LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
28 MAR 1990

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *GNATHOSTOMA* ANTIGENS WITH POTENTIAL FOR IMMUNODIAGNOSIS OF GNATHOSTOMIASIS

SIRIPORN TUNTIPOPIPAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN THE
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1989

Copyright by Mahidol University

13906

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณสมบัติของแอนติเจนของพยาธิตัวจี๊ด *(Gnathostoma spinigerum)* ที่มีศักยภาพสำหรับพัฒนาเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจี๊ด (gnathostomiasis) โดยวิธีทางอิมมิวโนวิทยา
ผู้วิจัย	นางสาวศิริพร ตันติโพธิ์พิพัฒน์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	นายสถิตย์ สิริสิงห
	นายเบญจะ เพชรคล้าย
	นายประมาณ เทพชัยศรี
	นางสาวอารยา ธรรมครองอาคม์
วันที่สำเร็จการศึกษา	๘ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๓๒

บทคัดย่อ

โรคพยาธิตัวจี๊ด (gnathostomiasis) มีสาเหตุจากการติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด *(Gnathostoma spinigerum)* การติดเชื้อพยาธิตัวนี้มีรายงานมาจากหลายพื้นที่ในประเทศไทย การวินิจฉัยโรคในปัจจุบันนี้เป็นเพียงการสันนิษฐานจากอาการทางคลินิก เช่น อาการบวมเคลื่อนที่แบบเป็น ๆ หาย ๆ, มีอาการคันและปวดบริเวณที่บวมและบริโภคนิสัยของผู้ป่วย และจากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการบางอย่าง เช่น การพบเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิลสูงในในกระแสโลหิต (eosinophilia) การวินิจฉัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นการวินิจฉัยที่ไม่แน่นอน ดังนั้น การวินิจฉัยโดยวิธีการทางอิมมิวโนวิทยาจึงน่าจะช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยอาการทางคลินิกได้ อย่างไรก็ตาม จะต้องมีการพัฒนาการวินิจฉัยทางอิมมิวโนวิทยา เพื่อที่จะให้ได้วิธีการที่ไว (sensitivity) และจำเพาะแม่นยำ (specificity) ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงพยายามวิเคราะห์คุณสมบัติของแอนติเจนที่เตรียมจากส่วนต่าง ๆ ของพยาธิ เช่น somatic extract, excretory-secretory products (ES) และ surface extract โดยวิธีทางสรีระเคมี (physicochemical technique) และ

Copyright by Mahidol University

อิมมิวโนวิทยา (immunological technique) เพื่อให้ได้องค์ประกอบที่มีศักยภาพสูงและมีความจำเพาะสูง สำหรับนำมาพัฒนาใช้ในการวินิจฉัยโรคได้อย่างแม่นยำ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลุ่มคนไข้ที่มีอาการทางสมองร่วมด้วย (cerebral gnathostomiasis) ซึ่งถือเป็นกลุ่มคนไข้ที่มีพยาธิสภาพที่รุนแรง และอาจทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้ โดยพยายามพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับตรวจหาแอนติเจนของพยาธิในน้ำไขสันหลัง และหาแอนติบอดีทั้งในน้ำเหลืองและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วย

ผลจากการศึกษาวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่า somatic แอนติเจนของพยาธิตัวจี๊ดมีองค์ประกอบค่อนข้างจะซับซ้อนประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่มากกว่า 116 ลงมาถึง 13 กิโลดาลตัน ในขณะที่ ES และ surface extract ประกอบด้วยโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 98 ถึง 12 กิโลดาลตัน และ 70 ถึง 16 กิโลดาลตัน ตามลำดับ องค์ประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดของ somatic แอนติเจนเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน ในขณะที่องค์ประกอบส่วนใหญ่ของ ES แอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 55 ถึง 40 กิโลดาลตันเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีน และเมื่อทำการศึกษาวิเคราะห์โดยวิธี immunoenzymatic blotting พบว่าทั้ง somatic และ ES แอนติเจนสามารถทำปฏิกริยาที่จำเพาะกับน้ำเหลืองจากผู้ป่วย และสัตว์ที่ติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด นอกจากนี้ เรายังได้ทำการศึกษาความจำเพาะของแอนติเจนทั้งสองโดยให้แอนติเจนทั้งสองชนิดทำปฏิกริยากับน้ำเหลืองจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิหอยโข่ง *(Angiostrongylus cantonensis)* ซึ่งเป็นพยาธิตัวกลมที่สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพที่คล้ายคลึงกันในระบบประสาท จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (26, 21 และ 19 กิโลดาลตัน) ของ somatic แอนติเจนจากพยาธิตัวจี๊ด จะทำปฏิกริยาเฉพาะกับน้ำเหลืองจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด และไม่ทำปฏิกริยากับน้ำเหลือจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิหอยโข่ง ในขณะที่องค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก (มากกว่า 38 กิโลดาลตัน) จะทำปฏิกริยากับน้ำเหลืองที่ติดเชื้อพยาธิทั้งสองชนิด ในทางตรงกันข้าม ES แอนติเจนจะทำปฏิกริยาที่จำเพาะต่อน้ำเหลืองจากคนไข้ที่ติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด แต่ไม่ทำปฏิกริยากับน้ำเหลืองจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิหอยโข่ง

