

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ระบาดวิทยา ชีวประวัติ และการบ่งบอกระดับอนุ  
ของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* Onji &  
Nishino, 1916 ในจังหวัดเชียงใหม่

ผู้เขียน

นายประลองยุทธ ศรีपालวิทย์

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์

ประธานกรรมการ

Prof.Dr. Jong-Yil Chai

กรรมการ

รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย

กรรมการ

อ.ดร. อำนาจ โรจนไพบูลย์

กรรมการ

บทคัดย่อ

พยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* เป็นพยาธิในวงศ์ Heterophyidae ซึ่งมีรายงาน  
ติดในคนเขตภาคเหนือและภาคอีสานของไทย แต่ข้อมูลเกี่ยวกับค่าความชุก (prevalence) ของ  
พยาธิในปลายังมีน้อย วัตถุประสงค์ของการสำรวจในครั้งนี้เพื่อตรวจหาระยะติดต่อของพยาธิ  
*S. falcatus* ในปลาเข็ม (*Dermogenus pusillus*) ระหว่างเดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือนธันวาคม  
2545 จากอำเภอเมือง หางดง ดอยสะเก็ด และสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งประชาชนมีการใช้  
ประโยชน์จากแหล่งน้ำอย่างมาก พบค่าความชุก เท่ากับ 98.28% (1199/1220) ช่วงความ  
หนาแน่นของการติดเชื้อ (range intensity) มีค่าเท่ากับ 94 - 2,434 เมตาเซอร์คาเรีย

(metacercariae) ต่อปลา 1 ตัว (ค่าความหนาแน่น 919.02) 28 - 3,418 (963.66) 2 - 2,492 (213.51) และ 0 - 815 (85.12) ในปลาจากอำเภอเมือง หางดง ดอยสะเก็ด และสารภี ตามลำดับ โดยพบพยาธิมากที่สุดในส่วนของกล้ามเนื้อในทุกอำเภอ

การศึกษาชีวประวัติพยาธิใบไม้ *S. falcatus* เริ่มจากระยะตัวเต็มวัยในโฮสต์เฉพาะ หนู และไก่โดยการป้อนหนอนพยาธิระยะ metacercariae และตรวจหาระยะตัวเต็มวัย พบค่าการติดพยาธิในโฮสต์ (incidence) เป็น 77.78% (14/18) และ 91.06% (33/34) ค่าความหนาแน่นเป็น 15.56 (280/18) และ 86.06 (2,926/34) ในหนูและไก่ตามลำดับ และมีค่า recovery rate เท่ากับ 7.78% และ 33.76% การศึกษาการพัฒนาของพยาธิตัวเต็มวัยในไก่ พบขนาดของลำตัวและอวัยวะภายในอื่นๆ ของพยาธิ เช่น oral sucker pharynx esophagus ventrogenital sucker ovary และ testes มีการเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ถึง 2 หลังจากการป้อนพยาธิในไก่ ตรวจพบไข่ภายในตัวของพยาธิเฉลี่ย 87.50% ของพยาธิทั้งหมด ในวันที่ 2 โดยขนาดของไข่มีขนาดค่อนข้างคงที่ ระหว่างวันที่ 2 ถึง 14 หลังจากป้อนหนอนพยาธิในไก่ มีความยาว 20.0 - 22.5 ไมโครเมตร กว้าง 7.5 - 10.5 ไมโครเมตร และตรวจพบไข่ในอุจจาระของหนูและไก่ในวันที่ 7 และ 8 หลังจากการป้อนพยาธิตามลำดับ ตัวอ่อนระยะ miracidium ที่อยู่ในไข่ มีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ (pyriform) ยาว 12.5 - 15.5 ไมโครเมตร กว้าง 5.0 - 7.5 ไมโครเมตร

การวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาโดยการศึกษาแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ *S. falcatus* เทียบกับพยาธิใบไม้ในวงศ์เดียวกันอีก 4 ชนิด ได้แก่ *Haplorchis taichui* *Centrocestus caninus* *Metagonimus yokogawai* *Haplorchoides* sp. และพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) 20 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ ซึ่งมีเพียง 0.56 % ที่พบจากพยาธิทั้ง 6 ชนิดที่

