

คุณสมบัติของโปรตีนแอนติเจนจากพยาธิทริคิเนลล่า สไปราลิส ในระยะติดต่อกับที่ตอบสนองต่อ  
ซีรัมสุกรด้วยเทคนิคอิมมูโนบลอต



นางสาวดวงกมล สุระเรืองชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF THE INFECTIVE LARVAE OF *TRICHINELLA SPIRALIS*  
ANTIGEN RESPONSES TO SWINE SERA USING IMMUNOBLOT TECHNIQUE



Miss Duangkhamol Suraruangchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Sciences

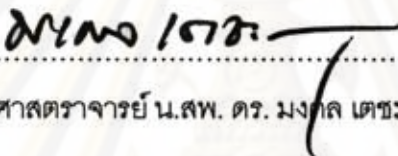
Chulalongkorn University

Academic Year 2009

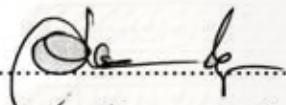
Copyright of Chulalongkorn University

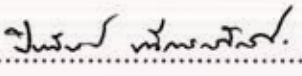
หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติของโปรตีนแอนติเจนจากพยาธิทริคิเนลล่า สไปราลิส
	ในระยะติดต่อกับตอบสนองต่อซีรัมสุกรด้วยเทคนิคอิมมูโนเบลอท
โดย	น. ส. ดวงกมล สุระเรืองชัย
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น. สพ. ดร. ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ. ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล

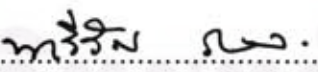
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

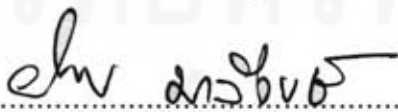
  
..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. มงคล เดชะกะพ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ สพ. ญ. ดร. อัจฉรียา ไชละสูต)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น. สพ. ดร. ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ. ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ พญ. ผิวพรรณ มาลีวงษ์)

ดวงกมล สุระเรืองชัย: คุณสมบัติของโปรตีนแอนติเจนจากพยาธิทริคิเนลล่า สไปราลิส  
ในระยะติดต่อที่ตอบสนองต่อซีรัมสุกรด้วยเทคนิคอิมมูโนบลอต

(CHARACTERIZATION OF THE INFECTIVE LARVAE OF *TRICHINELLA*  
*SPIRALIS* ANTIGEN RESPONSES TO SWINE SERA USING IMMUNOBLOT

TECHNIQUE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. น. สพ. ดร. ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์,  
อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. สพ. ญ. ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล, 103 หน้า.

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการทำปฏิกิริยาอิมมูโนบลอตของซีรัมสุกรที่ได้รับ  
พยาธิทริคิเนลล่า สไปราลิส (*Trichinella spiralis*) และพิสูจน์ความจำเพาะของโปรตีนแอนติเจน  
ชนิดสกัดหยาบที่เตรียมจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อ ตัวอย่างซีรัมสุกร 4 กลุ่มมี ดังนี้  
กลุ่มที่ 1 ซีรัมสุกรแรกคลอดจำนวน 7 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 ซีรัมสุกรที่ตรวจไม่พบโปรโตซัวและปรสิต  
ในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่นจำนวน 21 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 ซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis*  
จำนวน 5 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 4 ตัวอย่างซีรัมสุกรที่ติดโปรโตซัวและปรสิตภายในระบบทางเดินอาหาร  
ชนิดอื่นเมื่อตรวจด้วยวิธีมาตรฐานทางปรสิตวิทยาจำนวน 34 ตัวอย่าง ตัวอย่างซีรัมสุกรที่ติด  
พยาธิ *T. spiralis* มีรูปแบบของอิมมูโนบลอตอย่างน้อย 14 น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน มี  
น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 210/215-31 กิโลดาลตัน (kDa) ได้แก่ 210/215, 153, 101/105, 92,  
67/68, 61/62, 53/54, 48/49, 42/43, 41, 36/38, 34, 32 และ 31 kDa พบว่าโปรตีนแอนติเจนที่  
น้ำหนักโมเลกุล 92, 61/62 และ 41 kDa มีความจำเพาะสูงต่อซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* ใน  
ประเทศไทย โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวแทนโปรตีนแอนติเจนในการ  
พัฒนาความจำเพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิ *T. spiralis* ในสุกรต่อไปได้ในอนาคต



ภาควิชาพยาธิวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต ดวงกมล สุระเรืองชัย  
สาขาวิชา พยาธิสัตววิทยาทางสัตวแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์  
ปีการศึกษา...2552..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ทวีถาวรสวัสดิ์

## 5075555831 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEYWORDS : *Trichinella spiralis*/ infective larvae/ antigen/ swine/ immunoblot technique

DUANGKHAMOL SURARUANGCHAI: CHARACTERIZATION OF THE INFECTIVE LARVAE OF *TRICHINELLA SPIRALIS* ANTIGEN RESPONDED TO SWINE SERA USING IMMUNOBLOT TECHNIQUE. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSIST. PROF. PIYANAN Taweethavonsawat, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. NAREERAT Viseshakul, Ph.D., 103 pp.

The purposes of this study were to observe immunoblot profile responses to *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) infected swine sera and to identify specific proteins of infective stages in crude extract antigen derived from *T. spiralis*. Swine sera were divided into 4 groups; group 1, 7 sera were collected from piglets on day zero; group 2, 21 swine serum samples were microscopically confirmed negative for protozoa and other gastrointestinal parasites; group 3, 5 serum samples were obtained from *T. spiralis* infected swine; group 4, derived from 34 swine which had been parasitologically confirmed positive for other and parasitic infections by standard parasitological methods. The profiles of *T. spiralis* detected by swine sera immunoblot revealed at least 14 different molecular weight (MW) proteins ranging from 210/215-31 kilodaltons (kDa). There are 210/215, 153, 101/105, 92, 67/68, 61/62, 53/54, 48/49, 42/43, 41, 36/38, 34, 32 and 31 kDa. The MW protein antigens at 92, 61/62 and 41 kDa appeared to be highly specific to *T. spiralis* infected swine sera from Thailand. They will be targeted as candidates for the development of specific diagnostic tests for *T. spiralis* infection of swine.

Department : ...Veterinary Pathology.....

Field of Study : Veterinary Pathobiology...

Academic Year : ...2009.....

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

D. Surarungchai  
P. Taweethavonsawat  
Nareerat Viseshakul

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาของ ผศ. น. สพ. ดร. ปิยนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. สพ. ญ. ดร. นาวิรัตน์ วิเศษกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาและแก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัยจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ลุล่วงไปได้ด้วยดีจึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ ขอขอบคุณ รศ. พญ. ผิวพรรณ มาลีวงษ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิและ รศ. สพ. ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสุต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่สละเวลาให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่หน่วยปรสิต หน่วยไวรัสและหน่วยพยาธิ ภาควิชาพยาธิวิทยาทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสารเคมี ให้ความรู้ คำแนะนำ รวมถึงให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยเป็นอย่างดีและขอขอบคุณ ผศ. น. สพ. ดร. ทนง อัครวาทย์ อาจารย์และนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้วัสดุวิทยาศาสตร์ตลอดจนเครื่องมือวิจัย ขอขอบคุณ สพ. ญ. มณฑานต์ วงศ์ภากร สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อซีรัมสุกรทดลองติดพยาธิ *T. spiralis* และ สพ. ญ. มลฤดี สหกิจภิญโญที่เสียสละเวลาพาผู้วิจัยไปเก็บตัวอย่างด้วยความมีน้ำใจ ขอขอบคุณ น. สพ. ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ ออยุธยา และ สพ. ญ. ศิริพร ดันทเวส ที่เอื้อเฟื้อซีรัมสุกรแรกคลอดด้วยความเอื้อเฟื้อยิ่ง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เฝ้าระวังโรคสัตว์สู่คน มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดี ขอขอบคุณฟาร์มสุกรและสถานีเพาะเลี้ยงสุกรทุกแห่งที่ให้ความเอื้อเฟื้อและอนุญาตให้เข้าไปเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณรุ่นพี่ เพื่อนและรุ่นน้องทุกท่านที่เป็นกำลังใจอย่างดีแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษารวมถึงผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีได้เอื้อนามไว้ ณ ที่นี้ การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ บางส่วนของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้นำไปเสนอผลงานทางวิชาการในประชุมวิชาการนานาชาติ “22<sup>nd</sup> World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology ” (WAAVP 2009) เมืองคัลการี ประเทศแคนาดา ขอขอบคุณ ผศ. สพ. ญ. ดร. นาวิรัตน์ วิเศษกุล ที่สนับสนุนทุนทรัพย์ในการลงทะเบียนเข้าร่วมงานและขอขอบคุณ น. สพ. สมพงษ์ ชำนาญทองไพวัลย์ ที่ช่วยเหลือสนับสนุนค่าที่พักในบางส่วน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่ออัฐ สุระเรืองชัยและคุณแม่สุพัทธรา ตั้งคุ่มวงศ์ บุพการีผู้ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัยมาโดยตลอด และขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่ให้ความรัก ความห่วงใยและกำลังใจอย่างดีเยี่ยมตลอดการศึกษ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 คำถามสำหรับการวิจัย/ สมมติฐาน.....	3
1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.2 พยาธิ <i>T. spiralis</i>	
2.2.1 ชีววิทยาของพยาธิ <i>T. spiralis</i> .....	6
2.2.2 กายรูปวิทยาของพยาธิ <i>T. spiralis</i> .....	7
2.2.3 วงชีวิตของพยาธิ <i>T. spiralis</i> .....	10
2.3 ระบาดวิทยาของพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในระดับโลก.....	11
2.4 ระบาดวิทยาของพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในประเทศไทย.....	15
2.5 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิ <i>T. spiralis</i> .....	17

บทที่	หน้า
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.6 อาการทางคลินิกของโรค trichinellosis ในมนุษย์.....	25
2.7 การรักษาโรค trichinellosis.....	26
2.8 การตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในสุกร.....	26
3. วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การศึกษาขนาดและลักษณะรูปร่างพยาธิ <i>T. spiralis</i> ระยะติดต่อก่อน.....	37
3.2 การย่อยเห็ดและ การเพิ่มจำนวนพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในสัตว์ทดลอง.....	38
3.3 การเตรียมแอนติเจนและการวัดปริมาณโปรตีน.....	39
3.4 กลุ่มตัวอย่าง.....	40
3.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนจากแอนติเจนสกัดหยาบ.....	42
3.6 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย immunoblot technique.....	44
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในระยะติดต่อก่อนด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง.....	47
4.2 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนจากแอนติเจนสกัดหยาบด้วย SDS-PAGE.....	49
4.3 ผลการวิเคราะห์การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีสุกรกลุ่ม 3 กับแอนติเจนสกัดหยาบด้วย immunoblot technique.....	53
4.4 ผลการวิเคราะห์การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีสุกรกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 กับแอนติเจนสกัดหยาบด้วย immunoblot technique.....	51
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	65
รายการอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	88
ประวัติผู้วิจัย.....	103



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของโปรตีนจากสารคัดหลั่งของพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในระยะติดต่อเมื่อแยกด้วย 2 DE.....	23
2	การใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อพยาธิในสกุล <i>Trichinella</i> เมื่อศึกษาด้วยแอนติเจนต่างชนิด.....	33
3	สรุปผลการศึกษารูปแบบการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติเจนจากตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อกับซีรัมมนุษย์ ม้า และสุกรที่ได้รับพยาธิ <i>T. spiralis</i> .....	35
4	จำนวนตัวอย่างซีรัมสุกรในแต่ละกลุ่ม.....	41
5	จำนวนตัวอย่างซีรัมสุกรกลุ่ม 4 แยกตามชนิดการติดโรคปรสิตภายใน.....	43
6	สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกันกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique.....	57

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ตัวอ่อนพยาธิ <i>T. spiralis</i> ระยะที่ 1 เพศผู้..... 8
2	ตัวอ่อนพยาธิ <i>T. spiralis</i> ระยะที่ 1 เพศเมีย..... 8
3	พยาธิตัวเต็มวัยเพศผู้เห็นอวัยวะสืบพันธุ์หรือ clasper ที่บริเวณส่วนปลายอย่างชัดเจน..... 9
4	พยาธิ <i>T. spiralis</i> ตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีตัวอ่อนอยู่ในมดลูก..... 9
5	วงชีวิตพยาธิ <i>T. spiralis</i> ..... 11
6	เขตการระบาดของพยาธิในสกุล <i>Trichinella</i> ; <i>T. spiralis</i> (Tsp), <i>T. pseudospiralis</i> จากทวีปอเมริกาเหนือ (TpsN), <i>T. pseudospiralis</i> จากทวีปยุโรปและทวีปเอเชีย (TpsP), <i>T. pseudospiralis</i> จากเกาะทัสมาเนียในทวีปออสเตรเลีย (TpsA), <i>T. papuae</i> (Tpa) และ <i>T. zimbabwensis</i> (Tzi)..... 14
7	เขตการระบาดของพยาธิ ในสกุล <i>Trichinella</i> ; <i>T. nativa</i> (Tna), <i>T. britovi</i> (Tb), <i>T. murrelli</i> (Tm), <i>T. nelsoni</i> (Tne), <i>T. genotype T6</i> (T6), <i>Trichinella genotype T8</i> (T8) และ <i>T. genotype T9</i> (T9)..... 14
8	จังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค trichinellosis ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2505-2548..... 16
9	ตำแหน่งของ phosphorylcholine เมื่อย้อม immunohistochemical staining อยู่ใน hypodermis และ genital primordium ของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ <i>T. spiralis</i> ..... 18
10	โครงสร้างทางชีวเคมีของน้ำตาล CDP- tyvelose (3, 6 dideoxy arabinohexose)..... 20
11	ตำแหน่งของน้ำตาล tyvelose เมื่อย้อม immunohistochemical staining อยู่ในเซลล์ stichocytes และผนังชั้น cuticle ของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ <i>T. spiralis</i> ..... 21
12	เซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามารวมอยู่รอบ nurse cell ของ <i>T. spiralis</i> จากอิทธิพลของ IL-10..... 24
13	แผ่นกระจก 2 แผ่นสำหรับกดเนื้อเยื่อหรือ Compressorium..... 29

ภาพที่	หน้า
14 Trichinoscope.....	29
15 การเก็บตัวอ่อนพยาธิ <i>T. spiralis</i> ระยะติดต่อด้วย Double separatory funnel method.....	30
16 ตัวอ่อนพยาธิ <i>T. spiralis</i> ระยะติดต่อกในกล้ามเนื้อกระบังลมหนูทดลองเมื่อตรวจด้วยวิธีกัดเนื้อเยื่อและส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง.....	47
17 ตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อก (L1) ในแคปซูลในกล้ามเนื้อกระบังลมหนูทดลองเห็นได้ชัดเจนเมื่อย้อมสี Semichon's acetic carmine.....	48
18 ตัวอ่อนพยาธิ <i>T. spiralis</i> ระยะติดต่อกแสดงหลอดอาหารชนิด stichosome.....	49
19 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหยาบจากพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในระยะติดต่อกเมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 ความเข้มข้นเจลที่ 12% ที่ความเข้มข้นชั้นโปรตีนที่ต่างกัน.....	50
20 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหยาบจากพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในระยะติดต่อกเมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 ความเข้มข้นเจลที่ 12%.....	51
21 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหยาบจากพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในระยะติดต่อกเมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 เปรียบเทียบกับโปรตีนสกัดหยาบจากเนื้อหนู ที่ความเข้มข้นเจล 12%.....	52
22 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหยาบจากพยาธิ <i>T. spiralis</i> ในระยะติดต่อกเมื่อย้อมด้วยสีsilver ความเข้มข้นเจลที่ 12%.....	53
23 Immunoblot pattern ของสุกรกลุ่ม 3 ที่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนแอนติเจนสกัดหยาบของตัวอ่อนระยะติดต่อกพยาธิ <i>T. spiralis</i> แถว 1 ถึง 5 เป็นตัวอย่างซีรัมสุกรติดพยาธิ <i>T. spiralis</i> ตัวที่ 1 ถึง 5 ตามลำดับ.....	54
24 Immunoblot pattern ของสุกรกลุ่ม 2, 3 และ 4 ที่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนแอนติเจนสกัดหยาบของตัวอ่อนระยะติดต่อกพยาธิ <i>T. spiralis</i> .....	56

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพยาธิทริคิเนลโลซิส (trichinellosis) เป็นโรคสัตว์สู่คนที่สำคัญ เนื่องจากพยาธิสามารถดำรงชีวิตอยู่ในโฮสต์หลายชนิดโดยไม่แสดงอาการทางคลินิก สาเหตุเกิดจากพยาธิตัวกลมขนาดเล็กในสกุลทริคิเนลล่า (Genus *Trichinella*) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพยาธิทริคิเนลล่า สไปราลิส (*Trichinella spiralis*) เป็นพยาธิชนิดที่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกและพยาธิสภาพในมนุษย์มากที่สุด อาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่รับประทานเนื้อสัตว์ดิบที่มีพยาธิชนิดนี้ ได้แก่ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ มีไข้ ปวดท้อง อาเจียน บางรายอาจเสียชีวิตหากได้รับพยาธิในระยะติดต่อเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันการแพร่ระบาดของพยาธิ *T. spiralis* มีแนวโน้มสูงขึ้น เนื่องจากมีการอพยพย้ายถิ่น รวมไปถึงการขนส่งที่มีการพัฒนามากขึ้น ส่งผลให้มีการค้าเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ระหว่างประเทศตลอดจนการเพิ่มจำนวนของประชากรทำให้ความต้องการในการบริโภคเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ประเทศไทยมีรายงานการระบาดของพยาธิ *T. spiralis* เป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2505 และต่อมามีรายงานการระบาดในมนุษย์และสัตว์เป็นประจำทุกปี (Kaewpitoon et al., 2006) สาเหตุหลักมาจากการบริโภคเนื้อสัตว์ที่ไม่ผ่านการปรุงสุก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคเนื้อสุกรซึ่งเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อพยาธิ *T. spiralis* สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคชนิดอื่น

การตรวจวินิจฉัยพยาธิ *T. spiralis* ในสุกรจึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการเฝ้าระวังและป้องกันโรคจากสัตว์มาสู่คน ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยพยาธิในระยะติดต่อโดยตรงในสุกรยังมีข้อจำกัดเนื่องจากความไวและความจำเพาะจะขึ้นกับตำแหน่งและวิธีการจำเพาะในการตรวจตัวอย่าง (Gamble et al., 2000) การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา (serological methods) จึงถูกพัฒนาขึ้นมาแทนที่ เนื่องจากมีความไวสูง ใช้เวลาน้อยในการตรวจวินิจฉัย สามารถตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมาก อีกทั้งสามารถทำได้ในสัตว์ที่ยังมีชีวิตและยังประหยัดค่าใช้จ่ายหากเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาขึ้นอยู่กับชนิดและคุณภาพของแอนติเจน (OIE, 2008) ปัจจุบันแอนติเจนที่นิยมนำมาศึกษา ยังคงเป็นแอนติเจนที่

เตรียมได้จากตัวอ่อนพยาธิในระยะที่ 1 (Larva stage1, L1) ซึ่งเป็นระยะติดต่อก่อน สามารถอาศัยอยู่ในร่างกายของสุกรได้เป็นเวลานานจึงเป็นระยะสำคัญที่ควรเฝ้าระวังมากที่สุด พยาธิในระยะติดต่อก่อนสามารถเพิ่มจำนวนได้ง่ายในหนูทดลองซึ่งเป็นโฮสต์ที่มีความไวต่อพยาธิ *T. spiralis* (Srimanote et al., 2000) แอนติเจนที่เตรียมได้จากพยาธิในระยะติดต่อก่อนแบ่งออกเป็นสองชนิดคือ แอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิทั้งตัวโดยการสกัดหยาบ (crude extract, CE) และแอนติเจนที่เตรียมได้จากสารคัดหลั่งของพยาธิ (excretory-secretory antigen, ES) จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Mahannop และคณะในปี 1992 พบว่าแอนติเจนที่เตรียมได้จากสารคัดหลั่งของพยาธิแม้ว่าจะมีความจำเพาะสูงกว่าแอนติเจนชนิดสกัดหยาบ แต่ยังมีข้อจำกัดคือแอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิมักเตรียมได้ปริมาณน้อยและต้องอาศัยความชำนาญรวมถึงมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยแอนติเจนสกัดหยาบที่สามารถเตรียมได้ง่ายกว่าและให้ปริมาณมากด้วยเทคนิคอิมมูโนบลอต (immunoblot technique) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงน่าจะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยคัดกรองโรค trichinellosis ในสุกรในอนาคตต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาโปรตีนแอนติเจนของพยาธิ *T. spiralis* ระยะติดต่อก่อนในกล้ามเนื้อลายหนูทดลองที่ยังไม่เคยมีการศึกษาลักษณะจำเพาะ คุณสมบัติทางซีรัมวิทยาเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงของห้องปฏิบัติการ
- 2.2 เพื่อศึกษาความจำเพาะของโปรตีนแอนติเจนที่นำหนักโมเลกุลต่างๆต่อซีรัมสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* และสุกรที่ป่วยด้วยโรคปรสิตชนิดอื่นด้วย immunoblot technique

### คำสำคัญ

พยาธิทริคิเนลล่า สไปราลิส ตัวอ่อนระยะติดต่อก่อน แอนติเจน สุกร เทคนิคอิมมูโนบลอต

### Keywords

*Trichinella spiralis*, infective stage larvae, antigen, swine, immunoblot technique

### 3. คำถามสำหรับการวิจัย / สมมติฐานการวิจัย

- 3.1 ไพรตั้นแอนติเจนสกัดหยาบที่เตรียมได้จากพยาธิ *T. spiralis* มีไพรตั้นที่น้ำหนักโมเลกุลเท่าใด
- 3.2 มีไพรตั้นแอนติเจนสกัดหยาบที่มีความจำเพาะต่อซีรัมของสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของสุกรที่ติดปรสิตชนิดอื่นที่มีระบาดในประเทศไทยหรือไม่

### 4. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอ่อนระยะติดต่อ (Infective stage larvae)

หมายถึง ตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 1 ที่ฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อลายของโฮสต์

เทคนิคอิมมูโนบลอต (Immunoblot technique)

หมายถึง เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ความจำเพาะของน้ำหนักโมเลกุลแอนติเจนกับแอนติบอดีของผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย

แอนติเจนสกัดหยาบ (Crude extract antigen)

หมายถึง แอนติเจนที่เตรียมได้จากการบดพยาธิทั้งตัวในส่วนของไพรตั้นที่ละลายในน้ำกลั่น

แอนติเจนจากสารคัดหลั่ง (Excretory-secretory antigen)

หมายถึง แอนติเจนที่พยาธิขับออกมาอยู่ในรูปสารคัดหลั่งและสิ่งขับถ่าย

### 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 ทราบข้อมูลความจำเพาะของไพรตั้นแอนติเจนสกัดหยาบที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆต่อซีรัมสุกรทดลองที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* และสุกรที่ติดปรสิตชนิดอื่นด้วย immunoblot technique

5.2 สามารถนำผลความจำเพาะของไพรตั้นแอนติเจนสกัดหยาบต่อซีรัมสุกรติดพยาธิ

*T. spiralis* ไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิ

*T. spiralis* ในสุกรเพื่อการตรวจคัดกรองโรคในอนาคต

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวคิดและทฤษฎี

โรค trichinellosis เป็นโรคสัตว์สู่คน (zoonosis) ที่พบการระบาดทั่วโลกยกเว้นในเขตทวีปแอนตาร์กติกา (Pozio, 2007<sup>b</sup>) ปัจจุบันมีรายงานการระบาดใหม่ของโรค trichinellosis ในหลายประเทศ เช่น ประเทศอิตาลี (Pozio et al., 2006) ประเทศลาว (Sayasone et al., 2007) และประเทศจีน (Wang et al., 2006) เป็นต้น พยาธิในสกุล *Trichinella* ชนิดที่มีระบาดในประเทศไทยมากที่สุดและพบว่ารายงานการระบาดเป็นประจำคือพยาธิ *T. spiralis* (Kaewpitoon et al., 2006) พยาธิ *T. spiralis* ติดต่อกับสัตว์สู่คนจากการบริโภคตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิที่ฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อลายของโฮสต์กักเก็บ (reservoir host) สัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคและสัตว์ป่าสามารถเป็นโฮสต์กักเก็บของพยาธิ *T. spiralis* โดยไม่แสดงอาการของโรคปรากฏให้เห็น การตรวจคัดกรองโรคเพื่อการป้องกันการระบาดของโรคจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุกรซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคมีรายงานพบว่าเป็นสาเหตุของการติดพยาธิจากสัตว์มาสู่คน (Pozio, 2007<sup>b</sup>) เนื่องจากพยาธิ *T. spiralis* มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในสุกรได้ดีกว่าพยาธิ *Trichinella* ชนิดอื่น (Kapel and Gamble, 2000) อีกทั้งสุกรยังเป็นสัตว์ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย การติดพยาธิ *T. spiralis* ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรทำให้หลายประเทศทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัยมากขึ้น โดยมีการใช้การตรวจวินิจฉัยเพื่อคัดกรองการติดโรค trichinellosis ในสุกรทั่วโลกซึ่งมูลค่าของการตรวจตัวอย่างอยู่ที่ประมาณ 3 ดอลลาร์สหรัฐต่อสุกรหนึ่งตัว (Kapel, 2005)

การตรวจวินิจฉัยพยาธิ *Trichinella* แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การตรวจวินิจฉัยทางตรงเพื่อตรวจหาตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิในกล้ามเนื้อ และการตรวจวินิจฉัยทางอ้อมด้วยวิธีการทางซีรัมวิทยาเพื่อหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิ (OIE, 2008) แม้ว่าการตรวจวินิจฉัยทางตรงจะมีประสิทธิภาพและความไวสูงแต่มีข้อจำกัดในการตรวจวินิจฉัยสัตว์ที่ยังมีชีวิต ใช้เวลาในการตรวจนานและค่าใช้จ่ายสูง ในขณะที่การตรวจวินิจฉัยทางอ้อมสามารถทำได้ง่าย สามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่างและรวดเร็วสามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้งสัตว์ที่ยังมีชีวิตและตายแล้ว รวมถึงตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis ที่เกิดจากพยาธิ *Trichinella* ชนิดอื่นที่ไม่มีแคปซูล เช่น

*T. pseudospiralis* ได้ดี เนื่องจากตัวอ่อนพยาธิชนิดที่ไม่มีแคปซูลสังเกตได้ยากกรณีผู้ตรวจวินิจฉัยไม่มีความชำนาญมากเพียงพอ วิธีการทางซีรัมวิทยาจึงมีประโยชน์ในการศึกษาเชิงระบาดวิทยาตลอดจนประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือตรวจวินิจฉัยพยาธิในโรงฆ่าสัตว์โดยความไวและความจำเพาะของวิธีการทางซีรัมวิทยาจะมีความสัมพันธ์กับชนิดและคุณภาพของแอนติเจนที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย (OIE, 2008) การเลือกชนิดของแอนติเจนที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis

แอนติเจนที่เตรียมได้จากพยาธิแบ่งออกเป็นสองชนิดคือ แอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิทั้งตัวโดยการสกัดหยาบและแอนติเจนที่เตรียมได้จากสารคัดหลั่งของพยาธิ แอนติเจนทั้งสองชนิดนี้สามารถเตรียมได้จากพยาธิในระยะต่างกันได้แก่ พยาธิตัวอ่อนแรกเกิด (new born larva) ตัวอ่อนระยะติดต่อ หรือระยะที่ฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อ และจากพยาธิตัวเต็มวัย แอนติเจนที่เตรียมได้จากพยาธิในระยะติดต่อเป็นแอนติเจนที่นิยมศึกษามากที่สุดเนื่องจากพยาธิสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็นปริมาณมากในกล้ามเนื้อลายของหนูทดลอง (Srimanote et al., 2000) และเป็นระยะที่สามารถคงอยู่ในกล้ามเนื้อของโฮสต์ได้เป็นระยะเวลานาน (Pinelli et al., 2004) จากการศึกษาพบว่าระดับของภูมิคุ้มกันต่อพยาธิ *T. spiralis* ในสุกรอยู่ในระดับที่เริ่มตรวจพบได้ด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาได้ตั้งแต่ 15 วันหลังจากได้รับพยาธิในระยะติดต่อ (Picherot et al., 2007) และสามารถคงอยู่ต่อไปได้อีกอย่างน้อย 40 สัปดาห์ (Kapel and Gamble, 2000) แอนติเจนจากตัวอ่อนในระยะติดต่อจะถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis อย่างแพร่หลาย แต่แอนติเจนที่เตรียมได้จากตัวอ่อนพยาธิในระยะติดต่อโดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติเจนที่เตรียมจากพยาธิทั้งตัวโดยการสกัดหยาบสามารถให้ผลบวกหลงได้ (false positive) ดังรายงานการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างแอนติเจนที่เตรียมได้จากตัวอ่อนในระยะติดต่อของพยาธิ *T. spiralis* กับซีรัมของผู้ป่วยที่ติดพยาธิชนิดอื่น เช่น *Schistosoma* spp., *Gnathostoma spinigirum*, *Opisthorchis viverrini*, *Capillaria philippinensis*, *Strongyloides stercoralis* (Ruangkunaporn et al., 1994; Sakolvaree et al., 1997; Maleewong et al., 2006) เป็นต้น ในขณะที่แอนติเจนที่เตรียมได้จากสารคัดหลั่งนั้นมีความจำเพาะต่อซีรัมของผู้ป่วยโรค trichinellosis มากกว่าแต่มีขั้นตอนการผลิตที่ยุ่งยากและใช้ค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงและมีโอกาสเกิดผลบวกหลงเช่นกัน เนื่องจากมีองค์ประกอบของโปรตีนบางชนิดร่วมกันกับพยาธิชนิดอื่น (Srimanote et al., 2000) การศึกษาโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูงในการตรวจวินิจฉัยจึงมีความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis



การศึกษาความจำเพาะของแอนติเจนพยาธิ *T. spiralis* ต่อผู้ป่วย trichinellosis ในปัจจุบันยังจำกัดอยู่ในมนุษย์ ในสุกรนั้นยังมีรายงานการศึกษาอยู่น้อย การศึกษาความจำเพาะของแอนติเจนต่อแอนติบอดีของสุกรที่ได้รับตัวอ่อนของพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อกับโรคปรสิตในสุกรชนิดอื่นประเทศไทยยังไม่มีรายงาน ดังนั้นการศึกษาความจำเพาะของโปรตีนแอนติเจนที่เตรียมจากตัวอ่อนพยาธิในระยะติดต่อก โดยพิจารณาโปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ด้วย immunoblot technique ที่มีความจำเพาะสูงเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมของสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* เพื่อนำข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาในครั้งนี้ไปทำการประยุกต์ใช้ในตรวจวินิจฉัยคัดกรองและเฝ้าระวังการติดพยาธิ *T. spiralis* ในสุกรในประเทศไทยต่อไป

## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.2 พยาธิ *T. spiralis*

#### 2.2.1 ชีววิทยาของพยาธิ *T. spiralis*

พยาธิ *T. spiralis* มีชื่อสามัญว่าพยาธิทริคิน่า (trichina worm) หรือ garbage worm เป็นพยาธิตัวกลมขนาดเล็กจัดลำดับตามอนุกรมวิธานได้ ดังนี้

Phylum: Nematoda

Class: Adenophorea

Order: Trichulida

Family: Trichinellidae

Genus: *Trichinella*

Species: *T. spiralis*

ความสำคัญของพยาธิในสกุล *Trichinella* คือ ก่อให้เกิดโรค trichinellosis ซึ่งเป็นโรคสัตว์สู่คน สามารถแบ่งพยาธิออกเป็น 8 ชนิด 4 จีโนไทป์ (genotypes) ดังนี้ *T. spiralis*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, *T. native*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *Trichinella* genotype T6, *Trichinella* genotype T8, *Trichinella* genotype T9 และ *Trichinella* genotype T12 หรือแบ่งเป็น 2 เคลด (clade) ตามลักษณะการมีหรือไม่มีแคปซูล

ของพยาธิ พยาธิ *T. spiralis* จึงถูกจัดอยู่ใน clade I ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีแคปซูลหุ้มตัวอ่อนระยะติดต่อก (Gottstein et al., 2009)

*T. spiralis* เป็นพยาธิในสกุล *Trichinella* เพียงชนิดเดียวที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและดำรงชีวิตอยู่ในสุกร (*Sus scrofa*) หนูแรท (*Rattus* spp.) และหนูไมซ์ (*Mus musculus*) ได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะทางชีววิทยาที่นักวิทยาศาสตร์นำมาใช้ในการจำแนกชนิดของพยาธิในสกุล *Trichinella* (Murrell, 1985) พยาธิ *T. spiralis* เป็นสาเหตุหลักของการระบาดของโรค trichinellosis ในมนุษย์และในสัตว์หลายชนิด ทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์กินเนื้อรวมถึงสัตว์ป่า สัตว์ป่าจึงเป็นโฮสต์กักเก็บของพยาธิมาสู่สุกรซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่ระบาดของพยาธิมาสู่มนุษย์โดยที่โฮสต์กักเก็บไม่แสดงอาการทางคลินิกทำให้ยากต่อการควบคุมการระบาดของโรค trichinellosis

## 2.2.2 กายรูปวิทยาของพยาธิ *T. spiralis*

ตัวอ่อนพยาธิ *T. spiralis* ระยะที่ 1 หรือพยาธิในระยะติดต่อกมีความยาวโดยเฉลี่ย 0.61 – 1.0 มิลลิเมตร (mm) ขนาดของลำตัวกว้าง 0.026 - 0.040 mm (Pozio et al., 1992) หลอดอาหารมีเซลล์รูปวงแหวน (stichocyte) ล้อมรอบ ตัวอ่อนในระยะนี้สามารถแยกเพศของพยาธิได้จากความยาวของช่องทวารหนัก (rectum) ตัวอ่อนระยะติดต่อกเพศผู้จะมีช่องทวารหนักยาวเป็น 2 เท่าของตัวอ่อนระยะติดต่อกเพศเมีย พยาธิเพศผู้มีความยาวช่องทวารหนัก 50.4 - 63.0 ไมครอน ( $\mu\text{m}$ ) (รูปที่ 1) ในขณะที่ตัวอ่อนเพศเมียมีความยาวช่องทวารหนัก 18.9 - 31.35  $\mu\text{m}$  และพบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียเริ่มมีการพัฒนาจากอวัยวะสืบพันธุ์ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ (ganad rudiment) เปลี่ยนแปลงเป็นถุงรับสเปิร์มและมดลูกที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ (seminal receptacle and uterus rudiment) seminal receptacle rudiment มีลักษณะเป็นแกรนูล (granule) ละเอียดสีน้ำตาล (รูปที่ 2) ในขณะที่เพศผู้จะยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระบบสืบพันธุ์ (Liu et al., 1991)

พยาธิตัวเต็มวัยเพศผู้มีความยาวโดยเฉลี่ย 1.0 - 1.8 mm ปลายหางมี lateral flaps บนแต่ละด้านของช่องเปิดร่วมของทวารหนักและอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (cloacal opening) มี papillae 2 คู่หลัง flap ไม่มี spicule และ ปลอกหุ้มอวัยวะสืบพันธุ์ (รูปที่ 3) พยาธิตัวเต็มวัยเพศเมียยาว 1.37 - 3.7 mm (Pozio et al., 1992) ลำตัวมีขนาดเล็กบาง เพศเมียช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (vulva) อยู่ใกล้ตอนกลางของหลอดอาหาร (รูปที่ 4)



รูปที่ 1 ตัวอ่อนพยาธิ *T. spiralis* ระยะที่ 1 เพศผู้



รูปที่ 2 ตัวอ่อนพยาธิ *T. spiralis* ระยะที่ 1 เพศเมีย



รูปที่ 3 พยาธิตัวเต็มวัยเพศผู้เห็นอวัยวะสืบพันธุ์หรือ clasper (ลูกศรชี้) ที่บริเวณส่วนปลายอย่างชัดเจน (Kaewpitoon et al., 2006)

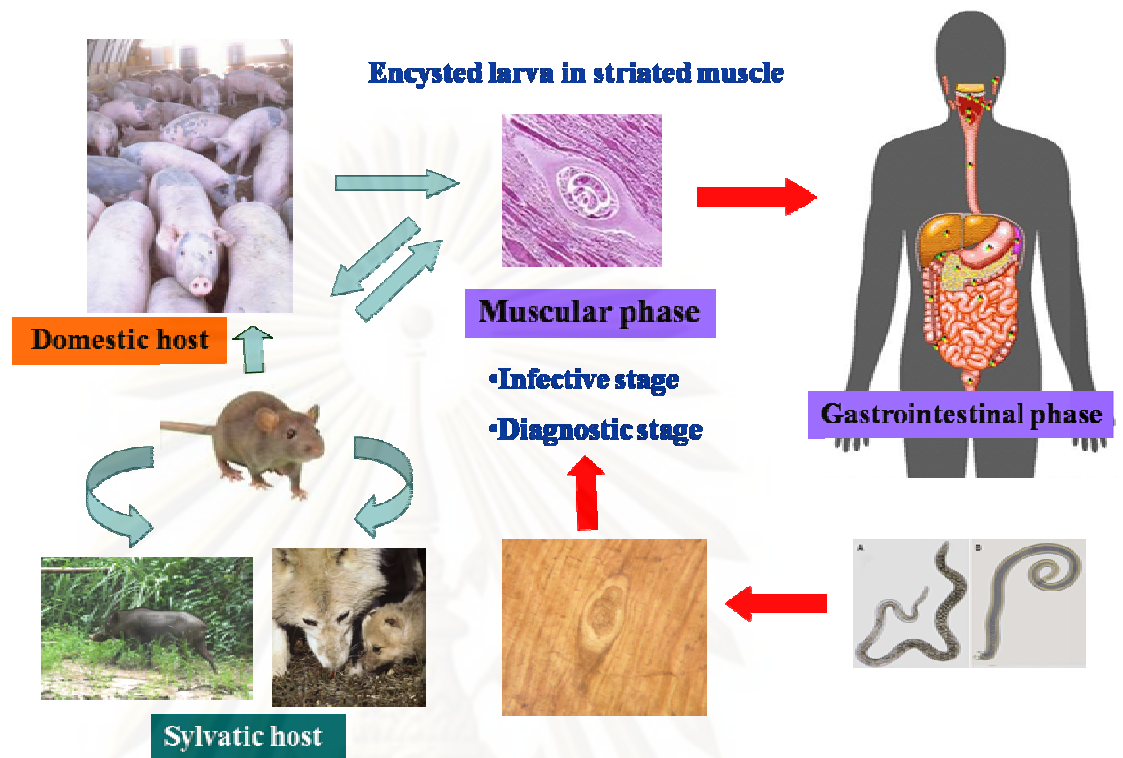


รูปที่ 4 พยาธิ *T. spiralis* ตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีตัวอ่อน (ลูกศรชี้) อยู่ภายในมดลูก (Kaewpitoon et al., 2006)

### 2.2.3 วงชีวิตของพยาธิ *T. spiralis*

พยาธิ *T. spiralis* มีวงชีวิตเป็นปรสิตอย่างแท้จริงเนื่องจากทุกช่วงชีวิตของพยาธิ จำเป็นต้องอาศัยอยู่บนโฮสต์ชนิดเดียวกัน วงชีวิตของพยาธิเริ่มต้นจากมนุษย์หรือสัตว์กินตัวอ่อน ระยะติดต่อกันอยู่ในเนื้อสัตว์ดิบ ตัวอ่อนของพยาธิจะออกมาจากแคปซูลและไชผ่านเข้าไปในส่วน ของลำไส้เล็กส่วนต้นและกลาง หลังจากนั้นพยาธิจะกลับออกมาอยู่ในท่อทางเดินอาหารและลอก คราบจำนวน 4 ครั้ง เรียกระยะนี้ว่า enteral phase หรือ gastrointestinal phase (Despommier et al., 1978) เป็นระยะที่พยาธิอยู่ในทางเดินอาหารเพื่อพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย พยาธิพร้อมที่จะผสม พันธุ์ภายใน 30 - 34 ชั่วโมงหลังจากโฮสต์ได้รับตัวอ่อนระยะติดต่อกันเข้าไป พยาธิเพศเมียเหล่านี้จะ ให้ตัวอ่อนเป็นจำนวนมาก พยาธิตัวเมียตัวหนึ่งจะสามารถออกลูกเป็นตัวอ่อน (viviparous) ใน วันที่ 5 หลังจากผสมพันธุ์ พยาธิตัวเมีย 1 ตัวอาจให้ตัวอ่อนมากถึง 500 - 1,500 ตัว ก่อนที่พยาธิ ตัวเต็มวัยบางส่วนจะถูกกำจัดออกโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ตัวอ่อนแรกเกิดของพยาธิจะไช เข้าสู่เนื้อเยื่อได้หลายตำแหน่งผ่านทางกระแสเลือดของน้ำเหลือง และเข้าสู่กระแสเลือดได้ผ่าน ทางหลอดเลือดขนาดเล็กเพื่อเข้าสู่เส้นใยกล้ามเนื้อตัวอ่อนพยาธิจะเข้าไปฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อลายบริเวณที่มีออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงในปริมาณสูง โดยตัวอ่อนพยาธิ ใช้เอนไซม์บางชนิดในการไชเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของโฮสต์ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Gottstein et al., 2009) เซลล์กล้ามเนื้อลายของโฮสต์จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นเซลล์ เนิร์ส (nurse cell) ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายซิสต์หรือแคปซูล ตัวอ่อนของพยาธิจะพัฒนาตัวเองอยู่ ภายใต้อุปสรรคโดยไม่มีอาการลอกคราบ พยาธิตัวอ่อนแรกเกิดจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อกัน ภายใน 15 วัน พยาธิในระยะนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ในโฮสต์ได้เป็นระยะเวลานานจนกว่าจะมี โฮสต์ตัวใหม่ซึ่งอาจจะเป็นสัตว์ป่า (sylvatic host) หรือสัตว์เลี้ยง (domestic host) เช่น สุนัข จิ้งจอก หมูป่า หนู ฯลฯ มากินตัวอ่อนในระยะติดต่อกันต่อไป

ตัวอ่อนสามารถอยู่ในร่างกายมนุษย์ได้นานมากกว่า 40 ปี (Fröscher et al., 1988) ระยะ ที่ตัวอ่อนอยู่ในกล้ามเนื้อลายนี้อาจเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า ระยะ hypobiotic stage, parenteral phase หรือ muscular phase ซึ่งมีความสำคัญในแง่ของระบาดวิทยาเนื่องจากเป็นระยะติดต่อกัน และเป็นระยะที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยในโรงฆ่าสัตว์ วงชีวิตของพยาธิมีความสัมพันธ์กันทั้งสัตว์ เลี้ยงเพื่อการบริโภคและสัตว์ป่าจากการกินเนื้อสัตว์ที่มีพยาธิระยะติดต่อกันอยู่ในกล้ามเนื้อลายของ โฮสต์ วงชีวิตแสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 วงชีวิตพยาธิ *T. spiralis*

### 2.3 ระบาดวิทยาของพยาธิ *T. spiralis* ในระดับโลก

องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties, OIE) ได้จัดโรค trichinellosis ไว้เป็นโรคสัตว์สู่คนที่ควรเฝ้าระวังและมีความสำคัญเชิงสาธารณสุขในหลายประเทศ ดังจะเห็นได้จากรายงานการระบาดในหลายภูมิภาคทั่วโลก จากรายงานการระบาดของพยาธิในสกุล *Trichinella* พบว่าทวีปยุโรปมีการระบาดของโรคมากเป็นอันดับหนึ่ง โดยมีทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกาและทวีปออสเตรเลียเป็นอันดับสอง สาม สี่และห้า ตามลำดับ จากรายงานในอดีตพบว่าพยาธิ *T. spiralis* เป็นสาเหตุของการระบาดมากที่สุด *T. spiralis* ระบาดมากในเขตอบอุ่นและเขตร้อนและมีโฮสต์ที่สำคัญ (predominant host) คือ สุกรและสุกรป่า (Pozio, 2007<sup>3</sup>) สถานการณ์การระบาดของพยาธิ *Trichinella* แต่ละชนิดในทวีปต่างๆ ทั่วโลก แสดงในรูปที่ 6 และ รูปที่ 7

### 2.3.1 ทวีปยุโรป

เขตการระบาดของพยาธิในทวีปยุโรป ได้แก่ ประเทศเอสโตเนีย (Pozio et al., 1998) ประเทศโครเอเชีย (Marinculic et al., 2001) ประเทศฟินแลนด์ (Oivanen et al., 2002) ประเทศอิตาลี (Pozio and Murrell, 2006) ประเทศลิทัวเนีย (Malakauskas et al., 2007) ประเทศลัตเวีย (Pozio, 2007<sup>b</sup>) ในประเทศโปแลนด์มีรายงานว่าสาเหตุหลักของการระบาดของโรคเกิดจากการบริโภคเนื้อสุกรที่เลี้ยงแบบปล่อยหลังบ้านและมีการระบาดเกิดขึ้นเป็นประจำทุกปี พบรายงานผู้ป่วยตั้งแต่ 15 รายไปจนถึง 100 รายต่อปี (Ramisz et al., 2001) เช่นเดียวกับในประเทศฝรั่งเศสที่พบว่ามี การระบาดของพยาธิเป็นประจำทุกปีตั้งแต่ปี ค.ศ. 1975 เป็นต้นมา (Pozio, 2007<sup>b</sup>)

### 2.3.2 ทวีปเอเชีย

จากการศึกษาการระบาดของพยาธิ *T. spiralis* ในทวีปเอเชีย ประเทศที่มีรายงานการระบาดของ *T. spiralis* ได้แก่ ประเทศไทย (Boonthanom and Nawarat, 1963; Kaewpitoon et al., 2006) ประเทศเกาหลีใต้ (Sohn et al., 2000) ประเทศตุรกี (Pozio and Zarlenga, 2005) ประเทศลาว (Sayasone et al., 2007) ประเทศเวียดนาม (Pozio, 2007<sup>b</sup>) ในประเทศจีนโรค trichinellosis เป็นโรคสัตว์สู่คนที่มีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากมีรายงานการเสียชีวิตและการระบาดของโรคนี้เป็นประจำทุกปี การเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็วตลอดจนการอพยพย้ายถิ่นฐานของชาวจีนในภาคกลางจำนวนมากสู่ภาคตะวันตกของประเทศทำให้มีความต้องการเนื้อสุกรเพื่อการบริโภคมากขึ้น การขนส่งเนื้อสุกรจากภาคกลางซึ่งเป็นเขตระบาดที่สำคัญของพยาธิ *T. spiralis* สู่ภาคตะวันตกจึงเป็นสาเหตุสำคัญของการระบาดในปัจจุบัน (Wang et al., 2007)

### 2.3.3 ทวีปแอฟริกา

ประเทศที่มีรายงานการระบาดของ *T. spiralis* ได้แก่ ประเทศอียิปต์ ประเทศอัลจีเรีย พบว่าประเทศที่นับถือศาสนาอิสลามมักจะมี การระบาดของพยาธิน้อยเนื่องจากชาวมุสลิมมักจะไม่รับประทานเนื้อสุกรและการเกิดโรคในมนุษย์จึงมักเกิดกับนักท่องเที่ยวที่เป็นชาวต่างชาติ (Pozio, 2007<sup>b</sup>)

### 2.3.4 ทวีปอเมริกา

การระบาดของทวีปอเมริกา ได้แก่ ประเทศเม็กซิโก (Arriaga et al., 1995) ประเทศแคนาดา (Appleyard et al., 1998) ประเทศชิลี (Ortega-Pierres et al., 2000) นอกจากนี้ประเทศอาร์เจนตินามีรายงานการระบาดของโรคในมนุษย์และในสัตว์เป็นประจำทุกปี (Ribichich et al., 2005) ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าสาเหตุการระบาดของพยาธิมักมีสาเหตุจากการที่ผู้ป่วยรับประทานเนื้อสุกรที่มาจากฟาร์มที่ไม่ได้มาตรฐาน (Nelson et al., 2003) ปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกามีการทดลองนำร่อง *Trichinae* Certification Program เพื่อทำฟาร์มปลอดพยาธิ *Trichinella* ในฟาร์มสุกรมากกว่า 50 ฟาร์มทั่วประเทศ นอกจากนี้สหรัฐอเมริกายังได้ทำข้อตกลงทางกฎหมายกับประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ประเทศรัสเซีย ประเทศญี่ปุ่นและอีกหลายประเทศ เพื่อให้มีการตรวจคัดกรองเนื้อสุกรและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรก่อนการส่งออกด้วยวิธีการย่อยเทียม (Pozio, 2007<sup>b</sup>)

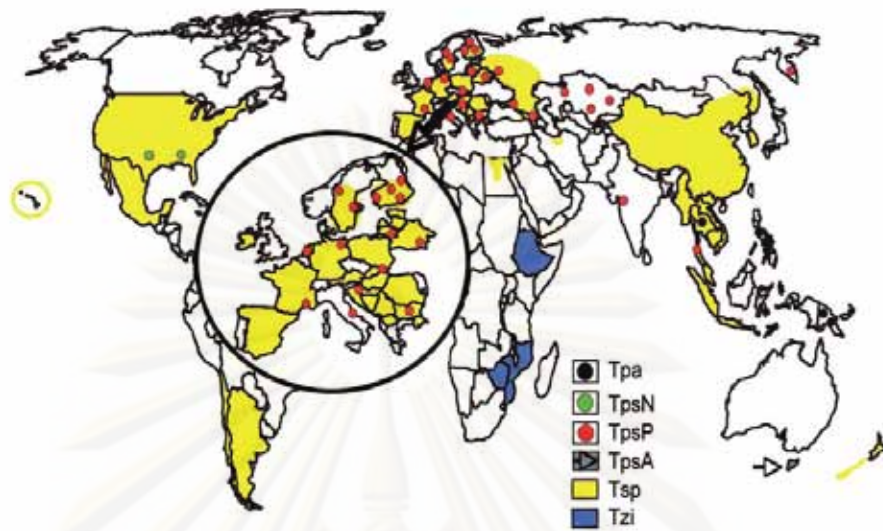
### 2.3.5 ทวีปออสเตรเลีย

ประเทศปาปัวนิวกินีและประเทศออสเตรเลียไม่พบรายงานการระบาดของพยาธิ *T. spiralis* แต่พบรายงานการระบาดของพยาธิ *Trichinella* ชนิดอื่น เช่น *T. pseudospiralis* ในเกาะทัสมาเนีย และ *T. papuae* ในขณะที่ประเทศนิวซีแลนด์พบการระบาดของพยาธิ *T. spiralis* สาเหตุของการระบาดเกิดจากการอพยพย้ายถิ่นฐานของชาวยุโรปและการบริโภคเนื้อสุกรที่เลี้ยงแบบปล่อยหลังบ้าน (Pozio, 2007<sup>b</sup>)

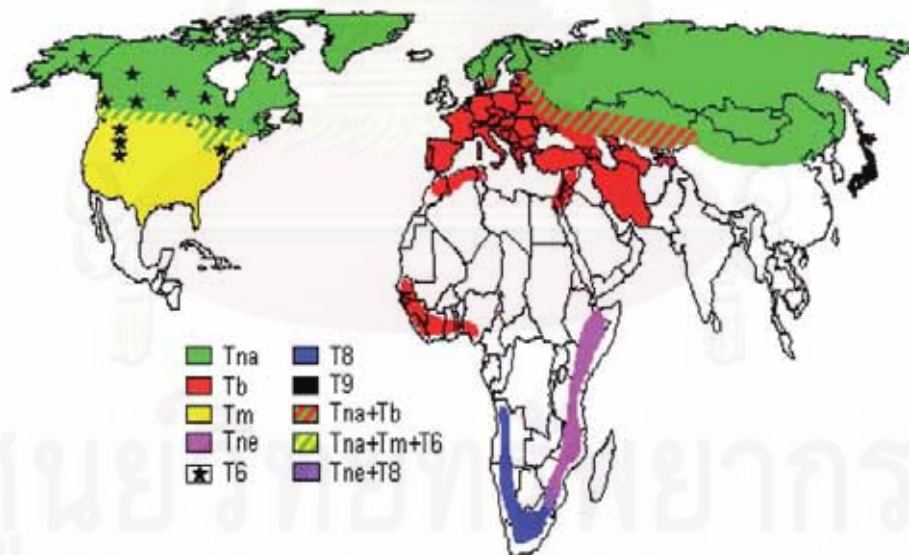
ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 6 เขตการระบาดของพยาธิในสกุล *Trichinella*; *T. spiralis* (Tsp), *T. pseudospiralis* จากทวีปอเมริกาเหนือ (TpsN), *T. pseudospiralis* จากทวีปยุโรปและทวีปเอเชีย (TpsP), *T. pseudospiralis* จากเกาะทัสมานเนียในทวีปออสเตรเลีย (TpsA), *T. papuae* (Tpa) และ *T. zimbabwensis* (Tzi) (Gottstein et al., 2009)



รูปที่ 7 เขตการระบาดของพยาธิในสกุล *Trichinella*; *T. nativa* (Tna), *T. britovi* (Tb), *T. murrelli* (Tm), *T. nelsoni* (Tne), *T. genotype T6* (T6), *Trichinella genotype T8* (T8) และ *T. genotype T9* (T9) (Gottstein et al., 2009)

## 2.4 ระบาดวิทยาของพยาธิ *T. spiralis* ในประเทศไทย

ประเทศไทยมีรายงานการระบาดของพยาธิในสกุล *Trichinella* 3 ชนิดคือ *T. spiralis* (Boonthanom and Nawarat, 1963), *T. pseudospiralis* (Jongwutiwes et al, 1998) และ *T. papuae* (Khumjui et al., 2008) พยาธิในสกุล *Trichinella* ชนิดที่มีความสำคัญที่สุดในประเทศไทยคือพยาธิ *T. spiralis* เนื่องจากมีรายงานพบการระบาดอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่พบรายงานผู้ป่วยโรค trichinellosis ในประเทศไทยเป็นครั้งแรกที่อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอนในปี พ.ศ. 2505 สาเหตุเกิดจากผู้ป่วยบริโภคเนื้อสุกรที่ไม่ผ่านการปรุงสุก (Boonthanom and Nawarat, 1963) การระบาดของพยาธิ *T. spiralis* พบได้บ่อยที่สุดในสัตว์เลี้ยง เช่น สุกรและสุนัข โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย ดังแสดงในแผนที่แสดงรายงานการระบาดของโรค trichinellosis ในประเทศไทย (รูปที่ 8) สาเหตุจากการบริโภคเนื้อสุกรที่ซื้อมาจากชาวเขาและนำมาปรุงอาหาร เช่น ลาบ หลู้หรือแหนม โดยมีการระบาดอย่างต่อเนื่องมาเป็นประจำทุกปีจนถึงปัจจุบัน พบว่าเพศชายมีอัตราการป่วยมากกว่าเพศหญิง โดยมีสาเหตุหลัก คือ การบริโภคเนื้อสุกรและสุกรป่าที่ปรุงไม่สุก (Kaewpitoon et al., 2006)



