การเตรียมแอนติเจนและการตรวจโรคพยาธิใบไม้ในตับโดยวิธีทดสอบทางผิวหนัง

สมปอง พิริยายน[1], อุษา เชษฐานนท์[1], วงศ์ขวัญ จิตนุพงศ์[1]
ทัศนีย์ ชมภูจันทร์[2], ชัยณรงค์ นามเข็ม[1], วีณา มุกดาสกุลภิบาล[1]
1. ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช
2. ฝ่ายปาราสิตวิทยา กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

จากการตรวจพบพยาธิใบไม้ในตับโค โดยวิธีทดสอบทางผิวหนัง *(Intradermal test)* พบว่าแอนติเจนที่เตรียมสดจากพยาธิตัวแก่ *(Freshly coected fluke antigen = FFA)* ที่ความเข้มข้น 1 *mg/ml* ให้ผลสอดคล้องอย่างมีนัยสำคัญกับการตรวจอุจจาระโดยวิธีตกตะกอน *(Sedimentation)* และยังให้ผลดีกว่าแอนติเจนที่เตรียมโดยวิธีไลโอฟิไลซ์ *(Lyophilized fluke antigen = LFA)* และแอนติเจนมาตรฐานของญี่ปุ่น ในเขตที่มีการระบาดของพยาธิ พบว่า *FFA* ให้ผลบวกแท้ถึง 90% และผลลบแท้เพียง 58.33% ส่วนในเขตที่ไม่มีการระบาด ให้ผลบวกไม่แท้เพียง 13.33% ข้อเสียคือหลังจากถ่ายพยาธิแล้ว การทดสอบทางผิวหนังจะยังคงให้ผลบวกอยู่ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้ในเขตที่มีการระบาดและการรักษาโรคนี้ผลลบแท้มีค่าเปอร์เซ็นต์ต่ำ

การใช้เทคนิคทางซีรั่มวิทยามาช่วยในการชันสูตร ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางวิธีทดสอบทางผิวหนัง *(Intradermal test)* ก็นับเป็นวิธีหนึ่งที่ได้มีการศึกษากันมานานนับสิบปี โดยเฉพาะในคนได้มีการศึกษากันมากเพื่อใช้ตรวจโรคพยาธิใบไม้ในเลือด[7] แอนติเจนที่ใช้ตรวจส่วนมากเป็น *Crude antigen* และเพื่อพัฒนาให้มีความไวและความเฉพาะปัจจุบันได้ทดลองผลิตแอนติเจนให้บริสุทธิ์ขึ้น หรือใช้เอนไซม์ หรือสารคัดหลั่ง *(secretion)* ต่าง ๆ ของพยาธิมาใช้ในการทดสอบ[4] นอกจากนี้การทดสอบทางผิวหนังยังใช้เพื่อตรวจหาโรค *Toxoplasmosis, Leishmaniasis* และพยาธิใบไม้ในตับคน *(Clonorchis sinensis)*[8] สำหรับในสัตว์ จากการทดลองของรำพึง และคณะ (2506) ได้เตรียมแอนติเจนพยาธิใบไม้ในตับกระบือโดยวิธีสกัดด้วย *normal saline* และทดสอบทางผิวหนัง พบให้ผลบวก 67.92 % เมื่อเทียบกับการตรวจตับ จากรายงานในการสำรวจพบพยาธิในภาคใต้พบว่าโคเป็นโรคพยาธิใบไม้ในตับถึง 11.35 % (เฉลี่ยปี 2527) และบางท้องที่มีเปอร์เซ็นต์สูงถึง 44.91 แสดงให้เห็นว่าโรคพยาธิใบไม้ในตับยังคงเป็นปัญหาสำคัญในการปศุสัตว์ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายในทางเศรษฐกิจอย่างมากในการเลี้ยงโค การตรวจโรคพยาธิใบไม้ในตับโคในปัจจุบันมักใช้การตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระโดยวิธีการต่าง ๆ เช่น *Formalin Ether Sedimentation* และ *Simple Sedimentation* ซึ่งต้องใช้เวลานาน ต้องการน้ำยาเคมีเฉพาะ ข้อสำคัญต้องใช้เจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญด้านนี้พอ และต้องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่านั้น จึงไม่เหมาะในการปฏิบัติงานในท้องที่และในที่ซึ่งไม่มีห้องปฏิบัติการ ดังนั้น เพื่อที่จะนำวิธีทดสอบทางผิวหนังไปช่วยตรวจในท้องที่ได้ จึงจำเป็นต้องหาข้อมูลและความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้สำหรับการตรวจวิธีนี้ในท้องที่ รายงานนี้จึงเป็นการศึกษาการเตรียมแอนติเจนแบบสด และแบบไลโอฟีไลซ์ขึ้นเป็นครั้งแรกและใช้ทดสอบโคทั้งในเขตที่มีการระบาดและไม่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ในตับ โดยเปรียบเทียบกับผลการตรวจอุจจาระโดยวิธี *Simple Sedimentation*

