

K-式 沈澱管에 의한 肝蛭虫卵 簡易檢査法

金敎準 · 金相根 · 許敏道

忠南大學校 農科大學

緒 論

肝蛭은 消化器 또는 關聯臟器에 寄生하고 있으므로 糞便中에 排出된 虫卵을 檢出할 수 있을때 確診이 可能하다고 하겠다.

外界에 排出된 虫卵이 孵化하여 中間過程을 거쳐 metacercaria態로서 宿主의 消化器官으로 부터 侵入하여 各 臟器로 移動하면서 成熟하게되고 膽管內에서 産卵하기까지는 적어도 60~90日을 必要로 하게 되어 産卵期와는 絶對的인 關係가 있으므로 每番 糞便檢査를 通하여 虫卵을 確認할 수는 없으며, 糞便檢査法의 難易와 技術의 熟練이 要求되므로 肝蛭診斷에는 一般的으로 皮內反應法이 常用되고 있지만^{11,13)}, 이것 역시 驅虫한 後로도 長期에 걸쳐 陽性反應을 나타내므로 臨床面에 있어서 糞便檢査는 不可避한 檢査法이라 아니할 수 없다. 肝蛭虫卵은 比重이 높은 關係로 沈澱原理를 應用한 集卵法이 많이 利用되고 있으나 이미 報告된 方法들은 漸次 改善되어 왔으나^{3,6,7)} 現在까지도 簡便하며 迅速하고 正確한 檢出法은 없는 것으로 알고 있다.

現在까지 Bass法¹⁾을 爲始하여 數 많은 方法이 報告되었으나^{2~4,6,7)}, 一般的으로 渡邊變法¹²⁾, 時計皿法¹⁰⁾, 隱岐變法⁸⁾, SRGB法등^{5,9,14)}의 方法이 應用되고 있는 實情이다. 著者 등은 平素부터 이들 成績에 對하여 關心을 가지고 調査한 結果 報告者間에 差異가 있어 이것을 解決하기 위하여 檢出率이 높으면서도 操作이 簡便하고 省力的이며, 迅速한 方法을 開發하고자 摸索하고 있었다. 이에 K-式 沈澱管을 考案하여 檢査한 結果 지금까지 報告된 여러 方法에 比하여 理想的인 方法으로 생각되기에 本 K-式 沈澱管法의 概要를 紹介하고 이를 臨床의 應用價値 特히 EPG(egg per gram)成績에 對하여 確實性을 究明할 目的으로 實施한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材 料

1) 肝蛭虫卵: 肝蛭虫의 感染이 可能한 環境下의 大田

近郊牧場에서 皮內反應法에 의해 陽性으로 判定된 乳牛를 對象으로 糞便檢査에 의하여 虫卵을 確認하는 한편 이를 蒐集하여 冷藏庫에 保管하면서 供試하였다.

2) 器材: 檢査에 必要한 準備材料는 Fig.1에서 보는 바와 같다.

① 篩 1組; 金網 直徑 11cm, 높이 6cm의 枠를 만들고 100, 150, 250mesh의 篩를 3段으로 되게 하였다(以下 本文에서는 I, II, III段이라 稱함).

② shower nozzle 1組

③ polyethylene製 洗淨瓶 500ml

④ beaker 100~200ml

⑤ K-式 沈澱管(20ml)

⑥ slide glass

⑦ 染色液; methylene blue原液(5g에 alcohol 100ml) 또는 Giemsa原液의 2倍 稀釋液

2. 檢査方法

1) 500ml의 beaker에 牛糞(肝蛭虫卵을 人爲的으로 糞 g當 50個 混入) 5g을 취하고 물을 가하여 攪拌하고 이 糞汁을 1段에 濾過한다(Fig. 2의 1~3).

2) 1段의 金網上에 適當한 水量으로 1~2分間 shower로 씻어내린다(Fig 2의 4).

3) 1段을 除去하고 II段의 金網위에 約 15秒씩 같은 要領으로 shower로 씻어 내린다(Fig. 2의 5).