ทำการศึกษา การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยโปรแกรม PAUP สามารถจัดกลุ่มออกเป็นสองกลุ่ม คือ พยาธิใบไม้ *S. falcatus* *H. taichui* *C. caninus* และ *M. yokogawai* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พยาธิใบไม้ *Haplorchoides* sp. อยู่ในกลุ่มที่สอง และพยาธิใบไม้ *O. viverrini* เป็น outgroup การหาไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) โดยเลือกแถบดีเอ็นเอขนาด 382 คู่เบส ซึ่งพบเฉพาะในแถบดีเอ็นเอของพยาธิ *S. falcatus* โดยใช้ไพรเมอร์ OPA08 จากนั้นนำไปหาลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ *S. falcatus* 1 คู่คือ SFF1 (5'-GTGACGTAGGACC TAAAACAG-3') และ SFR1 (5'-GTGACGTAGGTAGCCCAGGTAGCGCGTT-3') เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) พบให้ผลบวก (positive) เฉพาะพยาธิใบไม้ *S. falcatus* และให้ผลลบ (negative) ต่อพยาธิอีก 5 ชนิดที่นำมาเปรียบเทียบ ไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ *S. falcatus* นี้ได้นำไปตรวจหาระยะตัวอ่อนในหอยจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติในการศึกษาชีวประวัติของพยาธิใบไม้ชนิดนี้ต่อไป

การตรวจหาระยะตัวอ่อนของพยาธิ *S. falcatus* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ ใช้ไพรเมอร์ SFF1/SFR1 ซึ่งจำเพาะต่อพยาธิชนิดนี้จากผลการวิจัยเบื้องต้น พบตัวอ่อนของพยาธิในหอย *Tarebia granifera* ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติจากตำบลแม่เห็ะให้ผลบวก กล่าวคือพบตัวอ่อนระยะ mother rediae daughter radiae และ cercariae จำนวนมากในเนื้อเยื่อของหอย ตัวอ่อนระยะ mother redia มีลักษณะเรียวยาว (elongate) ยาว 152.5 - 232.5 ไมโครเมตร กว้าง 34.0 - 55.5 ไมโครเมตร มี pharynx ยาว 27.5 - 37.5 ไมโครเมตร กว้าง 22.5 - 32.5 ไมโครเมตร ตัวอ่อนระยะ daughter redia ลักษณะเรียวยาว มีความยาว 675.0 - 1,075.0 ไมโครเมตร กว้าง 90.0 - 120.0 ไมโครเมตร พบ pharynx ยาว 35.0 - 62.5 ไมโครเมตร กว้าง 27.5 - 50.0 ไมโครเมตร ตัวอ่อนระยะ cercaria เป็นแบบ parapleurophocercous ส่วนลำตัวยาว 155.0 - 230.0

ไมโครเมตร กว้าง 67.5 - 100.0 ไมโครเมตร ส่วนหาง มีลักษณะเรียวยาว มีครีบก้นยาวไปกับหาง ยาว 210.0 - 390.0 ไมโครเมตร กว้าง 17.5 - 27.5 ไมโครเมตร พบตัวอ่อนระยะ metacercariae ในปลาเข็มที่ติดเชื้อตามธรรมชาติจากคูเมืองเชียงใหม่ โดย encysted metacercariae มีความยาว 147.5 - 207.5 ไมโครเมตร กว้าง 127.5 - 177.5 ไมโครเมตร cyst wallsหนา 2.5 - 5.0 ไมโครเมตร ส่วน excysted metacercariae ลักษณะยาวรี (elongated and ovoid) มีความยาว 290.0 - 412.5 ไมโครเมตร กว้าง 130.0 - 175.0 ไมโครเมตร พบ ventrogenital sucker อยู่เกือบกึ่งกลางของลำตัวเอียงไปทางด้านขวา มี spine ขนาดเล็ก 2 กลุ่ม testes ตั้งอยู่ตรงกันข้ามกัน ในส่วนท้ายของลำตัว testis ด้านซ้าย ยาว 30.0 - 51.5 ไมโครเมตร กว้าง 35.0 - 45.0 ไมโครเมตร ส่วน testis ด้านขวา ยาว 35.0 - 45.0 ไมโครเมตร กว้าง 33.0 - 42.5 ไมโครเมตร ovary ยาว 17.5 - 31.0 ไมโครเมตร กว้าง 17.5 - 31.0 ไมโครเมตร

การศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิใบไม้ *S. falcatus* ซึ่งให้เห็นว่าปลาเข็มในจังหวัดเชียงใหม่ ติดเชื้อพยาธิใบไม้ *S. falcatus* ระยะเมตตาเซอร์คาเรียอย่างหนัก การศึกษาชีวประวัติของพยาธิ *S. falcatus* สรุปผลได้ว่าพยาธิชนิดนี้สามารถพบระยะตัวเต็มวัยในหนูและไก่ 2 วัน หลังการป้อน ตัวอ่อนระยะ metacercariae ที่ได้จากปลาเข็มซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง ตรวจพบระยะไข่ 7 และ 8 วันหลังจากการป้อนในหนูและไก่ตามลำดับ พบระยะตัวอ่อนระยะ mother rediae daughter rediae และ cercariae ในหอย *Tarebia granifera* ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง การบ่งบอกระดับอนุสามารถหาไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิ *S. falcatus* ได้ คือ SFF1 และ SFR1 และการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิจากเทคนิค HAT-RAPD สามารถแยกพยาธิ 6 ชนิดที่ทำการศึกษาออกจากกันอย่างชัดเจน

<b>Thesis Title</b>	Epidemiology, Life History and Molecular Identification of Trematode, <i>Stellantchasmus falcatus</i> Onji & Nishino, 1916 in Chiang Mai Province	
<b>Author</b>	Mr. Pralongyut Sripalwit	
<b>Degree</b>	Doctor of Science (Biology) <i>Philosophy</i>	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc.Prof.Dr. Chalobol Wongsawad	Chairperson
	Prof.Dr. Jong-Yil Chai	Member
	Assoc.Prof.Dr.Somboon Anuntalabhochai	Member
	Lect.Dr. Amnat Rojanapaibul	Member

### ABSTRACT

*Stellantchasmus falcatus* is one of the heterophyid flukes that were reported in humans in northern and northeastern Thailand, but its prevalence in fish hosts is poorly known. This investigation aimed to examine the infective stage of *S. falcatus* in half-beaked fish, *Dermogenus pusillus*, collected from water reservoirs that are frequently used by the people in Mueang, Hang Dong, Doi Saket and Saraphi districts, Chiang Mai province from December 2001 to December 2002. The prevalence of infection was 98.28% of the fish (1199/1220). The intensity range of *S. falcatus* metacercariae per fish varied; 94 - 2,434 (intensity 919.02), 28 - 3,418 (963.66), 2 - 2,492 (213.51) and 0 - 815 (85.12) in Mueang, Hang Dong, Saraphi, and

Doi Saket districts, respectively. The body portion of the fish with the heaviest metacercarial infections were muscles in all districts.

The life history of *S. falcatus* was initially investigated by orally force-feeding metacercariae to mice and chicks, and then examining for adult worms. The incidence of the experimental hosts were 77.78% (14/18) and 91.06% (33/34), with the intensities 15.56 (280/18) and 86.06 (2,926/34) in mice and chicks respectively. The recovery rates of worms were 7.78% and 33.76% on average. The development of adult worms was observed in experimental chicks. Body size and inner organs such as the oral sucker, pharynx, esophagus, ventrogenital sucker, ovary and testes quickly increased from day 1 - 2 post-infection (PI). The eggs were recognized in 87.50% of specimens on day 2 PI. Egg size in the uterine duct was almost constant during days 2 - 14 PI with 20.0 - 22.5  $\mu\text{m}$  long and 7.5 - 10.5  $\mu\text{m}$  wide. Eggs of *S. falcatus* were first found in feces of experimental mice and chicks at 7 and 8 days PI, respectively. Miracidium found in embryonated egg was pyriform with 12.5 - 15.5  $\mu\text{m}$  long and 5.0 - 7.5  $\mu\text{m}$  wide.

