



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหาเมตาเซอ์คาร์เรียของพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืด
จากอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

โดย นางสาวจิตติยวดี ศรีภา

กันยายน พ.ศ. 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหาเมตาเซิร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืด
จากอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

ผู้วิจัย

นางสาวจิตติยวดี ศรีภา

วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อุบลฯ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในหัวข้อ “การตรวจหาเมตาเซิร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืดจากอำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี” สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยด้วยความอนุเคราะห์จากงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2555 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.บรรจบ ศรีภา อำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในการทำวิจัย ในระหว่างที่ทำการวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ขอขอบคุณนายสุวิทย์ บาลไทสง ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ท่านคณบดีวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รศ.นพ.ป่วน สุทธิพิณิจธรรม ที่กรุณาอนุญาตผู้วิจัยให้ไปทำวิจัยที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

จิตติยวดี ศรีภา

บทสรุปผู้บริหาร

(Executive summary)

โรคติดเชื้อปรสิตเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ลาว เวียดนาม และกัมพูชา หน่วยงานด้านสาธารณสุขทั้งในระดับประเทศและระดับโลก เช่น World Health Organization (WHO) ต่างเห็นความสำคัญของปัญหานี้ และให้การสนับสนุนช่วยเหลือในด้านต่างๆ เพื่อลดปัญหาดังกล่าว

จากการรณรงค์ป้องกันโดยหลายภาคส่วนทำให้เกิดโรคติดเชื้อปรสิตมีอัตราการลดลงในหลายพื้นที่ แต่ก็ยังคงมีรายงานการเกิดโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีอยู่ โดยพบผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูงถึง 16.6% [1] โดย 1 ใน 4 ของผู้เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ สามารถพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) [2] ซึ่งวัฒนธรรมในการบริโภคปลาแบบสุกๆ ดิบๆ ที่มีระยะติดต่อกับพยาธิ ทำให้มีโอกาสดิตพยาธิใบไม้ตับมากขึ้น นอกจากนี้ ยังมีโอกาสดิตพยาธิใบไม้ลำไส้ได้อีกด้วย ดังนั้น การสำรวจความชุกของการดิตพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืดจากแหล่งน้ำที่ประชาชนมักนิยมไปหาปลาเพื่อมาประกอบอาหารหรือปลาที่ถูกขายในท้องตลาด จะช่วยคาดการณ์โอกาสที่ประชากรในชุมชนนั้นๆ จะได้สัมผัสหรือดิตพยาธิใบไม้ตับรวมถึงพยาธิใบไม้ลำไส้อื่นๆ ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เริ่มต้นการศึกษาความชุกของการดิตพยาธิใบไม้ต่างๆ ในปลาที่จับ/ซื้อได้จากแหล่งต่างๆ ในเขตอำเภวารินชำราบและพื้นที่ใกล้เคียง แบ่งเป็นแหล่งน้ำตามธรรมชาติจำนวน 7 แหล่งน้ำ และตลาดจำนวน 3 แห่ง ได้แก่ บ้านกุดปลาขาว บ้านบึงสระพัง บ้านคอนสาย บ้านหนองกินเพล บ้านหนองสองห้อง บ้านนาโพนน้อย บ้านหนองคู ตลาดสดอำเภวารินชำราบ ตลาดสดชุมชนบ้านบึงหวาย และตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง จากการตรวจดูระยะ metacercaria ที่หาง/ครีบของปลาที่จับได้จากแหล่งดังกล่าว พบว่า ปลาจากบ้านบึงสระพังและตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่างมีระยะ metacercaria ที่บริเวณหางและครีบ ผู้วิจัยจึงได้เก็บตัวอย่างปลาจากทั้งสองแหล่งเพิ่มเติม ได้ปลาตัวอย่างทั้งสิ้น 215 ตัว แบ่งเป็นปลาจากบ้านบึงสระพัง 135 ตัว และปลาจากตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่างอีก 80 ตัว ชนิดของปลาตัวอย่างที่ได้มาจากทั้งสองแหล่งไม่แตกต่างกันนักและเป็นปลาที่พบได้บ่อยในแม่น้ำมูล ปลาที่จับได้จากบ้านบึงสระพัง ได้แก่ ปลากระมัง (*Puntioplites falcifer*) (67.4%) รองลงมา คือ ปลาโຈก (*Cyclocheilichthys enoplos*) 23 ตัว (17.03%), ปลาตะเพียนทราย (*Puntius brevis*) 7 ตัว (5.16%), ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) 6 ตัว (4.44%), ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) และ ปลาขาวสร้อย (*Henicorhynchus simensis*) ชนิดละ 2 ตัว (1.48%) และปลากาดำ หรือปลาอีตุ้ม (*Epalzeorhynchus chrysophekadion*), ปลาสร้อยลูกกล้วย (*Labiobarbus leptocheila*), ปลาตะเพียนทอง (*Barbonymus altus*) และปลากระสูบจุด (*Hampula*

dispar) ชนิดละ 1 ตัว (0.74%) ส่วนปลาตัวอย่างจากตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง พบปลาทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) จำนวน 33 ตัว (41.25%), ปลากระสบจุด (*H. dispar*) จำนวน 22 ตัว (27.5%) และ ปลาโจก (*C. enoplos*) 25 ตัว (31.25%) โดยปลาเหล่านี้ถูกจับมาจากลำเขบายซึ่งอยู่ใกล้เคียงกับตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง ปลาตัวอย่างทุกตัวได้นำมาย่อยด้วยเทคนิค pepsin digestion เพื่อแยกเอาเฉพาะระยะ metacercaria ออกมาจากเนื้อเยื่อปลาและระบุชนิดพยาธิจากรูปร่างลักษณะของระยะ metacercaria ที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการย่อยปลาเพื่อแยกเอาระยะ metacercariae พบว่ามีระยะ metacercariae ที่ตรวจพบในปลาจากบึงสระพังและตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง ทั้งสิ้น 231 metacercariae แบ่งเป็น metacercariae จากบึงสระพัง 165 metacercariae และจากตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง 66 metacercariae โดยส่วนใหญ่ เป็นระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *Cestrocestus formosanus* คิดเป็น 21.21% และ 34.85% ตามลำดับ จากการตรวจระบุชนิดของระยะ metacercariae ในปลาจากบึงสระพังพบระยะ metacercariae ของ *C. formosanus* ในปลากระมัง (*P. falcifer*), ปลาโจก (*C. enoplos*), ปลาากดำ หรือปลาอีตุ้ม (*E. chrysophekadion*), ปลาตะเพียนขาว (*B. gonionotus*), ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) และปลากระสบจุด (*H. dispar*) ระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ลำไส้ที่ตรวจพบรองลงมา คือ ระยะ metacercariae ของ *Haplochis pumilio* และ *H. taichui* โดยพบระยะ metacercariae ของ *H. pumilio* 10.91% และพบระยะ metacercariae ของ *H. taichui* 1.21% ระยะ metacercariae ของ *H. pumilio* นั้นตรวจพบในปลากระมัง (*P. falcifer*) และปลาโจก (*C. enoplos*) ส่วนระยะ metacercariae ของ *H. taichui* ตรวจพบในปลาโจก (*C. enoplos*) เท่านั้น ส่วนปลาสร้อยลูกกล้วย หรือ *Labiobarbus leptocheila* ไม่พบระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ชนิดใดเลย ส่วนปลาที่ได้จากตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง ซึ่งเป็นปลาที่ชาวบ้านจับมาจากลำเขบาย พบว่า ปลาที่ชาวบ้านนำมาขายส่วนใหญ่ ได้แก่ ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*), ปลากระสบจุด (*H. dispar*) และปลาโจก (*C. enoplos*) ซึ่งปลาเหล่านี้ ตรวจพบระยะ metacercariae ของ *C. formosanus* 34.85% โดยตรวจพบในปลาทั้ง 3 ชนิด ระยะ metacercariae ที่ตรวจพบรองลงมา คือ ระยะ metacercariae ของ *H. pumilio* โดยตรวจพบ 4.55% ในปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) และปลากระสบจุด (*H. dispar*) และระยะ metacercariae ของ *H. taichui* พบ 1.52% ในปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*)

จากการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบระยะ metacercariae ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ (unidentified metacercaria) จากปลาทั้งสองแหล่งรวมกันถึง 64.5% และเมื่อนำ DNA ของ metacercaria เหล่านี้ มาทำการเพิ่มจำนวนขึ้นยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน Internal transcribed spacer 2 (ITS-2) ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *H. taichui*, *C. formosanus* และ primer ที่จำเพาะกับ partial genomic DNA ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และ *Clonorchis*

sinensis พบ band ของ PCR products ที่ตำแหน่ง 367 bp หลังจากเพิ่มจำนวน DNA ของ unidentified metacercaria ด้วย primer ที่จำเพาะกับยีน ITS-2 ของพยาธิตัวแบน *C. formosanus* ซึ่งสอดคล้องกับกับจำนวน base pairs ของยีน ITS-2 ของพยาธิตัวแบน *C. formosanus* จึงสรุปได้ว่า unidentified metacercaria ที่ตรวจพบนั้น เป็นระยะ metacercaria ของพยาธิตัวแบน *C. formosanus*

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ ตรวจไม่พบระยะ metacercariae ของพยาธิตัวแบน *O. viverrini* แต่ตรวจพบพยาธิตัวแบนลำไส้อื่นๆ ได้แก่ *H. taichui*, *H. pumilio* และ *C. formosanus* ซึ่งเป็นพยาธิตัวแบนก่อโรครุนแรงในผู้ที่ติดเชื้อ ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีการเจ็บป่วยเล็กน้อย เช่น ปวดท้อง ท้องเสีย ปวดมวนท้อง เป็นต้น เนื่องจากระยะตัวเต็มวัยของพยาธิตัวแบนจะฝังตัวลึกลงไปลำไส้เล็ก แต่การเจ็บปวดเล็กน้อยๆ ก็สามารถบั่นทอนประสิทธิภาพในการทำงานและอาจส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของครอบครัวและสังคมต่อไปได้ นอกจากนี้ การตรวจพบระยะติดต่อของพยาธิตัวแบนในโฮสต์ตัวกลางซึ่งเป็นอาหารหลักของประชากร ยังบ่งบอกถึงความปลอดภัยด้านอาหารที่มาจากพื้นที่นั้นๆ และความสำคัญในการส่งเสริมสุขอนามัยที่ดีให้เกิดขึ้นในชุมชน เพื่อตัดวงจรชีวิตของพยาธิตัวแบนทุกชนิด

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ที่มีสาเหตุจากการรับประทานอาหารประเภทปลาน้ำจืดแบบสุกๆ ดิบๆ ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในประชากรของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากพฤติกรรมของประชากรในการรับประทานอาหารแบบสุกๆ ดิบๆ การตรวจหาระยะติดต่อของพยาธิในปลาน้ำจืดจึงมีความสำคัญในแง่การประเมินความปลอดภัยด้านอาหารของคนในชุมชน จากการตรวจดูระยะติดต่อ metacercaria ของพยาธิในปลาน้ำจืดจากแหล่งต่างๆ พบว่าปลาจากแหล่งน้ำของหมู่บ้านบึงสระพังและปลาที่ขายในตลาดชุมชนบ้านนาสว่าง มีระยะติดต่อ metacercariae ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *Centrocestus formosanus* 25.11%, *Haplochis pumilio* 9.09%, *Haplochis taichui* 1.3% และระยะ metacercaria ที่ไม่สามารถระบุชนิดถึง 64.5% แต่ตรวจไม่พบระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* โดยปลาที่ตรวจพบระยะติดต่อของพยาธิ ได้แก่ ปลากระมัง ปลาโจก กระสับจูด ปลาไส้ตันตาแดงและปลาตะเพียนขาว และจากการเพิ่มจำนวน DNA ของระยะ metacercaria ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับพยาธิพยาธิใบไม้ลำไส้และพยาธิใบไม้ตับ พบ Specific DNA band ความยาว 367 bp หลังจากเพิ่มจำนวน DNA ด้วย primer ที่จำเพาะกับยีน ITS-2 ของ *C. formosanus* ซึ่งบ่งบอกว่าระยะ metacercaria ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้นั้นเป็นระยะ metacercaria ของ *C. formosanus* อย่างไรก็ตามการตรวจพบระยะติดต่อของพยาธิในปลาชนิดต่างๆ นั้น บ่งบอกถึงการมีวงจรชีวิตของพยาธิในสิ่งแวดล้อมและการขาดสุขอนามัยที่ดีของคนในชุมชน การร่วมกันสร้างให้เกิดสุขอนามัยที่ดีในชุมชนจะเป็นการตัดวงจรชีวิตของพยาธิให้หมดไปอย่างถาวร นอกจากนั้น การตรวจไม่พบระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลาน้ำจืดเลย แต่ยังคงมีรายงานอุบัติการณ์โรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีในประชากรอำเภอวารินชำราบ ทำให้ปัจจัยในเรื่องของการติดพยาธิจากปลาน้ำจืดที่ถูกขนส่งมาจากแหล่งอื่น เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควรคำนึงถึง

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ลำไส้, เมตาเซอร์คาเรีย, PCR

Abstract

Parasitic infection through eating raw or improperly cooked fish remains a public health in population of Northeast. The unchanged behavior in eating raw or inadequate cooked fish is provoked the important of fish examination for fluke metacercariae in terms of assessing food safety in community. In this study, the examination for fluke metacercariae in fresh water fish from various area of Warinchamrap district and neighborhood area was performed. The various species of intestinal fluke metacercariae including *Centrocestus formosanus*, *Haplochis pumilio* and *Haplochis taichui* were found in fish from Ban Bung Sa Pang and Ba Na Saung Market as 25.11%, 9.09% and 1.3%, respectively. The cached fish that infected with these intestinal fluke metacercariae were *Puntioplites falcifer*, *Cyclocheilichthys enoplos*, *Hampula dispar*, *Cyclocheilichthys apogon* and *Barbonymus gonionotus*. Unidentified metacercariae was presented as 64.5% while metacercariae of *Opisthorchis viverrini* was not detected. Unidentified metacercariae was extracted for DNA and amplified with intestinal and liver fluke specific primers. DNA band at 367 bp that corresponding with ITS-2 of *C. formosanus* was presented after amplification with specific primer for *C. formosanus*. These indicated that those unidentified metacercariae was *C. formosanus*. The presented of intestinal fluke metacercariae also indicative of the maintaining of intestinal fluke life cycle in environment and insanitation of residents in community. The encouragement in sanitation is important to perform and consumption of infected fish from other sources is also taking into consideration, since opisthorchiasis and cholangiocarcinoma cases have been reported until nowadays.