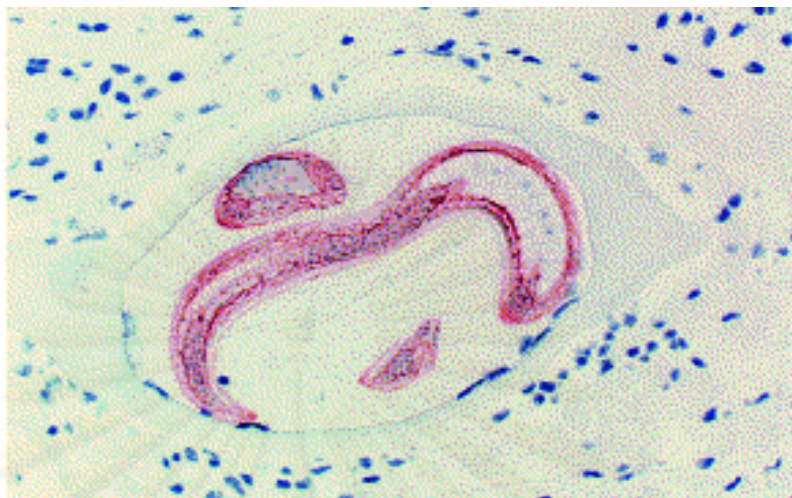
รูปที่ 8 จังหวัดที่มีรายงานการระบาดของโรค trichinellosis ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2505-2548  
(Kaewpitoon et al., 2006)

## 2.5 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิ *T. spiralis*

การเกิดพยาธิสภาพต่างๆ เป็นผลเนื่องมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายโฮสต์ต่อสารก่อภูมิคุ้มกันหรือแอนติเจนจากพยาธิ ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์จะช่วยลดปริมาณตัวอ่อนของพยาธิในกล้ามเนื้อ ความสามารถในการเคลื่อนที่ของพยาธิตัวเต็มวัยในขณะที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร รวมถึงลดความสามารถในการสืบพันธุ์ของพยาธิตัวเต็มวัย (Takahashi et al., 1997) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิ *T. spiralis* มี 2 ชนิด คือ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell mediated immune responses) และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ (antibody responses) จะกล่าวถึงชนิดของแอนติเจนและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิ *T. spiralis* โดยสังเขป ดังนี้

### 2.5.1 แอนติเจน

จากการศึกษาแอนติเจนจากพยาธิ *T. spiralis* พบว่า ตัวอ่อนในแต่ละระยะมีแอนติเจนที่มีความจำเพาะ (developmental stage specific antigen) ในระหว่างที่พยาธิ *T. spiralis* ลอกคราบจะเกิดกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการใช้เอนไซม์ในการเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรตหรือ saccharides เพื่อสร้างเป็นสายยาวและนำไปเชื่อมต่อกับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีน การต่อสาย polysaccharides กับสายโพลีเปปไทด์เป้าหมาย เพื่อให้โปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ทำหน้าที่ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นแอนติเจนในแต่ละระยะของพยาธิ จึงมีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละครั้งที่มีการลอกคราบเกิดขึ้น ทำให้แอนติบอดีของโฮสต์ และมีการตอบสนองแบบ biphasic ทำให้สามารถแบ่งแอนติเจนของพยาธิในระยะติดต่อกออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ แอนติเจนกลุ่มแรกสามารถพบได้ใน cuticle inner layers, hemolymph, embryonic sheath, hypodermal gland, genital primordium, exocrine granules ในระบบสืบพันธุ์ของพยาธิ สามารถตรวจพบแอนติเจนกลุ่มแรกนี้ได้หลังจากโฮสต์ได้รับพยาธิในระยะติดต่อกโดยการกินไปอย่างน้อย 2 สัปดาห์ แอนติเจนกลุ่มนี้จึงจัดอยู่ในกลุ่มที่ตอบสนองเร็ว (rapid-responding group) กล่าวคือ พยาธิมีการสร้างแอนติเจนกลุ่มนี้ออกมาได้เร็ว แอนติเจนกลุ่มนี้มีส่วนของโปรตีนแอนติเจนที่มีองค์ประกอบของฟอสโฟริลโคลีน (phosphorylcholine) ซึ่งพบได้ในพยาธิหลายชนิด (Takahashi, 1997; Appleton and Romaris, 2001) (รูปที่ 9) ดังนั้นแอนติเจนในกลุ่มนี้จึงสามารถพบได้มากในแอนติเจนสกัดหยาบเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนจะบดพยาธิทั้งตัวเพื่อเก็บโปรตีนที่ละลายน้ำมาใช้ในตรวจวินิจฉัยหรือการศึกษา



**รูปที่ 9** ตำแหน่งของ phosphorylcholine เมื่อย้อม immunohistochemical staining (สีชมพู) อยู่ใน hypodermis และ genital primordium ของตัวอ่อนระยะติดต่อยาธิ *T. spiralis* (Appleton and Romaris, 2001)

แอนติเจนจากตัวอ่อนพยาธิสกัดหยาบจึงมีองค์ประกอบของแอนติเจนในกลุ่มแรกอยู่มาก จึงสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีของผู้ป่วยที่ติดพยาธิฟิลาเรีย เช่น *Onchocerca* spp. และพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mansoni* (Linder et al., 1992) แอนติเจนในกลุ่มนี้ จึงมีความจำเพาะต่ำ ในขณะที่แอนติเจนอีกกลุ่มหนึ่งพบได้ที่ผิวของพยาธิตัวอ่อน แกรนูลในหลอดอาหารชนิดสทิซโคโซม (stichosome) เซลล์ล้อมรอบหลอดอาหารรูปร่างแหวนหรือเซลล์ stichocytes แบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ alpha, beta, gamma และ delta (Takahashi and Araki, 1989) ซึ่งโปรตีนแอนติเจนที่อยู่ในสารคัดหลั่งของพยาธิจะถูกเก็บไว้ที่เซลล์ stichocytes ชนิด alpha, beta และ gamma รวมถึงช่องว่างของระบบทางเดินอาหารของพยาธิตัวอ่อน เนื่องจากไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นในช่องว่างของระบบทางเดินอาหารและที่ผนังลำตัวชั้นคิวติเคิล (cuticle surface) จึงสรุปได้ว่าแอนติเจนกลุ่มนี้สร้างมาจากหลอดอาหารชนิด stichosome ของพยาธิ แอนติเจนกลุ่มนี้จะพบได้ในสิ่งที่พยาธิขับถ่ายออกมา รวมถึงสารคัดหลั่งต่างๆ

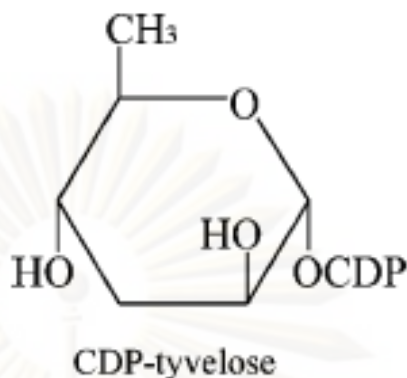
แอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิจะสามารถตรวจพบได้หลังจากได้รับพยาธิไปแล้ว 4 สัปดาห์จึงจัดอยู่ในกลุ่มของแอนติเจนที่มีการตอบสนองตอบช้า (slow-responding group) จากการศึกษาต่อมาพบว่าแอนติเจนที่ได้จากสารคัดหลั่งของตัวอ่อนพยาธิระยะก่อนและหลังการสร้างแคปซูลมีความสามารถในการเป็นแอนติเจนที่แตกต่างกัน (antigenic difference) การ

พัฒนาของแคปซูลจะเกิดขึ้นหลังจากพยาธิมีการพัฒนาของหลอดอาหารเกิดขึ้น (Ko and Yong, 1992) แอนติเจนเหล่านี้จะมีรูปแบบการก่อภูมิคุ้มกัน (antigenic profile) ที่มีลักษณะเฉพาะ ทั้งนี้ การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่มีต่อพยาธิ *T. spiralis* มีความสัมพันธ์กับค่าตัวแปร เสริม (parameter) หลายตัว ได้แก่ ชนิดของโฮสต์และลักษณะจำเพาะของพันธุกรรมในสัตว์แต่ละ ชนิด (MHC และ non- MHC genes) (Bell, 1998) จากการศึกษาของ Appleton และคณะ (1991) ด้วย immunoblot technique โดยใช้โปรตีนสกัดหยาบจากตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อกพบว่า แอนติเจนที่สำคัญในพยาธิ *T. spiralis* แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ *T. spiralis* group 1-*T. spiralis* group 8 (TSL-1-TSL-8) โดยพยาธิในระยะติดต่อกมีแอนติเจน TSL-1 เป็นแอนติเจน กลุ่มที่เหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีได้ดีเนื่องจากเป็นแอนติเจนกลุ่มที่อีพิโทพ (epitope) ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *Trichinella* สูง สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของสัตว์ที่ได้รับพยาธิ *Trichinella* ชนิดอื่นได้ดี (Nöckler et al., 2005) และเนื่องจากน้ำตาล tyvelose มีโครงสร้างที่ซ้ำกันที่ตำแหน่งส่วนปลายของสายโกลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide chains) จึงมีปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อ epitope หลายตำแหน่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของน้ำตาล  $\beta$ -tyvelose ที่เป็นแอนติเจนที่มีลักษณะจำเพาะของพยาธิวงศ์ทริคูรอยเดีย (Family Trichuroidea) แอนติเจนในกลุ่มของ TSL-1 จึงมีรายงานการศึกษามากที่สุด เนื่องจากเป็นแอนติเจนกลุ่มที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis (Ellis et al., 1997)

TSL-1 เป็นกลุ่มของแอนติเจนที่ประกอบไปด้วยไกลแคน (glycan) ที่มีโครงสร้างเป็นสาม และสี่มิติ (tri- and tetrantenary structures) glycan จะปรากฏในระยะที่พยาธิ *T. spiralis* ฝังตัว อยู่ในกล้ามเนื้อโดยไม่ตรวจพบในระยะอื่นและน้ำตาล tyvelose ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ 3,6-dideoxy-D-arabinohexose (รูปที่ 10) เป็นองค์ประกอบ

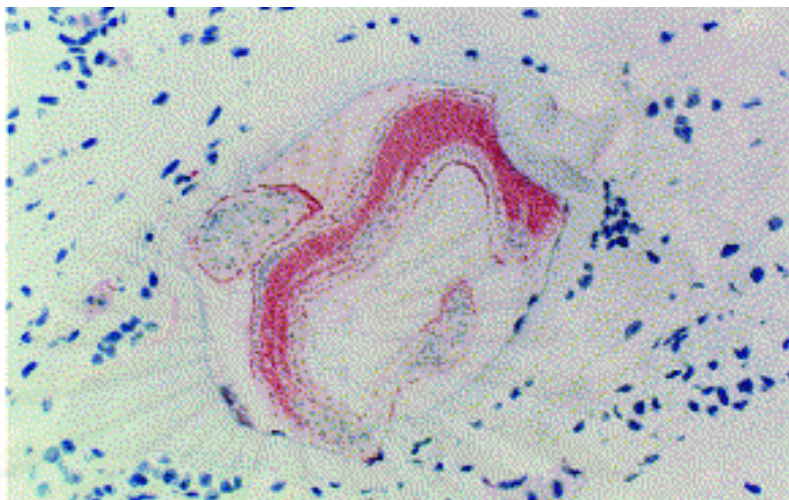
ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 10** โครงสร้างทางชีวเคมีของน้ำตาล CDP- tyvelose (3, 6 dideoxy-D-arabinohexose)  
(Bolás-Fernandaz and del Corral Bezara, 2006)

พยาธิจะผลิตโปรตีนต่างๆที่มีองค์ประกอบของแอนติเจนในกลุ่ม TSL-1 และเก็บไว้ในแกรนูลของเซลล์ stichocytes ของตัวอ่อนระยะติดต่อกัน (Ortega-Pierres et al., 1996; Romaris et al 2002) องค์ประกอบของสารคัดหลั่งและสิ่งขับถ่ายของตัวอ่อนที่ฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิด (Ellis et al., 1994) และแพร่กระจายออกมาจากแกรนูลของ stichocytes จึงสามารถพบแอนติเจนกลุ่ม TSL-1 ได้มากในสารคัดหลั่งและสิ่งขับถ่ายตัวอ่อนของพยาธิโดยพยาธิจะขับโปรตีนออกมาจากเซลล์ stichocytes รวมถึงผนังชั้น cuticle ของตัวอ่อน (Denkers et al., 1990; Appleton and Romaris, 2001) (รูปที่ 11)



**รูปที่ 11** ตำแหน่งของน้ำตาล tyvelose เมื่อย้อม immunohistochemical staining (สีชมพู) อยู่ในเซลล์ stichocytes และผนังชั้น cuticle ของตัวอ่อนระยะติดต่อยาธิ *T. spiralis* (Appleton and Romaris, 2001)

จากการศึกษาของ Lee และคณะ (1991) พบว่าแอนติเจนจากเซลล์ stichocytes (น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 43-45 kDa) อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และนิวคลีโอพลาสซึม (nucleoplasm) ของเซลล์โฮสต์และทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้มีการสร้างและมีการคงอยู่ของ nurse cell หลังจากนั้นตัวอ่อนพยาธิ *T. spiralis* ระยะติดต่อยาธิจะสร้างและส่งโปรตีนแอนติเจนออกไปนอกแคปซูลอีกครั้งก่อนที่โปรตีนบางส่วนจะถูกดูดซึมกลับมายังผนังชั้น cuticle และแกรนูลที่อยู่ภายในเซลล์ stichocytes ดังนั้นแอนติเจนจากผนังชั้น cuticle และแอนติเจนจากแกรนูลที่อยู่ภายในเซลล์ stichocyte ของพยาธิจึงมีบางส่วนที่มีคุณสมบัติของแอนติเจนร่วมกัน (share antigenicity) Robinson (2005) ศึกษาชนิดของโปรตีนเพิ่มเติมด้วยวิธีการแยกสายโพลีเปปไทด์บนเจลโดยใช้ two-dimensional gel electrophoresis (2 DE) ของแอนติเจนจากสารคัดหลั่งพยาธิ โปรตีนชนิดหลักที่ถูกขับออกมาใน 6 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงพยาธิระยะติดต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 40-60 kDa ต่อมาพยาธิจึงขับโปรตีนหลายชนิดออกมามากขึ้นพบว่าโปรตีนชนิดที่ถูกขับออกมาภายหลังมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ระหว่าง 15-40 kDa จากการศึกษาพบว่าองค์ประกอบหลักที่พยาธิ *T. spiralis* ขับออกมา นอกจากจะมีโปรตีนกลุ่ม TSL-1 ยังพบว่ามีเอนไซม์ 5'-nucleotidase ชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของ TSL-1 คือ gp43/gp38, 45 kDa และ TspSP-1 serine protease สามารถระบุชนิดโปรตีนจากสารคัดหลั่งของพยาธิ *T. spiralis* ได้ และจากข้อมูลของการทำชีวสารสนเทศ (Bioinformatic analysis) ระบุ



ว่าสายโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุล 45 kDa เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น serine proteases (TspSP-1) ซึ่งมีหลาย isoform เนื่องจากพบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากันแต่ต่างตำแหน่งบนเจลเมื่อการเปลี่ยนแปลงค่า pI (Robinson et al., 2005) จากการศึกษาของ Romaris และคณะ (2002) พบว่า TspSP-1 มี 4 N-glycosylation sites

TspSP-1 ของพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อดังกล่าวประกอบด้วย 2 serine protease domains แต่มีเพียง domain เดียวเท่านั้นที่สามารถทำหน้าที่ได้ เพราะการสังเคราะห์ multi-domain serine proteases โดยทั่วไปจะมีความคล้ายคลึงกับการสังเคราะห์ membrane-bound proteins ซึ่งจะต้องผ่านกระบวนการเร่งปฏิกิริยา (catalyses) ให้อยู่ในรูปโปรตีนที่สามารถทำงานได้ หน้าที่ของ TspSP-1 ยังไม่เป็นที่ทราบกันดีแต่สันนิษฐานว่ามีบทบาทในการลอกคราบของพยาธิ (Trap et al., 2006) โปรตีนในกลุ่ม TSL-1 จึงมีประโยชน์มากในการตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis ชนิดเรื้อรังด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาทั้งในมนุษย์และสัตว์เพราะแอนติบอดีของโฮสต์จะสามารถทำปฏิกิริยาต่อโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 43-68 kDa ในระยะท้ายของการติดเชื้อ (Denkers et al., 1991) การแยกชนิดของโปรตีนจากสารคัดหลั่งของพยาธิพบว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ที่ต่างกันของโปรตีนจากสารคัดหลั่งของพยาธิ *T. spiralis* ในปัจจุบัน สรุปได้ ตารางที่ 1

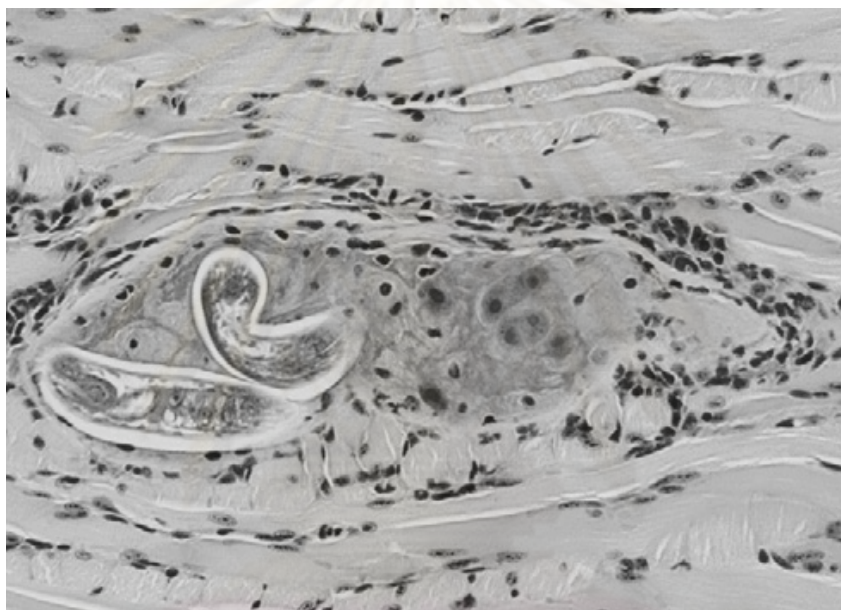
ตารางที่ 1 ชนิดของโปรตีนจากสารคัดหลั่งของพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อเมื่อแยกด้วย 2 DE (Robinson et al., 2005; Robinson et al., 2007)

ชนิดโปรตีน	GenBank accession	
	number	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)/ ค่า pI
serine protease	AY028974	48/6.33
gp43	M95499	38/5.95
45 kDa antigen	U01847	31/4.76
5'-nucleotidase	AY127571	62/6.13
ORF9.10	U88241	47.6/5.16

### 2.5.2 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์

จากการศึกษาของ Walls (1973) พบว่ากลุ่มเซลล์อักเสบ เช่น นิวโทรฟิล (neutrophil) โมโนนิวเคลียร์เซลล์ (mononuclear cell) ได้แก่ โมโนไซต์ (monocyte) และมาโครฟาจ (macrophage) จะเข้ามาล้อมรอบ nurse cell ใน T lymphocyte deficient mice สามารถอธิบายได้ว่าเซลล์เหล่านี้มีการทำงานร่วมกันในภาวะที่โฮสต์มีการติดเชื้อที่กล้ามเนื้อ โดยกลุ่มของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ที่มีลักษณะจำเพาะคือ มี T cell receptor ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบตั้งแต่พยาธิตัวอ่อนแรกเกิดไซเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อและเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ (cytokine) ชนิดต่างๆ ได้แก่ IL-4 (Li and Ko, 2001) IL-5, IL-10, IL-13 และ IFN-gamma (Beiting et al., 2007) ในผู้ป่วยโรค trichinellosis พบว่า mononuclear cell มีความสามารถในการสร้าง cytokine IFN-g, IL-10 และ IL-5 และยังคงความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อตอบสนองต่อเชื้อได้นานมากกว่า 3 ปีหลังจากได้รับเชื้อ (Gómez-Morales et al., 2002)

การเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกันของโฮสต์ระหว่างที่พยาธิ *T. spiralis* อยู่ในกล้ามเนื้อจะสัมพันธ์กับอาการทางคลินิกที่สำคัญ ได้แก่ กระบวนการอักเสบ (Beiting et al., 2004) เซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากเข้ามาอยู่รอบๆเซลล์กล้ามเนื้อที่มีตัวอ่อนของพยาธิอาศัยอยู่ตลอดเวลา (รูปที่ 12) และกระตุ้นให้เกิดภาวะอักเสบ แต่การอักเสบที่เกิดขึ้นไม่มีนัยสำคัญต่อการต่อต้านพยาธิทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดตัวอ่อนพยาธิที่อยู่ในกล้ามเนื้อออกไปได้ *T. spiralis* (Fabre et al., 2009)



รูปที่ 12 เซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามารวมอยู่รอบ nurse cell ของ *T. spiralis* จากอิทธิพล ของ IL-10 (Fabre et al., 2009)

### 2.5.3 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำ

ชนิดของแอนติบอดีในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในระหว่างที่ติดพยาธิ *T. spiralis* ได้แก่ IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> (Almond and Parkhouse, 1986) และ IgE (Zakroff et al., 1989) ปริมาณของ IgG<sub>1</sub> และ IgE ที่สูงขึ้นในระหว่างการป่วยด้วยโรค trichinellosis ชนิดเรื้อรังเกิดจากการตอบสนองต่อการทำงานของ T helper-2 cell (Beiting et al., 2007) จากการศึกษาในสุกร การตอบสนองของแอนติบอดีในสุกรต่อพยาธิ *T. spiralis* พบว่าบริเวณเยื่อเมือกในลำไส้มีการสร้างทั้ง IgG<sub>1</sub> และ Ig A สามารถตรวจพบ IgG<sub>1</sub> ได้เป็นครั้งแรกที่เยื่อเมือกของลำไส้เล็กในวันที่ 15 หลังจากที่ได้รับพยาธิในระยะติดต่อ ในขณะที่แอนติบอดีในซีรัมจะตรวจพบได้เป็นครั้งแรกในวันที่ 20 หลังจากที่ได้รับพยาธิในระยะติดต่อ ทำให้สันนิษฐานได้ว่าระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์มีการ

สร้างแอนติบอดีแบบเป็นลำดับขั้นหรืออาจกล่าวได้ว่าการแพร่กระจายของแอนติบอดีจากเยื่อเมือกของลำไส้ไปยังกระแสเลือด แอนติบอดีจะถูกเหนี่ยวนำให้สร้างออกมาทั้งในระยะต้นและระยะต่อมาของการติดพยาธิ จากการศึกษา Isotype analysis ของแอนติบอดีพบว่าระดับของ IgG<sub>1</sub> และ IgG<sub>2</sub> ที่จำเพาะจะเพิ่มขึ้นในเยื่อเมือกของลำไส้ในระหว่างที่มีการติดพยาธิร่วมกับมี IgG<sub>1</sub> อยู่ในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญ (Picherot et al., 2007)

## 2.6 อาการทางคลินิกของโรค trichinellosis ในมนุษย์

อาการทางคลินิกมักแสดงอาการในมนุษย์แต่ในสัตว์ที่เป็นโฮสต์กักเก็บมักไม่แสดงอาการทางคลินิกปรากฏให้เห็นนอกจากจะได้รับพยาธิในระยะติดต่อเป็นจำนวนมาก อาการทางคลินิกมีความสัมพันธ์กันกับปริมาณของตัวอ่อนระยะติดต่อที่ได้รับเข้าไปและระยะเวลาของการได้รับพยาธิเข้าไปโดยการกิน การตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis ในมนุษย์มักสับสนกับโรคที่เกี่ยวข้องระบบกล้ามเนื้ออื่น เนื่องจากมีอาการทางคลินิกที่ปรากฏให้เห็นคล้ายคลึงกัน (Mahannop et al., 1992; Gamble et al., 2004) Capó และ Despommier (1996) แบ่งอาการทางคลินิกที่ปรากฏเป็น 2 ระยะดังนี้

### 2.6.1 Enteral phase

ผู้ป่วยมักไม่แสดงอาการในระยะแรกหลังจากรับประทานเนื้อสัตว์ที่มีตัวอ่อนในระยะติดต่อของพยาธิหรืออาจแสดงอาการอาเจียนและท้องเสียเพียงเล็กน้อย อาการทางคลินิกในระยะนี้มีสาเหตุมาจากพยาธิตัวเต็มวัยไชเข้าทางเยื่อเมือกของลำไส้เล็กส่วนต้น ดังนั้นในสัปดาห์แรกผู้ป่วยที่ได้รับพยาธิเข้าไปในจำนวนมากจะแสดงอาการปวดท้องโดยเฉพาะท้องตอนบน (upper abdomen) ร่วมกับมีอาการท้องเสียหรือท้องผูก อาเจียน อ่อนเพลียและอาจมีไข้ต่ำ อาการจะปรากฏเป็นระยะเวลา 2-3 วัน อาการดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับอาการของโรคในระบบทางเดินอาหารอื่น เช่น อาหารเป็นพิษ หรือติดโรคพยาธิอื่น เป็นต้น จึงเป็นสาเหตุให้มีการวินิจฉัยโรคผิดพลาดทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องหรือละเลยอาการเบื้องต้นดังกล่าวจนกระทั่งมีการพัฒนาของโรคเข้าสู่ระยะ parenteral phase หรือ systemic phase

## 2.6.2 Parenteral phase

ระยะเวลาระหว่าง 2-6 สัปดาห์แรกผู้ป่วยได้รับพยาธิในระยะติดต่อเข้าไปยังคงอยู่ในช่วง enteral phase ผู้ป่วยจะยังคงมีไข้สูงเนื่องจากเกิดการตายและการอักเสบของเซลล์กล้ามเนื้อเป็นผลทำให้เกิดการสร้างแกรนูโลมา (granuloma) และเกิดอาการแทรกซ้อนทำให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิต คือ ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบและอาจมีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง (Andrews et al.,1994) หรือแสดงอาการของโรคระบบอื่นๆโดยขึ้นอยู่กับบริเวณที่ตัวอ่อนเข้าไปสร้างแคปซูลอยู่ในกล้ามเนื้อ ในผู้ป่วยที่รับประทานตัวอ่อนในระยะติดต่อเข้าไปมากมักเสียชีวิตจากภาวะช็อกจากการแพ้ (anaphylactic shock) หรือระบบทางเดินหายใจล้มเหลวเฉียบพลันเนื่องจากตัวอ่อนไปฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อกระบังลมเป็นจำนวนมาก

