รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากโปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (Short Synthetic Peptides) ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและสารเสริมฤทธิ์ (Adjuvants) สำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ Fasciolosis

Developments of the vaccines using short synthetic peptides of protease enzymes and adjuvants for fasciolosis

ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๒๓๔๗๓
สัญญาเลขที่ ๒๑/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวัคซีนจากโปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (Short Synthetic Peptides) ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและสารเสริมฤทธิ์ (Adjuvants) สำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ Fasciolosis

Developments of the vaccines using short synthetic peptides of protease enzymes and adjuvants for fasciolosis

ผศ.ดร.นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ
สาขาวิชาพยาธิวิทยากายวิภาค คณะสหเวชศาสตร์

ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 21/2562

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 21/2562).

บทคัดย่อ

พยาธิ *Fasciola gigantica* เป็นพยาธิใบไม้ในตับ ซึ่งเป็นพยาธิที่ก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ในตับ (Fasciolosis) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากปรสิตเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของคน และสัตว์เลี้ยง เช่น โค กระบือ แพะ และแกะ เป็นต้น การระบาดค่อนข้างมากในสัตว์เศรษฐกิจจำพวกโค กระบือ ในประเทศเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย ซึ่งเมื่อเกิดการติดเชื้อก็สามารถทำให้เกิดตับอักเสบท่อน้ำดีอักเสบหรืออุดตัน ในปัจจุบันการรักษาด้วยยาฆ่าพยาธินั้นทำให้ในแต่ละปีจะต้องใช้ยาฆ่าพยาธิในปริมาณที่มากขึ้นเป็นผลให้เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ทำให้ประเทศไทยสูญเสียรายได้ถึง 350-400ล้านบาทต่อปี จึงมีการใช้ Excretory secretory products (ES) เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้โฮสต์สร้าง IgG1, IgG2a เพื่อใช้ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่ง ES เป็นโปรตีนแอนติเจนที่หลั่งออกมาจากทางเดินอาหารของพยาธิ ได้แก่ saposin-like protein2 (SAP-2), leucine aminopeptidase (LAP) ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ recombinant *Fasciola gigantica* saposin-like protein 2 (rFgSAP-2) และrecombinant *Fasciola gigantica* leucine aminopeptidase (rFgLAP) และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี กับจำนวนพยาธิใบไม้ตับ (worm recovery)

ในการศึกษาครั้งนี้กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ combine vaccine แบ่งหนูเป็น 6 กลุ่ม โดยหนูกลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับวัคซีนและ Alum ซึ่งเป็น negative control กลุ่มที่ 2 เป็นหนูฉีด Alum และ Vaccine ซึ่งเป็น positive control กลุ่มที่ 3 ฉีดเฉพาะ Alum กลุ่มที่ 4 ฉีด Alum ร่วมกับ rFgSAP-2 กลุ่ม 5 ฉีด Alum และ ฉีด rFgLAP และ กลุ่ม 6 ฉีด Alum และ ฉีด rFgSAP-2 กับ rFgLAP โดยนำ rFgSAP-2 และ rFgLAP มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำมาหาความเข้มด้วยวิธี (Lowry method) โดยสร้าง standard curve และวัดขนาดของโปรตีนด้วยการรันเจล (gel electrophoresis) เทียบกับ marker ซึ่งพบว่า SAP-2 มีขนาด 10 kDa และ LAP มีขนาด 57.6 kDa หลังจากนั้นกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูด้วย rFgSAP-2 และ rFgLAP โดยใช้ระยะเวลา 0 สัปดาห์, 4 สัปดาห์ (infection) และ 6 สัปดาห์ (termination) จากนั้นนำซีรัมของหนูแต่ละช่วงเวลามาหาระดับ IgG1 และ IgG2a ที่ตอบสนอง โดยเทียบกับ positive control , negative control ,adjuvate control พบว่า ระดับแอนติบอดี IgG1 มีค่ามากกว่า IgG2a ทั้งระยะ infection และ termination จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของ Anti-FgSAP-2, Anti-FgLAP และAnti-FgSAP-2 + Anti-FgLAP ต่อ recombinant protein SAP-2 (rFgSAP-2) และ recombinant protein LAP (rFgLAP) แต่ละชนิดด้วยวิธี Western blot พบว่า กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม SAP-2 โดยใช้ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 กับ Alum , กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่ม LAP โดยใช้ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgLAP กับ Alum และ กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่ม SAP-2+LAP โดยใช้ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 และ rFgLAP กับ Alum ซึ่งจะ blot กับโปรตีน SAP-2 และ LAP พบว่า กลุ่มที่ 1 ให้ผลจำเพาะกับ rFgSAP-2, กลุ่มที่ 2 ให้ผลจำเพาะกับ rFgLAP และ กลุ่มที่ 3 ให้ผลจำเพาะกับ rFgLAP และ rFgSAP-2 จากนั้นดูตำแหน่งที่มีการแสดงออกของโปรตีนใน *Fasciola gigantica* ด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 กับ Alum, ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgLAP กับ Alum ,ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgLAP+rFgSAP-2 กับ Alum และใช้ 1X PBS เป็น negative control พบว่าระยะ infection มีการแสดงของ LAP ที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ (cecal epitheilial cell) , SAP-2 จะพบมีการแสดงออกที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ (cecal epitheilial cell) และ SAP-2+LAP จะพบมีการแสดงออกที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ (cecal epitheilial cell) และระยะ termination มีการแสดงออกของ LAP ที่บริเวณอัณฑะ(testis) รังไข่(ovary) มีการแสดงออกที่แกรนูลที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ (cecal epitheilial cell) , SAP-2 มีการแสดงออกที่บริเวณอัณฑะ(testis) รังไข่(ovary) และแกรนูลที่บริเวณเยื่บุลำไส้ (cecal epitheilial cell) และ SAP-2+LAP มีการแสดงออกที่บริเวณอัณฑะ (testis) รังไข่ (ovary)

และเกรนูลที่บริเวณเยื่อบุลำไส้ (cecal epitheilial cell) โดยผลที่ได้นั้นสามารถนำไปพัฒนาศักยภาพของวัคซีนในการต้านการติดพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* ได้

Keywords : *Opisthorchis viverrini*, cathepsinF*, Fasciola gigantica*, leucine aminopeptidase, cross reaction

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	6
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
เนื้อเรื่อง	9
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	9
การผลิตเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) ของพยาธิ	9
การเพาะเลี้ยงวงชีวิตพยาธิในห้องปฏิบัติการ	9
การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอย *L. ollula*	9
การเก็บตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิ	9
การสังเคราะห์โปรตีนสายสั้น	9
การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีน	10
การนับจำนวนพยาธิ	11
วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล	11
ตรวจวัดระดับ liver enzymes ในเลือด	11
ตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA	11
ผลการวิจัย	13
ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีน SAP-2 , LAP โดยวิธี Lowry method	13
ตรวจวิเคราะห์โปรตีน SAP-2 , LAP โดย SDS-PAGE	14
ตรวจการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG 1 และ IgG2a ต่อโปรตีน SAP-2 ,LAP ด้วยวิธี Indirect ELISA	15
การตอบสนองของระดับ Antibody (IgG)	18
ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน SAP-2 และ LAP โดยวิธี Western blot	19
Immunohistochemistry	19
LAP ในระยะ Infection	20
LAP ในระยะ Termination	21
SAP-2 ในระยะ Infection	22
SAP-2 ในระยะ Termination	23
SAP-2 และ LAP ในระยะ Infection	24
SAP-2 และ LAP ในระยะ Termination	25
Negative control	26
Correlation	26
การตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-2 โดยวิธี Lowry method	28
การตรวจหาขนาดของโปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-2 โดยวิธี SDS-PAGE	28
ตรวจการตอบสนองของ Ab ชนิด IgG1 และ IgG2a ของ rFgSAP-1, rFgSAP-2 วิธี ELISA	29

หน้า
ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 โดยวิธี Western blot 35
Immunohistochemistry 36
Anti-SAP-2 antibody 36
Anti-SAP-1และ SAP-2 antibody 37
Worm recovery 37
การวิเคราะห์การลดลงของพยาธิในการทดสอบวัคซีน 43
การวิเคราะห์ความเสียหายของตับหนูทดลองในการทดสอบวัคซีน 44
การวิเคราะห์น้ำหนักพยาธิโดยเฉลี่ยต่อตัวในการทดสอบวัคซีน 45
สรุปผลการวิจัย 46
อภิปรายและวิจารณ์ 47
อภิปรายผลการทดลอง 49
สรุปและเสนอแนะ 50
ผลผลิต 50
รายงานการเงิน 50
บรรณานุกรม 52
ภาคผนวก 56
ประวัตินักวิจัยและคณะ 57

สารบัญตาราง (List of Table)

หน้า

ตารางที่ 1 สรุปผลการทดสอบวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่คณะผู้วิจัยได้ทดลอง 2
ตารางที่ 2 สรุปการทดลองวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่ตีพิมพ์ 3
ตารางที่ 3 แสดงสารเสริมฤทธิ์ที่มีการพัฒนาเป็นวัคซีนที่อยู่ในระยะต่างๆ 6
ตารางที่ 4 จำนวนโปรตีนสังเคราะห์สายสั้น 10
ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ของ SAP-2 และ LAP 13
ตารางที่ 6 Worm recovery และร้อยละของพยาธิที่ลดลงในหนู ICR 14
ตารางที่ 7 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 450 nm ตรวจหาระดับ IgG1, IgG2a ของ SAP-2 15
ตารางที่ 8 เสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 450 nm ตรวจหาระดับ IgG1, IgG2a ของ LAP 16
ตารางที่9 แสดงค่าดูดกลืนแสงที 450 nm ของกลุ่ม SAP-2+ LAP
ตรวจหาระดับ IgG1, IgG2a ของโปรตีน SAP-2 24 16
ตารางที่10 แสดงค่าดูดกลืนแสงที 450 nm ของกลุ่ม SAP-2+ LAP ตรวจหาระดับ
IgG1และ IgG2a ของโปรตีน LAP 25 17
ตารางที่ 11แสดงความเข้มข้นของโปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-2 โดยวิธี Lowry method 28
ตารางที่12 ตรวจหาระดับ IgG1,IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-1 30
ตารางที่13 ตรวจหาระดับ IgG1, IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-2 กลุ่ม rFgSAP-2 31
ตารางที่14 ตรวจหาระดับ IgG1, IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-1 กลุ่ม rFgSAP-1+rFgSAP-2 32
ตารางที่15 ตรวจหาระดับ IgG1, IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-2 กลุ่ม rFgSAP-1+rFgSAP-2 33
ตารางที่16 Worm recovery และร้อยละของพยาธิที่ลดลงในหนู ICR 37
ตารางที่17 แสดงจำนวนพยาธิที่นับได้หลังจากการทดสอบวัคซีนโดยใช้ Aluminium hydroxide gel
adjuvant ในแต่ละกลุ่ม 44
ตารางที่18 การกำหนดระดับการให้คะแนนความรุนแรงของการเกิด fibrosis ของตับ 44
ตารางที่19 แสดงคะแนนรอยโรคของตับในการทดสอบวัคซีน 44
ตารางที่20 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักพยาธิต่อตัวในแต่ละกลุ่ม 45

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หน้า

รูปที่ 1 แสดงภาพสรุปวิธี Indirect ELISA 11
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐาน(Standard curve) เปรียบเทียบหาความเข้มข้น SAP-2 และ LAP 13
รูปที่ 3 แสดงขนาดของแถบโปรตีน LAP และ SAP-2 14
รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-SAP-2 IgG1, IgG2a และ Anti-LAP IgG1, IgG2a 18
รูปที่ 5 แสดงขนาดของแถบโปรตีน SAP-2+ LAP, SAP-2 และ LAP 19
รูปที่ 6 การแสดงออกของ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ในระยะ Infection 20
รูปที่ 7 การแสดงออกของ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ในระยะ Termination 21
รูปที่ 8 การแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ในระยะ Infection 22
รูปที่ 9 การแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ในระยะ Termination 23
รูปที่ 10 การแสดงออกของ FgSAP-2,FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ระยะ Infection 24
รูปที่ 11การแสดงออกของ FgSAP-2,FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ระยะ Termination25
รูปที่ 12 Negative control ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* 26
รูปที่ 13 กราฟแสดง Log Titer ของ IgG1,IgG2a กับจำนวน worm recovery ระยะ Infection 27
รูปที่ 14 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) เปรียบเทียบหาความเข้มข้น SAP-1 และ SAP-2 28
รูปที่ 15 แสดงขนาดของแถบโปรตีน rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 ย้อมด้วยสี Coomassie blue 29
รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-SAP-1 IgG1,IgG2a และ Anti-SAP-2 IgG1,IgG2a 34
รูปที่ 17 แสดงขนาดของโปรตีน rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 โดยวิธี Western blot 35
รูปที่ 18 การแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ระยะ Termination 36
รูปที่ 19 การแสดงออกของ FgSAP-1+SAP-2 ในเนื้อเยื่อ *F. gigantica* ระยะ Termination 37
รูปที่ 20 กราฟแสดง Log Titer ของ IgG1,IgG2a กับจำนวน worm recovery ระยะ Infection 39
รูปที่ 21 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ต่อ spSAP1/1 41
รูปที่ 22 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ต่อ spSAP1/2 42
รูปที่ 23 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ต่อ spSAP1/3 43

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 1 แสดงชนิดของสารเสริมฤทธิ์	4
แผนภูมิที่ 2 แสดงแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาโปรตีนวัคซีน	10
แผนภูมิที่ 3 แสดงภาพสรุปวิธี Indirect ELISA	12

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (List of Abbreviations)

CatF	Cathepsin F
SOD	Superoxide dismutase
LAP	Leucine aminopeptidase
Ov	*Opisthoechis voverrini*
r	recombinant
Fg	*Fasciola gigantica*
IRS	Rabbit infected serum
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
PoAb	Polyclonal antibody
MoAb	Monoclonal antibody
WB	Whole body
Ig	Immunoglobulin
SAP	saposin-like protein
CatB	**Cathepsin B**

บทนำ (Introduction)

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แพะ และแกะที่เลี้ยงในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะต่อเกษตรและอุตสาหกรรมการสัตว์เลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตเนื้อและนม จากการสำรวจพบว่าโคกระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8% และในบางพื้นที่อัตรการติดเชื้ออาจสูงถึงร้อยละ 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 ทำให้เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเกิด 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 Cath L กับ LAP และ heme โปรตีนทำให้พยาธิตัวเต็มวัยไม่ออกไข่และตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นวัคซีนของ recombinant FhSAP-2 ต่อ *F. hepatica* ในกระต่าย และพบว่าโปรตีนนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนที่ดี โดยมีจำนวนพยาธิลดลงถึง 81.2% และจำนวนไข่พยาธิในอุจจาระและน้ำดีของสัตว์ ทดลองลดลง 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
rFgSAP-1	*E. coli*	Mice	74.3	Kueakhai et al., 2016
rFgLAP	*E. coli*	Mice	64.3	Changklungmoa et al., 2013
rFgCatL1H	Yeast	Mice	66.1	Sansri et al., 2015
rFgL1G	*E. coli*	Mice	58.3	Changklungmoa et al., 2016
rFgL1	*E. coli*	Mice	73.3	Kueakhai et al., 2015
rFgCatB2	Yeast	Mice	60	Chantree et al., 2013
rFgCatB3	Yeast	Mice	66	Chantree et al., 2013

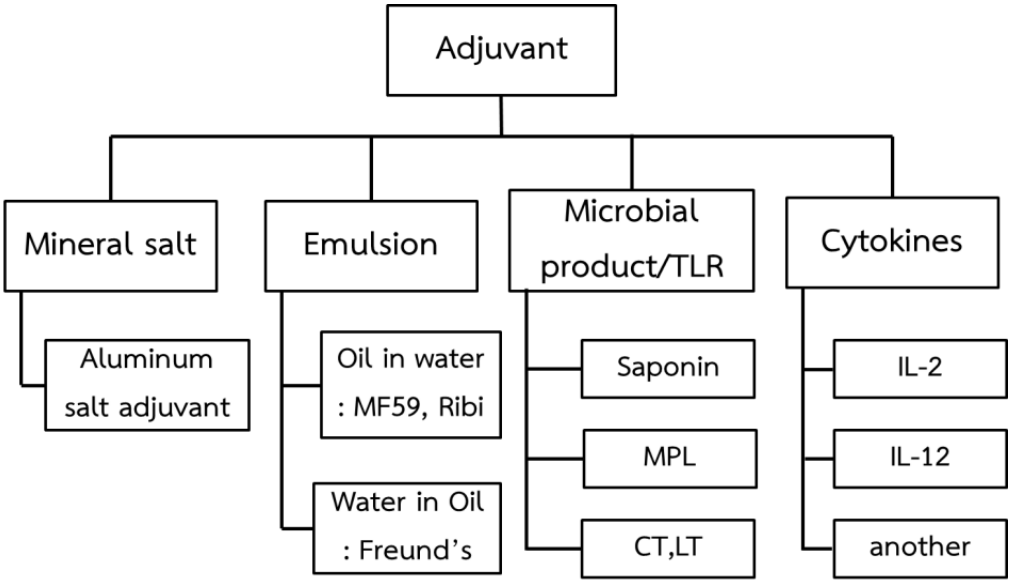
ตารางที่ 2 สรุปการทดลองวัคซีนป้องกันโรค Fasciolosis ที่ตีพิมพ์

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

รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถช่วยลดการติดเชื้อ *Fasciola* spp. ได้จริงและมีโอกาสประสบความสำเร็จอย่างมากที่จะทำให้ลดการติดเชื้อถึง 95-99% จึงเหมาะแก่การนำมาผลิตเป็นวัคซีน นอกจากนี้ยังมีสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) เป็นสารประกอบหรือระบบนำส่งที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน เมื่อนำมาใช้กับวัคซีนจึงเป็นแอนติเจนที่ช่วยให้วัคซีนกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี และ

ยังทำให้แอนติเจนในวัคซีนอยู่ได้นานขึ้นทั้งคุณสมบัติทางชีวภาพ และความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน จึงทำให้ลดปริมาณแอนติเจนหรือจำนวนครั้งในการฉีดวัคซีนลง เช่น aluminium salt หรือ emulsion-based adjuvant โดยสารเสริมฤทธิ์จะพาแอนติเจนไปยังต่อมน้ำเหลืองที่มีเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอยู่ แอนติเจนที่มีขนาดเล็กมากๆ เช่น สายโปรตีนจะถูกกำจัดออกจากตำแหน่งที่ฉีดวัคซีนและต่อมน้ำเหลืองอย่างรวดเร็วภายหลังฉีด (Kenney and Cross, 2010; Pulendran et al., 2010) สารเสริมฤทธิ์แอนติเจนที่ดีจะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย มีความคงตัว ราคาถูก ใช้ได้กับวัคซีนหลายชนิด กระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้หลายรูปแบบเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการใช้แอนติเจนเพียงอย่างเดียว และเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันระยะยาวโดยมีจำนวนครั้งในการกระตุ้นซ้ำต่ำ ซึ่งสารเสริมฤทธิ์มีอยู่หลายประเภท โดยแต่ละประเภทมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันออกไป



แผนภูมิที่ 1 แสดงชนิดของสารเสริมฤทธิ์

Freund's adjuvant จะประกอบด้วย 2 รูปแบบคือ Freund's complete adjuvant (FCA) และ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ซึ่ง FCA เป็น water-in oil emulsion ที่มีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ฆ่าด้วยความร้อนแล้วอยู่ด้วย FCA จะกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีได้ดีกว่า แต่มักจะเกิด granuloma หรือมีการอักเสบรุนแรงบริเวณที่ฉีด โดยทั่วไปในการฉีดสัตว์ทดลองครั้งแรก (primary immunization) มักใช้ FCA แต่ครั้งต่อไปจะใช้ FIA ซึ่ง FCA จะมีผลต่อ TLR12, TLR4, TLR9 และยังส่งผลการตอบสนองของ T helper 1 ต่อแอนติบอดี IgG2 ซึ่งมีผลทำให้เกิดการโอบกินของแมคโคฟาจ การทำลายด้วยระบบคอมพิเมนท์ และการฆ่าด้วยเม็ดเลือดขาว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของ mycobacterial และการส่งสัญญาณในโฮสต์ (Shenderov et al., 2010; Su et al., 2005) เมื่อเทียบกับ FIA จะส่งผลการตอบสนองของ T helper 2 ต่อแอนติบอดี IgG1 ซึ่งมีผลการทำลายโดยกระบวนการกระตุ้นระบบ ADCC ของระบบภูมิคุ้มกัน FCA และ FIA มักก่อให้เกิดเนื้องอก (granulomas) บริเวณที่ฉีดเพราะการตกค้างของ mineral oil ที่ไม่เผาผลาญจึงถูกจำกัดเฉพาะในสัตว์เท่านั้น ดังนั้นในการใช้วัคซีนภาคสนามไม่อนุญาตให้ใช้ได้

Aluminium salt เป็นสารเสริมฤทธิ์ตัวแรกที่ถูกใช้ในวัคซีนเป็นเวลานานกว่า 80 ปี aluminium salt ที่ถูกใช้ใน ปัจจุบันมีหลายแบบเช่น ในรูปของ aluminium hydroxide ที่ถูกใช้โรคไอกรน, โรคคอตีบ และบาดทะยัก, aluminium phosphate ที่ถูกใช้ในโรคไวรัสตับอักเสบ A (HAV) and B (HBV), aluminium hydroxyphosphate sulphate ที่ถูกใช้ใน quadrivalant human papillomavirus (HPV) โดย aluminium

salt จะทำให้มีการชะลอการปลดปล่อยแอนติเจนแล้วมีผลการตอบสนองของ Th2 จะกระตุ้นการจับแอนติเจนโดยการนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์ (antigen presenting cell, APC) หรือแมคโคฟาจ บริเวณตำแหน่งที่ฉีดวัคซีน และมีฤทธิ์ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณที่ฉีดยา ทำให้สามารถสร้างแอนติบอดีในการป้องกันการติดเชื้อ แต่ aluminium จะไม่มีผลต่อการกระตุ้น T lymphocyte, cell-mediated immunity และ TLR (Gavin et al., 2006) จึงไม่สามารถใช้สำหรับวัคซีนที่ป้องกันการติดเชื้อภายในเซลล์ได้

Oil-in-Water Emulsions เช่น MF59, Ribi และ AS03 เป็นอิมัลชัน (อาจเป็น oil in water หรือ water in oil) ออกฤทธิ์เหมือนกับ aluminium salt คือกระตุ้นการอักเสบและนำเสนอแอนติเจนบนผิวเซลล์ จึงสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดี เช่น การใช้ MF59 ซึ่งเป็น oil in water ในวัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่จะมีผลต่อการอักเสบและกระตุ้นการทำงานของ innate immunity ทั้งในแง่การจับกับแอนติเจน , การเปลี่ยนแปลงแอนติเจนในเซลล์ และการนำเสนอแอนติเจนที่ผิวเซลล์ต่อ T lymphocyte หรือการนำเสนอต่อระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ (direct activation of innate immune cells) โดย oil-in-water จะมีกระบวนการเผาผลาญในการเป็นสารเสริมฤทธิ์ได้ง่ายกว่า paraffin oil มีการกระตุ้นที่แข็งแรงต่อการตอบสนองของแอนติบอดีช่วยให้ใช้ปริมาณยาและปริมาณแอนติเจนน้อยลงและสร้างการตอบสนองต่อหน่วยความจำการแสดงออกของ Th1 และ Th2 (Ott et al., 1995).

Saponin-Based adjuvants เป็นอนุภาคนาโนที่ผลิตมาจากซาโปนินที่บริสุทธิ์จากเปลือกต้นไม้ของอเมริกาใต้ *Quillaja saponaria* (Reed S. et al., 2013) ทำให้เกิดการตอบสนองแอนติเจนแบบ T-dependent และ T-independent (Petrovsky N. & Aguilar JC., 2004) เมื่อซาโปนินรวมกับคอเลสเตอรอลและฟอสโฟลิปิดเพื่อสร้าง Immuno- stimulatory complexes (ISCOMs) Quil-A® adjuvant สามารถกระตุ้น cell-mediated และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ antibody-mediated ของเชื้อไวรัส, เชื้อแบคทีเรีย, ปรสิตและ tumer antigen ได้ ถึงแม้ว่า ISCOMs เป็นตัวกระตุ้นของการตอบสนองของ Th cell แต่ไม่ได้กำหนดว่าเป็น Th1 หรือ Th2 ไม่เหมือนกับสารเสริมฤทธิ์ชนิดอื่นๆ ซึ่ง ISCOMs มีการแสดงออกของ MHC class I และมีการกระตุ้นการตอบสนองของทั้ง CD8+ และ CD4+ T cell จัดเป็นประเภทโปรตีนแอนติเจนที่ละลายน้ำในมนุษย์และในสัตว์ทดลอง (Davis et al., 2004)

Summary of adjuvants in prophylactic vaccines that are licensed or in clinical development

Adjuvant	Description	Vaccine
Licensed		
Aluminum salts (Alum)	Insoluble particulates of hydroxide, phosphate or hydroxyphosphate sulfate salts	Included in licensed products for routine childhood vaccines and many others
Oil-in-water emulsions (MF59, AS03)	Oil dispersed nanoemulsions (mainly squalene) stabilized with non-ionic surfactants	Included in licensed products for seasonal influenza vaccine (MF59) or pandemic influenza vaccines (MF59, AS03)
Virosomes	Dispersed lipid vesicles including viral membrane (influenza) proteins	In licensed products for influenza vaccine (*Inflexal*) and HAV vaccine (*Epaxal*)
AS04	Natural product TLR4 ligand (MPL) adsorbed on to alum	Licensed products for HBV vaccine (*Fendrix*) and HPV vaccine (*Cervarix*)
MPL	Natural product TLR4 ligand	Approved products for tree pollen and grass pollen allergies on a *named patient* basis in Europe (*Pollinex*)
RC-529	Synthetic TLR4 ligand adsorbed to aluminum hydroxide	Was a licensed product in Argentina for HBV (*Supervax*)
Phase III		
Liposomes (AS01)	Dispersed lipid vesicles containing TLR4 ligand (MPL) and saponin QS-21	Phase III, submitted for licensure for malaria vaccine (RTS,S) and for approval for herpes zoster vaccine (HZ/su)
CpG ODN (1018 ISS)	Soluble TLR9 ligand (oligonucleotide) co-administered with HBV vaccine	Submitted for licensure for HBV vaccine
Topical cream with TLR7 ligand	Topical ointment of TLR7 ligand (imiquimod) applied in conjunction with intradermal vaccination	Influenza vaccine
Phase II		
EGVac system	Bacterial polysaccharide/bacterial DNA	Therapeutic HPV vaccine
Saponin complexes (ISCOM, Matrix-M)	Lipid, purified saponins and cholesterol cage-like nanocomplexes	Influenza vaccine
GLA-SE	Oil-in-water nanoemulsion with synthetic TLR4 ligand (GLA)	Tuberculosis vaccine, RSV vaccine, and Leishmania vaccine
IC31	Cationic peptide complexed with TLR9 ligand (oligonucleotide)	Tuberculosis vaccine
Oil-in-water emulsion (ISA51)	Oil dispersed nanoemulsion (mainly squalene) stabilized with non-ionic surfactant	Included in licensed seasonal influenza vaccine
AS02	Oil-in-water nanoemulsion with TLR4 ligand (MPL) and saponin, QS-21	Malaria and HIV vaccines (withdrawn after Phase II)
VAX2012Q, VAX125	TLR5 ligand protein (flagellin) linked to antigen	Influenza vaccine
Poly I:C (Ampligen, rintatolimod)	Double-stranded RNA polymer analogue and	Influenza vaccine
PIKA	TLR3 ligand	Rabies vaccine
VCL-HB01 (Vaxfectin)	Cationic liposome	Genital herpes vaccine (prophylactic and therapeutic, and DNA based)

HAV, hepatitis A virus; HBV, hepatitis B virus; HIV, human immunodeficiency virus; HPV, human papillomavirus, and MPL, 3-O-desacyl-4′-monophosphoryl lipid A.

ตารางที่ 3 แสดงสารเสริมฤทธิ์ที่มีการพัฒนาเป็นวัคซีนที่อยู่ในระยะต่างๆ (O'Hagen et al., 2017)

จากข้อมูลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าความสำเร็จในการพัฒนาวัคซีนนั้นประกอบไปด้วยหลายปัจจัย แต่อีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือการเลือกใช้สารเสริมฤทธิ์ ที่จะช่วยกระตุ้นระบบอิมมูนของโฮสล์ และวัคซีนที่พัฒนาโดยใช้โปรตีนแอนติเจนบางส่วนจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้สารเสริมฤทธิ์ช่วยด้วย ในปัจจุบันมีผู้คิดค้นสารเสริมฤทธิ์เพิ่มขึ้นมากมายและเป็นที่ยอมรับ แต่จะเห็นได้ว่าสารเสริมฤทธิ์นั้นให้ผลที่ไม่เหมือนกันของแต่ละแอนติเจน ดังนี้นจึงต้องมีการวิจัยสารเสริมฤทธิ์ควบคู่ไปด้วย

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Fasciola gigantica เป็นพยาธิที่พบทั่วไปในโค กระบือ แกะ และคนในประเทศไทย และประเทศเขตร้อนอื่น ๆ ทั่วโลก เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านเกษตรอุตสาหกรรมการสัตว์เลี้ยงของประเทศในอัตราสูง จากการสำรวจพบว่าโค กระบือมีการติดเชื้อเฉลี่ยร้อยละ 11.8% และในบางบริเวณของประเทศไทยอาจมีอัตราการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 85 ดังนั้นพยาธิใบไม้ตับจึงเป็น

พยาธิที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม 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 ซึ่งการเก็บอุจาระสัตว์นั้นทำได้ยากและเสียเวลามากในการตรวจ อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อในระยะเริ่มต้นได้เนื่องจากจะตรวจพบไข่ก็ต่อเมื่อพยาธิกลายเป็นตัวเต็มวัยที่ปล่อยไข่ออกมา หลังจากติดเชื้อ 10-16 สัปดาห์ ทำให้ไข่ของพยาธินั้นปนเปื้อนสู่แหน่งน้ำธรรมชาติซึ่งทำให้วงจรการระบาดยังคงมีอยู่

ในประเทศไทยจะมีรายงายการติดพยาธิ *F. gigantica* ในคนน้อยนั้น ไม่สามารถแปรผลได้ว่าประไทยไม่มีการระบาดของของโรค Fasciolosis เป็นเพราะคนส่วนใหญ่ของประเทศไม่ได้รับการตรวจทางการแพทย์เนื่องจากพฤติกรรมของคนไทยนั้นถ้าอาการของโรคไม่รุนแรงมากก็จะไม่ไปตรวจรักษา ซึ่งถ้าติดเชื้อ *F. gigantica* น้อยก็จะไม่แสดงอาการของโรคมากนัก ในทางตรงกันข้ามคนไทยนิยมบริโภคผักสด และผักบางชนิดนั้นปลูกในน้ำ เช่น ผักกะเฉด ผักบุ้งไทย เป็นต้น รวมถึงการนำน้ำธรรมชาติจากหนองบึงมาลดน้ำผักที่ปลูก ดังนั้นคนไทยจึงตกอยู่ในภาวะเสี่ยงเป็นโรค Fasciolosis จากพฤติกรรมการบริโภคโดยไม่รู้ตัว และอีกประการที่สนับสนุนได้ว่า *F. gigantica* มีการติดในคนได้มากเช่นกันดังมีรายงานการติดเชื้อ *F. gigantica* ในกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง และแอฟริกาเหนือ ส่วนการติดเชื้อ *F. hepatica* มีรายงานการติดทั้งคนและสัตว์เช่นกัน ในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยได้ออกเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เช่น เชียงใหม่ ปทุมธานี เพรชบุรี นครราชสีมา แม่ฮองสอน 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* นั้นมีความคล้ายกัน 95-100 % จึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคให้ครอบคลุมทั้งสองชนิด และปัญหาโรค fasciolosis ยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณะสุขและปศุสัตว์อยู่มาก จึงเป็นโอกาศทางการค้าที่ประเทศไทยจะสามารถผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรค fasciolosis ได้เองและสร้างมูลค่ารายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างดี และถ้างานวิจัยนี้สามารถเป็นสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรคที่ใช้งานได้จริง ซึ่งจะเป็นต้นแบบแนวคิดที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรคสำหรับโรคพยาธิอื่นๆ เช่น *Opisthorchis viverrini* ที่มีการแพร่ระบาดมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ดังนั้นคณะวิจัยซึ่งได้เห็นแนวโน้มที่จะสร้างชุดตรวจวินิจฉัยโรค fasciolosis ได้ จึงคิดที่จะต่อยอดงานวิจัยให้เป็นนวัตกรรมที่สร้างขึ้นจากคนไทย ซึ่งจะสร้างชื่อเสียงกับมหาวิทยาลัยและประเทศชาติ

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

การพัฒนาและปรับปรุงศักยภาพของวัคซีนที่สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และ *F. hepatica* โดยใช้โปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (short synthetic peptides) จากกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลาย

โปรตีนที่มีศักยภาพ ได้แก่ cathepsin B (CatB), cathepsin L (CathL), leucine aminopeptidase (LAP) และ saposin (SAP) ในหนูทดลอง

การศึกษาหาสารเสริมฤทธิ์ (Adjuvant) ที่จะเพิ่มศักยภาพของวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ Fasciolosis ให้ศักยภาพของวัคซีนมีประสิทธิภาพสูง ได้แก่ **(Aluminium salt , Oil-in-Water Emulsions, Saponin-Based)**
ในหนูทดลอง

1. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนแอนติเจนเดี่ยว (single vaccine)
2. ศึกษาทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนแอนติเจนรวม (combine vaccine)

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)

การผลิตเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) ของพยาธิ

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. ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องพ่นอากาศลงไปในอ่างน้ำตลอดเวลาและให้แสงสว่างโดยใช้ไฟนีออนขนาด 40W เป็นเวลา 8 ซ.ม. ต่อวัน ให้อาหารคือผักกาดหอมและสาหร่ายเซลล์เดียว

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 (metacercaria) 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 แล้วจึงเกาะกับแผ่นพลาสติก สลัดหางทิ้ง สร้างซิสต์ระยะเมตาเซอร์คาเรียขึ้นมา

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

การสังเคราะห์โปรตีนสายสั้น

สั่งสังเคราห์โปรตีนสายสั้น โดยการสังเคราห์เป็นช่วงๆ ของแอนติเจนเป้าหมายโดยมีความยาว 30 อะมิโน

ตารางที่ 4 จำนวนโปรตีนสังเคราะห์สายสั้น

โปรตีน	จำนวนอะมิโนทั้งหมด (อะมิโน)	จำนวนหน่วยโปรตีนสายสั้น (30 อะมิโน/เส้น)
SAP1	100	3
SAP2	100	3
CatL	326	11
CatB	300	10
LAP	523	17

การทดสอบคุณสมบัติของวัคซีน

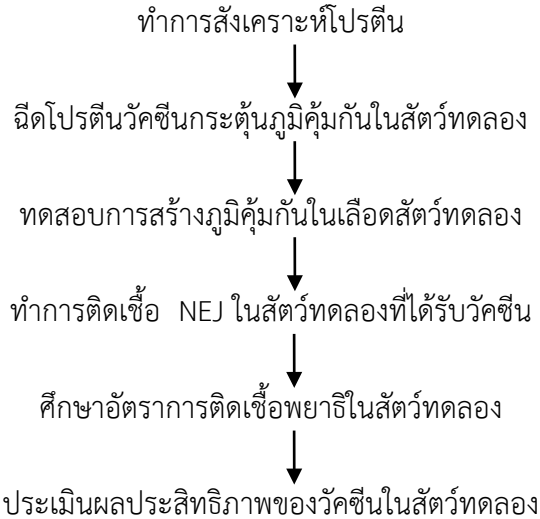
กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั้งในรูปของโปรตีนเดี่ยว (single vaccine) โปรตีนผสม (cocktail vaccine) โดยผสมกับสาร adjuvants ในการศึกษาส่วนนี้ผู้ทำการวิจัยจะทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองต่อโปรตีนเป้าหมาย (CatB, CatL, SAP, LAP) โดยทำการฉีดกระตุ้น 2 วิธีเพื่อเปรียบเทียบผล คือ ใต้ผิวหนัง โดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มทดลอง กลุ่มทดลองละ 10 ตัว ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดกระตุ้นใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ 1

กลุ่มที่ 2 ทำการฉีดกระตุ้นด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มีโปรตีนผสมเป็นกลุ่มควบคุมที่ 2

กลุ่มที่ 3 ทำการฉีดกระตุ้นเข้าใต้ผิวหนังด้วยแอนติเจน 50 ไมโครกรัม ปนกับ adjuvant ต่อครั้ง

นำโปรตีนจำนวน 50 ไมโครกรัม ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer Saline) ผสมกับ Adjuvant ในปริมาณเท่า ๆ กัน และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจนกระทั่งเหนียวข้นไม่แตกตัวกระจาย และจับตัวเป็นกลุ่มเมื่อหยดทดสอบลงในน้ำ จากนั้นฉีดเข้าช่องท้องหนูหรือใต้ผิวหนังโดยฉีดทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยผสมโปรตีน Adjuvant สำหรับการฉีดครั้งแรก และจะฉีดครั้งต่อไป เมื่อครบ 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดครั้งที่ 3 จะเก็บเลือกจากหางหนูเพื่อทดสอบการสร้างภูมิคุ้มกันในหนู และจากนั้นจะทำการทดสอบการป้องกันการติดเชื้อพยาธิ โดยการป้อนเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 10 เม็ด และหลังจากป้อนเมตาเซอร์คาเรีย 4 สัปดาห์ จะฆ่าหนูเพื่อคำนวณหาค่าร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อ



แผนภูมิที่ 2 แสดงแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาโปรตีนวัคซีน เพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันการติดเชื้อพยาธิ

การนับจำนวนพยาธิ

หนูถูกทำให้ตายด้วย CO_2 หลังจากการทำให้หนูติดเชื้อพยาธิ 4 สัปดาห์ แล้วนำตับหนูออกมาใส่ในน้ำเกลือ และฉีกตับหนูให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปล่อยให้ตัวพยาธิออกมาจากตับ หลังจากนั้นนับจำนวนพยาธิจากตับของหนูแต่ละตัว เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละของการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

ทำการคำนวณหาค่า % protection ดังสูตรด้านล่าง

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

‘‘A” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มควบคุม

‘‘B” ค่าเฉลี่ยของ worm recovery จากกลุ่มทดสอบ

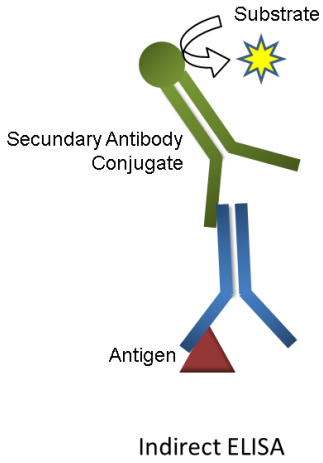
เปรียบเทียบ ระดับของแอนติบอดี และ เอนไซม์ตับ ของกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ one-way ANOVA and Kruskal-Wallis Test และ ใช้โปรแกรม SPSS ในการคำนวณ และ ที่ $p \leq 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตรวจวัดระดับ liver enzymes ในเลือด