Key words: Intestinal fluke, Metacercariae, PCR

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	v
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	vi
สารบัญ	vii
สารบัญรูปภาพ	ix
สารบัญตาราง	x
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. ขอบเขตงานวิจัย	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1. ชีววิทยาของพยาธิตัวแบน	3
2. พยาธิตัวแบนลำไส้	3
3. ชีววิทยาของ <i>H. taichui</i>	4
4. ชีววิทยาของ <i>H. pumilio</i>	4
5. ชีววิทยาของ <i>O. viverrini</i>	4
6. ความชุกของระยะติดต่อพยาธิตัวแบน <i>O. viverrini</i> ในปลาน้ำจืด	6
7. ความชุกของ opisthorchiasis	6
8. การแยกชนิดของระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรียโดยเทคนิค PCR	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	9
2. วิธีดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	13
1. ชนิดและจำนวนปลาน้ำจืดตัวอย่างจากแหล่งน้ำในชุมชน	13

	หน้า
2. การตรวจพบระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ในลำไส้	14
3. การระบุชนิดของ unidentified metacercariae โดยวิธี PCR	21
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	31
ประวัติผู้วิจัย	32

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ระยะ metacercariae ที่บริเวณหางปลาในวงศ์ปลาตะเพียนจากบึงสระพัง	14
รูปที่ 2 ระยะ metacercariae ที่บริเวณหางปลาในวงศ์ปลาตะเพียนจากตลาดสด ชุมชนบ้านนาสว่าง	14
รูปที่ 3 ระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ <i>C. formosanus</i>	16
รูปที่ 4 ระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ <i>H. taichui</i>	16
รูปที่ 5 ระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ <i>H. pumilio</i>	17
รูปที่ 6 ระยะ metacercariae ที่ไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิได้	18
รูปที่ 7 PCR products ของ pool unknown metacercaria	21
รูปที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของ pool unknown metacercaria ด้วย primer ที่จำเพาะกับ <i>C. formosanus</i>	22
รูปที่ 9 PCR products ของ unknown metacercaria ซึ่งถูกเพิ่มจำนวนด้วย primer ที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ตับ <i>O. viverrini</i>	22

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 จำนวนของระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ จากตัวอย่างปลาจากบึงสระพัง	19
ตารางที่ 2 จำนวนของระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ จากตัวอย่างปลาจากตลาดชุมชนบ้านนาสว่าง	20

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

โรคติดเชื้อปรสิตยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศไทย ลาว พม่า กัมพูชา และเวียดนาม ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบผู้ติดเชื้อปรสิตหลายชนิด โดยเฉพาะโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ มีรายงานจำนวนผู้ป่วยสูงถึง 16.6% (1) โดย 1 ใน 4 ของผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ สามารถพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) (3)

อย่างไรก็ตาม ได้มีความพยายามในการรณรงค์ เพื่อป้องกันการติดเชื้อปรสิตในประชากรและลดอุบัติการณ์การเกิดโรคที่รุนแรงตามมา แต่ก็พบว่ายังมีรายงานการติดเชื้อปรสิตในประชากร โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีรายงานจำนวนผู้ป่วยอย่างต่อเนื่อง (4-6) จังหวัดอุบลราชธานีเป็นอีกพื้นที่หนึ่งที่มีการติดเชื้อปรสิตในประชากร โดยเฉพาะโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ จากการสำรวจครั้งล่าสุดในพื้นที่อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยตั้งตรงจิตร และคณะ ในปี 2550 พบความชุกของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ถึง 14.8% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับ จากศูนย์มะเร็ง จังหวัดอุบลราชธานี ระหว่างปี 2540-2544 ที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดอื่น จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าประชากรในจังหวัดอุบลราชธานียังคงมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูงมาก สูงกว่าเกณฑ์ที่กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุขตั้งเป้าไว้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรในจังหวัดอุบลราชธานียังขาดสุขนิสัยที่ดีในการรับประทานอาหาร โดยยังมีการบริโภคอาหารประเภทปลาในวงศ์ปลาตะเพียนซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้ตับและพยาธิใบไม้ลำไส้อื่นๆ แบบสุกๆ ดิบๆ ทำให้มีโอกาสดำรงระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรีย นำไปสู่การติดพยาธิใบไม้ต่างๆ

การสำรวจการติดพยาธิใบไม้ในปลาที่อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติที่ประชาชนในพื้นที่สามารถไปจับเพื่อมาประกอบอาหาร เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะบอกความเสี่ยงของประชากรในพื้นที่ที่ใกล้เคียงแหล่งน้ำนั้นต่อการติดเชื้อมีปรสิตดังกล่าว และเป็นแนวทางในการวางแผนป้องกันการติดเชื้อปรสิตจากโฮสต์กึ่งกลางได้นอกจากนั้น ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคที่มีความไวในการตรวจหาและระบุชนิดของระยะเมตาเซอร์คาเรีย แทนการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการแยกชนิด Pitaksakulrat และคณะ (7) ได้นำเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ต่างๆ มาใช้ในการระบุชนิดของระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลาน้ำจืด นอกจากนั้น ยังมีการนำเทคนิคเดียวกันนี้ ไปใช้ในการตรวจหาการติดพยาธิใบไม้ในโฮสต์กึ่งกลาง เช่น ปลาวงศ์ปลาตะเพียน *Cyprinodonts* spp. (8-10) และ

หอย *Bithynia* spp. (11, 12) และโฮสต์เฉพาะ เช่น คน (13-15) และสัตว์ทดลอง เช่น หนูแฮมสเตอร์ (16) โดยการเพิ่มจำนวนขึ้นยีน ที่มีความจำเพาะกับระยะหรือชนิดของพยาธิที่ต้องการศึกษา

เมื่อการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมกรรมการบริโภคกลายเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก การวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิในปลา เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยประเมินความเสี่ยงในการติดพยาธิจากการบริโภคปลาแบบสุกๆ ดิบๆ ในประชากรที่อาศัยในพื้นที่ของแหล่งน้ำที่ตรวจพบปลาที่ติดพยาธิ การทราบชนิดของปลาที่ติดพยาธิและทราบชนิดของพยาธิที่ติดเชื้อในปลา ตลอดจนทราบแหล่งน้ำที่มีปลาที่ติดพยาธิ จะมีประโยชน์ต่อประชาชนในพื้นที่นั้นๆ ในการเลือกบริโภคอาหารหรือหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารแบบสุกๆ ดิบๆ รวมถึงหน่วยงานสาธารณสุขในพื้นที่ ที่จะมึบทบาทในการเฝ้าระวัง ควบคุม ป้องกัน ส่งเสริมให้ความรู้และคำแนะนำแก่ประชาชนเพื่อให้ประชาชนได้ตระหนักถึงความไม่ปลอดภัยจากการรับประทานปลาจากแหล่งน้ำที่ตรวจพบปลาที่ติดเชื้อ ในด้านระบาดวิทยา สามารถบ่งบอกความชุกของปลาที่ติดพยาธิต่างๆ ได้ และการนำเทคนิค PCR มาช่วยในการวินิจฉัย จะช่วยให้การวินิจฉัยมีความจำเพาะและมีความไวมากขึ้น ลดเวลาและความยุ่งยากในการตรวจวินิจฉัย

2. วัตถุประสงค์

ตรวจหาระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืดที่มีเกล็ด (cyprinoid fish) ที่อาศัยในแหล่งน้ำต่างๆ ของอำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

3. ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืดที่มีเกล็ด (cyprinoid fish) ที่จับได้จากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ในพื้นที่อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เทคนิค polymerase chain reaction ในการยืนยันในกรณีที่ไม่สามารถยืนยันชนิดของปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความชุกของการมีระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ ในปลาวงศ์ปลาตะเพียนที่อาศัยในแหล่งน้ำต่างๆ ของอำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี
2. สามารถนำเทคนิค PCR มาใช้ระบุชนิดของเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ได้
3. หน่วยงานด้านสาธารณสุขของจังหวัดอุบลราชธานี สามารถนำข้อมูลความชุกของการมีระยะติดต่อ เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ ในปลาวงศ์ปลาตะเพียน ไปใช้ในการวางแผนป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ได้

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีวิตวิทยาของพยาธิใบไม้

พยาธิใบไม้ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในอวัยวะส่วนต่างๆ ของโฮสต์จำเพาะซึ่งเป็นคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีการผสมพันธุ์โดยอาศัยเพศ และออกไข่มาในอวัยวะที่มันอาศัยอยู่ ไข่ออกมาสู่ภายนอกร่างกายโดยปนออกมา กับอุจจาระ เสมหะ หรือปัสสาวะลงสู่ น้ำ ไข่พยาธิใบไม้บางชนิดมีไมราซิเดียมเจริญพร้อมที่จะฟักออกมาทันที บางชนิดจะฟักหลังจากถูกหอยกินเข้าไปแล้ว บางชนิดต้องใช้เวลาหลายวันหรือหลายสัปดาห์จึงจะเจริญเป็นตัวอ่อนไมราซิเดียม เมื่อไมราซิเดียมออกจากไข่ว่ายไปในน้ำและไขเข้าสู่หอยจะเจริญเป็นสปอโรซิสต์ และจะเจริญต่อไปเป็นรีเดียและเซอร์คาเรีย เมื่อเซอร์คาเรียเจริญเต็มที่ที่จะไขออกจากหอยว่ายอยู่ในน้ำเมื่อพบโฮสต์ตัวกลางตัวที่สองที่เหมาะสมจะไขเข้าไปและสลัดหางทิ้ง และสร้างถุงซิสต์กลายเป็นระยะเมตาเซอร์คาเรีย เมื่อคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่งเป็นโฮสต์จำเพาะมากินระยะเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อก้าวเข้า ตัวอ่อนจะออกจากถุงซิสต์บริเวณส่วนต้นของลำไส้เล็กแล้วเดินทางไปยังอวัยวะที่พยาธิเหล่านั้นจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย แต่ในพยาธิใบไม้เลือดจะไม่มีระยะรีเดียและเมตาเซอร์คาเรีย

พยาธิใบไม้สามารถจัดกลุ่มเรียกชื่ออย่างง่ายๆ ตามอวัยวะที่ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ได้เป็นสี่กลุ่มใหญ่ๆ

1. พยาธิใบไม้ลำไส้ (intestinal fluke) ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้อาศัยอยู่ในลำไส้ อาจเป็นลำไส้เล็กหรือลำไส้ใหญ่
 2. พยาธิใบไม้ตับ (liver fluke) ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในทางเดินน้ำดี หรือท่อน้ำดีของตับ ในที่นี้ขอกล่าวถึงเฉพาะ *O. viverrini*
 3. พยาธิใบไม้ปอด (lung fluke) ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในปอด
- แต่ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะพยาธิใบไม้ลำไส้และพยาธิใบไม้ตับ

2. พยาธิใบไม้ลำไส้

พยาธิใบไม้ลำไส้มีขนาดแตกต่างกัน จึงสามารถจัดกลุ่มตามขนาดได้ดังนี้

1. ขนาดมากกว่า 2 cm เช่น *Fasciolopsis* spp.
2. ขนาดระหว่าง 0.5 – 2 cm เช่น *Echinostoma* spp.
3. ขนาดเล็กกว่า 0.5 cm เช่น *Haplorchis* spp. : *H. taichui*, *H. pumilio* , *Centrocestus* spp.

พยาธิใบไม้ลำไส้เหล่านี้ออกไปปนมากับอุจจาระ ไข่ที่ออกมาบางครั้งมีลักษณะคล้ายกันมากจนแยกชนิดออกจากกันยากและอาจใช้ในการวินิจฉัยชนิดพยาธิไม่ถูกต้องทั้งหมดโดยเฉพาะอย่างยิ่งไข่ของกลุ่มพยาธิใบไม้ในกลุ่มที่มีขนาดเล็กกว่า 0.5 cm ซึ่งไข่มีลักษณะคล้ายกับไข่พยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) รวมถึงวงจรชีวิตที่

คล้ายคลึงกัน สามารถติดพยาธิได้จากการกินปลาในวงศ์ปลาตะเพียนที่มีระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรีย เช่นเดียวกับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*

3. ชีววิทยาของ *H. taichui*

เป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก ขนาด $0.88-1.16 \times 0.43-0.51$ มิลลิเมตร ผิวมีหนามคลุมจากส่วนหัวไปจนถึงระดับอัมตะ oral sucker อยู่เกือบปลายสุดส่วนหัว คอหอยค่อนข้างกลม หลอดอาหารเห็นชัด ลำไส้แยกเป็นสองแขนงยาวไปถึงขอบของอัมตะ ventral sucker อยู่กลางตัว มีหนามจำนวน 13-16 อัน เรียงเป็นรูปพัด อัมตะมีอันเดียว รูปร่างกลมอยู่ส่วนท้ายสุด รังไข่กลมอยู่กึ่งกลางของส่วนท้าย vitelline follicles กระจายอยู่ส่วนท้ายมดลูกอยู่บริเวณส่วนท้ายของตัว

วงจรชีวิต มีหอยน้ำจืด *Melanoides tuberculata* เป็นโฮสต์ตัวกลางตัวที่หนึ่ง และมีปลาวงศ์ปลาตะเพียนเป็นโฮสต์ตัวกลางตัวที่สอง