Copyright by Mahidol University

เพื่อที่จะให้ได้วิธีการวินิจฉัยโรคทางอิมมิวโนวิทยาที่มีความจำเพาะมากขึ้น ผู้วิจัยจึงได้พยายามพัฒนาวิธีการหาแอนติเจนของพยาธิตัวจี๊ดที่มีความไวและความจำเพาะสูงต่อ ES แอนติเจน โดยวิธี biotin-streptavidin ELISA (B-SA ELISA) ขึ้นมา แต่ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะสามารถวัดระดับความเข้มข้นของโปรตีนได้ต่ำถึง 2 ng/ml ก็ตาม ผู้วิจัยก็ยังไม่สามารถตรวจพบแอนติเจนในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่มีอาการทางประสาทร่วมด้วย จากจำนวนผู้ป่วย 28 ราย สามารถตรวจพบแอนติเจนได้เพียงรายเดียว ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยอาจจะมีแอนติบอดี้สูง ซึ่งทำให้การวัดหาแอนติเจนทำได้ไม่ดี ดังนั้น เราจึงพยายามวิเคราะห์ต่อว่าจะมีแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อ somatic แอนติเจนของพยาธิตัวจี๊ดในน้ำไขสันหลังของคนไข้หรือไม่ และหากมีระดับแตกต่างไปจากที่พบในน้ำเหลืองหรือไม่ จากการวิเคราะห์ครั้งนี้พบว่าทั้งน้ำเหลืองและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยกลุ่มนี้มีระดับของแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อ somatic แอนติเจนสูงกว่าในกลุ่มควบคุม และระดับที่พบในน้ำไขสันหลังในผู้ป่วยทุกรายจะต่ำกว่าระดับที่พบในน้ำเหลือง

เพื่อที่จะได้ทราบว่าแอนติบอดี้ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยเป็นแอนติบอดี้ที่มาจากน้ำเหลืองหรือสร้างขึ้นโดยเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลาง ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของโปรตีนบางชนิดเพื่อนำมาคำนวนหาสัดส่วนของระดับอัลบูมินในน้ำเหลืองและน้ำไขสันหลัง (albumin ratio), สัดส่วนของระดับ IgG ในน้ำไขสันหลังและน้ำเหลือง หารด้วยสัดส่วนของระดับอัลบูมินในน้ำไขสันหลังและน้ำเหลือง (IgG-albumin index) และ specific antibody activity (specific IgG titer to somatic L3G/total IgG) ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวเราพบว่ามีคนไข้ 2 ราย จากจำนวนทั้งหมด 32 ราย สามารถตรวจพบว่ามีการสร้างแอนติบอดี้โดยเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลาง และนอกจากตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี้ในน้ำ ไขสันหลังของผู้ป่วยแล้ว การศึกษายังครอบคลุมไปถึงการตรวจหา immune complexes ในน้ำไขสันหลังด้วยวิธี complement-consumption test และพบว่ามีผู้ป่วย 1 ราย ที่สามารถตรวจพบ immune complexes ในน้ำไขสันหลังได้

Copyright by Mahidol University

ผลจากการศึกษาดังกล่าวทั้งหมดพอจะสรุปได้ว่าการตรวจหาแอนติเจนในน้ำไขสันหลังจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ดและมีอาการทางสมองร่วมด้วยไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจี๊ด ในขณะที่การตรวจหาระดับ

แอนติบอดี้ที่จำเพาะจะให้ผลการวินิจฉัยที่น่าเชื่อถือมากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้องค์ประกอบที่ค่อนข้างจะบริสุทธิ์และทำปฏิกริยาเฉพาะกับน้ำเหลืองจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิตัวจี๊ด อย่างเช่น ES แอนติเจนซึ่งไม่ทำปฏิกริยากับน้ำเหลืองจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิหอยไข่ง นอกจากนี้ในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวเราสามารถจะใช้น้ำไขสันหลังเป็นสิ่งส่งตรวจแทนน้ำเหลืองเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดี้ที่จำเพาะได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: Identification and characterization of *Gnathostoma* antigens with potential for immunodiagnosis of gnathostomiasis

Name: Siriporn Tuntipopipat

Degree: Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee:

Stitaya Sirisinha, D.M.D., Ph.D.