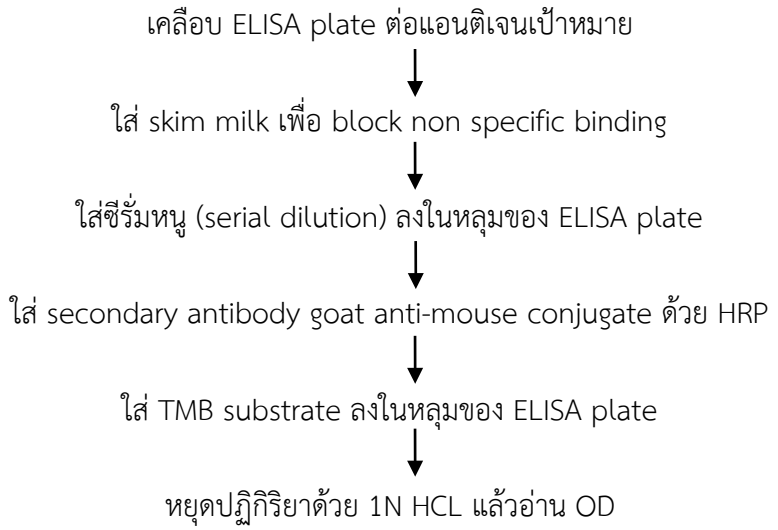
ตรวจวัดระดับ เอนไซม์ตับ (AST, ALT และGGT) เพื่อตรวจวัดความผิดปกติของตับ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (automatic machine) เพื่อหาระดับความเสียหายของตับจากพยาธิ

ตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

เป็นวิธีที่มี sensitivity สูงใช้สำหรับตรวจหาแอนติบอดี ขั้นตอนดังกล่าวแสดงโดยย่อ ด้วยแผนผังและภาพประกอบ ดังนี้



ภาพที่ 1 แสดงภาพสรุปวิธี Indirect ELISA
(https://www.biosynth.com/en/product-areas/diagnostics/elisa/elisa.html?sprache=en)



แผนภูมิที่ 3 แสดงภาพสรุปวิธี Indirect ELISA นำค่าของ OD ที่ได้มาเปรียบเทียบระดับไตเตอร์ของแต่ละ Adjuvant

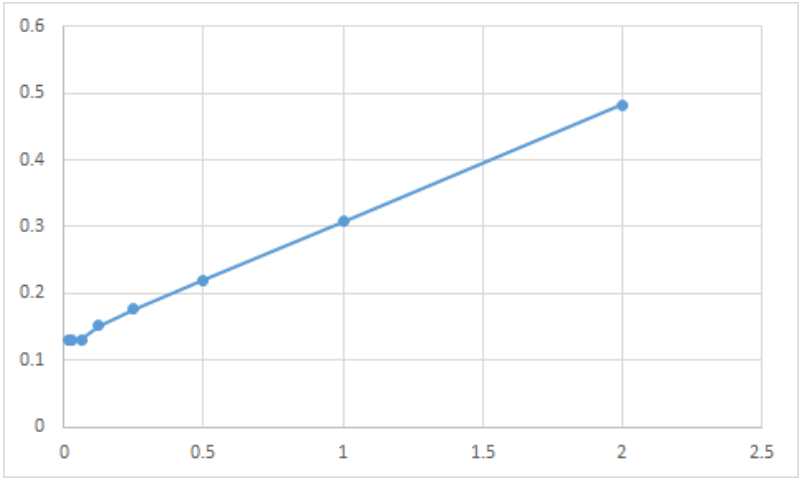
ผลการวิจัย (Results)

ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีน SAP-2 , LAP โดยวิธี Lowry method

ผลการตรวจสอบความเข้มข้นของ SAP-2 และ LAP ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้วิธี Lowry method ได้ความเข้มข้นของ SAP-2 เท่ากับ ความเข้มข้น 6.261 µg และ LAP ความเข้มข้น 5.639 µg

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้น (Conc.) และค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) ที่ 750 นาโนเมตร ของ SAP-2 และ LAP

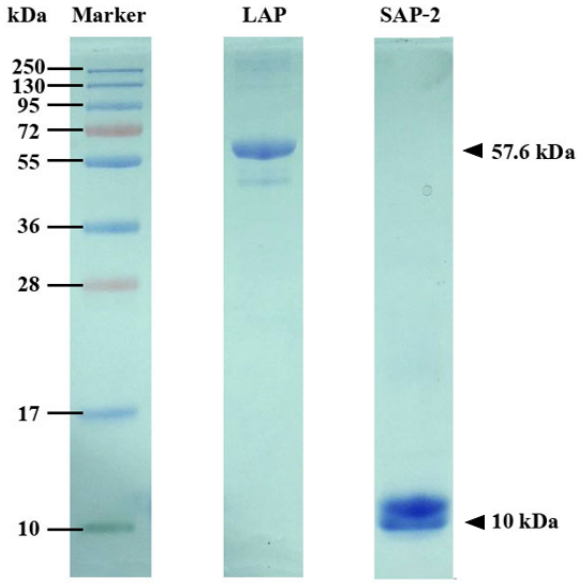
sample	conc.	Absorbance
std.1	2	0.482
std.2	1	0.308
std.3	0.5	0.22
std.4	0.25	0.176
std.5	0.125	0.152
std.6	0.063	0.131
std.7	0.031	0.129
std.8	0.016	0.13
SAP-2 1	6.254	1.245
SAP-2 2	6.286	1.248
LAP 1	5.558	1.121
LAP 2	5.719	1.15



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐาน(Standard curve) เปรียบเทียบหาความเข้มข้น SAP-2 และ LAP

ตรวจวิเคราะห์โปรตีน SAP-2 , LAP โดย SDS-PAGE

จากการตรวจวัดขนาดของโปรตีน recombinant protein LAP (rFgLAP) และ recombinant protein SAP-2 (rFgSAP-2) ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* ด้วยวิธี gel electrophoresis พบว่า rFgLAP นั้นมีขนาด 57.6 kDa และ rFgSAP-2 มีขนาด 10 kDa (ภาพที่ 4-2)



ภาพที่ 3 แสดงขนาดของแถบโปรตีน LAP (lane 1) และ SAP-2 (lane 2) เทียบตำแหน่งและขนาดของโปรตีน Specific marker (ด้านซ้ายสุด) ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วย gel electrophoresis

ตารางที่ 6 Worm recovery และร้อยละของพยาธิที่ลดลงในหนู ICR ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย recombinant- protein ของพยาธิ *F.gigantica* โดย infect หนูด้วยพยาธิระยะ metacercariae 15 ตัว ต่อหนู 1 ตัว

Groups	Mice	Treatments	Worm recovery	Mean ± SD	Reduction (%)
1.Infected Control	10	Non-immunized and uninfected	-	-	-
2.Infected Control	10	Non-immunized and infected	5,7,6,3,6,8,7,8,5,4	5.9 ± 1.66	-
3.Adjuvant Control	10	Immunized with Adjuvant and infected	6,8,4,3,5,7,6,2,8,8	5.7 ± 2.16	-
4.rFgSAP-2	10	Immunized with 50 µg of rFgSAP-2 plus adjuvant and infected	2,4,0,1,2,0,1,2,4,0	1.6 ± 1.51	72.8, 71.9
5.rFgLAP	10	Immunized with 50 µg of rFgLAP plus adjuvant and infected	0,4,1,3,1,1,2,1,3,3	1.9 ± 1.29	67.8, 66.6
6.rFgSAP-2 + rFgLAP	10	Immunized with 25 µg of rFgSAP-2 plus adjuvant , and 25 µg of rFgLAP plus adjuvant infected	2,1,0,0,1,1,3,2,0,1	1.1 ± 0.99	81.3, 80.7

* 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

ทำการฉีดวัคซีนด้วยโปรตีนแบบชนิดเดียว (LAP, SAP2) และโปรตีนแบบผสม (LAP+SAP2) ในหนูทั้งหมด 10 ตัวจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 4 อาทิตย์ ต่อมาสองสัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่สองทำการติดเชื้อหนูด้วยพยาธิ *Fasciola gigantica* ระยะ metacercariae จำนวน 15 เม็ดต่อหนู หลังจากผ่านไป 4 สัปดาห์จึงการฆ่าหนูเพื่อนับจำนวนพยาธิจากตับและคำนวนเปอร์เซนต์การลดลงของพยาธิหรือ Percent of reduction (%) พบว่าหนูในกลุ่มที่ฉีดโปรตีน LAP SAP2 และ โปรตีนแบบผสม (LAP+SAP2) มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิ 66.7-67.8% 71.9-72.9% และ 80.7-81.4% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม adjuvant control และ positive control ตามลำดับ

ตรวจการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG 1 และ IgG2a ต่อโปรตีน SAP-2 ,LAP ด้วยวิธี Indirect ELISA

ผลการตอบสนองของ HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1,IgG2a ต่อกลุ่ม SAP-2 , LAP, SAP-2+LAP โดยแต่ละกลุ่มแบ่งเป็น Infection (4 สัปดาห์) และ Termination (6 สัปดาห์) ด้วยวิธีการ Indirect ELISA โดยแต่ละกลุ่ม SAP-2 , LAP และ SAP-2+LAP มีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในการสร้างระดับแอนติบอดี IgG1 มากกว่า IgG2a ผลตามตาราง ดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม SAP-2 ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ของโปรตีน SAP-2

Serum No.	Titer (1: ...)			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week)	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	25600	6400	12800	800
2	25600	6400	12800	3200
3	51200	6400	12800	800
4	51200	25600	6400	12800
5	25600	25600	25600	6400
6	51200	6400	12800	400
7	102400	51200	102400	25600
8	102400	25600	25600	12800
9	51200	25600	12800	12800
10	51200	25600	25600	6400

ตารางที่ 8 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม LAP ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1และ IgG2a ของโปรตีน LAP

Serum No.	Titer (1: ...)			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	102400	25600	6400	12800
2	25600	25600	400	25600
3	51200	12800	25600	6400
4	25600	51200	3200	6400
5	51200	25600	6400	12800
6	51200	51200	12800	25600
7	25600	25600	25600	25600
8	25600	51200	3200	6400
9	102400	25600	12800	12800
10	12800	25600	100	100

ตารางที่ 9 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม SAP-2+ LAP ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1และ IgG2a ของโปรตีน SAP-2

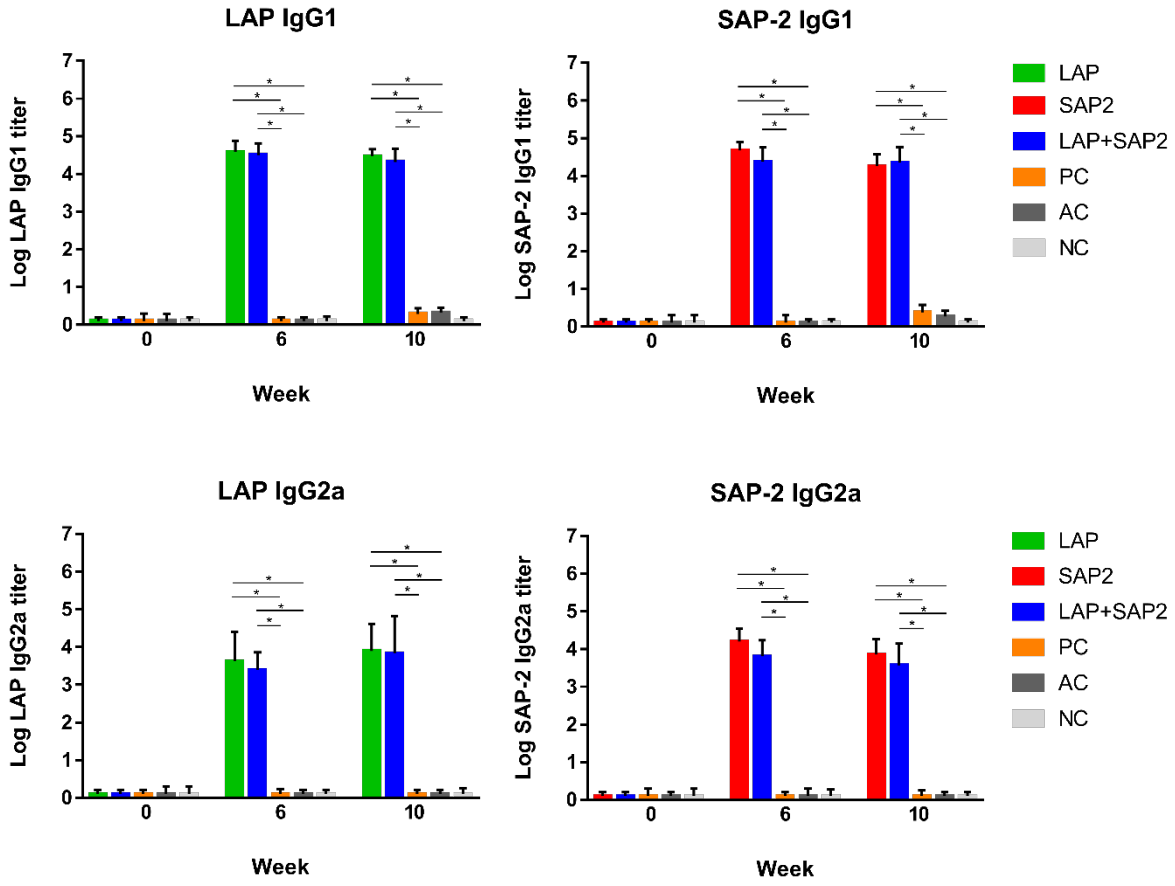
Serum No.	Titer (1: ...)			
	SAP-2			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week)	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	12800	51200	1600	1600
2	12800	1600	3200	200
3	6400	25600	6400	1600
4	12800	25600	25600	12800
5	12800	25600	6400	6400
6	25600	25600	1600	1600
7	51200	25600	6400	12800
8	51200	51200	6400	6400
9	51200	25600	25600	6400
10	102400	25600	12800	12800

ตารางที่ 10 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม SAP-2+ LAP ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1และ IgG2a ของโปรตีน LAP

Serum No.	Titer (1: ...)			
	LAP			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week)	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	25600	25600	1600	12800
2	12800	3200	6400	100
3	25600	25600	1600	25600
4	12800	25600	1600	25600
5	51200	25600	6400	12800
6	102400	51200	6400	12800
7	51200	51200	6400	51200
8	51200	12800	1600	25600
9	51200	25600	3200	12800
10	12800	12800	200	100

จากการเปรียบเทียบระดับ IgG1 และ IgG2a ของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าซีรัมจากหนูที่ immunized ด้วย rFgLAP หรือ rFgSAP-2 หรือrFg LAP + rFgSAP-2 มีระดับ IgG titer สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ adjuvant , negative control , positive control

การตอบสนองของระดับ Antibody (IgG)

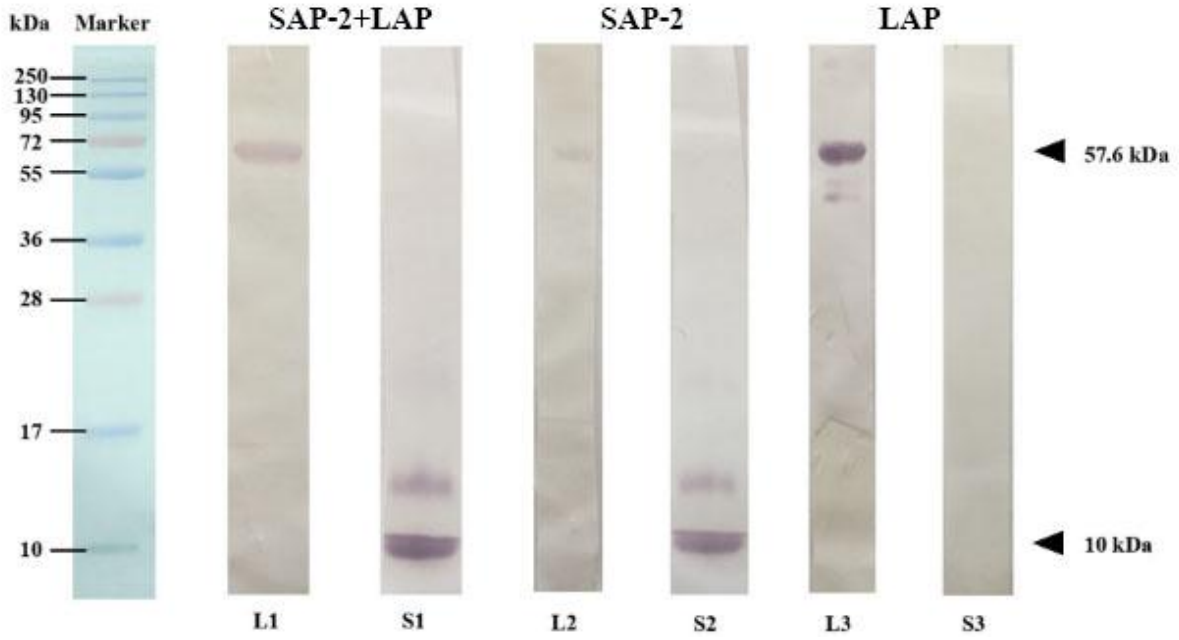


ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-SAP-2 IgG1 antibody กับระยะเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย rFgLAP (ภาพ A), กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-SAP-2 IgG2a antibody กับระยะเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 (ภาพ B), กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-LAP IgG1 antibody กับระยะเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย rFgLAP (ภาพ C), กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-LAP IgG2a antibody กับระยะเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย rFgLAP (ภาพ D), * เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการวัดระดับ IgG1 และ IgG2a พบว่า กลุ่มหนูที่ฉีดวัคซีนทุกกลุ่มมีการเพิ่มขึ้นของระดับ IgG1 และ IgG2a ต่อโปรตีน SAP1 และ SAP2 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Positive control และ Adjuvant control ทั้งในระยะ Infection และ Termination

ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน SAP-2 และ LAP โดยวิธี Western blot

การศึกษาการทำปฏิกิริยาซีรัมหนูกลุ่ม LAP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย LAP กับ Alum, ซีรัมหนูกลุ่ม SAP-2 ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย SAP-2 กับ Alum, ซีรัมหนูกลุ่ม SAP-2+LAP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย SAP-2 ร่วมกับ LAP กับ Alum ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* เพื่อยืนยันผลการทดสอบจากวิธี Indirect ELISA พบว่าซีรัมหนูกลุ่ม SAP-2 ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย SAP-2 กับ Alum มีความจำเพาะต่อ rFgSAP-2 และ ซีรัมหนูกลุ่ม LAP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย LAP กับ Alum มีความจำเพาะต่อ rFgLAP โดย rFgSAP-2 มีขนาด 10 kDa และ rFgLAP มีขนาด 57.6 kDa ซึ่งกลุ่ม SAP-2+LAP พบโปรตีนขนาด 10 kDa และโปรตีนขนาด 57.6 kDa กลุ่ม SAP-2 พบโปรตีนขนาด 10 kDa และกลุ่ม LAP พบโปรตีนขนาด 57.6 kDa (ภาพที่ 4-4)