อุปกรณ์และวิธีการ

สุ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระโค ในเขตที่มีการระบาดของโรคพยาธิใบไม้ในตับ (ตำบลลำป่า อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง) มาตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ โดยวิธี *Simple Sedimentation* โคที่พบไข่พยาธิใบไม้ใน

ตับ จะถูกทดสอบทางผิวหนังด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบวัณโรค และใช้เครื่องมืออย่างเดียวกัน แอนติเจนที่ใช้ทดสอบเป็นแอนติเจน มาตรฐานจากประเทศญี่ปุ่น และที่เตรียมขึ้นเองจากห้องปฏิบัติการ แบบวิธีไลโอฟิไลซ์ *(LFA)* ที่มีความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 *mg/ml* และแบบสด *(FFA)* ที่มีความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 1 *mg/ml* ฉีดแอนติเจนที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มต่าง ๆ เข้าผิวหนังโคนหาง *(Caudal fold)* ข้างขวา และแอนติเจนจากญี่ปุ่นเข้าข้างซ้าย ข้างละ 0.2 *ml* วัดขนาดของ *caudal fold* ทันทีหลังฉีด และวัดอีกครั้งภายหลังฉีดประมาณ 20 นาที ความแตกต่างของค่าทั้งสอง ถือเป็นค่าบวกเพิ่มขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาทางผิวหนัง ต่อจากนั้นนำแอนติเจน *FFA* ที่มีความเข้มข้น *1 mg/ml* ไปทดสอบกับโคที่ไม่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ ในเขตที่ไม่มีการระบาด เปรียบเทียบกับแอนติเจนจากญี่ปุ่น เพื่อหาค่าบวกไม่แท้ (ลบแท้)

ในเขตที่มีการระบาดหลังจากถ่ายพยาธิใบไม้ในตับแล้ว ทุก ๆ 1, 2 และ 3 เดือนจะทำการทดสอบผิวหนังโคและตรวจอุจจาระเปรียบเทียบ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางผิวหนังต่อการทดสอบ

การเตรียมแอนติเจน

1. แบบสด *(Freshly collected fluke antigen = FFA)*

เก็บแยกพยาธิตัวแก่จากตับโคจากโรงฆ่าสัตว์ แช่ใน *0.01 MPBS, pH7.2* ล้างให้สะอาดหลาย ๆ ครั้ง ให้หมดเมือก ซับตัวพยาธิให้ค่อนข้างแห้ง ชั่งตัวพยาธิ 1 กรัม ผสมกับ *PBS* 1 *ml* บดให้ละเอียดด้วย *Homogenizer* เสร็จแล้วนำไป *sonicate* ที่ 20 *K cycles* 6 ครั้ง ๆ ละ 30 วินาที ทิ้งไว้ 4° ซ. 1 คืน จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่ 4° ซ. นำสารละลายใสมาหาค่าปริมาณโปรตีน โดยวิธี *Folin-Lowry* โดยใช้ *bovine plasma albumin* เป็นมาตรฐานแล้วนำสารละลายที่ได้ไปเก็บไว้ที่ –20° ซ. ก่อนใช้ทำให้เจือจางด้วย *PBS* ให้เป็นความเข้มข้นต่าง ๆ

