

574.29

จ 2420

5-3

ภูมิทัศน์ภายในระบบนิเวศของ เหวในหมู่บ้านจันทรที่คึกเขือพยาธิตัวจิ๊ด

ปริญญาบัตร

ของ

รุ่งลาพรรณ ไพรรณ

5-6 พ.ค. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้า

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2528

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178316

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษา-มหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน

..... กรรมการ

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

..... กรรมการ

..... กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้โดยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ คอลงคนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ อย่างดียิ่งจาก คร. อารยา ธรรมครองอาคม และผู้ช่วยศาสตราจารย์พันธุ์สิน เกตุทัต ผู้ริเริ่มรู้สึกษาบซึ่งในความกรุณาถึงกล่าว จึงกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สติชัย สิริสิงห และภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้ใช้สถานที่ และ อุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อนันต์ พุทธิยาสถาพร และอาจารย์ สุรพล เทียมเพชร ที่ให้คำแนะนำปรึกษา และช่วยเหลือในการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ เป็นอย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนงบประมาณแผ่นดิน เพื่อใช้จ่ายในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำแนะนำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณพ่อและแม่ตลอดจนน้อง ๆ ที่เป็นกำลังใจตลอดมา

รุ่งดาวรรณ ไพรวรรณ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
คำนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการศึกษาคนควา.....	5
ความสำคัญในการศึกษาคนควา.....	5
ขอบเขตในการศึกษาคนควา	6
คำจำกัดความศัพท์เฉพาะ	6
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	10
วงชีวิตของพยาธิตัวจิ๋ว	10
ลักษณะรูปร่างของพยาธิตัวจิ๋ว	12
การศึกษาทางค่านิยมโนโลยีของโรคพยาธิตัวจิ๋ว	14
3 วิธีดำเนินการ	20
วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการดำเนินการ	20
วิธีดำเนินการและรวบรวมข้อมูล	21
การเก็บรวบรวมตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว ...	21
การสกัดแอนติเจนจากเนื้อเยื่อตัวอย่างระยะที่ 3 ของ พยาธิตัวจิ๋ว	22
การหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัว อ่อน ระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว	23
การทำให้หนูถีบจักรติดเชื้อตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิ ตัวจิ๋ว	25
การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน ของพยาธิตัวจิ๋วโดยการฉีดวัคซีน	26

การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในวุ้น . . .	26
การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าและตกตะกอนในวุ้น	27
การตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเกาะ	28
การศึกษาองค์ประกอบของแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีเรดิโออิมมูโนพรีซิพิตเคชัน และออโตเรดิโอกราฟี	30
4 ผลการศึกษาคนควา	36
ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วเพื่อเตรียมแอนติเจน	36
ผลการหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว	36
ผลการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในวุ้น..	39
ผลการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าและตกตะกอนในวุ้น	43
ผลการตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเกาะ	48
ผลการศึกษาองค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมจากหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมีตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วโดยวิธีเรดิโออิมมูโนพรีซิพิตเคชันและออโตเรดิโอกราฟี.	52
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	59
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	59

บทที่	หน้า
ขอบเขตในการศึกษาค้นคว้า	59
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล	60
สรุปผลการศึกษาค้นคว้า	60
อภิปรายผล	63
ข้อเสนอแนะ	67
บรรณานุกรม	68
ภาคผนวก	75

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

- 1 แสดงผลการหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด 37
- 2 แสดงจำนวนแถบตะกอนที่พบในปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่
สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืดและ—
ซีรัมหนูถีบจักรที่ดัดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด
ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีตกตะกอนในนูน 40
- 3 แสดงจำนวนแถบตะกอนที่พบในปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่
สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืดและ—
ซีรัมหนูถีบจักรที่ดัดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด
ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระแส
ไฟฟ้าและตกตะกอนในนูน 44

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แผนภูมิแสดงวงชีวิตของพยาธิตัวจิ๋ว	10
2 ลักษณะพยาธิตัวจิ๋วตัวเต็มวัย	13
3 ลักษณะไข่ที่เจริญพัฒนาในระยะต่าง ๆ	13
4 ลักษณะตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิตัวจิ๋ว	13
5 ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของพยาธิตัวจิ๋วเจริญในช่องว่างลำตัวไร่น้ำ.	15
6 ลักษณะตัวอ่อนระยะที่ 2 ของพยาธิตัวจิ๋ว	15
7 แสดงตัวอ่อนระยะที่ . ของพยาธิตัวจิ๋ว	16
8 ลำดับขั้นของการตกตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติเจนที่ เกิดจากกาวสารกัมมันตภาพรังสีกับแอนติบอดี	33
9 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างค่าออปติคัลเดนซิตีกับความยาว คลื่น 750 นาโน เมตร กับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน	38
10 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิกิริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่คิด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว นาน 4 และ 6 สัปดาห์ กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วโดยวิธีตกตะกอนในเนื้ออุ่น	41
11 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิกิริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่คิด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว นาน 8 และ 12 สัปดาห์ กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3	

- ของพยาธิตัวจิ๋วโดยวิธีตกตะกอนในเนื้ออุ่น 42
- 12 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่ติด
เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว นาน 6 สัปดาห์
กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ-
พยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าและตก
ตะกอนในอุ่น 45
- 13 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่ติด
เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว นาน 8 สัปดาห์
กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ-
พยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าและตก
ตะกอนในอุ่น 46
- 14 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่ติด
เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว นาน 12 สัปดาห์
กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ -
พยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าและตก
ตะกอนในอุ่น 47
- 15 กราฟแสดงผลการตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีในซีรัม
หนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วโดย
วิธีเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง 49
- 16 กราฟแสดงผลการตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีในซีรัม
หนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วโดย
วิธีเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงและภายหลังจากที่แอนติบอดีถูก
รีดิวส์ด้วยบู-เมอร์แคปโตเอทานอล 51

- 17 แสดงแอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วเมื่อสกัดจากไอโอดีน 125 นำไปแยกองค์ประกอบโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส 53
- 18 แสดงองค์ประกอบแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรปกติจากต่างประเทศที่ปราศจากหนอนพยาธิอย่างแท้จริง, กับซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกอิมมูไนซ์ด้วยแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว, กับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5 ตัว นาน 6 สัปดาห์, กับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว นาน 8 สัปดาห์, กับโปรตีน เอ-เซฟาโรส 54
- 19 แสดงองค์ประกอบแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วทำปฏิกิริยากับกลุ่มกับหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดชนิด Schistosoma haematobium, S. mansoni, S. japonicum (Chinese strain), S. japonicum (Philippine strain), S. mekongi และทำปฏิกิริยากับกลุ่มกับหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวกลมในลำไส้ชนิด Aspicularis tetraptera และ Syphacia obvelata. 55
- 20 แสดงองค์ประกอบแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5 ตัว นาน 1 สัปดาห์, 2

สัปดาห์, 4 สัปดาห์, 6 สัปดาห์, 8 สัปดาห์, 12 สัปดาห์ และ 16 สัปดาห์	57
21 สรุปผลการศึกษาไคเนติกของการสร้างแอนติบอดีแสดงองค์ประกอบแอนติเจนจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ – พยาธิตัวจิ๋วที่หาปฏิกิริยาตกตะกอนกับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิชนิดเดียวกันเป็นเวลาต่างกัน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์และอโตเรดิโอกราฟี	58

บทนำ

พยาธิตัวจิ๋ว (Gnathostoma spp.) เป็นพยาธิตัวกลมที่ถูกค้นพบครั้งแรกโดย ดร. ริชาร์ด โอเวน (1836) และให้ชื่อว่า Gnathostoma spinigerum พบในก้อนเนื้ออก (Tumor) ที่ผนังกระเพาะอาหารของเสือภายในสวนสัตว์ กรุงลอนดอน ต่อมาพบว่า G. spinigerum ตัวนี้เป็นต้นเหตุที่ทำให้เกิดโรคพยาธิตัวจิ๋วในคนได้ (Human gnathostomiasis) (Miyazaki. 1960 : 338 - 370)

มีรายงานถึงการพบพยาธิตัวนี้ในประเทศไทย มาเลเชีย จีน ญี่ปุ่น อินเดีย อิสราเอล เวียดนาม อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ (Punyagupta and Pacheco. 1961 : 515 - 520) ดร. ลิวินสัน เป็นผู้พบพยาธิตัวจิ๋วในคนเป็นครั้งแรกโดยพบจากบริเวณเต้านมที่วามของหญิงไทยคนหนึ่งในกรุงเทพมหานคร (Levinson. 1889 : 323 - 326 citing Daengsvang. 1983 : 1 - 10)

นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีรายงานอีกหลายฉบับที่พบว่าพยาธิชนิดนี้ทำให้เกิดโรคร้ายในอวัยวะต่าง ๆ ในคน เช่น ในทางเดินปัสสาวะ (ปัสสาวะแสบ, สมทรง ระบุณี และปรีชา เจริญลาภ 2507 : 85 - 89) ในช่องลูกตา (บรรจงศักดิ์ นะมาตร และคนอื่น ๆ 2505 : 549 - 559) และปอดอีกเสบ (Vibulseth and Leelarasamee. 1980 : 23 - 24) เป็นต้น เขาใจกันว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจากการเคลื่อนที่ไปของตัวพยาธิทำให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะต่าง ๆ โดยตรง รวมทั้งสารบางอย่างที่พยาธิปล่อยออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาการต่อต้านขึ้น เกือบทุกรายที่ไ้ตัวพยาธิ

ออกมาเป็นหลักฐานพบว่า เป็นพยาธิที่เจริญเกินตัวอ่อนระยะที่ 3 (Advanced third stage larva) บางตัวลักษณะและขนาดเกือบเป็นพยาธิตัวเต็มวัย (Immature adult) ในบางกรณียังพบพยาธิตัวเต็มวัยในปูปาย (สมพนธ์ บุญยุปต์ และพิพัฒน์ ชุตินุเวช 2510 : 367 - 373) และพยาธิที่พบในคนไทยเป็นชนิด Gnathostoma spinigerum ทั้งสิ้น (สมพนธ์ บุญยุปต์ 2510 : 686 - 694)

ยอร์ค และ เมเบิลสโตน (Yorke and Maplestone, 1969) ได้จัดพยาธินี้ ไว้ในหมวดหมู่ดังนี้

Phylum Nematelminth

Class Nematoda (Rudolphi, 1808)

Order Eunematoda (Word, 1916)

Superorder Spiruroidea (Railliet and Henry, 1915)

Family Gnathostomidea (Railliet, 1895)

Superfamily Gnathostominae (Baylis and Home, 1920)

Genus Gnathostoma (Owen, 1836)

Genus Gnathostoma มี 19 Species (Miyazaki, 1960 338 - 370) แต่ยังมีรายงานของคนอื่นที่พบจำนวนต่างกันไป สำหรับในประเทศไทยพบว่า มี 4 Species ดังต่อไปนี้

1. G. spinigerum พบในกระเพาะอาหาร สุนัข แมว ชื่อว่า
ตัวจิ๋ว
2. G. hispidum พบในกระเพาะอาหารหมู ชื่อว่าตัวจิ๋วหมู
3. G. doloresi พบในกระเพาะอาหารหมู ชื่อว่าตัวจิ๋วหมู
4. G. vietnamicum พบในระบบทางเดินปัสสาวะนาก ชื่อว่า
ตัวจิ๋วนาก

พยาธิทั้ง 4 Species นี้มีรูปร่างโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันมาก การแยก Species นอกจากจะดูที่ผู้ให้อาศัยที่แท้จริง (Definitive host)

แฉะบ้างต้องดูลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกันออกไป เช่น ริมฝีปาก (Lip)

ลักษณะขอ (Hooks) เป็นต้น

การศึกษาเกี่ยวกับอิมมูโนโอยมีความสำคัญสำหรับโรคติดเชื้อพยาธิ
ตัวจิ๋วมาก ถึงแม้เหตุผลต่อไปนี้

1. มีคนไทยจำนวนไม่น้อยที่มีลักษณะนิสัยชอบกินอาหารที่ปรุงจาก
เนื้อสัตว์ดิบ ๆ สุก ๆ เช่น ส้มผัก ก๋วยเตี๋ยว ปลา ปลานึ่ง เป็นต้น คนเหล่านี้
ส่วนใหญ่เป็นชาวภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งมีการย้ายถิ่นฐาน
มาทำมาหากินอยู่ในภาคกลางและภาคอื่น ๆ ของประเทศเป็นจำนวนมาก ใน
ปัจจุบันมีผู้ป่วยด้วยอาการบวมอักเสบชนิดเคลื่อนที่ มารับการรักษาในโรงพยาบาล
ภาคเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นจำนวนมาก

2. การสำรวจอาหาร เช่น ส้มผัก ในตลาดลพบุรี และตลาดใน
เขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร ไคแก ตลาดบางลำภู ตลาดบางหมื่น ตลาด
เจริญภาค พบพยาธิตัวจิ๋วระยะคืบคอดอยู่ 14% 7% 5% และ 5% ตาม
ลำดับ (ศรีวิวัฒนา ศึกษาง 2525 : 60)

3. เนื่องจากคนเป็นผู้ให้อาศัยโดยบังเอิญ (Accidental host)
ของตัวจิ๋ว จึงไม่สามารถตรวจพบไข่ หรือตัวอ่อนในสิ่งขับถ่าย หรือสิ่งคัดหลั่ง
(Secretion) ใด ๆ ทั้งสิ้น การวินิจฉัยที่แน่นอนที่สุดในปัจจุบันก็คือการ
ตรวจพบตัวอ่อนหรือตัวเกือบเต็มวัยในเนื้อเยื่อที่คัดออกมาจากบริเวณบวมของ
ผู้ป่วยซึ่งเป็นวิธีการที่ยากลำบากมาก บางครั้งผ่านเข้าไปแล้วอาจไม่ได้พยาธิ

4. ในบางกรณีพยาธิไชเข้าไปในสมองหรือไขสันหลังทำให้สมอง
หรือไขสันหลังมีอาการอักเสบชนิดที่มีเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลในน้ำไขสันหลัง
(Eosinophilic myeloencephalitis) ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะ เป็นไข้
คอแข็ง ปวดเสียวอย่างมากตามเส้นประสาท ง่วงซึม หงุดหงิด หรือเป็น
อัมพาตและถึงกับตายได้ (สมพนธ์ บุญยุคปต์ และพิพัฒน์ ชูศิษุเวช 2510 :
367 - 373, ทนงศักดิ์ บุณนาถ, พิพัฒน์ ชูศิษุเวช และสมพนธ์ บุญยุคปต์

2511 : 813 - 821, บุญสม รัตนศิริ, วิจิตร เทมศรีชาติ และรัตนทิพย์
 ทรัพย์การ 2524 : 439 - 444) ซึ่งในกรณีนี้ถ้าไม่มีประวัติการบวมอีกเดิม
 เกือบที่มาก่อน การวินิจฉัยย่อมทำได้ลำบาก

5. วิธีการทางอิมมูโนโลยีนั้น หากมีการศึกษาวิจัยจนค้นพบแอนติเจน
 ที่เหมาะสมในการใช้งานแล้ว จะเป็นวิธีการที่ให้ความแน่นอนในการวินิจฉัย -
 โรคได้ นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธีอิมมูโนโลยียังสะดวกและปลอดภัย
 กับผู้ป่วยอีกด้วย

ในปัจจุบันนี้ การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีทางอิมมูโนโลยียังให้ผลไม่
 เป็นที่น่าพอใจนัก (Yamaguchi. 1952 : 26 - 34 ; Egashira. 1952 :
 108 - 129 ; Ando. 1957 : 2342 - 2359 ; Furuno. 1959 : 2802 - 2822)
 ทั้งนี้ เพราะพยาธิตัวจืดเป็นพยาธิตัวกลมที่มีองค์ประกอบทางชีวเคมีซับซ้อน
 การสกัดแอนติเจนมาใช้โดยไม่แยกแยะองค์ประกอบให้ใดเฉพาะส่วนที่จะให้ปฏิกิริยา
 จำเพาะ (Purification) เสียก่อน จึงให้ปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย
 โรคอื่น ๆ ด้วย ทั้งนี้โดยอาศัยผลการวิจัยในพยาธิตัวกลมอื่น ๆ และยังให้
 ปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อพยาธิตัวแบนชนิดอื่นด้วย (Kasemsuth,
 Panut-ampon and Sanghiru . 1981 : 410 - 412) ดังนั้น หากทำ
 การศึกษาโดยวิธีเรดิโออิมมูโนพรีซิพิตชัน (Radioimmunoprecipitation)
 และออโตเรดิโอกราฟี (Autoradiography) จนรูปร่างองค์ประกอบแอนติ
 เจนของพยาธิจะให้ปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับตัวจืดแล้วจะทำให้การวินิจฉัย -
 โรคโดยวิธีทางอิมมูโนโลยีให้ผลที่เชื่อถือได้แน่นอน นอกจากนี้การตรวจหา
 แอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในวุ้น (Immunodiffusion) โดยวิธี
 แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าและตกตะกอนในวุ้น (Immunoelectrophoresis)
 และการตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีการเกาะกลุ่มเม็ดเลือด
 แดงและ (Passive haemagglutination) ยังช่วยให้เกิดความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ทาง
 ค่านอิมมูโนโลยีระหว่างผู้ให้อาศัย (Host) และพยาธิตัว

จักได้ขึ้น

ดังนั้น งานวิจัยนี้จะไต่ถามการศึกษาทั้งความสัมพันธ์ระหว่างผู้ให้อาศัยและพยาธิตัวจักโดยใช้นกขี้จิ้งเป็นผูให้อาศัยแทนคน และจะไต่ถามองค์ประกอบแอนติเจนของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจักเพื่อให้เป็นแนวทางในงานวิจัยในเรื่องการวินิจฉัยโรค (Immunodiagnosis) ต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาครั้งนี้

1. เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของเหลว (Humoral immune response) ในหนูถีบจักร (Mice) ที่ติดเชื้อมพยาธิตัวจักจำนวนต่างกันและระยะเวลาที่ต่างกัน โดยจะศึกษาในค่าคุณภาพและปริมาณของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มทั้งที่ได้จากการทำหนูติดเชื้อ (Infection) และอิมมูไนซ์ (Immunization) ซึ่งจะ เป็นแนวทางสำหรับการศึกษาวิจัยทางด้านการวินิจฉัยโรค (Immunodiagnosis) ของพยาธิตัวจักต่อไปในอนาคต

ความสำคัญในการศึกษาครั้งนี้

ผลของการศึกษาหาได้ทราบถึง

1. ข้อมูลพื้นฐานที่จะ เป็นแนวทางวิจัยต่อไปในอนาคต เพื่อให้ได้วิธีการในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจักในคนได้แม่นยำ
2. เทคนิคและวิธีการในการตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจักในปลาไหลน้ำจืด

ขอบเขตในการศึกษาคนควา

1. การศึกษารังไข่ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด ซึ่งได้จากปลาไหลน้ำจืด จากตลาดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร
2. สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูถีบจักร (Mice) เพศผู้โตเต็มวัย
3. ศึกษาถึงปริมาณและคุณภาพของภูมิคุ้มกันทานในระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะที่หนูมีต่อพยาธิตัวจิ๊ด
4. การศึกษาคนควารังไข่ของปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำจำกัดความศัพท์เฉพาะ

Immune response หมายถึง การตอบสนองของร่างกายมนุษย์หรือสัตว์บางชนิดในลักษณะจำเพาะ (Specific) ต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งมีโคหลายรูปแบบ โคแก่ การสร้างโคโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่เป็นแกมมาโกลบูลิน (Gammaglobulin) เรียกว่าแอนติบอดี (Antibody) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) ที่ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นพลาสมาเซลล์ (Plasma cell) และ/หรืออาจตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมด้วยการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) ที่ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบต่าง ๆ กัน นอกจากนี้ยังอาจตอบสนองออกมาในรูปที่เรียกว่า ภูมิโนโลจิกอล โทลเอดรานซ์ (Immunological tolerance) ซึ่งหมายถึงการตอบสนองในทางลบ

Humoral immune response หมายถึงการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในลักษณะจำเพาะด้วยการสร้างแอนติบอดี ซึ่งอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวในเลือด (Plasma) ในน้ำเหลือง (Lymph) และในของเหลวของเนื้อเยื่อ

ต่าง ๆ (Tissue fluid) ของร่างกาย

Immune system หมายถึง ระบบทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ประกอบด้วยเซลล์หลายพวกทำหน้าที่รวมกัน เซลล์ดังกล่าวได้แก่ ลิมโฟไซต์และฟาโกไซต์ (Phagocyte) เป็นต้น เซลล์เหล่านี้พบอยู่ในเลือด น้ำเหลือง ไขกระดูก ม้าม ต่อมทอนซิล ไทมัส (Thymus) , พeyer's patches (Peyer's patches) , ทอนซิลและอะดีนอยด์