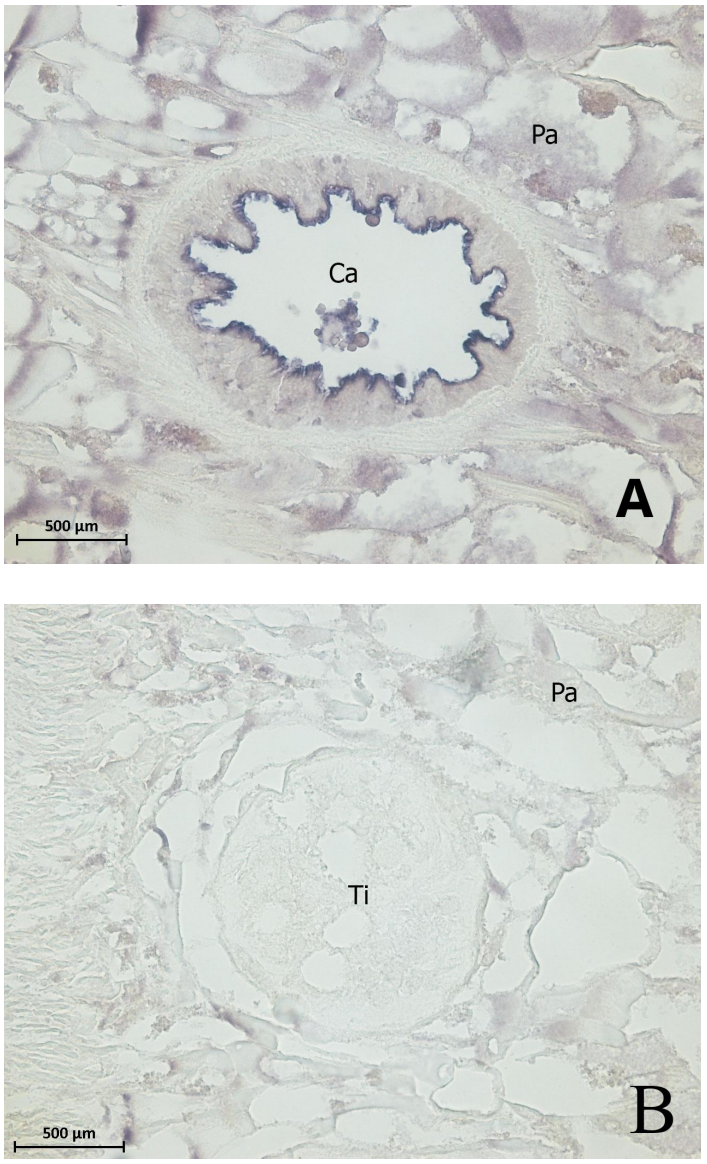
ภาพที่ 5 แสดงขนาดของแถบโปรตีน HRP-conjugated goat anti-mouse ต่อ pool serum SAP-2+LAP ,pool serum SAP-2 , pool serum LAP โดยกลุ่ม SAP-2+ LAP ได้แก่ L1 (lane 2) , S1 (lane 3) กลุ่ม SAP-2 ได้แก่ L2 (lane 4) , S2 (lane 5) และ กลุ่ม LAP ได้แก่ L3 (lane 6) , S3 (lane 7) เทียบตำแหน่งและขนาดของโปรตีน Specific maarker (lane 1) ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี indirect western blot analysis

Immunohistochemistry

ผลการศึกษาการแสดงออกของ SAP-2 และ LAP ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* เพื่อดูความจำเพาะของแอนติบอดี Anti-LAP, Anti-SAP2 โดยอาศัยหลักการ Immunohistochemistry พบว่ามีความ จำเพาะต่อโปรตีนที่ลำไส้ และTestis ของพยาธิ ซึ่ง SAP-2 และ LAP มีการแสดงออกมากที่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้(Epithelium) และTestis จากตัวอย่างซีรัมของหนูระยะ Termination

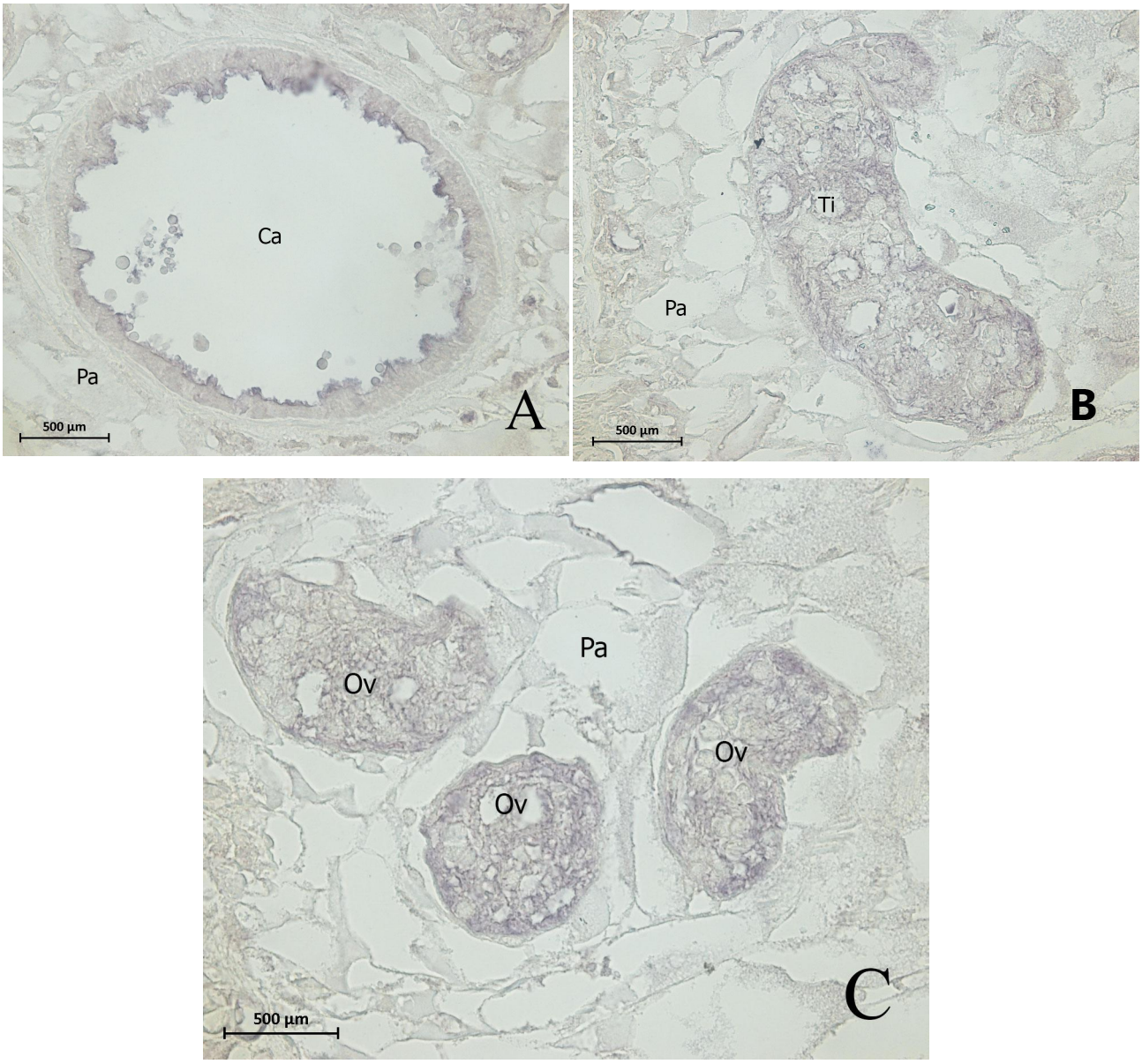
LAP

ระยะ Infection



ภาพที่ 6 การแสดงออกของ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Infection (ภาพ A) มีการแสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca),(ภาพ B) ไม่มีการแสดงออกใน Testis (Ti)

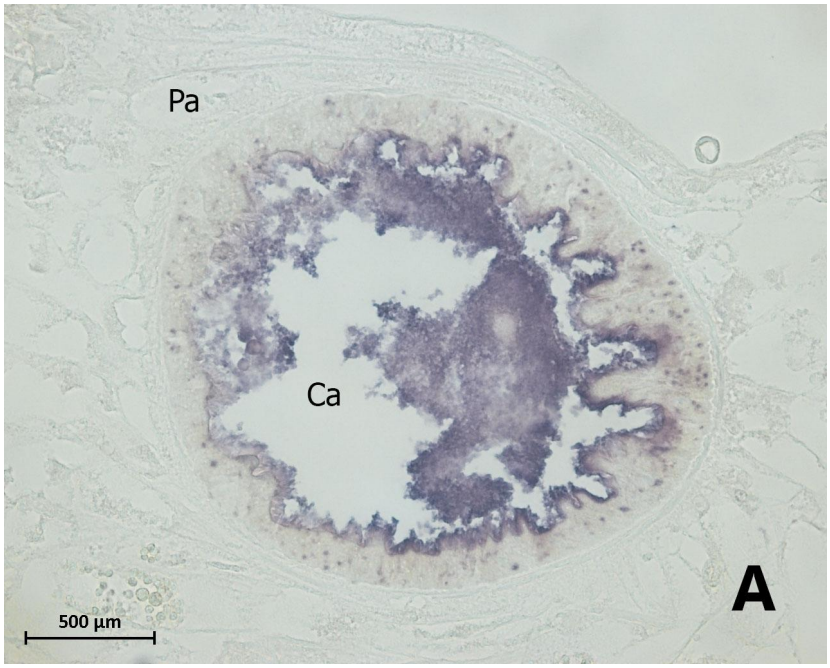
ระยะ Termination

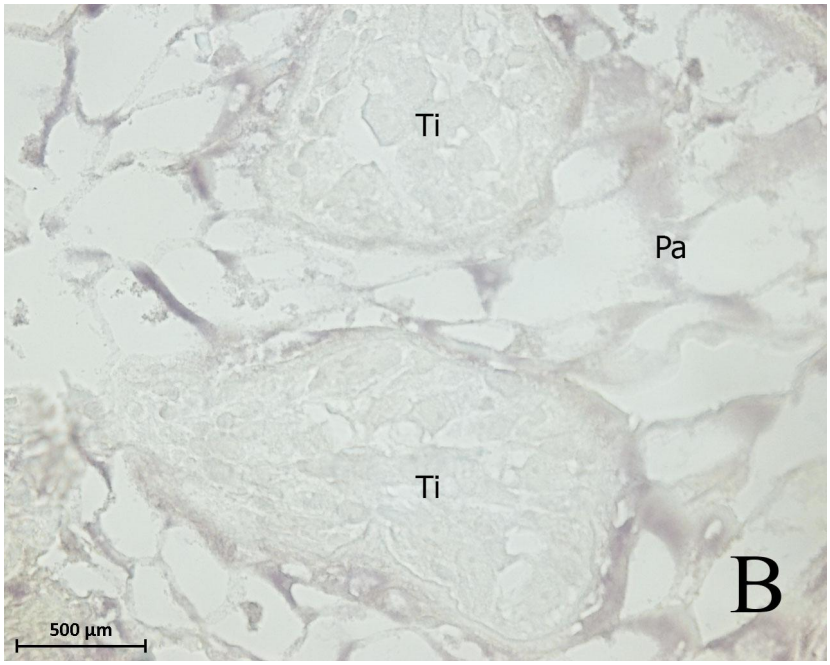


ภาพที่ **7** การแสดงออกของ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Termination (ภาพ A) แสดงออกบริเวณแกรนูลในส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca), (ภาพ B) มีการแสดงออกบริเวณ Testis (Ti), (ภาพ C) มีการแสดงออกของบริเวณ Ovary (Ov)

SAP-2

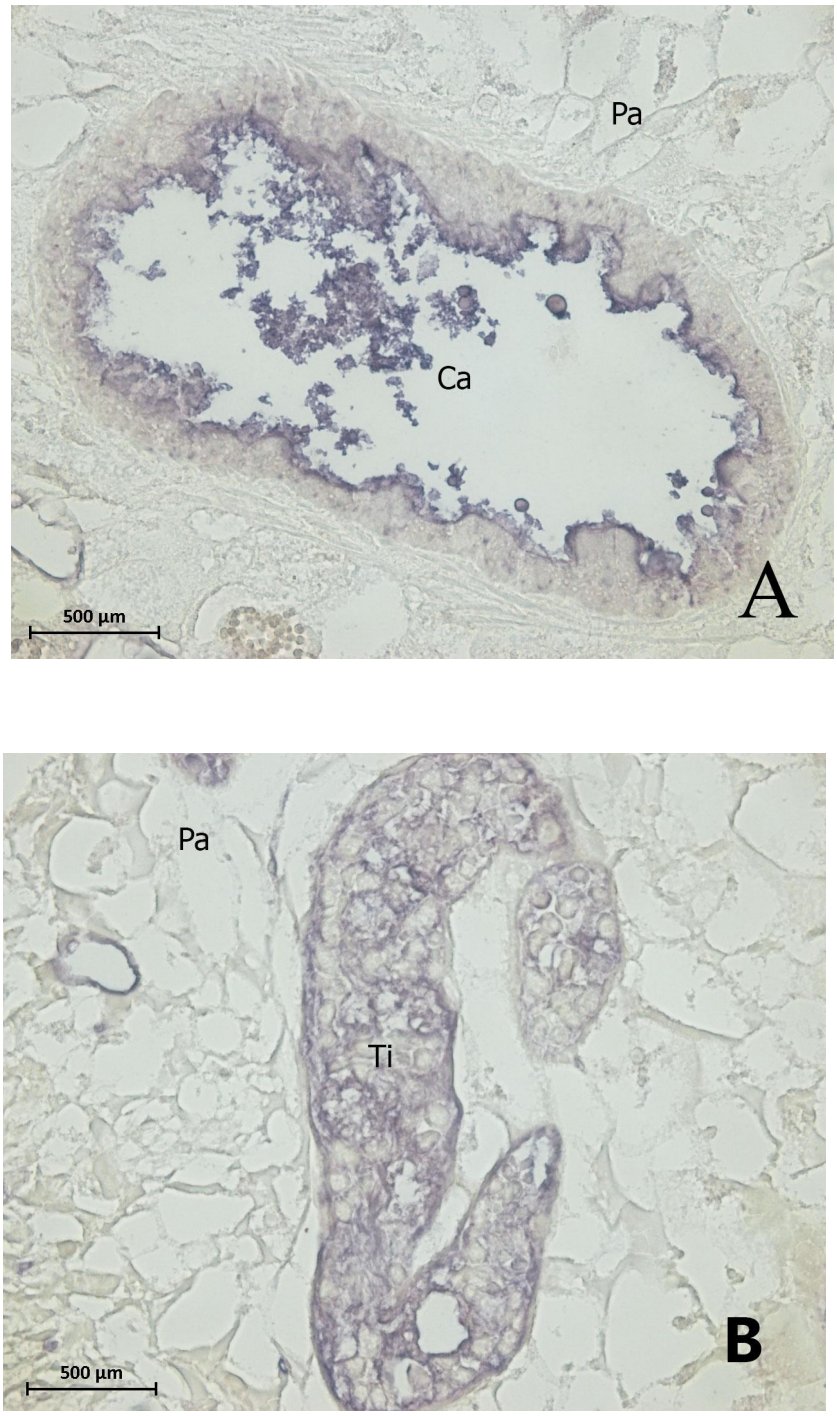
ระยะ Infection





ภาพที่ 8 การแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Infection (ภาพ A) มีการแสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca), (ภาพ B) ไม่มีการแสดงออกใน Testis (Ti)

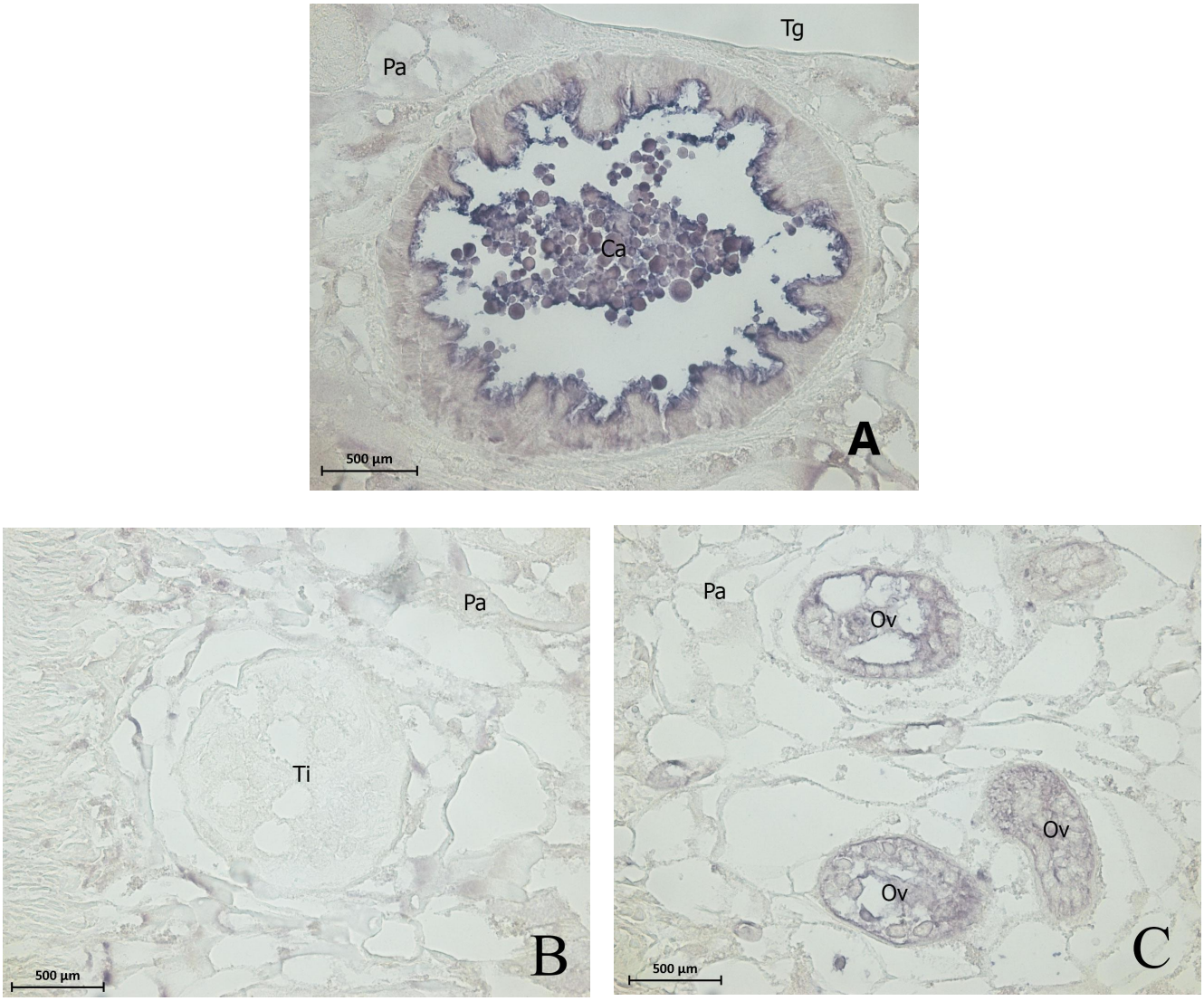
ระยะ Termination



ภาพที่ **9** การแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Termination (ภาพ A) แสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca), (ภาพ B) มีการแสดงออกบริเวณ Testis (Ti), (ภาพ C) มีการแสดงออกของบริเวณ Ovary (Ov)

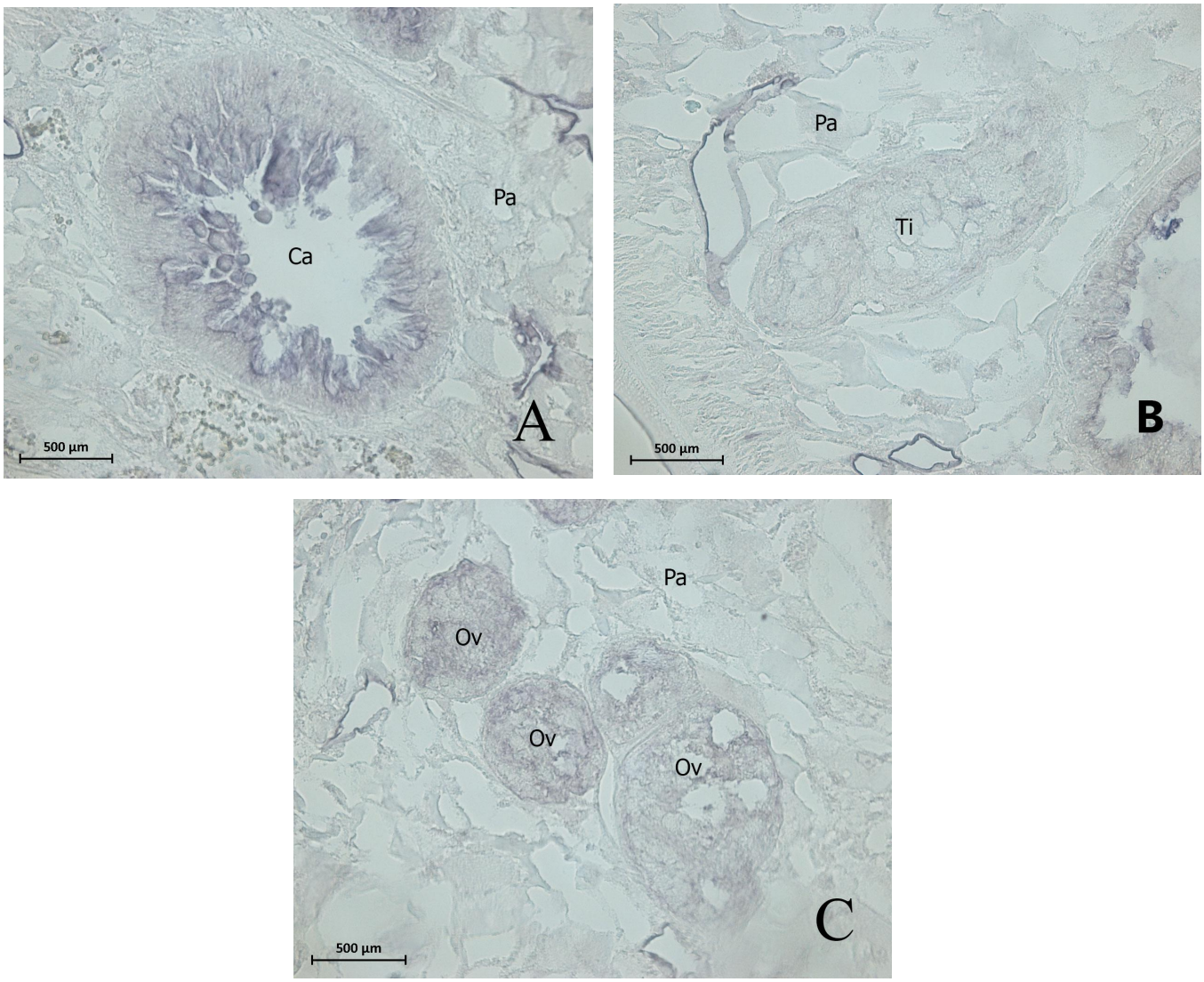
SAP-2 + LAP

ระยะ Infection



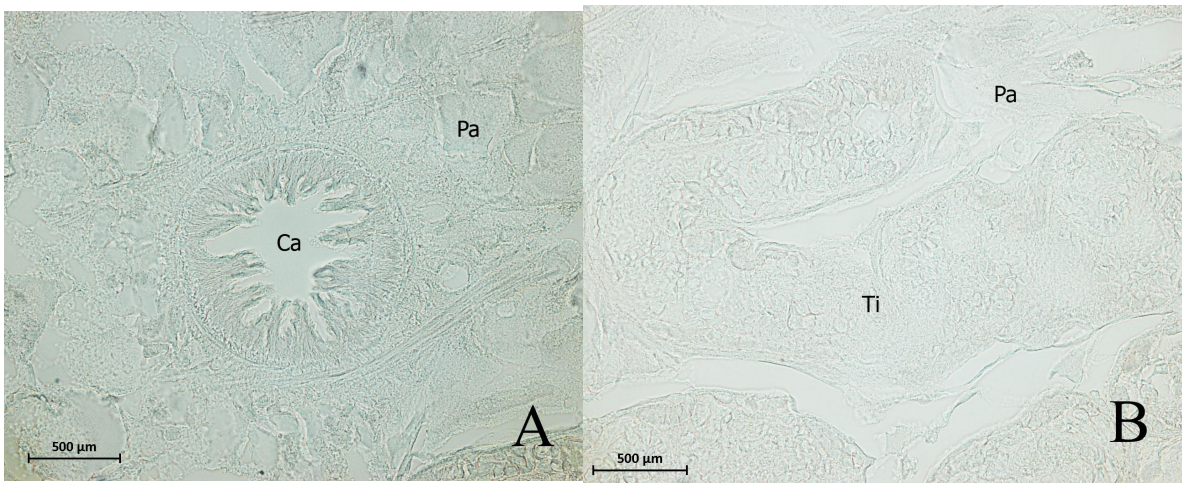
ภาพที่**10** การแสดงออกของ FgSAP-2 และ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Infection (ภาพ A) มีการแสดงออกในแกรนูล และบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca) ,(ภาพ B) ไม่มีการแสดงออกใน Testis (Ti)

ระยะ **Termination**



ภาพที่ **11** การแสดงออกของ FgSAP-2 และ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Termination (ภาพ A) มีการแสดงออกในแกรนูล และบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca) ,(ภาพ B) มีการแสดงออกใน Testis (Ti) ,(ภาพ C) มีการแสดงออกของบริเวณ Ovary (Ov)

Negative control

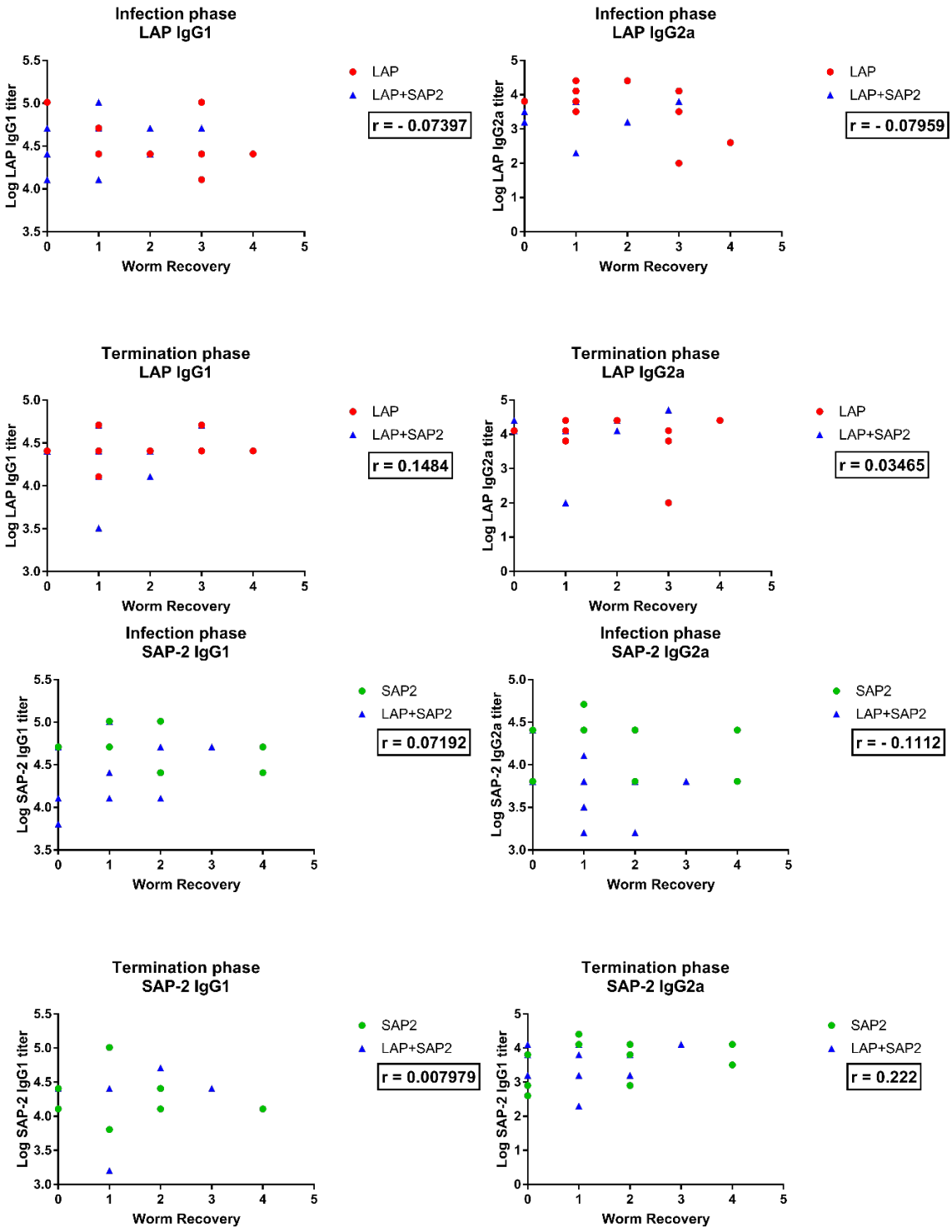


ภาพที่ 12 (ภาพ A) ไม่มีการแสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca) ,(ภาพ B) ไม่มีการแสดงออกใน Testis (Ti)

Correlation

จากการพล็อตค่า log titer ของกลุ่ม LAP, SAP-2, LAP+SAP-2, adjuvant และ positive control กับจำนวนพยาธิที่เหลืออยู่(worm recovery) พบว่าค่า correlation efficiency (r) ของกลุ่ม SAP-2 ระยะ infection IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.752 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.777, กลุ่ม SAP-2 ระยะ termination ของ IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.783 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.744, กลุ่ม LAP ระยะ infection IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.770 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.761, กลุ่ม LAP ระยะ termination ระยะ IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.743 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.668 ดังนั้นค่า correlation efficiency ของกลุ่ม SAP-2 ระยะ termination ของ IgG1 และ กลุ่ม LAP ระยะ infection IgG1 มีค่าติดลบที่มาก แสดงว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับการลดลงของจำนวนพยาธิ (ดังภาพ 4-14 และ 4-15)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน Worm recovery กับระดับของ Antibody (IgG) แสดงให้เห็นว่า เพิ่มขึ้นของระดับ IgG1 และ IgG2a สัมพันธ์กับการลดลงของจำนวน Worm recovery โดยพบว่าความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของระดับ IgG1 มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนมากกว่า (Strong correlation) ระดับการเพิ่มขึ้นของ IgG2a



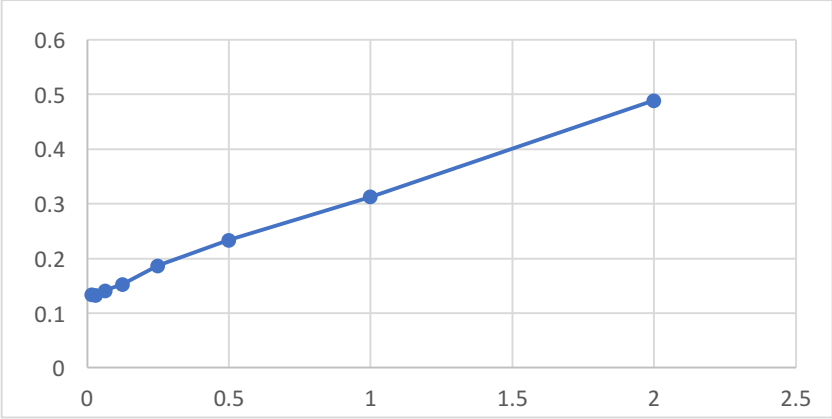
ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log Titer ของ IgG1 และ IgG2a กับจำนวน worm recovery ในระยะ Infection (ภาพA และB) ระยะTermination(ภาพC และD) ของ rFgSAP-2-vaccinated, SAP-2 + LAP, Adjuvant control(AC), Positive control(PC) แต่ละจุดแสดงถึงค่า Log Titer ของซีรัม(n = 40) กับจำนวน worm recovery

การตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-2 โดยวิธี Lowry method

ตารางที่ 11 แสดงความเข้มข้นของโปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-2 โดยวิธี Lowry method

Sample	Wells	Value	Result (µg/µl)	Mean result (µg/µl)
rFgSAP-1	A3	1.249	6.222	6.535
	B3	1.362	6.848	
rFgSAP-2	C3	1.278	6.382	6.177
	D3	1.205	5.972	

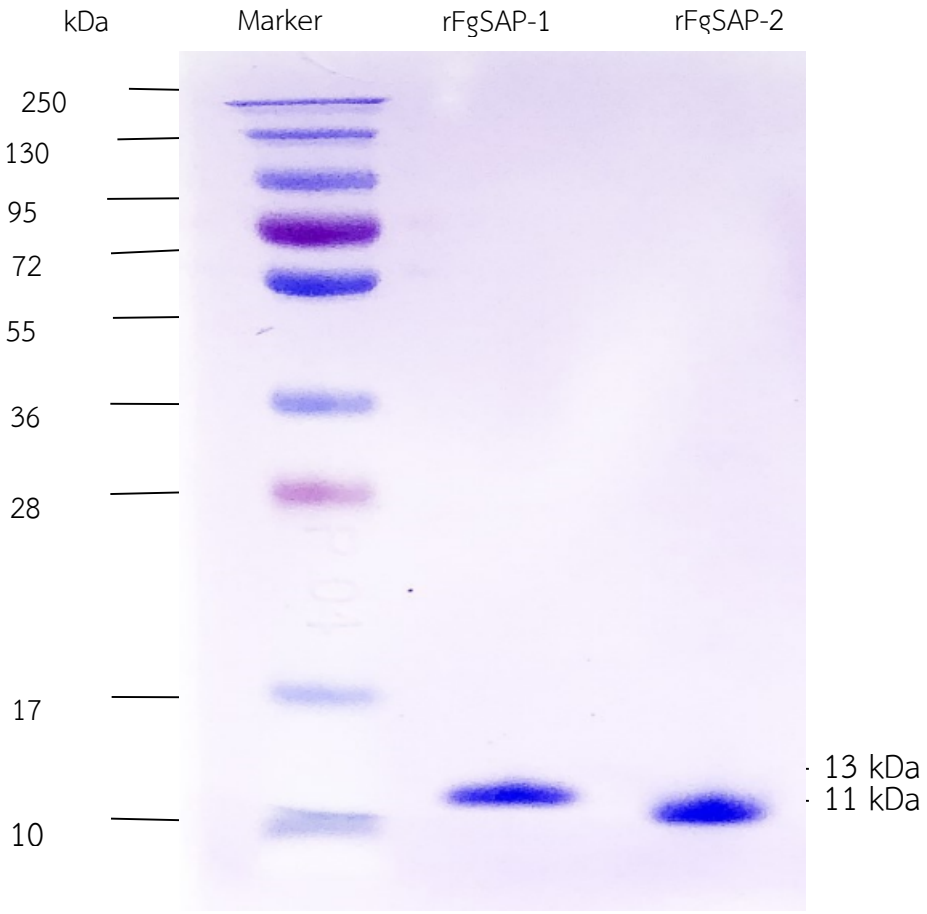
ผลการตรวจสอบความเข้มข้นของ rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้วิธี Lowry method พบว่า ความเข้มข้นของโปรตีน rFgSAP-1 มีความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย 6.535 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และความเข้มข้นของโปรตีน rFgSAP-2 มีความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย 6.177 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตารางที่ 1 แสดงค่าความเข้มข้น(Conc.) และค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 750 นาโนเมตรของ rFgSAP-1 และ rFgSAP-2



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) เปรียบเทียบหาความเข้มข้น SAP-1 และ SAP-2

การตรวจหาขนาดของโปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-2 โดยวิธี SDS-PAGE

จากการตรวจวัดขนาดของโปรตีน recombinant protein SAP-1 (rFgSAP-1) และ recombinant protein SAP-2 (rFgSAP-2) ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า rFgSAP-1 นั้นมี ขนาด 13 kDa และ rFgSAP-2 มีขนาด 11 kDa



ภาพที่ 15 แสดงขนาดของแถบโปรตีน rFgSAP-1 (lane 1) และ rFgSAP-2 (lane 2) ที่แยกด้วย 12.5 % SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie blue เทียบตำแหน่งและขนาดของโปรตีน Specific marker (ด้านซ้ายสุด) ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

การตรวจการตอบสนองของ antibody ชนิด IgG1 และ IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-1, rFgSAP-2 โดยวิธี Indirect ELISA

ผลการตอบสนองของ HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1, IgG2a ต่อกลุ่ม rFgSAP-1, rFgSAP2, rFgSAP-1+rFgSAP-2 โดยแต่ละกลุ่มแบ่งเป็น Infection (4 สัปดาห์) และ Termination (6 สัปดาห์) ด้วยวิธีการ Indirect ELISA ผลตามตาราง ดังนี้

ตารางที่ 12 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม rFgSAP-1 ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1และ IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-1

Serum No.	Titer			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week)	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	25600	6400	3200	3200
2	12800	12800	6400	1600
3	25600	6400	12800	3200
4	25600	25600	6400	6400
5	51200	12800	6400	3200
6	51200	12800	6400	3200
7	51200	12800	3200	3200
8	12800	6400	1600	6400

ตารางที่ 13 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม rFgSAP-2 ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1และ IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-2

Serum No.	Titer			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week)	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	6400	200	3200	3200
2	12800	400	6400	6400
3	25600	400	6400	1600
4	3200	หาค่าไม่ได้	12800	12800
5	12800	800	12800	12800
6	12800	800	6400	1600
7	12800	400	12800	1600
8	12800	400	12800	6400
9	12800	800	25600	12800
10	25600	800	25600	12800

ตารางที่ 14 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม rFgSAP-1+rFgSAP-2 ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1และ IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-1

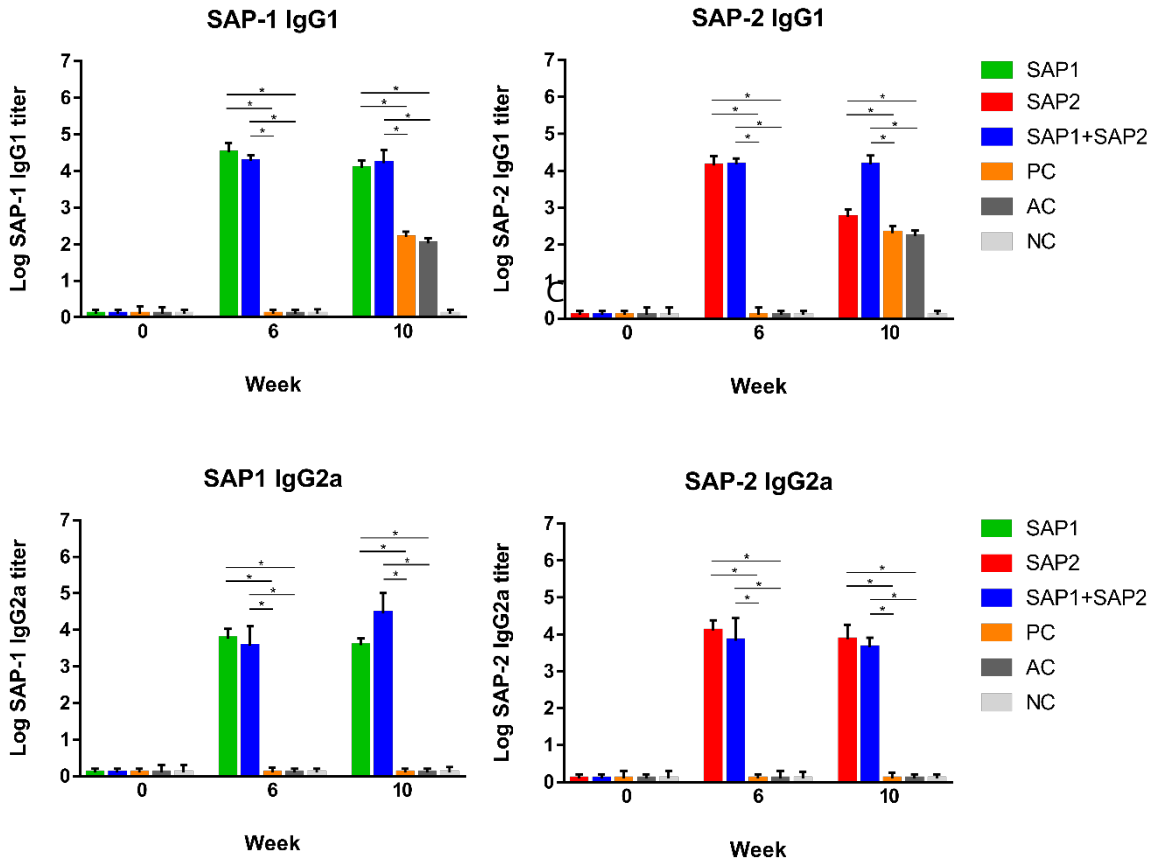
Serum No.	Titer			
	rFgSAP-1			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week)	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	12800	25600	6400	102400
2	25600	12800	6400	51200
3	25600	6400	3200	25600
4	25600	25600	1600	3200
5	25600	51200	3200	3200
6	12800	6400	6400	6400
7	12800	12800	3200	12800
8	หาค่าไม่ได้	12800	3200	25600
9	12800	6400	3200	
10	12800	3200	100	

ตารางที่ 15 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของกลุ่ม rFgSAP-1+rFgSAP-2 ตรวจหาระดับแอนติบอดี IgG1และ IgG2a ของโปรตีน rFgSAP-2

Serum No.	Titer			
	rFgSAP-1			
	IgG1		IgG2a	
	Infection (4 week)	Termination (6 week)	Infection (4 week)	Termination (6 week)
1	25600	25600	6400	6400
2	12800	25600	3200	6400
3	25600	12800	12800	6400
4	12800	25600	6400	1600
5	12800	12800	6400	1600
6	12800	6400	12800	3200
7	12800	12800	6400	6400
8	12800	12800	6400	6400
9	12800	6400	6400	3200
10	6400	6400	100	

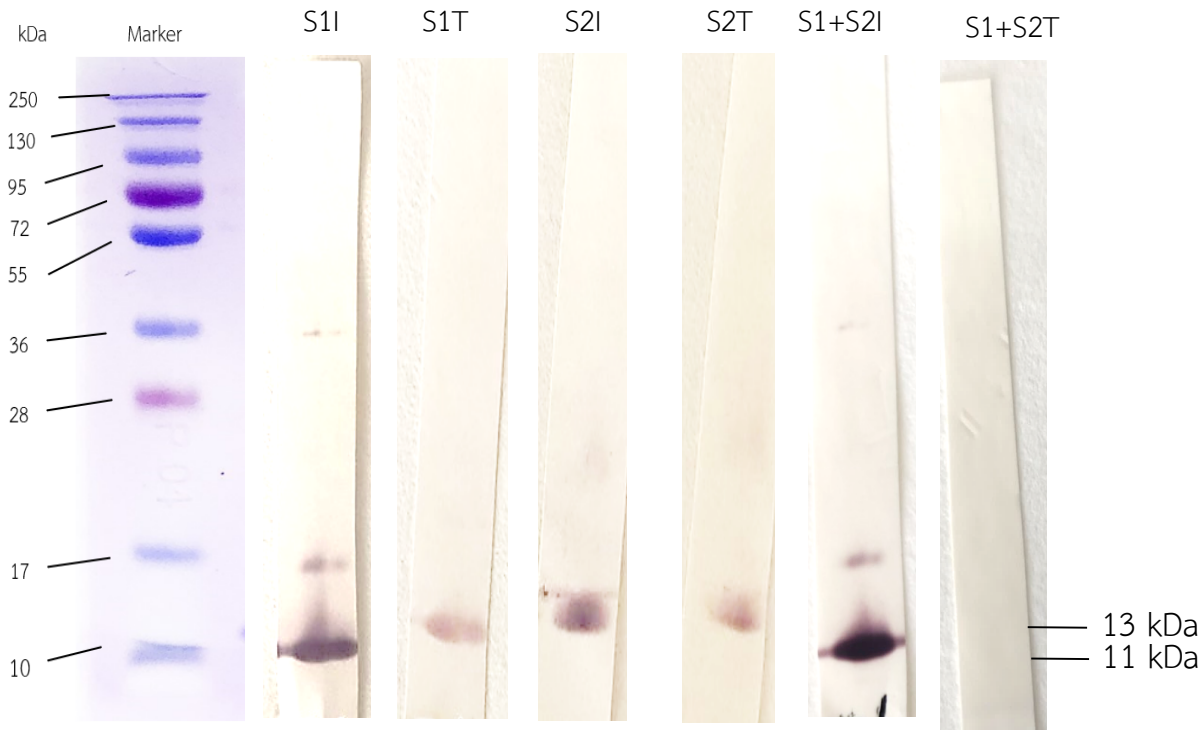
จากการเปรียบเทียบระดับ IgG1 และ IgG2a ของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าซีรัมจากหนที่ immunized ด้วย rFgSAP-1 หรือ rFgSAP-2 หรือ rFSAP-1 + rFgSAP-2 มีระดับ IgG titer สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ adjuvant , negative control , positive control

ผลการวัดระดับ IgG1 และ IgG2a พบว่า กลุ่มหนูที่ฉีดวัคซีนทุกกลุ่มมีการเพิ่มขึ้นของระดับ IgG1 และ IgG2a ต่อโปรตีน LAP และ SAP2 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม Positive control และ Adjuvant control ทั้งในระยะ Infection และ Termination



ภาพที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-SAP-1 IgG1 antibody กับระยะเวลาหลังจากการกระตุ้น ด้วย rFgSAP-1 (ภาพ A), กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-SAP-1 IgG2a antibody กับระยะเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย rFgSAP-1 (ภาพ B), กราฟแสดงความสัมพันธ์ Anti-SAP-2 IgG1 antibody กับระยะเวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 (ภาพ C), กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Anti-SAP-2 IgG2a antibody กับระยะ เวลาหลังจากการกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 (ภาพ D), * เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 โดยวิธี Western blot

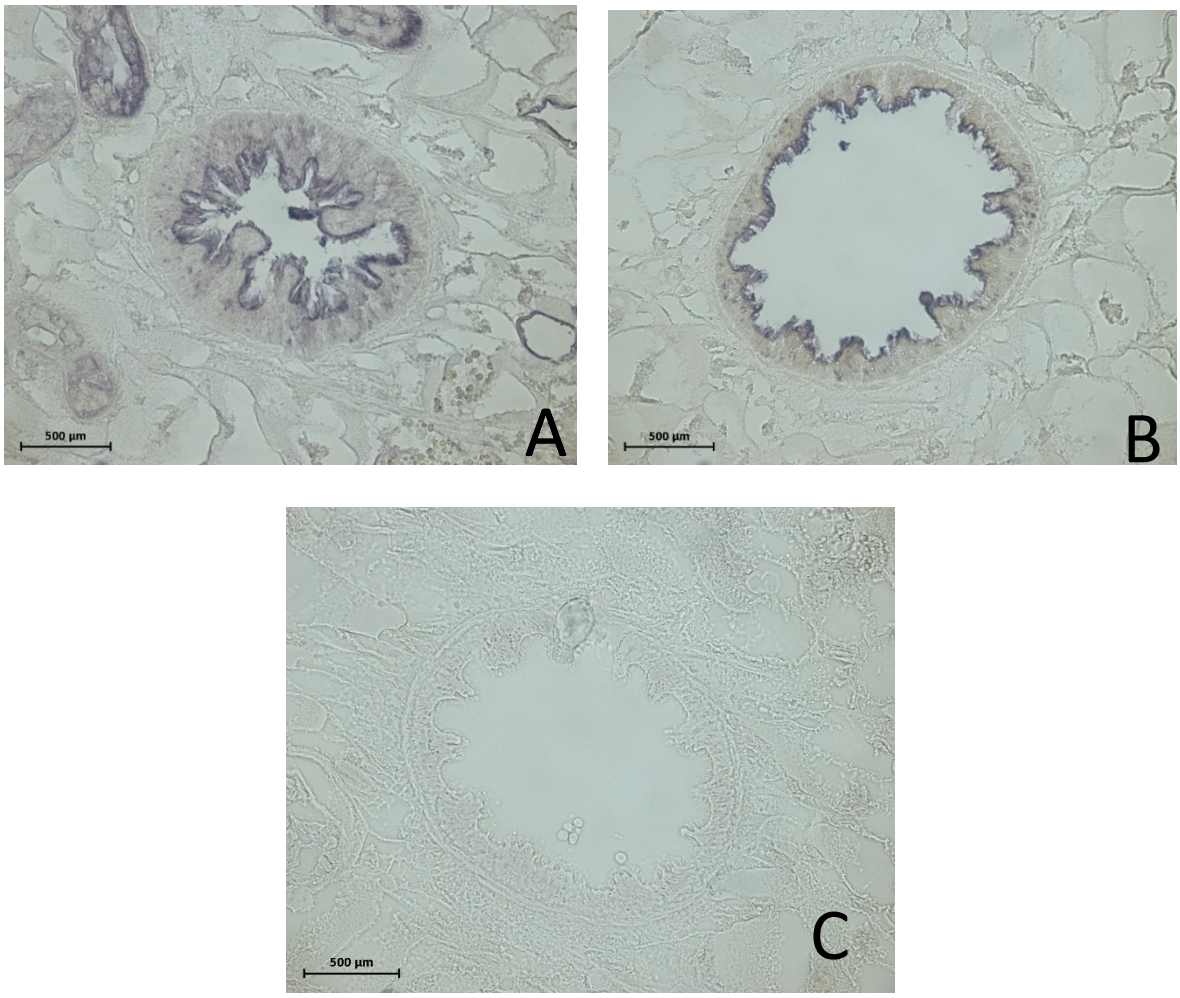


ภาพที่ 17 แสดงขนาดของแถบโปรตีน HRP-conjugated goat anti-mouse ต่อ pool serum SAP-1+SAP-2, pool serum SAP-1 , pool serum SAP-2 โดยกลุ่ม SAP-1 ได้แก่ S1I (lane 1) , S1T (lane 2) กลุ่ม SAP-2 ได้แก่ S2I (lane 3) , S2T (lane 4) และ กลุ่ม SAP-1+SAP-2 ได้แก่ S1+S2I (lane 5) , S1+S2T (lane 6) เทียบตำแหน่งและขนาดของโปรตีน Specific marker (ด้านซ้ายสุด) ที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี indirect western blot analysis

Immunohistochemistry

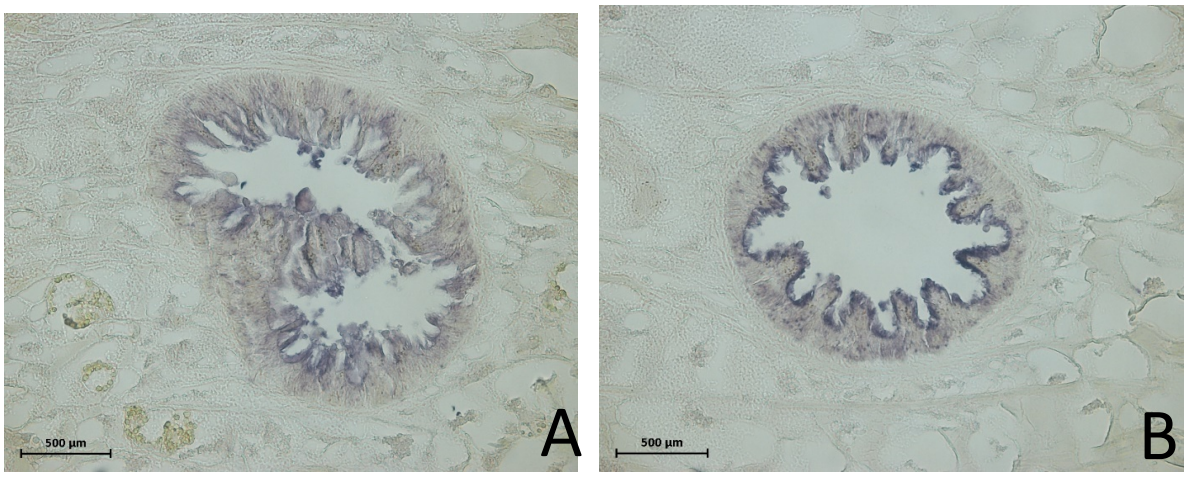
ผลการศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของ FgSAP-1 และ FgSAP-2 ในพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* เพื่อดูความจำเพาะของแอนติบอดี Anti-rFgSAP-1, Anti-rFgSAP-2 โดยอาศัยหลักการ Immunohistochemistry พบว่ามีความจำเพาะต่อโปรตีนที่ลำไส้และ Testis ของพยาธิ ซึ่ง SAP-1 และ SAP-2 มีการแสดงออกมาก ที่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (Epithelium) และ Testis จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของพยาธิ

Anti-SAP-2 antibody



ภาพที่ 18 การแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Termination (ภาพ A) มีการแสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca), ระยะ Infection (ภาพ B) แสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca) และ Negative control (ภาพ C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

Anti-SAP-1+SAP-2 antibody



ภาพที่ 19 การแสดงออกของ FgSAP-1+SAP-2 gene ในเนื้อเยื่อของ *Fasciola gigantica* ในระยะ Termination (ภาพ A) มีการแสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells (Ca), ระยะ Infection (ภาพ B) แสดงออกบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ Ca ที่กำลังขยาย 400 เท่า

Worm recovery

ตารางที่ 16 Worm recovery และร้อยละของพยาธิที่ลดลงในหนู ICR ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย recombinant- protein ของพยาธิ *F. gigantica* โดย infect หนูด้วยพยาธิระยะ metacercariae 15 ตัว ต่อหนู 1 ตัว

Groups	Mice	Worm recovery	Mean±SD	Reduction (%)
Positive control	10	5,7,6,3,6,8,7,8,5,4	5.9±1.66	
Adjuvant control	10	6,8,4,3,5,7,6,2,8,8	5.7±2.16	
SAP1	10	2,1,0,2,3,0,1,2,2,1	1.4±0.97	76.3[a], 75.4[b]
SAP2	10	2,4,0,1,2,0,1,2,4,0	1.6±1.51	72.9[a], 71.9[b]
SAP1+SAP2	10	0,1,2,0,0,2,1,1,1,2	1.1±0.82	83.1[a], 82.5[b]

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

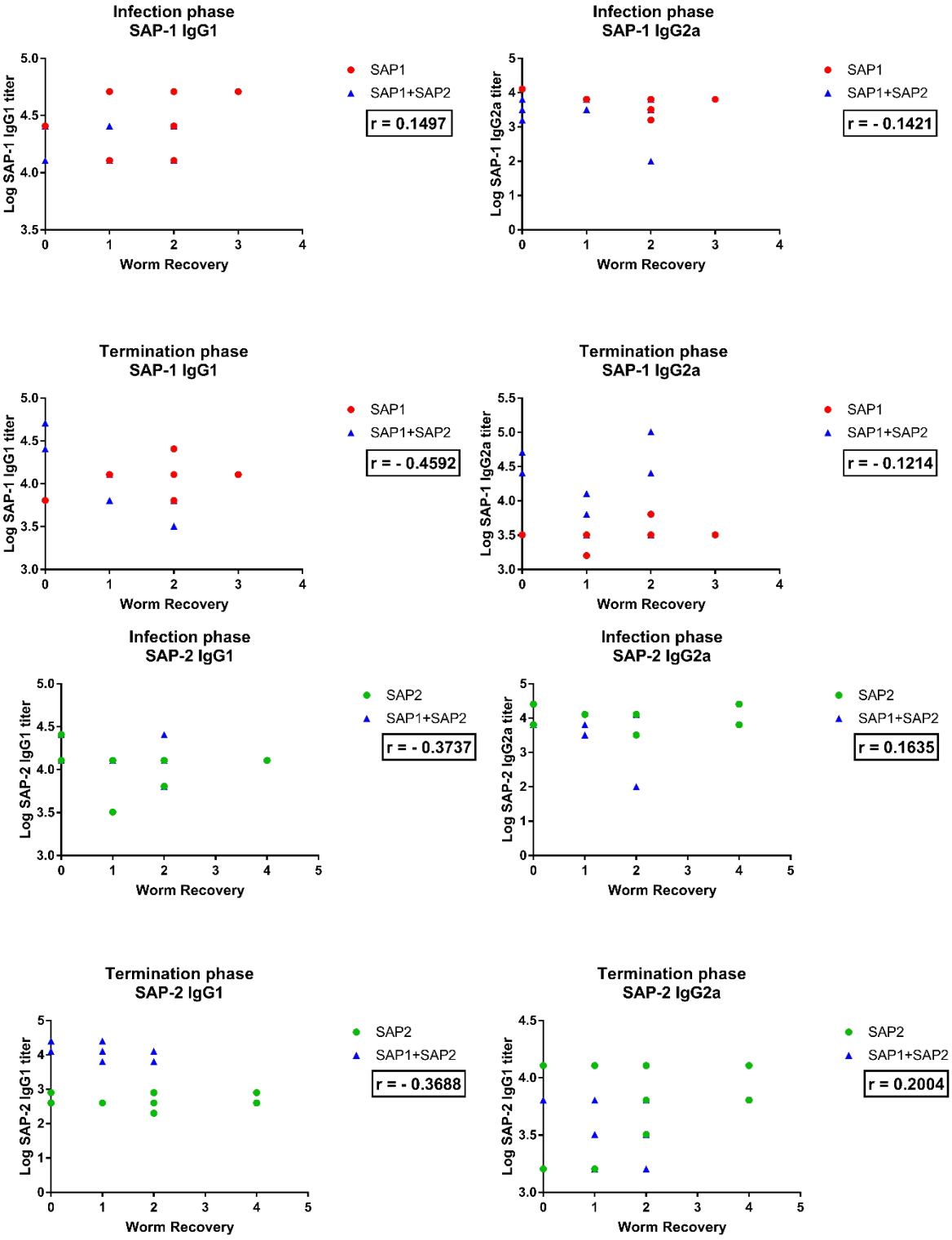
[a] Percent reduction, compared with group 2

[b] Percent reduction, compared with group 3

ทำการฉีดวัคซีนด้วยโปรตีนแบบชนิดเดียว (SAP1, SAP2) และโปรตีนแบบผสม (SAP1+SAP2) ในหนูทั้งหมด 10 ตัวจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 4 อาทิตย์ ต่อมาสองสัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่สองทำการติดเชื้อหนูด้วยพยาธิ *Fasciola gigantica* ระยะ metacercariae จำนวน 15 เม็ดต่อหนู หลังจากผ่านไป 4 สัปดาห์จึงการฆ่าหนูเพื่อนับจำนวนพยาธิจากตับและคำนวนเปอร์เซนต์การลดลงของพยาธิหรือ Percent of reduction (%) พบว่าหนูในกลุ่มที่ฉีดโปรตีน SAP1 SAP2 และ โปรตีนแบบผสม (SAP1+SAP2) มีเปอร์เซนต์การลดลงของพยาธิ 75.4-76.3% 71.9-72.9% และ 82.5-83.1% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม adjuvant control และ positive control ตามลำดับ

จากการพล็อตค่า log titer ของกลุ่ม SAP-1, SAP-2, SAP-1+SAP-2, adjuvant และ positive control กับจำนวนพยาธิที่เหลืออยู่ (worm recovery) พบว่าค่า correlation efficiency (r) ของกลุ่ม SAP-1 ระยะ infection IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.806 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.769, กลุ่ม SAP-1 ระยะ termination ของ IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.853 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.832, กลุ่ม SAP-2 ระยะ infection IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.830 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.729, กลุ่ม SAP-2 ระยะ termination ระยะ IgG1 มีค่าเท่ากับ -0.821 และ IgG2a มีค่าเท่ากับ -0.715 ดังนั้นค่า correlation efficiency ของกลุ่ม SAP-1 ระยะ termination ของ IgG1 และ กลุ่ม SAP-2 ระยะ infection IgG1 มีค่าติดลบที่มาก แสดงว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการ ลดลงของจำนวนพยาธิ

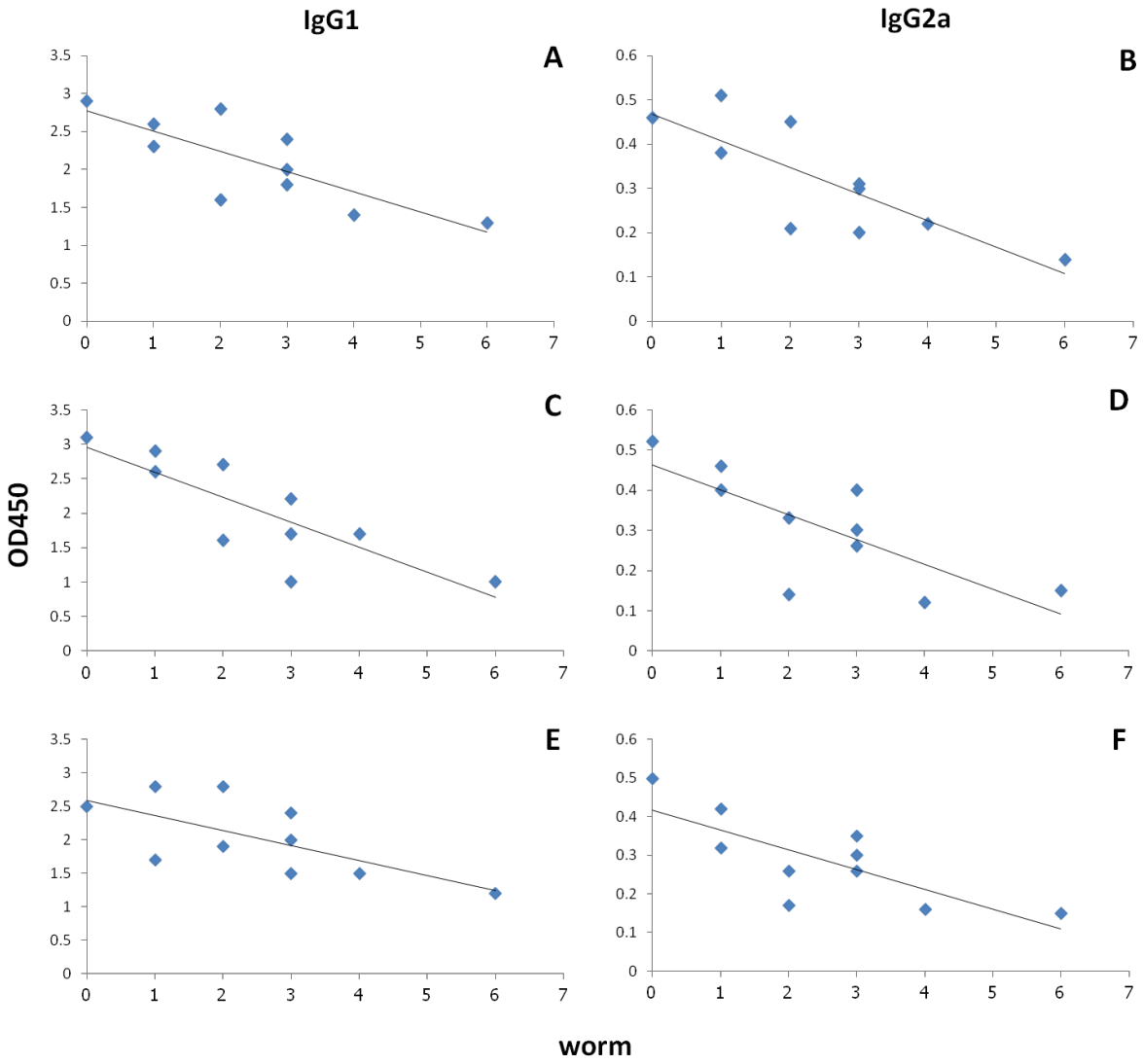
ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน Worm recovery กับระดับของ Antibody (IgG) แสดงให้เห็นว่า เพิ่มขึ้นของระดับ IgG1 และ IgG2a สัมพันธ์กับการลดลงของจำนวน Worm recovery โดยพบว่าความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของระดับ IgG1 และ IgG2a กับจำนวนการลดลงของ Worm recovery มีความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง (Moderate correlation) นอกจากนี้ระดับปริมาณ IgG ทั้งสองชนิดที่ลดลงอาจเกี่ยวข้องกับการ Neutralizing ของแอนติบอดีต่อโปรตีนของพยาธิ



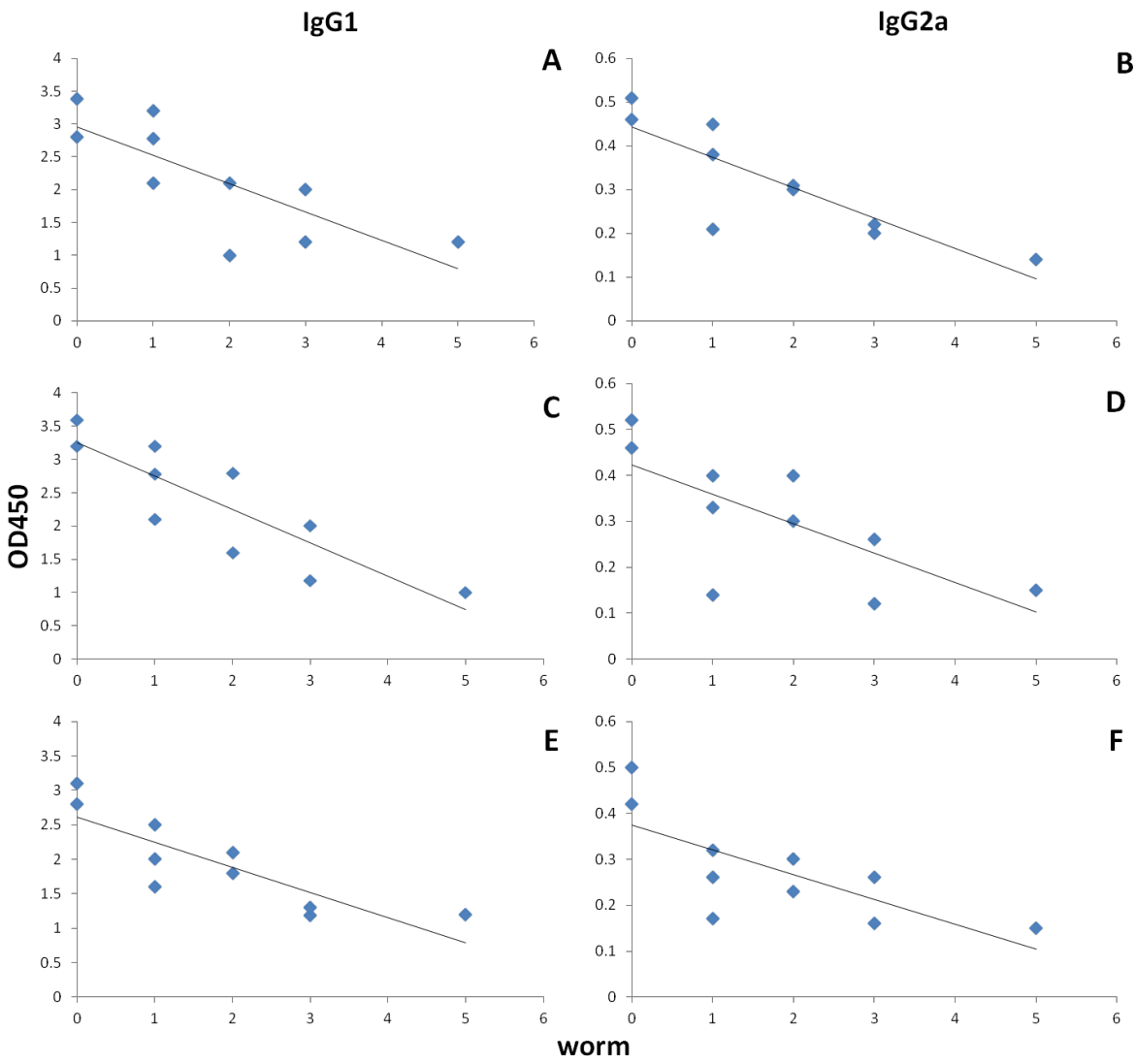
ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log Titer ของ IgG1 และ IgG2a กับจำนวน worm recovery ในระยะ Infection (ภาพ A และ B) ระยะ Termination (ภาพ C และ D) ของ rFgSAP-1-vaccinated, SAP-1 + SAP-2, Adjuvant control (AC), Positive control (PC) แต่ละจุดแสดงถึงค่า Log Titer ของซีรัม (n = 40) กับจำนวน worm recover

เมื่อนำค่าระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ที่ได้มาสร้างกราฟเทียบกับ ช่วงเวลาต่างๆ ที่ทำการทดลองนับจากวันที่มีการฉีดกระตุ้นโปรตีนครั้งแรก (สัปดาห์ที่ 0) จนถึงวันที่ทำการป้อนด้วย เมตาเซอร์คาเรีย (สัปดาห์ที่ 6) และวันที่ทำการฆ่าหนู (สัปดาห์ที่ 10) (รูปที่ 2, 4, 6) ผลการทดลอง พบว่า ระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ทั้งที่ฉีดกระตุ้นด้วย โปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (Short Synthetic Peptides) มีความจำเพาะต่อโปรตีนในแต่ละตัว และมีค่าสูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ภายหลังจากการฉีดกระตุ้น ในครั้งที่ 2 และสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นในช่วงสัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป ระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a มีค่าคงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยโปรตีนแล้ว ดังนั้น จากข้อมูลดังกล่าว สามารถบ่งชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (Short Synthetic Peptides) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ที่ได้รับการกระตุ้นจากการฉีดด้วยโปรตีนทั้งสองชนิด พบว่าทั้งโปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (Short Synthetic Peptides) สามารถกระตุ้นแอนติบอดี IgG1 ได้ดีกว่า IgG2a ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ Th2 คล้ายคลึงกับการศึกษาวัคซีนที่ผ่านมา

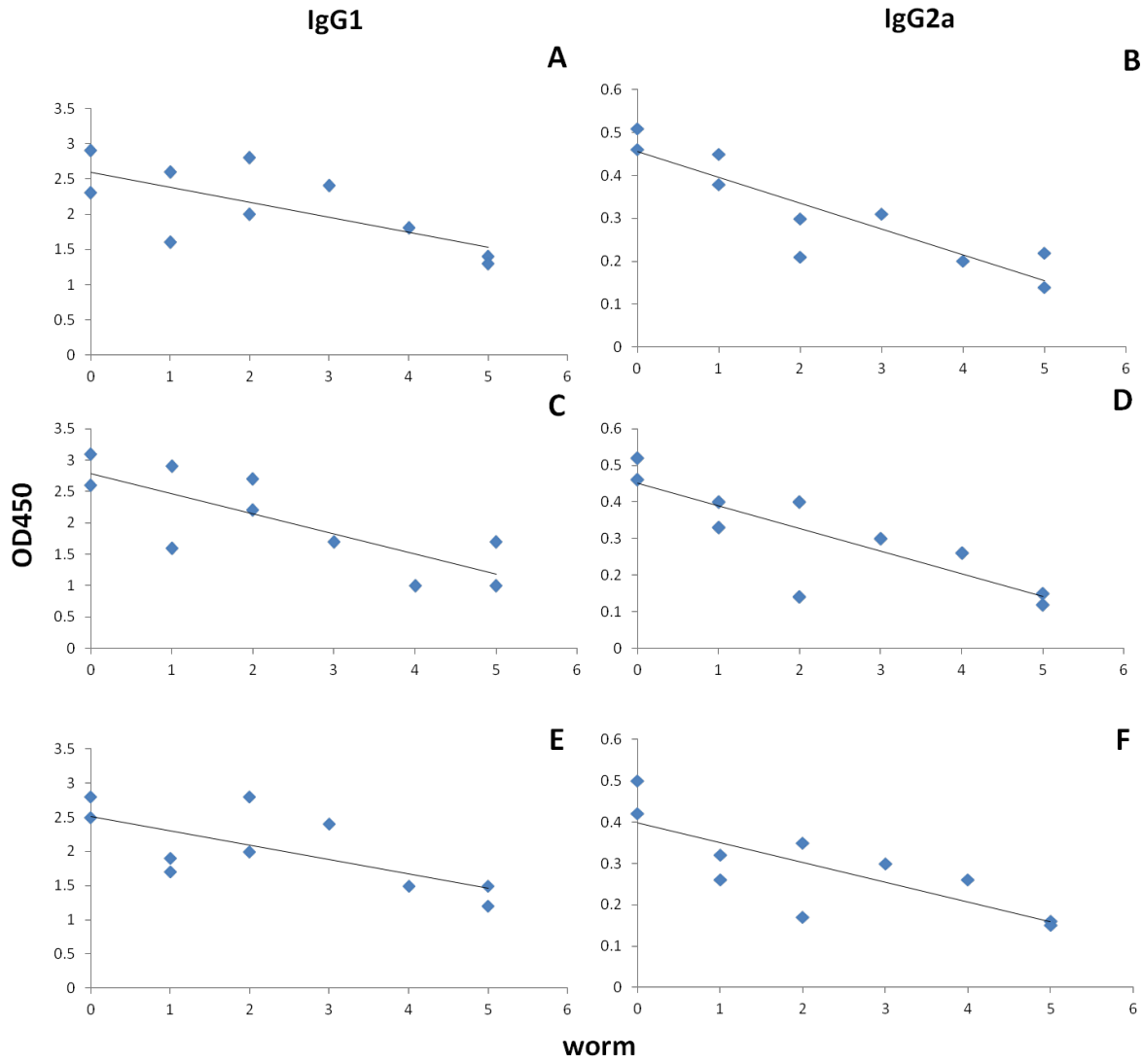
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a โดยใช้ซีรั่มของหนูใน 3 ช่วงเวลา คือ วันแรกของการติดเชื้อพยาธิ (หรือสัปดาห์ที่ 6 หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน) วันที่ 14 หลังจากการติดเชื้อ (หรือสัปดาห์ที่ 8 หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน) และวันที่ทำการฆ่าหนู หรือวันที่ 28 หลังจากการติดเชื้อ (หรือสัปดาห์ที่ 10 หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน) เทียบกับจำนวนพยาธิที่ทำการตรวจนับได้ในหนูแต่ละตัว ในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่า ระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย โปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (Short Synthetic Peptides) มีความสัมพันธ์สอดคล้องเชิงลบกับจำนวนพยาธิ กล่าวคือในหนูที่มีระดับของแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a สูง จะตรวจพบจำนวนพยาธิน้อย เช่นกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวแสดงถึง ประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิในการทดลองกลุ่มนี้ และเมื่อนำค่าดังกล่าวมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติแล้ว พบว่ามีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 21 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ต่อ spSAP1/1 เทียบกับจำนวนพยาธิของกลุ่มที่ฉีดวัคซีนด้วย spSAP1/1 ในวันที่ทำการติดเชื้อพยาธิ (A,B) วันที่ 14 หลังจากการติดเชื้อ (C, D) และวันที่ทำการฆ่าหนู (วันที่ 28 หลังจากติดเชื้อ: E,F)



ภาพที่ 22 ผลความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ต่อ spSAP1/2 เทียบกับจำนวนพยาธิของกลุ่มที่ฉีดวัคซีนด้วย spSAP1/2 ในวันที่ทำการติดเชื้อพยาธิ (A,B) วันที่ 14 หลังจากการติดเชื้อ (C, D) และวันที่ทำการฆ่าหนู (วันที่ 28 หลังจากติดเชื้อ: E,F)



ภาพที่ 23 ผลความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี IgG1 และ IgG2a ต่อ spSAP1/3 เทียบกับจำนวนพยาธิของกลุ่มที่ฉีดวัคซีนด้วย spSAP1/3 ในวันที่ทำการติดเชื้อพยาธิ (A,B) วันที่ 14 หลังจากการติดเชื้อ (C, D) และวันที่ทำการฆ่าหนู (วันที่ 28 หลังจากติดเชื้อ: E,F)

การวิเคราะห์การลดลงของพยาธิในการทดสอบวัคซีน

หลังจากทำการฆ่าหนูทดลองแล้วจึงนำตับหนูมาละลายในสารละลาย PBS เพื่อหาจำนวนพยาธิ แล้วนำจำนวนพยาธิที่นับได้ของหนูแต่ละตัวในแต่ละกลุ่ม มาทำการวิเคราะห์หาร้อยละการลดลงของพยาธิ ของการทดสอบวัคซีน (หรือร้อยละการป้องกันการติดเชื้อ) โดยใช้สูตรคำนวนดังนี้

ร้อยละการลดลงของจำนวนพยาธิ = (A - B)/A x 100

A คือค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม

B คือค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดสอบวัคซีน

ตารางที่ 17 แสดงจำนวนพยาธิที่นับได้หลังจากการทดสอบวัคซีนโดยใช้ Aluminium hydroxide gel adjuvant ในแต่ละกลุ่ม

Group	Condition	Mice	Worm recovery	Mean	Percent Reduction	
					เทียบกับ 2	เทียบกับ 3
1	Negative control	10	-	-	-	-
2	Positive control	10	9,8,2,7,8,9,7,7,9,6	6.9	-	-
3	Adjuvant control	10	5,7,6,9,5,8,7,5,8,9	7.2	-	-
4	spSAP1/1	10	3,1,2,3,4,1,0,2,6,3	2.5	63	65
5	spSAP1/2	10	2,5,5,0,0,1,2,3,1,4	2.3	66	68
6	spSAP1/3	10	0,2,1,0,5,1,1,3,3,2	1.8	73	75

การวิเคราะห์ความเสียหายของตับหนูทดลองในการทดสอบวัคซีน

การวิเคราะห์ความเสียหายของตับหนูโดยดูลักษณะผิดด้านนอกของตับ ซึ่งพิจารณาจากปริมาณของ fibrosis ของตับที่เกิดขึ้น ดังตารางที่ 3 แล้วนำมาเปลียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 18 การกำหนดระดับการให้คะแนนความรุนแรงของการเกิด fibrosis ของตับ

ระดับคะแนน	ปริมาณ fibrosis (%)	ลักษณะ fibrosis
0	0	ไม่พบเลย
1	น้อยกว่า 5	พบน้อยมาก
2	5-15	พบน้อย
3	15-30	พบปานกลาง
4	30-50	พบค่อนข้างมาก
5	มากกว่า 50	พบมาก

ตารางที่ 19 แสดงคะแนนรอยโรคของตับในการทดสอบวัคซีน

Group	Condition	Mice	Mean liver damage score ± SD
1	Negative control	10	-
2	Positive control	10	4.7 ± 1.2
3	Adjuvant control	10	5.1 ± 1.0
4	spSAP1/1	10	2.4 ± 1.1 [a]*, [b]*
5	spSAP1/2	10	1.9 ± 1.4 [a]*, [b]*
6	spSAP1/3	10	2.2 ± 1.0 [a]*, [b]*

*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

[a] เปรียบเทียบกับกลุ่ม 2, [b] เปรียบเทียบกับกลุ่ม 3

การวิเคราะห์น้ำหนักพยาธิโดยเฉลี่ยต่อตัวในการทดสอบวัคซีน

การวิเคราะห์น้ำหนักพยาธิโดยเฉลี่ยต่อตัวทำโดยการนำพยาธิของแต่ละกลุ่มทดลองมารวมกัน และใช้กระดาษกรองซับน้ำให้หมดและชั่งน้ำหนักด้วยตาชั่งที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่ง แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อตัว

จากการทดลองจะพบว่าขนาดของพยาธิของกลุ่มทดสอบวัคซีนมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดของพยาธิที่ทดสอบวัคซันมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัด และน้ำนักของพยาธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน

ตารางที่ 20 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักพยาธิต่อตัวในแต่ละกลุ่ม

Group	Condition	Mice	Mean weight worm (μg)	Percent Reduction	
				เทียบกับ 2	เทียบกับ 3
1	Negative control	10	-	-	-
2	Positive control	10	2.38	-	-
3	Adjuvant control	10	2.99	-	-
4	spSAP1/1	10	1.03	57.0*	65.6*
5	spSAP1/2	10	1.12	50.8*	60.9*
6	spSAP1/3	10	1.01	61.2*	69.6*

*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดสอบ Indirect ELISA เพื่อหาระดับของแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG2a พบว่า IgG1 มีระดับสูงกว่าชนิด IgG2a ทั้งระยะ infection และ termination ในกลุ่มของ SAP-2 และ LAP เมื่อยืนยันด้วยผล western blot ซึ่งทำการทดสอบโดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม SAP-2 ใช้ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 กับ Alum, กลุ่ม LAP ใช้ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgLAP กับ Alum และกลุ่ม SAP-2+LAP ใช้ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgSAP-2 และrFgLAP กับ Alum ซึ่งจะ blot กับโปรตีน SAP-2 และ LAP พบว่า กลุ่ม SAP-2 ให้ผลจำเพาะกับ rFgSAP-2, กลุ่ม LAP ให้ผลจำเพาะกับ rFgLAP และกลุ่ม SAP-2+LAP ให้ผลจำเพาะกับ rFgLAP และ rFgSAP-2 เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีจากซีรัมของหนูทั้ง 3 กลุ่มในระยะ infection และ termination โดยใช้ 1X PBS เป็น negative control มาทดสอบกับเนื้อเยื่อของพยาธิ *Fasciola gigantica* พบว่าในระยะ infection แอนบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีน LAP และ SAP-2 ที่แสดงออกบริเวณแกรนูลและส่วนปลายไซโตพลาสซึมของเยื่อบุลำไส้ (cecal epitheilial cell) และระยะ termination แอนบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีน LAP และ SAP-2 ที่แสดงออกบริเวณอัณฑะ (testis), รังไข่ (ovary), แกรนูลและส่วนปลายไซโตพลาสซึมของเยื่อบุลำไส้ (cecal epitheilial cell) โดยผลที่ได้นั้นแสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปพัฒนาศักยภาพของวัคซีนในการต้านการติดพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* ได้ และความสัมพันธ์ระหว่าง worm recovery กับ ระดับแอนติบอดี พบว่าค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่สูงขึ้น มีผลทำให้จำนวนพยาธิใบไม้ตับลดลง

rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูได้ โดยกระตุ้น Th2/Th1 immune responses ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย rFgSAP-1 พบว่ามีระดับของ IgG1 มากกว่า IgG2a ทำให้เกิดการกระตุ้น Th2 immune responses ได้เด่นชัด และในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย rFgSAP-2 พบการตอบสนองของ IgG1 และ IgG2a จึงสามารถทำให้เกิดการกระตุ้น Th2/Th1 immune responses ได้เช่นเดียวกัน

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีการทดสอบกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายด้วย SAP-2 จาก *F. hepatica* ร่วมกับ Freund's adjuvant มีค่า %Protection เท่ากับ 81.2% (Espino and Hillyer, 2004) และ 60 - 83.3% ในหนูทดลอง (Espino and Hillyer, 2010), หนูกลุ่ม LAP ซึ่งกระตุ้นด้วย LAP จาก *F.gigantica* ร่วมกับ Freund's adjuvant มีค่าเท่ากับ 60.8 - 64.3% (Changklungmoa., 2013), หนูกลุ่ม SAP-2 ซึ่งกระตุ้นด้วย SAP-2 จาก *F.gigantica* ร่วมกับ Freund's adjuvant มีค่าเท่ากับ 76.4 - 78.5% (Kueakhai et al., 2013), หนูที่กระตุ้นด้วย SAP-2 จาก *F. hepatica* ร่วมกับ Freund's adjuvant มีค่า %Protection เท่ากับ 60.0 - 62.5% (Rivera and Espino, 2017) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการป้องกันการติพยาธิ (%Protection) กับการศึกษาโดยใช้ Adjuvant ที่แตกต่างกันคือใช้ Alum adjuvant ร่วมกับ Recombinant protein จากพยาธิ *F.gigantica* ซึ่ง %Protection ของหนูกลุ่ม LAP กระตุ้นด้วย LAP มีค่าเท่ากับ 66.6 - 67.8% และหนูกลุ่ม SAP-2 กระตุ้นด้วย SAP-2 มีค่าเท่ากับ 71.9 - 72.8% เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบครั้งนี้กับผลการศึกษาก่อนหน้า พบว่าหนูกลุ่ม LAP ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า %Protection สูงกว่า และหนูกลุ่ม SAP-2 ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า %Protection ต่ำกว่าผลการทดสอบกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วย Combine vaccine ซึ่งใช้ทั้ง LAP และ SAP-2 จาก *F.gigantica* ร่วมกับ Alum มีค่า %Protection เท่ากับ 80.7 - 81.3% ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าการกระตุ้นด้วย Single vaccine ค่า %Protection ที่สูงขึ้นบ่งบอกถึงความสามารถของวัคซีนในการป้องกันการติดพยาธิที่สูงขึ้นด้วย เป็นผลมาจากการใช้ recombinant protein สองชนิดทั้ง LAP และ SAP-2 ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับ LAP และ SAP-2 เป็นผลทำให้มีการยับยั้งหน้าที่ของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดและนำไปสู่การกำจัดพยาธิ ผลการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จากการหาปริมาณแอนติบอดีชนิด IgG1 และ IgG2a ในซีรัมของหนูทดลองโดยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ Infection และ Termination โดยใช้เทคนิค Indirect ELISA จากภาพที่ 4-3 หนูกลุ่ม LAP, SAP-2 และหนูกลุ่ม SAP-2 + LAP ทั้งระยะ Infection และ Termination มีระดับ IgG1 และ IgG2a ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control, negative control และ adjuvant control

IgG1 ที่สูงขึ้นมาจากกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเมื่อ Immunized หนูทดลองเซลล์ที่มีหน้าที่เป็น Antigen presenting cell (APC) จะนำเสนอชิ้นเปปไทด์ให้กับ T helper 2 จากนั้นจะมีการหลั่ง Cytokine ไปกระตุ้นให้ B-cell สร้างแอนติบอดีชนิด IgG1 IgG2a ที่สูงขึ้นมาจากกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเมื่อ Immunized หนูทดลองเซลล์ที่มีหน้าที่เป็น APC จะนำเสนอชิ้นเปปไทด์ให้กับ T helper 1 จากนั้นจะมีการหลั่ง Cytokine ไปกระตุ้นให้ B-cell สร้างแอนติบอดีชนิด IgG2a ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีทั้งสองชนิดพบว่า IgG1 สูงกว่า IgG2a แสดงว่ามีการตอบสนอง T helper 2 สูงกว่า T helper 1 หลังจากนั้นแอนติบอดีที่ได้จะไป Neutralized บริเวณแอนติเจนที่จำเพาะ บนตัวพยาธิและเกิดกระบวนการ Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) ในการกำจัดพยาธิ

จากการศึกษา Correlation โดยการดูจำนวนพยาธิที่เหลืออยู่หลังจาก infect หนูด้วยพยาธิในระยะ metacercariae จำนวน 15 ตัว พบว่าหนูกลุ่ม LAP, SAP-2, LAP+SAP-2 ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย recombinant protein ทั้ง 2 ชนิด คือ LAP และ SAP-2 ของพยาธิ *F.gigantica* ร่วมกับ Alum มีค่า worm recovery ที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม adjuvant และ positive control ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเมื่อนำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟร่วมกับค่า log titer ของปริมาณ Anti-SAP-2 และ Anti-LAP ทั้งชนิด IgG1 และ IgG2a ในซีรัมของหนูกลุ่ม LAP, SAP-2, LAP+SAP-2, adjuvant และ positive control (ภาพที่ 4-12, 4-13) ซึ่งจากกราฟแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของค่า log titer กับค่า worm recovery โดยพบว่าเมื่อปริมาณ Anti-SAP-2 และ Anti-LAP ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ค่า worm recovery ลดลง แสดงว่าระดับของ Anti-SAP-2 และ Anti-LAP ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลทำให้หนูมีประสิทธิภาพในการกำจัดพยาธิเพิ่มสูงขึ้น จากนั้นเมื่อนำค่า log

titer กับค่า worm recovery มาหาค่า correlation efficiency (r) โดยใช้ Bivariate Correlation,Spearman test ซึ่งคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS version 22 ค่าที่ได้สอดคล้องกับความสัมพันธ์ของค่า log titer กับค่า worm recovery จากการพลอตกราฟ โดยค่าที่ได้ใกล้เคียง -1 แสดงให้เห็นว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กันในเชิงตรงกันข้าม

จากการศึกษา Western blot เพื่อดูความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูกลุ่มที่กระตุ้นด้วย SAP-2 กับ Alum, LAP กับ Alum และ SAP-2+LAP กับ Alum ซึ่ง blot กับ recombinant protein SAP-2 (rFgSAP-2) และ recombinant protein LAP (rFgLAP) ของพยาธิใบไม้ *Fasciola gigantica* โดยซีรัมหนูกลุ่ม SAP-2 ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย SAP-2 กับ Alum มีความจำเพาะต่อ rFgSAP-2 ได้แก่ L2 (lane 4) ,S2 (lane 5) พบโปรตีนขนาด 57.6 kDaได้แก่ L2 (lane 4) ,S2 (lane 5) พบโปรตีนขนาด 57.6 kDa, ซีรัมหนูกลุ่ม LAP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย LAP กับ Alum มีความจำเพาะต่อ rFgLAP ได้แก่ L3 (lane 6) ,S3 (lane7) พบโปรตีนขนาด 10 kDaและ ซีรัมหนูกลุ่ม SAP-2+LAP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย SAP-2+LAP กับ Alum มีความจำเพาะต่อ rFgSAP-2 และ rFgLAP ได้แก่ L1 (lane 2) ,S1 (lane 3) พบโปรตีนขนาด 10 kDa และโปรตีนขนาด 57.6 kDa (ภาพที่ 4-4)

จากการศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน SAP-2 และ LAP ในเนื้อเยื่อพยาธิ *Fasciola gigantica* และความจำเพาะของกลุ่มหนูที่กระตุ้นด้วย SAP-2 และ LAP ต่อโปรตีนในตัวพยาธิ โดยวิธี Immunohistochemistry พบว่า ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgLAP กับ Alum นั้น ซึ่งในระยะ Infection มีการแสดงออกของ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *Fasciola gigantica* บริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells ที่ภาพ A แต่ไม่มีการแสองออกใน testis ที่ภาพ B (ภาพที่ 4-5) และในระยะ Termination มีการแสดงออกของ FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *Fasciola gigantica* บริเวณแกรนูลในส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells ที่ภาพ A มีการแสองออกใน testis ที่ภาพ B และพบการแสดงออกที่ ovary ที่ภาพ C (ภาพที่ 4-6) และ ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgSAP กับ Alum นั้น ซึ่งในระยะ Infection มีการแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อ *Fasciola gigantica* บริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells ที่ภาพ A แต่ไม่มีการแสดงออกใน testis ที่ภาพ B (ภาพที่ 4-7) และในระยะ Termination มีการแสดงออกของ FgSAP-2 gene ในเนื้อเยื่อ *Fasciola gigantica* บริเวณแกรนูลในส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells ที่ภาพ A มีการแสดงออกใน testis ที่ภาพ B และพบการแสดงออกที่ ovary ที่ภาพ C (ภาพที่ 4-8) และ ซีรัมของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rFgSAP และ rFgLAP กับ Alum นั้น ซึ่งในระยะ Infection มีการแสดงออกของ FgSAP-2+FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *Fasciola gigantica* บริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells ที่ภาพ A แต่ไม่มีการแสดงออกใน testis ที่ภาพ B (ภาพที่ 4-9) และในระยะ Termination มีการแสดงออกของ FgSAP-2+FgLAP gene ในเนื้อเยื่อ *Fasciola gigantica* บริเวณแกรนูลในส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells ที่ภาพ A มีการแสดงออกใน testis ที่ภาพ B และพบการแสดงออกที่ ovary ที่ภาพ C (ภาพที่ 4-10) โดยเปรียบเทียบกับ Negative control โดยระยะ Infection นั้น จะพบการแสดงออกของ FgLAP , FgSAP-2 และ FgSAP-2+FgLAP gene เฉพาะที่บริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells เนื่องจากบริเวณนั้นมีการสร้างเอ็นไซม์ของ LAP และ SAP-2 ซึ่งบริเวณส่วนอื่นนั้นไม่มีการสร้างเอ็นไซม์ของ LAP และ SAP-2 ทำให้บริเวณอื่นนอกจากบริเวณส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells ไม่มีการแสดงออกของ FgLAP , FgSAP-2 และ FgSAP-2+FgLAP gene และระยะ Termination จะพบการแสดงออกของ FgLAP , FgSAP-2 และ FgSAP-2+FgLAP gene ที่บริเวณแกรนูลในส่วนปลายไซโตพลาสซึมของ cecal epithelial cells มีการแสดงออกใน testis และ ovary เนื่องจาก เมื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู โดย

ใช้ระยะเวลาที่นาน ส่งผลให้ทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีแบบ non-specific ขึ้นมา ทำให้เกิดการแสดงออกของ FgLAP , FgSAP-2 และ FgSAP-2+FgLAP gene ที่บริเวณ testis และ ovary ได้

จากการตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีน SAP-2 , LAP ด้วยวิธี Lowry method พบว่า นำความเข้มข้นของ Standard protein มาเจือจางแบบ two fold dilution ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2 - 0.016 µg/ml ซึ่งเทียบกับความเข้มข้นของ SAP-2 , LAP ที่ทำแบบ Dupilcate และมาวัดค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตร เมื่อดูตาราง 4-1 และ ภาพที่ 4-1 พบว่า ความเข้มข้นของ SAP-2 มีค่าเท่ากับ 6.261µg/ml และ ความเข้มข้นของ LAP มีค่าเท่ากับ 5.639 µg/ml เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของ Standard protein

จากการศึกษาขนาดของโปรตีน SAP-2 , LAP โดย SDS-PAGE พบว่า นำโปรตีน SAP-2 กับ LAP ที่รู้ความเข้มข้นของโปรตีน มาผสมสี Coomassie blue และนำมาต้มในน้ำเดือด จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ มาใส่ใน SDS-PAGE และใส่ Specific marker เพื่อเป็นตัวเทียบขนาดโปรตีน ในเครื่อง Electrophoresis การรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 0.02 A ต่อ gel 1 แผ่น ซึ่งผลจะพบว่า rFgLAP นั้นมีขนาด 10 kDa และ rFgSAP-2 มีขนาด 57.6 kDa เมื่อเทียบกับตำแหน่งและขนาดของโปรตีน Specific marker เมื่อดูจากภาพที่ 4-2

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีน Recombinant protein SAP-1 of *Fasciola gigantica* (rFgSAP-1) และ Recombinant protein SAP-2 of *Fasciola gigantica* (rFgSAP-2) โดยวิธี Lawry's method พบว่าโปรตีน rFgSAP-1 มีความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย 6.535 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และโปรตีน rFgSAP-2 มีความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย 6.177 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

จากการตรวจหาขนาดของโปรตีน Recombinant protein SAP-1 of *Fasciola gigantica* (rFgSAP-1) และ Recombinant protein SAP-2 of *Fasciola gigantica* (rFgSAP-2) โดยวิธี SDS-PAGE พบว่า rFgSAP-1 มีขนาดโมเลกุล 13 กิโลดอลตัน และ rFgSAP-2 มีขนาดโมเลกุล 11 กิโลดอลตัน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า rFgSAP-1 มีขนาดโมเลกุล 12 กิโลดอลตัน (Kueakhai et al., 2016) และ rFgSAP-2 มีขนาดโมเลกุล 11-12 กิโลดอลตัน (Kueakhai et al., 2010)

จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูด้วย rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 ทำให้หนูมีการสร้าง anti-rFgSAP-1 และ anti-rFgSAP-2 ขึ้น แล้วทำการตรวจสอบการตอบสนองของ antibody ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า rFgSAP-1 สามารถกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันของ IgG1 ได้ดีกว่า IgG2a ทำให้เกิด Th2/Th1 immune responses โดยมีการกระตุ้น Th2 immune responses เด่นชัดกว่า Th1 immune responses ซึ่งเหมือนกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่นำ rFgSAP-1 กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู พบว่ามีการตอบสนองต่อ IgG1 มากกว่า IgG2a จึงทำให้เกิด Th2/Th1 immune responses with Th2 predominating (Kueakhai et al., 2016) ส่วน rFgSAP-2 สามารถกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันของ IgG2a ได้ดีกว่า IgG21 ซึ่งจะทำให้เกิด Th2/Th1 immune responses โดยมีการกระตุ้น Th1 immune responses ที่เด่นชัดกว่า Th2 immune responses แต่ผลที่ได้ขัดแย้งกับงานวิจัยก่อนหน้าที่นำ rFgSAP-2 กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูพบว่ามีระดับของ IgG1 มากกว่า IgG2a ทำให้เกิดการตอบสนองของ Th2 immune responses ที่เด่นชัดกว่า Th1 immune responses (Kueakhai et al., 2013)

จากการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน rFgSAP-1 และ rFgSAP-2 ด้วยวิธี Western blot พบว่า rFgSAP-1 มีขนาดโมเลกุล 13 กิโลดอลตัน และ rFgSAP-2 มีขนาดโมเลกุล 11 กิโลดอลตัน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าการวัด rFgSAP-1 ด้วยวิธี Western blot มีขนาดโมเลกุล 12 กิโลดอลตัน (Kueakhai et al., 2016) และ rFgSAP-2 มีขนาดโมเลกุล 10 กิโลดอลตัน (Kueakhai et al., 2010) และจาก

ผลการทดลองปฏิกิริยาระหว่าง rFgSAP-1 กับ anti-rFgSAP-1 จาก serum ของหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย rFgSAP-1 พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะ และปฏิกิริยาระหว่าง rFgSAP-2 กับ anti-rFgSAP-2 สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะ

การศึกษาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน FgSAP-1 และ FgSAP-2 ในพยาธิ Fasciola gigantica โดยเทคนิค Immunohistochemistry ตรวจพบในส่วนของ cecal epithelial cells ซึ่งเหมือนกับการศึกษาก่อนหน้าที่ตรวจพบในส่วนของ cecal epithelial cells เช่นเดียวกัน (Kueakhai et al., 2016)

สรุปและเสนอแนะ

ไม่มี

(5) ผลผลิต (Output)

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

อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์

(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) 3863100299xxx สัญญาเลขที่ 21/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาวัคซีนจากโปรตีนสังเคราะห์สายสั้น (Short Synthetic Peptides) ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน และสารเสริมฤทธิ์ (Adjuvants) สำหรับโรคพยาธิใบไม้ตับ Fasciolosis

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. นรินทร์ ช่างกลึงเหมาะ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2562

ระยะเวลาดำเนินการ.....1.....ปี.....3.....เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	404,150	บาท เมื่อวัน 28 เดือน ตุลาคม	ปี 2561
งวดที่ 2 (40%)	323,320	บาท เมื่อวัน 26 เดือน สิงหาคม	ปี 2562
งวดที่ 3 (10%)		บาท เมื่อวัน - เดือน -	ปี -
รวม	727,470		

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	72,000	72,000	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	355,470	355,470	-
4. ค่าใช้สอย	300,000	300,000	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	80,830	80,830	-
รวม	808,300	808,300	-

(.....)

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. *Parasitology Research*. 112, 3653–3659.

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.

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, 2009. 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.