The molecular analysis was studied by compared DNA fingerprints of *S. falcatus* with four other heterophyid flukes (*Haplorchis taichui*, *Centrocestus caninus*, *Metagonimus yokogawai* and *Haplorchoides* sp.) and one liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) using a high annealing temperature random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique, with 20 arbitrary 10-mer oligonucleotide primers. In total, HAT-RAPD generated 354 genetic markers of which only 0.56% were shared by the six species studied and separated the six species studied into two major clusters by PAUP program analysis: *S. falcatus*, *H. taichui*, *C. caninus* and *M. yokogawai* were grouped together; the second cluster is *Haplorchoides* sp. with



*O. viverrini* as an outgroup. For specific primer finding, a unique 382 bp band generated by the OPA08 primer was selected from HAT-RAPD markers of *S. falcatus*. Subsequently, this band was excised and sequenced. Based on sequence data, a pair of specific primers; SFF1 (5'-GTGACGTAGGACCTTAAAACAG-3') and SFR1 (5'-GTGACGTAGGTAGCCCAGGTAGCGCGTT-3'), was designed for polymerase chain reaction (PCR) identification for *S. falcatus*. The primers provided PCR-positive in *S. falcatus*, whereas the other five species of adults tested were repeatedly PCR-negative. This specific primer for *S. falcatus* has been applied to screen the larval stages in natural snails for investigation of its life history in the study area.

When the specific primer pair SFF1/SFR1 from above was used for screening the larval stages of *S. falcatus*, DNA samples from a naturally infected snail (*Tarebia granifera*) collected from Tumbon Mae Hae provided PCR-positive. A number of larval stages, mother rediae, daughter rediae and cercariae were detected in the tissue of the snail. The mother redia was elongated, 152.5 - 232.5  $\mu\text{m}$  long, 34.0 - 55.0  $\mu\text{m}$  wide and the pharynx was 27.5 - 37.5  $\mu\text{m}$  long, 22.5 - 32.5  $\mu\text{m}$  wide. The daughter redia was elongated, 675.0 - 1,075.0  $\mu\text{m}$  long, 90.0 - 120.0  $\mu\text{m}$  wide and the pharynx was 35.0 - 62.5  $\mu\text{m}$  long, 27.5 - 50.0  $\mu\text{m}$  wide. The cercaria was of the parapleurophocercous type. The body was 155.0 - 230.0  $\mu\text{m}$  long, 67.5 - 100.0  $\mu\text{m}$  wide. The tail with a fin was elongated and it set in a socket of the body, 210.0 - 390.0  $\mu\text{m}$  long, 17.5 - 27.5  $\mu\text{m}$  wide. Metacercariae of *S. falcatus* were collected from a naturally infected half-beak fish, *Dermogenius pullsilus* in Chiang Mai moat. Encysted metacercariae were 147.5 - 207.5  $\mu\text{m}$  long and 127.5 - 177.5  $\mu\text{m}$  wide. Cyst

walls were 2.5 - 5.0  $\mu\text{m}$  in thickness. Excysted worms were elongated and ovoid, 290.0 - 412.5  $\mu\text{m}$  long and 130.0 - 175.0  $\mu\text{m}$  wide. The ventrogenital sucker was slightly submedian to the right side and armed with two dense lateral groups of small spines on the lip. Two testes are opposite and situated in the posterior part of the body. The left testis was 30.0 - 51.5  $\mu\text{m}$  long and 35.0 - 45.0  $\mu\text{m}$  wide. The right testis was 35.0 - 45.0  $\mu\text{m}$  long and 33.0 - 42.5  $\mu\text{m}$  wide. Ovary was 17.5 - 31.0  $\mu\text{m}$  long and 17.5 - 31.0  $\mu\text{m}$  wide.

The epidemiology investigation of *S. falcatus* indicated that the half-beaked fish in Chiang Mai province are heavily infected with *S. falcatus* metacercariae. The life history investigation of *S. falcatus*, from this study showed that adult worms were found both in mice and chicks after being orally force-fed with metacercariae from *D. pusillus* (second intermediate host) at day 2. Embryonated eggs could be found in the feces of mice and chicks at 7 and 8 days PI. The larval stages of mother rediae, daughter rediae and cercariae were recovered from a naturally infected snail, *Tarebia granifera* (first intermediate host). The molecular identification, SFF1 and SFR1 specific primers provided PCR-positive only in *S. falcatus*. The six species studied were distinct, discriminated by the analysis of HAT-RAPD patterns.

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University

All rights reserved