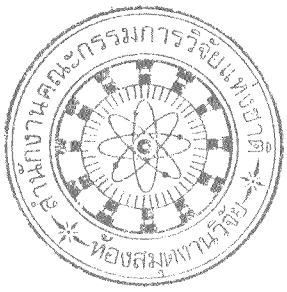
บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การระบาดวิทยาของพยาธิใบไม้ในตับขนาดใหญ่ (*Fasciola gigantica*) และพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วบางชนิดในวัว และควาย และการตรวจสอบทางอณูชีววิทยาของพยาธิ สำหรับการศึกษาการระบาดของพยาธิระยะตัวเต็มวัยในวัว และควาย ได้กำหนดจุดเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เพื่อเก็บตัวอย่างตับ ถุงน้ำดี และกระเพาะผ้าขี้ริ้วของวัวและควาย จำนวน 6 จังหวัด แบ่งเป็นจุดเก็บตัวอย่างในภาคเหนือ 4 จังหวัด จำนวน 7 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดลำพูนจำนวน 2 จุดเก็บตัวอย่าง คือ อำเภอเมือง และ อำเภอป่าซาง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 จุดเก็บตัวอย่าง คือ อำเภอเมือง อำเภอดอยสะเก็ด และอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงราย จำนวน 1 จุดเก็บตัวอย่าง คือ อำเภอแม่สาย และจังหวัดตาก 1 จุดเก็บตัวอย่าง คืออำเภอเมือง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัด จำนวน 2 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดนครพนม 1 จุดเก็บตัวอย่าง คืออำเภอนาแก และจังหวัดสกลนคร 1 จุดเก็บตัวอย่าง คืออำเภอคำตากล้า ซึ่งผลการศึกษาพบพยาธิทั้งหมด 9 ชนิด แบ่งเป็นพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ 1 ชนิด คือ *F. gigantica* และพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้ว 8 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ *Paramphistomum epicilitum, Fischoederius elongatus, Fischoederius* sp., *Orthocoelium streptocoelium, Orthocoelium dicranocoelium, Calicophoron calicophorum* และพยาธิที่ยังไม่ทราบชนิดอีก 2 ชนิด ได้แก่ unknown 1 และ unknown 2 สำหรับพยาธิในกระเพาะผ้าขี้ริ้วมีความแตกต่างจากการศึกษาพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้วในวัวและควายจากประเทศไทย ซึ่งพบพยาธิหลายชนิด ได้แก่ *G. crumenifer, Carmyerius spatiosus, F. elongatus, O. streptocoelium, O. dicranocoelium, O. parvipapillatum, P. epiclitum, P. ichikawai,* and *C. calicophorum* (Sey *et al.*, 1997), *P. cervi* (Anuracpreeda *et al.*, 2008; Panyarachun *et al.*, 2010) ขณะเดียวกันในภาคเหนือยังพบจำนวนชนิดของพยาธิมากกว่าการศึกษาของ Sripalwit (2007) ที่พบพยาธิกลุ่มนี้เพียง 3 ชนิดได้แก่ *O. streptocoelium, P. epiclitum* และ *F. elongates* นอกจากนี้ยังแตกต่างจากพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าริ้วที่พบในประเทศอื่นๆ เช่น พยาธิ *P. daubneyi* พบในประเทศฝรั่งเศส (Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000) *P. ichikawai* พบในประเทศ Moravia (Kotrla and Chroustacta, 1978) *P. microbothrium* มีรายงานพบในประเทศ Sardinia, Yugoslavia และ Hungary (Horak, 1971) *P. cervi* พบในประเทศ Mexico (Rangel-Ruiz *et al.*, 2003), Bangladesh (Uddin *et al.*,