4. ชีววิทยาของ *H. pumilio*

รูปร่างเรียวยาว ขนาด 0.65×0.28 มิลลิเมตร มีหนามเล็กๆ ปกคลุมตลอดตัว oral sucker อยู่เกือบปลายสุดส่วนหัว ลำไส้ผนังหนาแยกเป็นสองแขนงยาวไปถึงขอบหลังของรังไข่ ventral sucker มีขนาดเล็ก มีหนามจำนวน 27-39 อัน รูปตัว I หรือ A เรียงเป็นแถวเดียวกันอยู่ที่ผิวหนังด้านนอก ด้านหน้ามีตุ่มยื่นออกไป 2 ตุ่ม แต่ละตุ่มมีหนาม 2-3 อัน อัมตะมีอันเดียว กลม อยู่ทางด้านหลังของรังไข่ มดลูกอยู่ส่วนท้ายของตัว

วงจรชีวิต โฮสต์ตัวกลางตัวที่หนึ่ง ได้แก่ หอย *Melania* spp., *Melanoides tuberculata* โฮสต์ตัวกลางตัวที่สอง ได้แก่ ปลาวงศ์ปลาตะเพียน

5. ชีววิทยาของ *O. viverrini*

พยาธิใบไม้ตับอยู่ในอันดับย่อย (Suborder) Prosostomata วงศ์ (Family) Opisthorchiidae ในระยะตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในทางเดินน้ำดีและถุงน้ำดี พยาธิชนิดนี้ทำให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขในประเทศไทยเนื่องจากก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ตับ (opisthorchiasis) และในประชากรที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง จะมีโอกาสพัฒนาความรุนแรงไปสู่โรคมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) ในปัจจุบันยังมีประชากรจำนวนมาก โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือเป็นโรครดังกล่าว

พยาธิ *O. viverrini* ในระยะตัวเต็มวัยขณะมีชีวิต พยาธิจะมีรูปร่างเรียวยาวลำตัวบางใสและมีสีเนื้อขนาดของลำตัวยาว 5.5 - 9.5 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 7.5 มิลลิเมตร) กว้าง 0.7-1.6 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 1.4 มิลลิเมตร) ลักษณะเฉพาะของพยาธิใบไม้ตับ คือ พยาธิมีรูปร่างเรียวยาวและอัมตะมีลักษณะเป็นพู (lobe) ลึก 4 พูติดกัน นอกจากพบพยาธิตัวเต็มวัยในคนแล้ว ในธรรมชาติยังพบพยาธิตัวเต็มวัยได้ในแมวและสุนัข

วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับเริ่มจากไข่พยาธิออกมาสู่ภายนอกโฮสต์ตามทางเดินน้ำดีสู่ลำไส้เล็กและออกสู่ภายนอกโฮสต์พร้อมกับอุจจาระ ไข่พยาธิมีขนาดเล็ก (26×13 ไมโครเมตร) รูปร่างคล้ายหลอดไฟ มีฝาปิด

และเปลือกไข่ด้านตรงข้ามฝามีตุ่มเล็กยื่นออกมา ภายในไข่มีตัวอ่อนระยะแรก คือ ไมราซิเดียม (miracidium) ไข่พยาธิที่ออกมาพร้อมกับอุจจาระจะต้องลงสู่ น้ำ เมื่อไข่ตกลงสู่ น้ำ ไข่จะถูกกินโดยหอยน้ำจืดที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางชนิดที่หนึ่ง (first intermediate host) คือ หอยในสกุล (Genus) *Bithynia* spp. (17) หอยในสกุลนี้มีขนาด 5 - 10 มิลลิเมตร พบได้ทั่วไปในทุ่งนา สระน้ำหรือแหล่งน้ำ สำหรับในประเทศไทยหอยน้ำจืดที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางชนิดที่หนึ่งมีอยู่ 3 ชนิด (Species) คือ *Bithynia (Digoniostoma) funiculata* พบในภาคเหนือ *B. (D.) siamensis goniomphalos* พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ *B. (D.) siamensis siamensis* พบในภาคกลาง (18) เมื่อหอยกินไข่พยาธิไมราซิเดียมจะออกจากไข่ภายในกระเพาะอาหารของหอยแล้วเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างในบริเวณลำไส้และอวัยวะย่อยอาหาร กลายเป็นสปอร์โรซิสต์ (sporocyst หรือ first generation sporocyst) ภายในสปอร์โรซิสต์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเพิ่มจำนวน กลายเป็นเรเดีย (rediae) ภายในแต่ละเรเดียจะเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเพิ่มจำนวน กลายเป็นเซอร์คาเรีย (cercaria) ซึ่งหางยาวและมีครีบ มีชื่อเฉพาะเรียกว่า lophopleurocercous cercaria ในระยะเวลาประมาณ 1 เดือน หลังจากนั้นเซอร์คาเรียจะไขออกจากหอยน้ำจืดว่ายออกไปสู่ น้ำแล้วไขเข้าสู่ปลาน้ำจืดเกล็ดขาว (cyprinoid fish) ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางชนิดที่สอง (second intermediate host) เช่น ปลาสุต (*Hampala dispar*) ปลาแม่สะแตง (*Cyclocheilichthys siaja*) ปลาปก (ปลาแก้มขี้) (*Puntius orphoides*) ปลาชีว (*Parachela oxygastroides*) ปลาตะเพียนทราย (*Puntius leiocanthus*) ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ปลากระมัง (*Puntioplites proctozysron*) ปลาหน้าหมอง (*Osteochilus* sp.) ปลาขาวทราย (*Labiobarbus lineatus*) เซอร์คาเรียไขเข้าไปในเนื้อปลา ใต้เกล็ดสลัดหางทิ้งและเข้าถุงซิสต์ (encyst) เจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวอ่อนอีกระยะหนึ่งเรียกว่า เมตาเซอร์คาเรีย (metacercariae) หรือ encysted cercaria โดยตัวอ่อนขดอยู่ในถุงซิสต์ และใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ขึ้นไปเมตาเซอร์คาเรียดังกล่าวจะเจริญเต็มที่และเป็นระยะติดต่อของพยาธิ (infective stage) มีรายงานการพบเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุดบริเวณครีบหาง ครีบอก ครีบท้อง และครีบหลังของปลาน้ำจืดเกล็ดขาวตามลำดับ แต่พบน้อยที่สุดบริเวณครีบหัว เมื่อคนรับประทานอาหารที่ทำจากปลาน้ำจืดเกล็ดขาวดิบๆ หรือปรุงไม่สุก เนื้อปลาจะถูกย่อยโดยน้ำย่อย pepsin ในกระเพาะอาหาร ทำให้เมตาเซอร์คาเรียหลุดออกมาจากเนื้อปลา และถูกการบีบตัวของกระเพาะอาหารให้ไปอยู่ในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม และผนังของเมตาเซอร์คาเรียจะถูกย่อยโดยน้ำย่อย trypsin ทำให้ตัวอ่อนในถุงซิสต์หลุดออกมาจากถุงซิสต์และเดินทางเข้าสู่ทางเดินน้ำดีไปยังท่อน้ำดีและถุงน้ำดี ในบริเวณดังกล่าวพยาธิจะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยและมีการออกไข่ตั้งแต่โฮสต์กินเนื้อปลาที่มีเมตาเซอร์คาเรียจนเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยในทางเดินน้ำดี การตรวจพบไข่ในอุจจาระจะกินเวลาประมาณ 1-2 เดือนหลังจากได้รับเมตาเซอร์คาเรียเข้าไป (19)

6. ความชุกของระยะติดต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลาน้ำจืด

เนื่องจากการติดพยาธิใบไม้ตับเกิดจากการรับประทานปลาน้ำจืดที่มีเกล็ดแบบสุกๆ ดิบๆ ซึ่งเป็นวัฒนธรรมในการรับประทานอาหารของคนในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ จากการศึกษาในเขตจังหวัดอุดรธานี ในปี 1965 พบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับในปลาสุต (74%) ปลาปาก (65%) ปลาแม่สะแตง (51%) ปลาตะเพียนทราย (22%) ปลาตะเพียนขาว (3%) ปลากระมัง (8%) ปลาหน้าหมอง (4%) ปลาขาวทราย (3%) และปลาชีว (10%) เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับที่พบในปลา มีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับท้องที่ที่สำรวจ (18) เช่นเดียวกับผลการสำรวจในปี 1961 ของ Vajrasthira S และคณะ (20) ที่พบเมตาเซอร์คาเรียจากปลา 19.7- 60.4% โดยจำนวนของเมตาเซอร์คาเรียขึ้นอยู่กับท้องที่เช่นกัน และในการสำรวจปลาที่ขายในตลาด จังหวัดอุดรธานี สระแก้ว ปราจีนบุรี ช่วงปี 1992 – 1996 พบการติดเชื้อระยะ metacercaria ของ *O. viverrini* ถึง 25 – 28% (21) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงของประชากรในจังหวัดดังกล่าวต่อการเป็นโรค opisthorchiasis และ CCA ในประเทศอื่นๆ เช่น แขวงสาละวัน ประเทศลาว ก็มีรายงานการติดเชื้อระยะ metacercaria ของ *O. viverrini* ในปลาน้ำจืดถึง 59.2% (22) จะเห็นว่าแม้เวลาผ่านไป แต่ยังคงตรวจพบระยะ metacercaria ในปลาน้ำจืดอยู่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการระบาดของโรค opisthorchiasis ยังคงมีอยู่ในชุมชน โดยความชุกของ metacercaria จะขึ้นกับชนิดของปลาและฤดูกาลด้วย (23) จากการสำรวจในจังหวัดขอนแก่นและมหาสารคามพบว่า มีจำนวนเมตาเซอร์คาเรียสูงในช่วงฤดูหนาว โดยพบความชุกสูงสุดในเดือนธันวาคมและกุมภาพันธ์ โดยในปี 1991 – 1992 พบปลาน้ำจืดในจังหวัดขอนแก่นที่ติดเชื้อระยะ metacercaria ของ *O. viverrini* อยู่ถึง 29.7% โดยมีอัตราการติดเชื้อเฉลี่ย 1.68 metacercaria ต่อ ปลา 1 ตัว และพบความชุกของการติดเชื้อ *O. viverrini* ในคนและหอยในอัตราที่สูงในช่วงต้นฤดูฝน ซึ่งการมีอุจจาระปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ประกอบกับการกักเก็บน้ำฝนโดยเชือกหรือแหล่งน้ำต่างๆ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของโฮสต์กึ่งกลางและมีการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตของพยาธิ และการรับประทานปลาแบบสุกๆ ดิบๆ ของประชากร ทำให้การติดเชื้อปรสิต *O. viverrini* ยังคงมีอยู่ในประชากร (24)

7. ความชุกของ opisthorchiasis

โรคติดเชื้อหนอนพยาธิเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ จากประมาณการติดพยาธิจากประชากรทั่วโลก พบว่ามีประชากรกว่า 10% หรือมากกว่า 750 ล้านคนมีความเสี่ยงต่อการติดหนอนพยาธิ และมีประชากรกว่า 80 ล้านคน มีความเสี่ยงต่อการติดพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis* spp. ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (25) การติดพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญโดยเฉพาะในประเทศไทยและลาว (26)

จากการประมาณการติดพยาธิ พบว่าในประเทศไทย มีประชากรกว่า 8 ล้านคนติดพยาธิ *O. viverrini* ส่วนในประเทศลาว มีประชากรอีกประมาณ 2 ล้านคนติดพยาธิชนิดนี้ (26) ในประเทศไทย พบความชุกของ

การติดพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มากในประชากรที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีรายงานความชุกของการติดพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* สูงถึง 16.6% (27) โดยในจังหวัดอุบลราชธานีมีผู้ป่วยโรค opisthorchiasis คิดเป็น 20.2% (28) และจากการศึกษาเกี่ยวกับการติดพยาธิ *O. viverrini* พบว่า *O. viverrini* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ติดเชื้อสามารถพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งมะเร็งท่อน้ำดีได้ ทำให้พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม class I carcinogen (29) จากสาเหตุนี้ส่งผลให้อุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (3) และมักพบการติดพยาธิและการเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีในประชากรที่มีฐานะยากจนซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ของประเทศ ทำให้ภาวะการเป็นโรคนี้นี้สูงมากในคนไทย โดยรองลงมาจากโรคเอดส์และการติดเชื้อเอชไอวี การบาดเจ็บจากอุบัติเหตุขนส่ง โรคหลอดเลือดสมอง และเบาหวาน (International Policy Health Program, 2007)

นอกจากจะพบการติดพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในประชากรของประเทศไทยกับลาวแล้ว ยังพบการติดพยาธิชนิดเดียวกันนี้ในประชากรของประเทศกัมพูชาและเวียดนาม ซึ่งเป็นประเทศที่อยู่ในบริเวณลุ่มน้ำโขงตอนล่างและมีพื้นที่ติดกับประเทศไทยทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศของประเทศที่อยู่ในบริเวณนี้มีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของปรสิตหลายชนิด

8. การแยกชนิดของระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรียโดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การแยกสายสัมพันธ์ของหนอนพยาธิโดยใช้ยีนที่มีความจำเพาะนั้นทำให้สามารถระบุพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิได้แน่นอนกว่าการแยกโดยใช้ลักษณะรูปร่าง เนื่องจากในบางระยะของพยาธิที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน มักจะมีรูปร่างที่คล้ายกันมา การแยกชนิดจึงทำได้เพียงในระยะตัวเต็มวัยเท่านั้น ซึ่งอาจไม่สะดวกนัก เนื่องจากพยาธิมีหลายระยะในวงจรชีวิตและระยะที่มีความสำคัญในทางระบาดวิทยาคือระยะติดต่อ ซึ่งมักจะเป็นระยะตัวอ่อน เช่น ในพยาธิ *O. viverrini* ที่มีระยะติดต่อ คือ metacercaria ที่พบอยู่ในกล้ามเนื้อ ครัวบ กลัดของปลาน้ำจืด นอกจากระยะติดต่อของ *O. viverrini* ยังพบระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก เช่น *H. taichui*, *H. pumilio* และ *H. yokogawai* ซึ่งพยาธิใบไม้ขนาดเล็กไม่ได้ก่อพยาธิสภาพที่รุนแรงเหมือนกับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* นอกจากนั้นยังสามารถตรวจพบระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ของสัตว์ เช่น *Procerovum varium* (30) ซึ่งระยะติดต่อของพยาธิใบไม้เหล่านี้ มีรูปร่างที่คล้ายกันมาก ต้องใช้ความชำนาญในการแยกชนิด ประกอบกับความรุนแรงในการก่อโรคแตกต่างกัน ทำให้การรู้ชนิดของพยาธิจากการพบระยะ metacercaria จึงมีความสำคัญในแง่ของการป้องกันการติดเชื้อปรสิตจากการรับประทานปลา