4) III段 金網의 周圍에서 물을 弱하게 shower로서 씻어내리고 虫卵을 包含한 殘査를 金網의 中央이나 모서리로 集合시킨다. 이때 必要에 따라 染色液 4~5滴을 點滴하여 染色한다.

5) III段篩를 뒤집어서 100ml用 mess beakes內에 polyethylene洗淨瓶으로 强하게 씻어내리고 beaker의 糞汁이 一定量이 되도록 調節한다. 必要以上으로 過量 일때는 10分 以上 靜置한 후 上清液을 버리고 一定量의 눈금으로 調節한다(Fig.2의 6).

6) 人爲的으로 虫卵 50個씩을 混入한 糞汁을 充分히 振盪한 다음 5, 10 및 15ml를 各各 A·B·C型이라 하고 이를 吸入後 5, 10 및 15分間隔으로 沈澱시키는 것을 各 各 I, II, III型으로 하여 總 9型으로 區分하였다.

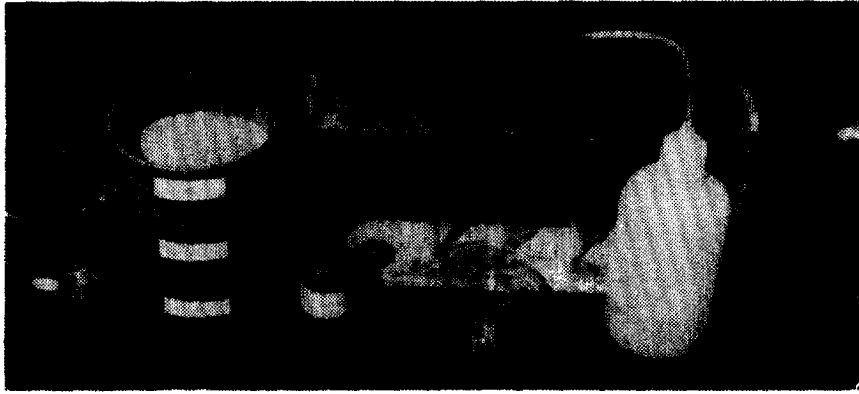


Fig. 1. Apparatus of detection

7) 各型에 따라 K-式 沈澱管을 통하여 全量 또는 1/5 量을 취하여 沈澱管 固定臺(Fig. 1)에 垂直으로 懸垂하여 各型에 따라 沈澱시킨 殘渣를 slide glass위에 完全히 떨어져 나간 후 平坦하게 擴張시킨 다음, cover glass를 덮지 않고서 40~50倍의 低倍率로서 常法대로 虫卵數를 算定한다.

8) 鏡檢은 染色하지 않아도 檢出이 容易하지만 많은 例數를 調査할 때는 視力의 疲勞를 減기 위하여 染色하는 편이 좋다. 이때 纖維類는 綠青色으로 染色되고 肝蛭虫卵은 黃色, 雙口吸虫卵, 大型線虫卵 등은 原色인 白色으로 明確하게 區分이 된다.

結果 및 考察

1. 篩의 組合과 虫卵數: 表 1에서 보는 바와 같이 金網의 細目크기에 따라 7段階의 篩를 만들어 여러 가지 組合을 構想하여 渡邊變法¹²⁾에 의하여 肝蛭虫卵 50個를 人爲的으로 混入한 糞汁을 檢査順序에 따라 實施하고