2006), *Calicophoron microbothrium, C. clavula* และ *Ceylonocotyle dicranocoelium* มีรายงานพบในประเทศ Zimbabwe (Dube *et al.*, 2010) ขณะที่ *Fischoederius upiensis* พบในประเทศ Philippines (Eduardo and Javellana, 2008) สำหรับพยาธิ *F. elongatus* และ *F. cobboldi* มีรายงานพบในประเทศ India, Bangladesh และ Thailand (Horak, 1971; Sey and Prasitirat, 1994)

สำหรับความชุกของพยาธิที่พบในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *Fasciola gigantica* ในควายมีความชุกมากกว่าวัว โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 63.33% ขณะที่วัวพบเพียง 26.32% ขณะที่พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้ว พบว่าควายมีความหลากหลายของชนิดพยาธิ และจำนวนมากกว่าวัวเช่นเดียวกัน โดยควายพบพยาธิ *Fischoederius elongatus* มีค่าความชุกรวมสูงที่สุดเท่ากับ 100% ขณะที่วัวกลับพบพยาธิ *P. epicilitum* มีค่าความชุกรวมเท่ากับ 68.42% ซึ่งอาจเนื่องมาจากควายสามารถกินอาหารทั้งบนบก และในน้ำ โดยที่ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อของพยาธิเหล่านี้จะเกาะติดอยู่กับพืชน้ำ ทำให้ควายมีโอกาสได้รับเมตาเซอร์คาเรียมากกว่าวัวที่ไม่สามารถกินอาหารในน้ำได้ และอาจเนื่องมาจากวัวบางส่วนมีการเลี้ยงในฟาร์มมมากกว่าควายซึ่งปล่อยให้หาอาหารกินเองตามธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้น สามารถทำได้เพียงการเปรียบเทียบชนิด และความชุกของพยาธิที่เก็บรวบรวมมาจากวัวเท่านั้น เนื่องจากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมบริโภควัวเท่านั้น เป็นเหตุให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างพยาธิในควายได้ ขณะที่ภาคเหนือจะบริโภคควายเป็นหลัก และนิยมบริโภควัวบ้างแต่มีปริมาณน้อยกว่า ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบชนิดของพยาธิที่พบในวัวจากทั้ง 2 ภาค พบว่าตะวันออกเฉียงเหนือมีความชุกของพยาธิน้อยกว่าภาคเหนือ โดยภาคเหนือพบชนิดของพยาธิแตกต่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 2 ชนิด ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ unknown 1 และ unknown 2 ขณะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบพยาธิที่แตกต่างจากภาคเหนือ คือ *Fischoederius* sp. สำหรับการศึกษาการระบาดของพยาธิระยะตัวเต็มในวัว และควายกลับให้ผลที่ขัดแย้งกับการระบาดของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียในหอย ซึ่งจากการศึกษาพบเซอร์คาเรียในหอยจำนวน 4 แบบ คือ gymnophallus cercaria, amphistome cercaria, parapleurolophocercous cercaria และ furcocercous cercaria โดยที่ gymnophallus cercaria และ amphistome cercaria คาดว่าเป็นตัวอ่อนของพยาธิที่จะพัฒนาไปเป็นพยาธิ *F. gigantica* และ พยาธิกระเพาะผ้าขี้ริ้ว โดยที่เซอร์คาเรียทั้ง 2 แบบพบในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างน้อย ขณะที่ parapleurolophocercous cercaria พบมากที่สุดในทุกจุดเก็บตัวอย่าง สำหรับสาเหตุที่การระบาดของพยาธิระยะตัวเต็มวัยกับตัวอ่อนให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันอาจเนื่องจากวัว และควายที่

นำมาฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ในแถบภาคเหนือลักลอบนำเข้าจากประเทศเพื่อนบ้าน เพราะภาคเหนือมีอาณาเขตติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้านเป็นแนวยาว และมีพื้นที่เป็นภูเขาสลับซับซ้อน ทำให้มีการลักลอบนำเข้าวัว และควายมาจากประเทศเพื่อนบ้านได้ง่าย ซึ่งวัวและควายเหล่านี้ส่วนใหญ่มีการเลี้ยงแบบปล่อย และกินหญ้าตามธรรมชาติจึงมีโอกาสที่สัตว์เลี้ยงจะได้รับเมตาเซอร์คาเรีย (ระยะติดต่อ) ของพยาธิเหล่านี้ที่เกาะติดอยู่กับพืชน้ำจึงมีโอกาสที่พยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และพยาธิกระเพาะผ้าขี้ริ้วในโคมีการระบาดที่สูงกว่าในประเทศไทย ขณะที่ในประเทศไทยจะนิยมเลี้ยงสัตว์แบบฟาร์ม หรือกึ่งฟาร์ม มีวิธีการเลี้ยงที่ถูกสุขลักษณะมากกว่า และให้ยาถ่ายพยาธิวัวและควายเป็นประจำ ทำให้มีการระบาดของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของพยาธิน้อยตามไปด้วย

สำหรับการศึกษาทางอณูชีววิทยา โดยการศึกษาการสร้างตัวติดตามในการตรวจสอบพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantica* โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD ซึ่งพัฒนาโดย Anuntalabhochai *et al.* (2000) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic DNA) เป็นประโยชน์ในการแยกชนิดของพยาธิที่มีเหมือนหรือแตกต่างชนิดกันของพยาธิได้ นอกจากนี้แถบ DNA ที่แตกต่างกันของพยาธิ หรือมีความเฉพาะเจาะจงกับพยาธิชนิดนั้น ๆ สามารถนำไปออกแบบ และสร้างเป็นตัวติดตามสำหรับนำมาใช้ตรวจสอบพยาธิชนิดนั้น ๆ ต่อไปได้ ซึ่งวิธีการศึกษานี้มีการนำไปใช้สร้างตัวติดตามในพยาธิหลายชนิด โดย Sripalwit *et al.* (2003) ได้นำเทคนิค HAT-RAPD มาเป็นสร้างตัวติดตามของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่นำไปสร้างเป็นตัวติดตามมีขนาด 382 bp. ที่ได้จาก primer OPA-08 และ Wongsawad *et al.* (2009) ได้สร้างตัวติดตามของพยาธิ *H. taichui* ที่เกิดจากแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 260 bp จาก primer OPP-11 ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *F. gigantica* จาก arbitrary primer (Operon Technology, USA) ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 19 primers คือ OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPN-02, OPN-03, OPN-04, OPN-05, OPN-06, OPN-07, OPN-08, OPN-09, OPN-10 และ OPP-11 ซึ่งทั้ง 19 primers ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 80-3000 bp และสามารถทำให้เกิด %polymorphic band เท่ากับ 100% ซึ่ง primer OPP-11 ทำให้เกิดแถบดีเอ็นขนาด 550 bp ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *F. gigantica* ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีความแตกต่างจากการศึกษาของ Magalhaes *et al.* (2004) ที่ได้ออกแบบ specific primer ที่ใช้ตรวจสอบพยาธิ *Fasciola hepatica* ในหอย *Lymnea columella* โดยใช้ complete mitochondrial DNA sequence จาก Genebank และตรวจสอบด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ร่วมกับ primers ที่ไป amplify ส่วน internal transcribe spacer 2 (ITS2)