Antigen (แอนติเจน) หมายถึง สารซึ่งสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีและ/หรือสเปซิฟิคส์ เซนซิไทซ์ ลิมโฟไซต์ (Specifically Sensitized Lymphocytes) ได้ และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีหรือลิมโฟไซต์นั้น ๆ ได้ด้วย จึงนับว่าแอนติเจนมีคุณสมบัติ 2 ประการ คือ อิมมูโนจีนิซิตี (Immunogenicity) ซึ่งหมายถึง ความสามารถตามธรรมชาติที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี และสเปซิฟิคส์ เซนซิไทซ์ ลิมโฟไซต์ และสเปซิฟิค รีแอคทีวิตี (Specific reactivity) ซึ่งหมายถึง แอนติเจนจะสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีหรือสเปซิฟิคส์ เซนซิไทซ์ ลิมโฟไซต์ ที่มีกระตุ้นทำให้เกิดขึ้น

Antibody (แอนติบอดี) หมายถึงสารไกลโคโปรตีนในเลือดซึ่งเรียกว่า แกลบมาโกลบูลิน เกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อตำแหน่งบนแอนติเจน (Antigenic determinant) และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับตำแหน่งบนแอนติเจนนั้นเท่านั้น ไม่ว่าจะเป็นในหลอดทดลองหรือในร่างกาย แอนติบอดีเป็นผลิตภัณฑ์ของพลาสมาเซลล์ พบอยู่ในซีรัม น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำตา และน้ำไขสันหลัง เป็นต้น

Titer (ไตเตอร์) เป็นค่าที่ใช้แสดงถึงระดับของแอนติบอดีในของเหลวต่าง ๆ เช่น ซีรัมและสิ่งคัดหลั่ง วิธีการเพื่อหาไตเตอร์ ใช้การทดสอบทางอิมมูน ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยเจือจางของเหลวที่ต้องการตรวจให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันเรียงลำดับ (เช่น 1 : 10,

1 : 20, 1 : 40, ... หรือ 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, ... เป็นต้น) ส่วนประกอบอื่น ๆ ในปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่จะเติมลงในของเหลวเจือจางต่าง ๆ นั้น ให้อัตราความเข้มข้นที่ถูกต้องที่สุดของของเหลวที่ยังทำให้เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันได้ถือเป็นโคแอกูแลนต์ของสิ่งที่ตรวจ

Immunization หมายถึง การกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์หรือสัตว์ตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดหนึ่งชนิดใด โดยการฉีดแอนติเจนชนิดนั้นเข้าไปในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์นั้น ๆ

Immunodiffusion หมายถึง การแสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยให้สารทั้งสองอย่างซึมแพร่เข้าหากันและตกตะกอนให้เห็นในเนื้อวุ้น

Immunoelectrophoresis หมายถึง วิธีการที่ใช้หลักการของอิเล็กโตรโฟรีซิส ร่วมกับอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส กล่าวคือ ใช้กระแสไฟฟ้าแยกแอนติเจนต่าง ๆ ที่ผสมกันอยู่ให้ออกจากกันเป็นแต่ละส่วนย่อย ๆ เสียก่อน เนื่องจากแอนติเจนแต่ละโมเลกุลมีประจุไฟฟ้าต่างกันและมีขนาดของโมเลกุลต่างกันด้วย ทำให้เคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกันและจะถูกแยกไปอยู่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ กันในเนื้อวุ้น หลังจากนั้นเราจะหลอมยาวตลอดแนวของอิเล็กโตรโฟรีซิสไดแอนติซีรั่มซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ก่อแอนติเจนต่าง ๆ ที่ผสมกันอยู่นั้น แอนติเจนและแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อกันจะขึ้นเข้าหากันเกิดเป็นแถบตะกอนในตำแหน่งที่มีความเหมาะสม แถบตะกอนอาจเกิดหลายแถบถ้าแอนติเจนเป็นส่วนผสมของสารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกัน

Passive hemagglutination หรือ **Indirect hemagglutination** หมายถึง การทดสอบให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยนำแอนติเจนที่อยู่ในสารละลายมาเคลือบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในบางกรณีต้องใช้เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับสารบางอย่างเช่น กลูตาไรอัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) หรือ

แทนนิก แอซิด (Tannic acid) ก่อนแล้วแช่น้ำของแอนติเจนที่จะใช้

Radioimmunoprecipitation

และ Autoradiography

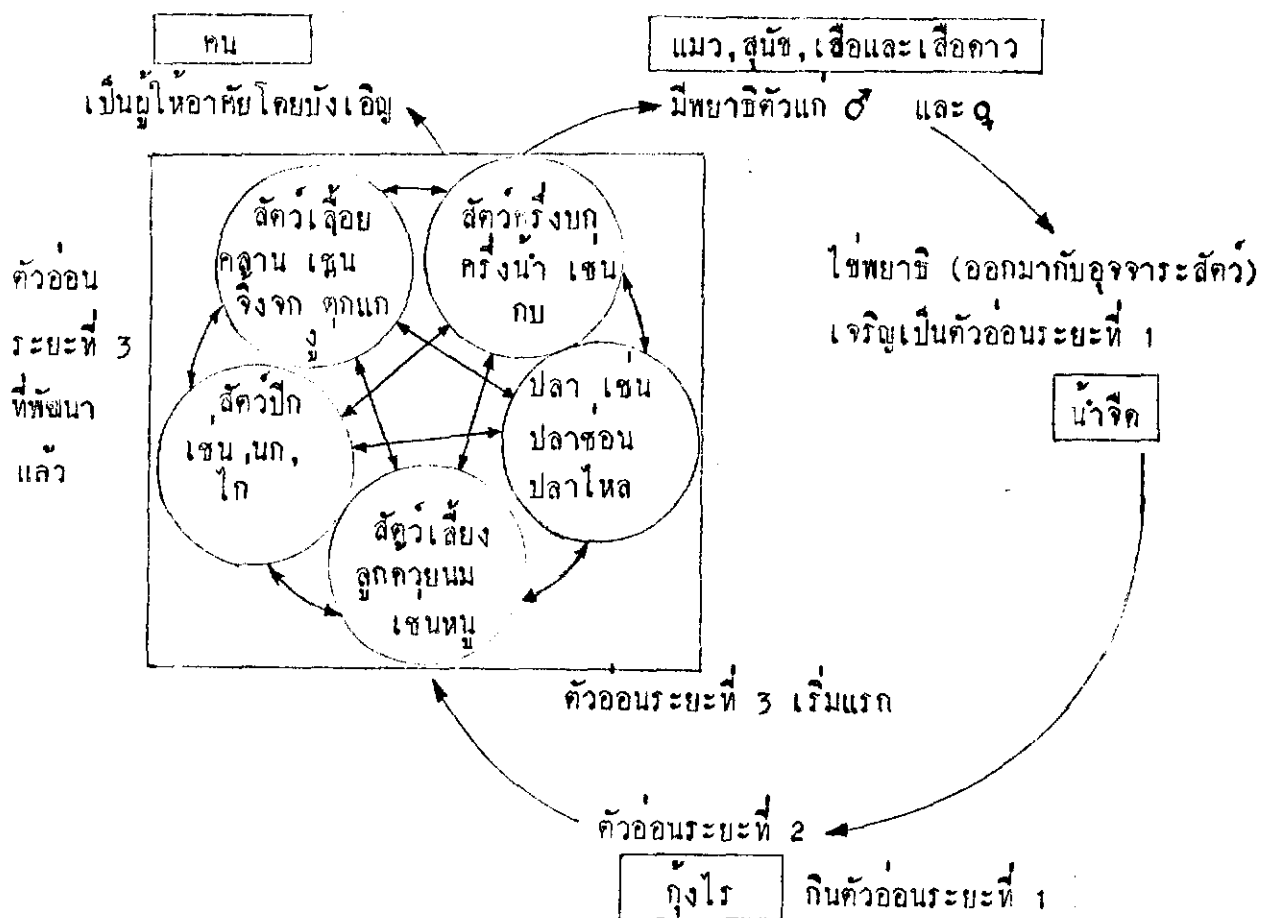
หมายถึง วิธีการที่จะศึกษาองค์ประกอบของแอนติเจนที่เป็นโปรตีนทำโดยติดฉลาก (Label) แอนติเจนด้วยสารกัมมันตภาพรังสี และให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี จะได้สารประกอบ เรดิโอแอคทีฟ อิมมูโนคอมเพล็กซ์ (Radioactive immune complex) ซึ่งจะแยกออกจากแอนติเจนอิสระ (Free antigen) และโปรตีนชนิดอื่น ๆ ในซีรัมโดยใช้แบคทีเรียชนิดสแตฟไฟโลคอคคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus, Cowan I strain) ซึ่งผลิตโปรตีน เอโก และสามารถแสดงให้เห็นแอนติเจนในอิมมูโนคอมเพล็กซ์ที่ถูกจับติดไปกับโปรตีนเอโก โดยวิธีการของ เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS - polyacrylamide gel electrophoresis) และออโตเรดิโอกราฟี

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

วงชีวิตของพยาธิตัวจิ๋ว

ศึกษาเริ่มแรกโดย ศาสตราจารย์นายแพทย์เจดิม พรหมมาส และศาสตราจารย์
นายแพทย์สวัสดิ์ แคงสว่าง (1933, 1936, 1937, 1980)



ภาพประกอบ 1 แผนภูมิแสดงวงชีวิตของพยาธิตัวจิ๋ว

พยาธิตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมีย อาศัยในก้อนเนื้อที่มีในกระเพาะอาหารแมวหรือสุนัข ซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยที่แท้จริง (**Definitive host**) หลังจากผสมพันธุ์กันแล้ว ตัวเมียออกไข่และไข่จะออกมาทางช่องคิตของก้อนเนื้อพบกับกระเพาะอาหารไปตามลำไส้ออกมาพร้อมกับอุจจาระ ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (**First stage larva**) ในน้ำ หลังจากนั้นจึงเข้าไปอยู่ในกุ้งไร (**Cyclop**) ซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยตัวที่ 1 (**First intermediate host**)

จนเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (**Second stage larva**) และเมื่อปลา กบ งู ไก่ ซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยตัวที่ 2 (**Second intermediate host**) กินกุ้งไร ที่มีตัวอ่อนระยะที่ 2 เข้าไป ตัวอ่อนระยะที่ 2 จะเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 (**Third stage larva**) ซึ่งเป็นระยะคิต (**Infective stage**) เมื่อผู้ให้อาศัยที่แท้จริงกินผู้ให้อาศัยที่ 2 ที่มีตัวอ่อนระยะที่ 3 เข้าไปตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเจริญเป็นตัวแก่ อาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารต่อไป

พยาธิตัวจิ๋วสามารถคิตออกมายังคนซึ่งคนเป็นผู้ให้อาศัยโดยบังเอิญ (**Accidental host**) กล่าวคือ เมื่อคนรับประทานปลาหรือเนื้อสัตว์ที่มีตัวอ่อนของพยาธิตัวจิ๋วระยะที่ 3 โดยที่ปลาหรือเนื้อสัตว์ที่รับประทาน เข้าไปในนั้น-กิน ๆ สุก ๆ ตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่รับประทานเข้าไปยังคงมีชีวิตอยู่ และเนื่องจากคนมิได้เป็นผู้ให้อาศัยที่แท้จริง ตัวอ่อนจึงไม่เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย-หรือจะเจริญเป็นระยะที่เรียกว่า ตัวเต็มวัยที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ (**Immature adult**) เคลื่อนที่ไปตามอวัยวะต่าง ๆ พยาธิสภาพของมนุษย์จะเกิดมากหรือน้อยขึ้นกับตำแหน่งที่พยาธิจะเดินทางไป ขณะที่พยาธินี้อยู่ตามกล้ามเนื้อ จะทำให้เกิดอาการปวด บวม ซึ่งเกิดจากพิษที่หลังจากพยาธิตัวจิ๋วซึ่งมีลักษณะคล้ายสารประกอบอะซิติลโคลีน (**Acetylcholine - like substance**) และไฮยาลูโรนิเนส (**Hyaluronidase**) ซึ่งสามารถละลายเมือกเลือดแดงและย่อยโปรตีนได้ (สรีรวิทยา ชิตช่วง 2525 : 60)

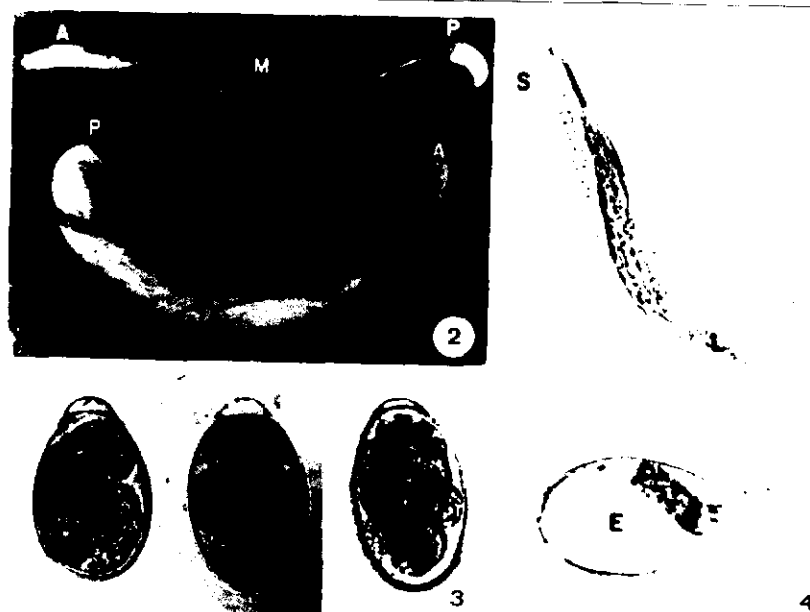
ลักษณะรูปร่างของพยาธิตัวจิ๋ว

พยาธิตัวเต็มวัย (Adult) มีลักษณะตัวกลมยาว เรียวจากหัวไปทาง ลำตัวค่อนข้างใสและมีสีชมพูอ่อน มีริมฝีปาก 1 คู่ หัวค่อนข้างกลม ที่หัวมีขอ เล็ก ๆ (Hooks or hooklets) ล้อมรอบอยู่ 8 แถว ภายในหัวมีถุง 4 ถุง เรียกว่า บาลโลเนตส์ (Ballonets) แต่ละถุงมีช่องต่อกับถุงยาวเล็กๆ 4 ถุง เรียกว่า เซอวิคอสแซค (Cervical sac) ซึ่งยื่นยาวในช่องลำตัวทาง หลอดอาหารและปลายถุงตันต่อจากหัวเป็นคอ (Neck) มีลักษณะเป็นรอยคอด เล็กน้อย ถัดจากคอเป็นลำตัว (Body) ซึ่งมีหนังหนา (Cuticle) และมี หนามยื่นออกมา (Spines) ตั้งแต่ตอนลำตัวจนถึงคอนลำตัว โดยปลายแหลม ของหนามชี้ไปทางหาง ส่วนหาง (Tail) ปลายหางแผ่ออกเล็กน้อย เรียกว่า คอคัล พาพิลลา (Caudal papillae) และมีสปิกูล (Spicule) ที่ยาวไม่ เท่ากัน 2 อัน ส่วนหางของตัวเมียแหลมกว่าหางตัวผู้ และมีช่องเปิดของระบบ สืบพันธุ์ เรียกว่า วัจวา (Vulva) ที่กึ่งกลางลำตัวหรือคอนลำตัว (ภาพประกอบ 2)

ไข่ มีลักษณะเป็นรูปยาวรีเล็กน้อยมีปุ่ม (Knob) อยู่ข้างหนึ่ง (ภาพ ประกอบ 3) ขนาดของไข่ 68.7×36.7 ไมครอน (Micron) เปลือก ไข่เป็นสีน้ำตาลอ่อน

ตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิตัวจิ๋รมีรูปร่างเรียวจากหัวไปท้าย ที่ หัวมีส่วนยื่นซึ่งสันแหลมคล้ายหนาม 1 อัน มีปลอก (Sheath) หุ้มรอบตัวภายในลำตัวมีหลอดเล็ก ๆ ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นหลอดอาหาร (Esophagus) และลำไส้ (Intestine) ขนาดของตัวอ่อนระยะนี้ประมาณ 265.2×15.8 ไมครอน โดยไม่รวมปลอกหุ้มรอบตัว (ภาพประกอบ 4)

เมื่อตัวอ่อนระยะที่ 1 ถูกถุงโรกิน ปลอกหุ้มจะหลุดออกเริ่มต้นเป็นตัว อ่อนระยะที่ 2 และจะไข่ออกจากกระเพาะอาหารของถุงโรไปอยู่ในช่องว่าง



ภาพประกอบ 2 ลักษณะพยาธิตัวจิ๋วตัวเต็มวัย

M แทน พยาธิตัวผู้ขนาดกว้าง 1 - 1.5 มิลลิเมตร

ยาว 11 - 25 มิลลิเมตร

F แทน พยาธิตัวเมียขนาดกว้าง 1 - 2 มิลลิเมตร

ยาว 25 - 54 มิลลิเมตร

A แทน ส่วนหัว และ P แทน ส่วนหาง

ภาพประกอบ 3 ลักษณะไข่ที่เจริญพัฒนาในระยะต่าง ๆ

ภาพประกอบ 4 ลักษณะตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิตัวจิ๋ว

S แทน ปอดกุ่มรอบตัว

E แทน เปลือกไข่

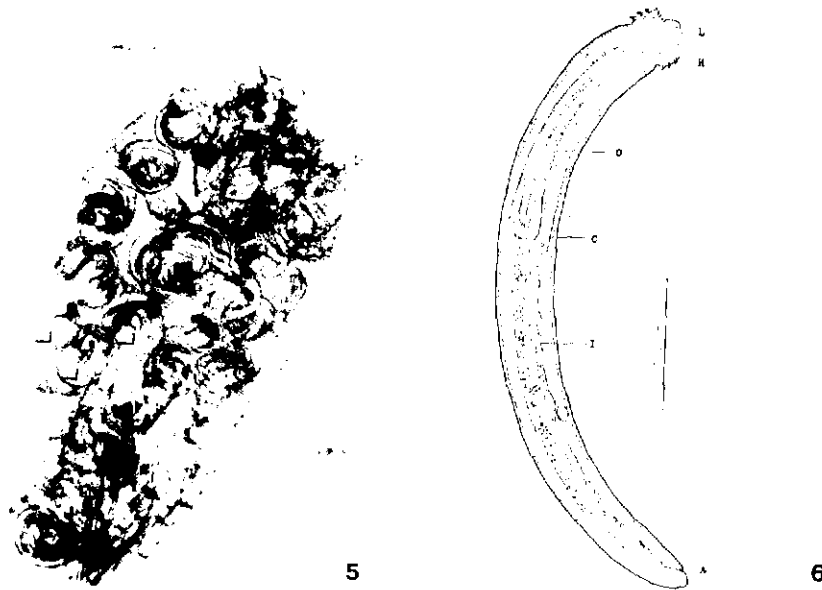
L แทน ตัวอ่อนระยะที่ 1

ลำตัว (Body cavity) แลเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ภายในเวลา 6 วัน โดยตัวอ่อนจะมีลักษณะเริ่มแรกของระยะที่ 3 มีขนาด 460 x 45 ไมครอน ริมฝีปาก 1 คู่ ขนาดเท่ากัน ที่หัวมีหนาม 4 แถว มีหลอดอาหารและลำไส้ ปลายหางมน มีรอยบน (Striations) ของผนังหุ้มลำตัว และมีหนามเห็น ชัด (ภาพประกอบ 5 และภาพประกอบ 6)

ตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่หัว (Head buld) มีริมฝีปาก 1 คู่ และมีขอ โดยรอบ 4 แถว ถือเป็นเพียงรอยคอคเล็กน้อย ผิวของลำตัวเป็นผนังหนา ที่มีรอยบน อวัยวะภายในประกอบด้วยบาโลโคเนตส์ และเซอวิกอล แคล เซน เคียวกับตัวเต็มวัย ระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนระยะที่ 3 มีริมฝีปากที่หัว 1 คู่ และมีพาพิลลา (Papillae) เล็ก ๆ 2 อันขนาดเท่ากัน ถัดจากปาก เป็นหลอดอาหารยาวต่อเนื่องกับลำไส้ ส่วนหน้าของหลอดอาหารเป็นกล้ามเนื้อ (Muscular portion) ส่วนหลังเป็นเซลดอม (Glandular portion) ต่อมนี้สามารถผลิตเนโทสโตมา ทอกซิน (Gnathostoma toxin) ได้ จากหลอดอาหารยาวไปถึงทวารหนัก (Anus) เป็นคอลัมนา อีพีทีเลียล เซล (Columnar epithelial cells) ของลำไส้มีขนาดเล็กมากอยู่ตรงกลาง และเปิดที่ช่องทวารหนัก (ภาพประกอบ 7)