2. แบบไลโอฟิไลซ์ *(Lyophilized fluke antigen = LFA)*

เก็บแยกและล้างพยาธิตัวแก่ เช่นเดียวกับวิธีแรก นำไปแช่ที่ –20° ซ. หลังจากนั้นบดด้วยเครื่อง *Homogenizer* ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 1 *ml PBS* ต่อจากนั้นนำไปแช่แข็งที่ –20° ซ. และเข้าเครื่อง *Lyophilizer* จนได้ผงพยาธิละเอียด แห้งสนิท เก็บไว้ที่ –20° ซ. ก่อนทำการทดลอง ชั่งผงพยาธิ 120 *mg.* แล้วนำไปละลายกับ *PBS 3 ml* ทิ้งไว้ค้างคืนในตู้เย็นที่ 4° ต่อจากนั้นปั่นด้วยความเร็วเท่ากันกับวิธีแรก นำสารละลายข้างบนไปหาปริมาณโปรตีน และเจือจางด้วย *PBS* เช่นเดียวกัน

เมื่อเตรียมเสร็จ นำสารละลายแอนติเจนทุกความเข้มข้น กรองผ่าน *membrane filter* ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อกรองแบคทีเรียซึ่งอาจจะสร้าง *Toxin* ในแอนติเจน และทำให้เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบทางผิวหนัง

ผลการทดลอง

จากการทดสอบทางผิวหนัง โคที่ตรวจพบไข่พยาธิด้วยวิธีการตกตะกอนของอุจจาระร่วงด้วยแอนติเจนมาตรฐานของญี่ปุ่น พบว่าโคทั้งหมด 89 ตัว ให้ผลบวก 62 ตัว คิดเป็นบวกแท้ 69.66% โดยถือว่าบวมเพิ่มขึ้นเท่ากับหรือมากกว่า 5 มม.ขึ้นไป เป็นบวก ส่วนโคที่พบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะ จากการตรวจ 10 ตัว ให้ผลบวกทางผิวหนัง 3 ตัว คิดเป็น 30% ส่วนโคที่ตรวจพบไข่พยาธิตัวกลม ตัวตืด *(Moniezia)* และทั้ง 2 ชนิดปนกัน ไม่ให้ผลบวกที่บวมมากกว่า 5 มม. ค่าเฉลี่ยการบวมเนื่องจากปฏิกิริยาทางผิวหนังในกลุ่มพยาธิใบไม้ในตับ มีค่ามากที่สุด 6.25 มม. และรองมาคือพยาธิใบไม้ในกระเพาะ 3.89 มม. ส่วนในกลุ่มอื่น ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 1 และเมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาทางผิวหนังกับอายุสัตว์ พบว่าค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงอายุไม่แน่นอน จะมีค่าเฉลี่ยการบวมมากในช่วงอายุ 2, 5 และ 8 ปี โดยบวมเพิ่มขึ้น 7.01, 8.36 และ 7.88 มม. ตามลำดับ

เมื่อทดลองใช้แอนติเจนที่เตรียมโดยวิธี *FFA* และ *LFA* ทดสอบทางผิวหนังพบว่าที่ความเข้มข้น *0.005, 0.05 mg/ml.* แอนติเจน *LFA* ให้ค่าบวก 31.82 และ 33.33% โดยมีการบวมขึ้นเฉลี่ย 1.80 และ 2.75 มม. ตามลำดับ ส่วนแอนติเจน *FFA* ให้ค่าบวกเพียง 28.57 และ 31.82% ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.05 *mg/ml.* และมีการบวมเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 2.13 และ 3.69 มม. ซึ่งบวมมากกว่าแอนติเจน *LFA* ที่ความเข้มข้น *0.5 mg/ml* ทั้งแอนติเจน *LFA* และ *FFA* ให้ค่าบวกใกล้เคียงกันคือ 58.33 และ 62.50% โดยบวมเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5.83 และ 6.25 มม. ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น *1 mg/ml.* ของแอนติเจน *FFA* ให้ค่าบวกถึง 90% และบวมเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 7.39 มม.