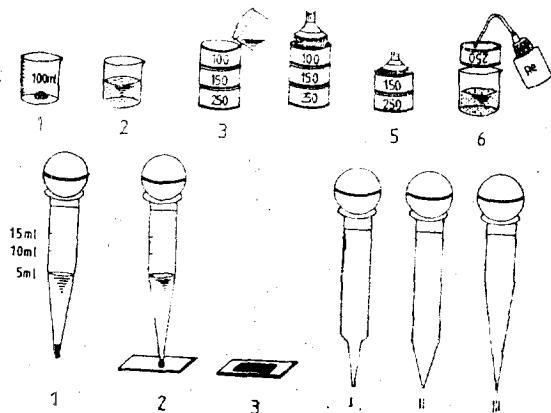


Fig. 2. Procedure of detection

이를 3反復한 結果 A와 B組의 170mesh에서 數個의 虫卵이 回收되었으며, A組의 200mesh에서는 39~41個가, 230mesh에서는 3~5個가 回收되었다. B組에서는 200mesh를 除去한 關係로 230mesh에서 43~46個가 回收되었으나 1個만이 回收되지 않았다.

A와 B組의 短點을 補完한 것으로서 簡便하고 省力의 인데 着眼하여 C組는 3段으로 組合하였지만 A·B組와 같이 粗大殘渣가 除去되고 時間을 短縮할 수 있었으며 特히 他 方法에 比해 높은 回收成績을 나타냈으므로 C組를 採取하여 本 試驗에 使用하였다.

2. 沈澱管의 類型에 따른 回收成績: Fig. 2와 같이 3型의 沈澱管을 便宜上 I, II 및 III型으로 分類하여 名稱하였다. 表 2에서 보는바와 같이 虫卵 50個를 10ml의 糞汁에 混合하여 各型에 따라 10分間적 沈澱시킨 다음 slide glass에 沈渣를 落下시켜 該 視野에서 나타난 것 을 같은 式으로 5反復한 結果, III型의 成績이 90%로 가장 良好하였다.

表 3에 나타난 成績은 表 2에서와 같은 方法으로 하여 虫卵이 完全히 回收됨을 보기 위하여 10分 間隔으로 沈澱時間을 두고 6回까지 調査한 成績이며 I, II型보다 III型이 1回에서의 回收率(90%)이 높았고, 2回에서 全數가 回收되어 가장 理想的인 方法이었다.

以上の 結果에서 가장 理想的인 III型을 K-式 沈澱管으로 名稱하고 本 試驗에서는 簡易法으로 採擇하였다.

3. K-式 沈澱管法에 의한 各型別 成績: 表 4, 5, 6에서는 K-式 沈澱管을 利用하여 反復한 回收成績으로 表 4에서는 A-II, A-III가 A-I보다 出現度가 높았으며 初回 即 1回의 鏡檢에서 全數가 回收되었으며, B型이 C型보다 回收率이 높게 나타났다.

表 5에서는 B-II, B-III는 B-I에 比하여 回收率이 높았으나, A型보다는 낮았고 C型보다는 높았다.

Table 1. Composition of Sieves with Various Meshes and Detection Numbers of Fasciola Eggs

Types	Compositions of sieves(mesh)							Total	
	100	125	150	170	200	230	250		
A	1	0	0	0	2	41	3	—	46
	2	0	0	0	0	40	4	—	44
	3	0	0	0	1	39	5	—	45
B	1	0	—	0	1	—	43	1	45
	2	0	—	0	1	—	46	0	47
	3	0	—	0	0	—	43	0	43
C*	1	0	—	0	—	—	—	—	47
	2	0	—	0	—	—	—	—	48
	3	0	—	0	—	—	—	—	45

*: Selected type —: Elimination of mesh

Table 2. Comparison of the Recovery Rates of Fasciola Eggs with the 3 Kinds of Sedimental Tube

(Unit: %)

Types of tube	No. of serial dropping					
	1	2	3	4	5	6
I	64	10	14	8	4	0
II	72	18	6	4	0	0
III*	90	10	0	0	0	0

*: Selected type of tube

表 6에서는 C-II, C-III는 C-I에 比하여 回收率이 높았으나 A型보다는 역시 낮았으며, B型과는 類似한 結果였다.

以上の 結果에서 나타난 바와 같이 A-II, A-III型은 가장 理想的인 方法으로 思料되며, B-II, C-III型은 A-II, A-III型보다는 低調하지만 比較的 良好한 方法으로 생각된다.

