

## บทนำ

โรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในคนมีสาเหตุจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ *Fasciola* spp. ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ตับในสัตว์พวก วัว ควาย แพะ แกะ ชนิดที่มีรายงานทำให้เกิดโรคในคนได้แก่ *Fasciola hepatica* และ *F. gigantica* ในประเทศไทย จากการสำรวจอุจจาระสัตว์เลี้ยง วัว ควาย พบว่า ร้อยละ 80 เป็นไข่ของ *F. gigantica* (Bhodhi-ngoen, 1982; สุวัชร วัชรเสถียร 2522) ผู้ป่วย fascioliasis เท่าที่มีรายงานจากทั่วโลกพบไม่ต่ำกว่า 100 ราย (Naquira-Vidoso and Marcial-Rojas, 1975; Clay and Straight, 1961; Facey and Marsden, 1960; Hadden and Pascarelli, 1967; Hardman et al, 1970) สำหรับในประเทศไทยพบผู้ป่วย fascioliasis รายแรกในปี พ.ศ. 2510 (Buranasin and Harinasuta, 1970) เป็นผู้ป่วยเพศหญิง อายุ 23 ปี ที่จังหวัดนครราชสีมา ในปี 2533 วัฒนา แสงกิต ได้รวบรวม fascioliasis ที่รายงานในผู้ป่วยคนไทยทั้งหมด 25 ราย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 ถึง พ.ศ. 2533 คาดว่าในประเทศไทยคงมีผู้ป่วยไม่ต่ำกว่า 30 ราย ในผู้ป่วย 25 ราย มี 17 รายที่วินิจฉัยผู้ป่วยโดยการผ่าตัด โดยที่เป็นผู้ป่วยเพศชาย 2 ราย และหญิง 23 ราย มีอายุต่ำสุด 9 ปี สูงสุด 71 ปี (เฉลี่ย 40 ปี) อาชีพส่วนใหญ่ทำนา ภูมิลำเนาผู้ป่วยพบอยู่ในภาคอีสาน 19 ราย พบมากที่สุดที่จังหวัดขอนแก่น 5 ราย ชัยภูมิ 4 ราย อุรธานี 3 ราย กาฬสินธุ์ 2 ราย นครราชสีมา 2 ราย สกลนคร 2 ราย และ ร้อยเอ็ด 1 ราย นอกนั้นมาจากภาคกลางและภาคเหนือคือ กรุงเทพฯ อุดรฯ สุโขทัย พิษณุโลก และเชียงใหม่ พยาธิที่พบเป็น *F. gigantica* 13 รายและ *F. hepatica* 6 ราย โดยพบไข่ *F. gigantica* 3 ราย และไม่ระบุ species 3 ราย พยาธิ สภาพพบทั้งนอกตำแหน่งปกติ (ectopic fascioliasis) ทำให้เกิดอาการทางผิวหนัง (สุวัชร วัชรเสถียร และวิเชียร สุนทรศิริ, 2522) เล็ดออกในช่องท้อง (วิกิจ วีรานูวัตต์ และคณะ, 2524) ก้อนในช่องท้องบริเวณ omentum (วิรุทธ แดนสีแก้ว และคณะ, 2533) ก้อนในตับอ่อน (Chitchang et al, 1982) ฝักเต้านม (Khamboonruang and Sakulwong, 1971) พ.ศ. 2527 ไพโรจน์ ปาริชาติกานนท์ และอำนาจ สารสาส ได้รายงานผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย ที่พบพยาธิใบไม้ในท่อน้ำดี ซึ่งเป็นตำแหน่งปกติ (usual habitat) ทำให้เกิดการโป่งพองของท่อน้ำดีในตับและตับอ่อน ท่อน้ำดีมีการอุดตันจากพยาธิใบไม้ สมาน เทศนา และคณะ (Tesana et al, 1989) ได้รายงานผู้ป่วย fascioliasis สองราย ซึ่งมี acute cholecystitis โรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis นี้ นับว่าเป็นโรคที่ทำอันตรายถึงชีวิตแก่ผู้ป่วย (วัฒนา แสงกิต, 2533; เพ็ญศรี โค้วสุวรรณ และคณะ, 2529) และจากรายงานมาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า จำนวนผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ได้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนน่าเป็นห่วงและเป็นปัญหาทางสาธารณสุข นอกจากนั้น พยาธิชนิดนี้ ยังทำความเดือดร้อนแก่ชาวนาซึ่งเป็นเจ้าของวัวควายเกือบทั้งหมดในภาคอีสาน และทำความเสียหายต่อผลผลิตปศุสัตว์ของประเทศ (รำพึง ดิสสะมาน, 2498; Dissamarn, 1955, 1961; Usanagornkul and Sukhapesna, 1980; Loehr, 1982) วัว-ควายที่ป่วยด้วยโรคนี้อย่างเรื้อรังจะมีอาการโลหิตจาง บวมได้ที่คาง อุจจาระเหลวดำ อาหารไม่ย่อยอยู่บ่อย ๆ ผอมแห้งจนอาจตาย หรือจำต้องฆ่าในที่สุด บางครั้งอาจเกิดโรคในลักษณะเฉียบพลัน หรือถึง

