

ชื่อเรื่อง

ระบาดวิทยาและการตรวจสอบทางอนุชีววิทยาของ
พยาธิใบไม้ในตับขนาดใหญ่ (*Fasciola gigantica*)
ร่วมกับพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้บริเวณชนิด

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์
รองศาสตราจารย์ ดร.นพ. คม สุคนธสรพร

บทคัดย่อ

85305

การศึกษาระบาดวิทยาและการตรวจสอบทางอนุชีววิทยาของพยาธิใบไม้ในตับขนาดใหญ่ (*Fasciola gigantica*) ร่วมกับพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้บริเวณชนิด แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกศึกษาการระบาดของพยาธิระยะตัวเต็มวัยในวัว-ควาย และระยะตัวอ่อนในหอย และส่วนที่สองการศึกษาทางอนุชีววิทยา ในการศึกษาการระบาดของพยาธิระยะตัวเต็มวัยนั้น พบพยาธิทั้งหมด 9 ชนิด แบ่งเป็นพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ 1 ชนิด คือ *Fasciola gigantica* พยาธิกระเพาะลำไส้ 8 ชนิด ได้แก่ *Paramphistomum epiclitum*, *Fischoederius elongatus*, *Fischoederius* sp., *Orthocoelium streptocoelium*, *Orthocoelium dicranocoelium*, *Calicophoron calicophorum* และพยาธิที่ยังไม่ทราบชนิดอีก 2 ชนิด ได้แก่ Unknown 1 และ Unknown 2 ซึ่งควายพบพยาธิ *F. gigantica* มากกว่าวัว โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 63.33% ขณะที่วัวพบเพียง 26.32% สำหรับพยาธิใบไม้กระเพาะลำไส้ พบพยาธิ *F. elongatus* ในควายมีค่าความชุกรวมสูงที่สุดเท่ากับ 100% ขณะที่วัวพบพยาธิ *P. epiclitum* มีค่าความชุกรวมเท่ากับ 68.42% สำหรับการระบาดของตัวอ่อนพยาธิระยะเชอร์คาเรียในหอย จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Filopaludina martensi martensi*, *Filopaludina doliaris*, *Melanoides tuberculata*, *Adamietta housei*, *lymnaea auricularia rubiginosa*, *Indoplanorbis exustus* และ *Tarebia granifera* พบเชอร์คาเรียทั้งหมด 4 แบบ คือ *gymnophallus cercaria*, *amphistome cercaria*, *parapleurolophocercous cercaria* และ *furcocercous cercaria* พบว่าค่าความชุกของ *parapleurolophocercous cercaria* สูงที่สุดใน *M. tuberculata* เท่ากับ 63.33% และ *gymnophallus cercaria* มีค่าความชุกน้อยที่สุดใน *L. auricularia rubiginosa* เท่ากับ 10% ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะเชอร์คาเรียของพยาธิ *F. gigantica* และยังพบว่า *I. exustus* ไม่พบการติดเชื้อของตัวอ่อนพยาธิ

การศึกษาการสร้างตัวติดตามสำหรับตรวจหาลำพยาธิตัวตืด *F. gigantica* โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยอาศัยการทดสอบกับ arbitrary primers จำนวน 19 primers ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 550 bp จาก primer OPP 11 ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพยาธิตัวตืด *F. gigantica* จากนั้นจึงนำแถบดีเอ็นเอไปสกัดเอาดีเอ็นเอ เพื่อนำไปเข้าสู่กระบวนการ ligation, transformation และ sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาออกแบบ specific primers ที่จำเพาะต่อพยาธิตัวตืด *F. gigantica* ที่มีขนาด 20 bases ดังนี้ Forward primer ; FG_F: 5' – TCG GGA AGA GCT CCT ATG TA–3', Reverse primer ; FG_R: 5' – ATT GAA GGG GAG AGG GTC CG–3' และ specific primer ที่ได้ไปทดสอบกับพยาธิตัวตืด *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย และตัวเต็มวัยของพยาธิตัวตืดอื่นๆ ที่สำรวจพบ พบว่า specific primer นี้ มีความเฉพาะเจาะจงกับพยาธิตัวตืด *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด ประมาณ 550 bp เพียงแถบเดียวในตัวอย่างที่เป็นพยาธิตัวตืด *F. gigantica* เท่านั้น เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างพยาธิตัวตืดระยะเชอร์คาเรียที่พบในหอย จำนวน 4 แบบ คือ gymnophallus cercaria, amphistome cercaria, parapleurolophocercous cercaria และ furcocercous cercaria ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 550 bp ใน gymnophallus cercaria ที่พบใน *L. auricularia rubiginosa* แสดงว่า gymnophallus cercaria เป็นตัวอ่อนของพยาธิตัวตืด *F. gigantica*

การศึกษาความสัมพันธ์ของพยาธิตัวตืด พบว่าพยาธิตัวตืด *F. gigantica* ในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นพยาธิตัวตืดชนิดเดียวกัน ขณะที่พยาธิตัวตืด *Fasciola* sp. 1 และ *Fasciola* sp.2 จากประเทศเวียดนามก็เป็นชนิดเดียวกัน และยังพบว่า *F. gigantica* ในประเทศไทยกับ *Fasciola* sp. จากประเทศเวียดนามมีความใกล้เคียงกันมากกว่าพยาธิตัวตืดชนิดอื่น ขณะเดียวกัน *F. hepatica* มีความแตกต่างจาก genus เดียวกัน สำหรับพยาธิตัวตืดกระเพาะปัสสาวะที่พบว่ามีพยาธิตัวตืด *O. streptocoelium* และ *O. dicranocoelium* มีความใกล้เคียงกันมากกว่าพยาธิตัวตืดกระเพาะปัสสาวะชนิดอื่นในกลุ่ม

