสังคม 02-259-2343 Email : srirath@swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก : Biological Sciences:Neurosciences, Illinois State University

ปริญญาโท : วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์), มหาวิทยาลัยมหิดล

ปริญญาตรี : วท.บ. (กายภาพบำบัด), มหาวิทยาลัยมหิดล

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ.ดร.อุดมศรี โชว์พิทพรชัย

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ 02-664-1000 ต่อ 4501

Email :udomsri@swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก : ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์), มหาวิทยาลัยมหิดล

ปริญญาโท : วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์), มหาวิทยาลัยมหิดล

ปริญญาตรี : วท.บ. (พยาบาลศาสตร์), มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ.ดร. ธาวิณี สวัสดิ์พาณิชย์

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 043348360-8

Email :md_tarinee@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก : ปร.ด. (อณูชีววิทยา), มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปริญญาโท : วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์), มหาวิทยาลัยมหิดล

ปริญญาตรี : วท.บ. (กายภาพบำบัด), มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.วิฑูร ชาวสุข

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 038-102222

Email :witoonj@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก : ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์), มหาวิทยาลัยมหิดล

ปริญญาตรี : วท.บ. (ชีววิทยา), มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์