ในเขตที่ไม่มีการระบาดของพยาธิ และสัตว์ไม่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ พบแต่พยาธิใบไม้ในกระเพาะพยาธิตัวกลม โปรโตซัว และเชื้อบิดเล็กน้อย เมื่อนำแอนติเจน *FFA* ที่ความเข้มข้น *1 mg/ml.* ทดสอบเปรียบเทียบกับแอนติเจนมาตรฐานเพื่อหาค่าลบแท้ ผลการทดสอบพบว่า *FFA 1 mg/ml.* ให้ผลบวกไม่แท้เพียง 13.33% ใกล้เคียงกับแอนติเจนมาตรฐานของญี่ปุ่น (14.28%) แต่ในเขตที่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ในตับ ผลการทดสอบให้ผลลบแท้เพียง 58.33% กับแอนติเจน *FFA* และ 70.00% กับแอนติเจนมาตรฐานของญี่ปุ่น ถึงแม้จะตรวจไม่พบไข่พยาธิใบไม้ในตับในอุจจาระก็ตาม ผลเปรียบเทียบการบวมที่อายุต่าง ๆ จะใช้แอนติเจนทั้งสองชนิด ในเขตที่ไม่มีการระบาดกับเขตที่มีการระบาด แสดงในภาพที่ 1

หลังการถ่ายพยาธิในเขตที่มีการระบาด เมื่อทำการทดสอบทางผิวหนังซ้ำ ในช่วงเวลา 1, 2 และ 3 เดือน โดยใช้แอนติเจน *FFA 1 mg/ml.* และแอนติเจนมาตรฐาน พบว่าโคยังคงแสดงผลบวกทางผิวหนังกับแอนติเจน *FFA* อยู่ คิดเป็น 63.16, 60.00 และ 55.00% ในเดือนที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งยังคงให้ผลบวก 73.63, 57.14 และ 76.92 ตามลำดับ ผลการตรวจอุจจาระในช่วง 1 และ 2 เดือน ไม่พบไข่พยาธิใบไม้ในตับ ส่วนในเดือนที่ 3 หลังการรักษาโคบางตัวมีไข่พยาธิใบไม้ในตับในอุจจาระ ดังแสดงรูปสามเหลี่ยมในภาพที่ 2 และมีโค 2 ตัวซึ่งตรวจพบแต่ไข่พยาธิตัวกลม ก็ยังคงให้ผลลบอยู่ทั้ง 3 เดือน

Table 1. Fecal examination and intradermal test with liver fluke antigen (Japan) in the endemic area of bovine fascioliasis

Parasitic Detection	*Total No.of Cattle*	*No. Positive (%)*			*Mean size of wheal (mm.)*
		Size of wheal (≥ 3 mm)	*Size of wheal (≥ 4 mm)*	*Size of wheal (≥ 5 mm)*	
Liver fluke and other parasites	*89*	*72 (80.90)*	*64 (71.91)*	*62 (69.66)*	*6.25*
Rumen fluke	*10*	*6 (60.00)*	*4 (40.00)*	*3 (30.00)*	*3.89*
Nematode	*9*	*1 (11.11)*	*0 (00.00)*	*0 (00.00)*	*1.3*
Cestode	*1*	*0 (00.00)*	*0 (00.00)*	*0 (00.00)*	*2.7*
Nematode and Cestode	*2*	*1 (50.00)*	*0 (00.00)*	*0 (00.00)*	*3.0*

Table 2. Effect of protein concentration of LFA and FFA antigens for intradermal test in liver fluke egg-positive cattle

Concentration of protein (mg/ml.)	Antigen used	Total No. of cattle	No. positive (%) (Size of wheal ≥ 5 mm.)	Mean size of wheal in mm.
0.005	LFA	22	7 (31.82)	1.8
	FFA	7	2 (28.57)	2.13
0.05	LFA	9	3 (33.33)	2.75
	FFA	9	7 (31.82)	3.69
0.5	LFA	12	7 (58.33)	5.83
	FFA	8	5 (62.50)	6.25
1.0	FFA	10	9 (90.00)	7.39

Table 3. Comparison of liver fluke antigen (Japan) and FFA antigen by intradermal test in liver fluke egg-negative cattle in endemic and non-endemic area