การศึกษาทางอิมมูโนโลยีของโรคพยาธิตัวจิ๊ด

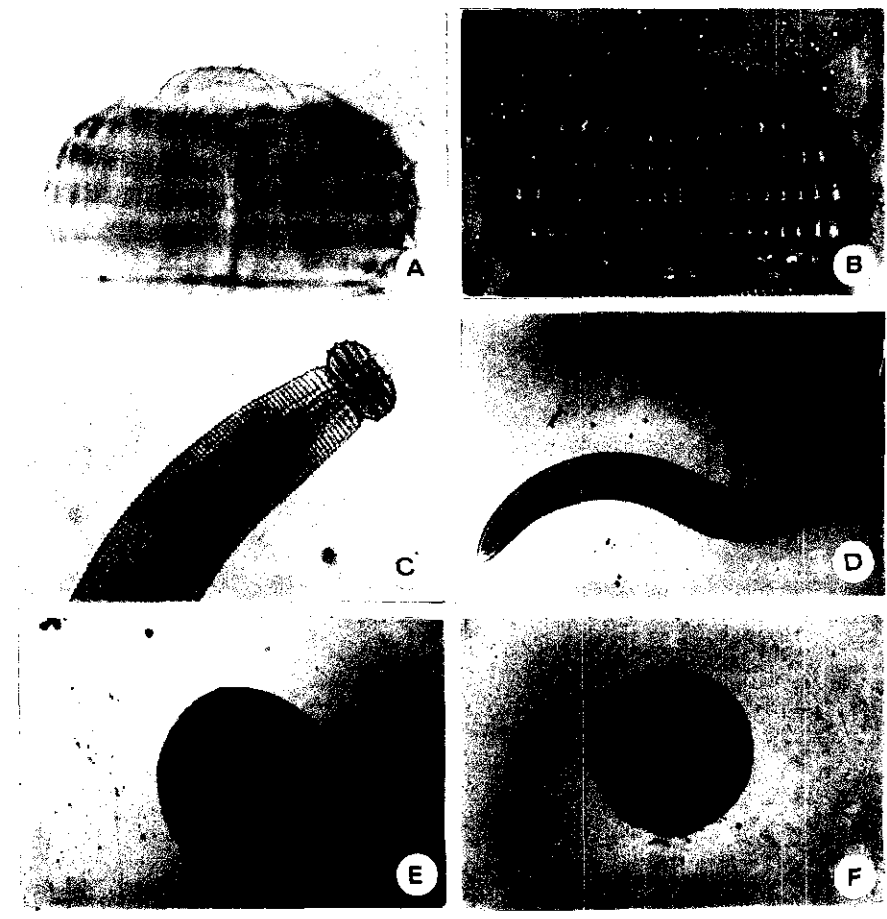
วิธีทดสอบทางอิมมูโนโลยีหลาย ๆ วิธี ได้ถูกคิดและดัดแปลงขึ้นใหม่ ให้ความไว (Sensitive) และเฉพาะเจาะจง (Specific) ให้เห็นความแตกต่างของโรคพยาธิตัวจิ๊ดจากโรคติดเชื้อจากปรสิตตัวอื่นเพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ดในคน การทดสอบที่ผิวหนัง (Skin test) เป็นวิธีที่สะดวกที่สุด โดยเตรียมแอนติเจนจากพยาธิตัวจิ๊ดตัวเต็มวัย บดให้ละเอียดและทำให้แห้งเป็นผง เติมน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% 1,000 ส่วนและ ฟีนอล 0.5% (เพื่อสกัดสิ่งที่เป็นองค์ประกอบของแอนติเจน) ลงไป นำส่วน



ภาพประกอบ 5 ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของพยาธิตัวจิ๋วเจริญในช่องว่าง
ลำตัวของไรน้ำ

ภาพประกอบ 6 ลักษณะตัวอ่อนระยะที่ 2

- L แทน ริมฝีปาก
- H แทน ขอที่หัว
- O แทน หลอดอาหาร
- C แทน เชื้อวิคอลแซค
- I แทน ลำไส้
- A แทน ทวารหนัก



ภาพประกอบ 7 แสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว

A และ B แสดงส่วนหัว ประกอบด้วย ริมฝีปาก 1 คู่ และหนามรอบหัว 4 แถว

C และ D แสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่ออกจากเกราะ (Excyst)

E และ F แสดงตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เข้าเกราะ (Encyst)

ผสมน้ำไปนั้นจะได้อแอนติเจนที่เป็นของเหลว เป็นสารทั้งต้นและเจือจางเป็น 1 : 50 คายน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% ใช้ 0.05 มิลลิกรัม ของความเข้มข้น 1 : 50,000 ฉีดใต้ผิวหนังประมาณ 15 นาที คอมาจะเกิดรอยบวมแดง การรอบบวมแดงที่เกิดขึ้นใหญ่กว่ารอยที่ฉีดคายนํ้าเกลือเข้มข้น 0.85% แสดงว่าเป็นปฏิกิริยาผดผวก โดยทดสอบกับผู้ป่วยที่เป็นโรคตัวจืด 95 คน ปรากฏว่าให้ปฏิกิริยาผดผวกหมดทุกคน และทดสอบกับคนปกติ 108 คน ปรากฏว่าให้ปฏิกิริยาผดผวก 99 คน ประมาณ 2 ใน 3 ของกลุ่มที่ให้ปฏิกิริยาผดผวกจะให้ปฏิกิริยาผดผวกคอกแอนติเจนจากพยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus* spp.) และพยาธิใบไม้เลือด (*Schistosoma* spp.) คอยเหมือนกัน (Miyazaki, 1960) อย่างไรก็ตามมอริสตา และคนอื่น ๆ (Morisita and others, 1969) ได้ทดสอบเพื่อความแน่นอนโดยทดสอบที่ผิวหนังเช่นกัน แต่ใช้แอนติเจนจากพยาธิตัวจืดหมู (*G. doloresi*) ในบริเวณที่ไม่เคยมีการระบาดของโรคพยาธิตัวจืดเคย พบว่า 23 คน จาก 105 คนให้ปฏิกิริยาผดผวก การทดสอบที่ผิวหนังนี้เป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคจากพยาธิที่เยื่อผิวหนัง ปฏิกิริยาที่ผิวหนังนี้เป็นการตอบสนองต่อโปรตีนมากกว่าไขมัน หรือว่าอาจซึ่งสกัดจากหอคอกอาหารของพยาธิตัวจืด และพบว่าส่วนที่เป็นหอคอกอาหารของพยาธิตัวจืดนี้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนมากกว่าส่วนอื่นของพยาธิ (Ando, 1957 : 2432 - 2359)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยโรคนี้กับผู้ป่วยมากกว่า 500 ราย ที่เป็นโรคเยื่อหุ้มสมองหรือไขสันหลังอักเสบชนิดที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนสูงในน้ำไขสันหลัง ได้แบ่งกลุ่มอาการเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกคือ เมนิงโกเอนเซฟาไลติส (*Meningoencephalitis*) ซึ่งเกิดจาก (*Angiostrongylus* spp.) ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการปวดศีรษะรุนแรงมาก คอแข็ง เห็นขาในบางส่วนของร่างกาย ไข้ต่ำ คลื่นไส้ และอาเจียร นอกจากนี้

ยังอาจเกิดอัมพาตที่เส้นประสาทคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 (Punyagupta and others. 1986 : 801 ; Cross. 1975 : 109 - 131) ชนิดที่ 2

คือ ไมโอเอนเซฟาไลติส (Myeloencephalitis) เป็นโรคสมองอักเสบที่ผู้ป่วยมีอาการปวดรุนแรงตามลำตัวและแขนขาเป็นเวลา 2 - 3 วัน ตามมาด้วยอัมพาตของแขนขาและเป็นสาเหตุการตายได้ มากกว่าโรคชนิดที่ 1 เมื่อตรวจศพพบว่ามีพยาธิตัวจิ๋วในสมองผู้ป่วย (Punyagupta and others., 1968 : 801)

โดยทั่วไปการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๋วที่ปฏิบัติกันมาจนถึงปัจจุบันนี้ส่วนใหญ่ยังขึ้นอยู่กับพยาธิสภาพวมเคลื่อนที่ (Migratory swelling) ซึ่งไม่สามารถใช้วินิจฉัยโรคได้ในทุกกรณีเสมอไป จึงได้มีการนำเอาวิธีทดสอบทางอิมมูโนไคเอยีหลาย ๆ วิธีมาใช้ในการวินิจฉัยโรค เช่น การทดสอบที่ผิวหนัง และการทดสอบการตกตะกอน ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Precipitin test) (Yamaguchi. 1952 : 26 - 34 ; Egashira. 1953 : 108 - 129 ; Ando. 1957 : 2342 - 2359 ; Furuno. 1959 : 2802 - 2822)

แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่พอใจเนื่องจากไม่มีความไว และให้ผลการทดลองปฏิกิริยาผลบวกเพียงถึง 30% เนื่องจากมีปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross - reaction) กับการศึกษาเชื้อพยาธิชนิดอื่นจากการทดลองปฏิกิริยาตกตะกอนในวุ้น โดยใช้ซีรัมกระต่ายที่คัดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว พบว่ามีแถบตะกอน (Precipitin bands) ปรากฏให้เห็น 11 แถบ และทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับซีรัมกระต่ายที่คัดเชื้อพยาธิไส้เดือนชนิด Ascaris spp. ที่รับกระต่ายที่คัดเชื้อพยาธิไส้เดือนชนิด Toxocara spp. และกับซีรัมผู้ป่วยที่เป็นโรคอีโอสิโนฟิลสูงในกระแสเลือด (Tropical eosinophilia)

ปรากฏเห็นแถบตะกอน 2 แถบ (Punyagupta and Pacheco. 1961 : 515 - 520) จึงได้มีผู้นำเอาเทคนิควิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (Radio-immunoassay) มาใช้ ก็พบว่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อน

ระยะที่ 3 ของพยาธิวัฏจักรกับซีรัมแมวที่ติดเชื้อพยาธิวัฏจักรให้แอนติบอดีโคเคอร์
 สูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิได้เกินชนิด Toxocara cati
 ทำให้ดูเหมือนจะใช้วินิจฉัยโรคพยาธิวัฏจักรได้แต่ยังต้องพัฒนาความอีกต่อไป
 เนื่องจากยังพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับซีรัมแมวที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด

Opisthorchis sp. (Kasemsuth, Pannt - ampon and Sanghirun. 1981 :

410 - 412)

วิธีดำเนินการ

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการ

1. ปลาไหลจากตลาดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร
2. หนูถีบจักรเพศผู้โตเต็มวัย อายุประมาณ 2 - 3 เดือน จากศูนย์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. กรงสำหรับเลี้ยงหนูพร้อมที่ให้อาหารและชวน้ำ
4. กระชงใส ขนาด 8 x 10 เซนติเมตร 2.5 x 4.5 เซนติเมตร และ 12.8 x 9.5 เซนติเมตร
5. จานแก้วและฟุ้งเบอร์ 1
6. ขวดรูปชมพู่
7. หลอดทดลองขนาดต่าง ๆ
8. สแตนเลสซีฟ (Stainless sieve)
9. เครื่องปั่นเนื้อ
10. กล้องจุลทรรศน์และกล้อง Dissecting microscope
11. หลอดป้อนอาหารถึงกระเพาะ (Stomach tube)
12. วอเตอร์บัท (Water bath)
13. เครื่องบดที่ทำให้น้ำเนื้อเยื่อหลุดเป็นเซลล์ (Ground glass tissue grinder)
14. เครื่องโซนิเพรพ (Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator)
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Crating spectrophotometer)

16. เครื่องให้กำลังไฟฟ้า
17. อิเล็กโตรโฟเรติกแชมเบอร์ (Electrophoretic chamber)
18. ออโตไพเปตและไพเปตทิพ (Autopipette and Pipettetip)
19. โปรตีนเอ-เซฟารอส (Protein A Covalently coupled with Sepharose CL - 4B, SIGMA)
20. ไอโอคีน 125 (Amersham International Limited, Amersham, U.K.)
21. คลอรามิน-ที (Chloramine - T)
22. ฟิล์มเอกซเรย์ (Film x - ray, Fuji) น้ำยาสร้างภาพและ
น้ำยาหยุดภาพ (Developer and Fixer, Kodak)

วิธีดำเนินการและรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยได้ดำเนินการเป็นขั้น ๆ ดังนี้

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว

โดยเก็บจากตัปลาไหลน้ำจืดซึ่งเป็นผู้ให้อาศัยตัวที่ 2 ปลาไหลที่ซื้อมาจากตลาดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร การซื้อนั้นซื้อเฉพาะ เครื่องในของปลาไหล นำเครื่องในของปลาไหลใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งมายังห้องปฏิบัติการ การเก็บรวบรวมตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วโดยใช้น้ำย่อยเทียม (Artificial digestive juice) เป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก อองุ่นและบุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ (2523 : 37 - 39) ซึ่งมีวิธีทำได้ดังนี้

1.1 เตรียมน้ำยาสำหรับย่อยโดยใช้เปปซิน (Pepsin) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2 นำเครื่องในของปลาไหลมาเลือกเอาเฉพาะ ตับ (Liver) ตัดด้วยกรรไกรหรือมีคั่นละเอียด

1.3 ชั่งตับที่ตัดแล้ว 10 กรัม ผสมกับน้ำยอย 30 มิลลิลิตร ในขวดปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร

1.4 เอาขวดปชมพู่แช่ลงในวอเตอร์บาต ที่ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 6 ชั่วโมง

1.5 ใช้สแตนเลสฟักรองตะกอนจากขวดปชมพู่ใส่ในจานแก้ว ตรวจหาตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วด้วยกล้องโคเชกคิง ไมโครสโคป

1.6 ใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนขึ้นจากจานแก้ว ฉ่างให้สะอาดด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิค่าประมาณ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. การสกัดแอนติเจนจากเนื้อเยื่อของพยาธิตัวจิ๋ว

เป็นวิธีการของ อารยา ธรรมครองอาคม และสติกย์ สิริสิงห์ (1983 : 154 -- 162) มีวิธีการดังนี้

2.1 ฉ่างตัวพยาธิด้วยน้ำเกลือ 0.85% ประมาณ 3 ครั้ง

2.2 นำไปบดด้วยเครื่องบดที่ทำให้เนื้อเยื่อหลุดเป็นเซลล์

2.3 ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงจากเครื่องโซนิเฟรพ ทำประมาณ 15 ครั้ง โดยกินเครื่องครั้งละ 1 นาที พัก 1 นาที จนกระทั่งเซลล์แตกหมด สังเกตโคกด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 40 เท่า

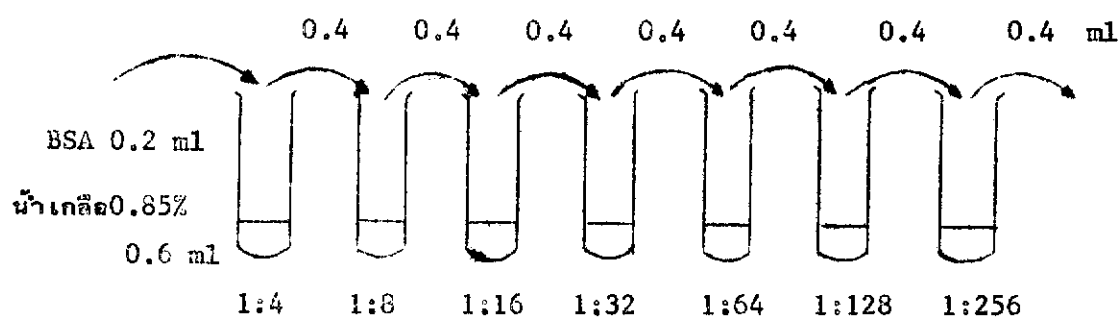
2.4 นำไปปั่น 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ด้วยเครื่องปั่นแบบความเร็วสูง

2.5 ดูดของเหลวใส่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

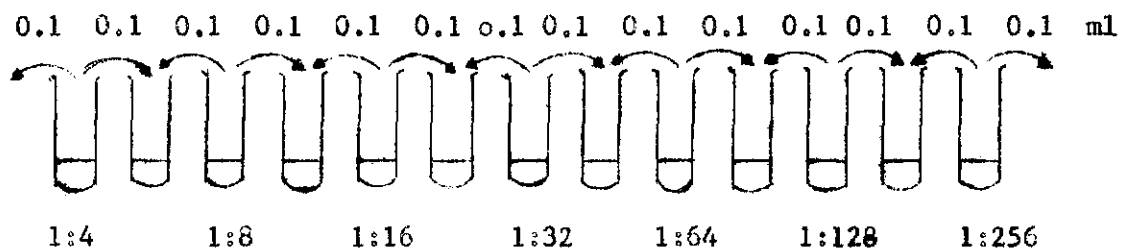
3. การหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อของพยาธิ
ตัวจิ๋ว

คัดแปลงมาจากวิธีของ ลอว์รี และคนอื่น ๆ (Lowry and
others. 1951 : 265 - 275) โดยใช้ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine
serum albumin : BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (Standard protein)
มีวิธีดังนี้

3.1 เจือจาง BSA ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร
แบบ ทู โฟลด์ ไดลูชัน (Two fold dilution) ให้มีความเจือจางตั้งแต่
1 : 4 จนถึง 1 : 256 ในหลอดแรกมีปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร จึงใส่ BSA
0.2 มิลลิลิตร ในน้ำเกลือ 0.85% 0.6 มิลลิลิตร หลอดต่อไปแต่ละหลอด
ใส่น้ำเกลือ 0.85% 0.4 มิลลิลิตร เมื่อผสมส่วนผสมในหลอดทดลองหลอด
แรกแล้วถ่าย 0.4 มิลลิลิตร จากหลอดแรกไปหลอดที่ 2 (1 : 8) ทำแบบนี้
จนถึงหลอดที่ 7 (1 : 256) แล้วหยุดทิ้งไป 0.4 มิลลิลิตร

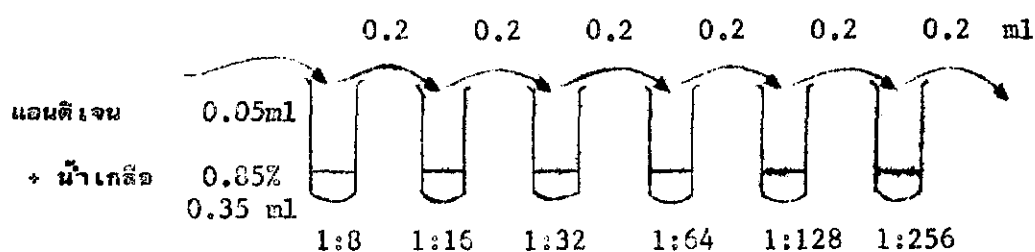


เพิ่มหลอดแทรกระหว่างแต่ละหลอด (ให้ความเข้มข้นของ
โปรตีนในแต่ละหลอดต่างกันไม่มากเพื่อให้หาได้ง่ายขึ้น)



เพราะฉะนั้นแต่ละหลอดจะมีปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

3.2 เจือจางแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อของพยาธิตัวจิ๋ว
ตัวแบบ หู ฟิลด์ ไกลด์ชัน โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตรเท่ากับ 0.2 มิลลิลิตร
และมีความเจือจางตั้งแต่ 1 : 8 จนถึง 1 : 256 เพราะฉะนั้นหลอดแรก
ของการให้มีความเจือจาง 1 : 8 จึงต้องใช้แอนติเจน 0.05 มิลลิลิตร
ผสมกับน้ำเกลือ 0.85% 0.35 มิลลิลิตร



3.3 เตรียมสารละลายที่จะใช้

3.3.1 Folin Reagent (SIGMA)

3.3.2 2% Na_2CO_3 ใน 0.1% N. NaOH

3.3.3 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 1% Sodium

หรือ Potassium tartrate

และเตรียม Working alkaline copper โดยผสม

สารละลายที่ 3.3.2 1 มิลลิลิตร กับสารละลายที่ 3.3.3 50 มิลลิลิตร

3.4 วิธีการมีขั้นตอนดังนี้

แอนคิเจน หรือ BSA 0.2 มิลลิกรัม

เติม Working alkaline Copper 1 มิลลิกรัม

ทิ้งไว้อดอุณหภูมิห้อง 10 นาที

เติม 1 N. Folin Reagent 0.1 มิลลิกรัม

ทิ้งไว้อดอุณหภูมิห้อง 30 นาที

นำไปอ่านค่าออปติคัลเดนซิตี (Optical density : O.D.)