## 2.7 การรักษาโรค trichinellosis

ยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรค trichinellosis ประกอบไปด้วยยาถ่ายพยาธิและยาในกลุ่มสเตียรอยด์ (steriod) ร่วมกับการให้สารน้ำและอิเล็กโทรไลต์ทดแทนที่สูญเสียไปในระยะ enteral phase การรักษาดังกล่าวเป็นเพียงการรักษาเพื่อบรรเทาอาการของโรคเนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานการรักษาโรค trichinellosis ที่ได้ผลแน่นอน เนื่องจากยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้โดยตรงกับตัวอ่อนพยาธิระยะที่อยู่ในแคปซูลได้ ประสิทธิภาพของการรักษาจึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็ว ยาถ่ายพยาธิที่นิยมใช้ได้แก่ albendazole (400 mg/วัน ทานต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน) และ mebendazole (200 mg/วัน ทานต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน) ในกรณีผู้ป่วยเป็นสตรีมีครรภ์และเด็กควรลดขนาดของยาลงมาที่ 5 mg ต่อน้ำหนักตัว 1 kg ทานยาเป็นระยะเวลา 4 วันติดต่อกันเพื่อขับพยาธิตัวเต็มวัยออกมาให้ได้เร็วที่สุดและลดการฝังตัวของตัวอ่อนพยาธิในกล้ามเนื้อ (Capó and Despommier,1996)

## 2.8 การตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิ *T. spiralis* ในสุกร

สาเหตุของโรค trichinellosis ในมนุษย์พบว่าสาเหตุหลักคือการรับประทานเนื้อสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคและเนื้อสัตว์ป่า (Pozio, 2007<sup>a</sup>) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคเนื้อสุกรซึ่งเป็นโฮสต์กักเก็บสำคัญของพยาธิ *T. spiralis* จากภาวะเศรษฐกิจและสังคมที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา รวมถึงจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นทำให้มีความต้องการบริโภคโปรตีนจากเนื้อสัตว์และการเพิ่มจำนวนสัตว์เลี้ยงอย่างรวดเร็วทำให้การเฝ้าระวัง ควบคุมโรค trichinellosis ทำได้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ในอนาคตจำนวนผู้ป่วยโรค trichinellosis จึงมีแนวโน้มที่จะมีจำนวนเพิ่ม

มากขึ้น (Van Knapen, 2000) โรค trichinellosis มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสภาวะเศรษฐกิจ สังคมและสุขอนามัยของผู้บริโภคการเกิดการระบาดของโรคจึงส่งผลกระทบต่อการค้าขายเนื้อสุกร และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรระหว่างประเทศ จากรายงานความชุกของพยาธิในสุกรและสัตว์ป่า เพิ่มขึ้นในหลายประเทศทำให้เพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อโรค trichinellosis จากการนำเข้าเนื้อสุกรเข้าสู่ ประเทศสมาชิกร่วมสหภาพยุโรป (European Union, EU or EC) องค์การความปลอดภัยอาหาร ยุโรป (European Food Safety Authority, EFSA) (Dupouy-Camet, 2000; EC, 2005) จึง กำหนดเงื่อนไขสำคัญในการส่งออกเนื้อสุกรเพื่อจำหน่ายไปยังประเทศในกลุ่มสมาชิกให้เนื้อสุกรที่ จะส่งออกจะต้องปราศจากพยาธิ *Trichinella* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *T. spiralis* จึงสามารถนำเข้า มายังประเทศกลุ่มสมาชิกร่วมสหภาพยุโรป การตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพจึงมีประโยชน์ในแง่ ของการเพิ่มความปลอดภัยในอาหารและเอื้อประโยชน์ต่อการค้าระหว่างประเทศ

ปัจจัยสำคัญในการควบคุมโรคจะต้องมีการพัฒนาเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยที่มีความ ไว และความจำเพาะสูง เนื่องจากสุกรมักไม่แสดงอาการทางคลินิกปรากฏให้เห็นนอกจากจะได้รับ พยาธิในระยะติดต่อในปริมาณมากจึงทำให้การตรวจคัดกรองเพื่อเฝ้าระวังโรค trichinellosis จาก การสังเกตอาการของโรคจึงไม่สามารถกระทำได้ในเชิงปฏิบัติ การตรวจวินิจฉัยตัวอ่อนระยะติดต่อ ของพยาธิ *T. spiralis* จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการควบคุมการระบาดและเฝ้าระวังโรค trichinellosis (Nöckler et al., 2000) การตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis ในสุกรแบ่งออกเป็น การ ตรวจวินิจฉัยทางตรงและทางอ้อม (OIE, 2008) ดังนี้

### 2.8.1 การตรวจวินิจฉัยทางตรง

การตรวจวินิจฉัยทางตรงเป็นการตรวจหาตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิที่ฝังตัวอยู่ใน กล้ามเนื้อลายของสุกรโดยตรง ความจำเพาะของการตรวจด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งเนื่องจากจะ พบตัวอ่อนในระยะติดต่อมากในบริเวณกล้ามเนื้อที่ใช้ออกซิเจนสูง ปริมาณของตัวอย่างที่เก็บ กรณีสัตว์อ่อนพยาธิ *T. spiralis* ฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อจำนวนน้อยผู้ตรวจอาจตรวจไม่พบพยาธิ รวมถึงวิธีการตรวจจำเพาะที่แตกต่างกันจะส่งผลกระทบต่อความไวและความจำเพาะที่แตกต่างกัน การ ตรวจวินิจฉัยโดยตรงมีความแม่นยำสูงแต่ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่มากเนื่องจากใช้เวลาในการตรวจ วิธีนี้ มีความไวที่ตัวอ่อนพยาธิประมาณ 1 - 3 ตัวต่อเนื้อเยื่อตัวอย่าง 1 กรัม (g) (Larvae per gram, LPG) จึงมีความไวต่ำในกรณีที่มีพยาธิตัวอ่อนอยู่ในกล้ามเนื้อจำนวนน้อย และต้องอาศัยความ ชำนาญในการตรวจหาแคปซูลหรือซิสต์ของพยาธิที่อยู่ในกล้ามเนื้อลาย ในกรณีที่มีการระบาดของ พยาธิขนาดของตัวอย่างที่เก็บอาจต้องเพิ่มปริมาณขึ้นเป็น 5 g เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจ

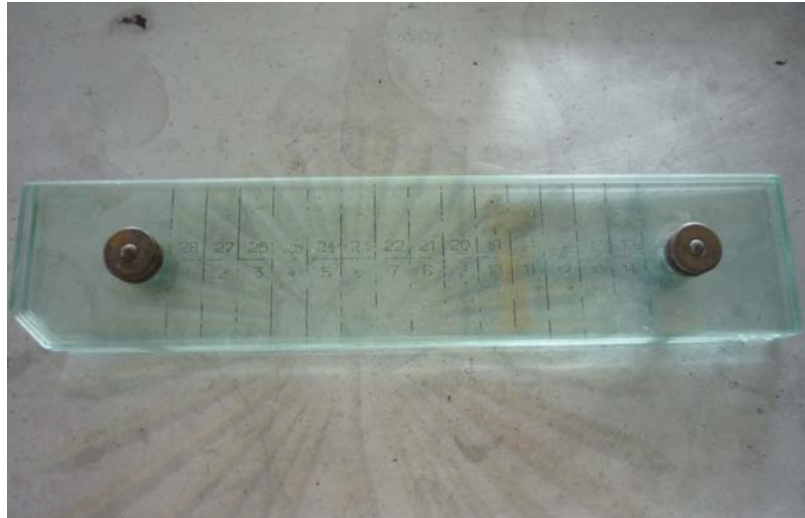
วินิจฉัย การเก็บตัวอย่างในการตรวจวินิจฉัยเฝ้าระวังโรคในสัตว์ที่ยังมีชีวิตอาจทำได้ยาก เนื่องจากการเก็บตัวอย่างควรเก็บในบริเวณที่พยาชิชอบเข้าไปอาศัยอยู่ (site of predilection) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของโฮสต์ ในสุกรตำแหน่งที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ลิ้น บริเวณส่วนหัว กระบังลมและกล้ามเนื้อแก้ม (Forbes and Gajadhar, 1999) สุกรป่า ได้แก่ กล้ามเนื้อขาหน้า และกล้ามเนื้อส่วนหัวกระบังลม ในกรณีของโฮสต์ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนว่าพยาชิชอบเข้าไปอยู่ที่ตำแหน่งใด แนะนำให้เก็บลิ้นหรือกล้ามเนื้อกระบังลม ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างในบริเวณที่ต้องการได้ อาจจะต้องเพิ่มปริมาณของตัวอย่าง โดยอาจเก็บตัวอย่างที่ปริมาณมากกว่า 100 g (Gamble et al., 2000) การตรวจวินิจฉัยทางตรง มีดังนี้

### 2.8.1.1 วิธีการกดเนื้อเยื่อ (Compression method)

การใช้แผ่นกระจก 2 แผ่นสำหรับกดเนื้อเยื่อหรือ compressorium (รูปที่ 13) กดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางเพื่อตรวจหาตัวอ่อนของพยาชิที่ฝังตัวอยู่แคปซูล โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างหรือ trichinoscope ซึ่งเป็นกล้องที่ออกแบบมาเพื่อการตรวจพยาชิ *T. spiralis* โดยเฉพาะ (รูปที่ 14) เพื่อตรวจหาตัวอ่อน ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่ออย่างน้อย 1 g หรืออย่างน้อย 0.05 g วิธีนี้สามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละ 1 ตัวอย่าง ทำให้เสียเวลาและแรงงานค่อนข้างมาก ความไวในการตรวจวินิจฉัยต่ำกว่าวิธีย่อยเทียม การตรวจวินิจฉัยโดยการกดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางยังไม่เหมาะในการตรวจวินิจฉัยพยาชิ *Trichinella* ชนิดที่ไม่มีคอลลาลาเจนแคปซูล เช่น *T. pseudospiralis*, *T. zimbubwensis* และ *T. papuae* เป็นต้น เนื่องจากสังเกตเห็นพยาชิได้ยากในกล้ามเนื้อโฮสต์ จากข้อจำกัดนี้ทำให้วิธีการกดเนื้อเยื่อเพื่อตรวจหาพยาชิในระยะติดต่อโดยตรงไม่เป็นที่ยอมรับของคณะกรรมการนานาชาติว่าด้วยเรื่องโรค trichinellosis (International Commission on Trichinellosis, ICT), OIE หรือ EU ในการตรวจคัดกรองการติดพยาชิ *Trichinella* ในปัจจุบัน (Gajadhar et al., 2009)

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 แผ่นกระจก 2 แผ่นสำหรับกดเนื้อเยื่อหรือ Compressorium



รูปที่ 14 Trichinoscope



### 2.8.1.2 การย่อยเทียม (Artificial digestion method)

การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการนิยมใช้วิธีย่อยเทียม (Dennis, 1970) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูง (Gajadhar and Forbes, 2001) การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้เลียนแบบการย่อยในธรรมชาติ น้ำย่อยเทียมประกอบไปด้วย 0.5 - 1% เปปซินและ 1% กรดไฮโดรคลอริก ระยะเวลาย่อยแปรผันไปตั้งแต่อย่างน้อย 30 นาทีจนถึงหลายชั่วโมงขึ้นกับปริมาณสัดส่วนของน้ำย่อยเทียมต่อตัวอย่างที่ใช้ คุณณหภูมิที่ใช้ในการย่อยอยู่ในระหว่าง 37 องศาเซลเซียส (°C) ไปจนถึง 44 - 46 °C น้ำย่อยเทียมจะย่อยเนื้อเยื่อรอบๆและแคปซูลของพยาธิออกเหลือแต่ตัวอ่อนระยะติดต่อที่สามารถสังเกตได้ง่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างหรือกล้องสเตอริโอ การย่อยเทียมสามารถทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ตัวอย่างละอย่างน้อย 1 g โดยการย่อย 1 ครั้ง สามารถตรวจตัวอย่างได้มากถึง 100 ตัวอย่าง การย่อยเทียมสามารถประยุกต์กับเทคนิคการเก็บตัวอ่อนต่างๆได้ เช่น การย่อยเทียมร่วมกับการแยกด้วยกรวยสองชั้น (The double separatory funnel method) (รูปที่ 15) การย่อยเทียมรวมหลายตัวอย่างร่วมกับการทำให้ตกตะกอน (OIE, 2008)



รูปที่ 15 การเก็บตัวอ่อนพยาธิ *T. spiralis* ระยะติดต่อด้วย Double separatory funnel method

ปัจจุบันการย่อยเทียมแบบ magnetic stirrer method เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard method) ในการตรวจวินิจฉัย *T. spiralis* ในสัตว์ แต่ในกรณีที่มีการระบาดของโรคการตรวจวินิจฉัยด้วยการย่อยเทียมยังต้องการการตรวจยืนยันโรคในแต่ละตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง (Gajadhar et al., 2009)

### 2.8.1.3 วิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

สำหรับวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาใช้ในการระบุชนิดและจีโนไทป์ (genotype) ของพยาธิในสกุล *Trichinella* กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วโลก เช่น restriction fragment length polymorphisms (RFLP) (Zarlenga et al., 1991) random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Wu et al., 1999) วิธีการอื่น ๆ ที่มีความไวสูงและความจำเพาะได้แก่ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction-PCR) (Rombout et al., 2001; Gasser et al., 2004) ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิได้แม้จะมีตัวอ่อนอยู่ในกล้ามเนื้อในปริมาณน้อย PCR จึงเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยพยาธิ *Trichinella* ที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจได้แม้ว่าจะมีพยาธิเพียงแค่ตัวเดียวและเป็นวิธีการใช้ในการแยกชนิดของพยาธิ *Trichinella* ที่มีความเหมาะสมมากที่สุดเนื่องจากไม่สามารถจำแนกชนิดของพยาธิได้จากการศึกษากายรูปวิทยาได้ เทคนิค PCR ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ของพยาธิ *Trichinella* มีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่ถูกกดระบบภูมิคุ้มกันหรือในกรณีที่ไม่น่าสนใจในผลการตรวจวินิจฉัยอื่น ๆ ปัจจุบันมีการตรวจวินิจฉัยด้วย multiplex PCR ซึ่งมีความไวสูง (Zarlenga et al., 1999) ตลอดจนการใช้ real-time PCR (Atterby et al., 2009)

### 2.7.2 การตรวจวินิจฉัยทางอ้อม

การตรวจวินิจฉัยทางอ้อมเป็นการตรวจการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยาเพื่อตรวจแอนติบอดีชนิดที่จำเพาะต่อแอนติเจนจึงมีความไวสูงกว่าการตรวจวินิจฉัยทางตรงในกรณีที่มีพยาธิฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อในปริมาณน้อยไม่สามารถสัมผัสตรวจได้ใน การตรวจวินิจฉัยทางตรง จากการศึกษาของ Gamble และ Patrascu (1996) พบว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยาสามารถใช้ตัวอย่างที่เป็นเลือดเพื่อมาแยกเฉพาะซีรั่มหรือน้ำจากเนื้อเยื่อพบว่าให้ผลดีและสามารถเก็บตัวอย่างในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตหรือจากซากสัตว์ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเฝ้าระวังโรคจากสัตว์มาสู่คน เครื่องมือที่ใช้ในการวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา มีหลายวิธี ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), co-agglutination test, indirect

immunofluorescent antibody test (IFAT) และ immunoblot technique (Robert et al., 1996; Ventuliello et al., 1998; Eissa et al., 2003; Sofronic-Milosavljevic et al., 2005) เป็นต้น การตรวจปริมาณระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์ต่อพยาธิ *T. spiralis* ด้วย ELISA เป็นเพียงวิธีเดียวในการตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological method) ที่ได้รับการยอมรับจาก ICT ว่าเป็นเครื่องมือทางระบาดวิทยาที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิ *Trichinella* (anti-*Trichinella* antibodies) ในการเฝ้าระวังโรค trichinellosis ในระดับฝูง เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ทราบผลการตรวจได้อย่างรวดเร็ว สามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละเป็นจำนวนมากจึงนิยมนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองโรคในสุกรและสุกรป่า แต่ยังไม่ให้ผลบวกสูงได้ในบางตัวอย่าง (OIE, 2008) การตรวจวินิจฉัยทางอ้อมที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ ELISA ซึ่งมักใช้ร่วมกับ immunoblot technique เพื่อยืนยันความจำเพาะของการตรวจวินิจฉัยโรค

### 2.7.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA สามารถใช้ในการตรวจอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ได้หลาย class ต่างกัน (IgA, IgG, IgM) หรือในระดับ subclass (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> และ IgG<sub>4</sub>) (Ljungström et al., 1988) พบว่าแอนติบอดี class IgG subclass IgG<sub>1</sub> มีความไวในการตรวจวินิจฉัยมากกว่าแอนติบอดีในคลาสอื่นเนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง IgG แต่ละ isotype พบว่า IgG<sub>1</sub> มีระดับสูงกว่า IgG<sub>2</sub> ในสุกร การใช้น้ำจากเนื้อเยื่อในการตรวจหาแอนติบอดีมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้เลือดหรือซีรัมในการตรวจโดยใช้วิธี ELISA ข้อดีของการใช้น้ำจากเนื้อเยื่อในการตรวจวินิจฉัยคือ เป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บไว้ได้นานสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาและการตรวจคัดกรองโรคในระดับประชากร (population screening test) (Beck et al., 2005) การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ELISA มีความไวสูง แต่ประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ELISA จะขึ้นอยู่กับและชนิดและคุณภาพของแอนติเจนที่ใช้ (OIE, 2008) ซึ่งแอนติเจนที่นำมาใช้ได้ในงาน ELISA ได้แก่ แอนติเจนสกัดหยาบ แอนติเจนจากสารคัดหลั่งและแอนติเจนสังเคราะห์เลียนแบบน้ำตาล tyvelose ในธรรมชาติ พบว่าแอนติเจนจากสารคัดหลั่งมีความไวและความจำเพาะต่อการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ELISA มากที่สุด จึงมีความนิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยมากที่สุดในปัจจุบัน สรุปได้ตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** การใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อพยาธิในสกุล *Trichinella* เมื่อศึกษาด้วยแอนติเจนต่างชนิด (Gajadhar et al., 2009)

วิธี	แอนติเจน	ความไว	ความจำเพาะ	อ้างอิง
ELISA	ชนิดสกัดหยาบ	99% (มนุษย์ สุกร)	60% (มนุษย์)	Andiva et al., 2002
ELISA	จากสารคัดหลั่ง	98% (สุกร ม้า)	98% (สุกร ม้า)	OIE, 2008, Møller et al., 2005 และ Yepez-Mulia et al.1999
		99% (มนุษย์)	91-96%(มนุษย์)	Gómez-Morales et al. 2008
ELISA	น้ำตาล beta-tyvelose	<98% (สุกร) <98% (ม้า)	>99% (สุกร)	Gamble et al.,1997 และ Pozio et al., 2002

### 2.7.2.2 Immunoblot technique

Immunoblot technique หรือ Western blot analysis เป็นเทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาที่มีความจำเพาะสูงเนื่องจากการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลจากนั้นแอนติบอดีจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน การใช้ immunoblot technique สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาชนิดที่ไม่จำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีของผู้ป่วยโรคพยาธิชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดผลบวกลวงเมื่อตรวจวินิจฉัยด้วย ELISA เมื่อใช้โปรตีนสกัดหยาบจากตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิเป็นแอนติเจน (Ruangkunaporn et al., 1994)

Mahannop และคณะ (1994) รายงานการศึกษารูปแบบการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติเจนสกัดหยาบกับซีรัมผู้ป่วยโรค trichinellosis พบโปรตีนแอนติเจนน้ำหนัก 109 kDa เป็นโปรตีนแอนติเจนน้ำหนักโมเลกุลเดียวที่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมผู้ป่วยโรคปรสิตชนิดอื่น ในขณะที่ Robert และคณะ (1996) พบว่าโปรตีนหลายชนิดที่เตรียมจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อที่น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 45-90 kDa สามารถเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันชนิดที่มีความจำเพาะต่อพยาธิได้ ต่อมา Yera และคณะ (2003) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ 43-44 และ 64

kDa สามารถเกิดปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อการติดพยาธิ *T. spiralis* ในมนุษย์ แต่การศึกษาและการตรวจวินิจฉัยด้วย immunoblot technique ในปศุสัตว์ยังคงจำกัดอยู่ในสัตว์บางชนิดเท่านั้น ได้แก่ ม้าและสุกร

จากการศึกษาการทำปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติเจนกับซีรัมของม้าทดลองที่ได้รับ *T. spiralis* พบว่ามีแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 47, 52, 59, 67, 72 และ 105 kDa (Yepez and Mulia, 1999) ในขณะที่ Pozio และคณะ (2002) ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างซีรัมม้าติดพยาธิ *T. spiralis* ในธรรมชาติกับแอนติเจนสกัดหยาบ สารคัดหลั่งจากพยาธิและน้ำตาลสังเคราะห์ tyvelose

จากการศึกษา immunoblot ในสุกร Nöckler และคณะ (1995) พบว่าซีรัมสุกรมีรูปแบบของการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างโปรตีนแอนติเจนและแอนติบอดีที่โปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 44 และ 67 kDa เมื่อใช้โปรตีนที่ได้จากสารคัดหลั่งของพยาธิเป็นแอนติเจน ในขณะที่ Aguilar (2000) พบโปรตีนแอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิที่มีความจำเพาะต่อซีรัมสุกรทดลองที่ได้รับ *T. spiralis* มี 7 น้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ 229, 108, 64, 45, 41, 40 และ 33-38.5 kDa ในขณะที่ Nöckler และคณะ (2009) ที่โปรตีนจากพยาธิสกัดหยาบที่โปรตีนน้ำหนัก 43, 47, 61, 66 และ 102 kDa ตามลำดับ พบว่าโปรตีนขนาด 43 kDa เป็นโปรตีนหลักที่เกิดปฏิกิริยากับซีรัมสุกร ในขณะที่ Gruden-Movsesijan และคณะ (2002) ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนจากสารคัดหลั่งกับแอนติบอดีในซีรัมสุกรด้วยวิธี Lectin blot analysis ซึ่ง lectin มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะสูงในการเกิดปฏิกิริยากับคาโบไฮเดรตจึงนิยมนำมาใช้ในการแยก oligosaccharides และ glycoproteins โดยใช้แอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิในระยะติดต่อพบว่ามีโปรตีน 3 น้ำหนักโมเลกุลที่มีเกิดปฏิกิริยากับซีรัมสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* ได้แก่ 45, 49 และ 53 kDa

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาดังกล่าว immunoblot technique จึงมักนิยมใช้ในกรณีที่ยืนยันต้องการผลที่ได้รับจากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ELISA อันเนื่องมาจากได้รับผลกระทบจากแอนติเจนที่มี phosphocholine เป็นองค์ประกอบ (Robert et al., 1996) สรุปผลการศึกษารวบรวมการตรวจวินิจฉัยการติด *Trichinella* ด้วย immunoblot technique ได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปผลการศึกษารูปแบบการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติเจนจากตัวอ่อน  
พยาธิ ระยะติดต่อกับซีรัมมนุษย์ ม้า และสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis*

ชนิดแอนติเจน	ตัวอย่างซีรัม	Immunoblot pattern (kDa)	อ้างอิง
CE*	สุกร	5 bands; 102, 66, 61, 47,43	Nöckler และคณะ (2009)
ES**	สุกร	2 bands; 67, 44	Nöckler และคณะ (1995)
ES	สุกร	3 bands; 53,49, 45	Gruden-Movsesijan และคณะ(2002)
ES	สุกร	7 bands; 229, 108, 64, 45, 41, 40, 33-38.5	Aguilar และคณะ (2000)
CE	มนุษย์	1band; 109	Mahannop และคณะ (1994)
CE	มนุษย์	3 bands; 90, 55, 47	Robert และคณะ (1996)
CE	มนุษย์	2 bands; 64, 43-44	Yera และคณะ (2003)
ES	มนุษย์	4 bands; ~55, 36, 29,14	Nuñez และคณะ (2000)
CE	ม้า	6 bands; 47, 52, 59, 67, 72, 105	Yepez-Mulia และคณะ (1999)
CE	ม้า	none	Pozio และคณะ (2002)

ตารางที่ 3 (ต่อ) สรุปผลการศึกษารูปแบบการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติเจนจากตัวอ่อนพยาธิ ระยะติดต่อกับซีรัมมนุษย์ ม้า และสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis*

ชนิดแอนติเจน	ตัวอย่างซีรัม	Immunoblot pattern (kDa)	อ้างอิง
ES	ม้า	none	Pozio และคณะ (2002)
tyvelose	ม้า	none	Pozio และคณะ (2002)

หมายเหตุ CE\* หมายถึง crude extract antigen

ES\*\* หมายถึง excretory-secretory antigen

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การศึกษาขนาดและลักษณะรูปร่างพยาธิ *T. spiralis* ระยะติดต่อก

##### 3.1.1 พยาธิ *T. spiralis*

พยาธิ *T. spiralis* ซึ่งเลี้ยงไว้อย่างต่อเนื่องในหนูเมาส์ (*Mus musculus*) ตั้งแต่ปี พ.ศ.2538 จากหน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

##### 3.1.2 สัตว์ทดลอง

หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศเมีย อายุประมาณ 3-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 20-35 g (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ) สำหรับเพิ่มจำนวนตัวอ่อนระยะติดโรค จำนวน 20 ตัว การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการขอจรรยาบรรณสัตว์ทดลองจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใบอนุญาตเลขที่ 0931016 สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลองคือห้อง 0530 ชั้น 5 อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงหนู 4 ตัวต่อ 1 กรง ให้อาหารและน้ำอย่างเพียงพอ (ad libitum)

##### 3.1.3 การตรวจหาพยาธิ *T. spiralis* ในหนูทดลอง

###### 3.1.3.1 วิธีกดเนื้อเยื่อ

การุณยฆาต (euthanize) หนูด้วย Zoletil ขนาด 10 มิลลิกรัม (mg) ต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (kg) โดยฉีดเข้าช่องท้อง เปิดผ่าซากโดยเปิดช่องท้องไปจนถึงส่วนอก แยกอวัยวะภายในออก นำเนื้อเยื่อบริเวณกระบังลม เพื่อตรวจหาตัวอ่อนพยาธิด้วยวิธีกดชิ้นเนื้อที่มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาดประมาณ 5X5 มิลลิเมตร (mm) นำไปวางบนแผ่นสไลด์แก้วแล้วใช้แผ่นสไลด์แก้วอีก 1 แผ่นกดลงไปจนกระทั่งแผ่นเนื้อบางใส นำไปส่องกล้องสเตอริโอตรวจหาตัวอ่อนที่มีแคปซูลหุ้มอยู่ในกล้ามเนื้อลายของหนูทดลองร่วมกับการย้อมสี Semichon' s acetic carmine ตามวิธีของ Meyer และ Olsen (1971)