Antigen used	Total No.of cattle	No.false positive (%) (Size of wheal ≥ 5 mm.)	% Negative	Mean size of wheal (mm.)
Non-endemic area				
Liver fluke Ag (Japan)	35	5 (14.28)	85.71	2.15
FFA (1 mg/ml.)	45	6 (13.33)	86.67	1.99
Endemic area				
Liver fluke Ag (Japan)	10	3 (30.00)	70.00	3.89
FFA (1 mg/ml.)	12	5 (41.67)	58.33	5.20

Table 4. Intradermal test by using liver fluke antigen (Japan) and FFA (1 mg/ml.) at 1,2 and 3 months after treatment

Time after treatment (months)	Antigen used	Total No. of cattle	No. positive (%)	Mean size of wheal in mm.	fecal exmanition (Liver fluke egg)
1	Liver fluke Ag (Japan)	17	14 (73.68)		Negative
	FFA	17	12 (63.36)		Negative
2	Liver fluke Ag (Japan)	14	8 (57.14)	4.75	Negative
	FFA	20	12 (60.00)	4.96	Negative
3	Liver fluke Ag (Japan)	13	10 (76.92)	5.65	Negative
	FFA	20	11 (55.00)	5.96	Positive

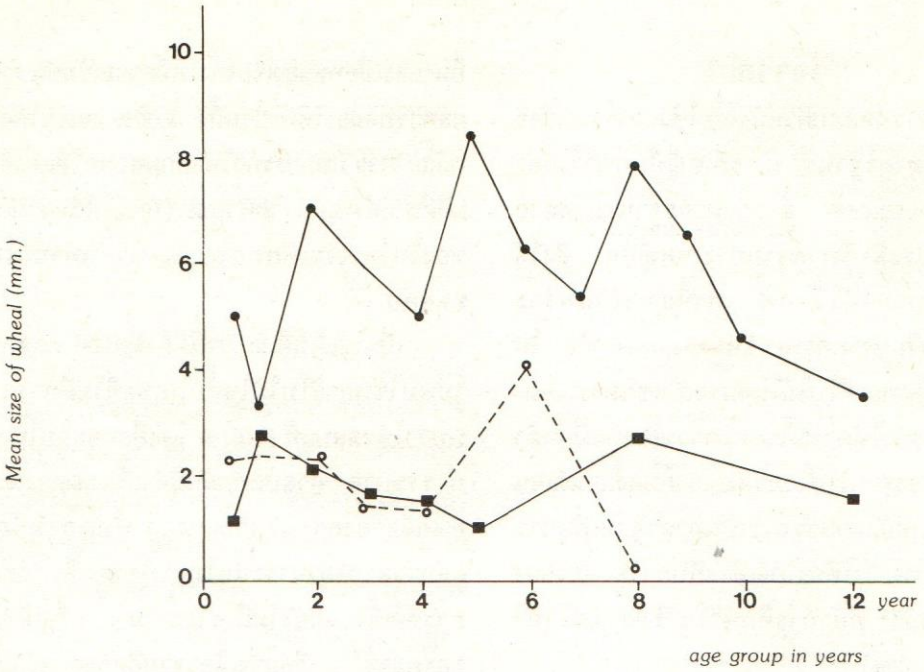

Fig.1 Mean size of wheal in cattle infected with liver fluke in endemic area compared with uninfected cattle in non-endemic area at various ages

●——● *Liver fluke antigen (Japan) testing in endemic area*
■——■ *Liver fluke antigen testing in non-endemic area*
o·····o *FFA (1 mg/ml) testing in non-endemic area*