เพื่อทำหน้าที่เป็น internal control ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้ primers เพียงคู่เดียว นอกจากวิธีดังกล่าวนี้ยังมีอีกหลายวิธีที่สามารถนำมาสร้างเป็นตัวติดตามได้ เช่น Hamburger *et al.* (1998 , 1998a and 2001) ที่ออกแบบ primer จากส่วนที่เป็น highly repeat sequence ที่มีขนาด 121 bp. ซึ่งพบจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของพยาธิ *Schistosoma mansoni* ขณะที่ Pontes *et al.* (2002) ใช้ส่วนที่เป็น highly repeat sequence ในการออกแบบ primer เพื่อตรวจสอบ *S. mansoni* เช่นเดียวกัน แต่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาด 110 bp. นอกจากนั้นยังแตกต่างจากการศึกษาของ Hertel *et al.* (2002) ที่ได้ออกแบบ primer ในการตรวจหาพยาธิ *Trichobilhazia ocellata* จากส่วน tandem repeat DNA sequence ที่มีขนาด 396 bp. ซึ่งได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของพยาธิ นอกจากจะมีการใช้ข้อมูลส่วนที่เป็น repeat sequence ในจีโนมแล้ว ยังมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณอื่น ๆ ในการออกแบบ primer ด้วย เช่นการศึกษาของ Dinkel *et al.* (1998) ที่ใช้ส่วน mitochondrial 12S rRNA gene ในการตรวจหาพยาธิ *Echinococcus mutilocularis* และให้ PCR product ที่เกิดจาก specific primer ขนาด 250 bp. นอกจากจะมีการใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบพยาธิแล้ว Barber *et al.* (2000) ได้ศึกษาการจำแนก *S. haematobium* และ *S. bovis* ในประเทศเคนย่าโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยในเบื้องต้นได้ทำ PCR โดยใช้ primers ที่ไป amplify ส่วน ITS2 region แล้วนำ PCR product ที่ได้ ตัดด้วย enzyme *Taq* 1 และ *Sau*3A1 พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของพยาธิ 2 ชนิดนี้ได้ จะเห็นได้ว่าจากรายงานการศึกษาการสร้าง specific primers เพื่อใช้ตรวจสอบพยาธิ ส่วนใหญ่จะออกแบบ primers โดยใช้ข้อมูล sequence ของจีโนมที่มีในฐานข้อมูลอยู่ก่อนแล้ว แต่สำหรับในการศึกษาครั้งนี้การเลือกใช้ เทคนิค HAT-RAPD ในการพัฒนาตัวติดตามนั้น เนื่องจากวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และสิ้นเปลืองงบประมาณน้อยกว่าเทคนิคทาง molecular อื่น ๆ (สุรินทร์, 2546:2546a; Anuntalabhochai *et al.*, 2000) ทำให้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีเหมาะสมในการสร้างตัวติดตามสำหรับการตรวจสอบชนิดของพยาธิในระยะต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการตรวจสอบโดยใช้ specific primers ควรมีการพัฒนา ต่อไปเป็น specific probe แล้วนำมาทดสอบโดยการทำ hybridization ซึ่งผลการศึกษาที่ผ่านมา specific probe จะต้องไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross hybridized) กับพยาธิชนิดอื่น (Sermsawan *et al.*, 1991; Sirasinha *et al.*, 1991; Dinkel *et al.*, 1998; Hamburger *et al.*, 2001; Hertel *et al.*, 2002) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสร้างตัวติดตามของพยาธิ *F. gigantica* ได้ โดยนำ specific primer ที่ได้ไปตรวจสอบพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็ม กับพยาธิชนิดอื่นๆ โดยพบว่าทำให้เกิดแถบดีเอ็นเฉพาะตัวอย่างดีเอ็นเอของพยาธิ *F. gigantica* ขณะเดียวกันเมื่อนำไปทดสอบกับระยะเซอร์คาเรียที่พบในหอยทั้ง 4

แบบ ซึ่งผลที่ได้ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะ gymnophallus cercaria ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า gymnophallus cercaria เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *F. gigantica* ดังนั้นผลจากการสร้างตัวติดตามของพยาธิชนิดนี้จึงเป็นประโยชน์ในการศึกษาระบาดวิทยา การวางแผนจัดการ การตรวจสอบ และการป้องกันการระบาดของพยาธิชนิดนี้ต่อไปได้