เจ็บพลัน ระยะเวลาการป่วยสั้น โดยเกิดสภาพโลหิตจางอย่างรุนแรงถึงขั้น แล้วจบลงด้วยการตายภายในเวลาไม่กี่วัน (Srikitjakam, 1986) ในต่างประเทศมีรายงานการเกิดโรคพยาธินี้ระบาดในบริเวณที่มีอุบัติการณ์ของพยาธิในสัตว์เลี้ยงสูง (Ashton et al, 1970; Hardman et al, 1970) ในประเทศไทยอุบัติการณ์ของพยาธิในสัตว์เลี้ยงพบร้อยละ 41.9 และในควายสูงร้อยละ 58.1 (Buranasin and Harinasuta, 1970) ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าเป็นโรคพยาธินี้ถึงร้อยละ 50 (วิจิตร สุขเพณีส, 2523) ซึ่งอาจจะสัมพันธ์กับการพบผู้ป่วยในภูมิภาคนี้สูง และลักษณะนิสัยการบริโภคของชาวบ้านที่นิยมรับประทานผักสดทำให้ได้รับตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าไปวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola spp.* (Beaver et al, 1984) มีดังนี้ ไข่พยาธิที่ปนออกมากับอุจจาระสัตว์เลี้ยง จะเจริญเป็นตัวอ่อนในหอยน้ำจืด (*Lymnaea spp.*) ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางและใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์ เจริญเป็นตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียอยู่ในถุงหุ้มเกาะติดตามพืชน้ำ เช่น ผักบุ้ง ผักกระเฉด ผักแว่น ผักก้นจอก (ผักตบชวาไทย) เมื่อคนหรือสัตว์ได้รับตัวอ่อนระยะติดต่อนี้เข้าไป น้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นจะย่อยถุงหุ้ม ตัวอ่อนพยาธิจะไชทะลุผนังลำไส้เข้าสู่ช่องท้องไปที่ตับ อาจมีเลือดออกจากการฉีกขาดของหลอดเลือด บางรายมีเลือดตกช่องท้อง ลักษณะตับที่เห็นด้วยตาเปล่าพบตับโต นิ่มจนเกือบละลาย มีก้อน (nodule) อยู่บนตับหลายอัน เนื้อตับเป็นโพรงซึ่งเต็มไปด้วยเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว มีการตายของเนื้อตับและการอุดตันของหลอดเลือดดำและแดงในตับ อาการระยะแรก (acute invasive phase) นี้เรียกว่า fasciolitic hepatitis หรือ febrile fasciolitic eosinophilic syndrome ผู้ป่วยจะมีไข้ ท้องอืด ปวดท้อง มักปวดบริเวณใต้ชายโครงขวา หรือใต้ลิ้นปี่ ตับโต กดเจ็บ ผู้ป่วยบางรายเกิดลมพิษหรือผื่นคันตามผิวหนังได้ พยาธิอาจเดินทางไปอยู่ที่อวัยวะอื่นในร่างกายโดยไม่เข้าสู่ตับหรือท่อน้ำดี เกิดเป็น ectopic fascioliasis ซึ่งพบได้เกือบทุกแห่งของร่างกายดังที่กล่าวมาแล้ว ระยะต่อมาเมื่อพยาธิเดินทางไปถึงท่อน้ำดี (chronic phase) พยาธิสภาพของเนื้อตับดีขึ้น ทำให้อาการต่าง ๆ ดีขึ้นระยะหนึ่ง ต่อมาจึงเกิดอาการของการอุดตันหรือ การอักเสบของท่อน้ำดี มีการโป่งพอง และเพิ่มจำนวนของเซลล์ในท่อน้ำดี และอาจจะเกิดนิ่วในถุงน้ำดี ถุงน้ำดีมีลักษณะการอักเสบเรื้อรัง ส่วนพยาธิสภาพที่ตับอาจปกติ หรือมีการคั่งของน้ำดีมีก้อนนูน (nodule) ขนาดเล็กที่แคปซูลหุ้มตับ (เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับตับแข็งชนิด biliary cirrhosis ในสัตว์) อาการในระยะนี้ไม่ค่อยรุนแรง ผู้ป่วยยังปวดท้องอยู่มีท้องอืดแน่นท้องคลื่นไส้ อาเจียน อาการคล้ายผู้ป่วยที่เป็นนิ่วในถุงน้ำดี ตับโต

โรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis เป็นโรคที่ทำอันตรายต่อผู้ป่วยจนถึงแก่ชีวิตได้ถ้าได้รับการวินิจฉัยโรคไม่ทันท่วงที การวินิจฉัยโรค fascioliasis ที่ถูกต้องที่สุดคือผ่าตัด พบตัวพยาธิหรือไข่พยาธิ การวินิจฉัยจากอัลตราซาวด์หรือเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT) ช่วยบอกว่ามีฝีหนองในตับ แต่ยังไม่มีความเฉพาะเจาะจงว่าเป็น hypoechoic หรือ hyperechoic สำหรับ endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) ช่วยวินิจฉัยได้ ถ้าพบเงาที่มีลักษณะคล้ายพยาธิใบไม้ (วัฒนา แสงกิจ, 2533)

การตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระหรือน้ำดี จะช่วยในการวินิจฉัยโรคได้ แต่ส่วนใหญ่มักจะพบโดยบังเอิญ จากการตรวจชิ้นเนื้อ ศัลยกรรม หรือจากการตรวจซากศพ เนื่องจากลักษณะของไข่พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. มีความคล้ายคลึงกับไข่พยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดกลาง *Echinostoma* spp. มาก ทำให้อาจวินิจฉัยผิดพลาดได้นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อจำนวนน้อย หรือในรายที่มีการติดเชื้อนอกตับ (ectopic fascioliasis) จะตรวจไม่พบไข่พยาธิในอุจจาระ ในคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรคพยาธินี้ แต่รับประทานเนื้อตับที่มีพยาธิตัวแก่นี้เข้าไป ก็สามารถตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระได้ เรียกว่าเป็น false fascioliasis นอกจากนั้นระยะฟักตัวของโรค fascioliasis ใช้เวลาประมาณ 3-4 เดือน หลังจากรับประทานตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย จึงจะสามารถตรวจพบไข่พยาธิได้ในอุจจาระ ซึ่งทำให้การวินิจฉัยผิดพลาด การรักษาอาจจะไม่ถูกต้องทันกับความรุนแรงของโรค เนื่องจากถ้าปล่อยให้พยาธิไชผ่านอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ การวินิจฉัยโรคทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยา จึงนับว่ามีประโยชน์อย่างมาก ได้มีการศึกษาเพื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีทั้งในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับวัวควาย (fascioliasis) หลายวิธี เช่นวิธี Indirect hemagglutination test (IHA), วิธี Counterimmunoelectrophoresis (CIEP) (Mansour et al, 1983), วิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Hillyer et al, 1985; Sinclair and Wassall, 1988; Langley and Hillyer, 1989; Youssef and Mansour, 1991) และวิธี immunoprecipitation (Swarup et al, 1987) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะแตกต่างกันขึ้นกับวิธีการ และชนิดของแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบ แอนติเจนที่เตรียมได้จากสารขับถ่ายคัดหลั่ง (excretory-secretory antigen) จากตัวปรสิตเชื่อว่าเป็นแอนติเจนที่ดี เพราะเป็นแอนติเจนที่จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ขณะที่ปรสิตอยู่ในร่างกายของโฮสต์ การศึกษาเพื่อหาคุณค่าของการใช้แอนติเจนของสารขับถ่ายคัดหลั่งจากตัวพยาธิมาวินิจฉัยจะนำไปสู่การพัฒนา วิธีการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยาของโรคปรสิตนั้น ๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1983 Mansour และคณะ ได้ใช้แอนติเจนชนิดสกัดจากตัวแก่ของ *Fasciola gigantica* (crude adult extract) ในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีในคน โดยวิธี indirect hemagglutination test (IHA) และ counterimmunoelectrophoresis (CIEP) แต่พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวกับชีรุ่มผู้ป่วย schistosomiasis และ amoebiasis Hillyer และคณะในปี ค.ศ. 1985 ได้รายงานวิธี ELISA ว่าสามารถใช้วัดระดับแอนติบอดีในวัวที่เป็นโรค fascioliasis ได้ภายใน 6-8 อาทิตย์ ภายหลังติดเชื้อในปี ค.ศ. 1987 Espino และคณะได้ใช้แอนติเจนชนิดขั้วท้ายคัณฑ์หลังของ *F. hepatica* มาใช้วินิจฉัยหาแอนติบอดีในชีรุ่มผู้ป่วย fascioliasis พบว่าสามารถใช้วินิจฉัยแยกออกจากชีรุ่ม ผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้เลือด (schistosomiasis), clonorchiasis และโรคพยาธิอื่น ๆ และในปี ค.ศ. 1988 Rivera Marrero และคณะ ได้แยกส่วนของแอนติเจนชนิดขั้วท้ายคัณฑ์หลังของ *F. hepatica* โดยวิธี gel filtration โดยใช้ Sephadex G - 75 พบว่า fraction I มีคุณค่าเพียงพอในการวินิจฉัยโรค ใน ค.ศ. 1989 ต่อมา Langley and Hillyer ได้รายงานว่าสามารถตรวจวัดระดับแอนติเจน ของพยาธิใบไม้ *F. hepatica* ในชีรุ่มหนูถีบจักรโดยวิธี Two-site enzyme-linked immunosorbent assays โดยสามารถตรวจวัดได้ภายใน 1 อาทิตย์ ภายหลังการติดเชื้อ ใน ค.ศ. 1988 Sinclair และ Wassall สามารถนำ metabolic product ของ *F. hepatica* มาใช้เป็นแอนติเจนในการวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยาในวัว โดยวิธี ELISA อนึ่งใน ค.ศ. 1991 Youssef และ Mansour ได้รายงานการใช้ partially purified *F. gigantica* worm antigens ในการประเมินการตรวจวัดแอนติบอดีทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลือง ต่อผู้ป่วยโรค fascioliasis โดยวิธี ELISA พบว่า fractions ที่ 2 และที่ 10 ของ gel-filtration มีความจำเพาะต่อชีรุ่มของคนไข้ fascioliasis จากที่มีรายงานมาทั้งหมด มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการใช้แอนติเจนชนิดขั้วท้ายคัณฑ์หลังของพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* มาใช้วินิจฉัยแยกโรค fascioliasis (Santiago and Hillyer, 1988 ; Hillyer et al, 1992 ; Espino et al., 1992) แต่มีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับ การใช้แอนติเจนชนิดสารขั้วท้ายคัณฑ์หลังของ *F. gigantica* และรวมทั้งการเปรียบเทียบแอนติเจนชนิดสารขั้วท้ายคัณฑ์หลังและชนิดสารสกัดจากตัวแก่ของ *Fasciola gigantica* มาใช้วินิจฉัยโรค fascioliasis ในคนเลย ผู้วิจัยจึงดำริที่จะนำแอนติเจนชนิดสารขั้วท้ายคัณฑ์หลังและชนิดสกัดจากพยาธิตัวแก่ มาใช้ในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis เพื่อหาแอนติเจนชนิดที่ดีที่สุด เพื่อนำไปสู่การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ให้ถูกต้องและแม่นยำต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบแอนติเจนสกัดจากตัวแก่ชนิดหยาบ (crude somatic adult worm extract antigen) และแอนติเจนจากสารขับถ่ายคัดหลัง (excretory-secretory antigen) ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* เพื่อใช้วินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในคนโดยวิธี ELISA