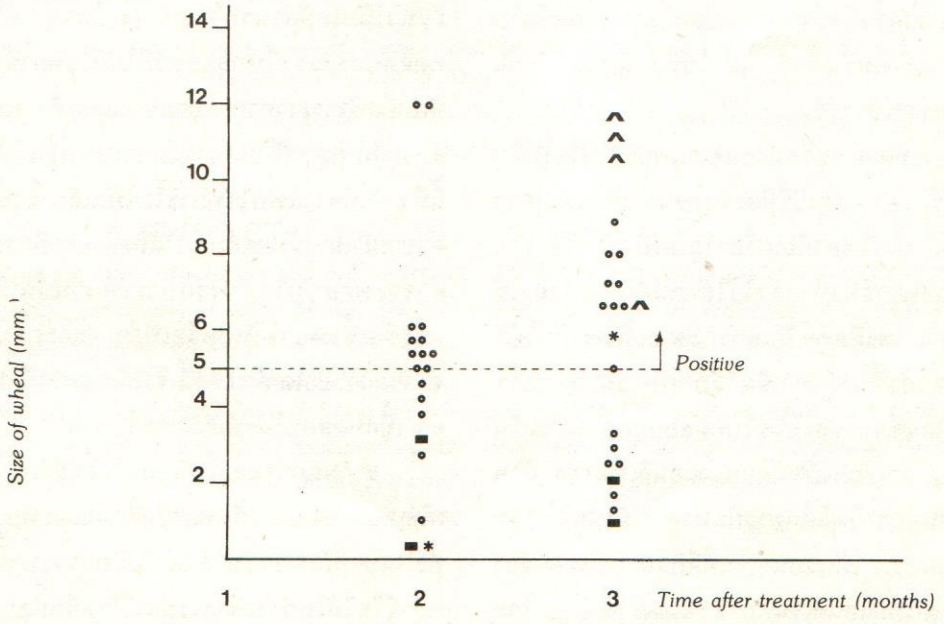

Fig.2 Size of wheal induced by FFA (1 mg/ml.) in each cattle at 2 and 3 month after treatment

• *No liver fluke egg (None, Rf.)* ^ *Liver fluke* ■ *Nematode* * *Cestode*

วิจารณ์

จากการทดสอบผิวหนังโดยใช้แอนติเจนพยาธิใบไม้ในตับมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่นพบว่าให้ค่าบวกแท้เพียง 69.66% ต่ำกว่ามาตรฐานของหน่วยตรวจสอบประสิทธิภาพจากประเทศญี่ปุ่น ซึ่งได้กำหนดค่าบวกแท้ไว้ 80% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอนติเจนเตรียมจากตัวพยาธิต่าง *species* กัน ในประเทศญี่ปุ่นพยาธิใบไม้ในตับจะเป็นชนิด *Fasciola hepatica* จึงทำให้ความไวและความเฉพาะมีค่าต่ำ หรืออาจเนื่องจากใกล้เวลาหมดอายุของแอนติเจน อย่างไรก็ตามยังสามารถใช้เป็นมาตรฐานเพื่อการศึกษานี้ได้ เพราะให้ค่าใกล้เคียงกับการทดลองของรำพึง และคณะ ที่ทำการศึกษาในโรงฆ่าสัตว์ (ค่าบวกแท้ 67.92%)

การทดลองนี้ใช้วัดการบวมเพิ่มขึ้นเป็นมิลลิเมตร ไม่ได้วัดเป็นพื้นที่ (ตารางมิลลิเมตร) ทั้งนี้ เพื่อสะดวกในการนำไปใช้ในท้องที่ที่ต้องการความเร็วในการอ่านผล แต่บางครั้งอาจเกิดผิดพลาดได้ เนื่องจากเทคนิคการใช้คาลิปเปอร์ และปริมาณของแอนติเจนที่ฉีดเข้าผิวหนังจริง ๆ แต่ถ้าใช้การสังเกตเมื่อทำบ่อยครั้งก็จะสามารถบอกได้ว่าบวกหรือไม่ ถ้าค่าบวมที่เพิ่มขึ้นก้ำกึ่ง เมื่อใช้นิ้ว สัมผัสบริเวณที่บวมจะค่อนข้างแข็ง