Bencha Petchclai, M.D.

Pramuan Tapchaisri, Ph.D.

Araya Dhamkrong-at, Ph.D.

Date of Graduation: 8 June B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

Human gnathostomiasis caused by *Gnathostoma spinigerum* has been reported to be a prevalent nematode infection in many regions of Thailand. The diagnosis of this parasitic infection is only presumptive, based on clinical features, for instances, intermittent migratory swelling, itching, pain and history of consuming half-cooked meat by individuals in endemic areas. Attempts have been made to diagnose this infection by conventional laboratory method, such as, complete blood count which showed a high percentage of eosinophil in the circulation. A number of immunodiagnostic methods for gnathostomiasis have been developed to confirm the presumptive clinical diagnosis. However, the development of specific and sensitive immunodiagnostic method is essential to obtain a reliable diagnosis. In this study, the various third-stage larval *G. spinigerum* (L_3G) antigen preparations including somatic extract,

Copyright by Mahidol University

excretory-secretory product (ES) and surface extract were characterized, employing a number of physicochemical and immunological methods in order to define specific component(s) with potential for immunodiagnosis of gnathostomiasis. An additional study was also undertaken to detect these parasitic antigens in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with central nervous system (CNS) involvements in order to monitor the active infection. Detection of specific antibodies in both serum and CSF of these cerebral gnathostomiasis patients had been undertaken in this study with a main objective of looking for the possibility of using CSF as a specimen for immunodiagnosis.

The SDS-PAGE pattern of somatic antigen was highly complex, consisting of proteins and glycoprotein with a molecular weight ranging from more than 116 to 13 KD. On the other hand, the ES antigen and surface extract consisted of components with more narrow molecular weight range of 98 to 12 KD and 70 to 16 KD respectively. The predominant somatic counterpart with a molecular weight of 38 KD was the only major glycoprotein detected in the somatic extract as demonstrated by concanavalin-A. On the contrary, a majority of the ES antigen, particularly those with molecular weight range of 55 to 40 KD, were glycoproteins. However, both somatic and ES antigens showed strong reactions with sera from infected humans, mice and rabbits immunized with various L_3G antigen preparations as demonstrated by immunoblotting technique. Specificity of these two antigens were analyzed with angiostrongyliasis serum obtained from patients suspected of having been infected with *Angiostrongylus cantonensis*, a common nematode found within CNS. The immunoblot

Copyright by Mahidol University

pattern showed that the low molecular weight components of the somatic antigen (26, 21 and 19 KD) reacted specifically with gnathostomiasis sera. On the other hand, those with high molecular weight components (more the 38 KD) reacted strongly with the angiostrongyliasis serum. On the contrary, the ES antigen failed to react with angiostrongyliasis serum.

In this study, the sensitive and specific biotin-streptavidin ELISA (B-SA ELISA) was also undertaken to be used for antigen detection in CSF of this group of patients. Although this B-SA ELISA could detect the presence of antigen to be level of 2 ng protein/ml, only one of the twenty-eight patients showed a positive antigen in his CSF specimen. It should be noted that no antibody could detect in his CSF. On the other hand, the other CSF specimens had high antibody levels in their CSF, therefore, any ES antigen may be in a form of immune complexes. In fact, one out of these CSF specimens, immune complexes were detected by complement consumption test.

An alternative approach with regarding to analyze both serum and CSF specimens of these patients for the presence of antibody reactive with the somatic antigen was also undertaken. Furthermore, by comparing the specific antibodies obtained in both serum and CSF of the individual patients and analyzed in conjunction with other immunological parameters, for examples, albumin ratio (serum albumin/CSF albumin), IgG-albumin index (CSF IgG/serum IgG ratio)/(CSF albumin/serum albumin ratio) and specific antibody activity (specific IgG titer/total IgG) all pointed to the fact that in addition to serum antibody which may be present in various degrees in CSF, local antibody production does occur within the CNS in two

Copyright by Mahidol University

cases out of thirty-two patients. An additional data clearly demonstrated that a large majority of the patients with CNS involvements gave high serum antibodies and the specific antibody could be readily detected in the CSF specimens.

From the overall study, it can conclude that the detection of antigen in CSF of cerebral gnathostomiasis patients is not suitable for immunodiagnosis. An alternative approach for detection of specific antibody is probably more effective, especially when the more refined ES component is available. The latter failed to react with angiostrongyliasis serum in immunoblotting analysis and therefore using the ES component as a diagnostic antigen would provide one with a reliable diagnosis for differentiation of gnathostomiasis and angiostrongyliasis. Either serum or CSF specimen can be used for antibody detection in cerebral gnathostomiasis patients.

Copyright by Mahidol University