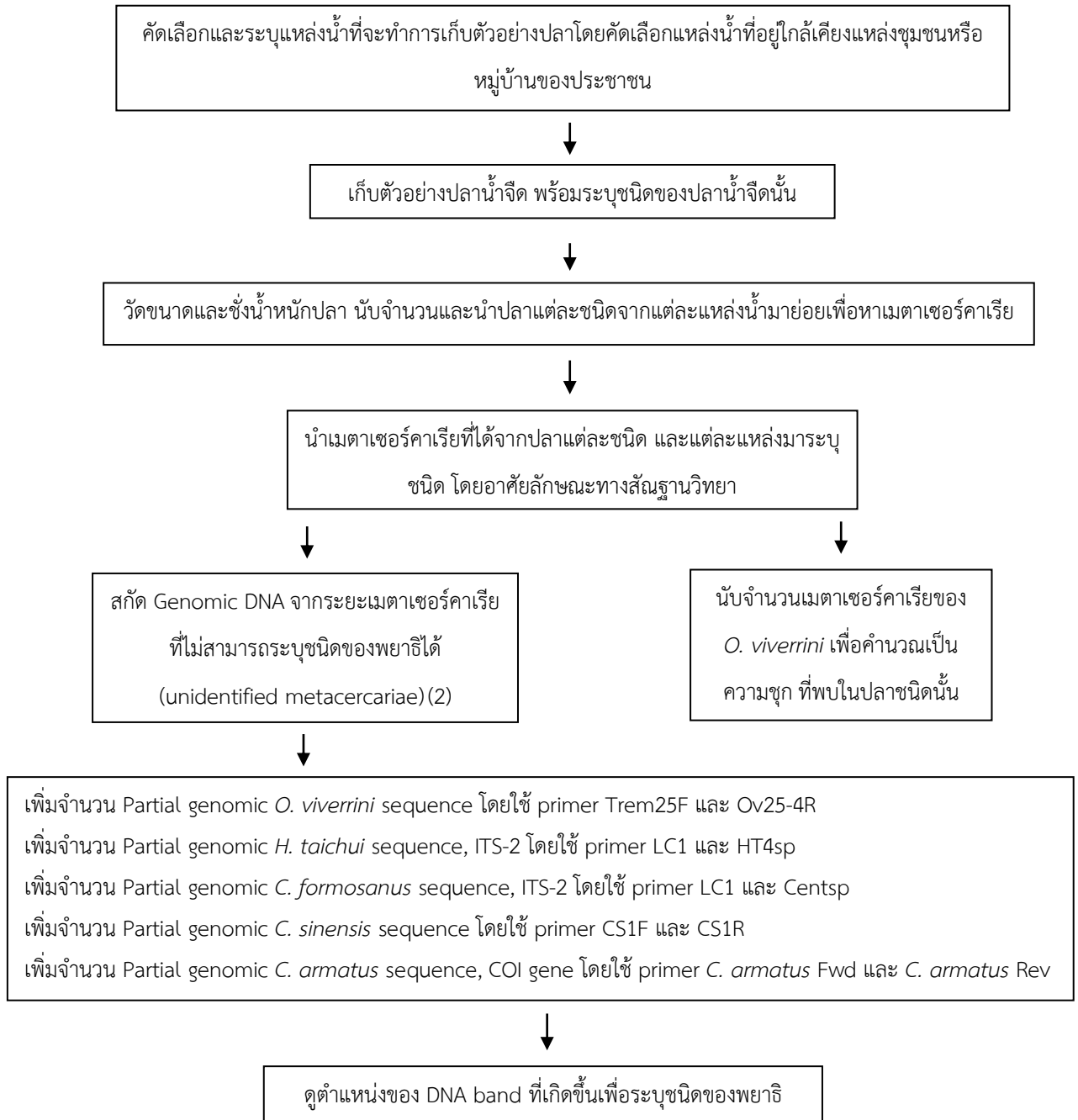
ในปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction; PCR) มาใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนที่จำเพาะกับพยาธิที่สนใจเพื่อแยกและระบุชนิดของพยาธินั้นๆ แทน classical method ซึ่งใช้การดูรูปร่างซึ่งมีข้อเสียหลายประการ เช่น ใช้ระยะเวลานานและต้องใช้ผู้ชำนาญ

ในการระบุชนิดของพยาธิ เป็นต้น วิธี PCR ที่นำมาใช้นั้น ได้แก่ Conventional PCR (31), RFLP-PCR (30) (32), real time FRET PCR (8) และ Multiplex PCR (33) โดยยีนที่นำมาใช้ในการเป็น marker เช่น mitochondrial DNA ได้แก่ NADH และ COI เป็นต้น นอกจากนั้น ยังมี rDNA ได้แก่ ยีน ITS (inter transcribed spacer) ซึ่งเป็นยีนที่มีจำนวน copy number สูง จึงง่ายต่อการเพิ่มจำนวนขึ้นยีนถึงแม้จะมีจำนวน DNA template ในปริมาณน้อย ดังนั้น ยีน ITS จึงเป็นยีนที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็น marker ในการแยกชนิดหนอนพยาธิหลายชนิด ใน *O. viverrini* มีการค้นพบยีน ITS-2 (34) และมีการใช้ยีน ITS-2 เป็น marker แยกชนิดระยะ metacercaria ของ *O. viverrini* ออกจากพยาธิใบไม้ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น *C. sinensis*, *H. taichui* และ *H. pumilio* (35) (36) (37) ซึ่งการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการแยกชนิดของระยะติดต่อของหนอนพยาธิในลำไส้ ทำให้การศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อปรสิตในประชากรมีความสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้มีการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อปรสิตในประชากรมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



2. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลือกตำแหน่งของแหล่งน้ำที่ศึกษา

ปลาวงศ์ปลาตะเพียนจากแหล่งน้ำต่างๆ ในเขตอำเภวารินชำราบและพื้นที่ใกล้เคียง จำนวน 10 แหล่ง ได้แก่ บ้านกุดปลาขาว บ้านบึงสระพัง บ้านคอนสาย บ้านหนองกินเพล บ้านหนองสองห้อง บ้านนาโพนน้อยและบ้านหนองคูและจากตลาดสดในเขตอำเภวารินชำราบ จำนวน 3 แห่ง ได้แก่ ตลาดสดอำเภวารินชำราบ ตลาดสดชุมชนบ้านบึงหวาย และตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่างซึ่งเป็นปลาที่จับมาจากลำเซบาย

2. การเก็บรักษาตัวอย่างปลา

ปลาที่จากแหล่งน้ำต่างๆ จะถูกเก็บที่ 4 °C และนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปลาที่เก็บได้จะถูกระบุชนิด จัดกลุ่มตามชนิดของปลา ชั่งน้ำหนักปลาแต่ละตัว วัดขนาดและนับจำนวน จากนั้น ปลาจากแต่ละแหล่งจะถูกสุ่มตรวจการมีระยะเมตาเซอ์คาร์เรียที่บริเวณหางและครีบ ปลาที่ตรวจพบระยะเมตาเซอ์คาร์เรียจะถูกนำไปย่อยด้วยเทคนิค pepsin digestion (38) ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยโรคเขตร้อน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อหาระยะเมตาเซอ์คาร์เรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และระบุชนิดเมตาเซอ์คาร์เรียของพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ ถ่ายรูป (2) และนับจำนวนเมตาเซอ์คาร์เรียของพยาธิชนิดนั้นๆ เพื่อนำไปคำนวณเป็นความชุกของระยะเมตาเซอ์คาร์เรียในปลาชนิดนั้นๆ เมตาเซอ์คาร์เรียที่ไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิได้ จะถูกล้างด้วยน้ำเกลือให้สะอาด เก็บที่ -20 °C เพื่อใช้ในการสกัด DNA ต่อไป

3. การระบุชนิดของ unidentified metacercariae โดยเทคนิค PCR

Unidentified metacercariae ที่เก็บไว้ที่ -20 °C จะถูกนำมาสกัด genomic DNA (Qiagen, USA) เพื่อเป็น template ในการระบุชนิดของพยาธิด้วยวิธี PCR (Tpersonal, Biometra, Germany) โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ตับและพยาธิใบไม้ลำไส้ ได้แก่ *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. taichui* และ *C. formosanus* และทดสอบการปนเปื้อน DNA จากปลาตัวอย่างด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะ cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene ของ *Cyclocheilichthys armatus* หรือปลาโจกซึ่งเป็นปลาในวงศ์ปลาตะเพียน โดยใช้ปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับแต่ละ primer

การเพิ่มจำนวน Genomic DNA ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ใช้ primer Trem25F : 5' ACA GGA AGT GGA ACC GTG TC 3' และ Ov25-4R : 5' AAT GAA CGG AAA TCG TGA CC 3' ในปฏิกิริยา 30 ul ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM Mg²⁺, 0.04 mM dNTP), 0.05 U Tag DNA polymerase (Fermentas, USA), 0.3 pmol ของ forward และ reverse primer โดยมี thermocycling conditions ดังนี้ initial denaturation 95 °C 5 นาที, denaturation 95 °C 1 นาที, annealing 60 °C 1 นาที, extension 72 °C 1 นาที จำนวน 35 cycles และ final extension 72 °C 5 นาที ซึ่งจะได้ความยาวของ PCR products ที่ 229 bp (7)

การเพิ่มจำนวน Genomic DNA ของพยาธิตัวแบน *C. sinensis* ใช้ primer CS1F : 5' CCA ACC GAG TTG GTC AAG TT 3' และ CS1R : 5' CAA TCC AAC GCA CTC TCT GA 3' ในปฏิกิริยา 25 μ l ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM Mg^{2+} , 0.25 mM dNTP), 0.06 U Tag DNA polymerase (Fermentas, USA), 0.3 pmol ของ forward และ reverse primer โดยมี thermocycling conditions ดังนี้ Initial denaturation 95 °C 3 นาที, Denaturation 95 °C 1 นาที, Annealing 62 °C 1 นาที, extension 72 °C 1 นาที จำนวน 35 cycles และ final extension 72 °C 10 นาที ซึ่งจะได้ความยาวของ PCR products ที่ 283 bp (7)

การเพิ่มจำนวน internal transcribed spacer 2 (ITS-2) ของพยาธิตัวแบนลำไส้ *H. taichui* ใช้ primer CS1F : 5' CCA ACC GAG TTG GTC AAG TT 3' และ CS1R : 5' CAA TCC AAC GCA CTC TCT GA 3' ในปฏิกิริยา 25 μ l ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM Mg^{2+} , 0.2 mM dNTP), 0.05 U Tag DNA polymerase (Fermentas, USA), 0.2 pmol ของ forward และ reverse primer โดยมี thermocycling conditions ดังนี้ initial denaturation 94 °C 1 นาที, denaturation 94 °C 1 นาที, annealing 55 °C 1 นาที, extension 72 °C 3 นาที จำนวน 30 cycles และ final extension 72 °C 5 นาที ซึ่งจะได้ความยาวของ PCR products ที่ 558 bp (7)

การเพิ่มจำนวน Internal transcribed spacer 2 (ITS-2) ของพยาธิตัวแบนลำไส้ *C. formosanus* ใช้ primer LC1 : 5' CGA GTA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3' และ Centsp : 5' CCA ATG CCG AGA TCA CAG ACA AG 3' ในปฏิกิริยา 25 μ l ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM Mg^{2+} , 0.2 mM dNTP), 0.05 U Tag DNA polymerase (Fermentas, USA), 0.2 pmol ของ forward และ reverse primer โดยมี thermocycling conditions ดังนี้ initial denaturation 94 °C 1 นาที, denaturation 94 °C 1 นาที, annealing 55 °C 1 นาที, extension 72 °C 3 นาที จำนวน 30 cycles และ final extension 72 °C 5 นาที ซึ่งจะได้ความยาวของ PCR products ที่ 367 bp (7)

การเพิ่มจำนวน cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene ของปลา *C. armatus* ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ปลาตะเพียน ใช้ primer *C. armatus* Fwd : 5' TTC TTT ATA GTA ATG CCA ATC CTT AT 3' และ *C. armatus* Rev : 5' AGT GAG AAA ATT GTT AGG TCT AC 3' ในปฏิกิริยา 25 μ l ที่ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM Mg^{2+} , 0.2 mM dNTP), 0.05 U Tag DNA polymerase (Fermentas, USA), 0.2 pmol ของ forward และ reverse primer โดยมี thermocycling conditions ดังนี้ initial denaturation 95 °C 5 นาที, denaturation 95 °C 30 วินาที,

annealing 60 °C 30 วินาที, extension 72 °C 90 วินาที จำนวน 40 cycles และ final extension 72 °C 5 นาที ซึ่งจะได้ความยาวของ PCR products ที่ 251 bp

หลังจากทำการเพิ่มจำนวนขึ้นยืนด้วยการทำ PCR แล้ว PCR products ที่ได้จะถูกนำมาแยกขนาดบน 1.7% agarose gel จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide และดูตำแหน่งของ DNA band ภายใต้แสง UV ด้วย Gel Documentation System (DNR Bio-Imaging Systems, Israel)

4. วิเคราะห์ข้อมูล

ความชุกของระยะ metacercariae ของพยาธิแต่ละชนิดและความชุกของปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ ที่พบการมีระยะ metacercariae ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างระยะ metacercariae ของพยาธิแต่ละชนิดกับชนิดของปลาน้ำจืดจากแต่ละแหล่ง จะถูกวิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS version 16.0