การทดลองเตรียมแอนติเจนพยาธิใบไม้ในตับ พบว่าวิธี *FFA* เป็นวิธีที่สะดวกและเตรียมง่ายกว่าวิธี *LFA* ซึ่งต้องอาศัยเครื่องไลโอฟิไลซ์ วิธี *LFA* จะเก็บผงพยาธิที่แห้งแล้วไว้ได้นานกว่าจะนำมาใช้แบบ *FFA* แต่เมื่อทำเป็นสารละลายแล้วจะเก็บให้มีปริมาณโปรตีนอยู่เท่าเดิมได้ยาก และจากการเจือจางแอนติเจนแต่ละชนิดไปทดสอบทุกความเข้มข้นของ *LFA* ค่าบวมเฉลี่ยน้อยกว่าแอนติเจน *FFA* ส่วนเปอร์เซ็นต์บวกไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงเลือกแอนติเจน *FFA* เป็นแอนติเจนที่ดีที่สุด ผลสอดคล้องกับการเตรียมแอนติเจนพยาธิ *Fasciola hepatica* โดยวิธีต่าง ๆ ของ *Farrell* และคณะ (1981) เพื่อนำไปตรวจด้วยวิธี *ELISA* ผลการทดสอบสรุปว่า วิธีเตรียมแอนติเจนแบบ *FFA* นั้น ให้ผลดีกว่าแอนติเจนชนิดอื่น และเมื่อทดลองเจือจางให้มีความเข้มข้น *1 mg/ml.* ผลการทดลองให้ค่าบวกถึง 90.00% และยังให้ค่าบวมเฉลี่ย 7.39 มม. ซึ่งทำให้แยกผลบวกได้เด่นชัดจากผลลบ แต่ *Pautrizel* และคณะ (1962) ใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนเพียง *0.03 mg/ml.* เท่านั้นในการทดสอบ

เมื่อใช้แอนติเจน *FFA 1 mg/ml.* ทดสอบโคที่ไม่พบไข่พยาธิใบไม้ในตับในเขตที่ไม่มีการระบาด พบว่าให้ผลลบแท้ 86.67% แต่เมื่อทดสอบในเขตที่มีการระบาด ค่าลบแท้กลับมีค่าเพียง 58.33% และค่าเฉลี่ยของการบวมก็มากกว่า ทั้งนี้ อาจเนื่องจากผลการตรวจอุจจาระนั้นไม่พบไข่พยาธิ แต่สัตว์มีการติดเชื้อ แต่ยังไม่ถึงระยะเต็มวัย หรือเกิดอุดตันของพยาธิ[2] หรืออาจเนื่องจากอิทธิพลของภูมิคุ้มกันที่ยังคงมีอยู่ในสัตว์หลังจากถ่ายพยาธิแล้ว เพราะเป็นเขตที่มีการรักษาอยู่เสมอ เมื่อได้ทดสอบทางผิวหนังซ้ำหลังการรักษาเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าโคยังจะคงให้ผลบวกอยู่เกิน 50% ทุกเดือน โดยเฉพาะเดือนแรกจะให้เปอร์เซ็นต์บวกสูง และเริ่มลดลงในเดือนที่สอง ส่วนในเดือนที่สาม ค่าบวกจะลดลงเหลือเพียง 55% มีแนวโน้มใกล้ค่าบวกไม่แท้ (41.67%) ที่ใช้ *FFA* ทดสอบครั้งแรกในกลุ่มสัตว์ที่ไม่มีไข่พยาธิใบไม้ในตับ เมื่อพิจารณาค่าการบวมของแต่ละตัว จะแบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มหนึ่งมีแนวโน้มบวกมากขึ้น ในจำนวนนี้มี 4 ตัวที่ตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในตับ ส่วนอีกกลุ่มค่าบวมมีแนวโน้มลดลง ถ้าได้ติดตามผลอีกระยะหนึ่งอาจจะพอสรุปได้ว่าพวกบวมเพิ่มขึ้นนั้นเนื่องจากการติดเชื้อพยาธิใหม่หรือเปล่า และกลุ่มที่ลดลงจะให้ผลลบเมื่อใด ด้วยเหตุนี้ จึงให้ค่าลบแท้มีเปอร์เซ็นต์ต่ำ เมื่อทดสอบในเขตที่มีการระบาด