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. หากการทำการศึกษานี้ประสบความสำเร็จ สามารถพัฒนานำแอนติเจนชนิดที่ดี ไปใช้ตรวจวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในคนโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองต่อไป
2. สามารถนำแอนติเจนชนิดที่ดีที่ผ่านการทดสอบนำไปใช้ทั่วประเทศ ไม่เพียงแต่หน่วยงานผู้ใช้โดยตรง โรงพยาบาลในเครือข่าย ของกระทรวงสาธารณสุข อาจจะรวมถึงพัฒนานำไปใช้ในศูนย์วิจัย ชันสูตรโรคสัตว์ต่าง ๆ เพื่อวินิจฉัยโรค fascioliasis ในสัตว์ก็ได้

### ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บและแยกชนิดตัวแก่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จากท่อน้ำดีของวัว
2. เตรียมแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัดหลัง (excretory-secretory, ES antigen)
3. เตรียมแอนติเจนสกัดจากพยาธิตัวแก่ชนิดหยาบ (crude somatic adult worm extract antigen)
4. เก็บซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis
5. เก็บซีรัมคนปกติที่ปลอดจากเชื้อปรสิต
6. เก็บซีรัมผู้ป่วยโรคปรสิตอื่น ๆ นอกเหนือไปจากผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis
7. พัฒนาวีธี ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะ (specific antibody) ต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในซีรัมผู้ป่วย โดยใช้แอนติเจนทั้งชนิดสกัดจากตัวแก่ชนิดหยาบ และชนิดสารขับถ่ายคัดหลังจากตัวพยาธิ
8. นำวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นในข้อ 7 มาทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis, ซีรัมคนปกติ และซีรัมผู้ป่วยโรคปรสิตชนิดอื่น ๆ
9. วิเคราะห์ข้อมูล

## วัสดุและวิธีการวิจัย

### 1. การเตรียมตัวแก่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

ตัวแก่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* จะเก็บจากท่อน้ำดีของวัวที่เป็นโรค fascioliasis จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดขอนแก่น ใส่ในขวดที่มีน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ปลอดเชื้อโรค เลือกเฉพาะพยาธิที่มีชีวิตสมบูรณ์ ไม่มีรอยฉีกขาด มีการเคลื่อนไหวดี นำมาล้างให้สะอาดใน 0.85% NaCl ที่ปลอดเชื้อโรคและมี penicillin G 100 unit/ml และ streptomycin 100  $\mu$ g/ml ทำการล้างประมาณ 5 ครั้ง ทำโดยวิธีปลอดเชื้อโรค (sterile technique)

### 2. ทำการแยกชนิดของพยาธิใบไม้ตับที่เก็บได้ว่าเป็น *F. gigantica*

ตามปกติแล้วพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. ที่พบในท่อน้ำดีของวัวควายซึ่งพบระบาดในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นชนิด *F. gigantica* (Bhodhi-ngoen, 1982; สุวัชร วัชรเสถียร 2522) แต่เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นชนิด *F. gigantica* จริงจึงได้สุ่มพยาธิบางส่วนมาตรึงสภาพด้วย alcohol-formalin-acetic acid (AFA) หลังจากล้าง AFA ออกแล้ว dehydrate ใน 30%, 50%, และ 70% alcohol ตามลำดับ ทำการย้อมด้วยสี carmine และ destain จนได้สีชมพูสวยงาม แล้ว mount ด้วยน้ำยา permount ทำเป็นสไลด์ถาวร จากนั้นตรวจแยกชนิดว่าเป็น *F. gigantica* จริง โดยวินิจฉัยตามเกณฑ์ของ Watanabe ในปี ค.ศ. 1965 และ Sahba และคณะ ในปี ค.ศ. 1972

### 3. การเตรียมแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica*

#### 3.1 การเตรียมแอนติเจนชนิดสารจับถ่ายคัตหลัง

เตรียมตามวิธีของ Tui และคณะในปี ค.ศ. 1982 โดยนำตัวแก่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ที่ล้างสะอาดใน 0.85% NaCl ปราศจากเชื้อโรค และยังมีชีวิตสมบูรณ์ดี ไม่มีบาดแผลฉีกขาด มาเลี้ยงในขวดเลี้ยงขนาด 200 ml ที่มีอาหารเลี้ยงพยาธิซึ่งประกอบด้วย 10.4 g/l RPMI 1640 (GIBCO BRL Laboratories), 25mM HEPES (Sigma), 25mM  $\text{NaHCO}_3$ , 100 unit/ml penicillin G, และ 100  $\mu$ g/ml streptomycin ใช้อาหารเลี้ยงพยาธิประมาณ 2 ml/ตัว ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อโรคในตู้อบอุณหภูมิ 37°C ที่มี 5%  $\text{CO}_2$  ในสภาวะบรรยากาศ หลังการเพาะเลี้ยง 4 ชั่วโมง เติมน้ำเลี้ยงพยาธิทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงพยาธิใหม่ลงไปเท่าเดิม ทำการเก็บน้ำเลี้ยงพยาธิประมาณ 4 ครั้ง ภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเพาะเลี้ยง รวมน้ำเลี้ยงพยาธิที่เก็บได้ นำไปปั่นที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที เพื่อแยกไขพยาธิทิ้งไป เก็บน้ำเลี้ยงส่วนบนที่มีแอนติเจนชนิดสารจับถ่ายคัตหลัง และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Diaflo<sup>®</sup> ultrafiltration membrane (Amicon Division, W.R. Grace & Co. USA) ซึ่งมี molecular weight (MW) cut-off membrane 10 KDa ทำที่อุณหภูมิ 4°C