### 3.1.3.2 การย้อมสี Semichon's acetic carmine (Meyer and Olsen, 1971)

เตรียมสี Semichon's acetic carmine โดยผสม acetic acid ลงในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 ละลายสีให้เข้ากัน นำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีตัวอ่อนพยาธิที่ทำให้คงตัวแล้วใน alcohol-formal-acetic (AFA) ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำเนื้อเยื่อตัวอย่างที่มีพยาธิมาย้อมให้สีติดจนมากเกินพอนานประมาณ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดสีของพยาธิด้วยกล้องสเตอริโอ ล้างสีออกด้วยสารละลาย 3% acid-alcohol นำเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วมาผ่านแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปมากเป็นลำดับที่ละชั้น ดังนี้ แอลกอฮอล์ 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% ตามลำดับครั้งละ 30 นาที ก่อนนำไปแช่ใน xylene และหยดสารละลาย hoyer's solution ปิดทับด้วย โคเวอร์สลิป อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2-3 วัน นำไปส่องศึกษาลักษณะของพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

### 3.1.3.3 การวัดขนาดพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 1

เก็บตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis* ที่เพิ่มจำนวนในหนูเมาส์ โดยย่อยเนื้อเยื่อด้วยน้ำย่อยเทียมตามวิธีของ Dennis และคณะ (1970) ดังที่จะกล่าวถึงในหัวข้อ 3.2.1 และล้างตัวอ่อนให้สะอาดในสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) สุ่มเก็บตัวอ่อนพยาธิจำนวน 30 ตัวอย่างใน 10% formalin เพื่อให้พยาธิคงสภาพ นำไปวัดขนาดความกว้างและความยาวของตัวอ่อน โดยวาดรูปพยาธิจาก camera lucida ก่อนวัดความกว้างและความยาวของตัวอ่อนจากรูปที่วาดได้ เปรียบเทียบอัตราส่วนความยาวที่วัดได้กับความยาวของ stage micrometers คูณด้วยค่าของ magnification index ของเลนส์วัตถุ 10X แล้วบันทึกผล

## 3.2 การย่อยเทียมและการเพิ่มจำนวนพยาธิ *T. spiralis* ในสัตว์ทดลอง

### 3.2.1 การย่อยเทียม

เก็บตัวอ่อนระยะติดต่อจากหนูเมาส์ผ่านการตรวจพิสูจน์พยาธิ *T. spiralis* ย่อยเนื้อเยื่อหนูด้วยน้ำย่อยเทียมตามวิธีของ Dennis และคณะ (1970) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ หลังจากเปิดผ่าช่องอกและนำอวัยวะภายในออก เลาะไขมัน ผนังและพังผืดต่างๆ ตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็กมากที่สุด ก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก เตรียมน้ำย่อยเทียม ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อ 1 g ต่อน้ำย่อยเทียม 10 มิลลิลิตร (ml) บั่นเนื้อเยื่อและน้ำย่อยเทียมด้วย homogenizer จนเนื้อและน้ำย่อยเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผสมตัวอย่างให้เข้ากันทุก 30 นาที กรองผ่าน

กระชอนและผ้าขาวบาง ลงในภาชนะทรงสูงตั้งไว้นานอย่างน้อย 30 นาทีเพื่อให้ตัวอ่อนพยาธิ ตกตะกอน ใช้หลอดดูดพยาธิขึ้นมาล้างในภาชนะทรงสูงที่ใส่ PBS อยู่อย่างน้อย 700 ml แล้วรอก ตกตะกอนอีกอย่างน้อย 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปใช้เพื่อเพิ่มจำนวนตัวอ่อนระยะติดต่อบับ จำนวนตัวอ่อนพยาธิให้ได้ประมาณ 300 ตัวต่อ PBS 1 ml ป้อนให้หนูทดลองต่อไป

### 3.2.2 การเพิ่มจำนวนพยาธิ *T. spiralis* ในหนูเมาส์

งดน้ำและอาหารหนูเป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนป้อนพยาธิจำนวน 300 ตัวต่อหนู 1 ตัว โดยเตรียมพยาธิ 300 ตัวต่อ PBS 1 ml หนูเมาส์ที่ได้รับเชื้อทั้งหมดเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นระยะเวลา 35 วัน (Kapel and Gamble, 2000) จึงทำการอนุญาตเพื่อเก็บตัวอ่อนพยาธิ

## 3.3 การเตรียมแอนติเจนและการวัดปริมาณโปรตีน

### 3.3.1 การเตรียมแอนติเจน

เตรียมแอนติเจนชนิดสกัดหยาบจากตัวอ่อนพยาธิในระยะติดต่อกและกล้ามเนื้อลายของ หนูสะอาด ดังนี้ ขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนชนิดสกัดหยาบดัดแปลงจาก Taweethavonsawat และคณะ (2002) มีดังนี้ ล้างตัวอ่อนพยาธิที่แยกได้จากการย่อยเทียมด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที บดรวมตัวอ่อนพยาธิจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันด้วย glass tissue grinder ละลาย องค์ประกอบของโปรตีนอื่นโดยใช้น้ำกลั่นร่วมกับ protease inhibitor cocktail (Roche, Germany) ที่อุณหภูมิ 4°C นำไปผ่านคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonic and Materials Vibra Cell, USA) 20 KHz/s เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายโปรตีนไปแยกไปแยกสารกลุ่ม crystalloid ออก (dialysis) โดยผ่าน cellulose tubular membrane (CelluSepT2, USA; MW cut off 6-8 kDa) ใน น้ำกลั่นปริมาตรอย่างน้อย 500 เท่าของปริมาณสารละลายที่ได้ เปลี่ยนน้ำกลั่นหลังจาก dialysis ไปแล้ว 3 ชั่วโมง จากนั้น dialysis ต่ออีก 8 ชั่วโมงก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสของสารละลายไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีของ แบริดฟอร์ด (Bradford, 1976) เตรียมแอนติเจนสกัดหยาบจากกล้ามเนื้อลายหนูด้วยวิธีดังกล่าว ข้างต้นเช่นเดียวกัน

### 3.3.2 การวัดปริมาณโปรตีน

เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Germany) ที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5 และ 10  $\mu\text{g/ml}$  (ภาคผนวก ค, ตารางที่ ๘3) เพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน วัดความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) โดยใช้โปรตีนมาตรฐาน 800  $\mu\text{l}$  ต่อ Bradford assay reagent (Bio-Rad, Canada) 200  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน รออย่างน้อย 5 นาทีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (nm) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ทำเช่นเดียวกันกับสารละลายแอนติเจนที่เตรียมได้ คือใช้ปริมาณตัวอย่าง 800  $\mu\text{l}$  ต่อ Bradford assay reagent 200  $\mu\text{l}$  นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟเส้นตรง (linear) คำนวณหาสมการกราฟโปรตีนมาตรฐาน แทนค่าการดูดกลืนแสงเป็น X และความเข้มข้นของโปรตีนเป็น Y จากนั้นแทนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเพื่อคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจน เก็บแอนติเจนที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไประเหยน้ำในตัวอย่างด้วยความเย็น (lyophilized) เก็บแอนติเจนแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 mg / ml

## 3.4 กลุ่มตัวอย่าง

### 3.4.1 ตัวอย่างซีรัม

ลูกสุกรแรกคลอด (Day 0) และสุกรอายุระหว่าง 2 เดือนถึง 3 ปี ในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยประกอบด้วยจังหวัดชลบุรี จังหวัดราชบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์และจังหวัดนครปฐม เก็บตัวอย่างซีรัมในเดือนกันยายน พ.ศ. 2551 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552

### 3.4.2 การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

ลูกสุกรแรกคลอดที่ยังไม่ผ่านการกินนมแม่เหลือง (colostrums) และสุกรอายุตั้งแต่ 2 เดือนจนถึง 3 ปีได้รับการตรวจวินิจฉัยโรคปรสิตภายในด้วยวิธีมาตรฐานทางปรสิตวิทยาได้แก่ การตรวจอุจจาระด้วยการทำให้ไข่พยาธิลอยตัว (floatation technique) และการทำให้ไข่พยาธิตกตะกอน (sedimentation technique) อุจจาระที่นำมาตรวจเป็นอุจจาระใหม่ที่ได้จากการล้างอุจจาระทางทวารหนัก ตรวจวินิจฉัยแยกชนิดปรสิตที่พบได้ในสุกร (ภาคผนวก ง, ตารางที่ ๘4) ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกลักษณะจำเพาะของไข่ ตัวอ่อนในระยะที่ 3 (ตัวอ่อนระยะติดต่อ) ของพยาธิในกลุ่มสตรองกาย ตัวเต็มวัยของพยาธิตลอดจนโอโอซิสต์ ซีสต์และรูปร่างที่

จำเพาะของโปรโตซัวในระยะต่างๆ ตรวจวินิจฉัยโรคปรสิตที่ หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 4)

กลุ่ม 1 ซึ่มสุกรปลอดโรคปรสิตภายในและพยาธิ *T. spiralis*

กลุ่ม 2 ซึ่มสุกรที่ตรวจไม่พบปรสิตภายในจากฟาร์ม

กลุ่ม 3 ซึ่มสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์)

กลุ่ม 4 ซึ่มสุกรที่ตรวจพบด้วยปรสิตภายในชนิดอื่น

สุกรในกลุ่ม 1 เป็นสุกรแรกคลอดที่ยังไม่ผ่านการกินนมแม่เหลืองและกลุ่ม 2-4 เป็นสุกรที่มีอายุระหว่าง 2 เดือนถึง 3 ปี สำหรับสุกรในกลุ่ม 3 เป็นสุกรทดลองอายุ 2.5 เดือนที่ได้รับการป้อนพยาธิ *T. spiralis* ระยะติดต่อกันจำนวน 1,000-2,000 ตัวต่อสุกรหนึ่งตัวและเก็บซึ่มหลังจากสุกรได้รับพยาธิ *T. spiralis* ไปแล้วนาน 20 สัปดาห์

**ตารางที่ 4** จำนวนตัวอย่างซึ่มสุกรในแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	จำนวน (ตัวอย่าง)
1	7
2	21
3	5
4	34
รวม	67

### 3.4.3 การตรวจวินิจฉัยปรสิตภายในและการเก็บเลือด

#### 3.4.3.1 การวินิจฉัยปรสิตภายใน

เก็บตัวอย่างโดยการสวมถุงมือล้างอุจจาระทางทวารหนัก เก็บอุจจาระปริมาณไม่น้อยกว่า 30 g ต่อ ตัวอย่าง อุจจาระต้องไม่มีปัสสาวะ น้ำ ดินหรือสิ่งเจือปนอื่นผสม นำตัวอย่างอุจจาระตรวจด้วยวิธีมาตรฐานทางปรสิตวิทยา ดังนี้

##### 3.4.3.1.2 วิธีการทำให้ไข่พยาธิลอยตัว

ตัวอย่างอุจจาระ 5 g ผสมกับสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัวให้เข้ากันกรองผ่านกระชอนไนล่อนบอกลพลาสติกใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร (cm) จนสารละลายปริมหบกระชอน ปิดด้านบนกระชอนพลาสติกด้วยโคเวอร์สลิปขนาด 22 x 22 mm ประมาณ 5 นาที แล้วนำโคเวอร์สลิปไปวางบนแผ่นกระจกแก้ว ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์วัตถุ 10x และ 40x ตามลำดับ

##### 3.4.3.1.2 วิธีการทำให้ไข่พยาธิตกตะกอน

ผสมอุจจาระ 10 g ละลายในน้ำหรือ normal saline ปริมาณ 500 ml กรองผ่านผ้าขาวบางลงในกรวยแก้วทรงสูงตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนนานอย่างน้อย 15 นาที เทน้ำส่วนบนประมาณ 2 ใน 3 ทิ้ง แล้วเติมน้ำหรือ normal saline ลงไปใหม่เพื่อล้างตะกอนทิ้งไว้อีก 15 นาที ทำเช่นนี้ประมาณ 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าน้ำส่วนบนจะใส ครั้งสุดท้ายให้เทน้ำออกให้เพียงเล็กน้อย ใช้ หลอดดูด (dropper) ดูดตะกอนมาหยดบนสไลด์ ปิดด้วยโคเวอร์สลิปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อตรวจวินิจฉัยแยกประเภทการติดเชื้อปรสิตภายใน

##### 3.4.3.1.3 การเพาะตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) พยาธิสตรองกาย

กรณีพบไข่พยาธิในกลุ่มสตรองกายนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป นำอุจจาระของสุกรแต่ละตัวที่ตรวจพบไข่พยาธิสตรองกายไปเพาะเลี้ยงตัวอ่อนจนกระทั่งเป็นระยะติดต่อกับ (L3) เก็บ L3 ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 - 10 วัน นำตัวอ่อนระยะติดต่อกับ ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตัวอ่อนลงใน 10% formalin ก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะโครงสร้างของตัวอ่อนและวัดขนาดเพื่อจำแนกชนิดของพยาธิต่อไป บันทึกผลการตรวจวินิจฉัย จำนวนและชนิดของตัวอย่างซีรัมในกลุ่มที่ 4 แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนตัวอย่างซีรัมสุกรกลุ่ม 4 แยกตามชนิดการติดเชื้อปรสิตภายใน

การติดเชื้อหรือปรสิตภายในชนิดอื่น	จำนวนตัวอย่าง (ตัวอย่าง)
<i>Ascaris suum</i> (As)	5
<i>Trichuris suis</i> (Tr)	2
Strongyle infection (Si)	3
Coccidia (Coc)	10
<i>Balantidium coli</i> (Bc)	2
Si + Coc	8
As + Tr	1
As + Si + Coc	1
Si + Bc + Coc	2
รวม	34

#### 3.4.3.2 การเก็บเลือด

สุกรจำนวน 67 ตัวที่มีคุณสมบัติที่ได้กล่าวมาแล้วในเบื้องต้น เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณคอ (jugular vein) ปริมาณอย่างน้อย 1 ml ต่อตัว นำเลือดสุกรที่จะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกซีรัมที่ 1,500 x g อุณหภูมิ 4°C เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

### 3.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนจากแอนติเจนสกัดหยาบ

#### 3.5.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมโปรตีนแอนติเจนกับ Sample buffer (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วนแอนติเจน 1 ส่วน บัฟเฟอร์ 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนตัวอย่างที่ 65°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงวิเคราะห์แยกสารตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) โดยใช้ Bio-Rad Mini Protean Slab Cell ขนาดเจลหนา 0.75 mm นำแอนติเจนที่เตรียมได้มาผ่านกระแสไฟฟ้าที่และ 4% stacking gel และ 12 % separating gel (ภาคผนวก ข, ตารางที่ ผ1-ผ2) ดัดแปลงจากขั้นตอนของ Laemmli (1970) ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ (Volt, V) เป็นเวลา 15 นาทีหรือจนกระทั่งโปรตีนมาตรฐานเคลื่อนมาจนถึงบริเวณของ separating gel ปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 150 V นาน 45 นาทีนำเจลที่ผ่านกระแสไฟฟ้าแล้วไปย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 (Bio-rad, Canada) และสี Silver (Bio-rad, Canada) เปรียบเทียบขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนที่ได้กับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Fermentas, Canada)

#### 3.5.2 การย้อมสี Coomassie blue G-250

แช่เจลที่ผ่านการทำ SDS-PAGE ในข้อ 3.5.1 ลงในสี Coomassie blue G-250 บนเครื่อง rotary shaker (Nahita, Spain) เป็นเวลา 45 นาที ล้างออกด้วย destain solution (ภาคผนวก ก) จนกว่าเจลจะใสและเห็นแถบโปรตีนที่ย้อมชัดเจน

#### 3.5.3 การย้อมสี silver

แช่เจลที่ผ่านการทำ SDS-PAGE ในข้อ 3.5.1 แล้วลงใน fixative เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ใน oxidizer เป็นเวลา 5 นาที ล้าง deionized water 3 ครั้งใช้ ครั้งละ 5 นาที จากนั้นแช่เจลใน silver reagent ล้างออกด้วยวิธีให้น้ำไหลผ่าน 20 วินาที แช่เจลลงใน developer ประมาณ 30 วินาที จนกระทั่งเห็นสีน้ำตาลหรือ smoky precipitate จึงเปลี่ยน developer ทำซ้ำหากยังเห็นตะกอนสีหรือ smoky precipitate ปรากฏขึ้น เปลี่ยน developer ทุก 5 นาที เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% acetic acid เป็นเวลา 15 นาที

### 3.5.4 การแปลผลน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

หลังจากย้อมสี Coomassie blue G-250 และ Silver วัดระยะทางที่โปรตีนมาตรฐาน เคลื่อน โดยวัดจากขอบ separating gel มาจนถึงส่วนกลางของแต่ละแถบโปรตีน (Migration distance) แล้วนำมาหารด้วยระยะทางของ tracking dye เพื่อให้ได้ค่า relative motility ของโปรตีน ดังสมการ (Hames, 1990)

$$\text{relative motility} = \frac{\text{Migration distance}}{\text{tracking dye distance}}$$

จากนั้นทำ semilogarithmic plot ของ Log ของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐานกับค่า relative motility ของโปรตีน อ่านค่าของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนของพยาธิจากกราฟ

### 3.6 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย immunoblot technique

หลังจากทำ SDS-PAGE โปรตีนแอนติเจนสกัดหายาบจากตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis* และแอนติเจนสกัดหายาบจากเนื้อหนูสะอาด ในข้อ 3.5.1 แขนงเจลในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4°C แขนงกระดาษกรอง กระดาษไนโตรเซลลูโลส (ขนาดกว้าง 6.2 cm ยาว 8.9 cm) ลงใน transfer buffer ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ก่อนนำไปประกอบกับเครื่อง electrophoresis apparatus ให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 V เป็นเวลา 90 นาที เพื่อผ่านโปรตีนแอนติเจนลงบน กระดาษไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, Canada) ตัดกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่แห้งสนิทขนาดกว้าง 0.3 cm ยาว 6.2 cm (คำนวณให้มีปริมาณโปรตีน 10  $\mu\text{g}$  ต่อ strip) แขนงใน blocking buffer (3% BSA 0.05% PBST) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางตัวอย่างซีรัมสุกรด้วย washing buffer (1.5 %BSA 0.05 % PBST) ใช้ซีรัม 5  $\mu\text{l}$  ต่อ washing buffer 1,000  $\mu\text{l}$  (อัตราส่วน 1:200) เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ goat anti-porcine IgG (H+L) conjugated horseradish peroxidase (Southern Biotech, USA ) อัตราส่วน 1: 1,000 แล้วล้างออกด้วย washing buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที โดยมี 2,6 dichlorophenol indophenol (Sigma, Germany) เป็นสารตั้งต้นในการทำให้เกิดสี รอกการเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที หรือจนกว่าจะมีสีปรากฏจึงหยุดปฏิกิริยาและล้างออกด้วยน้ำกลั่น



นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยาแล้วกับซีรัมสุกรที่มีการติดพยาธิ *T. spiralis* และซีรัมสุกรที่ติดโรคพยาธิชนิดอื่นที่พบในประเทศไทยมาเปรียบเทียบเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อไป การเตรียมสารเคมีของ immunoblot technique แสดงในภาคผนวก ก สำหรับแอนติเจนสกัดหยาบจากเนื้อหมูจะนำมาศึกษาการทำปฏิกิริยากับซีรัมสุกรในกลุ่ม 3 ต่อไป



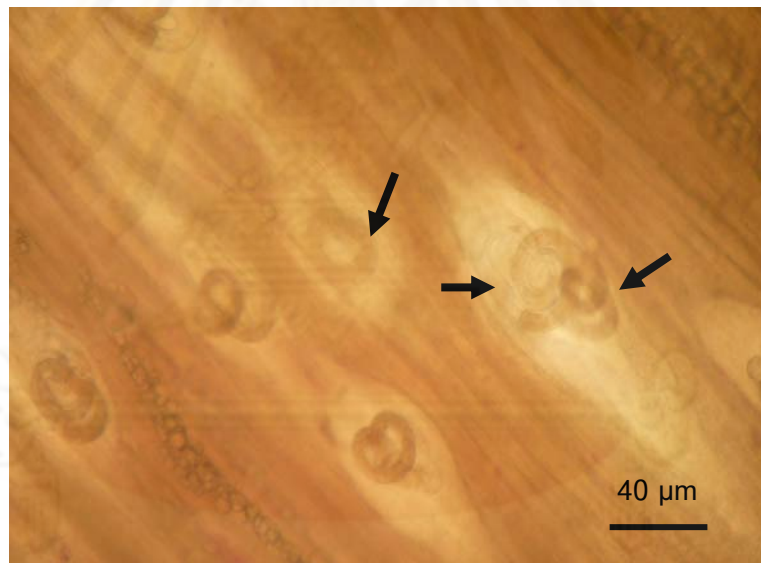
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

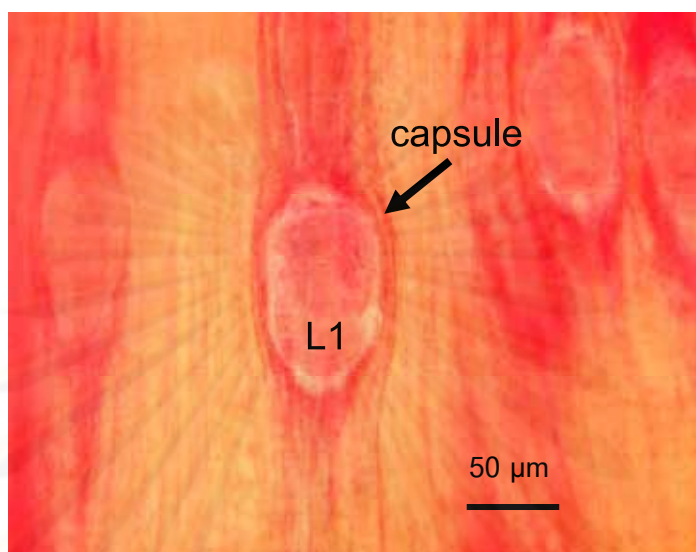
#### 4.1 ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของพยาธิในระยะติดต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

จากการตรวจวินิจฉัย compression method ของกล้ามเนื้อกระบังลมหนูทดลองในวันที่ 35 หลังจากที่ยกพยาธิ *T. spiralis* พบตัวอ่อนพยาธิในระยะติดต่อดอยู่ในแคปซูลในเซลล์กล้ามเนื้อลายเป็นจำนวนมาก เมื่อส่องตรวจดูด้วยกล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง พบพยาธิระยะติดต่อดอยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อลาย 1-2 ตัวต่อ nurse cell (รูปที่ 16)



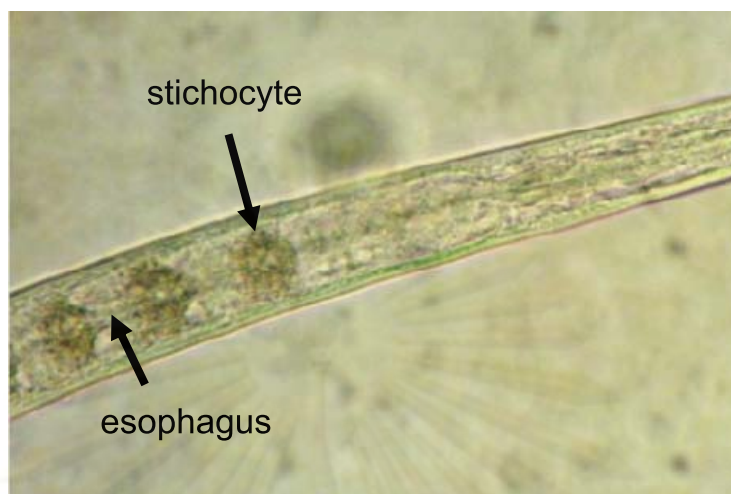
รูปที่ 16 ตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อดในกล้ามเนื้อกระบังลมหนูทดลอง (ลูกศรชี้) เมื่อตรวจด้วยวิธีกดเนื้อเยื่อและส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

นอกจากนี้ยังพบตัวอ่อนทั้งในกล้ามเนื้อลายเกือบทุกส่วน เช่น กล้ามเนื้อกระบังลม ลิ้น แก้ม กล้ามเนื้อทรวงอกและกล้ามเนื้อท้อง จากการย้อมสี Semichon's acetic carmine เพื่อศึกษาโครงสร้างทั่วไปของพยาธิและแคปซูลพบลักษณะแคปซูลของพยาธิเป็นรูปร่างรีตามความยาวของกล้ามเนื้อ คอลลาเจน (collagen) ที่เป็นโปรตีนองค์ประกอบสำคัญของแคปซูลติดสีแดงอมส้มชัดเจน ในขณะที่เซลล์กล้ามเนื้อลายและตัวอ่อนพยาธิจะติดสีอ่อนกว่า (รูปที่ 17)



**รูปที่ 17** ตัวอ่อนพยาธิระยะติดต่อก (L1) ในแคปซูล (ลูกศรชี้) ในกล้ามเนื้อกระบังลมหนูทดลอง  
เห็นได้ชัดเจนเมื่อย้อมสี Semichon's acetic carmine

เมื่อนำเนื้อหนูไปย่อยเพื่อเก็บตัวอ่อนระยะติดต่อกและทำให้คงสภาพใน 10% formalin สุ่มเก็บตัวอ่อนพยาธิจำนวน 30 ตัว พบว่ามีความยาวโดยเฉลี่ย  $0.73 \pm 0.046$  mm (0.60-0.80 mm) กว้าง  $0.02 \pm 0.004$  mm (0.019-0.030mm) (ภาคผนวก จ, ตารางที่ ๘6) มีหลอดอาหารแบบ stichosome เห็นเซลล์ stichocytes ล้อมรอบหลอดอาหาร (esophagus) ชัดเจน (รูปที่ 18)

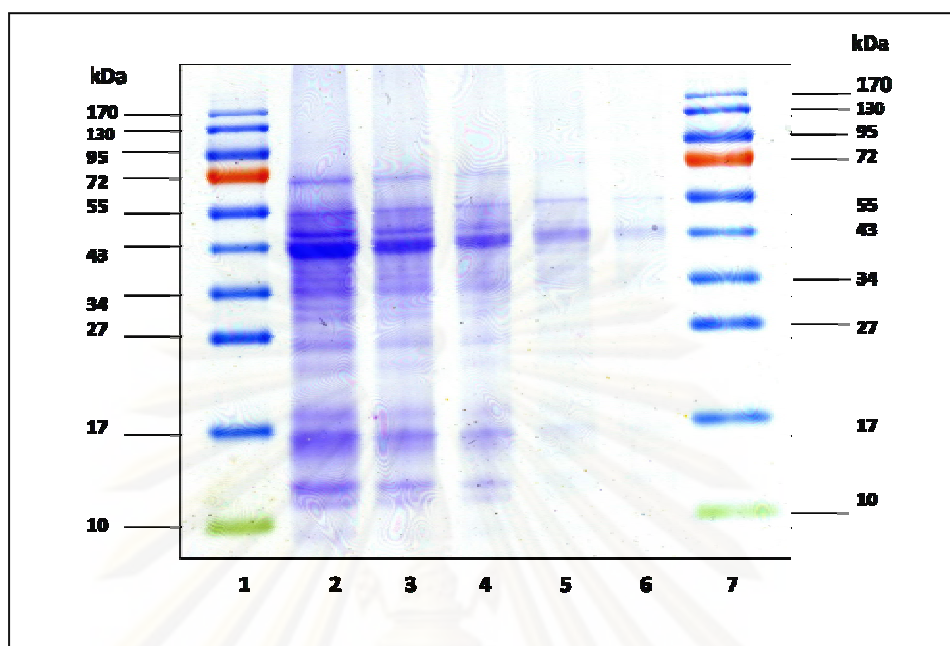


รูปที่ 18 ตัวอ่อนพยาธิ *T. spiralis* ระยะติดต่อแสดงหลอดอาหารชนิด stichosome (ลูกศรชี้)