จากผลการทดลองพบว่า แอนติเจน *FFA* ไม่เกิด *cross reaction* กับพยาธิตัวกลมและพยาธิตัวตืดทั้งในเขตที่มีการระบาดและไม่มีการระบาด ส่วนพยาธิใบไม้ในกระเพาะจะมีผลบ้างเล็กน้อย เพราะทำให้เกิดผลบวกไม่แท้ถึง 13.33% ในโคที่ไม่ติดเชื้อพยาธิในเขตที่ไม่มีการระบาด การแก้ไขอาจจะต้องมีการศึกษาการผลิตแอนติเจนให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการ

ใช้ *Gel Chromatography* แยกส่วนของสารละลายแอนติเจน และนำแต่ละส่วนไปทดสอบหาความเฉพาะ หรือทำ *tissue culture* พยาธิสกัดเอาเฉพาะเอนไซม์หรือสารคัดหลั่งต่าง ๆ มาใช้ทดสอบ ซึ่งกำลังศึกษากันมากในขณะนี้[4]

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทดลองขอขอบพระคุณปศุสัตว์จังหวัดพัทลุง ปศุสัตว์อำเภอเมืองพัทลุง และ เจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายปาราสิตวิทยาส่วนกลาง ที่ช่วยให้งานบรรลุเป้าหมาย ท้ายสุด ขอขอบพระคุณคุณนิมิตร ไตรวนาธรรม หัวหน้าศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ ที่สนับสนุนงานจนแล้วเสร็จ

เอกสารอ้างอิง

1. รำพึง ดิสสะมาน, ปิยะ อรัณยกานนท์, กิจ ธีระพัฒน์, และ พิบูล ไชยอนันต์. 2506 รายงานเบื้องต้นการทำแอนติเจนเพื่อใช้ทดสอบผิวหนังกระบือที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ในตับ. สัตวแพทยสาร. 14(2):91-94.

2. Brown, H.W. 1975. Basic Clinical Parasitology. Appleton-Century Grafts, New York, 343 pages.

3. Farrell, J.; Shen, D.T.; Wescott, R.B.; and Lang, B.Z. 1981. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Fasciola hepatica Infection in Cattle. Am. J. Vet. Res. 42(2):237.

4. Kagan, I.G. 1979. Diagnoestic, Epidemiologic, and Experimental Parasitology: Immunologic Aspects. Am. Trop. Med Hyg. 28(3):429-439.

5. Malex, E.A. 1980. Snail-transmitted parasitic diseases. Vol. I. CRC. Press, Inc., Boca Raton, Florida, 390 pages.

6. Pautrizel, R.; Bailenger, J.; Duret, J.; and Trimboneg, J. 1962. Utiization des antigenes distomales de lipidee dans le diagnosis alergigue de destomiasis de Fasciola hepatica. Rev. Immuno. 26:167.

7. Pellegrino, J. 1958. The intradermal test in the diagnosis of bilharziasis. Bull. W.H.O. 18:945-961.

8. Sadun, E.H.; Walton, B.C.; Buck, A.A.; and Lee, B.K. 1959. The use of purified antigens in the diagnosis of Clonorchis sinensis by means of intradermal and complement fixation tests. J. Parasito. 45(2):129.

Antigen Preparation and Intradermal Test for the Detection of Fascioliasis in Cattle

Sompong Piriyayon[1], Usa Chethanon, Wongkwan Jitnupong[1], Tasanee Chompoochan[2], Chainarong Namkhem[1], Weena Mukdaskulpiban[1]

[1]Southern Veterinary Research and Diagnostic Laboratory Center, Tung-Song, Nakhon si Thammarat, 80110, Thailand

[2]Parasitology section, Research Division, Department of Livestock Development, Phayathai road, Bangkok 10900, Thailand.

ABSTRACT

This experiment was carried out in order to diagnose fascioliasis in cattle by intradermal test using two kinds of adult worm antigen. One was freshly collected fluke antigen (FFA), the other was Lyophilized fluke antigen (LFA). The best antigen which gave positive result correlated to fecal examination was FFA containing protein 1 mg/ml. In the endemic area, 90% of egg-positive cattle showed the reaction and 58.33% of egg-negative cattle did not react. On the other hand, false positive cattle from the nonendemic area were 13.33%. After treatment, the positive result had remained for some period due to their antibody which may be one of the errors in the field test in the endemic area.