การศึกษาความสัมพันธ์ของพยาธิที่สำรวจพบ และพยาธิที่ใช้เปรียบเทียบจำนวนทั้งหมด 15 ได้แก่ *F. gigantica* (ลำพูน), *F. gigantica* (เชียงใหม่), *F. gigantica* (เชียงราย), *F. gigantica* (อีสาน), *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), *F. hepatica*, *Fischoederius* sp., *O. dicranocoelium*, *P. epiclitum*, *F. elongatus*, *O. streptocoelium*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 สามารถยืนยันได้ว่าพยาธิ *F. gigantica* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้เป็นชนิดเดียวกัน และ *Fasciola* sp.1 กับ *Fasciola* sp.2 จากประเทศเวียตนามเป็นชนิดเดียวกัน ขณะเดียวกัน *F. gigantica* ที่พบในประเทศไทย กับ *Fasciola* sp. ที่ได้จากประเทศเวียตนามมีความใกล้ชิดกันมากกว่าพยาธิชนิดอื่น ขณะที่ *F. hepatica* ถูกแยกออกไปจาก genus เดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอของพยาธิ *F. hepatica* ถูกสกัดมาจากสไลด์ถาวรทำให้คุณภาพของดีเอ็นเอไม่ดี เมื่อนำไปทำ PCR และ gel electrophoresis ทำให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดในแต่ละ primer น้อยตามไปด้วย เมื่อนำแถบดีเอ็นเอเหล่านั้นไปหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจึงทำให้เกิดข้อผิดพลาดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *O. streptocoelium* และ *O. dicranocoelium* มีความใกล้ชิดกันมากกว่าพยาธิในกระเพาะผ้าขี้ริ้วชนิดอื่นที่มี *Fischoederius* sp., *P. epiclitum*, *F. elongatus*, *C. calicophorum*, unknown 1 และunknown 2 ใกล้ชิดกันมากกว่า

สำหรับการเผยแพร่ข้อมูลการวิจัยนั้น คณะผู้วิจัยได้จัดกิจกรรมเผยแพร่ข้อมูลการวิจัยในช่วงสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์ ระหว่างวันที่ 18–20 สิงหาคม 2554 ซึ่งมีนักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไปเข้าร่วมงานเป็นจำนวนมาก นับเป็นโอกาสที่ดีสำหรับการเผยแพร่ข้อมูลการวิจัย ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับพยาธิ รวมทั้งวิธีการป้องกัน และวิธีการรักษาการติดพยาธิ โดยมีการนำเสนอทั้งในรูปแบบของสไลด์ถาวร โปสเตอร์ แผ่นพับ และพยาธิที่เก็บรักษาสภาพในฟอร์มาลีน ซึ่งผลจากการเผยแพร่ข้อมูลวิจัยนั้น พบว่ามีนักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไปให้ความสนใจ และซักถามในรายละเอียดเป็นจำนวนมาก การได้รับข่าวสารข้อมูลเกี่ยวกับพยาธิอย่างต่อเนื่อง ทำให้นักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไปมีการตื่นตัวต่อการติดพยาธิไม่ว่าจะเป็นพยาธิที่สามารถติดถึงคน และไม่ติดถึงคน ซึ่งเป็นการสร้างทัศนคติในเชิงลบเกี่ยวกับพยาธิ ทำให้สามารถปรับเปลี่ยนวัฒนธรรมในการบริโภคอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการติดพยาธิต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการนำเสนอผลการวิจัย และให้ความรู้แก่ประชาชนทั่วไปนั้นนอกจาก

จะเป็นการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยสู่สังคม การมีโอกาสแลกเปลี่ยนความคิดเห็นและอภิปรายผลการวิจัยร่วมกัน จะเป็นการสร้างโอกาสและวิธีการในการแก้ปัญหาที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งเป็นจุดมุ่งหมายหลักของงานวิจัยที่จะทำงานวิจัยให้เป็นงานวิจัยแบบสหวิทยาการ (Interdisciplinary) ที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ และตรงกับความต้องการของชุมชนมากที่สุด