#### 4.2 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนจากแอนติเจนสกัดหยาบด้วย SDS-PAGE

##### 4.2.1 ผลการย้อมสี Coomassie blue G-250

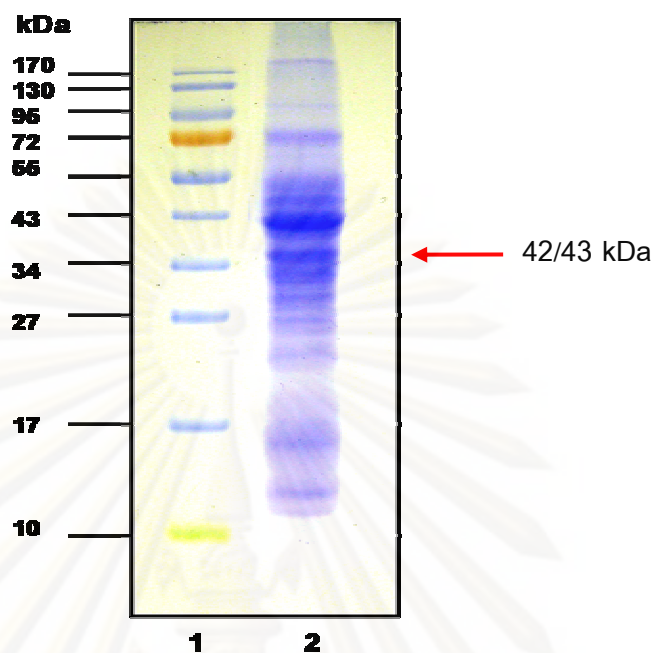
ผลการแยกแอนติเจนสกัดหยาบของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis* ที่ปริมาณ 10.0, 7.5, 6.0, 4.5 และ 3.0  $\mu\text{g}$  จากมากไปน้อยตามลำดับ พบว่าที่ปริมาณโปรตีนอย่างน้อย 6  $\mu\text{g}$  เห็นแถบโปรตีนที่ย้อมติดสีชัดเจน (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหายาจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อเมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 ความเข้มข้นเจลที่ 12% ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ต่างกัน

แถวที่ 1 = น้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน                      แถวที่ 2 = โปรตีนชนิดสกัดหายา 10.0 µg  
 แถวที่ 3 = โปรตีนชนิดสกัดหายา 7.5 µg                      แถวที่ 4 = โปรตีนชนิดสกัดหายา 6.0 µg  
 แถวที่ 5 = โปรตีนชนิดสกัดหายา 4.5 µg                      แถวที่ 6 = โปรตีนชนิดสกัดหายา 3.0 µg  
 แถวที่ 7 = น้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน

และเมื่อวิเคราะห์แอนติเจนสกัดหายาของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis* ปริมาณ 10.0 µg เมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 พบว่ามีโปรตีนแอนติเจนหลายน้ำหนักโมเลกุล ตั้งแต่ 210/215 ถึง 11 kDa ที่ย้อมติดสีชัดเจนอย่างน้อย 18 น้ำหนักโมเลกุล ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210/215, 101/105, 72/74, 67/68, 55/57, 53, 48/49, 42/43, 41, 36/37, 32, 31, 28, 25, 22, 16, 12 และ 11 kDa ตามลำดับ โดยมีสายโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุล 42/43 kDa เป็นโพลีเปปไทด์ชนิดที่พบปริมาณมากที่สุด (รูปที่ 20)

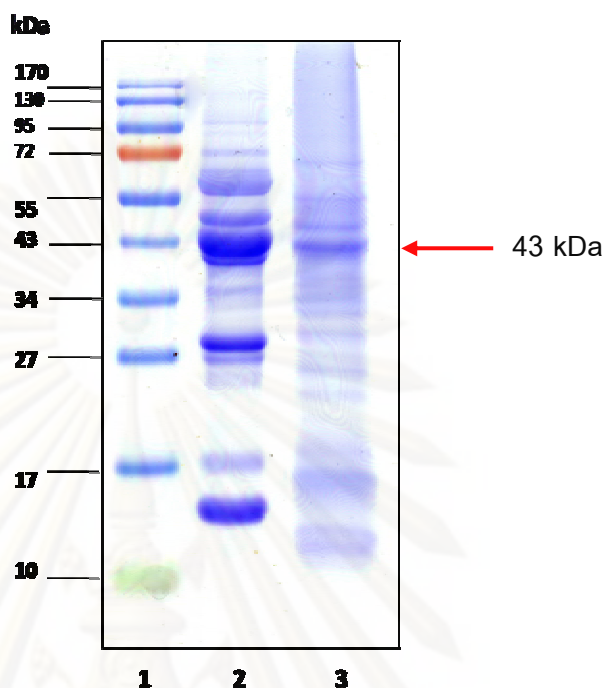


รูปที่ 20 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหายาจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อเมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 ความเข้มข้นเจลที่ 12%

แถวที่ 1 = น้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 = โปรตีนชนิดสกัดหายาพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อ

เมื่อนำเนื้อหุ้มาผ่านการสกัดโปรตีนอย่างหายาพบว่าเมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 เพื่อนำมาเปรียบเทียบยืนยันความบริสุทธิ์ของโปรตีนชนิดสกัดหายาจากพยาธิระยะติดต่อกว่าไม่มีโปรตีนจากเนื้อหุ้มาเจือปน พบว่าโปรตีนสกัดหายาจากเนื้อหุ้มีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 101 ถึง 16 kDa แอนติเจนชนิดสกัดหายามีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลที่ชัดเจนทั้งหมดอย่างน้อย 11 แถบ ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุล 101, 69, 60, 48, 43, 39, 35, 28, 27, 17 และ 14 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 21) โดยมีโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 43 kDa เป็นน้ำหนักโมเลกุลหลักที่มีปริมาณมากที่สุด



รูปที่ 21 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหายาจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อเมื่อย้อมด้วยสี Coomassie blue G-250 เปรียบเทียบกับโปรตีนสกัดหายาจากเนื้อหนูความเข้มข้น เจลที่ 12%

แถวที่ 1 = น้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 = โปรตีนชนิดสกัดหายาจากเนื้อหนู

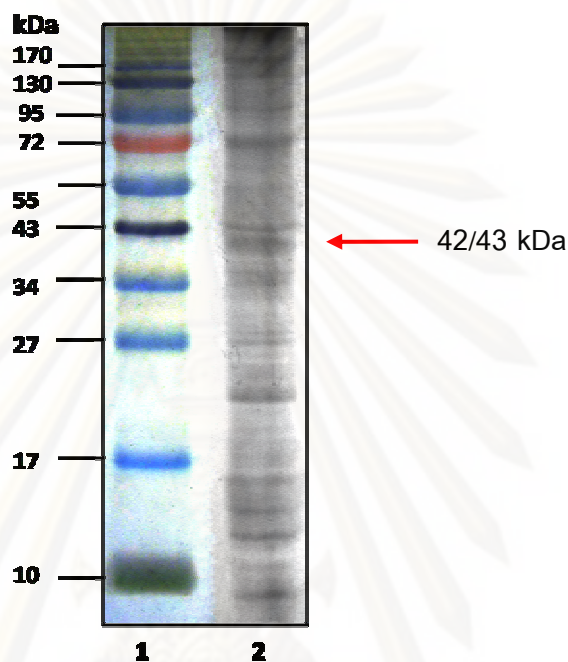
แถวที่ 3 = แอนติเจนชนิดสกัดหายาพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อ

พบว่าโปรตีนจากเนื้อหนูที่น้ำหนักโมเลกุล 101, 48, 43, 28 kDa มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันกับน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนสกัดหายาของพยาธิ *T. spiralis*

#### 4.2.2 ผลการย้อมสี Silver

ผลการแยกแอนติเจนสกัดหายาของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis* ที่ความเข้มข้น 0.25  $\mu\text{g}$  เมื่อย้อมด้วยสี silver พบว่ามีโพลีเปปไทด์หลายน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 210/215 ถึง 8/9 kDa แอนติเจนชนิดสกัดหายามีสายโพลีเปปไทด์ที่ติดสีชัดเจนทั้งหมดอย่างน้อย 28 ชนิด ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210/215, 153, 101/105, 92, 72/74, 67/68,

61/62, 55/57, 53, 48/49, 42/43, 41, 36/37, 34, 32/33, 31, 28, 26/27, 25, 24, 22, 17/18, 19, 15/16, 14, 12, 11 และ 8/9 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 22 )



รูปที่ 22 ผลการวิเคราะห์โปรตีนสกัดหายาบจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อเมื่อย้อมด้วยสี silver ความเข้มข้นเจลที่ 12%

แถวที่ 1 = น้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน

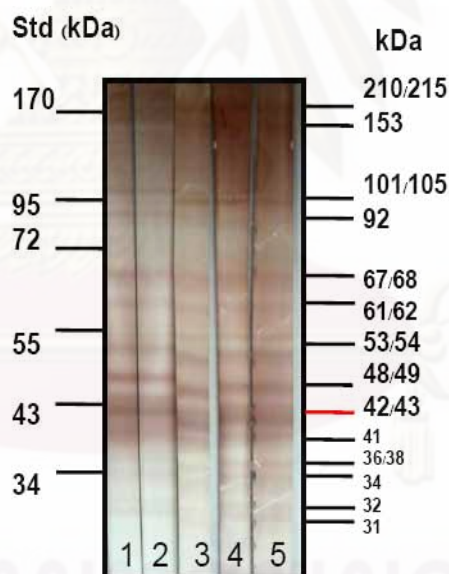
แถวที่ 2 = โปรตีนชนิดสกัดหายาบพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อที่ 0.25  $\mu$ g

#### 4.3 ผลการวิเคราะห์การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีสุกรกลุ่ม 3 กับแอนติเจนสกัดหายาบด้วย immunoblot technique

แอนติเจนชนิดสกัดหายาบที่เตรียมได้จากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เตรียมจากพยาธิ *T. spiralis* จำนวนประมาณ 5,000 ตัวต่อการเตรียม 1 ครั้ง (ความสูงจาก effendorf ประมาณ 0.5 cm) แอนติเจนที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้จะผ่านการ dialysis และวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้พบความเข้มข้นโปรตีนโดยเฉลี่ยเป็น 0.35 mg/ml (0.07  $\mu$ g/ infective stage larva) เมื่อวัดโปรตีนด้วยวิธีของเบรดฟอร์ดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (nm) ปรับความเข้มข้นของแอนติเจนเป็น 1 mg/ml โดยการนำไปประเหย



แห้งและเจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่ปริมาณโปรตีน 10 µg ต่อ strip แอนติบอดีของสุกรแต่ละตัวสามารถเกิดปฏิกิริยาที่โปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ผลการศึกษาโปรตีนแอนติเจนของพยาธิในระยะติดต่อด้วย immunoblot technique พบว่ามีโปรตีนอย่างน้อย 14 น้ำหนักโมเลกุลทำปฏิกิริยากับซีรัมสุกรที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* ทั้ง 5 ตัวอย่าง (รูปที่ 23) ได้แก่ โปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 210/215, 153, 101/105, 92, 67/68, 61/62, 53/54, 48/49, 42/43, 41, 36/38, 34, 32 และ 31 kDa ตามลำดับ โดยมีโปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 48/49 และ 42/43 kDa เป็นน้ำหนักโมเลกุลหลักที่เกิดปฏิกิริยาได้ชัดเจนกับ anti-*Trichinella* antibodies จากการวิเคราะห์ด้วย immunoblot technique พบว่า มีเพียงซีรัมสุกรทดลองตัวที่ 2 ที่ทำปฏิกิริยากับโพลีเปปไทด์น้ำหนักโมเลกุล 19 kDa และซีรัมสุกรทดลองตัวที่ 2 และ 4 ทำปฏิกิริยากับโพลีเปปไทด์น้ำหนักโมเลกุล 14 kDa (ตารางที่ 8) และผลการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีสุกรกลุ่ม 3 กับแอนติเจนสกัดหยาบจากเนื้อหนูด้วย immunoblot technique พบว่าโพลีเปปไทด์จากเนื้อหนูสะอาดไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากซีรัมสุกรกลุ่ม 3



รูปที่ 23 Immunoblot pattern ของสุกรกลุ่ม 3 ที่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนแอนติเจนสกัดหยาบของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis* แถว 1 ถึง 5 เป็นตัวอย่างซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* ตัวที่ 1 ถึง 5 ตามลำดับ

#### 4.4 ผลการวิเคราะห์ทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีสุกรกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 กับแอนติเจนสกัดหยาบด้วย immunoblot technique

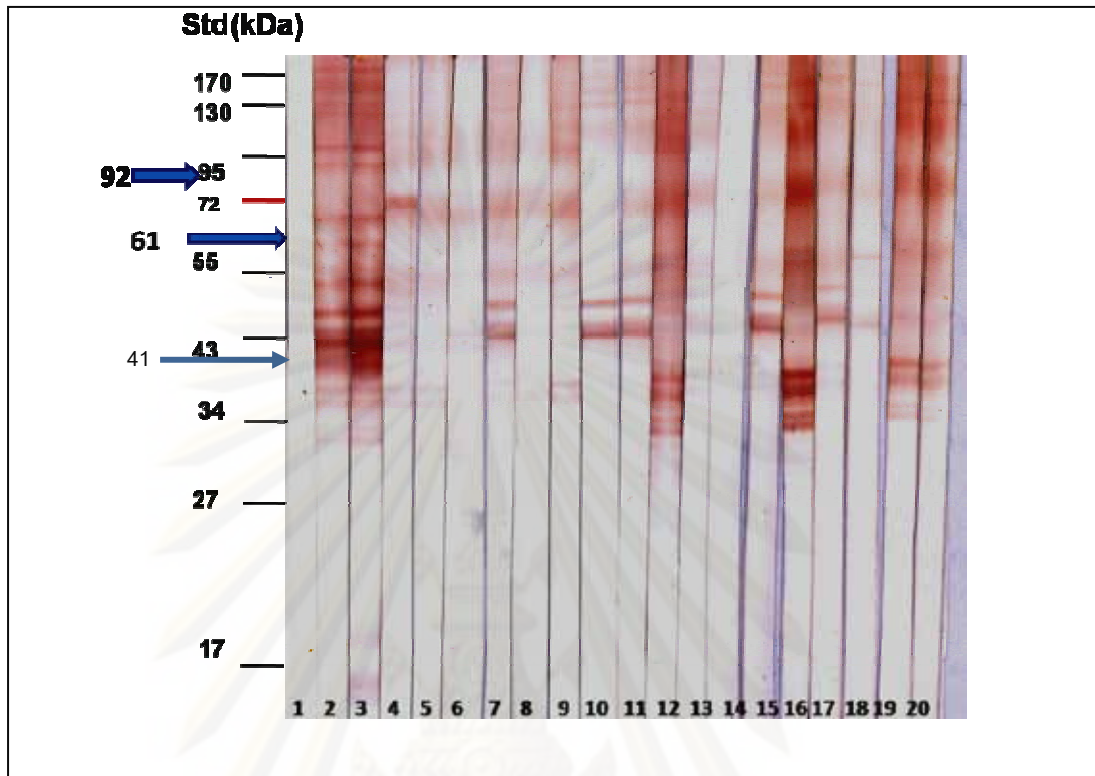
จากโปรตีนแอนติเจน 14 น้ำหนักโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีสุกรติด *T. spiralis* เมื่อนำมาศึกษาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรในแต่ละกลุ่ม จากการเปรียบเทียบรูปแบบของ immunoblot profile ของแอนติเจนชนิดสกัดหยาบจากพยาธิ *T. spiralis* กับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1 แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 2 และในกลุ่ม 4

จาก immunoblot profiles โปรตีนแอนติเจนชนิดสกัดหยาบจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อพบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 2 ที่ติดพยาธิ *A. suum*, *T. suis*, *Strongyle*, *Coccidia* และ *B. coli* จากการเพาะเลี้ยงพยาธิสตรองกายจนเป็นตัวอ่อนในระยะติดต่อ (ภาคผนวก ง, ตารางที่ ๕) พบว่าตัวอ่อนพยาธิสตรองกายที่เพาะเลี้ยงได้เป็นพยาธิ *Oesophagostomum dentatum* และ *Hyostrongylus rubidus* (ภาคผนวก ง, รูปที่ ๕ 1-4) และไม่สามารถระบุชนิดพยาธิ สตรองกายได้ในบางตัวอย่างเนื่องจากไม่พบตัวอ่อนจากการเพาะเลี้ยง

จากการวิเคราะห์ immunoblot profiles พบว่าสายโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุล 92, 61/62 และ 41 kDa เป็นโปรตีนแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมสุกรในกลุ่ม 3 รูปภาพตัวแทนการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละกลุ่มตัวอย่างดังรูปที่ 24 และที่ตาราง 6 และสรุปผลการเปรียบเทียบโปรตีนแอนติเจนที่ย้อมสีได้กับ immunoblot pattern แสดงในภาคผนวก ฉ ตารางที่ ๗ ความถี่ (frequency) ของโปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* เมื่อวิเคราะห์ด้วย immunoblot technique พบว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 92, 61/62 และ 41 kDa มีความจำเพาะต่อการติดพยาธิ *T. spiralis* เป็น 100 % (n = 5) ทั้ง 3 น้ำหนักโมเลกุล

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 Immunoblot pattern ของสุกรกลุ่ม 2, 3 และ 4 ที่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนแอนติเจนสกัด  
หยาบของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis*

- |             |   |   |           |   |                                     |
|-------------|---|---|-----------|---|-------------------------------------|
| แถว 1       | = | น้ำกลั่น  | แถว 2 - 3 | = | <i>T. spiralis</i> infection        |
| แถว 4 - 7   | = | Not found   | แถว 8 - 9 | = | <i>A. suum</i> infection            |
| แถว 10 - 11 | = | <i>B. coli</i> infection                            | แถว 12-15 | = | Coccidiosis                         |
| แถว 16 - 18 | = | Strongyle infection                                 | แถว 19    | = | Coccidiosis และ Strongyle infection |
| แถว 20      | = | Coccidiosis, <i>B. coli</i> และ Strongyle infection |           |   |                                     |

ตารางที่ 6 สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่นำหนักโมเลกุลต่างกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)													
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31
1	1-7	Day 0 piglet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	8-9	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2***	-	-	-
	10-11	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-
	12	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	-
	13-14	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ) สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่นำหนักโมเลกุลต่างกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)														
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31	
2	15	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1
	16	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
	17-18	Parasite-free	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
	19-20	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
	21	Parasite-free	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ) สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่นำหนักโมเลกุลต่างกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)														
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31	
2	22	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1
	23	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-
	24-28	Parasite-free	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	29-33	<i>T. spiralis</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4	34	<i>A. suis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1

ตารางที่ 6 (ต่อ) สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)													
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31
4	35	<i>A. suum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-
	36-38	<i>A. suum</i>	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	3	3	3	3
	39-40	<i>T. suis</i>	-	-	-	-	-	-	2	2	2	-	2	2	2	2
	41	Strongyle Infection	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
	42-43	<i>O. dentatum</i>	-	2	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ) สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่นำหนักโมเลกุลต่างกักับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)														
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31	
4	44-47	Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4
	48-49	Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2
	50	Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-
	51	Coccidia	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	52-53	Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-



ตารางที่ 6 (ต่อ) สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่นำหนักโมเลกุลต่างกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)													
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31
4	54	<i>B. coli</i>	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1
	55	<i>B. coli</i>	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
	56	Strongyle Infection + Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	57-58	Strongyle Infection + Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2	-	-	-
	59	Strongyle Infection + Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1

ตารางที่ 6 (ต่อ) สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่นำหนักโมเลกุลต่างกับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)													
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31
4	60	Strongyle Infection + Coccidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	61	<i>O. dentatum</i> + Coccidia	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	62	<i>O. dentatum</i> + Coccidia	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	1	1
	63	<i>O. dentatum</i> + Coccidia	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-
	64	<i>A. suum</i> + Strongyle Infection + Coccidia	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ) สรุปการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกักับซีรัมสุกรในกลุ่ม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย immunoblot technique

กลุ่ม	ลำดับที่	การตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต/ ชนิดของซีรัม	Predominant bands (kDa)													
			210/215	153	101/105	92	67/68	61/62	53/54	48/49	42/43	41	36/38	34	32	31
4	65	<i>A. suum</i> + <i>T. suis</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	66-67	<i>H. rubidus</i> + <i>Coccidia</i> + <i>B. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2

หมายเหตุ \*\*\*แสดงจำนวนตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกักับซีรัมสุกรในแต่ละกลุ่ม

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาลักษณะรูปร่างของพยาธิ *T. spiralis* ระยะติดต่อนอกกล้ามเนื้อของโฮสต์กักเก็บมีความสำคัญต่อการตรวจคัดกรองโรคที่โรงฆ่าสัตว์และเฝ้าระวังโรคในสัตว์ป่าที่เป็นแหล่งแพร่ระบาดของโรค การตรวจหาตัวอ่อนพยาธิโดยตรงในกล้ามเนื้อกลายเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความจำเพาะสูง แต่ต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจหาพยาธิซึ่งมีขนาดเล็กและอาศัยอยู่ในแคปซูล ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของพยาธิในเคลด 2 ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดพยาธิในสกุล *Trichinella* ได้จากการศึกษาทางกายรูปวิทยาเพียงอย่างเดียว การศึกษาลักษณะทางกายรูปวิทยาจึงเป็นเพียงเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ประกอบการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาร่วมกับการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของพยาธิ เช่นความสามารถในการเพิ่มจำนวนในหนูทดลอง เพื่อใช้ในการแยกชนิดของพยาธิ การศึกษาในครั้งนี้ผู้ศึกษาได้วัดขนาดความกว้างและความยาวของตัวอ่อนพยาธิ *T. spiralis* ที่เพิ่มจำนวนไว้อย่างต่อเนื่องในหนูทดลองตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 ในห้องปฏิบัติการหน่วยปรสิต ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พยาธิในระยะติดต่อที่ผ่านการย่อยเย็บและทำให้คงสภาพในสารละลาย 10 % ฟอรัมาลินแล้วมีความยาวโดยเฉลี่ย  $0.73 \pm 0.046$  mm (0.60-0.80 mm) กว้าง  $0.02 \pm 0.004$  mm (0.019-0.030 mm) สอดคล้องกับการศึกษาของ Pozio และคณะในปี 1992 ที่วัดขนาดของพยาธิในระยะติดต่อพบว่ามีค่าความยาวโดยเฉลี่ย 0.61–1.0 mm ขนาดของลำตัวกว้าง 0.026-0.040 mm แต่จากการศึกษาของ Nöckler และคณะ (2006) ที่แยกชนิดของพยาธิ *T. spiralis* และ *T. pseudospiralis* ด้วยขนาดของพยาธิและใช้เทคนิค PCR พบว่า *T. spiralis* มีความยาวโดยเฉลี่ย 1.10 mm ซึ่งมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าที่วัดได้ในครั้งนี้เล็กน้อย โดย Pozio และคณะ (2002) อธิบายผลของการลดขนาดของพยาธิที่เกิดขึ้นจากการผ่านเชื้อเข้าหนูทดลองในห้องปฏิบัติการหลายครั้งอาจมีผลทำให้ขนาดของพยาธิลดลง จึงสรุปได้ว่ากายรูปวิทยาที่ปรากฏสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิ *Trichinella* ได้ในเบื้องต้นแต่การตรวจวินิจฉัยเพื่อแยกชนิดของพยาธิในสกุล *Trichinella* ยังมีโอกาสผิดพลาดได้จึงควรทำควบคู่ไปกับเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงในกรณีที่ต้องการตรวจแยกชนิดของพยาธิในสกุล *Trichinella* เช่นการใช้เทคนิค PCR (Rombout et al., 2001) เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยเฝ้าระวังการติดพยาธิ *T. spiralis* ในสุกรปัจจุบันนิยมใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยามากขึ้นเนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว มีความไวสูงและสามารถเก็บตัวอย่างมาเพื่อตรวจวินิจฉัยได้ง่ายกว่าการตรวจวินิจฉัยหาตัวอ่อนพยาธิในระยะติดต่อโดยตรง แต่ข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา คือ ความไวและความจำเพาะของการตรวจด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดและคุณภาพของแอนติเจน (OIE, 2008) แอนติเจนที่นิยมศึกษาในปัจจุบัน มีอยู่ 3 ชนิด คือ แอนติเจนชนิดสกัดหยาบ แอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิในระยะติดต่อและแอนติเจนจากน้ำตาลสังเคราะห์ tyvelose เนื่องจากพบว่าแอนติเจนจากพยาธิในระยะติดต่อมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดีและเป็นระยะที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นระยะติดต่อโดยพยาธิสามารถดำรงชีวิตอยู่ในโฮสต์กักเก็บได้นานโดยไม่แสดงอาการทางคลินิก โปรตีนแอนติเจนของพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มที่พบว่ามี ความจำเพาะต่อพยาธิในวงศ์ Trichuroidea คือ TSL-1 เป็นแอนติเจนกลุ่มที่น้ำตาล tyvelose เป็น carbohydrate epitope ร่วมกัน แอนติเจนกลุ่มนี้ถูกเก็บสะสมอยู่ที่แกรนูลของเซลล์ stichocyte พบได้มากในสารคัดหลั่งจากพยาธิ (Appleton et al., 1991) แอนติเจนจากสารคัดหลั่งพยาธิจึงมีความจำเพาะสูงกว่าแอนติเจนชนิดสกัดหยาบซึ่งสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมผู้ป่วยที่ติดพยาธิชนิดอื่น (Ruangkunaporn et al., 1994; Sakolvaree et al., 1997; Maleewong et al., 2006) และยังเป็นแอนติเจนกลุ่มที่ epitope มีความจำเพาะต่อพยาธิ *T. spiralis* และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของสัตว์ที่ได้รับพยาธิ *Trichinella* ชนิดอื่นได้ดี (Nöckler et al., 2005) จึงมีการศึกษาแอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิอย่างต่อเนื่อง แต่ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิ *T. spiralis* เพื่อเตรียมแอนติเจนจากสารคัดหลั่งค่อนข้างยุ่งยากเพราะต้องเลี้ยงด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ พยาธิมีขนาดเล็กจึงต้องเลี้ยงพยาธิเป็นจำนวนมากเพื่อให้ได้ปริมาณแอนติเจนอย่างเพียงพอในการศึกษาหรือเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย และมีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งปริมาณและคุณภาพของแอนติเจนจะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bolas-Fernandez et al., 2009)

น้ำตาลสังเคราะห์ tyvelose เป็นคาร์โบไฮเดรตที่สังเคราะห์เลียนแบบน้ำตาล tyvelose ในแอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิในธรรมชาติ เนื่องจากเป็นส่วนที่มีความจำเพาะสูงและมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ดี แต่จากการศึกษาของ Gamble และคณะในปี 2004 พบว่าน้ำตาลสังเคราะห์ tyvelose มีความไวในการตรวจวินิจฉัยต่ำในบางตัวอย่าง ในขณะที่แอนติเจนชนิดสกัดหยาบซึ่งมีแอนติเจนที่มีโปรตีนซับซ้อนหลายชนิดเนื่องจากเตรียมจากการบดพยาธิระยะติดต่อทั้งตัวจึงมีองค์ประกอบของโปรตีนในกลุ่ม TSL-1 เช่นกัน แอนติเจนชนิดสกัด