จนปริมาตรลดลงตามต้องการ และทำการกำจัดอาหารเลี้ยงพยาธิออกจากแอนติเจนโดยนำไป dialyse ในน้ำกลั่น หลังจากนั้นหาปริมาณโปรตีนของแอนติเจนที่เตรียมได้โดยวิธี Folin-phenol (Lowry *et al.* 1951) แบ่งใส่หลอดปั่นขนาด 1.5 ml นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ค่อยด้วยอุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  จากนั้นทำให้แห้ง (freeze dry) เก็บแอนติเจนที่เตรียมได้แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้งาน

### 3.2 การเตรียมแอนติเจนสกัดจากพยาธิตัวแก่ชนิดหยาบ

การเตรียมแอนติเจนสกัดจากตัวแก่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ชนิดหยาบ ได้ทำตามวิธีของ Maleewong และคณะในปี ค.ศ. 1991 เริ่มจากนำตัวแก่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายกักหลังแล้ว และพยาธิยังมีชีวิตอยู่มาบดใน glass tissue grinder ที่มี 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ 0.1 mM N-tosyl-L phenylamine chloromethyl ketone (TPCK) บดตัวพยาธิจนละเอียด ทำในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา นำส่วนผสมที่ได้มาทำให้ cell แตกดียิ่งขึ้นโดยใช้คลื่นความถี่สูง (ultrasonic disintegrator) (Lab-line ultratip) ใช้ความถี่สูงสุดครั้งละ 1 นาที พัก 1 นาที จำนวน 10 ครั้ง ทำในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา นำส่วนผสมทั้งหมดที่ได้ไปปั่นที่  $10,000 \times g$  นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  คือดสารละลายใสส่วนบนซึ่งเป็นแอนติเจนชนิดสกัดจากพยาธิตัวแก่ชนิดหยาบ (crude somatic adult worm extract) จากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีน (Lowry *et al.* 1951) แบ่งใส่หลอดปั่นขนาด 1.5 ml และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้งาน

### 4. การเก็บซีรัมจากคนปกติ และผู้ป่วยโรคต่าง ๆ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเจาะเลือดคนปกติ (healthy control) ผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ผู้ป่วยที่สงสัย (suspected case) ว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ผู้ป่วยโรคปรีติชนิดอื่นๆ รวมทั้งผู้ป่วยโรควัณโรคปอด (pulmonary tuberculosis) โดยทำการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  นาน 30 นาที จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ข้ามคืน ปั่นที่  $500 \times g$  นาน 5 นาที แยกเก็บส่วนซีรัม แบ่งใส่หลอดปั่นขนาด 1.5 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้

#### 4.1 ผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ *fascioliasis* (proven *fascioliasis*)

วินิจฉัยยืนยันได้จากการตรวจพบตัวแก่พยาธิ *F. gigantica* โดยการผ่าตัด มีจำนวน 5 ราย โดยวินิจฉัยตัวหนอนพยาธิตามเกณฑ์ของ Watanabe ในปี ค.ศ. 1965 และ Sahba และคณะ 1972 โดยเกณฑ์ของการวินิจฉัย มีรายละเอียดย่อ ๆ ดังนี้ รูปร่างของ *F. gigantica* ตัวแก่จะยาวและพอมแคบกว่า *F. hepatica* อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง 4.39 ถึง 5.20 Acetabulum ของ *F. gigantica* ใหญ่กว่า oral sucker มีอัตราส่วน 1.5 แขนงของลำไส้ของ *F. gigantica* ชับซ้อนกว่า *F. hepatica* แขนงของ ovary ของ *F. gigantica* มีมากกว่า *F. hepatica* testis แตกแขนงและครอบคลุม 1/2 ของร่าง และมี cuticular spine ใหญ่และหนาที่ฐาน

#### 4.2 ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ *fascioliasis* (suspected *fascioliasis*)

วินิจฉัยโดยอาศัยอาการทางคลินิก (febrile fasciolitic eosinophilic syndrome) (พัฒนา แสงกิจ) ร่วมกับประวัติการรับประทานพืชน้ำ ของผู้ป่วย และ/หรือจากผลการตรวจเลือดในห้องปฏิบัติการ (พัฒนา แสงกิจ) รวมทั้งการตรวจพบไข่พยาธิ *Fasciola* spp. ในอุจจาระ และ/หรือ ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยอัลตราซาวด์ และ/หรือพบเงาที่มีลักษณะคล้ายพยาธิใบไม้ในบริเวณท่อน้ำดีจากการทำ ERCP และมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาฆ่าพยาธิ ผู้ป่วยที่สงสัยว่าน่าจะเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ *fascioliasis* ซึ่งไม่พบตัวพยาธิมีทั้งหมดจำนวน 6 ราย

#### 4.3 คนปกติ (healthy control)

เป็นคนที่สุขภาพร่างกายสมบูรณ์ แข็งแรงและปลอดจากเชื้อปรสิต โดยตรวจไม่พบเชื้อปรสิตใดๆในอุจจาระ เมื่อตรวจด้วยวิธีเข้มข้น (formalin ether concentration method) จำนวน 30 ราย

#### 4.4 ผู้ป่วยโรคปรสิตชนิดอื่น (other parasitosis case)

เป็นผู้ป่วยโรคปรสิตอื่น ๆ ที่ได้รับการวินิจฉัยโดยการพบตัวปรสิตหรือผลผลิตใด ๆ ของปรสิตนั้นในสิ่งส่งตรวจ ซึ่งรับจากผู้ป่วยโรคปรสิตอื่น ๆ ที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะของวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้น มีทั้งหมดจำนวน 105 ราย ประกอบด้วย ผู้ป่วย paragonimiasis 32 ราย, schistosomiasis 7 ราย, cysticercosis 7 ราย, angiostrongyliasis 8 ราย, capillariasis 4 ราย, gnathostomiasis 9 ราย, trichinosis 1 ราย, thelaziasis 1 ราย, strongyloidiasis ร่วมกับการติดเชื้อ *Giardia lamblia* infection 1 ราย, amoebiasis 1 ราย, opisthorchiasis 24 ราย, opisthorchiasis ร่วมกับการติดเชื้อปรสิตอื่น ๆ จำนวน 10 ราย (ได้แก่ติดเชื้อร่วมกับ hookworm 6 ราย; hookworm และ *S. stercoralis* 1 ราย; hookworm และ minute intestinal fluke 1 ราย; *Trichuris trichiura* 2 ราย)



#### 4.5 ผู้ป่วยโรควัณโรคปอด (pulmonary tuberculosis case)

ได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรควัณโรคปอดจริง โดยการตรวจพบเชื้อ acid fast bacilli ในเสมหะ และมีระดับแอนติบอดีใน serum ต่อเชื้อ *M. tuberculosis* สูง จำนวน 18 ราย

#### 4.6 ซีรัมกลุ่มควบคุม (control serum)

เป็นซีรัมที่ใช้เป็นมาตรฐานเพื่อควบคุม (control) ความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ของวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นมา หรือใช้ควบคุมผลการทดสอบที่ทำในแต่ละครั้ง หรือในแต่ละ plate ซึ่งได้แก่ :-

- pooled positive fascioliasis serum : เตรียมได้จากการรวบรวมซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis (proven case fascioliasis) ที่มีอยู่จำนวน 5 ราย ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน

- pooled negative healthy control serum : เตรียมได้จากการรวบรวมซีรัมคนปกติ ที่มีสุขภาพแข็งแรง และปลอดจากเชื้อปรสิตใด ๆ ที่มีอยู่จำนวน 20 รายในปริมาณที่เท่า ๆ กัน

### 5. พัฒนารูปแบบ ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในซีรัม

วิธี indirect ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในซีรัม โดยใช้แอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัสดหลัง และชนิดสกัดจากพยาธิตัวแก่ชนิดหยาบของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ได้ทำตามวิธีของ Voller และคณะ (1976) และวิธีของ Maleewong และคณะ (1990) โดยมีการปรับเปลี่ยนบางประการ และได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น (1) ความเข้มข้นของแอนติเจนทั้งชนิดสารขับถ่ายคัสดหลัง และชนิดสกัดจากพยาธิตัวแก่ชนิดหยาบ ที่ใช้เคลือบ plate (2) ความเจือจางของซีรัมที่ต้องการทดสอบ และ (3) ความเข้มข้นของ anti-human Ig ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase โดยการทำการ checker-board titration กับ pooled positive fascioliasis serum และ pooled negative healthy control serum

สำหรับวิธี indirect ELISA ดังกล่าวมีวิธีทำกล่าวพอสังเขปดังนี้คือ เคลือบ 96-well flat bottom EIA plate (Costar) ด้วยแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัสดหลัง หรือ ชนิดสกัดจากพยาธิตัวแก่ชนิดหยาบ (ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน) และละลายอยู่ใน carbonate coating buffer pH 9.6 แล้วนำ plate เก็บไว้ในกล่องที่มีความชื้นที่อุณหภูมิ 4°C ชั่วครู่ หรือนำไปอุ่นในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการล้างแอนติเจนส่วนเกินออกด้วย phosphate buffered saline ซึ่งมี 0.05% Tween 20 (PBST), pH 7.4 จำนวน 5 ครั้ง แล้วปิด non-specific binding site ของ plate ที่เหลือด้วย 2% bovine serum albumin (BSA) ใน PBST (2% BSA-PBST) ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากครบเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้าง plate จำนวน 5 ครั้งเช่นเดิม แล้วเติม pooled fascioliasis serum หรือ pooled healthy control serum (ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่างๆ กัน) ใน 1% BSA-PBST, pH 7.4 ลง

ไป 100  $\mu$ l/หลุม นำ plate ไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างซีรัมส่วนเกินออกด้วย PBST เช่นเดิมเมื่อครบเวลา จากนั้นเติม goat anti-human IgG (Cappel Laboratories, Westchester, PA) (ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่างๆ กัน) ใน 1% BSA-PBST ปริมาตร 100  $\mu$ l/หลุม นำ plate ไปอุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากล้างด้วย PBST ครั่งสุดท้ายเพื่อกำจัด conjugate ส่วนเกินออกแล้ว จึงเติม orthophenylenediamine tetraacetic acid (OPD) substrate (Sigma) ปริมาตร 100  $\mu$ l/หลุม ปล่อยให้ปฏิกิริยาการเกิดสีดำเนินที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในกล่องมืด หยุดปฏิกิริยาด้วย 50  $\mu$ l/หลุม ของ 8 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> จากนั้นวัดความเข้มของสารละลายสีเหลือง ด้วยเครื่อง ELISA reader (Dynatech MR 5000) ที่ความยาวคลื่น 490 nm

จากนั้นนำค่า ELISA OD ของทั้ง pooled positive fascioliasis และ pooled negative healthy control ที่ได้จากสถานะเดียวกัน มาเปรียบเทียบกัน และพิจารณาเลือกสถานะที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยโรคต่าง ๆ และคนปกติต่อไป

## 6. วิธี ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในซีรัม

จากการทำ chequer-board titration ในข้อ 5 คณะผู้วิจัยได้เลือกสถานะที่เหมาะสมที่สุดคือ ใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนที่เคลือบ plate ที่ 5  $\mu$ g/ml และ 10  $\mu$ g/ml, เลือกใช้ goat anti-human conjugated horseradish peroxidase enzyme ที่เจือจาง 1 : 2000 และ 1 : 1000 สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคืดหลัง และต่อแอนติเจนชนิดสกัดจากตัวแก่พยาธิชนิดหยาบตามลำดับ โดยเจือจางซีรัมที่ทดสอบเป็น 1 : 200 ทำการทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis จำนวน 5 ราย, ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis จำนวน 6 ราย, คนปกติที่ไม่เป็นโรคปรสิต จำนวน 30 ราย, ผู้ป่วยโรคปรสิตชนิดอื่น ๆ ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 4.4 จำนวน 105 ราย, ผู้ป่วยโรคฉี่หนูโรคมด จำนวน 18 ราย โดยซีรัมแต่ละรายจะทำการทดสอบซ้ำ (duplicate) นอกจากนั้นในการทำแต่ละครั้ง หรือในแต่ละ plate จะใช้ซีรัม pooled positive fascioliasis และ pooled negative healthy control เป็นตัวควบคุมความถูกต้องและความแม่นยำของการทดสอบ

สำหรับการอ่านผลการทดสอบ จะใช้ค่า cut-off OD ที่คำนวณจากค่า ELISA OD สูงสุด บวก 4 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของซีรัมผู้ป่วยโรคอื่น นอกเหนือไปจากผู้ป่วยหรือผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ซีรัมรายใดที่ให้ค่า ELISA OD เท่ากับ หรือสูงกว่าค่า cut-off OD ดังกล่าว จะถือว่าให้ผลบวกกับวิธีทดสอบ

## ผลการวิจัย

### 1. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในวิธี ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis

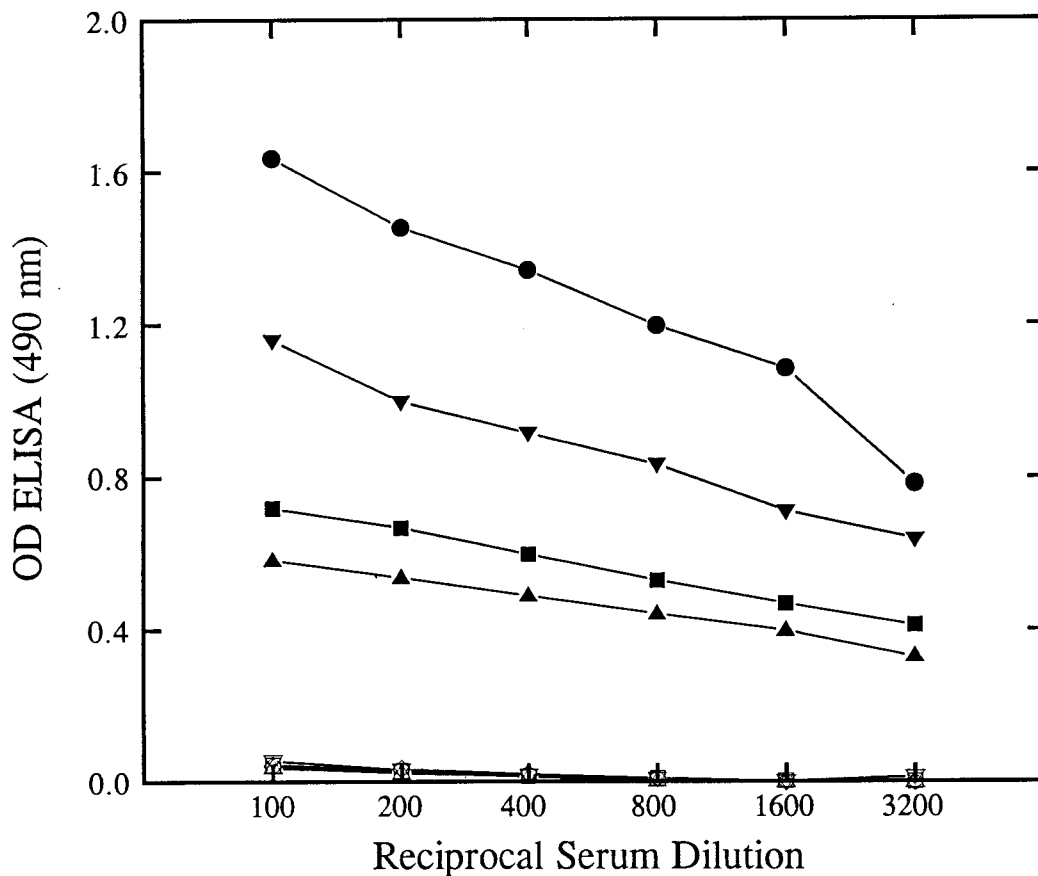
จากการทำ chequer-board titration (ตามวัสดุและวิธีการในข้อ 5) ผลการทดลองดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในซีรัม เมื่อใช้แอนติเจนชนิดสารจับถ่ายคัดหลังเป็นตัวแทนทดสอบ คือใช้แอนติเจนชนิดสารจับถ่ายคัดหลังที่มีความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$ /หลุม เคลือบ plate, เจือจาง goat anti-human IgG labeled horseradish peroxidase enzyme 1 : 2000, และเจือจางซีรัมที่ต้องการทดสอบเป็น 1 : 200

สำหรับผลของ chequer-board titration เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในซีรัม โดยใช้แอนติเจนสกัดจากตัวแก่พยาธิ ชนิดหยาบเป็นตัวแทนทดสอบ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2 และคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้แอนติเจนชนิดสกัดจากตัวแก่พยาธิ ชนิดหยาบที่มีความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$ /หลุม เคลือบ plate, เจือจาง goat anti-human IgG labeled horseradish peroxidase enzyme 1 : 1000, และเจือจางซีรัมที่ต้องการทดสอบเป็น 1 : 200

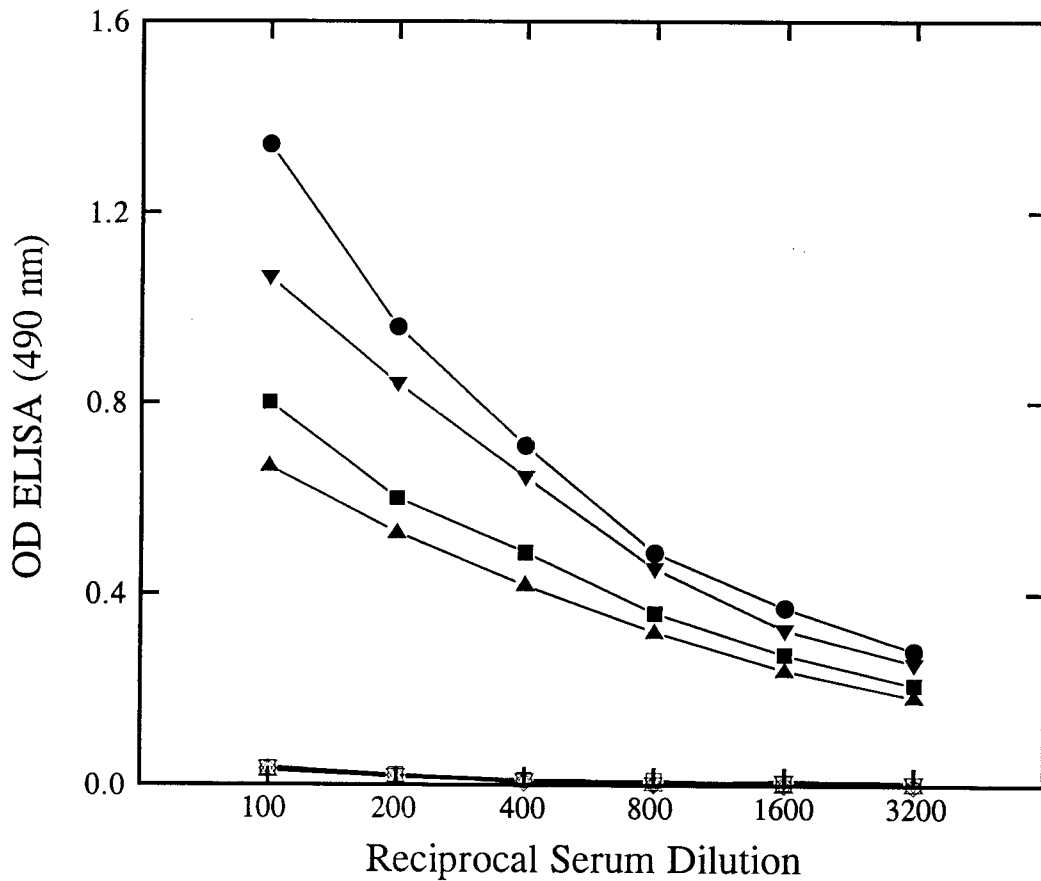
### 2. ผลการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ในซีรัมคน โดยวิธี ELISA