สำหรับกิจกรรมการเผยแพร่ข้อมูลการวิจัยได้จัดขึ้นในช่วงสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์ ระหว่างวันที่ 18–20 สิงหาคม 2554 โดยมีการนำเสนอทั้งในรูปแบบของสไลด์ถาวร โปสเตอร์ แผ่นพับ และพยาธิตัวตืดที่เก็บรักษาสภาพในฟอร์มาลีน ผลจากการเผยแพร่ข้อมูลวิจัยนั้น พบว่านักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไปให้ความสนใจ และซักถามเป็นจำนวนมาก ซึ่งการนำเสนอผลการวิจัย และให้ความรู้ผ่านการเผยแพร่ข้อมูลในรูปแบบต่างๆ นี้ เป็นการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้สู่ชาวบ้านโดยตรง เพื่อให้ชาวบ้านมีโอกาสเข้าถึงและใช้ประโยชน์จากองค์ความรู้ทางวิชาการ รวมทั้งการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นและอภิปรายผลร่วมกันเพื่อนำไปสู่กระบวนการแก้ปัญหาที่ถูกต้อง และการพัฒนาอย่างยั่งยืนในอนาคต

Title Epidemiology and Molecular Detection of the Giant Liver Fluke, *Fasciola gigantica*, including Some Rumen Flukes

Author Assoc.Prof.Dr. Chalobol Wongsawad
Assist. Pheravut Wongsawad
Assoc.Prof.Dr. Kom Sukontason, MD.

Abstract

805305

Epidemiology and molecular detection of giant liver fluke, *Fasciola gigantica* including rumen flukes in cows (*Bos indicus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) were investigated during October 2010 – September 2011. Two sectors of this study were divided; first, to determine epidemiology and morphological study of adult stage in definitive host and larval stage in snail intermediate host, whereas the last was performed to investigate molecular approaches for specific detection. For the result of epidemiological study, 9 fluke species were recorded which indicated as follows; 1 of giant liver fluke (*F. gigantica*), 8 of rumen flukes (*Paramphistomum epiclitum*, *Fischoederius elongatus*, *Fischoederius* sp., *Orthocoelium streptocoelium*, *O. dicranocoelium*, *Calicophoron calicophoron* and 2 of unknown rumen flukes (unknown1 and 2). From these, *F. gigantica* was predominated in buffaloes than in cows by revealing the prevalence of infection of 63.33% and 26.32% respectively. For the epidemiology of rumen fluke, *F. elongatus* showed highest prevalence (100%) in buffaloes, while the highest prevalence in cows was determined by *P. epiclitum* (68.42%). For the epidemiology of larval stage, 7 snail species were found (*Filopaludina martensi martensi*, *F. doliaris*, *Melanooides tuberculata*, *Adamietta housei*, *Lymnaea auricularia rubiginosa*, *Indoplanorbis exustus* and *Tarebia granifera*) and the presences of cercariae in these snail hosts were therefore determined. Four cercarial types were recovered; gymnophalus cercariae, amphistome cercariae, parapleurolophocercous cercariae and furcocercous cercariae. Parapleurolophocercous cercariae showed the highest prevalence of infection (63.33%) in *M. tuberculata* snail,

while the lowest (10%) was observed in gymnophalus cercaria infected in *L. auricularia rubiginosa* snail. This cercarial type (gymnophalus) has been recognized as the cercarial type of *F. gigantica*.

For molecular study, specific DNA marker for the detection of *F. gigantica* was investigated by using HAT-RAPD PCR method. Nineteen arbitrary primers were used to generate DNA fingerprint and *F. gigantica* specific DNA fragment was screened. The result showed that, 550 bp fragment generated from OPP-11 primer was desired to be the serotype of *F. gigantica* specific. After purified from agarose gel, the fragment was then prepared to sequencing (ligation, transformation). According to sequence data, specific primers (forward/reverse) were designed and sequences of each primer were described as follows; (forward) FG_F: 5'-TCG GGA AGA GCT CCT ATG TA-3' and (reverse) FG_R: 5'-ATT GAA GGG GAG AGG GTC CG-3'. These specific primers were tested for the specificity by attempting to amplify with *F. gigantica* and including all other adult flukes conducted in this study, and it was found that, 550 bp was generated in only *F. gigantica* specimen. Otherwise, they were also attempted to amplify with all 4 cercarial types found in this study and result revealed was, 550 bp was generated in only gymnophalus cercaria which can be confirmed that this cercarial type will develop to be *F. gigantica*.

For phylogenetic analysis, *F. gigantica* collected from the north and northeast region were verified to be the same species while Vietnamese specimens, *Fasciola* sp.1 and *Fasciola* sp.2 were also classified as the same species. Furthermore, Thai *F. gigantica* and Vietnamese *Fasciola* sp. showed more closely related than others, while in this study, *F. hepatica* was separated away from its generic member. In accordance with the rumen flukes, *O. streptocoelium* and *O. dicranocoelium* showed more closely related than other rumen flukes species.

For the promotion of academic interests, our research results were contributed to non-specific participants through the scientific exhibition of regional science week festival which hosted by Faculty of Science, Chiang Mai University during 18-20 August 2011. Multi presentation media including permanent slides of fluke specimens, poster presentation of research results, brochures and formalin-preserved parasite specimens were performed to contribute informative results to other people including teachers, staffs

and multi-grad students of primary and secondary school. The result found that, our objectives and activities were progressed by resulting of well interaction and responsibilities among participants. This seems to be the good opportunity to makes the accession and exploitation of participants to academic interests for sustaining development in further.