

**ANALYSIS OF CRUDE AND EXCRETORY-SECRETORY
ANTIGENS OF *DIROFILARIA IMMITIS* ADULT WORMS
AGAINST ANTIBODY OF BRUGIAN FILARIASIS BY ELISA
AND IMMUNOBLOT**

PANUPONG SAHAISOOK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การวิเคราะห์แอนติเจนชนิดสกัดอย่างหยาบและชนิดสารคัดหลั่งจากพยาธิหัวใจสุนัขระยะตัวเต็มวัยต่อแอนติบอดีต่อโรคเท้าช้างชนิดบรูเกียนด้วยวิธี ELISA และ IMMUNOBLOT (ANALYSIS OF CRUDE AND EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS OF DIROFILARIA IMMITIS ADULT WORMS AGAINST ANTIBODY OF BRUGIAN FILARIASIS BY ELISA AND IMMUNOBLOT)

วิทยุพงศ์ สหายสุข 4737008 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พารณ ดิคำชัย, Ph.D. (Tropical Medicine), มาลินี ไทยรุ่งโรจน์, Ph.D. (Medical Science), โชติช่วง พนโสภณกุล, Ph.D. (Biology), ผ่องศรี ทิพวง โภคผล, Ph.D. (Tropical Medicine)

บทคัดย่อ

การวินิจฉัยทางน้ำเหลืองของโรคเท้าช้างชนิดบรูเกียนในประเทศไทยยังไม่มีและวิธีตรวจวินิจฉัยที่ดีก็ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนักในวารสารงานวิจัย ดังนั้นจึงได้ทำการประเมินแอนติเจนชนิดสารคัดหลั่งและแอนติเจนชนิดหยาบซึ่งอาจเป็นแบบไม่สกัดและแบบสกัดไขมันจากพยาธิหัวใจสุนัขเพศผู้ตัวสดและเพศเมียตัวสดและที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ต่อมาได้เลือกแอนติเจนชนิดหยาบแบบไม่สกัดไขมันจากพยาธิเพศผู้ตัวสดและแบบสกัดไขมันจากพยาธิเพศเมียตัวสดมาใช้โดยผ่านการทดสอบด้วยวิธี immunoblot กับซีรัมผู้ป่วยโรคเท้าช้างและคนปกติเพื่อคัดแยกเอาแอนติเจนที่ดีไว้ เมื่อใช้วิธี IgG-ELISA วิเคราะห์แอนติเจนชนิดสารคัดหลั่งเพศผู้ (0.5 µg/ml) ซีรัมเจือจาง 1:800 ของผู้ป่วยโรคเท้าช้างชนิดบรูเกียน (36 ราย) โรคติดต่อปรสิตชนิดอื่นๆ (181 ราย) และซีรัมคนปกติ (54 ราย) และ IgG-conjugate เจือจางที่ 1:8,000 ผลพบว่าให้ค่าความไว 100% และค่าความจำเพาะ 96.17% ที่ค่าตัด 0.587 มีเพียง 8 รายจากโรคติดต่อปรสิต 6 โรค (4.42%) และ 1 รายจากซีรัมคนปกติ (1.85%) ให้ผลบวกปลอม จากสภาวะข้างต้นแอนติเจนชนิดสารคัดหลั่งเพศเมียให้ค่าความไว 100% และค่าความจำเพาะ 81.12% ที่ค่าตัด 0.616 พบผลบวกปลอม 37 รายจากโรคติดต่อปรสิต 20 โรค (20.11%) และ 8 รายจากซีรัมคนปกติ (14.81%) สำหรับแอนติเจนชนิดหยาบไม่สกัดไขมันจากพยาธิเพศผู้ (2 µg/ml) ซีรัมที่ 1:1,600 และ IgG-conjugate ที่ 1:8,000 ให้ค่าความไว 88.89% และค่าความจำเพาะ 81.28% ที่ค่าตัด 0.233 ส่วนแอนติเจนชนิดหยาบแบบสกัดไขมันจากพยาธิเพศเมียโดยใช้สภาวะทดสอบเหมือนกันยกเว้น IgG-conjugate เจือจางที่ 1:16,000 ให้ค่าความไว 94.44% และค่าความจำเพาะ 76.17% ที่ค่าตัด 0.164 มีโรคติดต่อปรสิต 20 โรคให้ผลบวกปลอม 24.31% (44/181) และ 30.94% (56/181) กับแอนติเจนชนิดหยาบจากพยาธิเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ ส่วนผล immunoblot มีเพียงแอนติเจนชนิดหยาบจากพยาธิเพศผู้ตัวสดเท่านั้นที่ให้ไกลโคโปรตีนแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 20.62 kDa แต่แถบนี้ไม่พบในผู้ป่วยโรคเท้าช้างชนิดบรูเกียนทั้งหมดและมีปฏิกิริยาข้ามกับโรคเท้าช้างชนิดแบนครอฟเตียน (5/5) พยาธิตัวจิ๊ด (1/3) และพยาธิปอดหนู (1/3) สรุปได้ว่าแอนติเจนชนิดสารคัดหลั่งเพศผู้ น่าจะนำมาใช้ในการวินิจฉัยทางน้ำเหลืองของโรคเท้าช้างชนิดบรูเกียนด้วยวิธี IgG-ELISA และแอนติเจนชนิดหยาบเพศผู้ อาจจะใช้ในการตรวจโรคเท้าช้างด้วยวิธี immunoblot อย่างไรก็ตามควรจะเตรียมแอนติเจนที่บริสุทธิ์มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ANALYSIS OF CRUDE AND EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS OF
DIROFILARIA IMMITIS ADULT WORMS AGAINST ANTIBODY OF BRUGIAN
FILARIASIS BY ELISA AND IMMUNOBLOT