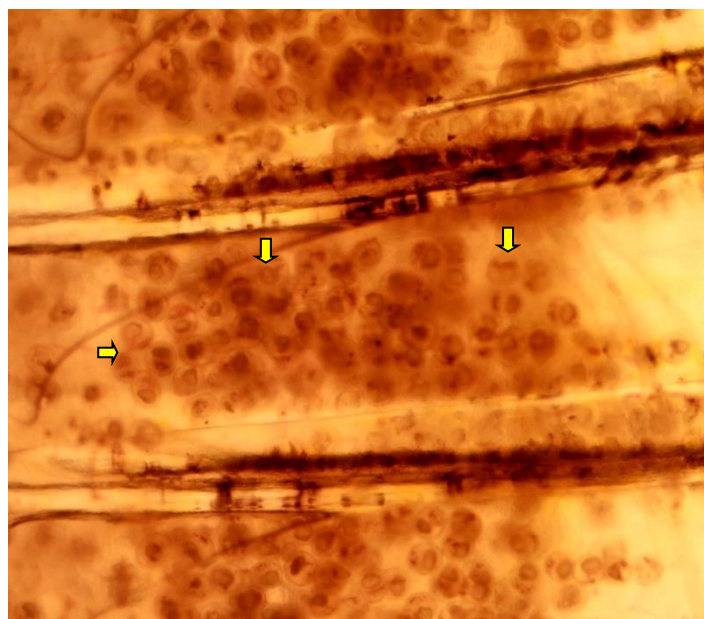
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ชนิดและจำนวนปลาน้ำจืดตัวอย่างจากแหล่งน้ำในชุมชน

ปลาวงศ์ปลาตะเพียนจากแหล่งน้ำในชุมชนในเขตอำเภอวารินชำราบและพื้นที่ใกล้เคียง จำนวน 7 แหล่งน้ำ ได้แก่ บ้านกุดปลาขาว บ้านบึงสระพัง บ้านคอนสาย บ้านหนองกินเพล บ้านหนองสองห้อง บ้านนาโพนน้อยและบ้านหนองคูและจากตลาดสดในเขตอำเภอวารินชำราบ จำนวน 3 แห่ง ได้แก่ ตลาดสดอำเภอวารินชำราบ ตลาดสดชุมชนบ้านบึงหวาย และตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่างซึ่งเป็นปลาที่จับมาจากลำเซบาย ได้นำมาชั่งน้ำหนักรวม นับจำนวน ระบุชนิดของปลา และวัดขนาด ปลาประมาณ 5 – 10 ตัว จากแต่ละแหล่งถูกสุ่มออกมา เพื่อตรวจดูระยะ *metacercariae* ของพยาธิใบไม้ที่หางปลา ปลาจากแหล่งที่ตรวจพบระยะ *metacercariae* ที่หาง ได้แก่ ปลาจากบ้านบึงสระพัง (รูปที่ 1) และตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง (รูปที่ 2) ปลาจากทั้งสองแหล่ง จำนวน 215 ตัว ได้แก่ ปลาจากบ้านบึงสระพัง 135 ตัว และปลาจากตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง 80 ตัว (ตารางที่ 1 และ 2) ได้ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์เปปซิน และตรวจดูระยะ *metacercariae* พร้อมกับระบุชนิดของพยาธิใบไม้

จากการระบุชนิดปลาตัวอย่างจากบ้านบึงสระพัง ส่วนใหญ่เป็นปลากระมัง (*Puntius falcifer*) 91 ตัว (67.4%) รองลงมา คือ ปลาโจก (*Cyclocheilichthys enoplos*) 23 ตัว (17.03%), ปลาตะเพียนทราย (*Puntius brevis*) 7 ตัว (5.16%), ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) 6 ตัว (4.44%), ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) และ ปลาขาวสร้อย (*Henicorhynchus simensis*) ชนิดละ 2 ตัว (1.48%) และปลากาดำ หรือปลาอีตุ้ม (*Epalzeorhynchus chrysophekadion*), ปลาสร้อยลูกกล้วย (*Labiobarbus leptocheila*), ปลาตะเพียนทอง (*Barbonymus altus*) และปลากระสับจุด (*Hampula dispar*) ชนิดละ 1 ตัว (0.74%) ส่วนปลาตัวอย่างจากตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง พบปลาทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) จำนวน 33 ตัว (41.25%), ปลากระสับจุด (*H. dispar*) จำนวน 22 ตัว (27.5%) และ ปลาโจก (*C. enoplos*) 25 ตัว (31.25%)



รูปที่ 1 ระยะ metacercariae (ลูกศรชี้) ที่บริเวณหางปลาในวงศ์ปลาตะเพียนจากบึงสระพัง พบว่าปลาตัวนี้มีจำนวน metacercariae ที่บริเวณหางจำนวนมาก แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของ metacercariae ได้



รูปที่ 2 ระยะ metacercariae (ลูกศรชี้) ที่บริเวณหางปลาในวงศ์ปลาตะเพียนจากตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง ซึ่งเป็นปลาที่ชาวบ้านจับได้จากลำเซบาย แล้วเอามาขายในตลาดของชุมชน จากภาพ พบว่าปลาตัวนี้มีจำนวน metacercariae ที่บริเวณหางจำนวนมาก แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของ metacercariae ได้

2. การตรวจพบระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ในลำไส้

จากการตรวจดูระยะ metacercariae ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 1 และ 2) พบว่า ระยะ metacercariae ที่ตรวจพบจากทั้งบึงสระพังและลำเซบาย (ตลาดสดชุมชนนาสว่าง) มีทั้งสิ้น 231

metacercariae แบ่งเป็น metacercariae จากบุงสระพัง 165 metacercariae และจากลำเซบาย (ตลาดชุมชนนาสว่าง) 66 metacercariae โดยส่วนใหญ่ เป็นระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *Cestrocestus formosanus* (รูปที่ 3) คิดเป็น 21.21% และ 34.85% ตามลำดับ จากการตรวจหาระยะ metacercariae ในปลาจากบุงสระพัง พบระยะ metacercariae ของ *C. formosanus* ได้ในปลากระมัง (*P. falcifer*), ปลาโจก (*C. enoplos*), ปลาเก๋าดำ หรือปลาอีตุ้ม (*E. chrysophekadion*), ปลาตะเพียนขาว (*B. gonionotus*), ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) และปลากระสูบจุด (*H. dispar*) ระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ลำไส้ที่ตรวจพบรองลงมา คือ ระยะ metacercariae ของ *Haplochis pumilio* (รูปที่ 5) และ *H. taichui* (รูปที่ 4) โดยพบระยะ metacercariae ของ *H. pumilio* 10.91% และพบระยะ metacercariae ของ *H. taichui* 1.21% ระยะ metacercariae ของ *H. pumilio* นั้นตรวจพบใน ปลากระมัง (*P. falcifer*) และปลาโจก (*C. enoplos*) ส่วนระยะ metacercariae ของ *H. taichui* ในปลาโจก (*C. enoplos*) เท่านั้น ส่วนปลาสร้อยลูกกล้วย หรือ *Labiobarbus leptocheila* ไม่พบระยะ metacercariae ของพยาธิใบไม้ชนิดใดเลย (ตารางที่ 1)

จากการตรวจปลาที่ได้จากตลาดชุมชนบ้านนาสว่าง ซึ่งเป็นปลาที่ชาวบ้านจับมาจากลำเซบาย พบว่าปลาที่ชาวบ้านนำมาขายส่วนใหญ่ ได้แก่ ปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*), ปลากระสูบจุด (*H. dispar*) และปลาโจก (*C. enoplos*) ซึ่งปลาเหล่านี้ ตรวจพบระยะ metacercariae ของ *C. formosanus* 34.85% โดยตรวจพบในปลาทั้ง 3 ชนิด ระยะ metacercariae ที่ตรวจพบรองลงมา คือ ระยะ metacercariae ของ *H. pumilio* โดยตรวจพบ 4.55% ในปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) และปลากระสูบจุด (*H. dispar*) และระยะ metacercariae ของ *H. taichui* 1.52% ในปลาไส้ตันตาแดง (*C. apogon*) (ตารางที่ 2)



รูปที่ 3 ระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *C. formosanus* ซึ่งมีรูปร่างรี และมี excretory bladder คล้ายเครื่องหมายกากบาทหรือรูปตัว X (ลูกศรชี้)

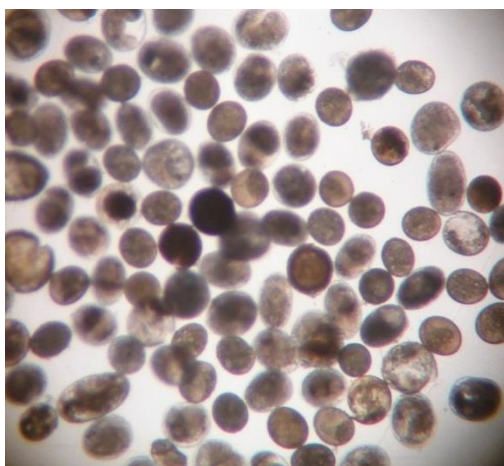


รูปที่ 4 ระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *H. taichui* ซึ่งลักษณะกลมและมีหนามเรียงตัวเป็นรูปพัดที่บริเวณ ventral sucker (ลูกศรชี้) ของตัวพยาธิ



รูปที่ 5 ระยะ metacercaria ของพยาธิตัวแบนลำไส้ *H. pumilio* ซึ่งลักษณะกลมรีและมีหนามเรียงตัวเป็นรูปตัว I ที่บริเวณ ventral sucker ของตัวพยาธิตัวแบนลำไส้ ซึ่งจากภาพจะเห็นหนามไม่ชัดเจนนัก (ลูกศรชี้)

นอกจากตรวจพบระยะ metacercariae ของพยาธิตัวแบนลำไส้ชนิดต่างๆ แล้ว ยังมี metacercariae ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ โดยปลาตัวอย่างจากทั้งสองแหล่งมีระยะ metacercariae ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้รวมกันถึง 64.5% ระยะ metacercariae ที่ไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิตัวแบน (unidentified metacercariae) จากทั้งสองแหล่งน้ำ (รูปที่ 6) จะถูกล้างให้สะอาดด้วย 0.85% NaCl และเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอการสกัด DNA ต่อไป



รูปที่ 6 ระยะ metacercariae ที่ไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิได้ ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม unidentified metacercariae

ตารางที่ 1 จำนวนของระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้จากตัวอย่างปลาจากบึงสระพัง อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

Fish species	Number of fish examined	Width		Length		Number of metacercariae recovered per host (N) ¹	Number of metacercariae classified based on morphology species specific (%prevalence)					Total of metacercariae
		Min (cm)	Max (cm)	Min (cm)	(N) ¹ Max (cm)		<i>O. viverrini</i>	<i>H. taichui</i>	<i>H. pumilio</i>	<i>C. formosanus</i>	unidentified	
ปลากะมัง (<i>Puntioplites falcifer</i>)	91	4.5	9	11	21	0.37 (34)	-	-	10 (29.41)	9 (26.47)	15 (44.12)	34 (14.72)
ปลาโจก, Soldier river brab (<i>Cyclocheilichthys enoplos</i>)	23	3	7	14.5	24.5	3.49 (80)	-	2 (2.5)	8 (10)	23 (28.75)	47 (58.75)	80 (34.63)
ปลากาดำ, ปลาอีตุ้ม (<i>Epalzeorhynchus chrysophekadion</i>)	1	5.5		20		11 (11)	-	-	-	1 (9.09)	10 (90.90)-	11 (4.76)
ปลาสร้อยลูกกล้วย (<i>Labiobarbus leptocheila</i>)	1	5.5		20		-	-	-	-	-	-	-
ปลาไส้ตันตาแดง, Beardless barb (<i>Cyclocheilichthys apogon</i>)	2	4	5	14	15.5	6 (12)	-	-	-	1 (8.33)	11 (91.67)	12 (5.19)
ปลาตะเพียนขาว, Java barb, Silver barb (<i>Barbonymus gonionotus</i>)	6	2	3	7.5	9.5	2.17 (13)	-	-	-	1 (7.69)	12 (92.31)	13 (5.63)
ปลาตะเพียนทราย (<i>Puntius brevis</i>)	7	2	3	10	12.5	0.43 (3)	-	-	-	-	3 (100)	3 (1.3)
ตะเพียนทอง, อีแจะ, Red tailed tinfoil (<i>Barbonymus altus</i>)	1	4.5		13		6 (6)	-	-	-	-	6 (100)	6 (2.6)
ปลาขาวสร้อย, Siamese mud carp (<i>Henicorhynchus simensis</i>)	2	2.3	2.8	10.5	12.5	1.5 (3)	-	-	-	-	3 (100)	3 (1.3)
กระสุมจุด, Eye-Spot Barb, Spotted Hampula Barb (<i>Hampula dispar</i>)	1	4		16		3 (3)	-	-	-	-	3 (100)	3 (1.3)

¹ จำนวนของระยะ metacercaria

ตารางที่ 2 จำนวนของระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้จากตัวอย่างปลาจากตลาดชุมชนบ้านนาสว่าง (ลำเซบาย) อำเภอดงขุดม จังหวัดอุบลราชธานี

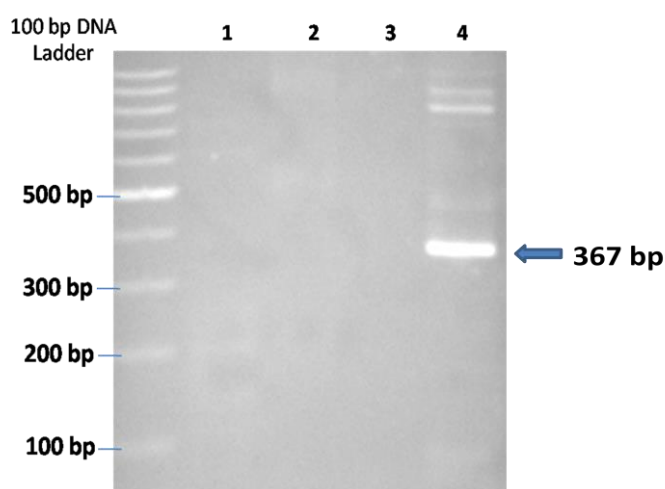
Fish species	Number of fish examined	Width		Length		Number of metacercariae recovered per host (N) ¹	Number of metacercariae classified based on morphology species specific (%prevalence)					Total of metacercariae
		Min (cm)	Max (cm)	Min (cm)	(N) ¹ Max (cm)		<i>O. viverrini</i>	<i>H. taichui</i>	<i>H. pumilio</i>	<i>C. formosanus</i>	unidentified	
ปลาไร้ต้นตาแดง, Beardless barb (<i>Cyclocheilichthys apogon</i>)	33	3	4.5	9	15	1.26 (26)	-	1 (3.85)	1 (3.85)	14 (53.85)	10 (38.46)	26 (11.26)
กระสับจุด, Eye-Spot Barb, Spotted Hampula Barb (<i>Hampula dispar</i>)	22	3	5	12	20	1.1 (20)	-	-	2 (10)	6 (30)	12 (60)	20 (8.66)
ปลาโจก, Soldier river brab (<i>Cyclocheilichthys enoplos</i>)	25	3	4.4	7	10	1.25 (20)	-	-	-	3 (15)	17 (85)	20 (8.66)