4. K-式 沈澱管法에 의한 平均回數率: K-式 沈澱管法에 의해 3反復한 檢査成績을 平均하여 各型間의 成績을 比較한 結果는 表 7에서 보는바와 같이 前項에서 比較한 것과 大體로 비슷한 成績이었다.

A-II, A-III型은 第1回 鏡檢에서 全數가 回收되었으나, B型과 C型은 各各 91~99%, 89~100%였다. 또한, A-I, B-I 및 C-I型은 各各 88, 82 및 71%였으며, B-I 및 C-I型은 3回以後에서 모두 回收되었다.

以上の 結果에서, A-II, A-III型은 沈澱時間이 充分하고 糞汁量도 5ml가 適當量으로 生覺되어 가장 理想的

Table 3. Comparison of the Recovery Rates with the 3 Kinds of Sedimental Tube

(Unit: %)

Types of tube	Replications					
	1	2	3	4	5	Mean
I	80	50	70	50	62	62.4
II	81	60	70	66	70	69.4
III	90	94	90	86	90	90.0

Table 4. Results of the Recovered Eggs of Fasciola by the Kim's Sedimental Tube (per 5ml)

No. of serial dropping	Types								
	A-I*			A-II			A-III		
1	44	41	45	50	50	49	50	50	49
2	6	8	5	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*: A-I: 5ml-5minute(sedimental time)

A-II: "-10minute(")

A-III: "-15minute(")

인 方法이 確認되었으며, B-III, C-III型도 比較的 良好한 方法으로 認定되었다. 또한, 많은 例數를 한꺼번에 檢査해야 할 경우는 沈澱時間이 遲延됨으로 檢査時間이 많이 所要되나 固定臺에서 靜置하였다가 檢査하게 되므로 큰 不便은 없을것으로 생각되나 糞汁量이 10ml以上일 경우는 過量으로 오는 殘留虫卵의 回數가 完全하지 못한 弊端이 있다.

5. E.P.G. 檢査의 臨床의 應用: K-式 沈澱管에 의한 虫卵檢査에서 人爲的으로 肝蛭虫卵을 混入한 基礎試驗成績이므로 다른 檢査法과의 比較는 多少問題가 있겠으나, 虫卵이 들어있는 糞汁中에는 5g에 該當하는 虫卵數가 들어 있기 때문에 充分히 振盪하여 一定量, 例컨대 10ml(1/5量)中에는 糞 1g에 該當하는 肝蛭虫卵이 들어 있다는 計算이 된다.

表 7에서 보는바와 같이 A, B, C型 다같이 1~3回에서 虫卵 全數가 回收되었으나, A-II, A-III型과 B-III型 및 C-III型은 1回에서 全數의 回數率을 얻을수 있었는데, 上記 結果가 糞便 1g中의 虫卵數인 E.P.G.價(Egg per gram)이므로 本 K-式 沈澱管法은 E.P.G.價를 容易하

Table 5. Results of the Recovered Eggs of Fasciola by the Kim's Sedimental Tube (per 10m^l)

No. of serial dropping	Types								
	B-I*			B-II			B-III		
1	40	41	42	45	44	47	49	50	49
2	7	5	7	5	6	3	1	0	0
3	3	4	1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : B-I : 10m^l-5minute(sedimental time)

B-II : " -10 " (")

B-III : " -15 " (")

Table 6. Results of the Recovered Eggs of Fasciola by the Kim's Sedimental Tube(per 15m^l)

No. of serial dropping	Types								
	C-I*			C-II			C-III		
1	37	34	35	43	43	44	50	49	50
2	7	10	9	7	5	4	0	0	0
3	5	6	5	0	1	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : C-I : 15m^l-5minute(sedimental time)

C-II : " -10 " (")

C-III : " -15 " (")

Table 7. Mean Recovery Rates of Fasciola Eggs by the Kim's Sedimental Tube (Unit : %)