หยาบของ *T. spiralis* มีความซับซ้อนของชนิดโปรตีนมากกว่าแอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วย immunoblot technique (Frey et al., 2009) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงนอกจากนี้ยังมีข้อดีคือสามารถเตรียมได้ง่ายในห้องปฏิบัติการและประหยัดกว่าการเตรียมแอนติเจนจากสารคัดหลั่งของพยาธิมาก ปัจจุบันมีการนำ immunoblot technique มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค เช่น โรคพยาธิใบไม้ในม้าและสุกร (Gorman et al., 1997) ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคเอดส์ในมนุษย์ (Lee et al., 2000) เป็นต้น พบว่าให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่มีความจำเพาะสูง จากการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรค trichinellosis ที่มีสาเหตุมาจากพยาธิ *T. spiralis* ในมนุษย์ (Mahannop et al., 1994; Robert et al., 1996; Nuñez et al., 2000; Yera et al., 2003) พบว่ามีโปรตีนที่มีเกิดปฏิกิริยาต่อ human anti-*Trichinella* antibodies เช่นเดียวกับการศึกษา immunoblot technique ในสัตว์ เช่น ม้า (Yepes and Mulia et al., 1999) และสุกร (Nöckler et al., 1995; Gruden-Movsesijan et al., 2002; Nöckler et al., 2009) การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของซีรัมผู้ป่วย trichinellosis กับแอนติเจนของพยาธิและการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติเจนจากพยาธิและแอนติบอดีของโฮสต์ที่ติดโรคพยาธิชนิดอื่นถูกจำกัดอยู่ที่มนุษย์และสัตว์บางชนิด ในปัจจุบันยังมีการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างแอนติเจนสกัดหยาบจากตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis* และซีรัมสุกรติดพยาธิชนิดอื่นอยู่น้อยและยังไม่มีรายงานการศึกษาในประเทศไทย งานวิจัยการศึกษาความจำเพาะของแอนติเจนชนิดสกัดหยาบของพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อที่จำเพาะต่อซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* และไม่จำเพาะต่อซีรัมของสุกรที่ป่วยด้วยโรคปรสิตชนิดอื่นครั้งนี้จึงเป็นรายงานการศึกษาแรกในประเทศไทย

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าแอนติบอดีจากซีรัมสุกรในกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ จำนวนอย่างน้อย 14 น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันระหว่าง 210/215-31 kDa ได้แก่ 210/215, 153, 101/105, 92, 67/68, 61/62, 53/54, 48/49, 42/43, 41, 36/38, 34, 32 และ 31 kDa จาก immunoblot pattern ของสุกรตัวที่ 2 และ 4 ที่มีจำนวนโพลีเปปไทด์ที่ทำปฏิกิริยากับ swine anti-*Trichinella* แตกต่างไปจากสุกรตัวที่ 1, 3 และ 5 โดยมีโพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุล 19 และ 14 kDa ในสุกรตัวที่ 2 และ 19 kDa ในสุกรตัวที่ 4 (ตารางที่ 6) อาจจะเป็นผลจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างจำเพาะในสัตว์แต่ละตัว (Nöckler et al., 2009) หรือสุกรเคยมีปรสิตภายในต่อมาระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสามารถกำจัดปรสิตนั้นออกไปได้หมด หรือเคยได้รับการรักษาปรสิตภายในมาก่อนแต่ระบบภูมิคุ้มกันของสุกรสามารถจดจำแอนติเจนได้และสร้างแอนติบอดีชนิดจำเพาะต่อแอนติเจนชนิด

นั้น ซึ่งแอนติบอดีมีความสามารถในการคงอยู่ได้นานหลายเดือนจนถึงเป็นปีขึ้นกับชนิดและแอนติเจนที่ได้รับอย่างต่อเนื่อง ผลการศึกษาในครั้งนี้เกิดปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างแอนติบอดีของสุกรในกลุ่ม 2, 3 และ 4 กับแอนติเจนสกัดหยาบจากพยาธิในระยะติดต่อดังเนื่องจากโปรตีนสกัดหยาบจากพยาธิทั้งตัวมีโปรตีนปะปนกันอยู่หลายชนิด

ผลการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาข้ามของซีรัมสุกรในกลุ่ม 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ตรวจไม่พบปรสิตในอุจจาระกับแอนติเจนสกัดหยาบ เมื่อวิเคราะห์ด้วย immunoblot technique พบว่าเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนสกัดหยาบจากพยาธิ *T. spiralis* ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Gamble และคณะ (1997) ซึ่งไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างแอนติเจนกับซีรัมสุกรปลอดพยาธิ *T. spiralis* อาจมีสาเหตุมาจากสุกรในกลุ่ม 2 บางตัวอาจอยู่ในช่วงระยะแฝงของโรคก่อนที่จะมีอาการของโรคปรากฏ (latent period) สุกรมีปรสิตอยู่ในร่างกายในปริมาณน้อยทำให้ตรวจไม่พบไข่พยาธิ ซีสต์หรือโอโอซีสต์ในอุจจาระ หรือสุกรได้รับการรักษาโรคปรสิตมาก่อนทำให้ตรวจไม่พบปรสิตในอุจจาระแต่ยังคงมีระดับของแอนติบอดีในปริมาณที่เพียงพอในการจับกับแอนติเจนและก่อให้เกิดปฏิกิริยาเห็นเป็นแถบสี เนื่องจากซีรัมสุกรที่นำมาศึกษาส่วนมากเก็บมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงสุกรแบบปล่อย หรือฟาร์มเพาะเลี้ยงที่สุกรมีโอกาสสัมผัสและได้รับเชื้อบิดหรือ Coccidia ได้ง่ายเนื่องจากโอโอซีสต์ของเชื้อบิดมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมสูง (Belli et al., 2006) และเป็นปรสิตที่พบได้ทั่วไปในฟาร์มของประเทศไทย

รายงานการศึกษา immunoblot technique โดยใช้แอนติเจนจากสารคัดหลั่งและแอนติเจนสกัดหยาบจากพยาธิ *T. spiralis* ในระยะติดต่อกับซีรัมของผู้ป่วยมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลที่สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับซีรัมของผู้ป่วยโรค trichinellosis จาก immunoblot pattern ของแอนติเจนจากสารคัดหลั่งของตัวอ่อนระยะติดต่อดังของพยาธิ *T. spiralis* พบว่าแอนติบอดีของสุกรทดลองที่ได้รับตัวอ่อนระยะติดต่อดังของพยาธิ *T. spiralis* ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ประกอบไปด้วยโปรตีนที่มาจากหลายแหล่ง (heterologous organisms) เกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่อโปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 44 และ 67 kDa (Nöckler et al., 1995) ต่อมา Aguilar และคณะ (2000) มีรายงานว่า immunoblot pattern ของสุกรทดลองติดเชื้อ *T. spiralis* โดยใช้สารคัดหลั่งของพยาธิเป็นแอนติเจนเช่นกันพบว่ามีปฏิกิริยาจำเพาะที่โปรตีนแอนติเจนน้ำหนักโมเลกุล 229, 108, 64, 45, 41, 40, 33-38.5 kDa และจากการศึกษาของ Gruden-Movesijian (2002) ด้วยเทคนิค lectin blot พบว่ามี glycoprotein ที่น้ำหนักโมเลกุล 45, 49 และ 53 kDa ที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* ในขณะที่การศึกษากการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนชนิดสกัดหยาบกับผู้ป่วยโรค trichinellosis พบว่า immunoblot pattern มีรูปแบบ

ของปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 47, 55 และ 90 kDa หรือ 43-44 และ 64 kDa (Robert et al., 1996; Yera et al., 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mahannop และคณะ (1994) พบการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีนสกัดหยาบที่น้ำหนักโมเลกุล 109 kDa และจากการศึกษาของ Yepez-Mulia และคณะ (1999) พบว่า immunoblot pattern ของซีรัมฆ่าติดพยาธิ *T. spiralis* กับแอนติเจนชนิดสกัดหยาบได้แก่ โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 47, 52, 59, 67, 72 และ 105 kDa สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในครั้งนี้นี้กล่าวคือ จากการศึกษานี้พบโปรตีนแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรติดโรคพยาธิอื่นที่น้ำหนักโมเลกุล 92, 61/62 และ 41 kDa ตามลำดับ

แต่จากรายงานการศึกษาล่าสุด Nöckler และคณะ (2009) ได้ศึกษา immunoblot pattern ของซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* กับแอนติเจนชนิดสกัดหยาบซึ่งสามารถเตรียมได้ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าแอนติเจนจากสารคัดหลั่ง พบว่ามีสายโพลีเปปไทด์ที่เกิดปฏิกิริยาชัดเจนและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรที่ติดโรคพยาธิชนิดอื่น (*O. dentatum*, *T. suis*, *H. rubidus*, *Strongyloides ransomi*) ที่น้ำหนักโมเลกุล 43, 47, 61, 66 และ 102 kDa ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้นี้พบว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 61/62 kDa มีความจำเพาะต่อซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 43 kDa เป็นโปรตีนหลักที่เกิดปฏิกิริยาชัดเจนและเป็นโปรตีนที่พบในแอนติเจนชนิดสกัดหยาบปริมาณมากมีความสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยากับ anti-*Trichinella* antibodies ได้ดีเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้มีผลขัดแย้งกับรายงาน Nöckler และคณะ (2009) เนื่องจากจากโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 43 kDa สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรติดพยาธิชนิดอื่นที่พบในประเทศไทย (ตารางที่ 6) สามารถอธิบายได้จากการศึกษาของ Romaris (2002) ว่าพยาธิ *T. spiralis* มีแอนติเจนที่มีความจำเพาะของพยาธิในวงศ์ Trichuroidea คือ TSL-1 ซึ่งพยาธิในวงศ์นี้ที่พบได้ในสุกรคือ *T. suis* และ *T. spiralis* แอนติเจนในกลุ่ม TSL-1 มีน้ำตาล beta-tyvelose เป็นองค์ประกอบจึงสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมของสุกรติดพยาธิ *T. suis* ได้เนื่องจากมีส่วนที่ใช้ epitope ร่วมกัน (Ortega-Pierres et al., 1996) TSL-1 เป็นแอนติเจนที่ถูกสร้างและเก็บอยู่ในเซลล์ stichocytes ซึ่งซีรัมสุกรที่ติดพยาธิ *T. suis* ทุกตัวอย่าง สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 43 kDa แต่การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรติด *O. dentatum*, Coccidia, *B. coli* ยังไม่สามารถสรุปผลการศึกษาได้ชัดเจนเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามที่เกิดขึ้นไม่มีรูปแบบที่แน่นอน ส่วนหนึ่งมาจากเป็นผลมาจากสุกรในกลุ่ม 4 บางตัวอาจอยู่ในช่วงระยะแฝงของโรคก่อนที่จะมีอาการของโรคปรากฏ (latent period) สุกรมีปรสิตอยู่ในร่างกายใน



ปริมาณน้อยทำให้ตรวจไม่พบไข่ม้วนพยาธิหรือไอโอซีสต์ในอุจจาระ หรือสุกรได้รับยารักษาโรคปรสิตมาก่อนทำให้ตรวจไม่พบปรสิตในอุจจาระแต่ยังคงมีระดับของแอนติบอดีในปริมาณที่เพียงพอในการจับกับแอนติเจนและก่อให้เกิดปฏิกิริยาเห็นเป็นแถบสี ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นตลอดจนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะแตกต่างกันไปในสุกรแต่ละตัวล้วนมีผลต่อการ immunoblot profile ที่เกิดขึ้น (Nöckler et al., 2009)

ความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักโมเลกุลของสายโพลีเปปไทด์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในการศึกษาในครั้งนี้อาจคลาดเคลื่อนจากโปรโตคอล (protocol) ที่แตกต่างกันไปในแต่ละห้องปฏิบัติการ เช่น ปริมาณความเข้มข้นของ polyacrylamide ที่ใช้ในการศึกษาหรือ ชนิดโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลที่จำเพาะเป็นต้น รวมถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดและในการแปรผลการวิเคราะห์ immunoblot technique ที่มีสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นกับเอนไซม์ที่ไม่ชัดเจนในบางแบบ ดังนั้นการวิเคราะห์ผลของ immunoblot technique จึงควรมี gel documentation system ที่มีความไวและแม่นยำสูง (Nöckler et al, 2009) จากการศึกษาในครั้งนี้พบจำนวนโปรตีนที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่อโปรตีนสกัดหยาบมีจำนวน 14 น้ำหนักโมเลกุล ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Nöckler และคณะ (2009) ซึ่งพบ 12 น้ำหนักโมเลกุล อธิบายได้จากรายงานของ Picherot และคณะ (2007) ที่พบว่าจำนวนของโพลีเปปไทด์ที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับ ซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* ที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับขั้นโดยแพร่จากเยื่อเมือกของลำไส้เล็กมายังซีรัม เนื่องจากจำนวนของปฏิกิริยาที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาจำเพาะของแอนติบอดีกับโพลีเปปไทด์จากแอนติเจนของพยาธิจะมีจำนวนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปนานมากขึ้นจากการสร้างแอนติบอดีชนิดที่จำเพาะต่อสายโพลีเปปไทด์หลายชนิดมากขึ้นจากการศึกษาของความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีของสุกรทดลองที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* พบว่าแอนติบอดีในซีรัมสุกรจะเริ่มทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนเมื่อศึกษาด้วย immunoblot technique ในวันที่ 20 หลังจากได้รับเชื้อโดยโปรตีนแอนติเจนแรกที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีคือโปรตีนที่น้ำหนักโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 110 kDa จากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาที่โพลีเปปไทด์ที่น้ำหนักโมเลกุล 55/59, 43/46 และ 35 kDa ภายหลังจากติดพยาธิ 60 วัน อีกทั้งความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของโปรตีนแอนติเจนกับซีรัมของมนุษย์และสัตว์ที่ได้รับพยาธิ *T. spiralis* จะขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิ *T. spiralis* และระยะเวลา นับตั้งแต่วันที่ได้รับเชื้อเข้าไป (Gottstine et al., 2009, Nöckler et al., 2009) จึงทำให้ปริมาณของโพลีเปปไทด์ที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะมีจำนวนแตกต่างกัน

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 92, 61/62 และ 41 kDa เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อซีรัมสุกรติดพยาธิ *T. spiralis* ในประเทศไทยเนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับซีรัมสุกรในกลุ่มอื่น จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจในการศึกษาต่อเพื่อพัฒนาความจำเพาะของการตรวจการติดพยาธิ *T. spiralis* การพัฒนาความจำเพาะของโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาในอนาคตควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างสุกรในแต่ละกลุ่มตัวอย่างให้มากขึ้นและมีการเก็บซีรัมตามช่วงเวลาเพื่อศึกษาระยะเวลาในการตอบสนองของแอนติบอดีในระยะยาวร่วมด้วย ประกอบกับการเพิ่มเทคนิคการย้อมสีที่มีความจำเพาะของชนิดโปรตีน เนื่องจากสีที่ใช้ในการย้อมสีโปรตีนมีความหลากหลายทั้งชนิดและวิธีซึ่งมีทั้งความไวและความจำเพาะแตกต่างกันไป เช่น Coomassie blue G-250 ที่จะให้แถบโปรตีนที่ย้อมแล้วเป็นสีน้ำเงินมีความไวต่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ระดับ  $\mu\text{g}$  สีย้อม silver เป็นสีย้อมที่มีความไวสูงในระดับนาโนกรัม (ng) ซึ่งสามารถย้อมได้ทั้งโปรตีนและดีเอ็นเอ (DNA) การย้อมด้วย lumitein เป็น luminescent dye มีความไวมากแม้มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 1 ng ดังนั้นการใช้สีเหล่านี้ย้อมจึงเป็นการย้อมที่ติดสีโปรตีนกลายเป็นไกลโคโปรตีน, lipoprotein ในงานทดลองครั้งนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าการย้อมติดสีที่เกิดขึ้นเป็นโปรตีนชนิดใด

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งต่อไปควรที่จะเพิ่มเทคนิคการแยกชนิดของโปรตีน เช่น การย้อมโปรตีนด้วย concanavalin A ซึ่งเป็น lectin protein ที่มีความสามารถในการจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลหรือ glycoprotein รวมถึงศึกษาคุณสมบัติและลักษณะจำเพาะของโปรตีนโดยใช้วิธีการแยกบนเจลโดยใช้ 2 DE gel เพื่อศึกษาชนิดของโปรตีนของพยาธิและสารก่อภูมิคุ้มกันระหว่างโฮสต์และพยาธิการแยกโพลีเพปไทด์บนเจลด้วยกระแสไฟฟ้ามิติเดียว (one-dimensional electrophoresis) เป็นการแยกตามขนาดและประจุร่วมกันบนเจลในภาวะที่โปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพไป การแยกมิติเดียวจะเป็นการแยกตามขนาดหรือแยกตามประจุ (isoelectric focusing, IEF) แต่การแยกด้วยกระแสไฟฟ้ามิติเดียวโพลีเพปไทด์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปมีโอกาสเคลื่อนที่ไปพร้อมกันและไปหยุดที่ตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันจึงอาจทำให้เห็นผิดพลาดวิเคราะห์เป็นแถบเดียวในกรณีโปรตีนสกัดหยาบซึ่งเป็นส่วนผสมโปรตีนซับซ้อน การเคลื่อนที่ของโปรตีนหลายชนิดไปพร้อม ทำให้สรุปผลความบริสุทธิ์ของตัวอย่างผิดพลาดไปได้ ดังนั้นเพื่อระบุความจำเพาะของโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้นจึงควรทำ 2 DE เพิ่มเติม ก่อนนำโปรตีนที่สนใจศึกษาไปสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติจำเพาะของโปรตีนด้วยการใช้แมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry) ซึ่งเป็นเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาลำดับและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนชนิดนั้นต่อไป ซึ่งมีความแม่นยำในการทำนายชนิดและคุณสมบัติของโปรตีนสูงประกอบกับเปรียบเทียบ protein sequence ที่สนใจกับ protein sequence จาก

ฐานข้อมูลเพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในการพัฒนาความจำเพาะของการตรวจวินิจฉัย

*T. spiralis*



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- Andiva, S., Year, H., Haeghebaert, S., Tourte-Schaefer, C., Magnaval, J.F. and Dupouy-Camet, J. 2002. Comparative evaluation of a latex agglutination test, two ELISA tests and a Western blot test for the serodiagnosis of human trichinellosis. *Ann. Biol. Clin.* 60: 79–83.
- Aguilar, F.B.A., Bautista-Garfias, C.R., Rojas, J. and de Nova, M.E. 2000. Experimental swine Trichinellosis: Use of Dot-ELISA and western blot with excretion/secretion antigens (ES) from infective larvae to detect anti-*Trichinella spiralis* antibodies. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42 (2): 57-62
- Almond, N.M. and Parkhouse, R.M. 1986. The Ig class distribution of antiphosphorylcholine responses in mice infected with parasitic nematodes. *Immunology.* 59 : 633–635.
- Andrews, J.R., Ainsworth, R., and Abernethy, D. 1994. *Trichinella pseudospiralis* in humans: description of a case and its treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 200-203.
- Appleton, J.A., Bell, R.G., Homan, W. and van Knapen, F. 1991. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today.* 7: 190–192.
- Appleton, J.A. and Romaris, F. 2001. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Vet. Parasitol.* 101 (3-4): 249-260.
- Appleyard, G.D., Conboy, G., Gajadhar, A.A. 1998. *Trichinella spiralis* in sylvatic hosts from Prince Edward Island. *J. Wildl. Dis.* 34: 158–160.
- Arriaga, C., Yopez-Mulia, L., Viveros, N., Adame, L.A., Zarlenga, D.S., Lichtenfels, J.R., Benitez, E. and Ortega-Pierres, M.G. 1995. Detection of

*Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. J. Parasitol. 81: 781–783.

Atterby, H., Learmount, J., Conyers, C., Zimmer, I., Boonham, N. and Taylor, M. 2009. Development of a real-time PCR assay for the detection of *Trichinella spiralis* in situ. Vet. Parasitol. 161 (1-2): 92-98.

Beck, R., Gaspar, A., Mihaljević, Z., Marinculić, A., Stojčević, D. and Brstilo, M. 2005. Evaluation of ELISA for detection of *Trichinella* antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs. Vet. Parasitol. 132: 91–95.

Beiting, D.P., Bliss, S.K., Schlafer, D.H., Roberts, V.L., and Appleton, J.A. 2004. Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*. Infect. Immun. 72: 3129–3137.

Beiting, D.P., Gagliardo, L.F., Hesse, M., Bliss, S.K., Meskill, D. and Appleton, J. A. 2007. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells and TGF-beta. J. of Immunol. 178:1039–1047.

Bell, R.G. 1998. The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. Adv. Parasitol. 41: 149–217.

Belli, S.I., Smith, N.C. and Ferguson, D.J. 2006. The coccidian oocyst: a tough nut to crack!. Trends. Parasitol. 22 (9): 416-423.

Bolás-Fernandaz, F. and del Corral Bezara, L. 2006. TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. Res. in Vet. Sci. 81 (3): 297-303.

- Bolas-Fernández, F., Dea-Ayuela, M.A., Connolly, B. and Bobinson M.W. 2009. Micro-environmental conditions modulate protein secretion and infectivity of *Trichinella spiralis* L1 larvae. *Vet. Parasitol.* 159: 236-239.
- Boonthanom, P. and Nawarat, A. 1963. The outbreak of trichinosis at Amphur Mae Sarieng. *Bull. Pub. Health.* 33: 301–308.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Capo', V., and Despommier , D. D. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 47–54.
- Denkers, E.Y., Wassom, D.L., Krco, C.J. and Hayes, C.E. 1990. The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single, immunodominant epitope shared by multiple antigens. *J. of Immunol.* 144: 3152–3159.
- Denkers, E.Y., Hayes, C.E. and Wassom, D.L. 1991. *Trichinella spiralis*: Influence of an immunodominant, carbohydrate-associated determinant on the host antibody response repertoire. *Exp. Parasitol.* 72 (4): 403-410.
- Dennis, D.T., Despommier, D.D. and Davis, N. 1970. Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasitol.* 56: 974–977.
- Despommier, D.D., Sukhdeo, M. and Meerovitch, E. 1978. *Trichinella spiralis*: site selection of the larva during the enteral phase of the infection in mice. *Exp. Parasitol.* 44: 209–215

- Dupouy-Camet, J. 2000. Trichinellosis: at worldwide zoonosis. *Vet. Parasitol.* 93: 191–200.
- Eissa, M.M., El-Mansoury, S.T. and Allam, S.R. 2003. Co - agglutination (Co-A): a rapid test for the diagnosis of experimental trichinellosis. (abstract). *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 33: 637–645.
- Ellis, L.A., Reason, A.J., Morris, H.R., Dell, A., Iglesias, R., Ubeira, F.M. and Appleton, J.A. 1994. Glycans as targets for monoclonal antibodies that protect rats against *Trichinella spiralis*. *Glycobiol.*4: 585–592.
- Ellis, L.A., McVay, C.S., Probert, M.A., Zhang, J., Bundle, D.R. and Appleton, J.A. 1997. Terminal  $\beta$ -linked tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens. *Glycobiol.* 7: 383–390.
- European Community. 2005. Regulation (EC) no. 2075/2005 of the European Parliament and of the Council of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Off. J. Eur. Commun.* 338: 60–82.
- Fabre, M.V., Beiting, D.P., Bliss, S.K. and Appleton, J.A. 2009. Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Vet. Parasitol.* 159: 245-248.
- Forbes, L.B. and Gajadhar, A.A. 1999. A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food. Prot.* 62: 1308–1313.
- Frey, C.F., Schuppers, M.E., Nöckler, K., Marinculic, A., Pozio, E., Kihm, U. and Gottstein, B. 2009. Validation of a western blot for the detection of anti-*Trichinella* spp. antibodies in domestic pigs. *Parasitol. Res.* 104: 1269-1279.

- Fröscher, W., F. Gullotta, M., Saathoff, and Tackmann, W. 1988. Chronic trichinosis. Clinical, bioptic, serological and electromyographic observations. *Eur. Neurol.* 28: 221-226.
- Gajadhar A. A. and Forbes L.B. 2001. An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety with example data on trichinellosis. *Vet. Parasitol.* 103: 133-140.
- Gajadhar, A. A., Pozio, E., Gamble, H.R. , Nöckler, K., Maddox-Hyttel, C., Forbes, L. B., Vallée, I., Rossi, P., Marinculic, A. and Boireau, P. 2009. *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet. Parasitol.* 159: 197-205.
- Gamble, H. R. and I. V. Patrascu. 1996. Whole blood, serum and tissue fluids in an EIA for swine trichinellosis. *J. Food. Prot.* 59: 1213–1217.
- Gamble, H.R., Wisnewski, N. and Wasson, D.L. 1997. Diagnosis of trichinellosis in swine by enzyme immunoassay, using a synthetic glycan antigen. *Am. J. Vet. Res.* 58: 1417–1421.
- Gamble, H.R., Bessonov, A.S., Cuperlovic, K., Gajadhar, A. A., van Knapen, F., Nöckler, K., Schenone, H. and Zhu, X. 2000. International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.* 93: 393–408.
- Gamble, H.R., Pozio, E., Bruschi, F., Nöckler, K., Kapel, C. M. and Gajadhar, A. A. 2004. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infections in animals and man. *Parasite.* 11: 3–13.
- Gasser, R.B., Hu, M., Abs El - Osta, Y.G., Zarlanga, D.S. and Pozio, E. 2004. Non-isotonic single-strand conformation polymorphism analysis of



sequence variability in ribosomal DNA expansion segments within the genus *Trichinella* (Nematode : Adenophorea). *Electrophoresis*. 25: 3357-3364.

Gómez-Morales, M.A., Mele, R., Sanchez, M., Sacchini, D., De Giacomo, M. and Pozio, E. 2002. Increased CD8(+)-T-cell expression and a type 2 cytokine pattern during the muscular phase of *Trichinella* infection in humans. *Infection and Immunity*. 70: 233–239.

Gómez-Morales, M.A., Ludovisi, A., Amati, M., Cherchi, S., Pezzotti, P. and Pozio, E. 2008. Validation of an ELISA for the diagnosis of human trichinellosis. *Clin. Vaccine Immunol*. 15:1723–1729.

Gorman, T., Aballay, J., Fredes, F., Silva M., Aguillón, J.C. and Alcaíno, H. A. 1997. Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using western blots. *Int. J. of Parasitol*. 27 (11): 1429-1432.

Gottstein, B., Pozio Z., Nöckler, K. 2009. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev*. 127-145.

Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N. and Sofronic-Milosavljevic, L. 2002. Lectin blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory–secretory components. *Parasitol. Res*. 88: 1004–1007.

Hames, B.D. 1990. One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis of Proteins, a practical approach*. 2<sup>nd</sup> ed. Hames, B.D. and Rickwood, D. (eds.). Oxford: Oxford University Press. 14–17.

Jongwutiwes, S., Chantachum, N., Kraivichian, P., Siriyasatien, P., Putapornpit, C., Tamburrini, A., La Rosa, G., Sreesunpasirikul, C., Yingyourd, P. and Pozio, E. 1998. First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. *Clin. Infect. Dis*. 26: 111–115.