¹ จำนวนของระยะ metacercaria

3. การระบุชนิดของ unidentified metacercariae โดยวิธี polymerase chain reaction

DNA ของ unidentified metacercariae จากบุงสระพังและจากตลาดชุมชนบ้านนาสว่าง ถูกนำมาใช้เป็น template ในการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ตับและพยาธิใบไม้ลำไส้อื่นๆ *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. taichui* และ *C. formosanus* พบว่า มี band ของ DNA เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 367 bp หลังจากเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของ unidentified metacercariae โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ *C. formosanus* (รูปที่ 7) แต่ไม่มี band ของ DNA เกิดขึ้นหลังจากเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของ unidentified metacercariae โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ *O. viverrini*, *H. taichui* และ *C. sinensis* (รูปที่ 7 และ 9)

Band ของ DNA เกิดขึ้นซึ่งตรงกับตำแหน่ง DNA ของ *C. formosanus* ได้ถูกตัดและส่งไปวิเคราะห์ชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (National Center for Biotechnology Information; NCBI) โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีน ITS-2 ของ *C. formosanus* (รูปที่ 8)



รูปที่ 7 PCR products ของ pool unknown metacercaria ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วย primer ที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* (lane 1), *H. taichui* (lane 2), *C. sinensis* (lane 3) และ *C. formosanus* (lane 4)

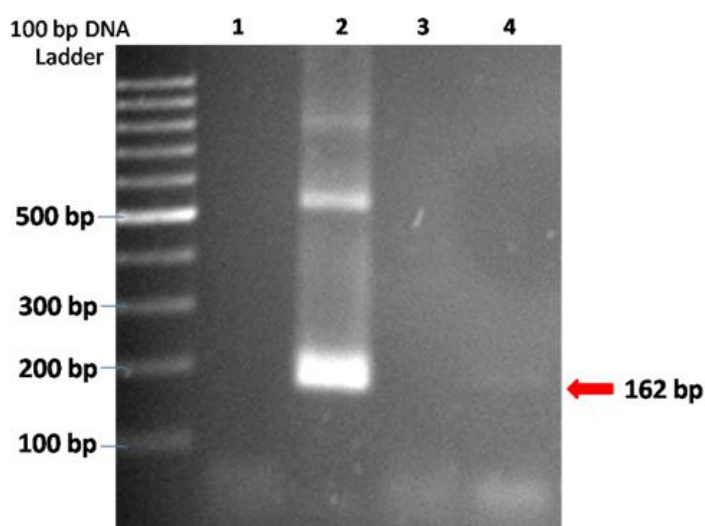
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Centrocestus formosanus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequ	364	364	100%	2e-97	100%	KJ630836.1
☐ Centrocestus sp. PWK-2013 isolate Worm_186-6 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed	364	364	100%	2e-97	100%	KF658456.1
☐ Centrocestus sp. PWK-2013 isolate Worm_186-11 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed	364	364	100%	2e-97	100%	KF658455.1
☐ Centrocestus sp. MK-2012 isolate C1 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, co	364	364	100%	2e-97	100%	JQ390545.1
☐ Centrocestus sp. MK-2012 isolate C3 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, co	359	359	100%	1e-95	99%	JQ390547.1
☐ Centrocestus sp. RD-2003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom	331	331	100%	2e-87	97%	AY245699.1

รูปที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของ pool unknown metacercaria ด้วย primer ที่จำเพาะกับ *C. formosanus* พบว่า DNA ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน ITS-2 (Internal transcribed spacer 2) ของ *C. formosanus*



รูปที่ 9 PCR products ของ unknown metacercaria ซึ่งถูกเพิ่มจำนวนด้วย primer ที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ความยาวของ PCR products ที่เพิ่มจำนวนได้ อยู่ที่ 162 bp (lane 1 : negative control (no template), lane 2 : *O. viverrini* metacercaria จาก endemic area, lane 3 : unknown metacercaria จากบึงสระพัง, lane 4 : unknown metacercaria จากตลาดชุมชนบ้านนาสว่าง (ลำเซบาย)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างอยู่ในพื้นที่ลุ่มน้ำมูลตอนล่างซึ่งมีแม่น้ำมูลเป็นแม่น้ำสายหลัก และมีแม่น้ำสาขาต่างๆ อีกหลายสาขา เช่น ลำเซบายเป็นแม่น้ำสาขาของแม่น้ำมูลที่ไหลผ่าน อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี นอกจากแม่น้ำสาขาแล้ว ในพื้นที่อำเภวารินชำราบยังมีแหล่งน้ำผิวดินอื่นๆ ที่เป็นสาขาย่อย แยกออกมาจากแม่น้ำสาขา มีหนอง บึง ฝาย และแหล่งน้ำอื่นๆ ที่มนุษย์สร้างขึ้น (ที่มา : <http://www.haii.or.th/wiki/index.php>)

การมีแหล่งน้ำผิวดิน ทำให้มีสัตว์และพืชน้ำหลายชนิดมาอยู่อาศัยในแหล่งน้ำดังกล่าว โดยเฉพาะปลาในวงศ์ปลาตะเพียนซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางที่สองของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ซึ่งเป็นปลาที่พบเห็นได้ในแม่น้ำมูล เช่น ปลากระสูบจุด (*H. dispar*), ปลาขาวนา (*C. apogon*) ปลาตะเพียนทราย (*P. brevis*) ปลาขาวสร้อย (*H. simensis*) เป็นต้น (ที่มา : <http://home.kku.ac.th/pracha/>) ซึ่งปลาเหล่านี้เป็นโฮสต์ที่เหมาะสมต่อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* โดยมีรายงานการตรวจพบระยะติดต่อ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลาเหล่านี้ ทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น จีน (39) เวียดนาม (40) และลาว (2) เป็นต้น

ในการสำรวจความชุกของระยะติดต่อ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลาน้ำจืดครั้งนี้ ได้ทำการสำรวจในปลาตัวอย่างที่ได้จากแหล่งน้ำที่แตกต่างกันจำนวน 10 แหล่ง โดยทั้ง 10 แหล่งนั้นอยู่ในพื้นที่อำเภวารินชำราบและมี 1 แหล่ง คือ ตลาดบ้านนาสว่าง อยู่ในพื้นที่อำเภอเดชอุดมแต่มีพื้นที่ติดกับอำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี แหล่งน้ำในพื้นที่อำเภวารินชำราบประกอบด้วยแหล่งน้ำตามธรรมชาติจำนวน 7 แหล่งน้ำ และตลาดสด 2 แห่ง แหล่งน้ำทั้ง 7 แหล่งน้ำ มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือ มีลักษณะเป็นหนองน้ำหรือบึง อยู่ใกล้ชุมชน เป็นแหล่งน้ำที่ใช้หาปลาเพื่อรับประทานในครัวเรือนหรือขาย ได้แก่ บ้านกุดปลาขาว บ้านบึงสระพัง บ้านคอนสาย บ้านหนองกินเพล บ้านหนองสองห้อง บ้านนาโหนดน้อยและบ้านหนองคู ส่วนตลาดสดนั้นเป็นตลาดสดของอำเภวารินชำราบ 1 แห่ง และตลาดสดของชุมชนอีก 1 แห่ง คือ ตลาดสดชุมชนบ้านบึงหวาย แหล่งที่มาของปลาที่ขายในตลาดสดทั้ง 2 แห่ง มีความแตกต่างกัน แหล่งที่มาของปลาที่ขายในตลาดสดอำเภวารินชำราบ ได้แก่ กุดปลาขาว หาดคูเตือ ห้วยชะยุ้ง แหล่งที่มาของปลาที่ขายในตลาดสดชุมชนบ้านบึงหวาย คือ ปลาที่จับได้จากลำโดม ส่วนแหล่งที่มาของปลาที่ขายในตลาดสดชุมชนบ้านนาสว่าง คือ ลำเซบาย ซึ่งชนิดของปลาที่จับได้จากแหล่งน้ำทั้ง 10 แหล่งนี้ มีความคล้ายคลึงกันและเป็นปลาที่พบได้บ่อยในลุ่มน้ำมูล ได้แก่ ปลากระมัง ปลาขาวสร้อย ปลาขาวนา ปลาโจัก ปลากระสูบจุด ปลาตะเพียนทราย เป็นต้น นอกจากนั้น ปลาบางชนิด เช่น ปลาขาวสร้อย ปลาขาวนา ปลากระสูบจุด และปลา

ตะเพียนทราย เป็นโฮสต์ที่เหมาะสมของระยะติดต่อ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และพยาธิใบไม้ลำไส้อื่นๆ

หลังจากทราบแหล่งที่มาของปลาและระบุชนิดของปลาตัวอย่างแล้ว ปลาตัวอย่างที่มาจากแหล่งน้ำที่แตกต่างกัน แหล่งละประมาณ 5 – 10 ตัว ได้ถูกนำมาตรวจดูการมีระยะ metacercaria ที่บริเวณหางหรือครีบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งวิธีนี้ทำให้สามารถตรวจหาแหล่งน้ำที่มีปลาที่มีระยะติดต่อได้เร็วขึ้น ไม่ต้องเสียเวลาและเสียค่าใช้จ่ายในการย่อยปลาด้วยเทคนิค pepsin digestion อย่างไรก็ตาม วิธีนี้เป็นเพียงการตรวจดูในเบื้องต้นเท่านั้น ยังไม่สามารถระบุชนิดของ metacercaria ที่ตรวจพบได้ ดังนั้น ปลาจากแหล่งน้ำที่ตรวจพบระยะ metacercaria ที่บริเวณครีบหรือหางจะถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินด้วยเทคนิค pepsin digestion เพื่อแยกเอาระยะ metacercaria ออกจากเนื้อปลา และระบุชนิดของระยะ metacercaria ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูลักษณะสัณฐานวิทยา การเคลื่อนที่ของตัวอ่อน ลักษณะ excretory bladder เป็นต้น ซึ่งทำให้สามารถระบุชนิดของ metacercaria ได้แม่นยำขึ้น

จากการตรวจพบระยะ metacercaria ที่บริเวณครีบหรือหางของปลาจากบึงสระพังและตลาดสดบ้านนาสว่าง จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างปลาจากแหล่งดังกล่าวเพิ่มเติม แต่เนื่องจากสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงและปริมาณน้ำในแหล่งน้ำลดลง ทำให้ปริมาณปลาตัวอย่างที่ได้มีจำนวนน้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ ซึ่งอาจทำให้มีความคลาดเคลื่อนในการแปลผลเนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างน้อย อย่างไรก็ตาม จำนวนปลาทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษามีทั้งสิ้น 215 ตัว ซึ่งเพียงพอต่อการประเมินความชุกอย่างคร่าวๆ ของการมีระยะติดต่อ metacercaria ของพยาธิใบไม้ในปลาตัวอย่าง และจากการตรวจดูระยะ metacercaria ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อระบุชนิดของพยาธิ พบว่า ปลาจากทั้งสองแหล่งมีระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *C. formosanus* (25.11%), *H. pumilio* (9.09%) และ *H. taichui* (1.3%) แต่ตรวจไม่พบระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และมีระยะ metacercaria บางชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิด (64.5%) ซึ่ง metacercaria ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้เหล่านี้ (unidentified metacercariae) ได้นำมาสกัด DNA และเพิ่มจำนวนขึ้นยืนด้วยเทคนิค PCR โดย primer ที่จำเพาะกับพยาธิพยาธิใบไม้ลำไส้ *C. formosanus*, *H. pumilio*, *H. taichui* และพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* พบ DNA band เกิดขึ้นตรงตำแหน่ง 367 bp หลังจากเพิ่มจำนวน DNA ด้วย primer ที่จำเพาะกับยีน ITS-2 ของ *C. formosanus*

จากการตรวจระบุชนิดของ metacercaria ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทำ PCR จาก DNA ของ metacercaria ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ พบว่า ระยะ metacercaria ส่วนใหญ่ ที่พบในปลาน้ำจืดที่อาศัยในบึงสระพังและลำเซบายเป็นระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ลำไส้ *C. formosanus* รองลงมาคือ *H. pumilio* และ *H. taichui* ตามลำดับ

พยาธิใบไม้ลำไส้ *C. formosanus* เป็นพยาธิใบไม้ที่พบครั้งแรกในสุนัข แต่ในปัจจุบันพบการติดพยาธิชนิดนี้ในคน โดยมักพบร่วมกับการติดพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ เช่น *O. viverrini*, *H. pumilio*, *H. taichui*, *Prosthodendrium molenkampii*, *Phaneropsolus bonnei* เป็นต้น ในประเทศไทย พบผู้ป่วยที่ติดพยาธิ *C. formosanus* ที่จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 1 ราย (41) ส่วนการสำรวจในประเทศลาว พบผู้ป่วย 7 ราย ที่ติดพยาธิชนิดนี้ (42) ในประเทศไทย ถึงแม้จะมีรายงานผู้ป่วยที่ติดพยาธิ *C. formosanus* เพียง 1 ราย แต่ก็มีรายงานการตรวจพบระยะ metacercaria ของพยาธิชนิดนี้ในปลาน้ำจืดหลายชนิด (7) (43) (43) นั้นหมายความว่าหากประชากรยังมีการรับประทานปลาน้ำจืดแบบสุกๆ ดิบๆ ก็อาจทำให้มีโอกาสติดพยาธิชนิดนี้ได้