No. of serial dropping	Types								
	A			B			C		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	88	100	100	82	91	99	71	89	100
2	12	0	0	13	9	1	17	11	0
3	0	0	0	5	0	0	12	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

게 檢査할 수 있는 方法이라 하겠다. 從前에는 寄生狀의 程度를 表示할때 十, 廿, 卅 등의 符號로서 莫然한 表示를 하는 것이 常例였으나 本 K-式 沈澱管法은 直接 곧바로 E.P.G. 價를 實數로 表記할 수 있어 寄生程度의 判定이 明確하게 되므로 앞으로 適切한 驅蟲措置 등의 對策樹立에 크게 寄與할 것으로 思料된다.

6. 他 肝蛭虫卵 檢出法과의 比較 : 現在까지 報告된 肝蛭虫卵 檢出法 即 渡邊變法¹²⁾, 岩田法¹⁰⁾, 原茂法⁸⁾, P.E.G.D.法¹³⁾ 및 S.R.G.B.法 등^{9,14)}과 本 K-式 沈澱管法과의 比較는 表 8에 나타난 바와 같다. 現在까지 報告된 肝蛭虫卵 檢出法들은 大部分이 器具들을 使用함에 있어 比較的 簡便치 못하며, 檢出率은 大體로 良好하였으나 E.P.G. 價를 얻지 못하는 弊端이 있는 反面, 本 K-式 沈澱管法은 위의 여러 方法과 같이 器具를 使用하나 省力的이어서 比較的 簡便하며, 檢出率도 가장 높을 뿐만 아니라 同時에 E.P.G. 價를 얻을 수 있어 곧바로 寄生程度의 判定까지 可能하므로 臨床家들에게 널리 勸奨할 수 있는 有用한 方法으로 思料된다.

結 論

皮內反應法에 의해 肝蛭 陽性反應으로 判定된 乳牛를 對象으로 糞便檢査를 實施하여 虫卵을 確認한 후 現在 使用되고 있는 肝蛭虫卵檢査法들의 短點을 改善하기 爲하여 殘滓物을 省力的으로 除去하는 篩의 組合法과 K-式 沈澱管을 考案하여, 人爲的으로 糞汁에 一定量의 虫卵을 混入하여 K-式 沈澱管法에 따라 檢査한 結果, 現在까지 報告된 他 方法들에 比하여 操作이 簡便하고 檢出率도 높게 나타나 理想的인 方法으로 思料되었기에 그 概要와 結果를 報告하는 바이다.

1. 肝蛭虫卵을 濾過하고 殘滓物을 除去하기 위한 篩의 組合를 3段階(100mesh, 150mesh, 250mesh)로 組合하여 省力的인 方法으로 改善하였다.

2. 3種의 沈澱管中 第Ⅲ型의 沈澱管에 의한 肝蛭虫卵의 回收率이 가장 높았으므로 第Ⅲ型을 K-式 沈澱管으로 指稱하였다.

3. K-式 沈澱管法에서 A-II, A-III, B-III 및 C-III型의 1回 回收率은 99~100%範圍였으며, A-I, B-II, C-I 및 C-II型은 71~91%範圍였다.

4. A型(5m^l, 5~15分沈澱), B型(10m^l, 5~15分沈澱) 및 C型(15m^l, 5~15分沈澱)은 各기 特徵을 가진 方法들로서 判定時間을 短縮하는에는 A型이 가장 有用한 方法이었다.

5. K-式 沈澱管法은 다른 檢出法에 比하여 가장 檢出率이 높은 簡便한 方法이었으며, E.P.G. 價도 同時에 얻을 수 있는 理想的인 方法으로서 臨床應用價値가 매

Table 8. Comparison of Detection Method of Fasciola Eggs

Method	Convenience	Instrument	Detect rate	EPG
Watanabe's modified method(1958)	×	○	○	×
Iwada's method(1963)	×	○	○	×
Harashigeru's method(1969)	○	○	○	×
PEGD method(1973)	×	○	○	×
SRGB method(1978)	×	×	○	○
Method of Kim's sedimental tube	○	○	◎	◎

우 높은 検査法으로 思料된다.