PANUPONG SAHAISOOK 4737008 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: PARON DEKUMYOY, Ph.D.(TROPICAL MEDICINE),
MALINEE THAIRUNGROJ, Ph.D.(MEDICAL SCIENCE), CHOTECHUANG
PANASOPONKUL, Ph.D.(BIOLOGY), PONGSRI TIPPAWANGKOSOL,
Ph.D.(TROPICAL MEDICINE)

ABSTRACT

Serodiagnosis of Brugian filariasis is not available in Thailand and a good test has not been demonstrated in the literature. Therefore, this study evaluated excretory-secretory antigens, either non-delipidized (NDLP) or delipidized (DLP) crude extracts from *Dirofilaria immitis* fresh and post-RPMI 1640 cultured adult worms, from which NDLP-fresh male and ether-DLP-fresh female crude extracts were subsequently selected by immunoblot test using pooled Brugian and negative sera to discriminate the unsatisfied extracts. IgG-ELISA analyzed male ES antigen (0.5 µg/ml), 1:800-diluted sera of Brugian filariasis (36 cases), other parasitic infections (181) and negative controls (54), and 1:8,000 dilution of IgG-conjugate. The test gave 100% sensitivity and 96.17% specificity at cut-off value 0.587. Only 8 cases of six parasitic infections (4.42%) and 1 negative control (1.85%) were false-positive. Under the above conditions, ES female antigen produced 100% sensitivity and 81.12% specificity at cut-off value 0.616. False positives were found in 37 cases of twenty parasitic infections (20.11%) and 8 negative controls (14.81%). For NDLP-fresh male antigen (2 µg/ml), serum dilution (1:1,600), and IgG-conjugate dilution (1:8,000), gave 88.89% sensitivity and 81.28% specificity, at cut-off value 0.233. The DLP-fresh female antigen used the same conditions as the male crude antigen, except for IgG-conjugate at 1:16,000, resulting in 94.44% sensitivity and 76.17% specificity at cut-off value 0.164. Twenty parasitic infections showed false positives, 24.31% (44/181) and 30.94% (56/181) for crude male and female antigens, respectively. By immunoblot, only fresh male crude antigen showed an interesting glycoprotein band of 20.62 kDa, but it was inconsistent with Brugian filariasis sera and also cross-reacted with Bancroftian filariasis (5/5), gnathostomiasis (1/3), and angiostrongyliasis (1/3). It was concluded that ES male antigen can probably be used in the serodiagnosis of Brugian filariasis by IgG-ELISA, and male crude antigen may be used in detecting lymphatic filariasis by IgG-immunoblot. However, a purified antigen is needed for further study.

KEY WORDS: BRUGIAN FILARIASIS/CRUDE ANTIGEN/EXCRETORY-
SECRETORY ANTIGEN/*DIROFILARIA IMMITIS*/IgG-
ELISA/IgG-IMMUNOBLOT

128 pp.