จากเครื่องเกรตติ้ง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยให้นำเชื้อซึ่งผ่านการทำปฏิกิริยาเหมือนแอนคิเจนเป็น Blank

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าออปติคัลเดนซิตี และค่าความเข้มข้นของ BSA เป็นไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนในแอนคิเจนจากกราฟมาตรฐาน

4. การทำให้หนูถีบจักรติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว

เพื่อเตรียมแอนติซีรัม (Antiserum)

สัตว์ทดลองใช้หนูถีบจักร แบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ

10 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมให้อาหารตามปกติ

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ให้ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิ

ตัวจิ๋ว จำนวน 5 ตัวต่อหนูถีบจักร 1 ตัว โดยป้อนทางปากด้วยหลอดสำหรับป้อนถึงกระเพาะ เลี้ยงต่อไปโดยให้อาหารและน้ำตามปกติเป็นเวลา 4 เดือน

เจาะเลือดจากหลังตา (Retro-orbital opthalmic venous plexus)

ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 ภายหลังติดเชื้อ เพื่อนำซีรัมไปศึกษาต่อ

กลุ่มที่ 3 ทดลองทุกอย่างเหมือนกลุ่มที่ 2 ต่างกันเฉพาะจำนวนตัวในระยะที่ 3 ของพยาธิวัฏจักรที่ติดเชื้อ จำนวน 10 ตัว คอหนูดิบจักร 1 ตัว

กลุ่มที่ 4 ทดลองทุกอย่างเหมือนกับกลุ่มที่ 2 ต่างกันเฉพาะจำนวนตัวในระยะที่ 3 ของพยาธิวัฏจักรที่ติดเชื้อ จำนวน 15 ตัว คอหนูดิบจักร 1 ตัว

5. การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดี ต่อแอนติเจนของพยาธิวัฏจักร โดยการฉีด (Immunization)

ไซหนูดิบจักร 5 ตัว ฉีดแอนติเจน (จากข้อ 2) เข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal) วันแรกไซแอนติเจน 0.04 มิลลิกรัมในปริมาตร 0.2 มิลลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant ปริมาตรเท่ากับ คอหนูดิบจักร 1 ตัว อีก 7 วันต่อมาฉีดแอนติเจนซ้ำอีกโดยไซแอนติเจน 0.02 มิลลิกรัมในปริมาตร 0.2 มิลลิตร ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ประมาณ 3 สัปดาห์ คอมาเจาะเลือดเก็บซีรัมไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

6. การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในวุ้น

(Immunodiffusion test)

ดัดแปลงมาจากวิธี Ouchterlony double diffusion (Crowle. 1961 : p. 181) โดยคมูน 1 กรัม (Agar noble ของ Difco Laboratories) ในน้ำเกลือ 0.85% 100 มิลลิตร เติมนอร์ไธโอเลค 0.001% (Merthiolate) เพื่อกันเชื้อรา เทวุ้นเหลว 4 มิลลิตร บนกระจกใสขนาด 2.5 x 7.5 เซนติเมตร และทิ้งไว้ให้-

แข็งที่อุณหภูมิห้อง ใช้เครื่องเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร จะมีหลุมตรงกลาง 1 หลุม รอบ ๆ อีก 6 หลุม โดยมีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นเติมแอนติเจนและแอนติซีรั่มลงหลุมให้พอดี เก็บไว้ในกล่องเก็บความชื้น (Moist chamber) ที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นมีแถบตะกอนเกิดขึ้น ปล่อยให้แห้งทิ้งไว้ให้เกิดขึ้นที่ประมาณ 48 ชั่วโมง ขึ้นต่อไป แฉในน้ำเกลือ 0.85% 1 - 2 วัน และแช่ในน้ำกลั่นอีก 1 วัน ปิच्छัยควย - กระดาษกรองและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ย้อมแถบตะกอนด้วยสีอะมิโด ซวาทซ์ (Amido schwarz-10 B 0.6% ของ E. Merck AG) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ คือ แฉบนแถบบนแผ่นกระจกใสในสไลด์ย้อม 2 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีส่วนเกิน (Destaining solution)

7. การตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มโดยวิธีแบกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า และตกตะกอนในวุ้น (Immunoelectrophoresis test)

คัดแปลงมาจากวิธี กราบาร์ และ เบอร์ติน (Grabar and Burtin. 1960 : 25 - 29) มีวิธีการดังนี้

7.1 ตมวุ้น 0.15 กรัม ในเวโรนอล-ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ 15 มิลลิตร pH 8.6 เติมเมอร์ไซโอเลต 0.001%

7.2 เทลงบนกระจกขนาด 8 x 10 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

7.3 เจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร ห่างกัน 1 เซนติเมตร

7.4 เติมแอนติเจนลงหลุมให้เต็มพอดี นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอิเล็กโตรโฟรีซิสแชมเบอร์ ที่ต่อกับกระแสไฟฟ้าที่มีกำลังที่ของกระแส 2.5 มิลลิแอมป์ ต่อความกว้างของกระจก 1 เซนติเมตร หรือ 15 โวลต์ ต่อความยาวของกระจก 1 เซนติเมตร ในเวโรนอล-ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ pH 8.6 เป็นเวลา $2\frac{1}{2}$ ชั่วโมง

7.5 เจาะร่องยาว 6.4 เซนติเมตร คั่นระหว่างหลุม ใส่แอนติซีรั่ว
 ดึงให้เต็มร่องพอดี นำไปเก็บในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ 24 ชั่วโมง
 จะสังเกตเห็นแถบตะกอน ปล่อยให้เกิดเต็มที่ประมาณ 48 ชั่วโมง ขึ้นต่อไปแช่แผ่น
 ตะกอนในน้ำเกลือ 0.85% เป็นเวลา 1 - 2 วัน และขึ้นน้ำกลั่นอีก 1 วัน ปัดขับ
 ด้วยกระดาษกรองและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง บดผงแถบตะกอนด้วยสีอะมีโด ขาวทึบ

8. การตรวจหาชนิดและประมาณแอนติบอดี ในซีรัมโดยวิธีการเกาะกลุ่ม
 เม็ดเลือดแดงและ (Passive hemagglutination test)

เป็นวิธีการที่คล้ายคลึงมาจากอิราตาและแบรนดริส (Hirata and
 Brandriss. 1968:641 - 646) ซึ่งประกอบด้วย

8.1 การเตรียมเม็ดเลือดแดงและโดยให้ทำปฏิกิริยากับกลูตาไรล
 ไลต์

8.1.1 เม็ดเลือดแดงและซึ่งนำมาจากศูนย์สัตว์ทดลองคณะ
 วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สามารถเก็บไว้ในสารละลายอัลซีเวอร์ (Alsever's
 Solution) ที่ 4 °C ได้นานเป็นเดือน แต่สำหรับการเตรียมเม็ดเลือดแดงและ
 ให้ทำปฏิกิริยากับกลูตาไรลไลต์นั้น ต้องใช้เม็ดเลือดแดงและที่แช่อยู่ในสารละลาย
 อัลซีเวอร์ 2 - 5 วัน

8.1.2 ตางเซเม็ดเลือดแดงและด้วยน้ำเกลือ 0.85%
 3 ครั้ง (แต่ละครั้งนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที 4 °C เป็นเวลา 5
 นาที)

8.1.3 ทำให้เม็ดเลือดแดงและแขวนลอยอยู่ในฟอสเฟต-
 บัฟเฟอร์ซาลายิน (Phosphate buffer saline. : PBS) และจึงผสมกลูตา-
 ไรลไลต์ 2.5% ที่ละลายพร้อมกันเข้าไปด้วยตลอดเวลา ใช้กลูตาไรลไลต์ 5 ส่วน

8.1.4 นำไปแช่ยาที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS
 อีก 3 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้าย เก็บเม็ดเลือดแดงและให้ทำปฏิกิริยากับกลูตาไรล
 ไลต์ แล้วใน PBS 4 °C สามารถเก็บเซไว้ได้นานจนกว่าจะนำมาใช้

8.2 การกระตุ้นเม็ดเลือดแดงและให้ทำปฏิกิริยากับกลูตาไรลไลต์
 ด้วยแอนติเจนจากเขาวัวตัวเล็ก

8.2.1 เจือจางแอนติเจนด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ (Acetate buffer) pH4.0 ในอัตรา 19 ส่วน

8.2.2 ใส่เม็ดเลือดแดงแกะ (จากข้อ 8.1.4) 0.1 ส่วน นำไปปั่นในรอตอร์มากที่ 37 C เป็นเวลา 30 นาที

8.2.3 ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% 3 ครั้ง (แต่ละครั้งปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที 4 C เป็นเวลา 5 นาที) ครั้งที่สุดท้ายเซลล์เลือดแดงและจะแขวนลอยในส่วนผสมของ 0.5% BSA ใน PBS (PBS-BSA) ปริมาตร 10 มิลลิกรัม

8.3 การกักเก็บเอาเฉพาะโรไฟโอแอนติบอดี (Heterophile antibody) ออกจากซีรัม

ใส่เม็ดเลือดแดงแกะ 0.5% ใน PBS ปริมาตร 4 ส่วน แอนติบอดีซีรัม 1 ส่วน ในหลอดทดลอง เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และนำไปปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที 4 C 5 นาที น้ำของเหลวใสเก็บแช่แข็งที่ -20 C จนกว่าจะนำมาใช้ ของเหลวใสเป็นซีรัมที่เจือจาง 1 : 5

8.4 การหาไตเตอร์ของแอนติซีรัม

8.4.1 เจือจางซีรัมจากข้อ 8.3 แบบ 2 เท่า โฟลด์ 10 ขั้นตอน ด้วย PBS-BSA ในฉากไมโครไตเตอร์ แบบรูปตัว U (Microtiter "u" plate) หลุมละ 0.05 มิลลิกรัม

8.4.2 หยดเม็ดเลือดแดงแกะ (จากข้อ 8.2.3) ลงไป ปริมาตรเท่ากัน แล้วทิ้งไว้ 1 - 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

8.4.3 ในกรณีที่ต้องการดูความไวของอิมมูโนโกลบูลินต่อรีดิวซิงเอเจนต์ (Reducing agent) ให้ 0.1 โมลาร์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol : 2-ME) ใน PBS-BSA เป็นตัวเจือจางแอนติซีรัมแทน PBS-BSA ธรรมดา (ดังนั้นในแต่ละหลุมจะมี 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเข้มข้น 0.05 โมลาร์) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ก่อนหยดเม็ดเลือดแดงแกะ (จากข้อ 8.2.3) ลงไป

8.4.4 อานผลหลังจากทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

1 - 2 ชั่วโมง

9. การศึกษาองค์ประกอบของแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัม โดยวิธีเรดิโออิมมูโนพรีซิเพชัน และออโตเรดิโอกราฟี (Radioimmunoprecipitation and autoradiography)

เทคนิคนี้ใช้ศึกษาองค์ประกอบของแอนติเจนที่เป็นโปรตีน (Ivarie and Jones. 1979 : 24 - 35)

กระทำโดยติดฉลาก (Label) แอนติเจนด้วยสารกัมมันตรังสี และทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัม องค์ประกอบของแอนติเจนและแอนติบอดีในซีรัมที่ให้ความจำเพาะจะจับกันเรียกว่า เรดิโอแอนติบอดี คอมเพลกซ์ ซึ่งจะแยกออกจากแอนติเจนอิสระและโปรตีนชนิดอื่น ๆ ในซีรัมโดยใช้โปรตีน เอ ซึ่งผลิตจาก Staphylococcus aureus (Cowan I strain) ซึ่งส่วนใหญ่จะจับ IgG ของหนูถีบจักรที่ pH 8.1 (Ey, Prowes and Jenkin. 1978 : 429-436) สามารถแสดงให้เห็นแอนติเจนในอิมมูโน คอมเพลกซ์ ที่ถูกจับติดไปโดยโปรตีน เอ ได้ โดยวิธีการเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) และออโตเรดิโอกราฟี

การศึกษารังสีของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด (จากข้อ 2) แอนติซีรัมจากหนูถีบจักรที่สกัดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดจำนวนต่าง ๆ (จากข้อ 4) และแอนติซีรัมจากหนูถีบจักรที่ถูกอิมมูไนซ์ด้วยแอนติเจนของพยาธิตัวจิ๊ด (จากข้อ 5)

วิธีการเรดิโออิมมูโนพรีซิเพชัน มีดังนี้

9.1 การเตรียมโปรตีน เอ-เซฟาโรส

9.1.1 รั้งโปรตีน เอ-เซฟาโรส 0.0715 กรัม ผสมลงใน หรือ-ไคลโรคลอริคแอซิด บัฟเฟอร์ pH 8.1 0.5 มิลลิลิตร ผสมในหลอดขั้ว หรือ-ไคลโรคลอริคแอซิด บัฟเฟอร์ เข้มข้นประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง เก็บไว้ 4°C จนกว่าจะใช้

9.2 การศึกษาลากแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วด้วยสารกัมมันตภาพรังสีชนิด ไอโอดีน 125

เป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากของ กรีนวูด ฮันเตอร์ และ โกลเวอร์ (Greenwood, Hunter and Glover. 1963 : 114 - 123) ซึ่งทำให้ไอโอดีน 125 ติดอยู่บนโมเลกุลของแอนติเจน โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ คลอรามีน-ที (Chloramine-T) อัตราส่วนของปฏิกิริยาระหว่างไอโอดีนกับโปรตีน คือ 2 ไมโครกรัม ของไอโอดีน 125 ต่อ 1 ไมโครกรัมโปรตีน ต่อคลอรามีน-ที 0.2 ไมโครกรัม มีขั้นตอนการทำงานดังนี้

9.2.1 ก่อนที่จะศึกษาลากแอนติเจน เติมโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มีความเข้มข้น 20 เท่าลงไป 1/19 ส่วน เพื่อให้ pH ของปฏิกิริยาเหมาะสม

9.2.2 ใส่ ไอโอดีน 125 ลงในแอนติเจน เติมคลอรามีน-ที ให้ทำปฏิกิริยา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียม เมตาไบซัลไฟท์ (Sodium metabisulfite) ปริมาณมากเกินไปพอ แล้วจึงเติมโซเดียม ไอโอไดด์ (Sodium iodide) และ BSA ในการทดลองนี้ใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 0.04 ไมโครกรัม โซเดียมไอโอไดด์ 10 ไมโครกรัม และ BSA 1 ไมโครกรัม ต่อโปรตีน 1 ไมโครกรัม แอนติเจนที่ศึกษาลากแล้วนี้เก็บไว้ใช้ภายใน 2 สัปดาห์ ที่ 4 C

9.3 การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ สแลบ เจล (Slab gel)

9.3.1 เตรียมบล็อก (Block) สแลบขนาด 12.8 x 9.5 x 0.1 ซม. มาตัดเป็น 4 ชิ้น

9.3.2 เตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ 10% จำนวน 6.4 มิลลิกรัม (เรียกว่ารันนิ่ง เจล Running gel) ใส่ลงในบล็อก และ เติมฟอสเฟตลงไปเพื่อให้มีฟอสเฟตเป็นสารรับน้ำหนัก เป็นกลาง

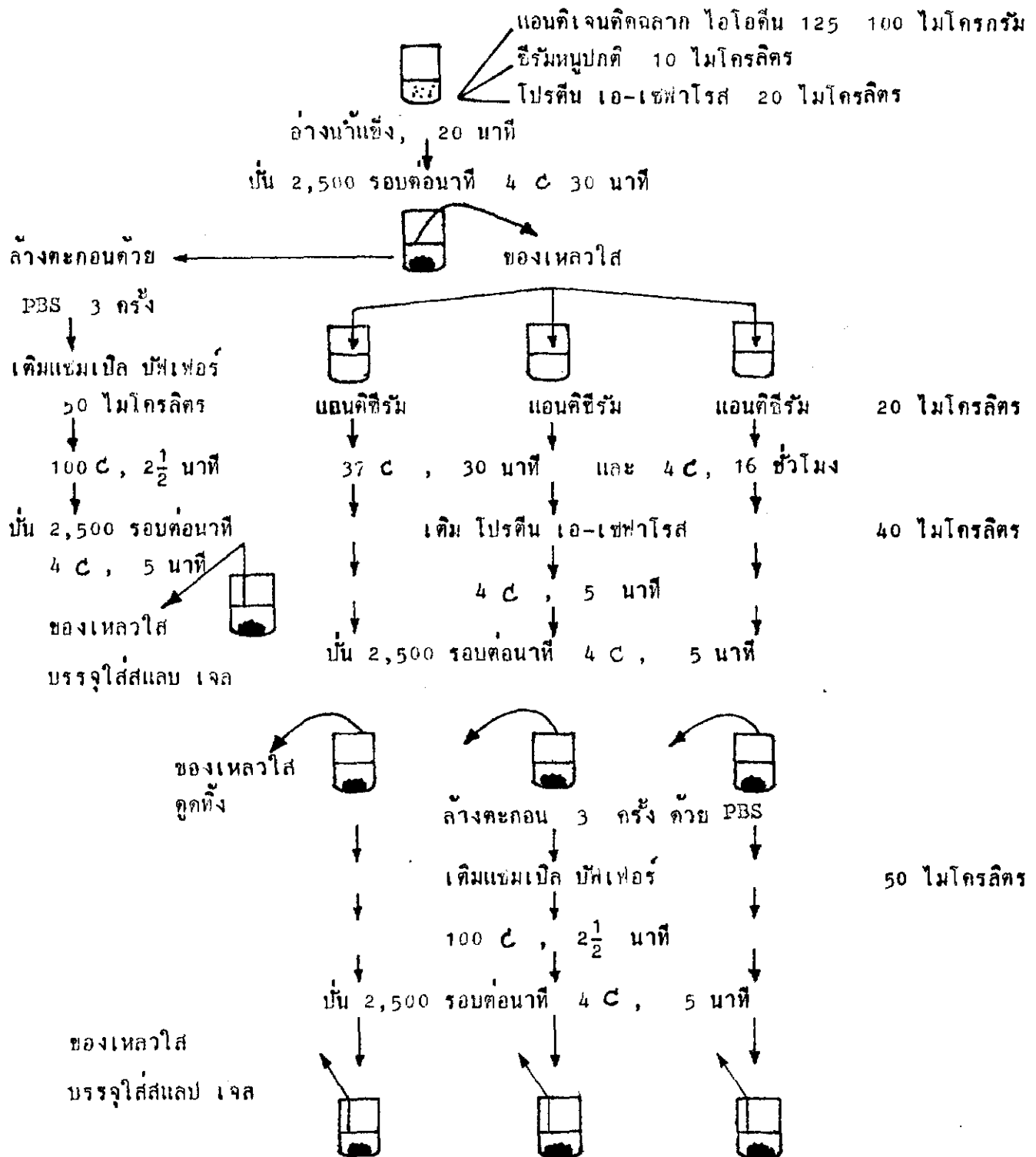
กันนึ่ง เจล จะแข็งตัวเป็นโพลีเมอร์ (Polymer) ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อได้รับแสงฟลูออเรสเซนซ์ทั้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง (สามารถเก็บคางคกไว้ ที่อุณหภูมิห้องหรือ 4 C)

9.3.3 แทนที่น้ำกลั่นที่อยู่เหนือกันนึ่ง เจล กวบ เอสจีเอส - โกลีอะคริลาไมค์ 4% pH 6.8 (เรียกว่า สแตกกิง เจล : **Stacking gel**) ใส่โคมบ์ (Comb : แผ่นพลาสติกคัทเป็นซี่ฟัน 8 ซี่ แต่ละซี่กว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร มีไว้เพื่อทำให้สแตกกิง เจล เป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอกลำไส้ของการทดสอบ (Specimen) ปล่อยให้สแตกกิง เจล แข็งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อได้รับแสงฟลูออเรสเซนส์ 1 ชั่วโมง นำมาใช้ทันที

9.4 การตกตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติเจนที่คิดค้นด้วยสารกัมมันตภาพรังสีกับแอนติบอดี (**Radioimmunoprecipitation**) (ภาพประกอบ 8)
การตกตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดีของพยาธิตัวจิ๋ว ซึ่งมีสารกัมมันตภาพรังสี คัดแปลงมาจากไอวารี และโจนส์ (**Ivarie and Jones. 1979 : 24 - 35**) มีวิธีดังนี้

9.4.1 นำแอนติเจนที่คิดค้นด้วยสารกัมมันตภาพรังสีจากข้อ 9.2 100 ไมโครกรัมโปรตีน เคมีทริส-ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 เท่า pH 8.1 5 ไมโครลิตร เพื่อให้ปฏิกิริยาเหมาะสม เคมีซีรัมของหนูถีบจักรปกติ (**Normal mice serum**) 10 ไมโครลิตร และโปรตีน เอ-เซฟาโรส 20 20 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาที นำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที 4 C 5 นาที

9.4.2 ลูกเอาของเหลวที่ใส่ออกแบ่งเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน แต่ละส่วนเติมแอนติซีรัมที่ต่างกัน นำไปแช่ในวอเตอร์บัค 37 C 30 นาที และ 4 C 1 คืน (16 ชั่วโมง)



ภาพประกอบ 8 ลำดับขั้นของการตกตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาของแอนติเจน
 ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีกับแอนติบอดี

9.4.3 เคมีโปรตีน เอ-เซฟาโรส 40 ไมโครลิตร ต่อ แอนติซีรัม 20 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที 5 นาที และล้างตะกอน 3 ครั้งด้วย PBS

9.4.4 อิมมูโน คอมเพลกซ์ จะถูกแยก (Eluted) จาก โปรตีน เอ-เซฟาโรส และแยกจากกันเองด้วย แซมเปิล บัฟเฟอร์ (Sample buffer : ทริส 0.625 โมลาร์, เอสดีเอส 1%, กลีเซอรอล 10%, ทู-เมอร์ แกลโคเอชานอล 5%) นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 100 °C เป็นเวลา $2\frac{1}{2}$ นาที และปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที 4 °C 5 นาที

9.4.5 กุญแจของ เหลวส่วนที่ได้ออกไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ สแลป เจล โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบข้างบน ผ่านบัฟเฟอร์ (อีเล็กโตรโฟรีซิส บัฟเฟอร์ pH 8.3) เข้าแผ่นสแลป เจล ลงสู่ อ่างบัฟเฟอร์ตอนล่างซึ่ง เป็นที่อยู่ของขั้วบวก ใช้กระแสตรง 4 มิลลิแอมป์ต่อสแลป เจล 1 แผ่น จากเครื่องให้กำลังไฟฟ้า นาน 5 ชั่วโมง

9.4.6 เมื่อสิ้นสุดการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ย้อมสีโปรตีน ในรันนิ่ง เจล ด้วยสีคัมมาสซี บริลเลียนท์ บลู (Coomassie brilliant blue) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกโดยคัสเทนนิ่ง โซลูชัน (โดยทั่วไปทิ้งไว้ 2 วัน)

9.5 ออโตเรกซ์โอกราฟี

วิธีการนี้เป็นวิธีที่ตรวจหาองค์ประกอบแอนติเจนที่ติดฉลาก ด้วยมันกลาสร้างสีในแผ่นรันนิ่ง เจล ซึ่งคัดแปลงมาจาก จารุมณี (Charumani, 1980) มีวิธีดังนี้

9.5.1 นำรันนิ่ง เจล (จากข้อ 9.4.6) ห่อหุ้มด้วยพลาสติก แล้วทำให้แห้งภายในสูญญากาศ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปใช้เวลา 3 ชั่วโมง

9.5.2 รันนิ่ง เจล ที่แห้งแล้วนำไปประกบฟิล์มเอกซ์เรย์
 เค็มไว้ระหว่างแผ่นอินเพนซีลียเออร์ สกรีน ที่อุณหภูมิ -70°C องศาเซลเซียส เป็น
 เวลา 3 – 7 วัน

9.5.3 ล้างฟิล์มในน้ำยาสร้างภาพและน้ำยาหยุดภาพ นำ
 ผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์

ผลการศึกษาค้นคว้า

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว เพื่อเตรียมแอนติเจน

จากตั๊กปลาไหล นำมาย่อยด้วยน้ำย่อย เติมน้ำเก็บรวบรวมไว้ในน้ำเกลือ 0.85% โคประมาณ 3,000 ตัว นำไปเตรียมแอนติเจน

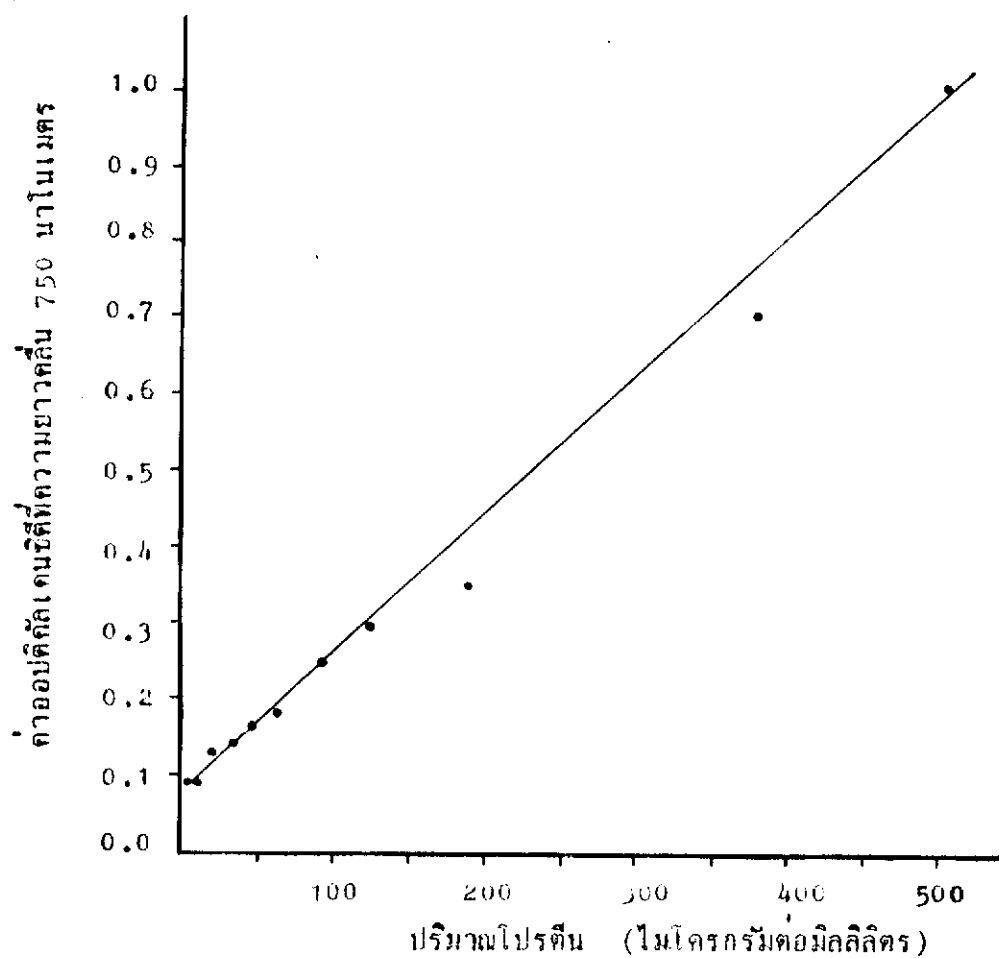
2. หาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว

เมื่อวัดค่า ออปติคัล เดนซิตี ของทั้ง BSA และแอนติเจน ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ Folin reagent แล้ว (ตาราง 1) นำค่าออปติคัล เดนซิตีที่ได้จาก BSA มาเขียนกราฟกับค่าปริมาณโปรตีนเป็นกราฟมาตรฐาน (ภาพประกอบ 9) สำหรับเปรียบเทียบค่าปริมาณของแอนติเจนดังแสดงในตาราง 1 ปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว ที่ความเข้มข้น 1:32 มีปริมาณโปรตีน 396 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 1:64 มีปริมาณโปรตีน 220 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 1:128 มีปริมาณโปรตีน 112 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 1:256 มีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นของแอนติเจนที่เตรียมมา มีเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วประมาณ 3,000 ตัว จะมีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีน 13.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในปริมาตร 5.2 มิลลิลิตร

ตาราง 1 แสดงผลการหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว

ความเข้มข้น	ค่าออกปฏิกิริยาที่ ที่ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร		ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)	
	โปรตีนมาตรฐาน	แอนติเจน	โปรตีนมาตรฐาน	แอนติเจน *
1 : 4	1.00		500.00	
	0.70		375.00	
1 : 8	0.45	2.00	250.00	
	0.35		187.50	
1 : 16	0.29	1.00	125.00	
	0.24		93.75	
1 : 32	0.18	0.80	62.50	386
	0.16		46.88	
1 : 64	0.14	0.47	31.25	220
	0.13		23.44	
1 : 128	0.14	0.27	15.63	112
	0.09		11.72	
1 : 256	0.09	0.17	7.81	50

* อ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างค่าออปติคัลเดนซิตีที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

3. ตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในเนื้อวุ้น

ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋ว 5, 10 และ 15 ตัว เจาะเก็บมา
ภายหลังการติดเชื้อในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาตกตะกอน
ในเนื้อวุ้น กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว โดย
ใช้ความเข้มข้นของแอนติเจน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเริ่มมีแถบตะกอนเกิด
ขึ้น 1 แถบ เมื่อใช้ซีรัมจากหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋วตั้งแต่ 6 สัปดาห์เป็นต้นไป
ไม่ว่าหนูถีบจักรนั้น จะติดเชื้อพยาธิ 5, 10 หรือ 15 ตัวก็ตาม (ตาราง 2 และ
ภาพประกอบ 10)

ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5 ตัว นาน 8
สัปดาห์ ยังก่อให้เกิดแถบตะกอน 1 แถบ ส่วนซีรัมของหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะ
ที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 10 ตัว และ 15 ตัว เป็นเวลานานเท่ากันให้แถบตะกอน
2 แถบ (ตาราง 2 และภาพประกอบ 11)

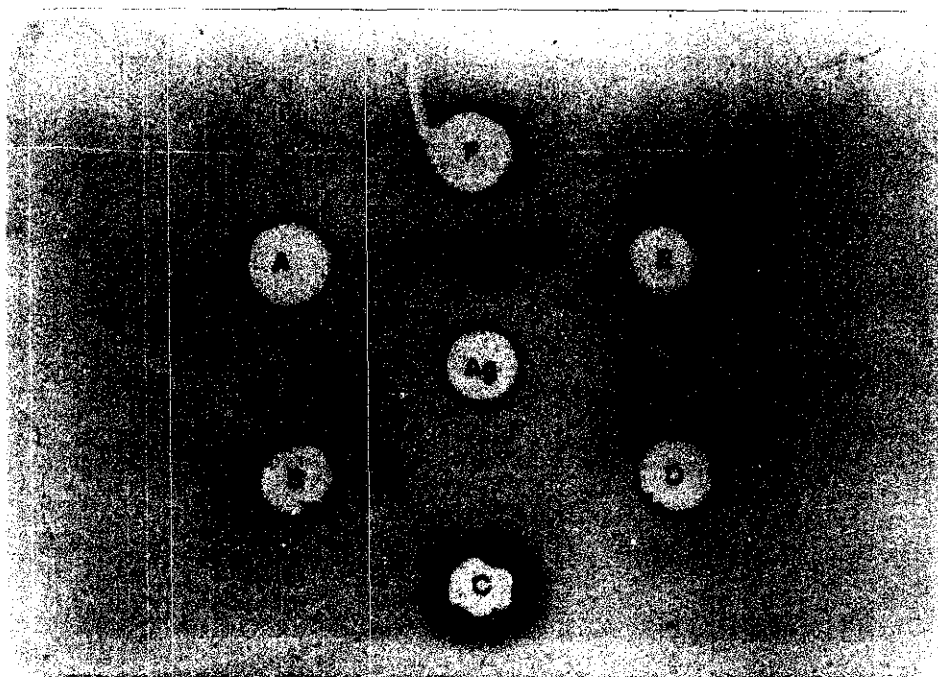
สำหรับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5 ตัว และ
15 ตัว นาน 12 สัปดาห์ ยังก่อให้เกิดแถบตะกอน 1 แถบ ส่วนซีรัมหนูถีบจักรที่ติด
เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 10 ตัว เป็นเวลานานเท่ากันให้แถบตะกอน
ที่เจือจางมาก (ตาราง 2 และภาพประกอบ 11)

ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5, 10 และ 15
ตัว นาน 16 สัปดาห์ เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาไม่สามารถตรวจพบแถบตะกอนในเนื้อวุ้น

ตาราง 2 แสดงจำนวนแถบตะกอนที่พบในปฏิริยาระหว่างแอนติเจนที่สกัด
จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดและซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีตก -
ตะกอนในวัน

ระยะเวลา ภายหลังการ ติดเชื้อ (สัปดาห์)	จำนวนตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดที่ให้ติดเชื้อในหนูถีบจักร		
	5 ตัว	10 ตัว	15 ตัว
1	-	-	-
2	-	-	-
4	-	-	-
6	1 *	1	1
8	1	2	2
12	1	1	1
16	-	-	-

* จำนวนแถบตะกอนที่สังเกตได้ 48 ชั่วโมงภายหลังทำปฏิริยา

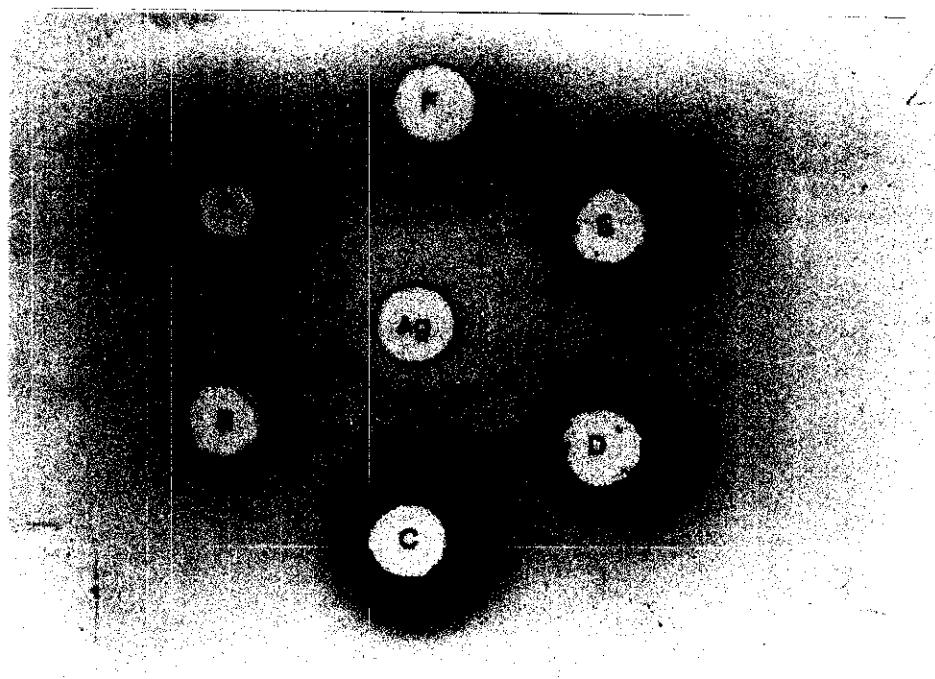


ภาพประกอบ 10 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิกิริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเชื้อตัวอ่อนระยะ
ที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด โดยวิธีตกตะกอนในเนื้อวุ้น

Ag แทน แอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดเข้มข้น

2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- | | | | |
|---|-----|---|---------------|
| A | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว | นาน 4 สัปดาห์ |
| B | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว | นาน 6 สัปดาห์ |
| C | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว | นาน 4 สัปดาห์ |
| D | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว | นาน 6 สัปดาห์ |
| E | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว | นาน 4 สัปดาห์ |
| F | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว | นาน 6 สัปดาห์ |



ภาพประกอบ 11 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิกิริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเชื้อตัวอ่อนระยะ
ที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด โดยวิธีตกตะกอนในเนื้อวุ้น

Ag แทน แอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดเข้มข้น

2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- | | | | |
|---|-----|---|----------------|
| A | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว | นาน 8 สัปดาห์ |
| B | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว | นาน 8 สัปดาห์ |
| C | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว | นาน 8 สัปดาห์ |
| D | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว | นาน 12 สัปดาห์ |
| E | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว | นาน 12 สัปดาห์ |
| F | แทน | ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว | นาน 12 สัปดาห์ |

4. การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระดาษไฟฟ้าและตกตะกอนในวุ้น

จากการทดลองหาแอนติบอดีในซีรัมของหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมีแอนติบอดีระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วโดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระดาษไฟฟ้าและตกตะกอนในวุ้น พบว่าซีรัมของหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมีแอนติบอดีระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5, 10 และ 15 ตัว เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เริ่มให้แถบตะกอน 1 แถบ โดยใช้แอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วมีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 3 และภาพประกอบ 12)

ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมีแอนติบอดีระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5, 10 และ 15 ตัว เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ทำปฏิกิริยาให้แถบตะกอนจำนวน 1, 2 และ 3 แถบ ตามลำดับ (ตาราง 3 และภาพประกอบ 13)

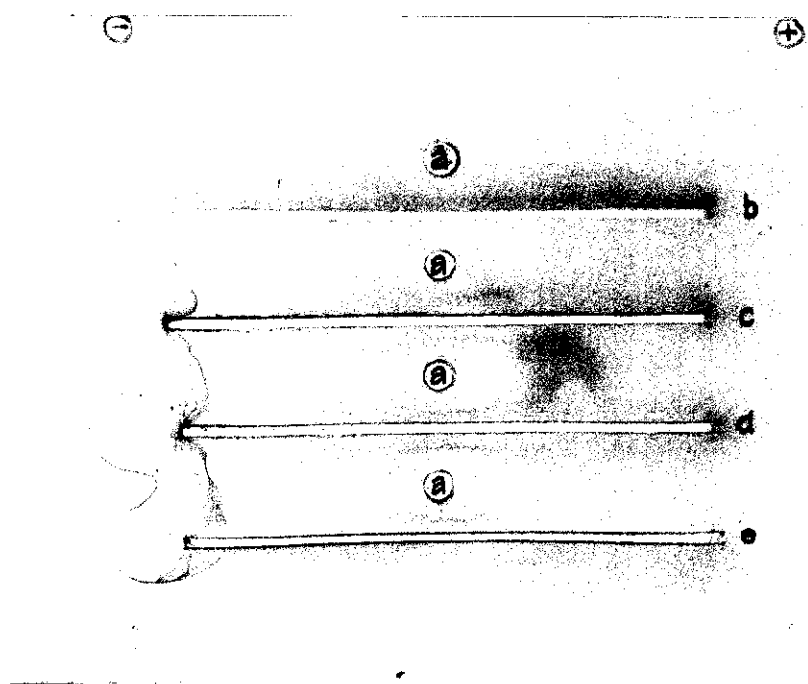
ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมีแอนติบอดีระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5, 10 และ 15 ตัว หลังจากฉีดเชื้อมานาน 12 สัปดาห์ ให้แถบตะกอน 1 แถบ (ตาราง 3 และภาพประกอบ 14)

เมื่อใช้ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมีแอนติบอดีระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5, 10 และ 15 ตัว เป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ ไม่พบแถบตะกอน

ตาราง 3 แสดงจำนวนแถบตะกอนที่พบในปฏิริยาระหว่างแอนติเจนที่สกัด
จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดและซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ โดยวิธีแยก
โปรตีนด้วยกระดาษไฟฟ้าและตกตะกอนในวัน

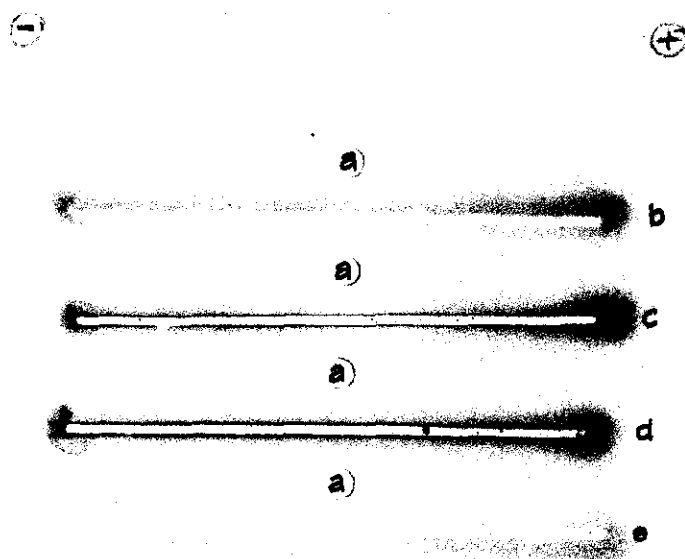
ระยะเวลา ภายหลังการ ติดเชื้อ (สัปดาห์)	จำนวนตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดที่ให้ติดเชื้อในหนูถีบจักร		
	5 ตัว	10 ตัว	15 ตัว
1	-	-	-
2	-	-	-
4	-	-	-
6	1 *	1	1
8	1	2	3
12	1	1	1
16	-	-	-

* จำนวนแถบตะกอนที่สังเกตได้ 48 ชั่วโมงภายหลังทำปฏิริยา



ภาพประกอบ 12 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิริยาระหว่างซีรัมหนูกับจักรที่ติดเชื้อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด นาน 6 สัปดาห์ กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อ-
เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด โดยวิธีแยกโปรตีน ด้วยกระแสไฟฟ้าและ
ตกตะกอนในวัน

- a แทน แอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดเข้มข้น
2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- b แทน ซีรัมหนูกับจักรปกติจากหนูส์ตัวทดลอง คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล
- c แทน ซีรัมหนูกับจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว
- d แทน ซีรัมหนูกับจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว
- e แทน ซีรัมหนูกับจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว



ภาพประกอบ 14 แสดงแถบตะกอนที่พบในปฏิกริยาระหว่างซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อ
ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด นาน 12 สัปดาห์ กับแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อ
เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด โดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าและ
ตกตะกอนในวัน

- a แทน แอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดเข้มข้น
2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร
- b แทน ซีรัมหนูถีบจักรปกติจากศูนย์สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- c แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว
- d แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว
- e แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว

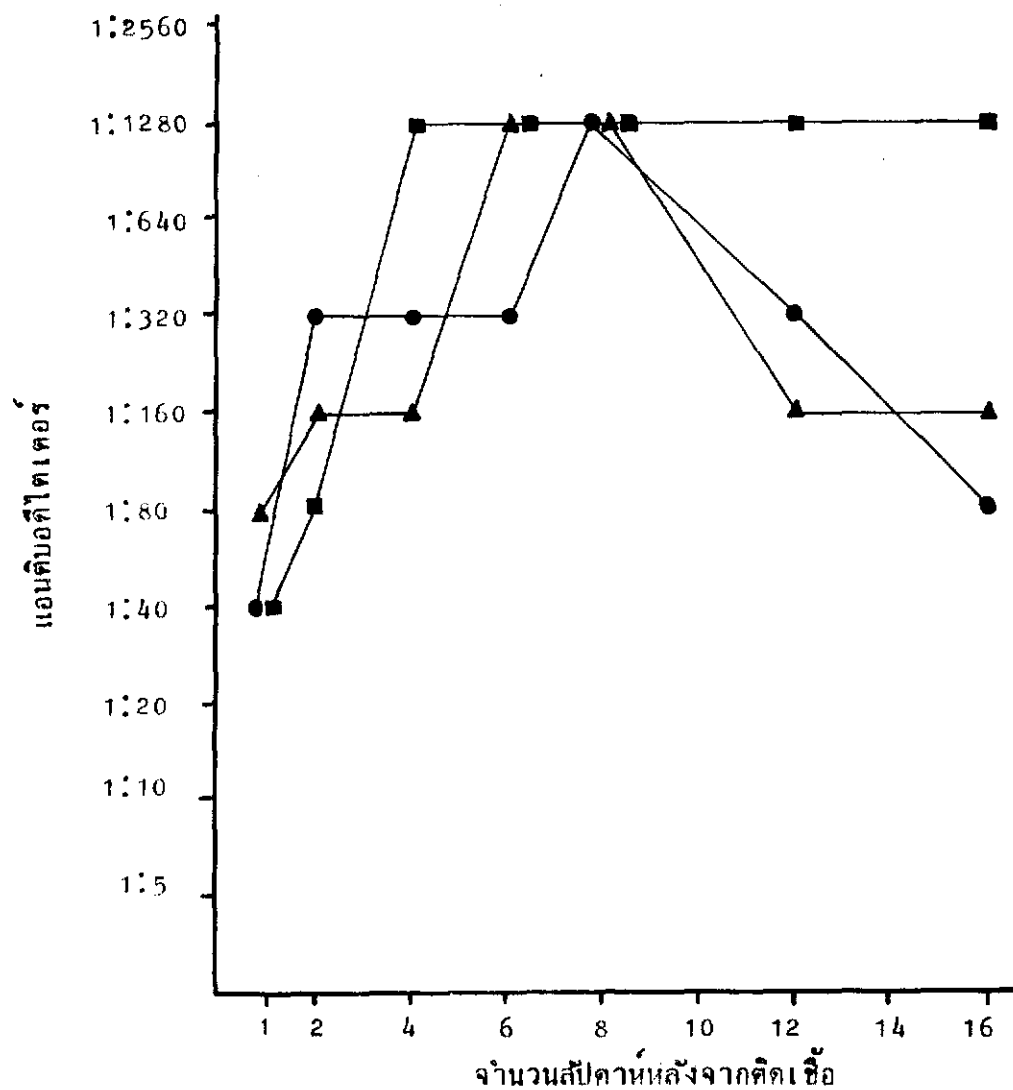
5. ตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีการ เกาะกลุ่ม เม็ด เลือดแดงแกะ

ก่อนที่จะลงมือตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรที่คิด เชื่อตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วนี้ โคทำการทดลองหาปริมาณความ เข้มข้นของ แอนติ เจนที่เหมาะสม สำหรับการตรวจสอบเสียก่อน โดยใช้แอนติ เจนที่มีความ เข้มข้น 520 และ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความ เข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 520 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร จึงใช้แอนติ เจนความ เข้มข้น เหนือนี้ตลอดการทดลอง

เมื่อทำการตรวจสอบซีรัมหนูถีบจักรที่คิด เชื่อตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วพบว่า มีแอนติบอดี เกิดขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกภายหลังการติดเชื้อ ไม่ว่าหนูถีบจักรนั้น จะได้รับพยาธิตัวจิ๋วไป 5, 10 หรือ 15 ตัวก็ตาม แต่เมื่อทำการตรวจสอบซีรัมหนูถีบจักรในระยะต่อมา พบว่าหนูกลุ่มที่คิด เชื่อตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5 ตัว มีแอนติบอดี เพิ่มขึ้นเร็วในสัปดาห์ที่ 2 มีไคเตอร์ 1 : 320 แล้วคงระดับนี้ อยู่จนถึงสัปดาห์ที่ 6 จึง เพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุด มีไคเตอร์ 1 : 1280 เมื่อหนูคิด-เชื่อนาน 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นแอนติบอดีไคเตอร์ลดลงตามลำดับจนเหลือ 1:80 เมื่อทำการตรวจสอบในสัปดาห์ที่ 16 ซึ่งเป็นระยะเวลาสุดท้ายของการทดลอง

(ภาพประกอบ 15)

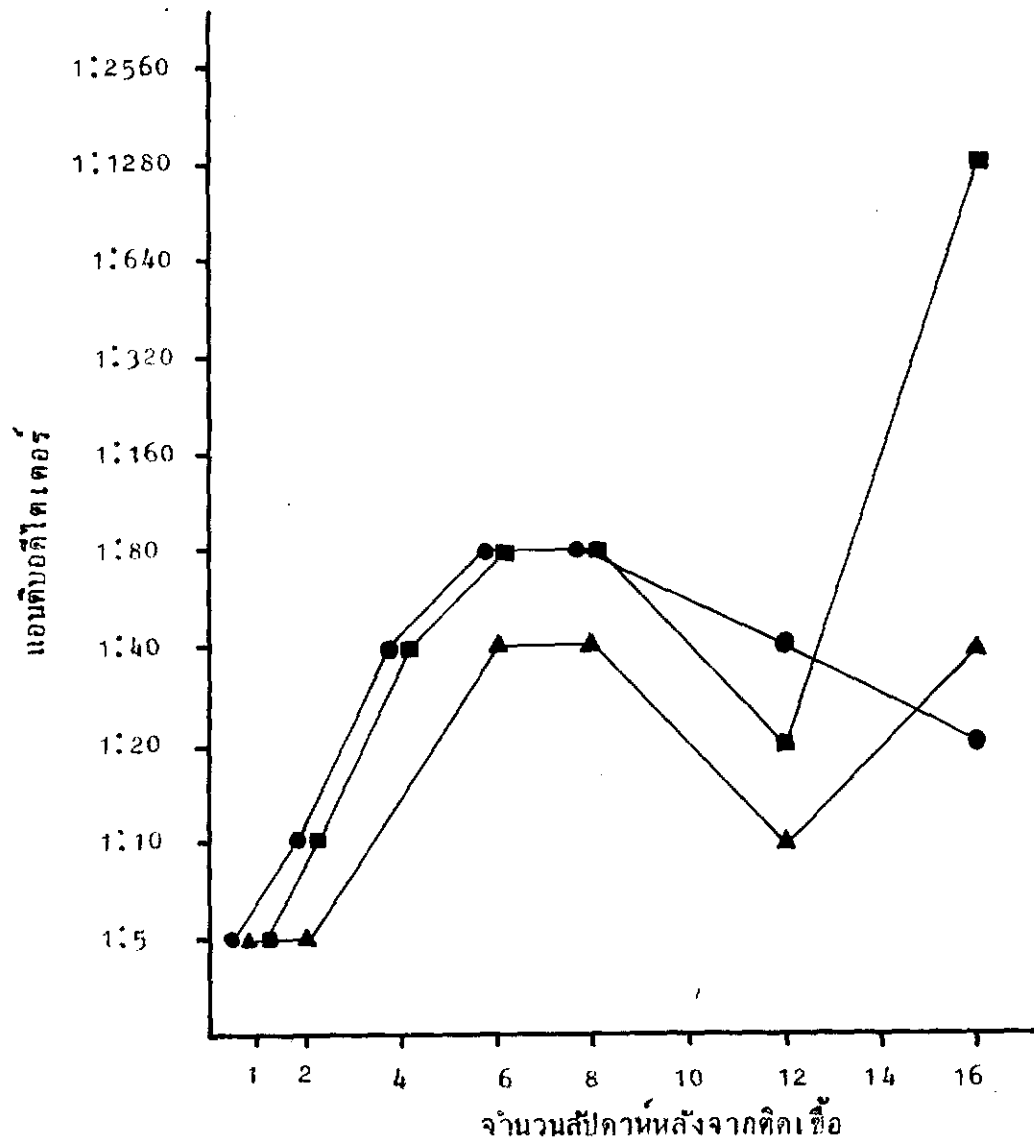
สำหรับแอนติบอดีไคเตอร์ที่ตรวจสอบได้ในซีรัมจากหนูที่คิด เชื่อพยาธิ 10 ตัว พบว่าเพิ่มขึ้นจาก 1 : 80 ในสัปดาห์แรกเป็น 1 : 160 ในสัปดาห์ที่ 2 แล้วเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุด 1 : 1280 ในสัปดาห์ที่ 6 เมื่อตรวจสอบต่อไปพบว่าแอนติบอดีไคเตอร์ลดลง เป็น 1 : 160 ในสัปดาห์ที่ 12 แล้วคงอยู่ที่ระดับนี้จนถึงสัปดาห์ที่ 16 การตรวจสอบแอนติบอดีไคเตอร์ในหนูกลุ่มสุดท้ายที่คิด เชื่อพยาธิ 15 ตัว พบว่าแอนติบอดีไคเตอร์เพิ่มขึ้นจาก 1 : 40 ในสัปดาห์แรกเป็น 1 : 80 ในสัปดาห์ที่ 2 แล้วเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุด 1 : 1280 เมื่อหนูคิด เชื่อได้เพียง 4 สัปดาห์แล้ว แอนติบอดีไคเตอร์ไม่ลดลงอีก เลยตลอดการทดลองจนถึงสัปดาห์ที่ 16 (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงผลการตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีใน
ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด โดยวิธีเกาะ-
กลุ่มเม็ดเลือดแดงแกะ

- แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว
- ▲—▲ แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว
- แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว

เมื่อทำการทดลองอีกชุดหนึ่งโดยการผสม ทุ-เมอร์แคปโตเอธานอล กับซีรัม ก่อนที่จะปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับ เม็ด เลือดแดง แกะที่ เคลือบผิวไว้ด้วยแอนติเจนจาก พยาธิ ตัวจิ๋ว พบว่าแอนติบอดีไทเทรตลดลงอย่างเห็นได้ชัดจนในซีรัมจากหนูทั้ง 3 กลุ่มที่ฉีดเชื้อพยาธิ 5, 10 และ 15 ตัว ในช่วงระยะเวลา 12 สัปดาห์ภายหลัง ฉีดเชื้อ เมื่อสังเกตเอาไทเทรตสูงสุดก่อนทำปฏิกิริยากับ ทุ-เมอร์แคปโตเอธานอล ในช่วงเวลา 6 ถึง 8 สัปดาห์ มีค่า 1 : 1280 (ภาพประกอบ 15) แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ ทุ-เมอร์แคปโตเอธานอลแล้ว มีไทเทรตลดลงเหลือเพียง 1 : 40 และ 1 : 80 ในช่วงระยะเวลาเดียวกัน (ภาพประกอบ 16) แสดงว่าแอนติบอดีไทเทรตในช่วงนี้ลดลงถึงประมาณ 20 เท่า เมื่อทำปฏิกิริยากับ ทุ-เมอร์แคปโตเอธานอล แต่สำหรับแอนติบอดีไทเทรตในช่วง 12 ถึง 16 สัปดาห์ ภายหลังการฉีดเชื้อลดลงไม่มากนัก เมื่อทำปฏิกิริยากับ ทุ-เมอร์แคปโตเอธานอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งซีรัมจากหนูที่ฉีดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 15 ตัว ไม่ได้อุณหภูมิ กระเทียมโดย ทุ-เมอร์แคปโตเอธานอล เลย เมื่อตรวจสอบในช่วงสัปดาห์ที่ 16 (เปรียบเทียบระหว่าง ภาพประกอบ 15 กับ ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงผลการตรวจหาชนิดและปริมาณแอนติบอดีใน

ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด โคยวิธีเกาะ

กลุ่มเม็ดเลือดแดงแกะภายหลังจากที่แอนติบอดีถูกรีทิวส์ด้วยบู-เมอร์

แคปโตเอธานอล

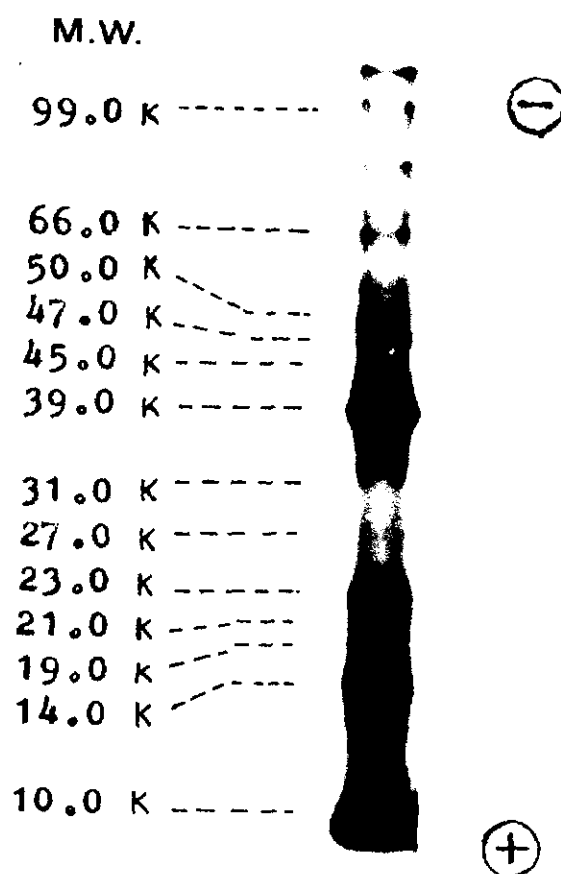
●—● แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 5 ตัว

▲—▲ แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 10 ตัว

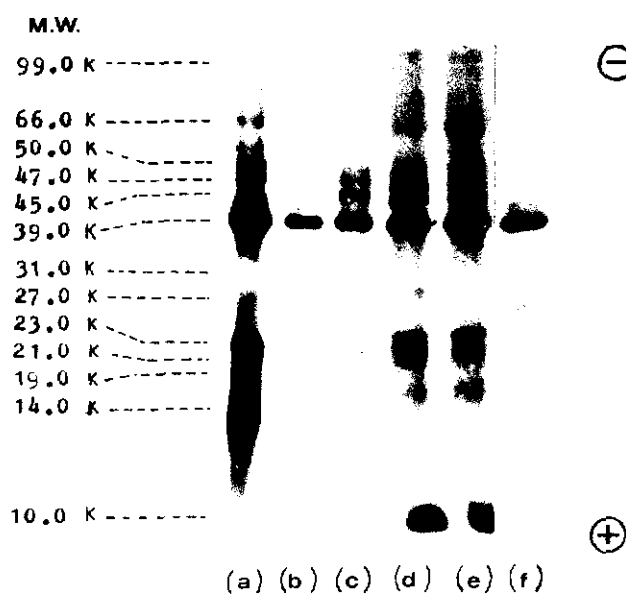
■—■ แทน ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด 15 ตัว

6. ศึกษาองค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมจากหนูถีบจักรที่ติด เชื้อ
ก่ออณูระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วโดยวิธีเรกิโออิมมูโนแฟรซิปิเทชันและออโตเรกิโอ
กราฟี

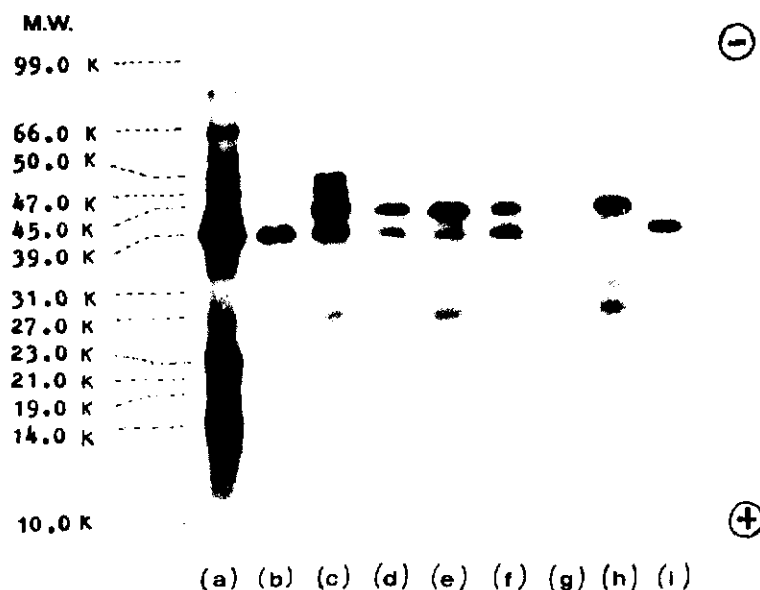
แอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอณูระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว เมื่อสกัด
จากโฮโอทีน 125 นำไปแยกองค์ประกอบโปรตีนโดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะครี-
ลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส และออโตเรกิโอกราฟี ได้ 20 แถบ ที่มีน้ำหนักโม-
เลกุลตั้งแต่ 99 ถึง 10 กิโลดาลตัน (K) แถบที่เข้มจัดมากและแถบที่ลึกละเอียดมีน้ำหนัก
โมเลกุล 39 กิโลดาลตัน และมีอีก 3 แถบที่เข้มรองลงมา มีน้ำหนักโมเลกุล 23
14 และ 10 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 17) เมื่อทำปฏิกิริยาคอกเคกอนกับซีรัมหนู
ถีบจักรทั้งที่ได้จากการทำให้หนูติด เชื้อก่ออณูระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว 5 ตัว เป็น
เวลา 6 สัปดาห์ และอิมมูโนซาวเยแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอณูระยะที่ 3
ของพยาธิตัวจิ๋วแล้วนำมาเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับซีรัมหนูถีบจักรปกติ (เป็น
ซีรัมที่ได้มาจากต่างประเทศซึ่ง เจาะจากหนูถีบจักรที่ปราศจากหนองพยาธิอย่างแท้
จริง) พบว่า องค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติซีรัมคือ 66 50
47 45 31 27 23 19 และ 14 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 18 และ
ภาพประกอบ 21) แต่เมื่อนำแอนติเจนมาทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรปกติจากศูนย์
สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีหนองพยาธิตัวกลมในลำไส้
ชนิด Aspicularis tetraptera และ Syphacia obvelata ปรากฏ
ว่ามีอยู่ 4 องค์ประกอบ แอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรพวกนี้ คือ องค์ประ-
กอบ 45 31 27 และ 23 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 19) และเมื่อนำ
แอนติเจนมาทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อพยาธิใบไม้เลือดชนิด Schistosome
haematobium, S. mansoni, S. japonicum (Chinese strain), S. japonicum
(Philippine strain) และ S. mekongi ปรากฏว่า
มีอยู่ 9 องค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรพวกนี้คือ 50 47
45 31 27 23 21 19 และ 14 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 19) เห็น
ได้ชัดว่าองค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 และ 47 กิโลดาลตัน มี
ความเหมือนกันกว่าความเข้มของแถบเดียวกัน เมื่อทำปฏิกิริยากับ



ภาพประกอบ 17 แสดงแอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจี๊ด เมื่อตัดฉลากไอโอดีน 125 นำไปแยกองค์ประกอบโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสและออโตเรคโตกราฟี



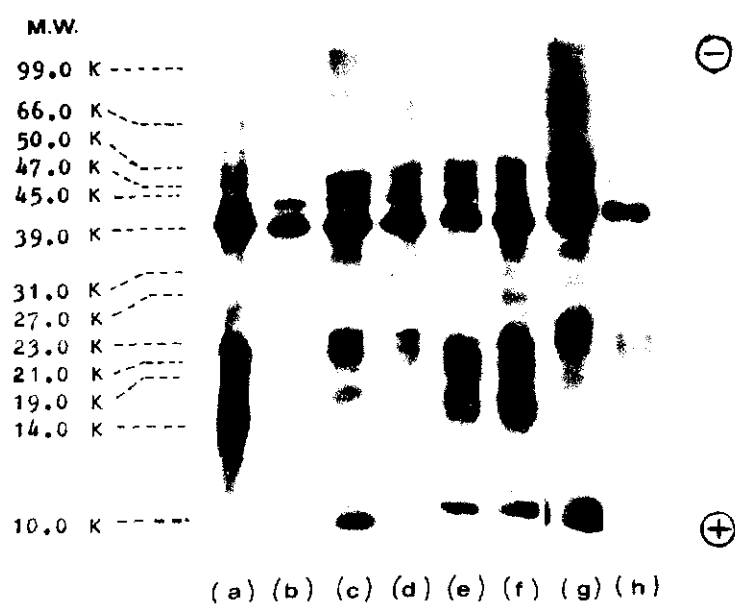
ภาพประกอบ 18 แสดงองค์ประกอบแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด (a), ทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรปกติจากต่างประเทศที่ปราศจากหนองพยาธิอย่างแท้จริง (b), ซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกอิมมูไนซ์ด้วยแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด (c), ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด 5 ตัว นาน 6 สัปดาห์ (d), ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด 5 ตัว นาน 8 สัปดาห์ (e), และโปรตีน เอ-เซฟาโรส (f)



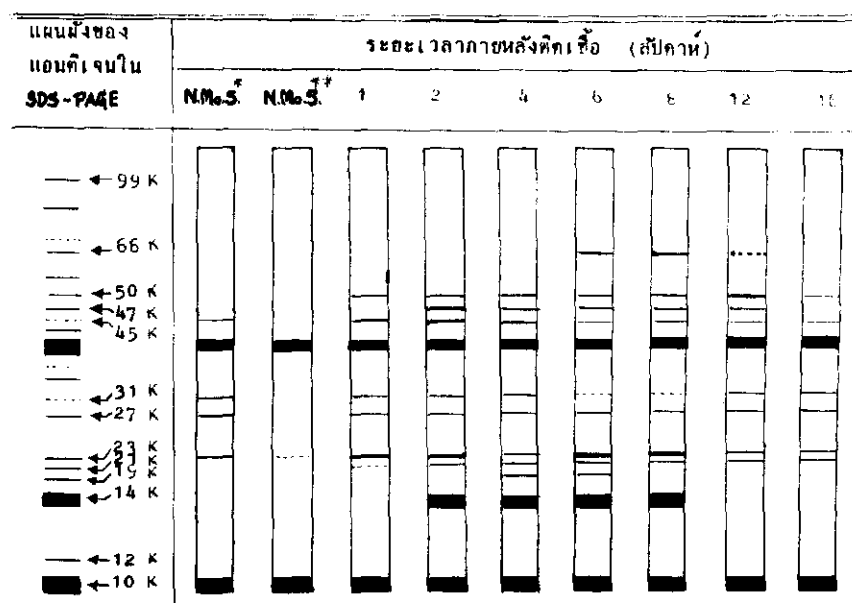
ภาพประกอบ 19 แสดงองค์ประกอบแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ พยาธิตัวจิ๊ด (a), ทว่าปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรปกติจากต่างประเทศที่ปราศ- จากหนอนพยาธิอย่างแท้จริง (b), กับซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกอิมมูไนซ์ด้วยแอนติเจน ที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ด (c), กับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อ พยาธิตัวกลมในลำไส้ชนิด Aspicularis tetraptera และ Syphacia obvelata จากศูนย์สัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (d), กับซีรัมหนูถีบจักร ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดชนิด Schistosoma haematobium (e), S. mansoni (f), S. japonicum (Chinese strain)(g), S. japonicum (Philippine strain) (h) และ S. mekongi (i)

ซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืดและอิมมูโนเซรุ่มแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าองค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 50 และ 47 กิโลดาลตัน เท่านั้นที่เข้าปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืดและอิมมูโนเซรุ่มแอนติเจนที่สกัดจาก เนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด

เมื่อทำการศึกษาไดเนคิก (Kinetic) ของการสร้างแอนติบอดีของคูประกอบต่าง ๆ ในหนูถีบจักรที่ติด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด สามารถตรวจพบแอนติบอดีของคูประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 45 31 27 23 และ 21 กิโลดาลตัน ใจก่อน ถึงแค่ 1 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ แอนติบอดีของคูประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 47 และ 14 กิโลดาลตัน ตรวจพบในสัปดาห์ที่ 2 และตรวจพบแอนติบอดีของคูประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 19 กิโลดาลตัน ในสัปดาห์ที่ 4 หลังการติดเชื้อ สำหรับแอนติบอดีของคูประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตันนั้น ตรวจพบเฉพาะในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 หลังการติดเชื้อเท่านั้น จากนั้นตรวจพบแถบจางลงในสัปดาห์ที่ 12 แล้วหายไป ในสัปดาห์ที่ 16 ในสัปดาห์ที่ 8 นี้ยังพบว่าแอนติบอดีของคูประกอบ 19 กิโลดาลตัน เริ่มหายไป และในสัปดาห์ที่ 16 ก็ตรวจไม่พบแอนติบอดีของคูประกอบ 14 กิโลดาลตันอีกด้วย (ภาพประกอบ 20 และภาพประกอบ 21)



ภาพประกอบ 20 แสดงองค์ประกอบแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด (a), ทำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด 5 ตัว นาน 1 สัปดาห์ (b), 2 สัปดาห์ (c), 4 สัปดาห์ (d), 6 สัปดาห์ (e), 8 สัปดาห์ (f), 12 สัปดาห์ (g) และ 16 สัปดาห์ (h)



ภาพประกอบ 21 สรุปผลการศึกษาโคเนติกของการสร้างแอนติบอดีแสดงองค์ประกอบแอนติเจนจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วที่ทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิชนิดเดียวกันเป็นเวลาต่างกัน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนพรีซิเพชันและออโตเรดิโอกราฟี

NMo.S.⁺ แทน ปฏิกิริยาตกตะกอนกับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวกลมในลำไส้ชนิด *Aspicularis tetraoptera* และ *Syphacia obvelata*

NMo.S.⁺* แทน ปฏิกิริยาตกตะกอนกับซีรัมหนูถีบจักรปกติจากต่างประเทศซึ่งปราศจากหนอนพยาธิ อย่างแท้จริง

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันเหลว (Humoral immune response) ในหนูถีบจักร (mice) ที่ติดเชื้อพยาธิตัวจืดจำนวนต่างกันและระยะเวลาที่ต่างกัน โดยจะศึกษาในคุณภาพและปริมาณของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มทั้งที่ได้จากการทำให้หนูถีบจักรติดเชื้อ (Infection) และอิมมูไนซ์ (Immunization) ซึ่งจะเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาวินิจฉัยโรค (Immunodiagnosis) ของพยาธิตัวจืดต่อไปในอนาคต

ขอบเขตในการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด ซึ่งได้จากปลาไหลน้ำจืดจากตลาดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร
2. สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนูถีบจักร เพศผู้โตเต็มวัย อายุประมาณ 2 - 3 เดือน จากศูนย์สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. ศึกษาถึงปริมาณและคุณภาพของภูมิคุ้มกันทางระบบภูมิคุ้มกันเหลวที่หนูถีบจักรมีต่อพยาธิตัวจืด
4. การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิก
2. สกัดแอนติเจนจากเนื้อเยื่อตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิก
3. หาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิก
4. เตรียมแอนติซีรัมจากหนูถีบจักรที่ถูกทำให้ติดเชื้อตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิก
5. กระตุ้นให้หนูถีบจักรสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิตัวจิกโดยการฉีดในช่องอกแอนติเจนจากเนื้อเยื่อของตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิก
6. ตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในวุ้น
7. ตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระดาษไฟฟ้าและตกตะกอนในวุ้น
8. ตรวจสอบชนิดและปริมาณแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงแกะ
9. ศึกษาองค์ประกอบแอนติเจนที่หาปฏิกิริยากับแอนติซีรัมจากหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิกโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแฟรซิปิเทชัน และออโตเรดิโอกราฟี

สรุปผลการศึกษาค้นคว้า

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิกจากการย่อยตับปลาไหลน้ำจืดด้วยน้ำย่อยเพิ่มโคประมาณ 3,000 ตัว นำไปสกัดเป็นแอนติเจนของพยาธิตัวจิกได้ความเข้มข้นของโปรตีน 13.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 5.2 มิลลิลิตร
2. การตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในวุ้น สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมได้ หลังจากที่ถูกฉีดวัคซีนติดเชื้อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ถึง 12 สัปดาห์

ไม่ว่าหนูถีบจักรจะติดเชือกตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด 5 10 หรือ 15 ตัวก็ตาม แต่ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัม เมื่อหนูถีบจักรติดเชือกเป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ โดยใช้เวลาเข้มข้นของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีแยกโปรตีนด้วยกระดาษไฟฟ้าและตกตะกอนในวุ้น สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมได้หลังจากที่หนูถีบจักรติดเชือกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เหมือนกับการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีตกตะกอนในวุ้น โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซีรัมจากหนูถีบจักรที่ติดเชือกตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืดจำนวน 10 และ 15 ตัว เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำปฏิกิริยาให้แถบตะกอนเพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 13) แต่เมื่อใช้ซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชือกเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ปรากฏว่าไม่พบแถบตะกอน

4. การตรวจหาชนิดและปริมาณของแอนติบอดีในซีรัมโดยวิธีการเกาะกลุ่มเมือกเลือดแห้งแคะ สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังการติดเชือกโดยใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนที่สกัดจากตัวอ่นระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจืด ที่มีความเข้มข้น 520 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แอนติบอดีที่ตรวจพบในสัปดาห์แรกภายหลังการติดเชือกมีไโคเตอร์ระหว่าง 1 : 40 และ 1 : 80 แล้วเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับสูงสุดมีไโคเตอร์ 1 : 1280 ไม่ว่าหนูถีบจักรนั้นจะติดเชือกหนอนพยาธิตัวจืดจำนวน 5 10 หรือ 15 ตัว หนูถีบจักรที่ติดเชือกพยาธิตัวจืดจำนวน 15 ตัว มีแอนติบอดีไโคเตอร์ขึ้นถึงระดับสูงสุดเร็วกว่าหนูกลุ่มที่ติดเชือกพยาธิตัวจืดจำนวน 5 ตัว และ 10 ตัว กล่าวคือ ใช้เวลาเพียง 4 สัปดาห์ สำหรับหนูถีบจักรที่ติดเชือกพยาธิตัวจืดจำนวน 10 ตัว ใช้เวลา 6 สัปดาห์ และหนูถีบจักรกลุ่มที่ติดเชือกพยาธิตัวจืด 5 ตัว ใช้เวลา 8 สัปดาห์ จึงจะมี

แอนติบอดีไคเตอร์สูงสุด แอนติบอดีไคเตอร์ในซีรัมที่ได้จากหนูถีบจักรกลุ่มที่ติด เชื้อ พยาธิ 15 ตัว ไม่ไคดลงจากระดับสูงสุดที่ 1 : 1280 ตลอดจนการทดลอง แอนติบอดีไคเตอร์ในซีรัมจากหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋ว 5 และ 10 ตัว มีค่าลดลงภายหลังสัปดาห์ที่ 8 เป็นต้นไป

แอนติบอดีที่ได้จากหนูถีบจักรทั้ง 3 กลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋ว จำนวนทาง กัน มีความไวของปฏิกิริยารีดักชัน (**Reduction**) ของ ทู-เมอร์แคปโทเอธานอล มากเมื่อทำการตรวจสอบในช่วง 1 - 8 สัปดาห์ภายหลังติดเชื้อ แสดงว่าแอนติ บอดีในซีรัมหนูถีบจักรภายหลังติดเชื้อ 8 สัปดาห์แรกเป็นชนิด **IgM** เป็นส่วนใหญ่ แล้วจึงมี **IgG** เพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 12 จนกลายเป็น **IgG** เกือบทั้ง หมกในสัปดาห์ที่ 16 แต่ถาพิจารณา เฉพาะซีรัมจากหนูถีบจักรกลุ่มที่ติด เชื้อพยาธิตัว จิ๋วจำนวน 15 ตัว เป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ พบว่าแอนติบอดีไม่มีความไวของปฏิกิริยารีดักชันของ ทู-เมอร์แคปโทเอธานอลเลย แสดงว่าเป็น **IgG** ทั้งหมดแล้ว

5. การศึกษาองค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมจากหนูถีบ จักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว โดยวิธีเรดิโออิมมูโนพรีซิพิตชันและ ออโตเรดิโอกราฟี ได้แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนที่สกัดได้จากตัวอ่อนระยะที่ 3 ของ พยาธิตัวจิ๋วเมื่อสกัดจากโฮสต์ 125 นาไปแยกองค์ประกอบโดยวิธี เอสดีเอส - โพลีอะคริลามิค เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส และออโตเรดิโอกราฟีได้ 20 แบบ ที่มี น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 99 ถึง 10 กิโลดาลตัน ให้ทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับซีรัมหนู ถีบจักรทั้งที่ได้จากการทำให้หนูถีบจักรติดเชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วจำนวน 5 ตัว เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์และอิมมูไนซ์ เมื่อเทียบปฏิกิริยากับหนูถีบจักรปกติและ หนูถีบจักรที่ติด เชื้อหนอนพยาธิตัวกลมในลำไส้ชนิด **Aspicularis tetraptera** และ **Syphacia obvelata** พบว่าองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 50 และ 47 กิโลดาลตัน ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับซีรัมหนูถีบจักรทั้งที่ได้ให้ติด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วและอิมมูไนซ์ แต่เมื่อให้แอนติ เจนนี้นำปฏิกิริยากับซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อ

พยาธิใบไม้เลือดชนิด Schistosoma haematobium, S. mansoni, S. japonicum

(Chinese strain), S. japonicum (Philippine strain)

และ S. mekongi พบว่ามีบางองค์ประกอบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแอนติซีรัมหนูถีบจักร เหล่านี้ ได้แก่ 50 47 45 31 27 23 19 และ 14 กิโลคาลตัน แต่ปฏิกิริยาข้ามกลุ่มที่เกิดขึ้นกับองค์ประกอบแอนติเจน 50 และ 47 กิโลคาลตัน ไม่รุนแรง เท่ากับปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อพยาธิตัวจิ๋ว

เมื่อศึกษาโคเน็คของการสร้างแอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ในหนูถีบจักรที่ติด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วจำนวน 5 ตัว สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 45 31 27 และ 21 กิโลคาลตัน ได้ก่อนตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังการติด เชื้อ และพบแอนติบอดีต่อองค์ประกอบอื่น ๆ เพิ่มมากขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งเป็นช่วงที่มีแอนติบอดีต่อองค์ประกอบแอนติเจนต่าง ๆ มากที่สุด ได้แก่ 66 50 47 45 31 27 23 21 19 และ 14 กิโลคาลตัน เริ่มหายไปตามลำดับ ภายหลังการติด เชื้อนานตั้งแต่ 8 สัปดาห์เป็นต้นไป

อภิปรายผล

การศึกษารังนี้ ได้ใช้ เทคนิคที่มีความไวต่างกันหลายชนิดในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรทั้งที่ติด เชื้อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋วและอิมมูโนเซรัมาให้ทราบว่าเมื่อทำการศึกษาโดยใช้ เทคนิคที่มีความไวต่ำ ได้แก่ การตกตะกอนในเนื่อวุ้น และการแยกโปรตีนด้วยกระดาษไฟฟ้าแล้วตกตะกอนใน เนื่อวุ้น สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อตัวอ่อนพยาธิตัวจิ๋วได้ตั้งแต่ 6 สัปดาห์ ภายหลังการติด เชื้อ เป็นต้นไป แต่เมื่อใช้ เทคนิคที่มีความไวสูงขึ้นไปอีก เช่น การเกาะกลุ่ม เม็ดเลือดแดง กระ และวิธี เรดิโออิมมูโนพรีซิปี เทชันรวมกับออต เรดิโอกราฟี สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อพยาธิตัวจิ๋วได้ ตั้งแต่สัปดาห์แรก

ของการติดเชื้อ นอกจากนี้อาจศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเกาะ
 ยังสามารถทำให้เห็นความแตกต่างของการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของเหลว
 ที่เกิดขึ้นในหนูถีบจักรที่ติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิตัวจิ๋วจำนวนต่างกัน กล่าวคือ แอนติบอดี
 ไคโตเตอร์ในซีรัมหนูที่ติดเชื้อพยาธิ 15 ตัว มีระดับสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูง
 สุดภายในเวลาเพียง 4 สัปดาห์ ภายหลังการติดเชื้อ ในขณะที่แอนติบอดีไคโตเตอร์
 ในหนูที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋ว 10 ตัว และ 5 ตัว เพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดช้ากว่าคือ ใช้ -
 เวลา 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ
 นายแพทย์สมพล บุญยคุปต์ และกวีลเลอร์โม พาชโก (Punyagupta and
 Pacheco . 1961 : 515 - 520) ซึ่งทำการศึกษาแอนติบอดีไคโตเตอร์ในกระต่าย
 ที่ติดเชื้อ Gnathostoma procyonis พบว่าแอนติบอดีไคโตเตอร์ในซีรัมกระต่ายที่
 ติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิจำนวน 5 ตัว มีระดับสูงขึ้นถึงระดับสูงสุดในเวลาประมาณ 8-
 10 สัปดาห์ ในขณะที่แอนติบอดีไคโตเตอร์ในซีรัมกระต่ายที่ติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิจำนวน
 20 ตัว เพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดภายในเวลาเพียง 5 - 7 สัปดาห์เท่านั้น สำหรับ
 แอนติบอดีไคโตเตอร์ในซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋ว 15 ตัวนั้น เมื่อเพิ่มขึ้นถึง
 ระดับสูงสุดแล้วไม่ลดลงเลยตลอดถึงสัปดาห์ที่ 16 ซึ่งเป็นสัปดาห์สุดท้ายของการ
 ทดลอง แต่สำหรับหนูถีบจักรที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋ว 5 และ 10 ตัว เมื่อเพิ่มขึ้นถึง
 ระดับสูงสุดแล้วลดลงภายหลังสัปดาห์ที่ 8 ทั้ง 2 กลุ่ม การลดระดับของแอนติบอดี
 ไคโตเตอร์ในหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิตัวจิ๋ว 5 และ 10 ตัวนี้ไม่ได้เกิดจากการที่พยาธิถูก
 กำจัดไปจากร่างกายหนูถีบจักร จากการฆ่าแล้วพิสูจน์ซากหนูเหล่านี้ทุกตัว เมื่อติดเชื้อ
 เชื้อนาน 8 เดือนแล้วพบว่ายังคงมีหนอนพยาธิตัวจิ๋วอยู่ในหนูทุกตัว แต่สังเกตพบว่า
 หนอนพยาธิส่วนใหญ่อยู่ในเกราะ หัวใจน่าจะเข้าไปในวุ้นที่ติดพยาธิตัวอ่อน
 จำนวน 15 ตัวนั้น ถึงแม้ว่าจะมีบางส่วนที่เข้าเกราะไปแล้วแต่ก็ยังคงเหลือบางส่วน
 ที่อยู่ในสภาวะเคลื่อนที่ได้จึงมีการขับถ่ายแอนติเจนได้ตามปกติเป็นการกระตุ้นแอนติ-
 บอดีให้คงรักษาระดับอยู่ได้ในขณะที่พยาธิจำนวนเล็กน้อย (5 และ 10 ตัว) เมื่อเขา

เพราะไปแล้วก็ไม่เหลือหรือเหลือไม่มากพอที่จะกระตุ้นแอนติบอดีให้รักษาระดับไว้ได้นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้เทคนิคการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงและโดยให้เปรียบเทียบผลการทำปฏิกิริยากับซีรัมก่อนและหลังจากการถูกรีดิวส์ด้วย ทู-เมอร์แคปโตเอทานอลได้แสดงให้เห็นว่าการคิด เชื่อตัวอ่อนพยาธิตัวจิ๋วทำให้หนูถีบจักรสร้างแอนติบอดีชนิด IgM ขึ้นมาตั้งแต่สัปดาห์แรกของการคิด เชื่อแล้วแอนติบอดีส่วนใหญ่ก็ยังคง เป็นชนิด IgM อยู่จนถึงประมาณ 8 สัปดาห์ จึงเริ่มมีแอนติบอดีชนิด IgG เพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 เป็นต้นไป การที่หนูถีบจักรมีแอนติบอดีชนิด IgG อยู่ เป็นเวลานานหลายสัปดาห์โดยที่สร้างแอนติบอดีชนิด IgG ซ้ำมานี้ ทำให้เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างเนื้อโฮสต์คือ หนูถีบจักรและปรสิตคือ พยาธิตัวจิ๋วซึ่งอาจมีคุณสมบัติบางประการทำให้หนูไม่สามารถสร้างแอนติบอดีชนิด IgG ได้ตามปกติ (มีการสร้างแอนติบอดีน้อยกว่าปกติในช่วง 12 สัปดาห์แรกของการคิด เชื่อ) การที่หนูสร้างแอนติบอดีชนิด IgG น้อยกว่าปกติในช่วง 12 สัปดาห์แรกของการคิด เชื่ออาจ เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พยาธิสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในตัวหนูได้จนกระทั่ง เขา เพราะ เรียบร้อย ทั้งนี้ จากการศึกษาวิจัยของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านทำให้ทราบว่าแอนติบอดีชนิด IgG มีความสำคัญในการกำจัดหนอนพยาธิในเนื้อโฮสต์เป็นอย่างมาก โดยทำการศึกษา ในหนูที่ถูกคิด เชื่อพยาธิปากขอในลำไส้ชนิด Nippostrongylus brasiliensis พบว่า เมื่อตายแอนติบอดีชนิด IgG จากหนูที่ถูกมีภูมิต้านทานโรคพยาธิชนิดนี้ไปให้หนูปกติทำให้หนูปกติมีภูมิต้านทานต่อการคิด เชื่อพยาธิปากขอชนิดนี้ได้เช่น เดียวกัน (Jones, Edwards and Ogilvie. 1970 : 621 - 633) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าแอนติบอดีชนิด IgG ยังสามารถช่วยให้เม็ด เลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลจากคนเกาะติดและฆ่าตัวอ่อนระยะที่ 1 (*Microfilaria*) ของพยาธิเท้าช้างชนิด Wuchereria bancrofti ได้อีกด้วย (Mehta and others. 1981:117-123)

การศึกษาองค์ประกอบแอนติเจนที่สกัดจากพยาธิตัวจิ๋วเมื่อคิดฉลาดไอโอดีน 125 แล้วนำมาศึกษาโดยวิธีเอสซีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส กับ

ออโตเรคิโกราฟี ทำให้ทราบว่าแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดประกอบด้วย โปรตีนเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน จำนวนอย่างน้อย 20 ชนิด ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน มีปริมาณมากที่สุด แต่กลับทำปฏิกิริยาชนิดไม่จำเพาะเจาะจงกับซีรัมหนูปกติ ในทางตรงกันข้ามองค์ประกอบแอนติเจนอื่นที่ไม่ใช่ขององค์ประกอบ เคนกลับมีความน่าสนใจกว่า ลักษณะเช่นนี้คล้ายกันกับลักษณะที่พบในแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิหอยโข่ง Angios - trongylus cantonensis (Dharmkrong-At and Sirisinha. 1983 : 154 - 162) สำหรับตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๊ดที่ใช้ในการศึกษารังนี้ปรากฏว่าเมื่อองค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 50 และ 47 กิโลดาลตันที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับแอนติซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมพยาธิตัวจิ๊ด แต่สำหรับองค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 และ 47 กิโลดาลตันนั้น ไม่เหมาะ - สำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากองค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน กระตุ้นให้หนูถีบจักรสร้างแอนติบอดีในช่วงระยะสั้นมาก คือเพียงช่วง - ระหว่างสัปดาห์ที่ 6 ถึงสัปดาห์ที่ 8 เท่านั้น ก่อนและหลังช่วงเวลานี้ตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อองค์ประกอบแอนติเจนนี้เลย และองค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน ตรวจพบในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 12 ดังนั้น องค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน จึงน่าจะเหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีแอนติบอดี เกิดขึ้นตลอดเวลาของการติด เชื้อตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 16 แต่องค์ประกอบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตันนี้ ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับซีรัมจากหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมพยาธิไหมเลือดหลายชนิด ได้แก่ S. haematobium, S. mansoni, S. japonicum (Chinese strain), S. japonicum (Philippine strain) และ S. mekongi อย่างไรก็ตามจะยังคงใช้ - ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ดได้อยู่ ทั้งนี้ จากการที่พบว่าปฏิกิริยาข้ามกลุ่มที่เกิดขึ้นนั้นให้ผลจำเพาะมาก เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาจำเพาะที่เกิดกับซีรัมหนูถีบจักรที่ติดเชื้อมพยาธิตัวจิ๊ด อีกประการหนึ่งในประเทศไทยเราไม่มีโรคพยาธิไหมเลือดอยู่เลย

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ก็เป็นการแสดงให้เห็นว่าพยาธิตัวจิ๋วมีองค์ประกอบแอนติเจน
ที่ใหม่ปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับพยาธิตัวกลมในลำไส้หนูชนิด Aspicularis tetraptera
และ Syphacia obvelata และพยาธิใบไม้เลือดชนิด S. haematobium, S.
mansoni, S. japonicum (Chinese strain) S. japonicum (Philippine
strain), และ S. mekongi ซึ่งนับว่าเป็นลักษณะทั่วไปที่
พบในพยาธิตัวกลมชนิดอื่น เช่น A. cantonensis (Bouthemy. and others.
1972 : 531) ผลการศึกษารังนี้ช่วยให้เข้าใจโรคที่ยังขึ้นว่าเพราะเหตุใดการไข
แอนติเจนที่สกัดจากเนื้อเยื่อของพยาธิโดยไม่ไคผ่านการจำแนกองค์ประกอบเสียก่อน
จึงให้ผลการทดสอบที่มีผิดพลาดได้ง่ายในผู้ป่วยตามที่ไคเคยมีรายงานไว้ (สมพงษ์
บุญคุปต์ และพิพัฒน์ ชูศิษุ เลข 2510 : 367 - 373)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษา เปรียบเทียบ กับซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคพยาธิตัวจิ๋วและ
ผู้ป่วยที่เป็นโรคอื่น ๆ
2. ควรมีการศึกษา เปรียบเทียบ กับแอนติเจนที่เตรียมจากสิ่งขับถ่ายและ
สารคัดหลั่งของตัวอ่อนระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ทองศักดิ์ บุนนาค พิพัฒน์ ชุตินุเวช และสมพนธ์ บุญคุปต์ "พยาธิตัวจิกจาก
ผู้ป่วยโรคไขสันหลังและสมองอีก เสบอีไอสีโนฟิลิคสองราย" จดหมายเหตุแพทย
สมาคมแห่งประเทศไทย 51 : 813 - 821 พฤศจิกายน 2511
- บุญสม รัตนศิริ วิจิตรรา เหมศรีชาติ และรัตนชัย พลัฏฐการ "พยาธิตัวจิก
ในระบบประสาท" วารสารกรมการแพทย์ 6 : 439 - 444 กันยายน -
ตุลาคม 2524
- บรรจงศักดิ์ นະมากร์ และคนอื่นๆ "พยาธิตัวจิกในช่องส่วนหน้าของลูกตา"
จดหมายเหตุแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 45 : 549 - 555 พฤศจิกายน
- ธันวาคม 2505
- ปณต มิคะเสน สมทรง ธนภูมิ และปรีชา เจริญลาภ "พยาธิตัวจิกในทาง
เดินปัสสาวะ" จดหมายเหตุแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 42 : 85 - 70
กุมภาพันธ์ 2507
- สมพนธ์ บุญคุปต์ และพิพัฒน์ ชุตินุเวช "โรคพยาธิตัวจิกในผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมอง
อีก เสบอีไอสีโนฟิลิค 1 ราย" วิทยาสาร เสนารักษ์ 20 : 367 - 373
กรกฎาคม 2510
- ศรีวัฒนา ชิตช่วง ปรราสิตวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 2 ศักดิ์โสภการพิมพ์
กรุงเทพมหานคร 2525, 265 หน้า
- องุ่น เกียรติวุฒิ และบุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ การตรวจวินิจฉัยโรคปรราสิต
บันทึกการพิมพ์ กรุงเทพมหานคร 2523, 94 หน้า

- Ando, T. "A study of Gnathostoma spinigerum." (Japan with English Abstract) Acta Medica 27 : 2342 - 2359, 1975.
- Bouthemy and others. " Structure Antigenique de Nematode Angiostrongylus cantonensis." Aspects Immunologiques des Relations -Parasite. Annual Parasitology (Paris) 47 : 531, 1972.
- Charumazi, A.M. Molecular Characterization of Antigen of Polyoma and SV40 Transformed Cells. PhD. Thesis, Georgetown University, Washington, D.C., U.S.A., 1980.
- Cross, J.H., " Diagnostic Methods in other Tissue Helminthiasis Including Angiostrongyliasis and Trichinosis : A Review " Diagnostic Methods for Important Helminthiasis and Amoebiasis in Southeast Asia and the Far East. 1975 : 327 p.
- Crowle, A.J. Immunodiffusion. Academic Press, New York, N.Y., 1961. p. 181.
- Daengsvang, S. " A Monograph on the Genus Gnathostoma and Gnathostomiasis in Thailand," SEAMIC Southeast Asian Medical Information Center Tokyo. 1980. 85 p.
- _____. " The World's First = story of Gnathostoma spinigerum Infection in the Young Thai Woman. " Journal of Parasitology and Tropical Medicine Association of Thailand. 6 : 1 - 10, 1983.
- Dharmkrong-at, A. and Sinisinha S. " Analysis of Antigens From Different Developmental Stages of Angiostrongylus

- cantonensis, " Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 14 : 154 - 162, 1983.
- Egashira, M. "Studies on Gnathostoma spinigerum," (Japan with English Abstract) Acta Medica 23 : 108 - 129, 1952.
- Ey, P.L.; Prowse, S.J. and Jenkin, C.R. " Isolation of Pure IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} Immunoglobulins from Mouse Serum Using Protein A-Sepharose." Immunochemistry 15 : 429 - 436, 1978.
- Furuno, O. " An Immunological Study on Gnathostomiasis Precipitin Ring Test and Sarles' Phenomenon. (Japan with English Abstract)", Acta Medica. 29 : 2802 - 2822, 1959.
- Grabar, P. and Burtin, P. Immuno-electrophoretic Analysis. Elsevier Publishing Co., New York, N.Y., 1960. p. 25 - 29.
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.s. " The Preparation of ¹³¹I-labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity," Biochemical Journal. 89 : 114 - 123, 1963.
- Hirata, A.A. and Brandriss, M.W. " Passive Hemagglutination Procedures for Protein and Polysaccharide Antigens Using Erythrocytes Stabilized by Aldehydes," Journal of Immunology. 100 : 641 - 646, 1968.
- Ivarie, R.D. and Jones, P.P. A Rapid Sensitive Assay for Specific Protein Synthesis in Cells and in Cell-Free Translations : Use of Staphylococcus aureus as an Adsorbent for Immune Complexes. Analytical Biochemistry. 97 : 24 - 35, 1979.

- Jones, V.E.; E ward, A.J. and Ogilvie, B.M. " The Circulating Immunoglobulins Involved in Protective Immunity to the Intestinal Stage of Nippostrongylus brasiliensis in the Rat " Immunology 18 : 621 - 633, 1970.
- Kasemsuth, R., Panut-Ampon, P. and Sanghirun, C. Study on the Diagnosis of Gnathostoma Infection in Cats by Radioimmunoassay," Southeast Asian Journal of Tropical Medical and Public Health. 12 : 410 - 412, 1981.
- Lowry, O. and others. " Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," Journal of Biological Chemistry. 193 : 265 - 275, 1951.
- Mehta and others. " Antibody Dependent Cell-Mediated Effects in Bancroftian Filariasis. " Immunology 43 : 117 - 123, 1981.
- Miyazaki, I. " On the Genus Gnathostoma and Human Gnathostomiasis with Special References to Japan," Experimental Parasitology. 9 : 338 - 370, 1960.
- Morisita and others. " Non-Specificity of Intradermal Test with Gnathostoma Antigen," Japanese Journal of Parasitology. (In Japan with English Summary) 18 : 120, 1969.

Prommas, C and Daengsvang, S. " Preliminary Report of a Study on the Life Cycle of Gnathostoma spinigerum." Journal of Parasitology. 19 : 287, 1993.

_____. " Further Report of a Study on the Life Cycles of Gnathostoma spinigerum," Journal of Parasitology. 23 : 115, 1936.

_____. Feeding Experiments on Cats with Gnathostoma spinigerum Larvae Obtained From the Second Intermediate Host," Journal of Parasitology. 23 : 11, 1937.

Punyagupta, S. and others. " Two Fatal Cases of Eosinophilic .loenphalitis a Newly Recognized Disease Caused by Gnathostoma spinigerum," Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 62 : 801, 1968.

Punyagupta, S. and Pacheco, G. " Serological Studies on Experimental Gnathostomiasis," American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 10 : 515 - 520, 1961.

Vibulseth, S. and Leelarasamee, A. " A case of Pulmonary Gnathostomiasis," Siriraj Hospital Gazette. 32 : 23 - 24, 1980.

Yamaguchi, T. " Immunological Studies on Human Gnathostomiasis," (Japan with English Abstract) Journal Kurume Medical Association. 15 : 26 - 34, 1952.

Yorke, W. and Mepilestone, P.A. The Nematode Parasites of Vertebrates.

Hafner Publishing Company, Inc., New York and London, 1969.

ภาคผนวก

สูตรน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

1. เปปซิน ความเข้มข้น 1%

เปปซิน (Merck, Germany)	1.0	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentrated HCl)	7.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1100.0	มิลลิลิตร
pH	3.0	

2. เวโรนอล-ไฮโดรคลอริกแอซิด บัฟเฟอร์

โซเดียมบอร์บิลาล (sodium borbilal)	9.0	กรัม
โซเดียมเอไซด์ (sodium azide)	0.5	กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N	6.3	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร
pH	8.6	

3. สารละลายอัลซีเวอร์ (Alsever's solution)

น้ำตาลเดกซ์โทรส (Dextrose)	10.250	กรัม
โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate dihydrate)	4.000	กรัม
กรดซิตริก (Citric acid : monohydrate)	0.275	กรัม
เกลือแกง (NaCl)	2.100	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	500.000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อโดยหมอนึ่งความดัน (Sterilization by autoclave)		
pH	6.10	

การใช้สารละลายอัลซี เวอร์

เลือด (Whole blood)	1.0	ส่วน
สารละลายอัลซี เวอร์	1.0	ส่วน
เก็บที่ 4.0		

4. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโดว์

เกลือแกง (NaCl)	8.00	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.20	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.20	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1000.00	มิลลิลิตร
pH	7.2	

5. กลูตาไรอัลคัล 2.5%

กลูตาไรอัลคัล 2.5%	1.0	ส่วน
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	10.0	ส่วน

6. อะซิเตต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์

กรดอะซิติก (เกลวเซี่ยว)	4.735	มิลลิลิตร
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate : trihydrate)	2.450	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	500.000	มิลลิลิตร
pH	4.0	

7. เอสซีเอส-โพลีอะคริลาไมค์ 10%

สตอคค์ อะคริลาไมค์ 30%	3.330	มิลลิลิตร
เจด บัฟเฟอร์ (pH 8.9)	1.250	มิลลิลิตร
เอสซีเอส (10% ในน้ำกลั่น)	0.100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5.265	มิลลิลิตร
ทีเมด (TEMED (N, N, N ¹ , N ¹ -Tetramethyl- Ethylenediamine, Eastman, Kodak)	0.005	มิลลิลิตร

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% (Ammonium per
sulfate)

0.050 มิลลิลิตร

รวม 10.000 มิลลิลิตร

8. เจด บัฟเฟอร์ (pH 8.9)

กรรไกรไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N	12.000	มิลลิลิตร
ทริซมา เบส (TRIZMA Base : SIGMA)	9.075	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	25.000	มิลลิลิตร

เจด บัฟเฟอร์ (pH 6.8)

ทริซมา เบส	3.0275	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	50.000	มิลลิลิตร
ปรับค่า กรรไกรไฮโดรคลอริกจนได้	6.8	

9. เอสดีเอส 10%

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate	0.1	กรัม
หรือ Lauryl sodium sulfate, SIGMA)		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1.0	มิลลิลิตร

10. เซมเบล บัฟเฟอร์

ความเข้มข้น 5 เท่า

ทรีซมา เบส	0.378	กรัม
กลีเซอรอล	5.000	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.500	กรัม
ทู-เมอร์แคปโตเอทานอล	2.50	มิลลิลิตร
โบรมอ ฟีนอล บลู (Bromo phenol blue)	0.005	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	10.00	มิลลิลิตร
ปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนได้	6.8	

11. อีเล็กโตรไฟรีซิส บัฟเฟอร์ pH 8.3

ทรีซมา เบส	6.0	กรัม
ไกลซีน (Glycine : Eastman, Kodak)	28.8	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.500	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	2000.0	มิลลิลิตร
ปรับค่า pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2N		
จนได้ pH	8.3	

12. คีคูมาดสี บวริลเลียนท์ บลู

คีคูมาดสี บวริลเลียนท์ บลู	0.6	กรัม
กรดอะซิติก (เกด เชียล)	21.0	มิลลิลิตร

16. โซเดียม เมตาไบซัลไฟต์ (เตรียมแล้วใช้ทันที)
 โซเดียม เมตาไบซัลไฟต์ 0.001 กรัม
 โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 1.000 มิลลิลิตร
17. โซเดียม ไอโอไดค์
 โซเดียม ไอโอไดค์ 0.05 กรัม
 โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 1.00 มิลลิลิตร
18. โบวไนซ์ ซีรัม อัลบูมิน 0.5%
 โบวไนซ์ ซีรัม อัลบูมิน 0.005 กรัม
 โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 1.000 มิลลิลิตร

ภูมิคำนทานในระบบนิเวศของ เหลวในหนุธิบจักรที่คัก เชื้อพยาธิตัวจิ

บทคัดย่อ

ของ

รุ่งลววรรณ ไพรวรรณ

เสนอคอมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการ ศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการ ศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2528

การศึกษาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน เหลวในหนูถีบจักรที่ติดเชื่อพยาธิ
ตัวจิ๋วได้ใช้เทคนิคที่มีความไวต่างกันหลายชนิด ทำให้ทราบว่าเมื่อทำการศึกษา โดย
ใช้เทคนิคที่มีความไวต่ำ ได้แก่ การตกตะกอนในเนื้อวุ้นและการแยกโปรตีนด้วยกระ-
แสไฟฟ้าแล้วตกตะกอนในเนื้อวุ้น สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อ
พยาธิตัวจิ๋วได้ตั้งแต่ 6 สัปดาห์ ภายหลังการติด เชื้อเป็นต้นไป แต่เมื่อใช้เทคนิคที่มี
ความไวสูงขึ้นไปอีก เช่น การ เกาะกลุ่มเม็ด เลือดแดงแกะ และวิธีเรดิโออิมมูโน -
พรีซิปีเตชัน ร่วมกับอิมมูโนเรดิโอกราฟี สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมหนูถีบจักรที่
ติด เชื้อพยาธิตัวจิ๋วได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการติด เชื้อ นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้ -
เทคนิคการ เกาะกลุ่มเม็ด เลือดแดงแกะยังสามารถทำให้เห็นความแตกต่างของการตอบ
สนองทาง ระบบภูมิคุ้มกัน เหลวที่เกิดขึ้นในหนูถีบจักรที่ติด เชื้อตัวอ่อนพยาธิตัวจิ๋ว จำนวน
แตกต่างกัน กล่าวคือ แอนติบอดีไท เเกอร์ในซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อพยาธิ 15 ตัว มีระดับ
สูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดในเวลา 4 สัปดาห์ ภายหลังการติด เชื้อ ใน
ขณะที่แอนติบอดีในหนูที่ติด เชื้อพยาธิตัวจิ๋ว 10 ตัว และ 5 ตัว เพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุด
ช้ากว่าคือ ใช้เวลา 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบผลการทำปฏิ-
กิริยากับซีรัมก่อนและหลังจากการถูกรีดด้วย ทุ-เมอร์แคปโตเอธานอล ได้แสดง
ให้เห็นว่าการติด เชื้อตัวอ่อนพยาธิตัวจิ๋วทำให้หนูถีบจักรสร้างแอนติบอดีชนิด IgM ขึ้น
มาตั้งแต่สัปดาห์แรกของการติด เชื้อแล้ว แอนติบอดีส่วนใหญ่ก็ยังคง เป็นชนิด IgM อยู่นาน
ถึง 8 สัปดาห์ จึง เริ่มมีแอนติบอดีชนิด IgG เพิ่มมากขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 เป็นต้นไป
และการศึกษาองค์ประกอบแอนติ เจนที่สกัดจากพยาธิตัวจิ๋ว เมื่อคั่นลากไอโอไดน์ 125
แล้วนำมาศึกษาโดยวิธี เอสจีเอส-โพลีอะคริลามิค เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส กับอิมมูโน-
เรดิโอกราฟี ทำให้ทราบว่าแอนติเจนที่สกัดจากเนื้อ เยื่อตัวอ่อน ระยะที่ 3 ของพยาธิ
ตัวจิ๋ว ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน จำนวนอย่างน้อย 20 ชนิด ที่มีน้ำ
หนักโมเลกุลตั้งแต่ 99 ถึง 10 กิโลดาลตัน องค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 39
กิโลดาลตัน มีปริมาณมากที่สุด แต่ที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะอย่างมากกับซีรัมหนูถีบจักรที่
ติด เชื้อตัวอ่อน ระยะที่ 3 ของพยาธิตัวจิ๋ว ได้แก่องค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50

กิโสดาลตัน เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาต่อซีรัมหนูถีบจักรที่ติด เชื้อปาราสิตอื่น ๆ ไคแก่ พยาธิที่กลืนในลำไส้และพยาธิใบไม้เลือด เมื่อทำการศึกษาไคเนติกของการสร้าง แอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ในหนูถีบจักรสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 45 31 27 23 และ 21 กิโสดาลตัน ไคก่อน ตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังการติดเชื้อและพบแอนติบอดีต่อองค์ประกอบอื่น ๆ เพิ่มมากขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งเป็นช่วงที่มีแอนติบอดีต่อองค์ประกอบแอนติเจนต่าง ๆ มากที่สุด ไคแก่ 66 50 47 45 31 27 23 21 19 และ 14 กิโสดาลตัน แลว แอนติบอดีต่อองค์ประกอบ 66 19 และ 14 กิโสดาลตัน เริ่มหายไปตามลำดับ ภายหลังการพักเรื้อนานทั้ง 8 สัปดาห์เป็นต้นไป ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นแนวทาง ในงานวิจัยในเรื่องการวินิจฉัยทาง อิมมูโนโลยีของโรคพยาธิควีจิกต่อไปในอนาคต

HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN MICE INFECTED WITH
GNATHOSTOMA SPINIGERUM

AN ABSTRACT

BY

RUNGLAWAN PRIWAN

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree
at Srinakharinwirot University

February 1985

Humoral immune response was studied in mice infected with Gnathostoma spinigerum by using techniques with different degrees of sensitivity. When immunodiffusion and immunoelectrophoresis were performed, antibody specific to somatic extract of third stage larvae of the parasite was detected six weeks after infection. On the other hand, when techniques with higher degree of sensitivity, i.e., passive hemagglutination and radioimmunoprecipitation, were used the antibodies were detected as early as one week after the infection. In the hemagglutination test, antibody titer of the sera of mice infected with 15 larvae was found to increase rapidly and reached its peak within four weeks of infection while those of the sera of mice infected with 10 and 5 larvae reached their peaks within eight and six weeks respectively. The hemagglutination activity of the antibodies obtained during the first eight weeks of infection was found to be markedly reduced when treated with 2-mercaptoethanol (2-ME), which indicated the presence of a large amount of IgM antibodies in this period. In contrast, the susceptibility to 2-ME was gradually decreased after twelve weeks of infection. This indicated the presence of a large amount of IgG antibodies in the later period of infection. When the somatic extract of third-stage larvae of G. spinigerum was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 20 bands of polypeptide with molecular weight from 99.0 to 10.0 K were demonstrated. Among these bands, the one with molecular weight 39.0 K

was found to be present in the largest proportion. Further characterization of these components by radioimmunoprecipitation and autoradiography indicated that only the component with molecular weight of 50 K reacted specifically with sera obtained from mice infected with G. spinigerum. The others were found to cross react with sera obtained from mice infected with Aspicularia tetraptera, Syphacia obvelata and Schistosoma spp. In addition, the kinetic of antibody formation in infected mice were studied and it was found that antibodies to the component with molecular weight 50, 45, 31, 27, 23 and 21 K appeared as early as one week of infection. The maximum antibody formation was demonstrated six weeks after infection when antibodies to 66, 50, 47, 45, 31, 27, 23, 21, 19 and 14 K components were detected. However, antibodies to 66, 19 and 14 K components began to disappear after the eighth week of infection. These results might be useful for further approach to immunodiagnosis of gnathostomiasis.