参 考 文 献

1. Bass, C.C.: Mild uncinarue infection. Arch. Int. Med. (1909).
2. Dennis, W.R., Stone, W.M. and Swanson, L. E.: A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. J. Amer. Vet. Med. Assoc. (1954) 124: 47.
3. Dorsman, W.: A new technique for counting eggs Fasciola hepatica in cattle faeces. J. Helminth. (1956) 30: 165.
4. Honer, M.R.: The interpretation of faecal egg-counts I. Daily variations in Fasciola hepatica egg-counts in cattle. Z. Parasitenk. (1965) 26: 143.
5. Wagenbach, G.E.: Purification of Eimeria tenella sporozoites with glass bead columns. J. Parasit. (1969) 55: 833.
6. Wickerhauser, T.: Immunobiological diagnosis of fascioliasis. II. The in vitro action of immune serum on the young parasitic stage of Fasciola hepatica- A new precipitin test for fascioliasis. Vet. Arch. (1961) 31: 71.
7. Willmott, S. and Dester, F.R.N.: Variation in faecal egg-counts in paramphistome infections as determined by a new technique. J. Helminth. (1952) 26: 147.
8. 原 茂, 中出萬茂溜: 肝蛭卵 簡易検査法の 一考察, 獸醫畜産新報, (1969) 507: 1276.
9. 平 詔亨: 微細な ガラス 球層濾過による 牛肺虫 第一期 子虫の 分離法. 家畜衛生試験研究報告 (1975) 70: 51.
10. 岩田神之介: 糞便検査 改良法と 従來の 簡易検査法との 比較試験. 日本獸醫學會誌 (1963) 25: 503.
11. 仲村和典, 梧桐喜八郎, 新谷圭男, 前田淳一, 坂井郁雄: 牛肝蛭 検査事業實施にともなう 虫卵検査法の 選定. 獸醫畜産新報 (1981) 721: 14.
12. 渡邊昇藏, 永山文昭, 岩田神之介: 肝蛭卵の 簡易検査法について, 日本獸醫學會誌 (1953) 6: 176.
13. 上村, 森澤, 多田, 麻生: 寄生虫における 皮内反應抗原, 生化學 (1960) 32: 242.
14. 吉原忍, 上野計, 須藤恒二: Polyethyleneglucoose (PEG)・Dextran(D)による 糞便内 肝蛭卵の 集卵法について. 第75回 日本獸醫學會 講演要旨(1973) 85.

An Easy Detection Method of Fasciola Eggs by Kim's Sedimental Tube

Kyo-Joon Kim, D.V.M., M.S., Ph.D., Sang-Keun Kim, M.S., Ph.D., Min-Do Hu, D.V.M.
Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University

Abstract

The studies carried out to investigate the detection method of Fasciola eggs from positive cattle feces in the intradermal reaction method with laborsaving composition of sieves and Kim's sedimental tube method.

The results obtained are summarized as follows:

1. The detection method of Fasciola eggs was improved by 3 meshes (100mesh, 150mesh, 250mesh) for filtration of fecal fluid contained Fasciola eggs.
2. Third type of tube in the 3 kinds of sedimental tube had the highest recovery rate of Fasciola eggs. Thus, this type of tube was selected and called as Kim's sedimental tube.
3. A-II, A-III, B-III and C-III type by Kim's sedimental tube method had the recovery rates of eggs in the 1st drop as ranged 99 to 100% and, A-I, B-II, C-II as 71 to 91%.
4. These Type of tubes were useful to detect Fasciola eggs and to shorten the time of the diagnostic procedures.
5. The Kim's sedimental tube method showed high recovery rates and convenient procedures as compared with other detection methods reported. In addition, the EPG value can also be obtained by this method. Therefore, it is desirable that the Kim's sedimental tube method could be recommended to clinicians.