- Kaewpitoon, N., Kaewpitoon, S.J., Philasri, C., Leksomboon, R., Maneenin, C., Sirilaph, C. and Pengsaa, P. 2006. Trichinosis: epidemiology in Thailand. *World J. Gastroenterol.* 12: 6440–6445.
- Kapel, C. M. 2005. Changes in the EU legislation on *Trichinella* inspection-new challenges in the epidemiology. *Vet. Parasitol.* 132: 189–194.
- Kapel, C.M. and Gamble, H.R., 2000. Infectivity, persistence and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int. J. Parasitol.* 30: 215–221.
- Khumjui, C., Choomkasien, P., Dekumyoy, P., Kusolsuk, T., Kongkaew, W., Chalamaat, M. and Jones, J.L. 2008. Outbreak of trichinellosis caused by *Trichinella papuae*, Thailand. 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (12): 1913-1915.
- Ko, R.C. and Yong, T.P. 1992. *Trichinella spiralis*: specificity of ES antigen from pre-cysted larvae. *J. Helminthol.* 66: 38-44.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lee, D.L., Ko, R.C., Yi, X.Y. and Yeung, M.H.F. 1991. *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. *Parasitol.* 102: 117–123.
- Lee, D.C., Stenland, C. J., Hartwell, R.C., Ford, E.K., Cai, K., Miller, J. L. C., Gilligan, K. J., Rubenstein, R., Fournel, M. and Petteway Jr, S. R. 2000. Monitoring plasma processing steps with a sensitive western blot assay for the detection of the prion protein. *J. Virol. Methods.* 84: 77-89.

- Li, C.K. and Ko, R.C. 2001. Inflammatory response during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections. *Parasitol. Res.* 87: 708–714.
- Linder, E., Thors, C. Lundin, L., Ljungström, I, Farah, S. Hagi, H. and Dias, F. 1992. Schistosome antigen gp-50 is responsible for serological cross-reactivity with *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* 8: 999-1005.
- Liu, Z.M., Wang, C. and An, C.L. 1991. Differentiation of the sex of *Trichinella* larvae collected in Changchun. (abstract). *Chinese J. Parasitol. Parasitic Dis.* 9 (3): 223-225.
- Ljungström, K.G., Renck, H., Hedin, H. Richter, W. and Wiholm, B.E. Hapten inhibition and dextran anaphylaxis. *Anaesthesia.* 43: 729-732.
- Mahannop, P., Chaicumpa, W., Setasuban, P., Morakote, N. and Tapchaisri, P. 1992. Immunodiagnosis of human trichinellosis using excretory secretory antigen (ES) antigen. *J. Helminthol.* 66: 297-304.
- Mahannop, P., Setasuban, P., Morakote, N., Tapchaisri, P. and Chaicumpa, W. 1994. Immunodiagnosis of human trichinellosis and identification of specific antigen for *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 25 (1): 87-94
- Malakauskas, A., Paulauskas, V., Jarvis, T., Keidans, P., Eddi, C., and Kapel, C.M. 2007. Molecular epidemiology of *Trichinella* spp. In three Baltic countries: Lithuania, Latvia, and Estonia. *Parasitol. Res.* 100: 687–693.
- Maleewong, P., Maleewong, W., Sukeepaisarnjaroen, W., Morakote, N. 2006. Potential use of *Trichinella spiralis* antigen for serodiagnosis of human capillariasis philippinensis by immunoblot analysis. *Parasitol. Res.* 98 (3): 227-231.

- Marinculic, A., Gaspar, A., Durakovic, E., Pozio, E. and La Rosa, G. 2001. Epidemiology of swine trichinellosis in the Republic of Croatia. *Parasite*. 8 (2): 92–94.
- Meyer, M.C. and Olsen, O.W. 1971. *Essential of parasitology*. Iowa: Brown company. 305.
- Møller, L.N., Petersen, E., Gamble, H.R., Kapel, C.M. 2005. Comparison of two antigens for demonstration of *Trichinella* spp. antibodies in blood and muscle fluid of foxes, pigs and wild boars. *Vet. Parasitol.* 132 (1-2): 81-84.
- Murrell, K.D. 1985. Strategies for the control of human trichinosis transmitted by pork. *Food Technol.* 39: 65-68.
- Nelson, M., Wright, T.L., Pierce, A. and Krogwold, R.A. 2003. A common-source outbreak of trichinosis from consumption of bear meat. *J. Environ. Health.* 65: 24.
- Nöckler, K., Voigt, W.P., Protz, D., Miko, A. and Ziedler, K. 1995. Diagnosis of trichinellosis in living pigs using indirect ELISA (German). (abstract). *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 108. 167–174.
- Nöckler, K., Pozio, E., Voigt, W.P., and Heidrich, J. 2000. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet. Parasitol.* 93: 335-350.
- Nöckler, K., Serrano, F.J., Boireau, P., Kapel, C.M. and Pozio, E. 2005. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.* 132: 85–90.

- Nöckler, K., Rerckinge, S., Pozio, E. 2006. Short communication *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* mixed infection in a wild boar (*Sus scrofa*) of Germany. *Vet. Parasitol.* 137: 364-368.
- Nöckler, K., Rerckinge, S., Broglia, A., Mayer-Scholl, A. and Bahn, P. 2009. Evaluation of a western blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Vet. Parasitol.* 163 (4): 341-347.
- Nuñez, G. G., S. L. Malmassari, S. N. Costantino, and S. M. Venturiello. 2000. Immunoelectrotransfer blot assay in acute and chronic human trichinellosis. *J. Parasitol.* 86: 1121–1124.
- OIE (Office International des Epizooties). 2008. Trichinellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6<sup>th</sup> Ed. Paris: Office International des Epizooties. 344-352.
- Oivanen, L., Kapel, C.M.O., Pozio, E., La Rosa, G., Mikkonen, T. and Sukura, A. 2002. Associations between *Trichinella* species and host species in Finland. *J. Parasitol.* 88: 84–88.
- Ortega-Pierres, M.G., Yepez-Mulia, L., Homan, W., Gamble, H.R., Lim, P.L., Takahashi, Y., Wassom, D.I. and Appleton, J.A. 1996. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.* 18: 273–284.
- Ortega-Pierres, M.G., Arriaga, C. and Yepez-Mulia, L. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Vet. Parasitol.* 93 : 201–225.
- Picherot, M., Oswald, I.P., Cote, M., Noeckler, K., Le Guerhier, F., Boireau, P. and Valle'e, I. 2007. Swine infection with *Trichinella spiralis*: comparative

analysis of the mucosal intestinal and systemic immune responses. *Vet. Parasitol.* 143: 122–130.

Pinelli, E., Mommers, M., Homan, W. van Maanen, T. and Kortbeek, L. M. 2004. Imported human trichinellosis: Sequential IgG<sub>4</sub> antibody response to *Trichinella spiralis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 57-60.

Pozio, E., La Rosa, G., Murrell, K. D. and Lichtenfels, J. R. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. Parasitol.* 78: 654–659.

Pozio, E., Miller, I., Jarvis, T., Kapel, C.M. and La Rosa, G. 1998. Distribution of sylvatic species of *Trichinella* in Estonia according to climate zones. *J. Parasitol.* 84: 193–195.

Pozio, E., Sofronic-Milosavljevic, L., Gomez Morales, M.A., Boireau, P. and Nöckler, K. 2002. Evaluation of ELISA and western blot analyses using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Vet. Parasitol.* 108: 163-178.

Pozio, E. and Zarlenga, D.S. 2005. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.* 35: 1191–1204.

Pozio, E., Mesina, P., Sechi, F., Pira, M., Liciardi, M., Cossu, P., Marucci, G., Garippa, G. and Firinu, A. 2006. Human outbreak of trichinellosis in the Mediterranean island of Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.* 140: 177–180.

Pozio, E. and Murrell, K.D. 2006. Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv. Parasitol.* 63: 367–439.

Pozio, E. 2007<sup>a</sup>. Taxonomy, biology and epidemiology of *Trichinella* parasites. FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management. In:

Prevention and control of trichinellosis. Dupouy-Camet, J. Murrell, K.D. (eds.). France: OIE. 1–35.

Pozio, E. 2007<sup>b</sup>. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 149: 3–21.

Ramisz, A., Szymborski, J., and Balicka-Ramisz, A. 2001. Epidemiological studies on trichinellosis among swine, wild boars and humans in Poland. *Parasite.* 8 (2): 90–91.

Robert, F., Because, B., Kassis, N. and Dupouy-Camet, J. 1996. Investigation of immunofluorescence cross-reactions against *Trichinella spiralis* by western blot (Immunoblot) analysis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 3: 575–577.

Ribichich, M., Gamble, H.R., Rosa, A., Bolpe, J. and Franco, A. 2005. Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Vet. Parasitol.* 132: 137–142.

Robinson, M.W., Gare, D.C. and Connolly, B. 2005. Profiling excretory/secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Vet. Parasitol.* 132: 37–41.

Robinson, M.W., Greig, R., Beattie, K. A., Lamont, D.J. and Connolly, B. 2007. Comparative analysis of the excretory–secretory proteome of the muscle larva of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 37: 139–148.

Romaris, F., North, S.J., Gagliardo, L.F., Butcher, B.A., Ghosh, K., Beiting, D.P., Panico, M., Arasu, P., Dell, A., Morris, H.R., and Appleton, J.A. 2002. A putative serine protease among the excretory-secretory glycoproteins of L1 *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122: 149–160.

- Rombout, Y.B., Bosch, S. and van Der Giessen, J.W. 2001. Detection and identification of eight *Trichinella* genotypes by reverse line blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 39: 642-646.
- Ruangkunaporn, Y., Watt, G. Harinasuta, C., Jongsakul K., Chongsa-nguan, M. and Chaicumpa, W. 1994. Immunodiagnosis of trichinellosis: efficiency of somatic antigen in early detection of human trichinellosis. Asian Pac. J. Allergy Immunol. 12: 39-42.
- Sakolvaree, Y., Ybanez, L. and Chaicumpa, W. 1997. Parasites elicited cross-reacting antibodies to *Opisthochis viverrini*. Asian Pac. J. Allergy Immunol. 15: 115-122.
- Sayasone, S., Odermatt, P., Vongphrachanh, P., Keoluangkot, V., Dupouy-Camet, J., Newton, P.N. and Strobel, M. 2007. A trichinellosis outbreak in Borikhamxay Province, Lao PDR. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 100: 1126–1129.
- Sofronic - Milosavljevic, L., Ilic, N., Djordjevic, M., Savic, M., Gruden-Movsesijan, A., Cuperlovic, K. and Murrell, K.D. 2005. Anti-*Trichinella* antibodies detected in chronically infected horses by IFA and western blot, but not by ELISA. Vet. Parasitol. 132: 107-111.
- Sohn, W.M., Kim, H.M., Chung, D.I. and Yee, S.T. 2000. The first human case of *Trichinella spiralis* infection in Korea. (abstract). Korean J. Parasitol. 38: 111–115.
- Srimanote, P., Ittiprasert, W., Sermsart, B., Chaisri, U., Mahannop, P., Sakolvaree, Y., apchaisri., P., Maleewong, W., Kurazono, H., Hayashi, H. and Chaicumpa, W. 2000. *Trichinella spiralis*-specific monoclonal antibodies and affinity-purified antigen-based diagnosis. Asian Pac. J. Allergy Immunol. 18: 37-45.



- Takahashi, Y. and Araki, S. 1989. *Trichinella spiralis*; The in situ localization of muscle larva antigens recognized by humans. *Exp. Parasitol.* 68: 414-422.
- Takahashi, Y. 1997. Antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Today.* Vol 13 (3) : 104-106.
- Takahashi, Y., Liu, M. and Waikakul, J. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Asia and the Pacific Rim. *Vet. Parasitol.* 93 (3-4): 227-239.
- Taweethavonsawat, P., Chaicumpa, W., Chaisri, U., Chuenbal, U., Sakolvaree, Y., Tapchaisri, P. and Wongsaroj., T. 2002. Specific monoclonal antibodies to *Strongyloides stercoralis*: a potential diagnostic reagent for strongyloidiasis. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 20 (4): 247-256.
- Trap, C., Fu, B., le Guerhier, F., Liu, M., Le Rhun, D., Romamd, T., Perret, C., Blaga, R. and Boireau, P. 2006. Cloning and analysis of a cDNA encoding a putative serine protease comprising two trypsin-like domains of *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 98: 288–294.
- Van Knapen, F., 2000. Control of trichinellosis by inspection and farm management practices. *Vet. Parsitol.* 93: 385–392.
- Venturiello, S.M., Ben, G.J., Costantino, S.N., Malmassari, S.L., Nunez, G.G., Veneroni, R.L. and Traversa, M.J. 1998. Diagnosis of porcine trichinellosis: parasitological and immunoserological tests in pig from endemic areas of Argentina. *Vet. Parasitol.* 74: 215-228.
- Walls, R.S., Carter, R.L., Leuchars, E. and Davies, A.J. 1973. The immunopathology of trichiniasis in T-cell deficient mice. *Clin. and Exp. Immunol.* 13: 231–242.

- Wang, Z.Q., Cui, J. and Xu, B.L. 2006. The epidemiology of human trichinellosis in China during 2000–2003. *Acta. Trop.* 97: 247–251.
- Wang, Z.Q., Cui, J. and Shen, L.J. 2007. The epidemiology of animal trichinellosis in China. *Vet. J.* 173: 391–398.
- Wu, Z., Nagano, I., Pozio, E. and Takahashi, Y. 1999. Polymerase chain reaction-restriction of *Trichinella* isolates. *Parasitol.* 118: 211-218.
- Yera, H., Andiva, S., Perret, C., Limonne, D., Boireau, P., and Dupouy-Camet, J. 2003. Development and evaluation of a western blot kit for diagnosis of Human Trichinellosis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10: 793–796.
- Yepez - Mulia, L., Arriag, C., Viveros, N., Adame, A., Benitez, E. and Ortega-Pierres, M.G. 1999. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis. *Vet. Parasitol.* 81: 57-68.
- Zakroff, S.G., Beck, L., Platzer, E.G. and Spiegelberg, H.L. 1989. The IgE and IgG subclass responses of mice to four helminth parasites. *Cell Immunol.* 119: 193–201.
- Zarlenga, D.S., Al-Yaman, F., Minchela, D. and La Rosa, G. 1991. A repetitive DNA probe specific for a North American sylvatic genotype of *Trichinella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 131-138.
- Zarlenga, D.S., Chute, M.B., Martin, A. and Kapel, C.M.O. 1999. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *Int. J. for Parasitol.* 29 (11): 1859-1867.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก: น้ำยาเคมี

### 1. น้ำย่อยเทียม (1% pepsin in 1% HCL)

Pepsin powder	10 g
Hydrochloric acid	10 ml
0.85% NaCl solution	990 ml

### 2. สารเคมี SDS-PAGE

#### 2.1 Stock solution

##### 2.1.1 30% Acrylamide-Bis-acrylamide solution

Acrylamide (Promega, USA)	14.60 g
Bisacrylamide (Promega, USA)	0.40 g
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	50.0 ml

##### 2.1.2 1.5 M Tris-HCL buffer, pH 8.8

Tris (hydroxymethyl) amino methane (Research Organics, Canada)	18.17 g
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	50.0 ml

##### 2.1.3 0.5 M Tris-HCL buffer, pH 6.8

Tris (hydroxymethyl) amino methane	6.06 g
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	50.0 ml

##### 2.1.4 10 % (W/V) Sodium dodecyl sulphate (SDS)

SDS (Bio Basic inc, Canada)	10.0 g
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	100.0 ml

##### 2.1.5 10 % Ammonium persulphate solution (APS)

Ammonium persulphate (Promega, USA)	0.1 ml
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	1.0 ml

##### 2.1.6 N, N, N', N'- tetra methylene diamine (TEMED) (Bio Basic inc, Canada)

## 2.2 บัฟเฟอร์

### 2.2.1 Electrode buffer (Tris glycine buffer), pH 8.3

Tris (hydroxymethyl) amino methane	3.03 g
Glycine (Research Organics, USA)	14.4 g
SDS	1.0 g
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	1,000.0 ml

### 2.2.2 Sample buffer (SDS reducing buffer)

0.5 M Tris-HCL buffer, pH 6.8	1.0 ml
Glycerol (Biomedical Inc, USA)	0.8 ml
10 % (W/V) Sodium dodecyl sulphate (SDS)	1.6 ml
2-beta-mercaptoethanol	0.4 ml
0.1% (W/V) bromophenol blue	0.2 ml

## 3. สารเคมีย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassies brilliant blue

### 3.1 Staining solution

Coomassies brilliant blue R-250 (Sigma, Germany)	1.25 g
Absolute Methanol (Merck, Germany)	250.0 ml
Glacial acetic acid (Merck, Germany)	50.0 ml
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	200.0 ml

### 3.2 Destaining solution

Absolute Methanol	400.0 ml
Glacial acetic acid	100.0 ml
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	1,000.0 ml

## 4. สารเคมีย้อมโปรตีนด้วยสี Silver (Bio-Rad, USA)

### 4.1 Fixative (40% methanol/10% acetic acid; v/v )

Methanol	400 ml
Gracial acetic acid	100 ml

Deionized water	500 ml
<b>4.2 Oxidizer</b>	
Oxidizer concentrate	10 ml
Deionized water	90 ml
ควรเตรียม oxidizer ใหม่ทุกครั้งที่ย้อมสี silver	
<b>4.3 Silver reagent</b>	
Silver reagent concentrate	10 ml
Deionized water	90 ml
ควรเตรียม silver reagent ใหม่ทุกครั้งที่ย้อมสี silver	
<b>4.4 Developer</b>	
Developer power	32.0 g
Deionized water	1.0 l
เก็บที่อุณหภูมิ 23-25°C ได้นาน 1 เดือน	
<b>4.5 5 % acetic acid</b>	
Gracial acetic acid	50.0 ml
Deionized water	950.0 ml

## 5. สารเคมี immunoblot

### 5.1 Transfer buffer

Tris (hydroxymethyl) amino methane	3.03 g
Glycine	14.4 g
Absolute Methanol	200.0 ml
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	1,000.0 ml

### 5.2 Washing buffer (0.05% Tween-20 ในสารละลาย PBS, pH 7.4; PBST)

Tween20 (Bio Basic inc, Canada)	0.5 ml
เติมสารละลาย PBS, pH 7.4 จนถึงปริมาตร	1,000.0 ml

### 5.3 Substrate solution

2, 6- dichloropheol- indophenol	0.005 g
เติมสารละลาย PBS, pH 7.4 จนถึงปริมาตร	10.0 ml

30 %H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.0 µl
<b>5.4 Blocking solution (3% BSA in PBST)</b>	
BSA	1.5 g
เติมสารละลาย PBST จนถึงปริมาตร	50.0 ml
<b>5.5 10X Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4</b>	
NaCl	80.0 g
KCL	2.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5 g
เติมน้ำกลั่นจนถึงปริมาตร	1,000.0 ml



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข: การเตรียมเจล

## ตารางที่ ผ1 การเตรียม 4% Stacking gel (5 ml)

น้ำกลั่น/ สารเคมี	ปริมาณ
น้ำกลั่น	3 ml
0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	1.25 ml
10% (W/V) SDS stock	50 $\mu$ l
30% Acrylamide-Bis-acrylamide solution	0.65 ml
Glycerol	50 $\mu$ l
10% APS	25 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

## ตารางที่ ผ2 การเตรียม Separating gel (15 ml)

น้ำกลั่น/ สารเคมี	Gel concentration				
	7.5%	8%	10%	11%	12%
น้ำกลั่น (ml)	7.12	6.9	5.88	5.37	4.87
0.5 M Tris-HCL, pH 8.8 (ml)	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
10% (W/V) SDS stock ( $\mu$ l)	150	150	150	150	150
30% Acrylamide-Bis-acrylamide solution (ml)	3.75	4	5.5	5.5	6
Glycerol ( $\mu$ l)	150	150	150	150	150
10% APS ( $\mu$ l)	75	75	75	75	75
TEMED ( $\mu$ l)	10	10	10	10	10



### ภาคผนวก ค: การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA

1. เตรียมสารละลาย BSA (sigma, Germany) ตั้งต้นที่ความเข้มข้น 2 mg/ml กรองสารละลายผ่าน filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$
2. ปรับความเข้มข้นของสารละลาย BSA ตั้งต้น โดยทำให้เจือจางลง 4 เท่า (เตรียม BSA 50  $\mu\text{l}$  จากความเข้มข้น 2mg/ml เจือจางในน้ำกลั่น 150  $\mu\text{l}$ ) จะได้ความเข้มข้นใหม่เป็น 0.5 mg/ml เตรียมโปรตีนมาตรฐานที่ลำดับความเข้มข้น 1.25-10  $\mu\text{g/ml}$  หรือเตรียมความเข้มข้นของโปรตีนให้อยู่ในช่วงของความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง

#### ตารางที่ ๓3 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (1.25-10 $\mu\text{g/ml}$ )

ความเข้มข้นของ BSA ที่ต้องการ ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ( $\mu\text{l}$ )	ปริมาณน้ำกลั่น ( $\mu\text{l}$ )	ปริมาณสารละลาย Bradford assay ( $\mu\text{l}$ )
Blank	0	800	200
1.25	2.5	797.5	200
2.5	5	795	200
5	10	790	200
10	20	780	200

## ภาคผนวก ง: การตรวจวินิจฉัยแยกชนิดปรสิต

ตารางที่ ผ4 โรคปรสิตภายใน (internal parasites) ที่สามารถพบได้ในสุกร

ปรสิต	ตำแหน่งที่ปรสิตอาศัยอยู่	ระยะที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย
<i>Hylostrongylus</i>	กระเพาะอาหาร	ไข่ในอุจจาระ
<i>Strongyloides</i>	ลำไส้เล็ก	ไข่ในอุจจาระ
<i>Oesophagostomum</i> spp.	ลำไส้ใหญ่	ไข่ในอุจจาระ
<i>Stephanurus</i> spp.	ไต	ไข่ในอุจจาระ
<i>Metastrongylus</i>	ปอด	ไข่ที่มีตัวอ่อนระยะที่ 1 ในอุจจาระ
<i>Trichuris suis</i>	ลำไส้ใหญ่	ไข่ในอุจจาระ
<i>Balantidium coli</i>	ลำไส้ใหญ่	ซีสต์ในอุจจาระ
<i>Ascaris suis</i>	ลำไส้เล็ก	ไข่ในอุจจาระ
<i>Macracanthorhynchus</i> spp.	ลำไส้เล็ก	ไข่ในอุจจาระ
<i>Fasciola</i> spp.	ท่อน้ำดี	ไข่ในอุจจาระ
<i>Giardia</i> spp.	ลำไส้เล็ก	ซีสต์ในอุจจาระ
<i>Cystoisospora</i>	ลำไส้เล็ก	โอโอซีสต์ในอุจจาระ
<i>Cryptosporidium</i>	ลำไส้เล็ก	ซีสต์ในอุจจาระ
<i>Eimeria</i> spp.	ลำไส้เล็ก	โอโอซีสต์ในอุจจาระ
<i>Isospora</i> spp.	ลำไส้เล็ก	โอโอซีสต์ในอุจจาระ

ตารางที่ ๘5 ผลการเพาะและวินิจฉัยแยกชนิดตัวอ่อนระยะที่ 3 (L3) พยาธิสตรของกาย

ลำดับ	รหัสสุกร	ผลการเพาะและวินิจฉัยแยกชนิด L3
1	PC26	ไม่พบ
2	PC58	ไม่พบ
3	PC17	ไม่พบ
4	PC19	ไม่พบ
5	PC24	ไม่พบ
6	PC32	ไม่พบ
7	PC 34	ไม่พบ
8	PC 41	ไม่พบ
9	PC 45	<i>O. dentatum</i>
10	PC48	<i>O. dentatum</i>
11	PC 51	<i>H. rubidus</i>
12	PC52	<i>O. dentatum</i>
13	PC 54	<i>H. rubidus</i>
14	SWKC1	<i>O. dentatum</i>
15	PC25	ไม่พบ
16	PC30	ไม่พบ
17	PC38	<i>O. dentatum</i>



รูปที่ ผ1-ผ2 ตัวอ่อนระยะที่ 3 พยาธิ *O. dentatum* ที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างอุจจาระสุกร



รูปที่ ผ3-ผ4 ตัวอ่อนระยะที่ 3 พยาธิ *H. rubidus* ที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอย่างอุจจาระสุกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ: ขนาดตัวอ่อนพยาธิระยะที่ 1

ตารางที่ ๘6 ขนาดความกว้างและความยาวของตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ *T. spiralis*

ลำดับที่	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )
1	712.5	22.5
2	742.5	18.75
3	757.5	22.5
4	705.0	30.0
5	712.5	22.5
6	675.0	22.5
7	697.5	30.0
8	712.5	18.75
9	720.0	22.5
10	682.5	22.5
11	660.0	22.5
12	637.5	18.75
13	780.0	18.75
14	795.0	22.5
15	690.0	30.0

ตารางที่ ๘6(ต่อ) ขนาดความกว้างและความยาวของตัวอ่อนระยะติดต่อกพยาธิ *T. spiralis*

ลำดับที่	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )
16	757.5	22.5
17	727.5	22.5
18	600.0	22.5
19	787.5	30.0
20	750.0	18.75
21	742.5	22.5
22	780.0	30.0
23	690.0	18.75
24	712.5	22.5
25	757.5	22.5
26	742.5	22.5
27	682.5	22.5
28	795.0	22.5
29	720.0	18.75
30	727.5	22.5

ภาคผนวก ฉ: ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE และ immunoblot technique

ตารางที่ ผ7 เปรียบเทียบโพลีเปปไทด์ที่ย้อมติดสี Coomassie blue G-250 สี Silver และ immunoblot pattern

น้ำหนักโมเลกุล (kDa)		
Coomassie blue G-250	Silver	Immunoblot pattern
210/215	210/215	210/215
-	153	-
101/105	101/105	101/105
-	92	92
72/74	72/74	-
67/68	67/68	67/68
-	61/62	61/62
55/57	55/57	-
53/54	53/54	53/54
48/49	48/49	48/49
42/43	42/43	42/43
41	41	41
36/38	36/38	36/38
-	34	34

ตารางที่ ๗7 (ต่อ) เปรียบเทียบโพลีเปปไทด์ที่ข้อมติดีสี Coomassie blue G-250 สี Silver และ immunoblot pattern

น้ำหนักโมเลกุล (kDa)		
Coomassie blue G-250	Silver	Immunoblot pattern
32	32	32
31	31	31
28	28	-
-	26/27	-
25	25	-
-	24	-
22	22	-
-	19	-
-	17/18	-
15/16	15/16	-
-	14	-
12	12	-
11	11	-
-	8/9	-



ตารางที่ ๘8 แสดงขนาดโปรตีนแอนติเจนจากพยาธิในระยะติดต่อชนิดสกัดหยาบน้ำหนักโมเลกุล  
จำเพาะที่ทำปฏิกิริยากับซีรัมสุกรที่ได้รับ *T. spiralis*

Immunoblot profiles					
น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ซีรัมสุกรกลุ่ม 3 ( <i>T. spiralis</i> infection, Ts)				
	Ts 1	Ts 2	Ts 3	Ts 4	Ts 5
210/215	+	+	+	+	+
153	+	+	+	+	+
101/105	+	+	+	+	+
92	+	+	+	+	+
67/68	+	+	+	+	+
61/62	+	+	+	+	+
53/54	+	+	+	+	+
48/49	+	+	+	+	+
42/43	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+
36/38	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+
19	-	+	-	-	-
14	-	+	-	+	-

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวดวงกมล สุระเรืองชัย เกิดเมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จาก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย