

RESEARCH ARTICLE

Prevalence of *Fasciola gigantica* Infection of Cows and Buffaloes Nearby Songkhla Lake Detected by Excretory-Secretory Antigen Based on ELISA

Boy Boonaue¹, Wissanuwat Chimnoi¹, Verachai Virochasaengaroon², Tassanee Mungmuang³, Sathaporn Jittapalapong¹, Burin Nimsuphan^{1*}

Abstract

Objective—To study the prevalence of *Fasciola gigantica* infection in cows and buffaloes residing in Songkhla Lake area.

Materials and Methods—The study areas were five districts of Songkhla province nearby Songkhla Lake, including Ranot, Krasaesin, Sathing Phra, Singha Nakhon and Khuan Niang. A total of 505 and 95 blood samples and 500 and 83 fecal samples of cows and buffaloes were checked for *Fasciola* infection. Serum samples were tested for *F. gigantica* infection by ELISA using Excretory-Secretory protein as antigen. The fecal samples were checked for the presence of liver fluke egg by formalin-ethyl acetate sedimentation.

Results—The positive results from ELISA showed 29.3% (148/505) in cows and 78.9% (75/95) in buffaloes for *Fasciola* infection. Comparing with the formalin-ethyl acetate sedimentation showed the positive results 7.8% (39/500) in cows and 30.1% (25/83) in buffaloes. The old cows had higher infection rate than young cows while the old buffaloes had the lower positive rates than young buffaloes. Both of female cows and buffaloes had the infection rates higher than male. The highest end-point titers of cows and buffaloes were 1:6,400 and 1:12,800, respectively.

Conclusion—Both cows and buffaloes were infected with *F. gigantica* in the high level. Thus, Songkhla Lake is the natural reservoir for fasciolosis in cows, buffaloes and possibly human. Human should avoid eating the raw water plants growing in Songkhla Lake.

KKU Vet J. 2013;23(1):98-109.

<http://vmj.kku.ac.th/>

Keywords: *Fasciola gigantica*; Cow; Buffalo; Songkhla Lake; ELISA

¹Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900.

²Livestock Development Office, Muang, Songkhla, 90000.

³Regional Livestock office, Region 9, Muang, Songkhla, 90000.

*Corresponding author E-mail: fvetbrn@ku.ac.th

ความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola gigantica* ในโคและกระบือรอบทะเลสาบสงขลาโดยการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยใช้ Excretory-Secretory แอนติเจน

บอย บุญเอื้อ¹, วิษณุวัฒน์ จิมน้อย¹, วีรชัย วิโรจน์แสงอรุณ², ทศนีย์ มุงเมือง³,
สถาพร จิตตपालพงศ์¹, บุรินทร์ นิมสุพรรณ^{1*}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola gigantica* ในโคและกระบือรอบทะเลสาบสงขลา

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ ทำการศึกษาในจังหวัดสงขลาบริเวณที่มีพื้นที่ติดกับทะเลสาบสงขลาประกอบไปด้วยอำเภอระโนด กระแสสินธุ์ สทิงพระ สิงหนคร และควนเนียง เก็บตัวอย่างเลือดโค 505 ตัวอย่างและกระบือ 95 ตัวอย่าง ตัวอย่างอุจจาระโค 500 ตัวอย่างและกระบือ 83 ตัวอย่าง ตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola* โดยวิธี ELISA และ Formalin-ethyl acetate sedimentation

ผลการศึกษา ผลการตรวจพบการติดเชื้อ *F. gigantica* ในโคและกระบือร้อยละ 29.3 (148/505) และ 78.9 (75/95) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจอุจจาระด้วยวิธี Formalin-ethyl acetate sedimentation พบโคและกระบือมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับคิดเป็นร้อยละ 7.8 (39/500) และ 30.1 (25/83) ตามลำดับโคที่มีอายุน้อยกว่า 7 ปี พบการติดเชื้อมากกว่าโคอายุมากกว่า 7 ปี แต่ในกระบือพบว่ากระบืออายุมากกว่า 7 ปีมีการติดเชื้อน้อยกว่ากระบืออายุต่ำกว่า 7 ปี ทั้งในโคและกระบือให้ผลที่สอดคล้องกันในเรื่องเพศ คือตัวเมียตรวจพบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูงกว่าในตัวผู้ ระดับ end-point titers สูงสุดอยู่ที่ 1:6,400 และ 1:12,800 ในโคและกระบือตามลำดับ

ข้อสรุป ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* ทั้งในโคและกระบือในระดับสูง ดังนั้นทะเลสาบสงขลาเป็นแหล่งกักโรค fasciolosis ตามธรรมชาติ สำหรับโค กระบือ และมนุษย์ มนุษย์ควรหลีกเลี่ยงการกินพืชน้ำแบบไม่ปรุงสุกที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่รอบทะเลสาบสงขลา

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2556;23(1):98-109.

<http://vmj.kku.ac.th/>

คำสำคัญ: *Fasciola gigantica* โค กระบือ ทะเลสาบสงขลา ELISA

¹ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

²สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

³สำนักงานปศุสัตว์เขต 9 อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: fvetbm@ku.ac.th

บทนำ

โรคพยาธิใบไม้ตับมีความสำคัญต่อปัญหาสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ พยาธิชนิด *Fasciola* ก่อให้เกิดโรค fasciolosis ในสัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำนวนมากรวมไปถึงมนุษย์ [1,2] การติดโรคผ่านทางกรกินพืชน้ำหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนพยาธิระยะติดต่อ (metacercaria) มีรายงานการแพร่กระจายพยาธิทั่วโลก หลายประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบการติดพยาธิชนิด *F. gigantica* ร้อยละ 6-90 ของทั้งโคและกระบือในประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซีย [3,4,5] ร้อยละ 5-94.7 ของโคพื้นเมืองในประเทศกัมพูชาและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว [6,7] ร้อยละ 28-72.2 ของโคเนื้อและโคนมในประเทศเวียดนาม [8,9] ประเทศไทยมีรายงานการติดโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* ทั้งในสัตว์ปศุสัตว์และมนุษย์ ความชุกของการติดพยาธิในโคและกระบือมีความผันแปรของความชุกในแต่ละจังหวัดแตกต่างกันอยู่ภายในช่วงระหว่างร้อยละ 0-85 [10,11,12,13] ภาคเหนือของไทยมีอัตราการติดพยาธิสูงสุดและภาคใต้มีอัตราการติดต่ำที่สุด [14] ส่วนอัตราการติดพยาธิ *Fasciola* มีรายงานในผู้ป่วยในที่ได้รับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลศิริราชในช่วงปี ค.ศ. 1991-1995 พบร้อยละ 0.36 [15]

การตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola* ประกอบไปด้วยการตรวจอุจจาระ การตรวจทางเซรุ่มวิทยาและการตรวจทางอณูวิทยา การตรวจอุจจาระเป็นวิธีการที่นิยมทำโดยใช้การตกตะกอนด้วยวิธี Formalin-ethyl acetate sedimentation [16] เพื่อตรวจหาไข่พยาธิในอุจจาระ วิธีการตรวจทางเซรุ่มวิทยา เช่น ELISA ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจการติดพยาธิใบไม้ตับในระยะเริ่มต้นของการติดโรค วิธีการดังกล่าวมีความไวในการตรวจสูงกว่าการตรวจอุจจาระแต่ไม่เหมาะในการตรวจภาคสนาม [17] มีโปรตีนจากพยาธิจำนวนมากถูกนำมาใช้ในการตรวจทางเซรุ่มวิทยาประกอบไปด้วยตัวพยาธิ ผิวน้ำ ไข่พยาธิ และสารที่พยาธิหลั่งหรือขับออกจากร่างกาย (Excretory-Secretory Protein, ES-protein) ES-protein มีหลายชนิดและมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันออกไปตั้งแต่ 15-101 kDa [18] โดยพบว่าสารที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *Fasciola* มีมวลโมเลกุล 27 kDa เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม cathepsin cysteine protease ซึ่งในแต่ละระยะของ *Fasciola* มีการผลิต cathepsin ออกมาต่างชนิดกันและทำหน้าที่แตกต่างกันไป สารในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ [19] ดังนั้น ES-protein จึงถูกนำมาใช้เพื่อวินิจฉัยโรค fasciolosis โดยใช้เป็นแอนติเจน (ES-Antigen, ES-Ag) สำหรับวิธี ELISA ซึ่งโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 27 kDa มีค่าความไว (ร้อยละ 93-94.9) ความแม่นยำสูง (ร้อยละ 96) [20,21,22] สามารถตรวจหา anti-*Fasciola* antibody ในนมของโคได้ และไม่เกิด cross reaction ระหว่างการติดพยาธิ *F. gigantica* และ *Paramphistomum epiclitum* [23,1]

ทะเลสาบสงขลาเป็นทะเลสาบน้ำจืดขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย ลักษณะภูมิประเทศเป็นแหล่งน้ำขนาดใหญ่มีน้ำไหลเวียนตลอดทั้งปี มีพื้นที่ 1,040 ตารางกิโลเมตร ติดต่อกับจังหวัดสงขลาและพัทลุง ลักษณะภูมิอากาศโดยรอบทะเลสาบสงขลาได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันออกเฉียงใต้

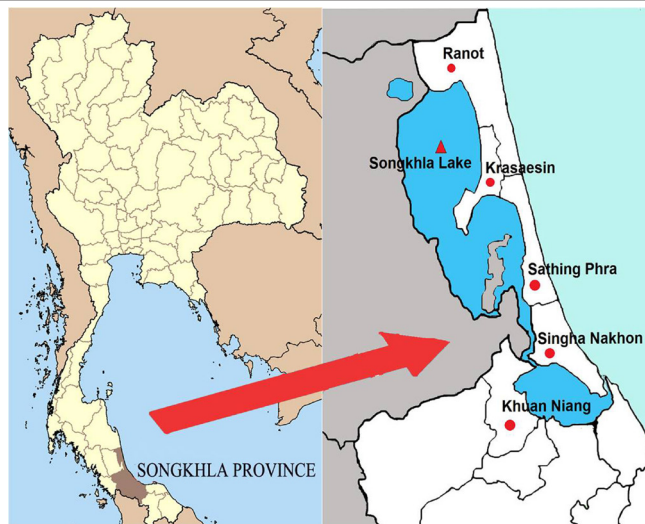
และตะวันตกเฉียงเหนือ ทำให้มีเพียงสองฤดูคือ ฤดูฝนระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงมกราคม และฤดูร้อนระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงมิถุนายน มีการทำเกษตรกรรมและเลี้ยงสัตว์ในพื้นที่รอบทะเลสาบ สัตว์ปศุสัตว์ที่เลี้ยงมากในพื้นที่คือ โคและกระบือ [24] ลักษณะการเลี้ยงสัตว์ส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบปล่อยทุ่งให้สัตว์หากินเองตามธรรมชาติ ช่วงเวลาที่ผ่านมาพบการตายของ โคและกระบือจำนวนมากหนึ่งที่เลี้ยงรอบทะเลสาบ โดยเมื่อผ่าซากพบพยาธิจำนวนมากในตับจึงอาจเป็นไปได้ว่าสาเหตุของการตายมาจากการติดพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola* จากเหตุการณ์ดังกล่าวพื้นที่รอบทะเลสาบสงขลาอาจมีการแพร่กระจายของพยาธิ *Fasciola* ทำให้โคและกระบือที่เลี้ยงภายในพื้นที่ที่มีโอกาสติดพยาธิในระดับสูงได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อหาความชุกของการติดพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* ในโคและกระบือรอบทะเลสาบสงขลาโดยวิธี ELISA ด้วยการใส่ ES-Ag

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สถานที่ทำการศึกษา

ทำการศึกษาที่จังหวัดสงขลาในเขตอำเภอระโนด กระแสสินธุ์ สทิงพระ สิงหนคร และควนเนียงซึ่งมีพื้นที่ติดกับทะเลสาบสงขลา (Figure 1)

Figure 1. Five Districts of Study Areas in Songkhla Province Nearby Songkhla Lake (Arrow Head)



การเก็บตัวอย่างเลือดและอูจาระ

เก็บตัวอย่างโค 505 ตัวและกระบือ 95 ตัวแบบไม่จำเพาะเจาะจง ตัวอย่างเลือด 505 และ 95 ตัวอย่างของโคและกระบือตามลำดับถูกเจาะเก็บจากเส้นเลือด jugular vein ตัวอย่างเลือดที่ได้มาปล่อย

ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำเลือดที่แข็งตัวไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,448 G นาน 20 นาที เพื่อทำการแยกเซรุ่มและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C และตัวอย่างอุจจาระโค 500 และกระบือ 83 ตัวอย่าง โดยการล้างเก็บทางทวารหนักของสัตว์ เก็บตัวอย่างอุจจาระที่อุณหภูมิ 4°C

การเก็บตัวอย่างพยาธิตัวเต็มวัย *F. gigantica* และการสกัดแยก ES-protein

พยาธิตัวเต็มวัยถูกเก็บจากตับและต่อน้ำดีของโคที่โรงฆ่าสัตว์และเก็บในสารละลาย PBS (pH 7.2) พยาธิถูกล้างด้วยน้ำเกลือเพื่อล้างสิ่งสกปรกออก หลังจากนั้นล้างพยาธิด้วย PBS 5 รอบ การสกัดแยก ES protein จากพยาธิ *F. gigantica* ตามวิธีการของ Raina และคณะ [25] พยาธิตัวเต็มวัยที่ผ่านการล้างทำความสะอาดถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน หลังจากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ ES protein และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 G นาน 30 นาที ที่ 4°C นำส่วนใสไปทำการตกตะกอนด้วยวิธี 2 steps alcoholic precipitation สุดท้ายตะกอนที่ได้นำไปละลายด้วย PBS สารละลายที่ได้นำไปวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -80°C

การตรวจอุจจาระด้วยวิธี Formalin-ethyl acetate sedimentation

ตักอุจจาระ 2 กรัม ล้างในน้ำเกลือและกรองผ่านตะแกรงกรองเทใส่หลอดทดลอง 12 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 1,448 G นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติม 10% formalin 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Ethyl acetate 2 มิลลิลิตร เขย่าหลอดและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,448 G นาน 5 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็นชั้น เทชั้นบนออกให้เหลือตะกอนล่างสุดไว้ ผสมตะกอนกับ 10% formalin หยดสารละลายที่ได้ลงบนสไลด์ปิดด้วย cover glass อ่านผลใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจหา anti-*F. gigantica* antibody ด้วยวิธี ELISA

เซรุ่มที่ได้จากโคและกระบือนำไปตรวจด้วยวิธี ELISA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Raina และคณะ [25] เคลือบ ELISA plate ด้วย ES antigen ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน ล้าง ELISA plate ด้วย 200 ไมโครลิตร ของ washing buffer (0.05% Tween-20 ใน PBS) 5 ครั้งและทำการ block ด้วย 3% skimmed milk นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ล้าง ELISA plate ด้วย washing buffer 5 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ 100 ไมโครลิตร ของเซรุ่มที่เจือจาง 1:200 ใน blocking buffer บ่มนาน 1 ชั่วโมง anti-bovine IgG peroxidase conjugate ถูกใส่ลงในแต่ละหลุมหลังจากการล้าง ELISA plate 5 ครั้ง สุดท้ายเติมสาร TMB ลงในหลุมและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ในที่มีด หยดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการเติม 100 ไมโครลิตร ของ 1N HCl อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย ELISA plate reader ค่า cut-off คำนวณจากค่าเฉลี่ยของโคและกระบือที่ไม่พบการติดพยาธิ *Fasciola* จากวิธีการตรวจอุจจาระและบวกด้วย 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหา ค่า End-point titers โดยการนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมดมาตรวจซ้ำโดยใช้เซรุ่มที่เจือจางตั้งแต่ 1:100 ถึง 1:12,800

การศึกษาแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

วิเคราะห์หามวลโมเลกุลของ ES-protein ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยตัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli [16] นำ ES-protein มาเคลื่อนที่ผ่าน 13% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie Blue R-250

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อการติดพยาธิ *F. gigantica* ด้วยสถิติ chi-square test ด้วยโปรแกรม Number Cruncher Statistical System programs (NCSS) version 2000 (Kaysville, UT)

ผลการศึกษา

จากผลการตรวจเชรุ่มของ โคและกระบือด้วยวิธี ELISA พบอัตราการติดพยาธิ *F. gigantica* ร้อยละ 29.3 (148/505) และ 78.9 (75/95) ตามลำดับ (Table 1) ในทุกอำเภอที่ทำการสำรวจพบการติด

Table 1. The Results of Fecal Examination and ELISA in Cows and Buffaloes

Methods	No. of animals	Positive <i>Fasciola</i> (%)
Formalin-ethyl acetate		
Cows	500	39(7.8)
Buffaloes	83	25(30.1)
ELISA		
Cows	505	148(29.3)
Buffaloes	95	75(78.9)

พยาธิ *F. gigantica* ทั้งในโคและกระบือ (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจอุจจาระด้วยวิธี Formalin-ethyl acetate sedimentation ซึ่งเป็น standard method สำหรับการตรวจหาการติดพยาธิ ความชุกของการติดพยาธิ *F. gigantica* ร้อยละ 7.8 (39/500) และ 30.1 (25/83) ในโคและกระบือตามลำดับ นอกจากนี้ผลการตรวจอุจจาระยังพบการติดพยาธิชนิดอื่นในโคและกระบือได้แก่ *Capillaria* spp., *Eurytrema pancreaticum*, *Moniezia benedeni*, Ruman flukes, Strongyle worms และ *Trichuris* spp. (Table 3) ระดับ end-point titers ของโคต่ำสุดอยู่ที่ 1:100 และสูงสุดอยู่ที่ 1:6,400 ส่วนของกระบือระดับต่ำสุดอยู่ที่ 1:200 และสูงสุดอยู่ที่ 1:12,800 โดยระดับ end-point titers ส่วนใหญ่อยู่ที่ 1:400 และ 1:1,600 ในโคและกระบือตามลำดับ โคตัวผู้ (ร้อยละ 17.4) พบการติดพยาธิใบไม้ตับต่ำกว่าโคตัวเมีย (ร้อยละ 33.5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ส่วนโคอายุน้อย (ร้อยละ 16.2) พบอัตราการติดน้อยกว่าโคอายุมาก (ร้อยละ 42.7) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ปัจจัยด้านอายุและเพศไม่มี

Table 2. The Prevalence of Intestinal Parasite Infections in Cows and Buffaloes in Each District Checked by Formalin-ethyl Acetate Sedimentation

Districts	No. of animals	No. of infected animals (%)
Singha Nakon		
Cows	84	76(90.5)
Buffaloes	27	23(85.2)
Sathing Phra		
Cows	113	108(95.6)
Buffaloes	26	25(96.2)
Krasaesin		
Cows	112	110(98.2)
Buffaloes	19	17(89.5)
Ranot		
Cows	145	126(86.9)
Buffaloes	11	6(54.5)
Khuan Niang		
Cows	46	44(95.7)
Total		
Cows	500	464(92.8)
Buffaloes	83	71(85)

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกระบือ (Table 4) ผลจากการนำ ES-protein ไปทำ SDS-PAGE ปรากฏแถบโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงโดยมีมวลโมเลกุล 27 kDa (Figure 2)

วิจารณ์

อัตราการติดพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* ในโคและกระบือรอบทะเลสาบสงขลาคิดเป็นร้อยละ 29.3 และ 78.9 ตามลำดับ ความชุกของการติดพยาธิใบไม้ตับที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี ELISA มีค่าสูงกว่าการตรวจด้วยวิธีการตรวจอุจจาระทั้งในโคและกระบือ การตรวจอุจจาระเพื่อหาไข่พยาธิเป็นวิธีการที่นิยมใช้และเหมาะสมในการใช้ตรวจในภาคสนามแต่วิธีการตรวจอุจจาระไม่สามารถวินิจฉัยการเป็นโรค fasciolosis ในระยะเริ่มแรก และให้ผลลบคลาดเคลื่อนในกรณีที่ติดพยาธิเป็นระยะเวลานาน [18] การตรวจทางเซรุ่มวิทยาสามารถตรวจการเป็นโรค fasciolosis ในระยะเริ่มแรกและการติดพยาธิแบบรื้อรัง [27,28] การตรวจด้วยวิธี ELISA โดยใช้ ES-Ag มีความไวและความ

Table 3. The Infection Number of Cows and Buffaloes and Type of Internal Parasites Checked by Formalin-ethyl Acetate Sedimentation

Districts	Singha Nakhon		Sathing Phra		Krasaesin		Ranot		Khuan Niang		Total	
	Cow	Buffalo	Cow	Buffalo	Cow	Buffalo	Cow	Buffalo	Cow	Buffalo	Cow	Buffalo
C	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1(0.2)	1(1.2)
F	-	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4(4.8)
R	48	17	72	8	76	16	77	3	32	305(61)	44(53)	
S	4	1	7	-	4	-	13	-	-	28(5.6)	1(1.2)	
C+R	1	-	-	-	-	-	2	-	3	6(1.2)	-	
C+S	-	-	1	-	-	-	2	-	-	3(0.6)	-	
E+R	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1(0.2)	-	
F+R	15	2	5	16	4	-	3	2	5	32(6.4)	20(24.1)	
M+S	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1(0.2)	-	
R+S	8	-	20	-	23	-	23	-	3	77(15.4)	-	
R+T	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1(0.2)	-	
C+R+S	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1(0.2)	-	
F+M+R	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1(0.2)	-	
F+R+S	-	-	3	-	1	-	2	1	-	6(1.2)	-	
R+S+T	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1(0.2)	-	

Abbreviations: C = *Capillaria* spp.; E = *Eurytrema pancreaticum*; F = *Fasciola* spp.; M = *Moniezia benedeni*; R = Rumen flukes; S = Strongyle worms; T = *Trichuris* spp.

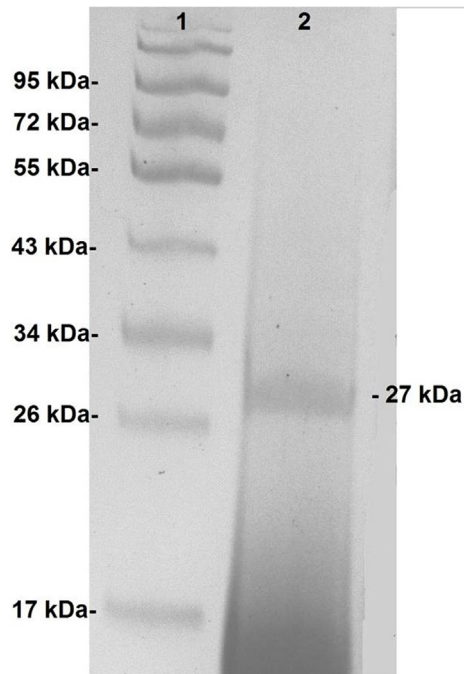
จำเพาะสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจอุจจาระ ดังนั้นวิธี ELISA เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่แนะนำให้ใช้ สำหรับการตรวจการติดพยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* ในโคและกระบือ

ความชุกของการติดพยาธิใบไม้ตับในโคจากการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่าที่มีการรายงานในเขตภาคใต้ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช [15] อาจมีสาเหตุจากพื้นที่รอบทะเลสาบสงขลาในจังหวัดสงขลา มีความเหมาะสมต่อการกระจายตัวของพยาธิ *Fasciola* ได้ดีกว่าในพื้นที่ราบลุ่มแม่น้ำปากพนังในจังหวัดนครศรีธรรมราช เพราะทะเลสาบสงขลาเป็นแหล่งน้ำที่มีน้ำไหลเวียนอยู่ภายในทะเลสาบตลอดทั้งปี แตกต่างจากการไหลของน้ำในแม่น้ำปากพนังซึ่งไหลลงสู่ทะเลโดยตรง วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับดำรงอยู่ภายในพื้นที่ทะเลสาบเพราะลักษณะการเลี้ยงโคและกระบือรอบทะเลสาบ สงขลามีรูปแบบการเลี้ยงแบบปล่อยทุ่งให้โคและกระบือหากินรอบทะเลสาบ สัตว์เหล่านี้ใช้ชีวิตอยู่

Table 4. The Influential Factors of Age and Sex on *Fasciola* Infection in Cows and Buffaloes

Factor		No. of animals	Positive <i>Fasciola</i> (%)	Statistic		
Cows	Age	<1	35	1(2.9)	$X^2=21.03$, $df=2$, $P<0.001$	
		1-7	367	64(28.1)		
		>7	103	30(42.7)		
	Sex	Male	132	23(17.4)		$X^2=12.18$, $df=1$, $P<0.001$
		Female	373	125(33.5)		
	Total		505	148(29.3)		
Buffaloes	Age	<7	37	31(83.8)	$X^2=0.06$, $df=1$, $P=0.8$	
		>7	58	44(75.9)		
	Sex	Male	11	9(81.8)	$X^2=0.09$, $df=1$, $P=0.76$	
		Female	84	66(78.6)		
	Total		95	75(78.9)		

* $P \leq 0.05$ is statistically significant

Figure 2. SDS-PAGE of *F. gigantica* ES-Ag Stained with Coomassie Blue

Lane assignments: lane 1 = molecular weight marker (kDa); lane 2 = *F. gigantica* ES-Ag

ในทะเลสาบทำให้พื้นที่ในบริเวณดังกล่าวอาจปนเปื้อนพยาธิจากการที่สัตว์ถ่ายอุจจาระบนพื้นหรือลงในน้ำ นอกจากนี้การแพร่กระจายของพยาธิอาจเกิดจากกระแสน้ำที่ไหลเวียนภายในทะเลสาบและการอพยพย้ายถิ่นของสัตว์รอบทะเลสาบ อย่างไรก็ตามข้อมูลการติดพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola* ของคนในพื้นที่จังหวัดสงขลายังไม่เคยมีรายงาน แต่จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามี ความชุกของการติดพยาธิ *F. gigantica* สูงในโคและกระบือรอบทะเลสาบสงขลา จึงมีความเป็นไปได้ที่คนในพื้นที่อาจจะติดหรือมีความเสี่ยงที่จะติดพยาธิ *F. gigantica* เพราะคนและสัตว์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่รอบทะเลสาบกินพืชน้ำที่เกิดและโตในพื้นที่ที่อาจมีการปนเปื้อนของพยาธิระยะติดต่อ ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าทะเลสาบสงขลาเป็นแหล่งเก็บกักพยาธิตามธรรมชาติสำหรับโรค fasciolosis ในสัตว์ปศุสัตว์และมนุษย์

โคและกระบือมีการติดพยาธิ *F. gigantica* ในทุกอำเภอที่ทำการศึกษาโดยเฉพาะกระบือแสดง อัตราการติดพยาธิสูงมากถึงร้อยละ 78.9 ปัจจัยด้านอายุและเพศในโคพบว่าโคอายุน้อยมีอัตราการติดโรคสูงกว่าโคอายุมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และโคตัวผู้มีอัตราการติดพยาธิน้อยกว่าตัวเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รหัส ก-ช (ค) 66.54 และขอขอบคุณสำนักงานปศุสัตว์เขต 9 และสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดสงขลาที่อำนวยความสะดวกในการเข้าพื้นที่ และเจ้าของสัตว์ที่ให้ความร่วมมือในการออกเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. Intapan PM, Tantrawatpan C, Maleewong W, Wongkham S, Wongkham C, Nakashima K. Potent epitopes derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in paptide-based immunoassay for the serodiagnosis of human fascioliasis. *Diagnos Microbiol Infect Dis.* 2005;53:125-129.
2. Kanoksil W, Wattanatron D, Wilasrusmee C, Mingphruedh S, Bunyaratvej S. Endoscopic removal of one live biliary *Fasciola gigantica*. *J Med Assoc Thai.* 2006;89:2150-2154.
3. Partoutomo S, Ronohardjo P, Wilson AJ, Stevenson P. Review of diseases in Indonesia affecting affecting draught power in domestic animals. In: Copland JW, editor. *Draught animal power for production.* Canberra: Bluestar Print; 1985. p. 140-146.
4. Saleha AA. Liver fluke disease (fascioliasis): epidemiology, economic impact and public health significance. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991;Suppl:361-364.
5. Suweta IGP. The situation of liver fluke infestation in cattle in Bali. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991;Suppl:349-351.
6. Dorny P, Stoliaroff V, Charlier J, Meas S, Sorn S, Chea B, et al. Infections with gastrointestinal nematodes,

- Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Vet Parasitol.* 2011;175:293-299.
7. Phomhaksa S, Thamrongyoswittayakul C, Chanlum A, Chanlun S, Somphol N, Yeanpet C. Prevalence of *Fasciola gigantica* infestation in beef cattle at Nongduang slaughterhouse in Vientiane capital of Lao's People's Democratic Republic using iELISA approach. *KKU Vet J.* 2012;22(2): 155-166.
 8. Geurden T, Somers R, Thanh NTG, Vien LV, Nga VT, Giang HH, et al. Parasitic infections in dairy cattle around Hanoi, north Vietnam. *Vet Parasitol.* 2008;153:384-388.
 9. Nguyen TGT, Le TH, Dao THT, Tran TLH, Praet N, Speybroeck N, et al. Bovine fasciolosis in the human fasciolosis hyperendemic Binh Dinh province in central Vietnam. *Acta Tropica.* 2011;117:19-22.
 10. Gray GD, Copland RS, Copeman D.B. *Overcoming liver fluke as a constraint to ruminant production in South-East Asia.* Canberra: Blue star Print; 2008.
 11. Neamjui P, Pimpukdee K, Nachom C. Prevalence and risk factors of liver fluke (*Fasciola* spp.) infestation in cattle and buffaloes in Buriram province. *KKU Vet J.* 2012;22:10-17.
 12. Prasitirat P, Chompoochan T, Nithiuthai S, Wongkasemjit S, Punmamoamg T, Pongrut P, et al. Prevalence of amphistomes of cattle in Thailand. *Parasitol hung.* 1996-1997;29-30:27-32.
 13. Worasing R. Gastrointestinal and blood sample parasites in cattle in Pakpanang river basin Nakhon si thammarat province. *Thai-NIAH.* 2007:38-47.
 14. Tuntasuvan D, Kittikoon V. Bovine fasciolosis in Thailand: A review. *J Trop Med Parasitol.* 1996;19.
 15. Tiewchaloren S, Junnu V. Parasitic infection of in-patient at Siriraj hospital from 1991-1995. *Siriraj Hosp Gaz.* 1996;48:1073-1080.
 16. Bonita R, Taira N. Faecal examination of *Fasciola* eggs fixed with formalin solution using the beads technique. *Vet Parasitol.* 1996;67:269-273.
 17. Intapan PM, Maleewong W, Nateeworanart S, Wongkham C, Pipitgool V, Sukolapong V, et al. Immunodiagnosis of human fascioliasis using an antigen of *Fasciola gigantica* adult worm with the molecular mass of 27 kDa by a Dot-ELISA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003;34:713-717.
 18. Awad WS, Ibrahim AK, Salib FA. Using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle, sheep and donkeys. *Res Vet Sci.* 2009;86:466-47.
 19. Smooker PM, Jayaraj R, Pike RN, Spithill TW. Cathepsin B proteases of flukes: the key to facilitating parasite control?. *Trend Parasitol.* 2010;26(10):506-514.
 20. Cornelissen JBWJ, Gasenbeek CPH, Boersma W, Borgsteede FHM, Milligen FJV. Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunessay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Int J Parasitol.* 1999;29:685-696.
 21. Dixit AK, Yadav SC, Sharma RL. 28 kDa *Fasciola gigantica* cysteine proteinase in the diagnosis of prepatent ovine fasciolosis. *Vet Parasitol.* 2002;109:233-247.
 22. Estuningsih SE, Smooker PM, Wiedosari E, Widjajanti S, Vaiano S, Partoutomo S, et al. Evaluation of antigen of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int J Parasitol.* 1997;24:1419-1428.
 23. Bennema S, Vercreyse J, Claerebout E, Schnieder T, Strube C, Ducheyne E, et al. The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus*

- viviparous* in dairy cattle in Flanders (Belgium). *Vet Parasitol.* 2009;165:51-57.
24. Partnership for Rehabilitation of Songkhla Lake Basin [database on the internet]. The geography of Songkhla Lake basin [cited 2013 Apr 3]. Available from: <http://www.tei.or.th/songkhalake/database/database.html>
 25. Raina OK, Yadav SC, Sriveny D, Gupta SC. Immuno-diagnosis of bubaline fasciolosis with *Fasciola gigantica* cathepsin-L and recombinant cathepsin L 1-D protease. *Acta Tropica.* 2006;98:145-151.
 26. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
 27. Arias M, Morrondo P, Hillyer GV, Sanchez-Andrade R, Suarez JL, Lomba C, et al. Immunodiagnosis of current fasciolosis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Vet Parasitol.* 2007;146:46-49.
 28. Ghosh S, Rawat P, Velusamy R, Joseph D, Gupta SC, Singh BP. 27 kDa *Fasciola gigantica* for diagnosis of prepatent fasciolosis in cattle. *Vet Res Commun.* 2005;29:123-135.