รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ

Developments of the vaccines using protease enzymes for fasciolosis

ดร. พรอนันต์ เกื้อไข่

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๑๘๑๗๐๐
สัญญาเลขที่ ๓๑/๒๕๕๙

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ

Developments of the vaccines using protease enzymes for fasciolosis

ดร. พรอนันต์ เกื้อไข่
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๙

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนันสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 31/2559

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 31/2559).

บทคัดย่อ

Fasciola gigantica cathepsinL, B (CatL, CatB) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่มีความสำคัญ มีการแสดงออกมากในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร และปล่อยสู่สารที่พยาธิหลั่งออกมา (ES product) ชนิดของ CatL และ B ที่แตกต่างกันจะมีการแสดงออกทั้งในตัวอ่อนระยะแรก ๆ และตัวเต็มวัยของพยาธิสำหรับการเคลื่อนที่และย่อยอาหาร ดังนั้น โปรตีน CatL และ B น่าจะเป็นเป้าหมายสำหรับการผลิตวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในการศึกษาครั้งนี้ มีการผลิต Recombinant pro-*F.gigantica* CatL1 (rpFgCatL1), recombinant mature *F. gigantica* CatL1 (rmFgCatL1), CatL1H, CatL1G, CatB2 ในแบคทีเรียสายพันธ์ *Escherichia coli* BL21 ซึ่งมีมวลโมเลกุล เท่ากับ 30, 25, 25, 25, 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในการทดสอบวัคซีนของโปรตีน rmFgCatL1G ใช้หนูสายพันธ์ Imprinting Control Region (ICR) กลุ่มละ 10 ตัว โดยมีการฉีดโปรตีนครั้งละ 50 ไมโครลิตร เข้าใต้ผิวหนัง หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ได้ทำให้หนูติดเชื้อโดยป้อนตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อ (metacercariae) ตัวละ 15 metacercariae ซึ่งผลการทดสอบวัคซีนมีการแสดงระดับการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rmFgCatL1G เท่ากับ ร้อยละ 56.5 และ 58.3 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ แอนติบอดีในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนมีการทำปฏิกิริยากับ newly excysted juveniles (NEJ), 4-week-old juveniles and the ES products of 4 week-old juveniles หลังจากทดสอบโดยวิธี dot blotting และพบว่าในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนมีการตอบสนองทั้ง Th1 และ Th2 ซึ่งสอดคล้องกับระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ที่เพิ่มขึ้น ระดับของเอนไซม์ตับ Serum Glutamic Oxaloacetic Transferase (SGOT) และ Serum Glutamic Pyruvate Transferase (SGPT) ในกลุ่ม rmFgCatL1G แสดงให้เห็นการลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม รอยโรคที่เกิดกับตับในกลุ่มวัคซีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า โปรตีน rmFgCatL1G มีศักยภาพในการเป็นวัคซีนป้องกันพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และอาจจะมีการทดสอบในสัตว์เคี้ยวเอื้องและมนุษย์ต่อไป

Abstract

In *Fasciola gigantica* cathepsin L and B (CatL, CathB) are a family of predominant proteases that is expressed in caecal epithelial cells and secreted into the excretory-secretory products (ES). CatL and CatB isotypes are expressed in both early and late stages of the life cycle and the parasites use them for migration and digestion. Therefore, CatL and B are a plausible target for vaccination against this parasite. Recombinant pro-*F.gigantica* CatL1 (rpFgCatL1), recombinant mature *F. gigantica* CatL1 (rmFgCatL1), recombinant mature *F.gigantica* CatL1G (rmFgCatL1G), recombinant mature *F.gigantica* CatL1H (rmFgCatL1H) and recombinant mature *F. gigantica* CatB2 (rmFgCatB2) were expressed in *Escherichia coli* BL21 at molecular weight 30, 25, 25, 25, 28 kDa, respectively. The vaccination was performed in Imprinting Control Region (ICR) mice (n=10) by subcutaneous injection with 50 µg of rmFgCatL1G combined with Freund's adjuvant. Two weeks after the second boost, mice were infected with 15 metacercariae by the oral route. The level of protection of rmFgCatL1 vaccines was estimated to be 56.5% and 58.3% when compared with non vaccinated-infected and adjuvant-infected controls, respectively. Antibodies in the immune sera of vaccinated mice were shown by dot-blotting to react with the native FgCatL1G in the extract of newly excysted juveniles (NEJ), 4-week-old juveniles and the ES products of 4 week-old juveniles. By determining the levels of IgG1 and IgG2a in the immune sera, which are indicative of Th2 and Th1 immune response, respectively, it was found that both Th1 and Th2 responses were significantly increased in rmFgCatL1G-immunized groups compared with the control groups, with higher levels of Th2 (IgG1) than Th1 (IgG2a). The levels of Serum Glutamic Oxaloacetic Transferase (SGOT) and Serum Glutamic Pyruvate Transferase (SGPT) in rmFgCatL1G-immunized group showed a no significant decrease when compared to control groups. The pathological lesions of liver in vaccinated groups were significantly decreased when compared with control groups. This study indicates that rmFgCatL1G has a potential as a vaccine candidate against *F. gigantica* in mice, and this potential will be tested in ruminants.

Keywords : Vaccine, CathepsinL1G*, Fasciola gigantica*, mice

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	5
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
เนื้อเรื่อง	8
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	8
การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ	8
การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*	8
การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ	9
การสังเคราะห์ recombinant FgCatL1	9
การทดสอบคุณสมบัติของพัฒนาวัคซีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน FgCatL1	9
ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมคุ้มกัน	11
การตรวจวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ตับ	11
วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล	11
ผลการวิจัย	12
การ clone cDNA ของ CatL, B	12
การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน	12
การทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ โปรตีน rFgCatL1G	14
การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อรีคอมบิแนนท์ rmFgCatL1G	15
Dot blot	17
ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับจำนวนพยาธิ	17
ระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT)	19
สรุปผลการวิจัย	21
อภิปรายและวิจารณ์	21
ผลผลิต	22
รายงานการเงิน	23
บรรณานุกรม	24
ภาคผนวก	29
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ	30
ประวัตินักวิจัย	38

สารบัญตาราง (List of Table)

		หน้า
ตารางที่ 1	สรุปผลการทดสอบวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่คณะผู้วิจัยได้ทดลอง	3
ตารางที่ 2	สรุปการทดลองวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่ตีพิมพ์	3
ตารางที่ 3	ตางรางแสดงร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ	14
ตารางที่ 4	แสดงค่าความเสียหายของตับ (liver damage lesion)	19

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หน้า

รูปที่ 1 แสดงผลการสังเคราะห์โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 13
รูปที่ 2 แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (humoral) 16
รูปที่ 3 แสดงผล dot blot 17
รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับจำนวนพยาธิ 18
รูปที่ 5 แสดงระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT) 20

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

CatL1	Cathepsin L1
CatB	Cathepsin B
r	recombinant
Fg	*Fasciola gigantica*
NEJ	Newly excysted juvenile
JV	Juvenile
AD	Adult
ES	Excretion-secretion
TA	Tegumental antigen
cDNA	Complementary DNA
TMB	3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine
AP	alkaline phosphatase
NBT/BCIP	nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indodyl phosphate
SGOT	Serum Glutamic Oxaloacetic Transferase
SGPT	Serum Glutamic Pyruvate Transferase
WB	Whole body
Ig	Immunoglobulin
SAP	saposin-like protein

บทนำ (Introduction)

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แพะ และแกะที่เลี้ยงในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะต่อเกษตรและอุตสาหกรรมการสัตว์เลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตเนื้อและนม จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8 และในบางพื้นที่อัตราการติดเชื้ออาจสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรที่มีอาชีพเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละไม่น้อยกว่า 300 ล้านบาท (Sukhapesna et al., 1990; Sirihakim and Pholpark, 1991) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่ามีคนติดเชื้อพยาธิ ชนิดนี้ไม่น้อยกว่า 30 ราย และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ในประเทศเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการแพร่ กระจายของหอยพาหะอย่างกว้างขวางในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา

เมื่อสัตว์เคี้ยวเอื้องหรือมนุษย์กินตัวอ่อนระยะติดต่อคือระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าไป ผนังหุ้มตัวอ่อนระยะนี้จะถูกทำลายโดยน้ำย่อยทำให้ตัวอ่อนระยะ newly excysted juvenile (NEJ) ออกจากซีสต์บริเวณลำไส้เล็กของโฮสท์ NEJ จะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าไปในช่องท้องภายในลำตัวของโฮสท์ และเคลื่อนไปสู่ตับแล้วเจริญเป็นพยาธิตัวอ่อนซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อของตับ ทำให้เนื้อเยื่อตับถูกทำลาย เกิด haemorrhage และ fibrosis ในเนื้อตับ เมื่อพยาธิเจริญเป็นตัวเต็มวัยก็จะเดินทางไปอาศัยในท่อน้ำดีโดยใช้อวัยวะยึดเกาะ (oral และ ventral suckers) เกาะผนังของท่อน้ำดี เนื่องจากมีความต้องการอาหารในปริมาณสูง พยาธิจะทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสท์บริเวณที่พยาธิอาศัยอยู่ จากการเคลื่อนที่ไปมา พยาธิใช้ oral sucker กัดหรือฉีกเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดเพื่อดูดกิน ในขณะที่หนามบริเวณผนังลำตัวจะครูดและทำลายเนื้อเยื่อของโฮสท์ในขณะที่พยาธิเคลื่อนที่ไปมา เอ็นไซม์และสารที่พยาธิหลั่งออกมาโดยเฉพาะกลุ่ม proteases และ lytic proteins จะช่วยทำลายและย่อยสลายเนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสท์มากยิ่งขึ้น เอ็นไซม์กลุ่ม endoproteases ในกลุ่ม cathepsin L (CatL) ,cathepsin B (CatB) และกลุ่ม exopeptidases ในสกุล leucine aminopeptidase (LAP) เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิหลั่งออกมาในสารคัดหลั่ง (excretion-secretion (ES) material) และพบว่ามีอยู่ในพยาธิตั้งแต่ระยะ NEJ จนกระทั่งระยะตัวเต็มวัย โดยอาจมี isotype ที่ปรับเปลี่ยนไปเช่น CathB3 ถูกสร้างและปล่อยโดย NEJ ในช่วงที่ไชเข้าเนื้อเยื่อของโฮสท์ ส่วน CatB2 พบในขั้นตัวอ่อน และ CatB1 เป็นเอนไซม์หลักในตัวเต็มวัย (Meemon et al., 2004) เอ็นไซม์ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายตัวที่ tegumental cells และ caecal epithelial cell ในตัวพยาธิ (Carmona et al., 1993; Smith et al., 1993; Creaney et al., 1996; Wilson et al., 1998; Law et al., 2003; Meemon et al., 2004) นอกจากนั้นพยาธิจะขับ lytic protein ที่ช่วยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก ได้แก่ สารพวก saposin-like protein (SAP) ซึ่งจะจับกับไขมันบนผนังเซลล์ทำให้เกิดรูและทำให้เซลล์ของโฮสท์แตกออกเพื่อเป็นอาหารพยาธิต่อไป

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติบางประการของยีน saposin-like protein (SAP) สองชนิดในพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. hepatica* (FhSAP-1 และ FhSAP-2) (Reed et al., 1998; Reed et al., 2000;

Espino and Hillyer, 2003) โปรตีนทั้งสองตัวนี้มีน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างคล้ายกับโปรตีน amoebopore ของ Entamoeba spp. ซึ่งเป็นปรสิตกลุ่มเดียวที่มีการศึกษาและวิเคราะห์คุณสมบัติของ SAP อย่างสมบูรณ์ที่สุด นอกเหนือจากโปรตีน SAP แล้ว ยังพบโปรตีน NK-lysin และ granulysin ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่มีคุณสมบัติคล้ายกันกับโปรตีน amoebopore โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ของโปรโตซัวจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์แปลกปลอมทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์เป้าหมายแตก (Zhai and Saier, 2000; Bruhn, 2005) โปรตีนกลุ่มนี้จึงถูกใช้เป็นกลไกในการป้องกันตัว และย่อยอาหารของอะมีบา ส่วนในพยาธิ Fasciola SAP ถูกใช้สำหรับการสลายสารอาหารโดยเฉพาะการสลายเซลล์เม็ดเลือดซึ่งเป็นอาหารหลัก (Espino and Hillyer, 2003) เซลล์เม็ดเลือดที่แตกออกจะถูกพยาธินำมาใช้เป็นอาหาร โดยมีการหลั่งเอ็นไซม์พวก proteases ดังกล่าวแล้ว ออกมาย่อย อีกต่อหนึ่งจนกลายเป็นโมเลกุลเชิงเดี่ยวที่ถูกดูดซึมผ่านทางผนังลำไส้เข้าสู่ตัวพยาธิ

การศึกษาเพื่อทดลองหาวัคซีนป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. เริ่มต้นเมื่อประมาณ 20 ปีที่แล้วมา โดยเริ่มจากการทดลองใช้แอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิตัวเต็มวัยทั้งตัว และสารที่พยาธิตัวเต็มวัยหลั่งออกมาโดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ พบว่าให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้แต่ไม่ดีเท่าที่ควร วัคซีนที่ให้ผลดีพอสมควรคือวัคซีนที่เตรียมจากพยาธิตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์ตาเรียที่ถูกฉายรังสี ซึ่งสามารถให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้ถึง 69-80% (Nansen, 1975; Hall and Lang, 1978; Haroun and Hilyer, 1986) แต่มักจะทำให้เกิดสภาวะแทรกซ้อน เช่น การเป็นถุงน้ำ (cysts) ที่อวัยวะต่าง ๆ เช่น ปอด เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของ NEJ ที่ถูกฉายแสงแล้วไปอยู่ที่อวัยวะเหล่านั้นก่อนที่จะสลายไป ต่อมาได้มีการศึกษาทดลองโดยใช้วัคซีนที่สกัดจากพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งแยกให้บริสุทธิ์เสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าให้ผลดีพอสมควรในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ แต่ก็เตรียมและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก ปัจจุบันวัคซีนตัวเลือกที่ได้ถูกนำมาใช้คือโปรตีนที่มีความสำคัญในการดำรงค์ชีพของพยาธิดังที่กล่าวมาแล้ว โปรตีนตัวแรก ๆ ที่ถูกนำมาใช้คือโปรตีนในกลุ่ม FABPs (Hillyer *et al*., 1987; Tendler *et al*., 1995; Aban *et al*., 1999) และโปรตีนในกลุ่ม antioxidant enzymes โดยเฉพาะ glutathione-S-transferase (GST) (Sexton *et al*., 1990; Sexton *et al*., 1994; Morrison *et al*., 1996) ต่อมาได้มีการนำโปรตีนในกลุ่ม proteases ได้แก่ Cath L และ LAP มาใช้ (Wijffels *et al*., 1994; Dalton *et al*., 1996; Estuningsih *et al*., 1997; Muro *et al*., 1997; Mulcahy *et al*., 1998; Piacenza *et al*., 1999) ซึ่งปรากฏว่าได้ผลดีพอสมควร โดยเฉพาะการใช้ CatL กับ LAP และ heme โปรตีนทำให้พยาธิตัวเต็มวัยไม่ออกไข่และตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นวัคซีนของ recombinant FhSAP-2 ต่อ *F. hepatica* ในกระต่าย และพบว่าโปรตีนนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนที่ดี โดยมีจำนวนพยาธิลดลงถึงร้อยละ 81.2 และจำนวนไข่พยาธิในอุจจาระและน้ำดีของสัตว์ทดลองลดลงร้อยละ 83.8 และ 73 ตามลำดับ (Espino and Hillyer, 2003)

ตารางที่ 1 สรุปผลการทดสอบวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่คณะผู้วิจัยได้ทดลอง

Protein	Expression system	Animal	%protection	References
rFgSAP-2	*E. coli*	Mice	78.5	Kueakhai et al., 2013
rFgLAP	*E. coli*	Mice	64.3	Changklung et al., 2013
rFgCatL1H	Yeast	Mice	66	Sansri et al., 2015
rFgCatB2	Yeast	Mice	60	Chantree et al., 2013
rFgCatB3	Yeast	Mice	66	Chantree et al., 2013
rFgSOD	*E. coli*	Mice	45	Jaikua et al., 2016
rFgCatL1	*E. coli*	Mice	39-47	Kueakhai et al., 2015

ตารางที่ 2 สรุปการทดลองวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่ตีพิมพ์

Protein	Type	Species	Animal	%protection	Reference
Hb	N	*F. hepatica*	Cattle	43.8	Dalton et al., 1996
CP		*F. gigantica*	Sheep	56.9	EL-Ahwany et al., 2012
B	R	*F. hepatica*	Rat	63.0	Jayaraj et al., 2009
L1	N	*F. hepatica*	Cattle	42.5	Dalton et al., 1996
	N	*F. hepatica*	Sheep	34.0	Piacenza et al., 1999
	R	*F. hepatica*	Cattle	48.2	Golden et al., 2010
L1G	R	*F. hepatica*	Cattle	43.0	Jayaraj et al., 2010
L2	N	*F. hepatica*	Cattle	43.0	Dalton et al., 1996
	N	*F. hepatica*	Sheep	33.0	Piacenza et al., 1999
L3	R	*F. hepatica*	Rat	52.0	Reszka et al., 2005
L5	R	*F. hepatica*	Rat	59.0	Jayaraj et al., 2009
LAP	N	*F. hepatica*	Sheep	89.6	Piacenza et al., 1999
	R	*F. hepatica*	Rabbit	78.0	Acota et al., 2008
	R	*F. gigantica*	Buffalo	0.0-8.4	Raina et al., 2011
	R	*F. hepatica*	Sheep	49.5-86.9	Maggioli et al., 2012
L1+L2	N	*F. hepatica*	Cattle	54.0	Mulcahy et al., 1998
	N	*F. hepatica*	Sheep	60.0	Piacenza et al., 1999
L1+L2+LAP	N	*F. hepatica*	Sheep	79.0	Piacenza et al., 1999
LAP+Prx	R	*F. gigantica*	Buffalo	0.0	Raina et al., 2011

L1+Hb	N	*F. hepatica*	Cattle	51.9	Dalton et al., 1996
L2+Hb	N	*F. hepatica*	Cattle	72.4	Dalton et al., 1996
	N	*F. hepatica*	Cattle	72.4	Mulcahy et al., 1998
B+L5	R	*F. hepatica*	Rat	76.0	Jayaraj et al., 2009
B+L1G	R	*F. hepatica*	Rat	62.0	Jayaraj et al., 2009
L5+L1G	R	*F. hepatica*	Rat	52.0	Jayaraj et al., 2009
B+L5+L1G	R	*F. hepatica*	Rat	52.0	Jayaraj et al., 2009
SAP2	R	*F. hepatica*	Mice	60.0	Espino et al., 2010