#### 2.1 Indirect ELISA เมื่อใช้แอนติเจนชนิดสารจับถ่ายคัดหลังในการตรวจสอบ

ตามวัสดุและวิธีการในข้อ 6 เมื่อใช้แอนติเจนชนิดสารจับถ่ายคัดหลังของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* เป็นตัวแทนตรวจสอบ ทำกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis จำนวน 5 ราย, ผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis จำนวน 6 ราย, ผู้ป่วยโรคปรสิตชนิดอื่น ๆ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1) จำนวน 105 ราย, ผู้ป่วยโรควัณโรคปอด จำนวน 18 ราย และคนปกติที่ไม่เป็นโรคปรสิต จำนวน 30 ราย เมื่อใช้ค่า ELISA OD สูงสุด + 4SD ของผู้ป่วยที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นโรคปรสิตอื่นนอกเหนือจากโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ซึ่งเท่ากับ 0.439 ( $0.267 + 4 \times 0.043$ ) เป็นค่า cut-off OD ซีรัมรายใดที่ให้ค่า ELISA OD เท่ากับหรือมากกว่า 0.439 จะถือว่าให้ผลบวกกับปฏิกิริยาการทดสอบ พบว่าการทดสอบโดยวิธีนี้ให้ค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) 100% ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ถึง 100% ที่ความชุกของโรค (prevalence) 3.2% โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) แม้ว่าจะทำการทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยโรคปรสิตอื่น และผู้ป่วยโรควัณโรคปอดจำนวนทั้งหมด 123 ราย นอกจากนี้ยังไม่พบผลบวกปลอม (false positive) เมื่อทำกับซีรัมคนปกติที่



รูปที่ 1. แสดงการเปรียบเทียบค่า optical density ที่ได้จากการทำ chequer-board titration เพื่อหา optimum dilution ของ goat anti-human IgG conjugated horseradish peroxidase enzyme และซีรัม เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบ plate ด้วยแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัดหลัง 0.5  $\mu$ g/หลุม แล้วให้ทำปฏิกิริยากับซีรัม pooled positive fascioliasis (สัญญาณลักษณะทึบ) หรือกับซีรัม pooled negative healthy control (สัญญาณลักษณะโปร่ง) ที่เจือจางตั้งแต่ 1:100 - 1: 3200 จากนั้นปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับ conjugate ที่เจือจาง 1 : 1000 (O-----O), 1 : 2000 (▽-----▽), 1:4000 (□-----□), และ 1 : 5000 (Δ-----Δ) ตามลำดับ



รูปที่ 2. แสดงการเปรียบเทียบค่า optical density ที่ได้จากการทำ chequer-board titration เพื่อหา optimum dilution ของ goat anti-human IgG conjugated horseradish peroxidase enzyme และซีรัมเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบ plate ด้วยแอนติเจนชนิดสกัดจากตัวแก่พยาธิชนิดหยาบ 1.0  $\mu$ g/หลุม แล้วให้ทำปฏิกิริยากับซีรัม pooled positive fascioliasis (สัญญาณลักษณะทึบ) หรือกับซีรัม pooled negative healthy control (สัญญาณลักษณะโปร่ง) ที่เจือจางตั้งแต่ 1:100 - 1:3200 จากนั้นปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับ conjugate ที่เจือจาง 1:1000 (O----O), 1:2000 (V----V), 1:4000 (□----□), และ 1:5000 (Δ----Δ) ตามลำดับ

ตารางที่ 1. แสดงช่วงค่า ค่าเฉลี่ยของ ELISA OD และอัตราร้อยละของซีรัมผู้ป่วยโรคต่าง ๆ และกลุ่มคนปกติ ที่ให้ปฏิกิริยาผลบวกกับแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคืดหลังของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยวิธี indirect ELISA

| Type of serum                       | Range         | Mean $\pm$ SD     | No.positive/total (%) |
|-------------------------------------|---------------|-------------------|-----------------------|
| Proven Fascioliasis                 | 1.097 - 1.552 | 1.243 $\pm$ 0.179 | 5/5 (100)             |
| Suspected Fascioliasis *            | 0.992 - 1.330 | 1.171 $\pm$ 0.137 | 6/6 (100)             |
| Gnathostomiasis                     | 0.004 - 0.164 | 0.085 $\pm$ 0.055 | 0/9 (0)               |
| Angiostrongyliasis                  | 0.021 - 0.145 | 0.055 $\pm$ 0.048 | 0/8 (0)               |
| Cysticercosis                       | 0.020 - 0.267 | 0.095 $\pm$ 0.096 | 0/7 (0)               |
| Schistosomiasis                     | 0.017 - 0.076 | 0.039 $\pm$ 0.022 | 0/7 (0)               |
| Capillariasis                       | 0.005 - 0.075 | 0.042 $\pm$ 0.032 | 0/4 (0)               |
| Paragonimiasis                      | 0.009 - 0.170 | 0.075 $\pm$ 0.037 | 0/32 (0)              |
| Trichinosis                         | 0.066         | 0.066             | 0/1 (0)               |
| Thelaziasis                         | 0.016         | 0.016             | 0/1 (0)               |
| Amoebiasis                          | 0.085         | 0.085             | 0/1 (0)               |
| Opisthorchiasis                     | 0.016 - 0.111 | 0.053 $\pm$ 0.027 | 0/24 (0)              |
| Opisthorchiasis ร่วมกับปรสิตอื่น ** | 0.026 - 0.106 | 0.066 $\pm$ 0.025 | 0/10 (0)              |
| Strongyloidiasis ร่วมกับ giardiasis | 0.016         | 0.016             | 0/1 (0)               |
| Tuberculosis                        | 0.022 - 0.147 | 0.066 $\pm$ 0.041 | 0/18 (0)              |
| Healthy control                     | 0.015 - 0.094 | 0.040 $\pm$ 0.020 | 0/30 (0)              |

\* วินิจฉัยจากข้อมูลต่างๆ ร่วมกัน ได้แก่ อาการทางคลินิก ประวัติการรับประทานพืชน้ำ ผลการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ การตรวจอุจจาระหาไข่พยาธิ ผลการตรวจด้วยอัลตราซาวด์ ผลของการทำ ERCP หรือการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาฆ่าพยาธิ

\*\* ได้แก่ hookworm infection 6 ราย, hookworm และ *S.stercoralis* infection 1 ราย, hookworm และ minute intestinal fluke infection 1 ราย, และ trichuriasis 2 ราย

ไม่เป็นโรคปรสิต สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis โดยอาศัยอาการทางคลินิกและผลการตรวจอื่นๆ ทางห้องปฏิบัติการ แต่ไม่พบตัวพยาธิจำนวน 6 ราย พบว่าให้ปฏิกิริยาผลบวกกับการทดสอบ โดยมีค่า ELISA OD อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.992-1.330 และมีค่าเฉลี่ยเป็น  $1.171 \pm 0.137$  ผลการทดลองดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

**2.2 Indirect ELISA** เมื่อใช้แอนติเจนชนิดสกัดจากตัวแก่พยาธิชนิดหยาบในการตรวจสอบตามวัสดุและวิธีการข้อ 6 เมื่อใช้แอนติเจนสกัดจากตัวแก่ของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ชนิดหยาบเป็นตัวตรวจสอบ และทำกับซีรัมผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis จำนวน 5 ราย, ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis จำนวน 6 ราย, ผู้ป่วยโรคปรสิตชนิดอื่น ๆ (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2) จำนวน 105 ราย, ผู้ป่วยโรคฉี่หนูโรคมอด จำนวน 18 ราย และคนปกติที่ไม่เป็นโรคปรสิต จำนวน 30 ราย เมื่อใช้ค่า ELISA OD สูงสุด + 4SD ของผู้ป่วยที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นโรคปรสิตอื่นนอกเหนือจากโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis ซึ่งเท่ากับ 0.422 ( $0.266 + 4 \times 0.039$ ) เป็นค่า cut-off OD ซีรัมรายใดที่ให้ค่า ELISA OD เท่ากับหรือมากกว่า 0.422 จะถือว่าให้ผลบวกกับปฏิกิริยาการทดสอบ ในการทดสอบนี้พบว่า ได้ค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) 100% ค่าทำนายผลบวก(positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ถึง 100% ที่ความชุกของโรค (prevalence) 3.2% โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) แม้ว่าจะทำการทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยโรคปรสิตอื่น และผู้ป่วยโรคฉี่หนูโรคมอดจำนวนทั้งหมด 123 ราย นอกจากนี้ยังไม่พบผลบวกปลอม (false positive) เมื่อทำกับซีรัมคนปกติที่ไม่เป็นโรคปรสิต สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ fascioliasis โดยอาศัยอาการทางคลินิกและผลการตรวจอื่นๆ ทางห้องปฏิบัติการ แต่ไม่พบตัวพยาธิจำนวน 6 ราย พบว่าให้ปฏิกิริยาผลบวกกับการทดสอบ โดยมีค่า ELISA OD อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.631-1.302 และมีค่าเฉลี่ยเป็น  $0.930 \pm 0.251$  ผลการทดลองดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. แสดงช่วงค่า ค่าเฉลี่ยของ ELISA OD และอัตราร้อยละของซีรั่มผู้ป่วยโรคต่าง ๆ และกลุ่มคนปกติ ที่ให้ปฏิกิริยาผลบวก กับแอนติเจนชนิดสกัดจากตัวแก่ชนิดพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* โดยวิธี indirect ELISA

| Type of serum                       | Range         | Mean $\pm$ SD     | No.positive/total (%) |
|-------------------------------------|---------------|-------------------|-----------------------|
| Proven Fascioliasis                 | 0.819 - 1.206 | 1.016 $\pm$ 0.161 | 5/5 (100)             |
| Suspected Fascioliasis *            | 0.631 - 1.302 | 0.930 $\pm$ 0.251 | 6/6 (100)             |
| Gnathostomiasis                     | 0.003 - 0.161 | 0.082 $\pm$ 0.057 | 0/9 (0)               |
| Angiostrongyliasis                  | 0.014 - 0.134 | 0.053 $\pm$ 0.047 | 0/8 (0)               |
| Cysticercosis                       | 0.018 - 0.266 | 0.067 $\pm$ 0.072 | 0/7 (0)               |
| Schistosomiasis                     | 0.009 - 0.058 | 0.028 $\pm$ 0.018 | 0/7 (0)               |
| Capillariasis                       | 0.006 - 0.064 | 0.041 $\pm$ 0.026 | 0/4 (0)               |
| Paragonimiasis                      | 0.008 - 0.175 | 0.072 $\pm$ 0.040 | 0/32 (0)              |
| Trichinosis                         | 0.063         | 0.063             | 0/1 (0)               |
| Thelaziasis                         | 0.019         | 0.019             | 0/1 (0)               |
| Amoebiasis                          | 0.067         | 0.067             | 0/1 (0)               |
| Opisthorchiasis                     | 0.015 - 0.086 | 0.044 $\pm$ 0.022 | 0/24 (0)              |
| Opisthorchiasis ร่วมกับปรสิตอื่น ** | 0.016 - 0.111 | 0.064 $\pm$ 0.029 | 0/10 (0)              |
| Strongyloidiasis ร่วมกับ giardiasis | 0.014         | 0.014             | 0/1 (0)               |
| Tuberculosis                        | 0.017 - 0.119 | 0.053 $\pm$ 0.031 | 0/18 (0)              |
| Healthy control                     | 0.014 - 0.092 | 0.038 $\pm$ 0.019 | 0/30 (0)              |

\* วินิจฉัยจากข้อมูลต่างๆ ร่วมกัน ได้แก่ อาการทางคลินิก ประวัติการรับประทานพืชน้ำ ผลการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ การตรวจอุจจาระหาไข่พยาธิ ผลการตรวจด้วยอัลตราซาวด์ ผลของการทำ ERCP หรือการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาฆ่าพยาธิ

\*\* ได้แก่ hookworm infection 6 ราย, hookworm และ *S.stercoralis* infection 1 ราย, hookworm และ minute intestinal fluke infection 1 ราย, และ trichuriasis 2 ราย

## วิจารณ์

มีการรายงานมากมายในการใช้แอนติเจนสกัดจากตัวแก่ชนิดพยาธิของ *F. gigantica* มาเป็นแอนติเจนในการทดสอบหาแอนติบอดี โดยวิธี ELISA (Masour et al., 1983 ; Youssef and Mansour, 1991 ; Swarup et al., 1987 ; Khalil et al., 1990 ; Fagbemmi and Qbaris, 1990). ในขณะที่ได้มีการนำแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัดหลั่งของพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* มาใช้เป็นแอนติเจนสำหรับตรวจวัดในคน โดยวิธี ELISA (Espino et al 1987 ; Espino et al., 1992 ; Hillyer et al., 1992) แต่มีรายงานน้อยมาก เกี่ยวกับการใช้แอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัดหลั่งของ *F. gigantica* และรวมทั้งการเปรียบเทียบการใช้แอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัดหลั่ง และแอนติเจนชนิดสารสกัดจากตัวแก่ของ *F. gigantica* สำหรับตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ (fascioliasis) โดยวิธี ELISA การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงถึงค่า ELISA O.D. ต่อแอนติเจนชนิดสารขับถ่ายคัดหลั่งและแอนติเจนชนิดสารสกัดจากตัวแก่ของ *F. gigantica* มีความไวและความจำเพาะสูงเท่า ๆ กัน สำหรับนำไปใช้วินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ (fascioliasis) ในคน จากข้อมูลที่ปรากฏนี้ อาจบ่งชี้ได้ว่ามี common antigen ระหว่างแอนติเจนทั้งสองชนิดเหมือนกับที่มีรายงานในพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis* (Wongratnachewin et al., 1988) และพยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus* (Maleewong et al., 1990)

การทำการทดสอบครั้งนี้ ปฏิบัติการเกี่ยวกับไม่มีในกลุ่มของผู้ป่วยโรค gnathostomiasis, angiostrongyliasis, cysticercosis, schistosomiasis, capillariasis, paragonimiasis, trichinosis, thelaziasis, amoebiasis, opisthorchiasis, tuberculosis, opisthrochiasis ร่วมกับ strongyloidiasis และ giardiasis ทำให้น่าจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้วินิจฉัยในประเทศไทย และประเทศใกล้เคียงในแถบตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งคล้ายกับการรายงานการนำมาใช้ของแอนติเจนชนิดขับถ่ายของพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* ในผู้ป่วยโรค fascioliasis ที่ไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองกับผู้ป่วยโรค filariasis, clonorchiasis และ schistosomiasis (Espino et al., 1987)

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาในอนาคต ทางคณะผู้วิจัยมีคำรที่ จะศึกษาเพื่อแยกชนิดของแอนติเจน ในสารขับถ่ายคัดหลั่งและสารสกัดชนิดพยาธิ เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีต่อไป