หมายเหตุ N=โปรตีนจากพยาธิ, R=รีคอมบิแนนท์เอนไซม์

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แกะ และคนในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านเกษตรอุตสาหกรรมการสัตว์เลี้ยงของประเทศในอัตราสูง จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ ร้อยละ 11.8 และในบางบริเวณของประเทศไทยอาจมีอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็นพยาธิที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม การเลี้ยงโค กระบือ แพะ และแกะ เนื่องจากทำให้ผลผลิตเนื้อ นม และการใช้แรงงานลดลงอย่างมาก มีการประมาณว่าโรคพยาธิชนิดนี้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรปีละประมาณ 300 ล้านบาท (Sukhapesna *et al*., 1990 : Sirihakim and Pholpark, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในประเทศไทย มีคนติดเชื้อพยาธิ *F. gigantica* มีแนวโน้มจะมากขึ้นเนื่องจากมีการขยายตัวของการเลี้ยงสัตว์ในประเทศ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 10 ปีที่แล้วมา

การตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* และ *F. hepatica* ในปัจจุบันใช้วิธีตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อซึ่งมีความไวและความถูกต้องแม่นยำต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์

รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถช่วยลดการติดเชื้อ *Fasciola* spp. ได้จริงและมีโอกาศประสบความสำเร็จอย่างมากที่จะทำให้ลดการติดเชื้อถึงร้อยละ 95-99 ซึ่งในประเทศไทยจะมีรายงายการติดพยาธิ *F. gigantica* ในคนน้อยนั้น ไม่สามารถแปรผลได้ว่าประไทยไม่มีการระบาดของของโรค Fasciolosis เป็นเพราะคนส่วนใหญ่ของประเทศไม่ได้รับการตรวจทางการแพทย์ เนื่องจากพฤติกรรมของคนไทยนั้นถ้าอาการของโรคไม่รุนแรงมากก็จะไม่ไปตรวจรักษา ซึ่งถ้าติดเชื้อ *F. gigantica* น้อยก็จะไม่แสดงอาการของโรคมากนัก ในทางตรงกันข้ามคนไทยนิยมบริโภคผักสด และผักบางชนิดนั้นปลูกในน้ำ เช่น ผักกะเฉด ผักบุ้งไทย เป็นต้น ดังนั้นคนไทยจึงตกอยู่ในภาวะเสี่ยงเป็นโรค Fasciolosis จากพฤติกรรมการบริโภคโดยไม่รู้ตัว และอีกประการที่สนับสนุนได้ว่า *F. gigantica* มีการติดในคนได้มากเช่นกันดังมีรายงานการติดเชื้อ *F. gigantica* ในกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และแอฟริกาเหนือ ส่วน

การติดเชื้อ *F. hepatica* มีรายงานการติดทั้งคนและสัตว์เช่นกัน ในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ออกเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เช่น เชียงใหม่ ปทุมธานี เพรชบุรี นครราชสีมา ยังพบวัวและควายติดเชื้อ *F. gigantica* อยู่ หรือสัตว์บางตัวไม่มีตัวพยาธิให้เห็นแต่กลับมีรอยโรค fasciolosis ให้เห็นอยู่ แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันการแพร่ระบาดของโรค fasciolosis ในประเทศไทยนั้นไม่ได้ลดลงเลย น่าจะเพิ่มขึ้นมากเสียอีก ภาวะโรคร้อนยิ่งเป็นตัวเร่งของวงจรชีวิตของ *Fasciola* spp. ให้เร็วและเพิ่มขึ้นด้วย ในสถานะการปัจจุบันมีการนำวัวจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น พม่า บังคลาเทศ เข้ามา ซึ่งวัวในแถบนั้นมีการติดเชื้อ *Fasciola* spp. อยู่มาก และในอนาคตมีโอกาศมากที่เชื้อ *F. hepatica* จะมาแพร่ระบาดในประเทศไทยด้วย จึงยิ่งทำให้สถานการแพร่ระบาดไม่อาจหายไปได้เลย ดังมีรายงานหอยในแหล่งน้ำสาธารณะมีการติดเชื้อ *F. gigantica*

พันธุกรรมของ *F. gigantica* และ *F. hepatica* นั้นมีความคล้ายกันร้อยละ 95-100 จึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะผลิตวัคซีนให้ได้ป้องกันครอบคลุมทั้งสองชนิด และปัญหาโรค fasciolosis ยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณะสุขและปศุสัตว์อยู่มาก จึงเป็นโอกาศทางการค้าที่ประเทศไทยจะสามารถผลิตวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ได้เองและสร้างมูลค่ารายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างดี และถ้างานวิจัยนี้สามารถเป็นวัคซีนที่ใช้งานได้จริงซึ่งจะเป็นต้นแบบแนวคิดที่จะสร้างวัคซีนสำหรับโรคพยาธิอื่นๆ เช่น *Opisthorchis viverrini* ที่มีการแพร่ระบาดมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างวัคซีนป้องกันโรค fasciolosis ได้ จึงคิดที่จะต่อยอดงานวิจัยให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสร้างชื่อเสียงกับมหาวิทยาลัยและประเทศชาติ

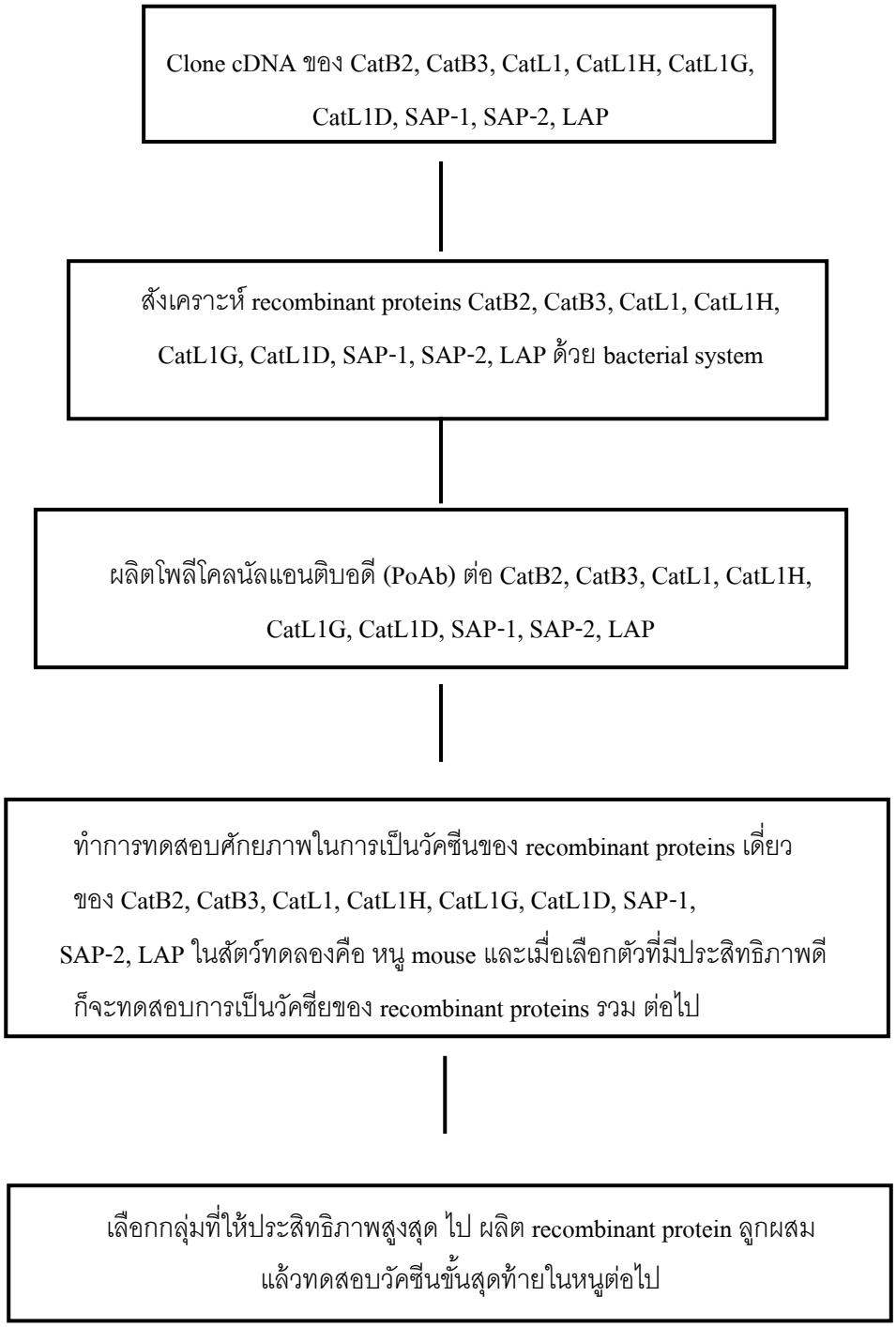
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

การพัฒนาและปรับปรุงศักยภาพของวัคซีนที่สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และ *F. hepatica* โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน จากกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ cathepsin B (CatB), cathepsin L (CatL), leucine aminopeptidase (LAP) และ saposin (SAP) ในหนูทดลอง

1. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์แอนติเจนเดี่ยว (single recombinant protein vaccine) ที่ผลิตจาก *E. coli*
2. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์แอนติเจนรวม (combine recombinant protein vaccine) ที่ผลิตจาก *E. coli*
3. การพัฒนารีคอมบิแนนท์แอนติเจนลูกผสมและศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์แอนติเจนลูกผสม (hybrid recombinant protein vaccine) ที่ผลิตจาก *E. coli*

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

โรคพยาธิส่วนใหญ่ซึ่งรวมทั้งโรคพยาธิใบไม้ตับไม่มีทางที่จะกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ เนื่องจากพยาธิชนิดนี้มีวงจรชีวิตที่แทรกซึมอยู่ในสภาพแวดล้อม โดยมีวงจรชีวิตส่วนหนึ่งที่พัฒนาเฉพาะในหอย lymneae ที่เป็นพาหะกลาง (intermediate host) ซึ่งมีกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำต่าง ๆ และไม่อาจจะกำจัดให้หมดสิ้นไปได้ มาตรการที่จะช่วยให้สามารถควบคุมการติดเชื้อในประชากรของสัตว์ที่เป็นพาหะเฉพาะ (definitive hosts) ได้แก่ วัว ควาย แพะ แกะ ตลอดจนมนุษย์ (ซึ่งเป็น accidental hosts) เพื่อป้องกันการติดเชื้อซ้ำซ้อนจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวัคซีนที่สามารถลดอัตราการติดเชื้อของพยาธิตัวอ่อน (newly excysted juvenile-NEJ) และ/หรือวัคซีนที่สามารถทำลายพยาธิตัวเต็มวัยหรือลดอัตราการออกไข่ของพยาธิ วัคซีนดังกล่าวคือ กลุ่มของแอนติเจนที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพยาธิและไม่มีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับโปรตีนกลุ่มเดียวกันในโฮสท์ โดยเฉพาะกลุ่มเอนไซม์โปรตีเอส (proteases) ได้แก่ CatB/L/D และ LAP ซึ่งพยาธิใช้ในการย่อยอาหาร กับกลุ่มสารที่ช่วยทำให้ผนังเม็ดเลือดแดงที่พยาธิกินเป็นอาหารแตก เช่น SAP



แผนผังแสดงวิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวาร

คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์บทความวิชาการในวารสารนานาชาติที่มี impact factor ค่อนข้างดี (Q1 หรือ Q2) ได้ไม่น้อยกว่า 1 บทความ

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันผลิตสัตว์และสุขภาพสัตว์
2. สถานีบำรุงพันธุ์และวิเคราะห์โรคสัตว์ กรมปศุสัตว์
3. ฟาร์มปศุสัตว์
4. เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์รายย่อย

เนื้อเรื่อง (Main body)

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ

นำเอาตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจากไข่พยาธิไปติดเชื้อในหอย *Lymnaea ollula* ซึ่งนำมาจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อให้ได้ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียสำหรับการทดลองได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากหอย *L. ollula* เป็นพันธุ์ที่มีความทนต่อการติดเชื้อพยาธิกว่าหอย *Radix rubiginosa* ซึ่งเป็นพาหะกลางของพยาธิใบไม้ตับ โค กระบือ ตามธรรมชาติในประเทศไทย การเพาะเลี้ยงหอย *L. ollula* กระทำโดยนำหอยตัวเต็มวัยประมาณ 30 ตัว ใส่ในอ่างพลาสติกสีขาว ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 ซ.ม. สูงประมาณ 9 ซ.ม. ภายในอ่าง ใส่ดินเหนียวและก้อนหิน ทำเป็นทางลาดเพื่อให้หอยวางไข่ เติมน้ำให้ท่วมดินเหนียวและก้อนหินประมาณ 2 ซ.ม. ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงไปในอ่างน้ำตลอดเวลา และให้แสงสว่างโดยใช้ไฟนีออนขนาด 40W เป็นเวลา 8 ซ.ม. ต่อวัน ให้อาหารคือผักกาดหอม

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*

(1) นำเอาไข่พยาธิที่ได้จากถุงน้ำดีของโคหรือกระบือที่ติดเชื้อพยาธิมาล้างน้ำดีออกด้วยน้ำที่ปราศ จากคลอรีน จากนั้นรวมเอาไข่ที่ได้ใส่จานแก้ว (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 ซม. เติมน้ำให้ท่วมฝาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการพัฒนาของไข่พยาธิทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope) พยาธิใช้เวลาประมาณ 14-16 วัน จึงจะเจริญเป็นระยะไมราซิเดียม และฟักออกมาจากไข่

(2) นำหอยที่โตเต็มที่ขนาดประมาณ 4-5 มม. แยกออกมาใส่ถ้วยพลาสติกซึ่งบรรจุน้ำปราศจากคลอรีน ดูดเอาตัวอ่อนพยาธิระยะไมราซิเดียม จำนวน 2 ตัว ใส่ลงไปในถ้วยที่ใส่หอยไว้แล้วใช้หลอดไฟขนาด 40W ส่องห่าง ๆ เพื่อช่วยกระตุ้นไมราซิเดียซึ่งไวต่อแสง ตั้งถ้วยทิ้งไว้ประมาณ 2 ชม. เพื่อให้ไมราซิเดียวไชเข้าไปในหอย หลังจากนั้นแยกเอาหอยออกมาเลี้ยงตามปกติ

การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercariae) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อนพยาธิใช้เวลาในการเจริญในหอยประมาณ 6 สัปดาห์ จึงจะได้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งจะออกจากหอยมาว่ายอยู่ในน้ำ หลังการติดเชื้อได้สัปดาห์ที่ 5 จึงเริ่มตรวจดูหอยที่ติดเชื้อไว้ และแยกหอยที่ติดเชื้อออกมาเลี้ยงรวมกันในที่ซึ่งพรางแสง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียออกมาจากหอย

สำหรับการเก็บตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียดำเนินการดังต่อไปนี้

(1) นำหอยที่ได้ติดเชื้อไว้แล้วแยกใส่ถ้วยพลาสติกใสที่มีน้ำปราศจากคลอรีนทำเช่นนี้ทุกวันเว้นวัน

(2) ใช้แผ่นพาลสติกบางใสขนาด 5x5 ซม. ใส่ลงในถ้วย

(3) ใช้โคมไฟขนาด 40W ส่องกระตุ้นให้เซอร์คาเรียออกจากหอย

(4) ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่ออกมาจากหอยจะว่ายอยู่ในน้ำระยะเวลาสั้น ๆ แล้วจึงเกาะกับแผ่น พลาสติก สลัดหางทิ้ง สร้างซิสต์ระยะเมตาเซอร์คาเรียขึ้นมา

(5) หลังจากนั้นประมาณ 2 ชม. แยกเอาหอยออกไปเลี้ยงตามเดิม นำเอาแผ่นพลาสติกออกมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บแผ่นพลาสติกที่มีเมตาเซอร์คาเรียไว้ในตู้เย็น ซึ่งเมตาเซอร์คาเรียจะมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 1 สัปดาห์

การสังเคราะห์ recombinant proteins

กระบวนการผลิต recombinant proteins ของจีนเป้าหมายจะกระทำโดยใช้ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนและสุดท้ายทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีนรีคอมบิแนนท์โปรตีน recombinant protein vaccine

กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั้งในรูปของโปรตีนเดี่ยว (single vaccine) โปรตีนผสม (cocktail vaccine) และโปรตีนลูกผสม (hybrid protein vaccine)โดยผสมกับสาร adjuvants เช่น Freund ในการศึกษาส่วนนี้ผู้ทำการวิจัยจะทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองต่อ recombinant proteins เป้าหมาย (CatB, CatL, SAP, LAP) โดยเลือกใช้ Freund's เป็น adjuvant โดยทำการฉีดกระตุ้น 2 วิธี เพื่อเปรียบเทียบผล คือ ใต้ผิวหนัง โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง กลุ่มทดลองละ 10 ตัว ได้แก่

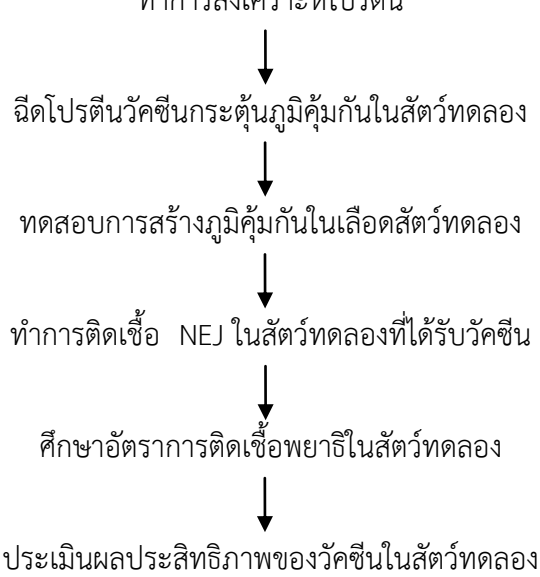
กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดกระตุ้นใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ 1

กลุ่มที่ 2 ทำการฉีดกระตุ้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มีโปรตีนผสมเป็นกลุ่มควบคุมที่ 2

กลุ่มที่ 3 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย บัฟเฟอร์ผสมกับ adjuvant

กลุ่มที่ 4 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย recombinant protein 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง

นำโปรตีนจำนวน 50 ไมโครกรัม ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline) ผสมกับ Freund' s Adjuvant ในปริมาณเท่า ๆ กัน และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจนกระทั่งเหนียวข้นไม่แตกตัวกระจาย และจับตัวเป็นกลุ่มเมื่อหยดทดสอบลงในน้ำ จากนั้นฉีดเข้าช่องท้องหนูหรือใต้ผิวหนังโดยฉีดทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยผสมโปรตีน Complete Freund's Adjuvant สำหรับการฉีดครั้งแรก และจะผสมโปรตีนกับ Incomplete Freund's Adjuvant สำหรับการฉีดครั้งต่อไป เมื่อครบ 2 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งที่ 3 จะเก็บเลือกจากหางหนูเพื่อทดสอบการสร้างภูมิคุ้มกันในหนู และจากนั้นจะทำการทดสอบการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ โดยการป้อนเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 15 เม็ด และหลังจากป้อนเมตาเซอร์คาเรีย 4 สัปดาห์ จะฆ่าหนูเพื่อคำนวณหาค่าร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อ



แผนภูมิ แสดงแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาโปรตีนวัคซีน เพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันการติดเชื้อพยาธิ

ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมคุ้มกัน

ทำการวัดระดับของ immunoglobulin (Ig) โดยเฉพาะ IgG1 และ IgG2 เพื่อดูการตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์ FgCatL1G โดยวิธี indirect ELISA

Coat plate with rmFgCatL1G

↓

Primary antibody (mice sera)

↓

Secondary antibody (HRP-goat anti-mouse IgG1 & IgG2)

↓

TMB

↓

Reaction measurement (plate reader at OD_{450})

แผนภูมิที่ 2 แสดงการทำ ELISA

การนับจำนวนพยาธิ

หนูถูกทำให้ตายด้วย ether หลังจากการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ 4 สัปดาห์ แล้วนำตับหนูออกมาใส่ในน้ำเกลือ และฉีกตับหนูให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปล่อยให้ตัวพยาธิออกมาจากตับ หลังจากนั้นนับจำนวนพยาธิจากตับของหนูแต่ละตัว เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

ตรวจวัดระดับ liver enzymes ในเลือด

ตรวจวัดระดับ เอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT) เพื่อตรวจวัดความผิดปกติของตับ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (automatic machine)

วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

1. ทำการคำนวณหาค่า % protection ของกลุ่มที่ 4 และ 5 โดยเทียบกับกลุ่มที่ 2 และ 3 ดังสูตรด้านล่าง

   % Protection = (A - B)/A X 100

   ‘‘A” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มควบคุมที่ 1 หรือ 2

   ‘‘B” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มทดสอบที่ 3 หรือ 4
2. เปรียบเทียบ ระดับของแอนติบอดี และ เอนไซม์ตับ ของกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ one-way ANOVA and Kruskal-Wallis Test และ ใช้โปรแกรม SPSS version 18.0 ในการคำนวณ และ ที่ $p \leq 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

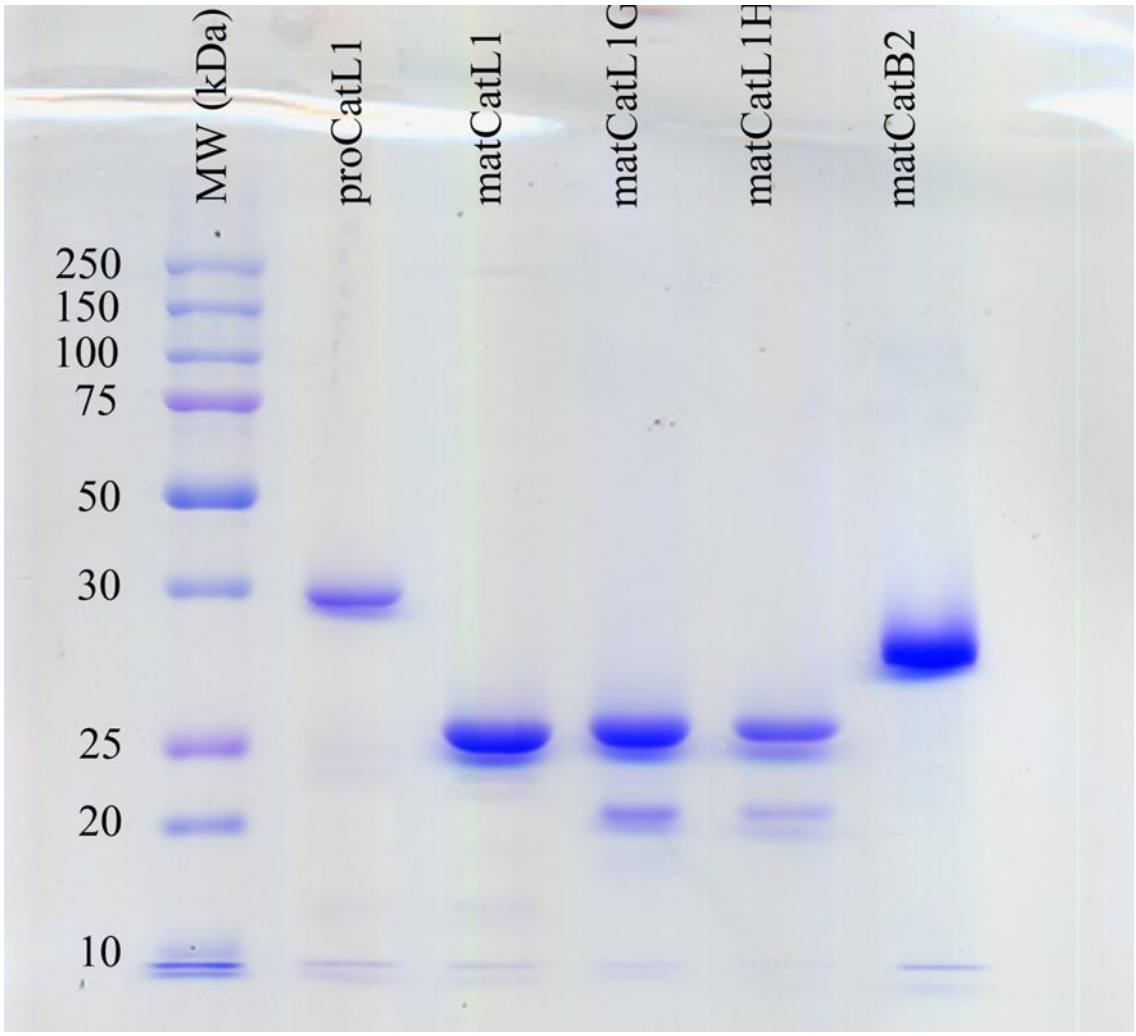
ผลการวิจัย (Results)

1. การ clone cDNA ของ CatL1, CatL1H, CatL1G, CatL1D, CatB2, SAP2 และ LAP แล้ว ยีน

ได้ทำการโคลนยีน CatL1, CatL1H, CatL1G, CatL1D, CatB2, SAP2 และ LAP โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ cDNA libraries จาก *F.gigantica* เป็น template หลังจากนั้นได้ทำการผลิต recombinant DNA โดย ligate ยีนที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทำการวิเคราะห์หาลำดับ DNA โดย Macrogen Inc (South Korea) หลังจากนั้นวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยโปรแกรม BLAST (The National Center for Biotechnology Information, NCBI, http://ww.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) และ SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004; http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)

2. **สังเคราะห์ recombinant protein**

การสังเคราะห์ recombinant proteins (CatL1, CatL1H, CatL1G, CatL1D, CatB2, SAP2 และ LAP) ทำโดยการ ligate cDNA ของจีนเป้าหมายกับ expression vector ของระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย (prokaryotic system) คือ pET-30b และ pET-21b หลังจากนั้นจึงนำ vector เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งคือเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นปล่อยให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของจีนโดยใช้ isopropyl-β-D- thiogalactoside (IPTG) และทำให้เซลล์แบคทีเรียสลายและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA หลังจากนั้นศึกษาขนาดของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue โดยขนาด (molecular weight) ของ matureCatL1 (mCatL1), mCatL1H, mCatL1G, mCatL1D, mCatB2 ที่ 30, 25, 25, 25, 28 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงขนาดของ recombinant proteins (lane 1: proCatL1, lane 2: matCatL1, lane 3: matCatL1G, lane 4: matCatL1H, lane 5: matCatB

3. ทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ โปรตีน rmFgCatL1G ในหนูทดลอง

กลุ่มการทดลองแบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยหนู ICR เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดกระตุ้น และไม่มีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ

กลุ่มที่ 2 ไม่มีการฉีดกระตุ้น และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ

กลุ่มที่ 3 ทำการฉีดกระตุ้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มีโปรตีนผสม และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ

กลุ่มที่ 4 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วย rmFgCatL1G 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง และมีการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ

โดยแต่ละกลุ่มทำการฉีดกระตุ้นหนู 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ และหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ทำให้หนูติดเชื้อตัวละ 15 metacercariae หลังจากนั้น 4 สัปดาห์หลังจากทำให้หนูติดเชื้อ ก็ทำการฆ่าหนูโดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เก็บตับและนับจำนวนพยาธิเพื่อคำนวณหาร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ และผลการทดสอบวัคซีนมีการแสดงระดับการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rmFgCatL1G เท่ากับร้อยละ 56.5 และ 58.3 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3.

ตางรางแสดงร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* หลังจากฉีดกระตุ้นด้วย rmFgCatL1G

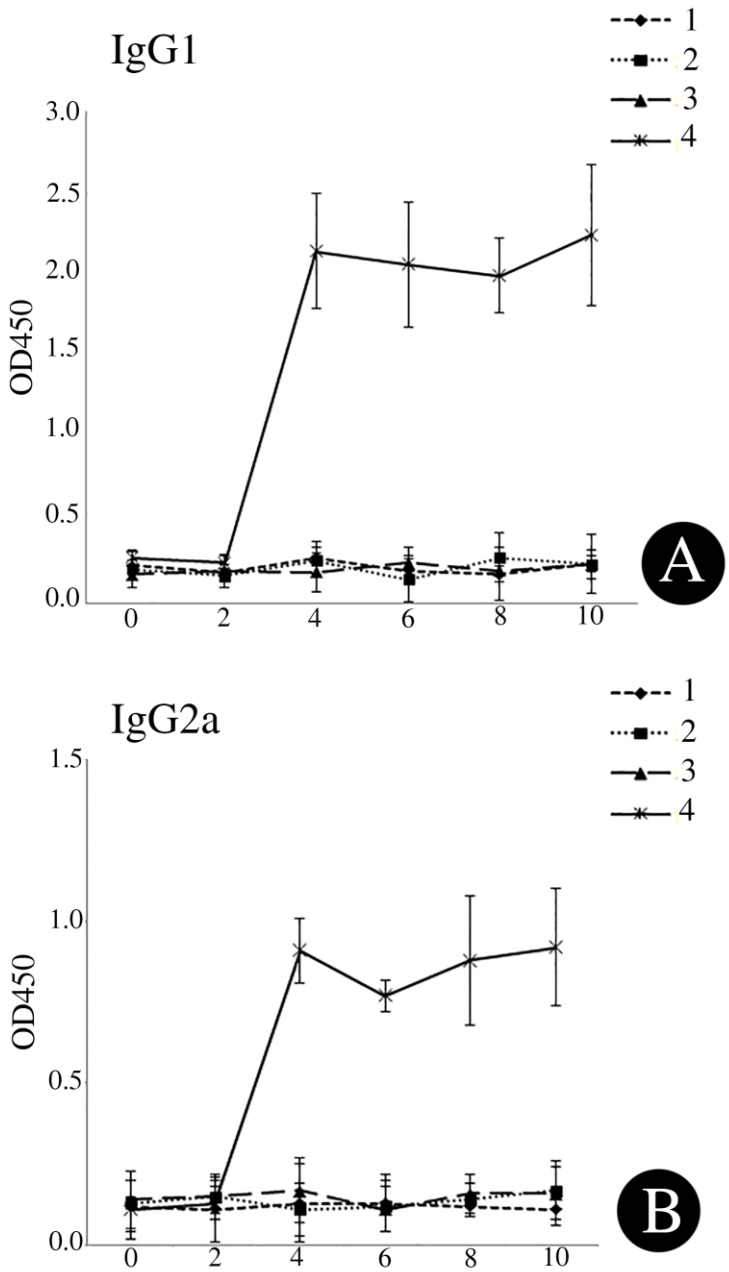
Groups	Mice	Treatments	Reduction (%)
1.Uninfected Control	10	Non-immunized and uninfected	_
2.Infected Control	10	Non-immunized and infected	_
3.Adjuvant Control	10	Immunized with Adjuvant and infected	_
4.rmFgCathL1G	10	50 µg of rmFgCatL1G and infected	56.5 [a] *, 58.3[b]*

* Significant in worm reduction compared with control groups ($p < 0.05$).

[a] Percent reduction, compared with group 2, [b] Percent reduction, compared with group 3

4. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของรีคอมบิแนนท์ rmFgCatL1G ในหนู ICR และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ต่อรีคอมบิแนนท์ rmFgCatL1G

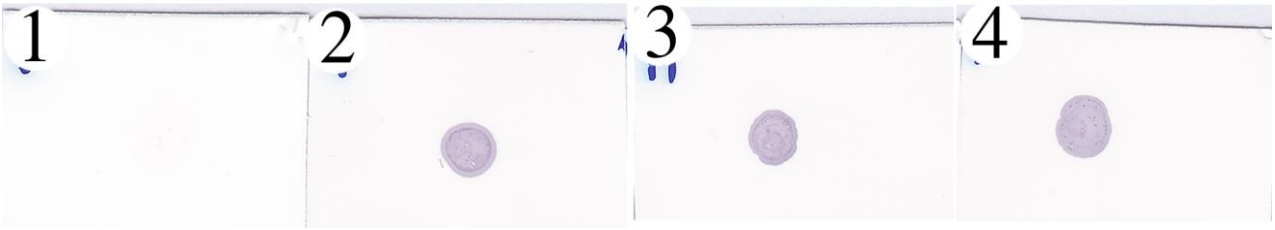
จากการทำให้หนูติดพยาธิโดยการป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ (*F. gigantica*) ในระยะ Metacercaria พบว่าโปรตีน rmFgCatL1G สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้ โดยมีระดับของ Immunoglobulin (Ig) ชนิด IgG1และ IgG2a ในกระแสเลือดสูงขึ้น (รูปที่ 2)



<u>รูปที่ 2</u> แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (humoral) โดยเฉพาะ IgG1 และ IgG2a พบว่าทั้งในกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วย rmFgCatL1G สามารถกระตุ้นภูมคุ้มกันได้ทั้ง IgG1 และ IgG2a (2A & 2B) แต่ระดับของ IgG1 จะสูงกว่า IgG2a ;1=Uninfected control, 2=Infected control, 3=Adjuvant control, 4=rmFgCatL1G

5. ผล dot blot

โปรตีน catL1s ที่สกัดได้จากการตัวพยาธิตัวอ่อน (newly excysted juvenile) (2), ตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ (WB) (3) และ ES ของตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ (4) มาวิเคราะห์โดยการทดสอบการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากหนูในกลุ่มวัคซีน โดยวิธี dot blot พบว่า ในกลุ่ม rmFgCatL1G ทำปฏิกิริยากับโปรตีน CatL1s (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงผล dot blot

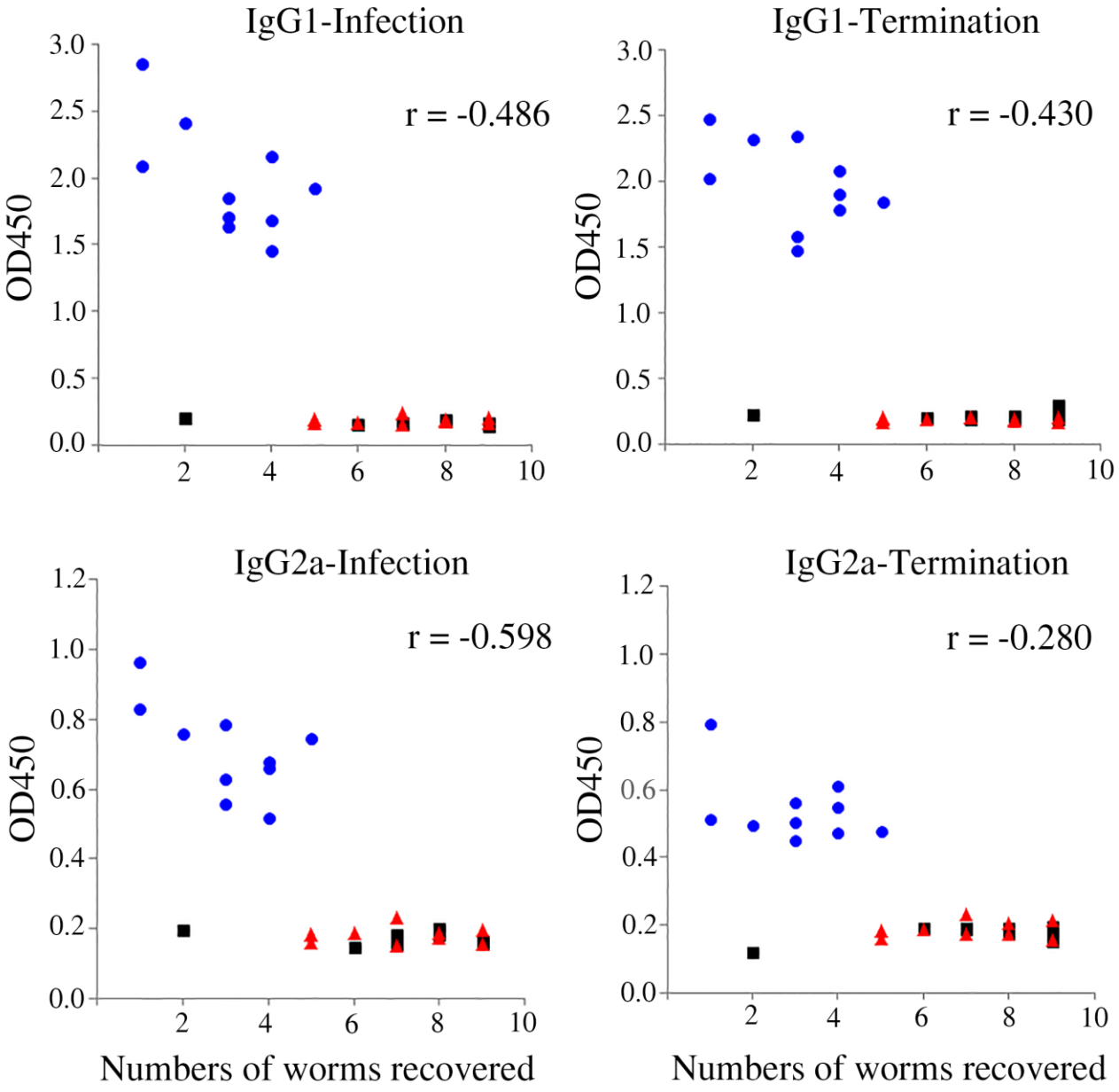
6. ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับ จำนวนพยาธิ

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ IgG1และ IgG2a และจำนวนพยาธิที่จุด ทำให้ติดเชื้อ (infection) และ termination (รูปที่. 4) พบว่าค่าที่ได้ IgG1 มีค่าที่สูงกว่า IgG2a (IgG1 showed stronger correlations than IgG2a) ซึ่งมีค่าดังนี้: IgG1 at infection , r = -0.486 (p=0.154), at termination, r = -0.430 (p=0.215); IgG2a at infection, r = -0.598 (p=0.068), at termination, r = -0.280 (p=0.432).

● = คือระดับของ OD_{450} และจำนวนพยาธิในกลุ่ม rmFgCatL1G vaccinated group

■ = คือระดับของ OD_{450} และจำนวนพยาธิในกลุ่ม the adjuvant and infected control group

▲ = คือระดับของ OD_{450} และจำนวนพยาธิในกลุ่ม non immunized and infected control group



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของระดับแอนติบอดี (IgG1 และ IgG2a) กับ จำนวนพยาธิ

7. ระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT)

ระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT) มีค่าสูงขึ้นที่จุด termination ทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่ม non-immunized and uninfected แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม rmFgCatL1G-immunized and infected และ กลุ่มควบคุม พบว่าระดับเอนไซม์ของกลุ่ม rmFgCatL1G-immunized and infected มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (รูปที่ 5)

* เท่ากับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

(1) non-immunized and uninfected

(2) non-immunized and infected

(3) Freund's adjuvant and infected

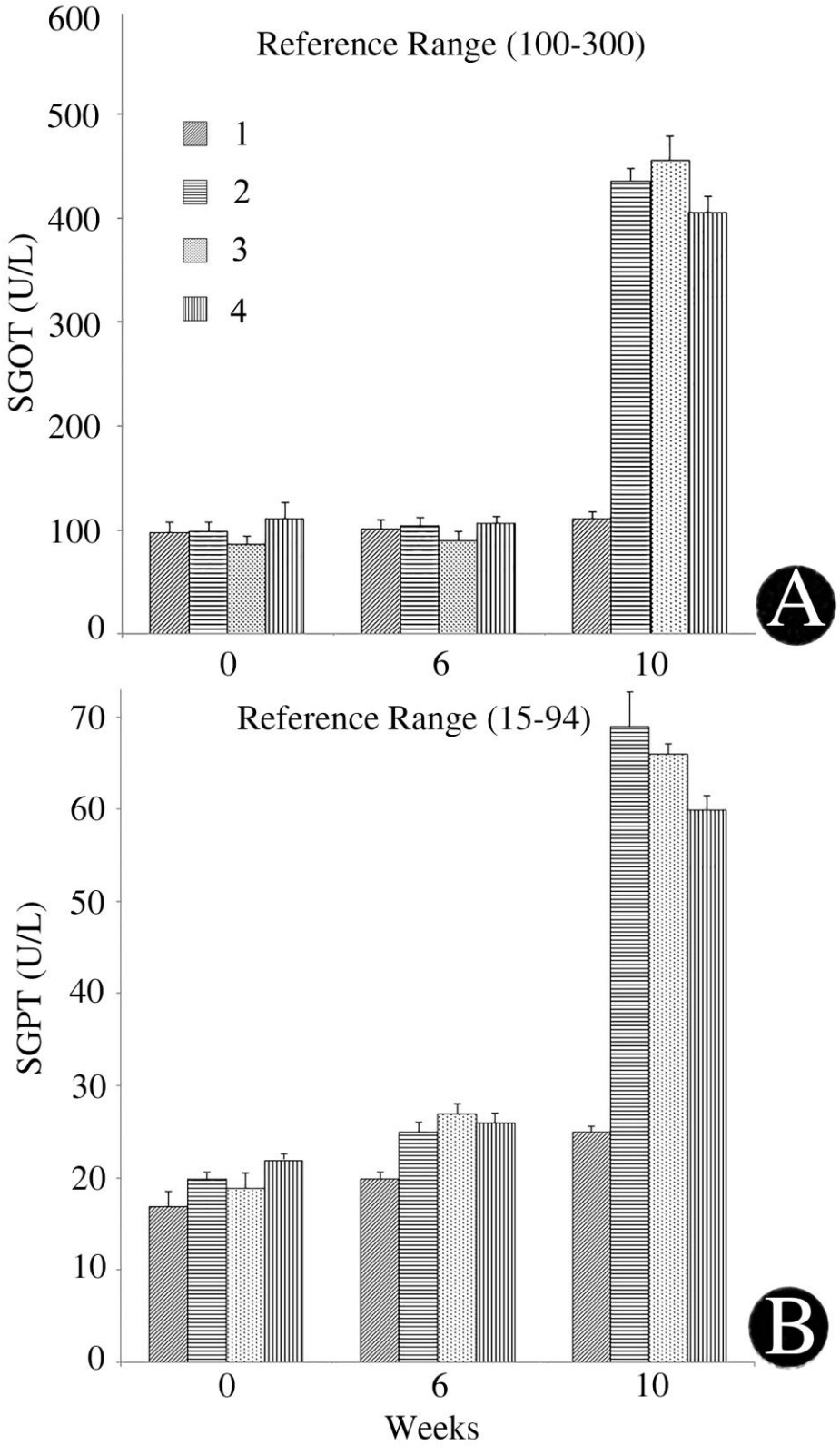
(4) rmFgCatL1G-immunized and infected

ตารางที่ 4. The pathological lesions of the livers were analyzed by scoring the damage lesions. In rFgCatL1G-vaccinated group.

Group	Mean liver damage score ± SD
1. Uninfected Control	-
2. Infected Control	3.3 ± 1.1
3. Adjuvant Control	3.4 ± 0.8
4. rmFgCatL1G	1.8 ± 0.9 [a]*, [b]*

*Significant in reduction of liver pathological lesion when compared with control group at p-value less than 0.05.

[a] Liver damage score, compared with group 2, [b] Liver damage score, compared with group 3



รูปที่ 5 แสดงระดับเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT)

(1) non-immunized and uninfected (2) non-immunized and infected

(3) Freund's adjuvant and infected (4) rmFgCatL1G-immunized and infected

สรุปผลการวิจัย

ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์ยีน (cDNA) และโปรตีนของ pro CatL1, mature CatL1, CatL1G, CatL1H และ CatB2 ได้สำเร็จ โดยการใช้วิธี screening cDNA libraries ของพยาธิ *F. gigantica* ด้วย primers ที่ออกแบบและสังเคราะห์จากยีนที่คล้ายกันจากพยาธิ *F. hepatica* ค้นได้จากฐานข้อมูล NCBI ซึ่งโปรตีน pro CatL1, mature CatL1, CatL1G, CatL1H และ CatB2 มีมวลโมเลกุล (MW) เท่ากับ 30, 25, 25, 25, 28 ตามลำดับ จากนั้นนำ recombinant proteins mature CatL1G (rFgCatL1G) มาทดสอบศักยภาพในการเป็นวัคซีนในหนู โดยการ immunize หนูด้วย recombinant proteins ผสมกับ Freud's adjuvant เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วติดเชื้อพยาธิด้วยการป้อน metacercaria 15 อันต่อหนูหนึ่งตัว เพื่อประเมินค่า percent protection พบว่าระดับของการป้องกันการติดเชื้อในกลุ่ม rmFgCatL1G เท่ากับ ร้อยละ 58.3 และ 56.5 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม non vaccinated-infected และ adjuvant-infected controls ตามลำดับ และแอนตอบอดีจากหนูในกลุ่มวัคซีนมีการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่สกัดได้จากตัวพยาธิระยะตัวอ่อนระยะแรก ตัวอ่อนระยะ 4 สัปดาห์ และโปรตีนที่พยาธิระบะ 4 สัปดาห์ปล่อยออกมา (ES) โดยโปรตีน rmFgCatL1G สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral ได้ โดยมีระดับของ Immunoglobulin (Ig) ชนิด IgG1และ IgG2a ในกระแสเลือดสูงขึ้น และระดับการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดียังมีความสัมพันธ์กับการลดลงของจำนวนพยาธิอีกด้วย โดยเฉพาะระดับของ IgG1 ส่วนระดับของเอนไซม์ตับ (SGOT และ SGPT) ที่บ่งบอกถึงความเสียหายของเนื้อเยื่อตับ พบว่าในกลุ่ม rmFgCatL1G ค่าเอนไซม์ตับทั้ง 2 ชนิด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ $p<0.05$

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

1) โดยทั่วไปแล้วการวิจัยในโครงการนี้ให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ที่ตั้งไว้ คือในปีแรกได้มีการผลิต recombinant proteins ได้สำเร็จ ทั้งสิ้น 5 โปรตีนคือ pro CatL1, mature CatL1, CatL1G, CatL1H และ CatB2 และได้มีการทดสอบวัคซีนแล้ว 3 โปรตีน พร้อมทั้งได้มีการวิเคราะห์ข้อมูลและได้มีการเผยแพร่โดยการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติเป็นที่เรียบร้อยแล้วคือโปรตีน pro CatL1 และ mature CatL1 (ทุน วช. 2558) (Kueakhai P, Changklungmoa N, Chaichanasak P, Jaikua W, Sobhon P. Vaccine poteintial of recombinant cathepsinL1 against fasciola gigantica in mice. Acta Trop 2015;.150, 71-78) และ โปรตีน mature CatL1G (ทุน วช 2559) (Changklungmoa N, Phoinok N, Yencham C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. Vet Parasitol 2016; 226: 124-131) ส่วนโปรตีนอื่น ๆ อยู่ระหว่างการดำเนินการทดสอบวัคซีนเดี่ยว และโปรตีนรวม แล้วจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลและมีการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มีคุณภาพอยู่ในระดับดีต่อไปในปี 2560 ส่วนปัญหาก็ในการวิจัยคือ มีการผลิต metacercariae ไม่เพียงพอต่อการทดสอบ อาจจะต้องใช้เวลาในการผลิตและทดสอบวัคซีน และอาจจะทำให้การทดสอบวัคซีนลูกผสมล่าช้าไปบ้าง

สรุปและเสนอแนะ

ไม่มี

(5) ผลผลิต (Output)

(5.1) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชิการทั้งในและระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. Changklungmoa N, Phoinok N, Yencham C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. Vet Parasitol 2016; 226: 124-131. (ภาคผนวก)

(5.2) การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

(5.3) ผลงานเชิงพาณิชย์ (มรการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ไม่มี

(5.4) ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 3930100116821 สัญญาเลขที่ 31/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาวัคซีนจากแอนติเจนในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนสำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. พรอนันต์ เกื้อไข่

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 25 กรกฎาคม 2559

ระยะเวลาดำเนินการ.....-.....ปี.....9.....เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	421,245	บาท	เมื่อวัน 1 เดือน ธันวาคม	ปี 2558
งวดที่ 2 (40%)	336,996	บาท	เมื่อวัน 2 เดือน กุมภาพันธ์	ปี 2559
งวดที่ 3 (10%)		บาท	เมื่อวัน - เดือน -	ปี -
รวม	758,241			

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	72,000	72,000	-
2. ค่าจ้าง	120,000	120,000	-
3. ค่าวัสดุ	503,490	480,500	22,990
4. ค่าใช้สอย	147,000	67,000	80,000
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช่จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย)	-	-	-
รวม	842,490	739,500	102,990

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม (Bibliography)

Aban JL, Ramajo V, Arellano JL, Oleaga A, Hillyer GV, Muro A, 1999. A fatty acid binding protein from Fasciola hepatica induced protection in C57/BL mice from challenge infection with Schistosoma bovis. Vet Parasitol. 83: 107-121.

Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF. 2008. Fasciola hepatica leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. Molecular and Biochemical Parasitology, 158, 52-64.

Alarcon JB, Waine GW, McManus DP, 1999. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. Adv Parasitol. 42: 343-410.

Bruhn H, 2005. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. Biochem J. 389: 249-257.

Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP, 1993. Cathepsin L proteinase secreted by Fasciola hepatica in vitro prevents antibody-mediated coxinophil attachment to newly excysted juveniles. Mol Biochem Parasitol. 62: 9-17.

Changklungmoa N, Kueakhai K, Riengrojpitak S, Chaithirayanon K, Chaichanasak P, Preyavichyapugdee N, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. 2013. Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against Fasciola gigantica in mice. Parasitol Res. 112, 3653–3659.

Changklungmoa N, Poinok N, Yencham C, Sobhon P, Kueakhai P. Vaccine potential of recombinant cathepsinL1G against *Fasciola gigantica* in mice. Vet Parasitol 2016; 226: 124-131.

Chantree P, Phatsara M, Meemon K, Chaichanasak P, Changklungmoa N, Kueakhai P, Lorsuwannarat N, Sangpairoj K, Songkoomkrong S, Wanichanon C, Itagaki T, Sobhon P. 2013 Vaccine potential of recombinant cathepsin B against Fasciola gigantica. Experimental Parasitology 135:102-109.

Creaney J, Wilson L, Dosen M, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC, 1996. Fasciola hepatica: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. Exp Parasitol. 83: 202-215.

Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ, 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with Fasciola hepatica by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. Infect Immun. 64: 5066-5074.

Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA, 1997. DNA vaccines. Annue Rev Immunol. 15: 617-648.

EL-Ahwany E, Rabia I, Nagy F, Zoheiry M, Diab T, Zada S, 2012. Protective Role of Purified Cysteine Proteinases against Fasciola gigantica Infection in Experimental Animals. Korean J Parasitol. 50: 45-51.

Espino AM, Hillyer GV, 2003. Molecular cloning of a member of the Fasciola hepatica saposin-like protein family. J Parasitol. 89: 545-552.

Espino AM, Morales A, Delgado B, Rivera FM, Figueroa O, Suárez E. 2010. Partial immunity to Fasciola hepatica in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. Ethnicity and Disease 20, S1-17-23.

Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosari E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, Spithill TW, 1997. Evaluation of antigens of Fasciola gigantica as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. Int J Parasitol. 27: 1419-1428.

Golden O, Flynn R.J, Reed C, Sekiya M, Donnelly S.M, Stack C., et al. 2010. Protection of cattle against a natural infection of Fasciola hepatica by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). Vaccine. 28, 5551-5557.

Hall RF, Lang BZ, 1978. The development of an experimental vaccine against Fasciola hepatica in cattle. Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc. 82: 56-60.

Haroun ET, Hillyer GV, 1986. Resistance to fascioliasis—a review. Vet Parasitol. 20: 63-93.

Hillier GV, Haroun ET, Hemandez A, de Galanes MS. 1987. Acquired resistance of Fasciola hepatica in cattle using a purified adult worm antigen. Am J Trop Med Hyg. 37: 363-369.

Jaikua W, Kueakhai P, Chaithirayanon K, Tanomrat R, Wongwairot S, Riengrojpitak S, Sobhon P, Changklungmoa N, 2016. Cytosolic superoxide dismutase can provide protection against *Fasciola gigantica*. Acta Trop, 162:75-82.

Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM. 2010. Liver fluke vaccines: Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of recombinant stage-specific antigens. Procedia in Vaccinology 2: 82-85.

Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PT. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. Vet Parasitol. 160: 230-236.

Kalinna BH, 1997. DNA vaccines for parasitic infections. Immunol Cell Biol. 75: 370-375.

Kueakhai P, Changklungmoa N, Riengrojpitak S, Chaichanasak P, Meemon K, Chaithirayanon K, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P. 2013. Vaccine potential of recombinant saposin-like protein 2 against Fasciolosis gigantica in mice. Vaccine, Accepted.

Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, Whisstock JC, Pike RN, Spithill TW. 2003. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile Fasciola hepatica and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. Infect Immun. 76: 6921-6932.

Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, et al. 2012. The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against Fasciola hepatica infection in sheep. Vaccine, 29, 9057-9063.

Meemon K, Grams R, Vichari-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Habe S, Sobhon P, 2004. Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from Fasciola gigantica. Mol Biochem Parasitol. 136: 1-10.

Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wieker J, Friedel T, Spithill TW, 1996. Protection of cattle against Fasciola hepatica infection by vaccination with glutathione S-transferas. Vaccine. 14: 1603-1612.

Mulcahy G. O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ, Dalton JP, 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against Fasciola hepatica. Vaccine. 16: 932-939.

Muro A, Ramajo V, Lopez J, Simon F, Hillyer GV. 1997. Fasciola hepatica: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. Vet Parasitol. 69: 219-229.

Nansen P, 1975. Resistance in cattle of Fasciola hepatica induced by gamma-ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. Res Vet Sci. 19: 278-283.

Ogra PL, Faden HS, Abraham R, Duffy LC, Sun M, Minor PD, 1991. Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines. J Infect Dis. 164: 191-194.

Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C, 1999. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. Infect Immun. 67: 1954-1961.

Raina OK, Nagar G, Varghese A, Prajitha G, Alex A, Maharana BR, et al. 2011. Lack of protective efficacy in buffaloes vaccinated with Fasciola gigantica leucine aminopeptidase and peroxiredoxin recombinant proteins. Acta Tropica, 118, 217-222.

Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA, Panaccio M, 1998. Fasciola hepatica: stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. Exp Parasitol. 89: 169-179.

Reed MB, Strugnell RA, Panaccio M, Spithill TW, 2000. A novel member of the NK-lysin protein famity is developmentally regulated and secreted by Fasciola hepatica. Mol Biochem Parasitol. 105: 297-303.

Reszka N, Cornelissen JB, Harmsen MM, Bienkowska-Szewczyk K, de Bree J, Boersma WJ, Rijsewijk FA. 2005. Fasciola hepatica procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. Vaccine. 23: 2987-2993.

Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF, et al., 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against Fasciola hepatica infection in sheep. J Immunol. 145: 3905-3910.

Sexton JL, Wilee MC, Colin T. Wijiffels GL, Salvatore L, Feil S, Parker MW, Spithill TW, Morrison CA, 1994. Vaccination of sheep against Fasciola hepatica with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. J Immunol. 152: 1861-1872.

Smith AM, Dowd AJ, McGonigle S, Keegan PS, Brennan G, Trudgett A, Dalton JP, 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult Fasciola hepatica. Mol Biochem Parasitol. 62: 1-8.

Smooker PM, Steeper KR, Drew DR, Strugnell RA, Spithill TW, 1999. Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of Fasciola hepatica: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. Parasite Immunol. 21: 357-364.

Srihakim S, Pholpark M, 1991. Problem of fascioliasis in animal husbandry in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 22: 352-355.

Sukhapesna V, Sarataphan N, Tuntasuvan D, Sangiamkuksana S, 1990. A study on epidemiology of liver fluke infections in buffaloes. Thai J Vet Med. 20: 527-534.

Tang DC, DeVit M, Johnston SA, 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature. 356: 152-154.

Tendler M, Vilar MM, Brito CA, Freire NM, Katz N, Simpson A, 1995. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine. Mem Inst Oswaldo Crus. 90: 255-256.

Weeks-Levy C, Tatem JM, DiMichele SJ, Waterfield W, Georgiu AF, Mento SJ, 1991. Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. Virology. 185: 934-937.

Wijiffels GL, Salvatore L, Dosen M, Waddington J, Wilson L, Thompson C, Campbell N, Sexton J, Wicker J, Bowen F, et al., 1994. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of Fasciola hepatica decreases worm fecundity. Exp Parasitol. 78: 132-148.

Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijiffels GL, Sandeman RM, Spithill TW, 1998. Fasciola hepatica: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. Exp Parasitol. 88: 85-94.

Zhai Y, Saier MHJ, 2000. The amoebapore superfamily. Biochem Biophys Acta. 1469: 87-99.

ภาคผนวก

(Appendix)