พยาธิใบไม้ *H. pumilio* และ *H. taichui* จัดเป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก มีระยะตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในลำไส้เล็กของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งคนด้วย พยาธิใบไม้ลำไส้เหล่านี้ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพและอาการทางคลินิกที่รุนแรง อาจมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย ปวดมวนท้อง เนื่องจากระยะตัวเต็มวัยของพยาธิจะฝังตัวลึกลงไปในลำไส้เล็ก แต่การติดพยาธิเหล่านี้ รวมทั้งพยาธิใบไม้ลำไส้ *C. formosanus* ที่เป็นสาเหตุของการเจ็บปวดเล็กๆ น้อยๆ ในประชากรนั้น สามารถบอกถึงสุขอนามัยที่ไม่ถูกต้องในการรับประทานอาหารที่ไม่ปรุงให้สุกก่อน รวมถึงความปลอดภัยในด้านอาหารของชุมชนนั้นๆ ด้วย

การตรวจดูระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืดที่อาศัยในแหล่งน้ำใกล้ชุมชนหรือปลาน้ำจืดที่ถูกนำมาขายในตลาด นอกจากจะทำให้ทราบข้อมูลความชุกของการติดพยาธิในปลาแล้ว ยังเป็นประโยชน์ในการวางนโยบายป้องกันการติดพยาธิจากการกินปลาสุกๆ ดิบๆ และช่วยกระตุ้นให้ประชาชนมีความระมัดระวังในการรับประทานอาหารมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องจำนวนแหล่งน้ำและจำนวนปลาตัวอย่าง แต่ข้อมูลความชุกของการติดพยาธิในปลาที่ได้แสดงในการศึกษานี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบอกความรุนแรงของการมีระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืดได้อย่างคร่าวๆ และแม้จะยังมีรายงานผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีอยู่ แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้กลับตรวจไม่พบระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลาตัวอย่างเลย ซึ่งอาจเนื่องมาจากข้อจำกัดที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ประกอบกับแหล่งน้ำผิวดินในจังหวัดอุบลราชธานีมีจำนวนมาก การตรวจดูการติดพยาธิของปลาในทุกแหล่งน้ำอาจเป็นไปได้ยาก การทำแผนที่ทางภูมิศาสตร์ระหว่างความชุกของผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีกับแหล่งน้ำผิวดินในจังหวัดอุบลราชธานี น่าจะช่วยให้มีโอกาสตรวจพบแหล่งน้ำที่เป็นแหล่งกักเก็บโฮสต์ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้ง่ายขึ้น นอกจากนั้น การติดพยาธิใบไม้ตับจากปลาน้ำจืดที่ถูกขนส่งจากแหล่งอื่นมาเพื่อขายในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานีก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่นักวิจัยควรคำนึงถึง เพื่อหาแหล่งน้ำที่มีปลาน้ำจืดที่มีระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับและพยาธิใบไม้ลำไส้อื่นๆ เพื่อจะได้หาแนวทางป้องกันและควบคุมการเกิดโรคพยาธิในชุมชนที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งน้ำนั้นๆ ต่อไป และจากการตรวจระยะติดต่อของพยาธิในปลา

ชนิดต่างๆ นั้น บ่งบอกถึงการมีวงจรชีวิตของพยาธิในสิ่งแวดล้อม การร่วมกันสร้างให้เกิดสุขอนามัยที่ดีในชุมชนจะเป็นการตัดวงจรชีวิตของพยาธิให้หมดไปอย่างถาวร

เอกสารอ้างอิง

1. Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, et al. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop.* Jul 23.
2. Rim HJ, Sohn WM, Yong TS, Eom KS, Chai JY, Min DY, et al. Fishborne trematode metacercariae detected in freshwater fish from Vientiane Municipality and Savannakhet Province, Lao PDR. *Korean J Parasitol.* 2008 Dec;46(4):253-60.
3. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med.* 2007 Jul;4(7):e201.
4. Kaewpitoon SJ, Rujirakul R, Wakkuwattapong R, Matrakool L, Tongtawee T, Panpimanmas S, et al. *Opisthorchis viverrini* Infection Among People in the Border Areas of Three Provinces, Northeast of Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(6):2973-7.
5. Yeoh KW, Promthet S, Sithithaworn P, Kamsa-Ard S, Parkin DM. Re-examination of *Opisthorchis viverrini* Infection in Northeast Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(8):3413-8.
6. Boonjaraspinyo S, Boonmars T, Kaewsamut B, Ekobol N, Laummaunwai P, Aukkanimart R, et al. A cross-sectional study on intestinal parasitic infections in rural communities, northeast Thailand. *Korean J Parasitol.* 2013 Dec;51(6):727-34.
7. Pitaksakulrat O, Sithithaworn P, Laoprom N, Laha T, Petney TN, Andrews RH. A cross-sectional study on the potential transmission of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* and other fishborne zoonotic trematodes by aquaculture fish. *Foodborne pathogens and disease.* Jan;10(1):35-41.
8. Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Phongsaskulchoti P, Maleewong W. Real-time fluorescence resonance energy transfer PCR with melting curve analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish intermediate hosts. *Vet Parasitol.* 2008 Oct 20;157(1-2):65-71.
9. Parvathi A, Umesha KR, Kumar S, Sithithaworn P, Karunasagar I. Development and evaluation of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish. *Acta Trop.* 2008 Jul;107(1):13-6.
10. Wongsawad P, Wongsawad C. Infection dynamics and molecular identification of metacercariae in cyprinoids from Chiang Mai and Sakon Nakhon Provinces. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011 Jan;42(1):53-7.

11. Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Pongsaskulchoti P, Maleewong W. Detection of *Opisthorchis viverrini* in infected bithynid snails by real-time fluorescence resonance energy transfer PCR-based method and melting curve analysis. *Parasitol Res.* 2008 Aug;103(3):649-55.
12. Maleewong W, Intapan PM, Wongkham C, Wongsaroj T, Kowsuwan T, Pumidonming W, et al. Detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected bithynid snails and cyprinoid fishes by a PCR-based method. *Parasitology.* 2003 Jan;126(Pt 1):63-7.
13. Duengai K, Sithithaworn P, Rudrappa UK, Iddya K, Laha T, Stensvold CR, et al. Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):366-8.
14. Stensvold CR, Saijuntha W, Sithithaworn P, Wongratanacheewin S, Strandgaard H, Ornbjerg N, et al. Evaluation of PCR based coprodiagnosis of human opisthorchiasis. *Acta Trop.* 2006 Jan;97(1):26-30.
15. Umesha KR, Kumar S, Parvathi A, Duengai K, Sithithaworn P, Karunasagar I. *Opisthorchis viverrini*: detection by polymerase chain reaction (PCR) in human stool samples. *Exp Parasitol.* 2008 Dec;120(4):353-6.
16. Wongratanacheewin S, Pumidonming W, Sermswan RW, Maleewong W. Development of a PCR-based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. *Parasitology.* 2001 Feb;122(Pt 2):175-80.
17. Brockelman WY, Upatham ES, Viyanant V, Ardsungnoen S, Chantanawat R. Field studies on the transmission of the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, in northeast Thailand: population changes of the snail intermediate host. *Int J Parasitol.* 1986 Oct;16(5):545-52.
18. Wykoff DE, Harinasuta C, Juttijudata P, Winn MM. *Opisthorchis viverrini* in Thailand--the Life Cycle and Comparison with *O. felineus*. *J Parasitol.* 1965 Apr;51:207-14.
19. Kaewkes S. Taxonomy and biology of liver flukes. *Acta Trop.* 2003 Nov;88(3):177-86.
20. Vajrasthira S, Harinasuta C, Komiya Y. The morphology of the metacercaria of *Opisthorchis viverrini*, with special reference to the excretory system. *Annals of tropical medicine and parasitology.* 1961 Dec;55:413-8.
21. Waikagul J. *Opisthorchis viverrini* metacercaria in Thai freshwater fish. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1998 Jun;29(2):324-6.

22. Sayasone S, Odermatt P, Phoumindr N, Vongsaravane X, Sensombath V, Phetsouvanh R, et al. Epidemiology of *Opisthorchis viverrini* in a rural district of southern Lao PDR. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Jan;101(1):40-7.
23. Vichasri S, Viyanant V, Upatham ES. *Opisthorchis viverrini* : intensity and rates of infection in cyprinoid fish from an endemic focus in Northeast Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1982 Mar;13(1):138-41.
24. Sithithaworn P, Pipitgool V, Srisawangwong T, Elkins DB, Haswell-Elkins MR. Seasonal variation of *Opisthorchis viverrini* infection in cyprinoid fish in north-east Thailand: implications for parasite control and food safety. Bull World Health Organ. 1997;75(2):125-31.
25. Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. Clin Microbiol Rev. 2009 Jul;22(3):466-83.
26. Andrews RH, Sithithaworn P, Petney TN. *Opisthorchis viverrini*: an underestimated parasite in world health. Trends in parasitology. 2008 Nov;24(11):497-501.
27. Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, et al. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. Acta Trop. Sep;120 Suppl 1:S158-68.
28. Sithithaworn P, Andrews RH, Nguyen VD, Wongsaroj T, Sinuon M, Odermatt P, et al. The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. Parasitology international. Mar;61(1):10-6.
29. Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:121-75.
30. Thaenkham U, Phuphisut O, Pakdee W, Homsuwan N, Sa-Nguankiat S, Waikagul J, et al. Rapid and simple identification of human pathogenic heterophyid intestinal fluke metacercariae by PCR-RFLP. Parasitology international. Dec;60(4):503-6.
31. Parvathi A, Umesha KR, Kumar S, Sithithaworn P, Karunasagar I, Karunasagar I. Development and evaluation of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish. Acta tropica. 2008 Jul;107(1):13-6.
32. Thaenkham U, Visetsuk K, Dung do T, Waikagul J. Discrimination of *Opisthorchis viverrini* from *Haplorchis taichui* using COI sequence marker. Acta tropica. 2007 Jul;103(1):26-32.
33. Le TH, Van De N, Blair D, Sithithaworn P, McManus DP. *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. Experimental parasitology. 2006 Feb;112(2):109-14.

34. Ando K, Sithithaworn P, Nuchjungreed C, Tesana S, Srisawangwong T, Limviroj W, et al. Nucleotide sequence of mitochondrial CO I and ribosomal ITS II genes of *Opisthorchis viverrini* in northeast Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2001;32 Suppl 2:17-22.
35. Sato M, Thaenkham U, Dekumyoy P, Waikagul J. Discrimination of *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. pumilio* and *H. taichui* using nuclear DNA-based PCR targeting ribosomal DNA ITS regions. Acta tropica. 2009 Jan;109(1):81-3.
36. Van Van K, Dalsgaard A, Blair D, Le TH. *Haplorchis pumilio* and *H. taichui* in Vietnam discriminated using ITS-2 DNA sequence data from adults and larvae. Experimental parasitology. 2009 Oct;123(2):146-51.
37. Katokhin AV, Shekhovtsov SV, Konkow S, Yurlova NI, Serbina EA, Vodianitskai SN, et al. Assessment of the genetic distinctions of *Opisthorchis felineus* from *O. viverrini* and *Clonorchis sinensis* by ITS2 and CO1 sequences. Dokl Biochem Biophys. 2008 Jul-Aug;421:214-7.
38. Srisawangwong T, Sithithaworn P, Tesana S. Metacercariae isolated from cyprinoid fishes in Khon Kaen District by digestion technic. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997;28 Suppl 1:224-6.
39. Sohn WM, Eom KS, Min DY, Rim HJ, Hoang EH, Yang Y, et al. Fishborne trematode metacercariae in freshwater fish from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. The Korean journal of parasitology. 2009 Sep;47(3):249-57.
40. Phan VT, Ersboll AK, Nguyen KV, Madsen H, Dalsgaard A. Farm-level risk factors for fish-borne zoonotic trematode infection in integrated small-scale fish farms in northern Vietnam. PLoS neglected tropical diseases. 4(7):e742.
41. Waikagul J, Wongsaroj T, Radomyos P, Meesomboon V, Praewanich R, Jongsuksuntikul P. Human infection of *Centrocestus caninus* in Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 1997 Dec;28(4):831-5.
42. Chai JY, Sohn WM, Yong TS, Eom KS, Min DY, Lee MY, et al. *Centrocestus formosanus* (Heterophyidae): human infections and the infection source in Lao PDR. The Journal of parasitology. Jun;99(3):531-6.
43. Wongsawad P, Wongsawad C. Infection dynamics and molecular identification of metacercariae in cyprinoids from Chiang Mai and Sakon Nakhon Provinces. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. Jan;42(1):53-7

ภาคผนวก

Survey of trematode metacercariae in cyprinoids fish from Warinchamrap district, Ubon Ratchathani province, Thailand

J. Sripa*, B. Sripa, N. Kiatsopit, S. Piratae

Objectives: Ubon Ratchathani province is a part of North-East Thailand where prevalence of opisthorchiasis and cholangiocarcinoma has been reported. This cross-sectional study was performed to elucidate the status of trematode larvae infection in cyprinoids fish in this area following mass treatment and campaigns by Thailand's public health agency over the past few years.

Methods: Cyprinoids fish samples were collected from April 2012 to August 2014. To investigate the infection of trematode metacercariae in cyprinoids fish, a total of 250 fish samples was randomly collected, identified fish species and examined for metacercariae at the fish's tail before being taken to the artificial digestion method. The sediments from fish digestion were examined for metacercariae and identified species level base on their detail morphologies under stereomicroscopy.

Results: From examination for trematode metacercariae in fish, three species of metacercariae, *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, and *Centrocestus formosanus*, were found to be prevalent in the fish hosts, whereas *O. viverrini* metacercariae was not detected.

Conclusion: This study showed the lack of *O. viverrini* infection in cyprinoids fish. Prevalence of *H. taichui*, *H. pumilio*, and *C. formosanus* were reported. Also, this study provided new information about infection in first intermediate hosts of zoonotic trematodes in this area.

Key words: Metacercariae, Cyprinoids fish, Ubon Ratchathani

Introduction

North-East of Thailand is endemic with parasitic infection. High rate of helminth and protozoa infection in people living in this part of Thailand has been reported continuously more than 10 years. Many factors including the suitability of topography, optimal climate, availability of intermediate host and poor sanitation of habitants are promoted high incidence rate of parasitic infection in population of this part of Thailand. Ubon Ratchathani province is an interesting area that located in lower part of North-East. Warinchamrap district was an area that proven high number of cholangiocarcinoma patient (data during 2002 – 2011) (Hospital Based Cancer Registry, 2002 – 2011). Moreover, high prevalence of *Opisthorchis viverrini* and other helminth infection in habitants was also reported from this area (Report of Civil Society Forum of Hospital, 2011–2012). This would indicate the distribution of first and secondary intermediate host of parasitic trematodes as well as unchanged eating habit of local people. The exits of specific intermediate hosts of parasitic trematodes are significant factors to promote complete of complicated life cycle of these parasites. Fresh water snail, *Bithynia goniomphalos* and cyprinoids fish that common found in this areas are considered to be of medical and veterinary public health significant since they were found as intermediate host of carcinogenic liver fluke, *O. viverrini* and other intestinal flukes.

However, there was no studies concerning of trematode larvae stage in these intermediate hosts. To elucidate the status of trematode infection in both freshwater snails and cyprinoids fish, the cross-sectional study was performed in area of Warinchamrap district. This epidemiological situation from this study could be provided importance information of trematode infection. Moreover, this is the first step to give a rough idea of the infection rates in humans and animals surrounding the areas and also force the effective control of parasitic infection.

Materials and Methods

1. Study areas

The study areas were explored using ten years backdated data of cholangiocarcinoma patients from Ubon Ratchathani Cancer Hospital, Ubon Ratchathani. The habitat and number of CCA, opisthorchiasis and other parasitic

infection patient during 2002-2011 were determined to identify risk area for these diseases. From data review, Warinchamrap district also showed high number of CCA and parasitic infection patients. This indicated the existing of factors that promote parasitic infection in habitant including trematode intermediate hosts; *Bithynia* snails and cyprinoids fish. Thus, rice fields, canals and ponds that plenty cover in this district were the sites for snails and fish collection.

2. Samples collection and identification

Collection of cyprinoids fish

Cyprinoids fish samples were random collected from natural ponds and canals in the rice field of Ko-ae sub-district during April 2012 to August 2014. All fish were examined for trematode metacercariae at caudal fin and fish's tail under light microscope. 250 fish samples that present metacercariae at their fin were transferred on ice to Tropical Disease Research Laboratory for artificial pepsin digestion. Fish samples were measure in body length and width, weigh and species identification. Fish samples were grouped according to fish species before carried out to digestion process following previously described (Srisawangwong, Sithithaworn, and Tesana, 1997). Briefly, Fish were homogenized in blender then mix with 0.25% pepsin (Sigma Aldrich, USA) and 1.5% HCl in 0.85% NaCl solution. The mixtures were incubated in shaking water bath at 37 °C for 1 hour. After that, the mixtures were filtered through a series of sieves including 1,000, 300, 106 and 250 um mesh, respectively. The filtered mixtures were precipitate in sediment jar in 0.85% NaCl solution until supernatant became clear. After the supernatant was clear, metacercariae in sediment were identified under stereomicroscope base on morphological criteria. Intensity of trematode metacercariae was calculated by counting number of metacercariae divided on fish species.

Results

Trematode metacercariae identification

A total of 250 fish samples consisted of 10 species of cyprinoids fish (Table 1) which found metacercariae at their tail and/or caudal fin were subject to pepsin digestion and metacercariae identification. All species of fish samples were infected with metacercariae in different prevalence. The common found trematode metacercariae were *Centrocestus formosanus*, *Haplochis pumilio*, *H. taichui* with prevalence of 25.11%, 9.09% and 1.3% respectively. The common fish that caught in this area were *Puntioplites falcifer*, *Cyclocheilichthys enoplos*, *C. apogon* and *Hampula dispar*. From this survey, all these common fish were also infected with zoonotic trematodes including *C. formosanus*, *H. pumilio* and *H. taichui* with the difference metacercariae burden per host. Among these fish, *H. dispar* was showed highest of number of metacercariae per host than others. In addition, 64.5% of metacercariae isolated from all fish were indicated as unidentified metacercariae (Figure 2).

Discussion

Prevalence of zoonotic trematode in intermediate and definitive host has been reported in many areas throughout Thailand, especially in the North and North-East. However, there was lack of information of zoonotic trematode prevalence in specific host from lower part of North-East of Thailand. This study would be the first report that showed the status of zoonotic trematode infection in specific intermediate host, *B. goniomphalos* and cyprinoids fish from Warinchamrap district, the area that accumulated with high number of CCA, opisthorchiasis and other parasitic infection patients.

Variety species of cyprinoids fish were collected from canals, rice fields and natural ponds that cover throughout area of Warinchamrap district. These fish samples were found infected with various types of zoonotic trematode metacercariae. This might due to the fact of the spread of animal and human feces into natural water resources that might allow parasites transmitted quickly and easily to their appropriated intermediate host. In addition, prevalence of infected

cyprinoids fish were represented complex and suitable ecosystem for trematode life cycle in this area. Though, the incidence of CCA and opisthorchiasis has been reported but there was no *O. viverrini* larvae infected in cyprinoids fish.

Although, *C. formosanus* is the zoonotic trematode that has been reported in intestine of dog, but recently seven patients from Lao PDR were found mix infections of *C. formosanus* with *O. viverrini* and *H. taichui* (Chai et al., 2013). This infection was cause of varied symptoms in patients including epigastric pain, indigestion and occasional diarrhoea but less of relationships with *C. formosanus* infection. Because of *C. formosanus* infection was stated that cause from frequently consuming raw or uncooked fresh water fish thus the attention should be paid to people who favour consume this kind of food.

From survey of metacercariae in cyprinoids fish, the common local fish species were found infection with varied species of intestinal trematode. Moreover, screening for metacercarial infection by examined fish caudal fin and fish's tail under light microscope before carried out to artificial pepsin digestion were used in this study. This screening examination technique was benefit in reducing the cost and time consuming in fish digestion. However, this technique cannot identify the metacercariae in species level. Thus, fish digestion with pepsin enzyme to isolate metacercariae from fish meat still important for identify the metacercariae base on morphological criteria. However, in this study, numerous of unidentified metacercariae were found. These metacercariae were atypical morphology and were not effective for identifiable metacercariae. To identified these atypical metcercariae, conventional PCR with specific primer would be the appropriate method since specificity and sensitivity has been reported (Pitaksakulrat et al., 2013).

From this study, parasitic infection in cyprinoids fish from Warinchamrap district are important in monitoring medical and veterinary public health in this area. Moreover, data from this survey are provided important information on ecology and host-parasite relationships of trematode infections. However, this information would be changed according to many factors. Thus, monitoring of the status of parasitic infection in these intermediate hosts should be performing regularly.

Acknowledgements

This study was partial supported by young researcher grant from Office of Research, Academic Services, Art and Culture preservation, Ubon Ratchathani University.

References

- Chai, J. Y., Sohn, W. M., Yong, T. S., Eom, K. S., Min, D. Y., Lee, M. Y., Lim, H., Insisiengmay, B., Phommasack, B., and Rim, H. J. (2013). *Centrocestus formosanus* (Heterophyidae): human infections and the infection source in Lao PDR. *J Parasitol* **99**(3), 531-6.
- Pitaksakulrat, O., Sithithaworn, P., Laoprom, N., Laha, T., Petney, T. N., and Andrews, R. H. (2013). A cross-sectional study on the potential transmission of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* and other fishborne zoonotic trematodes by aquaculture fish. *Foodborne Pathog Dis* **10**(1), 35-41.
- Srisawangwong, T., Sithithaworn, P., and Tesana, S. (1997). Metacercariae isolated from cyprinoid fishes in Khon Kaen District by digestion technic. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **28 Suppl 1**, 224-6.

Table 1 Prevalence of fish-borne trematode metacercariae in cyprinoids fish from Warinchamrap district, Ubon Ratchathani province.

Fish species	Number of fish examined	Width		Length		Number of metacercariae recovered per host (N) ¹	Number of metacercariae classified based on morphology species specific (%prevalence)					Total of metacercariae
		Min (cm)	Max (cm)	Min (cm)	(N) ¹ Max (cm)							
							<i>O. viverrini</i>	<i>H. taichui</i>	<i>H. pumilio</i>	<i>C. formosanus</i>	unidentified	
<i>Puntioplites falcifer</i>	91	4.5	9	11	21	0.37 (34)	-	-	10 (29.41)	9 (26.47)	15 (44.12)	34 (14.72)
Soldier river brab <i>(Cyclocheilichthys enoplos)</i>	23	3	7	14.5	24.5	3.49 (80)	-	2 (2.5)	8 (10)	23 (28.75)	47 (58.75)	80 (34.63)
<i>Epalzeorhynchos chrysophekadion</i>	1	5.5		20		11 (11)	-	-	-	1 (9.09)	10 (90.90)-	11 (4.76)
<i>Labiobarbus leptocheila</i>	1	5.5		20		-	-	-	-	-	-	-
Beardless barb <i>(Cyclocheilichthys apogon)</i>	2	4	5	14	15.5	6 (12)	-	-	-	1 (8.33)	11 (91.67)	12 (5.19)
Java barb, Silver barb <i>(Barbonymus gonionotus)</i>	6	2	3	7.5	9.5	2.17 (13)	-	-	-	1 (7.69)	12 (92.31)	13 (5.63)
<i>Puntius brevis</i>	7	2	3	10	12.5	0.43 (3)	-	-	-	-	3 (100)	3 (1.3)
Red tailed tinfoil <i>(Barbonymus altus)</i>	1	4.5		13		6 (6)	-	-	-	-	6 (100)	6 (2.6)
Siamese mud carp <i>(Henicorhynchus simensis)</i>	2	2.3	2.8	10.5	12.5	1.5 (3)	-	-	-	-	3 (100)	3 (1.3)
Eye-Spot Barb, Spotted Hampula Barb <i>(Hampula dispar)</i>	1	4		16		3 (3)	-	-	-	-	3 (100)	3 (1.3)

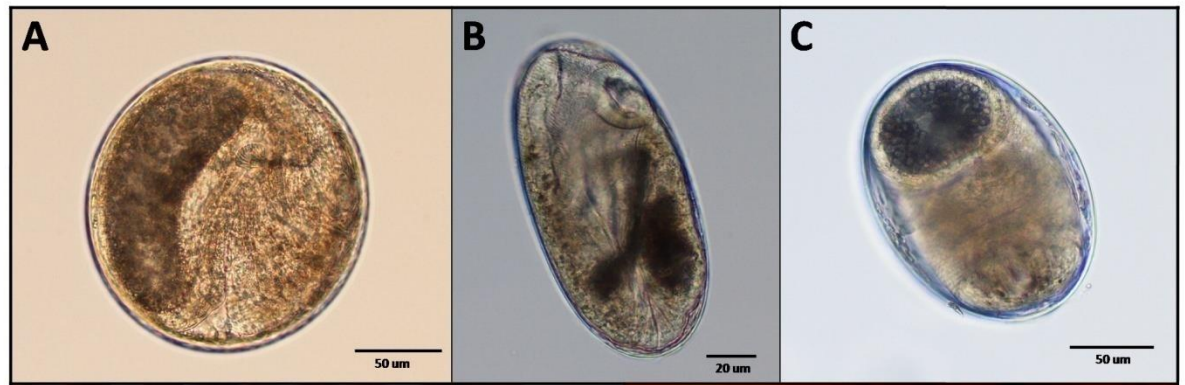


Figure 1 Trematode metacercariae infected in cyprinoids fish from form Warinchamrap district, Ubon Ratchathani province. Cyprinoids fish that found metacercariae at their caudal fin or fish's tail were carried out for artificial pepsin digestion. Metacercariae of intestinal trematodes; *H. taichui* (A), *C. formosanus* (B), and *H. pumilio* (C) were found infected fish samples.

ประวัตินักวิจัยหลัก

ชื่อ

นางสาวจิตติยวดี ศรีภา

หน่วยงานที่สังกัด

วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตำแหน่ง

อาจารย์

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	2554	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	2550	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	2548	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

งานวิจัย

1. Jex, A. R., Young, N. D., **Sripa, J.**, Hall, R. S., Scheerlinck, J. P., Laha, T., Sripa, B., and Gasser, R. B. (2012). Molecular changes in *Opisthorchis viverrini* (Southeast Asian liver fluke) during the transition from the juvenile to the adult stage. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11), e1916.
2. **Sripa, J.**, Brindley, P. J., Sripa, B., Loukas, A., Kaewkes, S., and Laha, T. (2012). Evaluation of liver fluke recombinant cathepsin B-1 protease as a serodiagnostic antigen for human opisthorchiasis. *Parasitol Int* 61(1), 191-5.
3. **Sripa, J.**, Laha, T., To, J., Brindley, P. J., Sripa, B., Kaewkes, S., Dalton, J. P., and Robinson, M. W. (2010). Secreted cysteine proteases of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: regulation of cathepsin F activation by autocatalysis and trans-processing by cathepsin B. *Cell Microbiol* 12(6), 781-95.
4. **Sripa, J.**, Pinlaor, P., Brindley, P. J., Sripa, B., Kaewkes, S., Robinson, M. W., Young, N. D., Gasser, R. B., Loukas, A., and Laha, T. (2011). RNA interference targeting cathepsin B of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Parasitol Int* 60(3), 283-8.
5. Laha, T., **Sripa, J.**, Sripa, B., Pearson, M., Tribolet, L., Kaewkes, S., Sithithaworn, P., Brindley, P. J., and Loukas, A. (2008). Asparaginyl endopeptidase from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, and its potential for serodiagnosis. *Int J Infect Dis* 12(6), e49-59.

โครงการที่เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

1. เรื่อง “การตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิตัวตืดพยาธิใบไม้ในปลาในปลาจืดจากอำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี (Detection of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in fresh water fish from Warinchamrap district Ubonratchathani province)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (20 มิถุนายน 2555 - 19 มิถุนายน 2556) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2555 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. เรื่อง “การศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อปรสิตในเชิงพื้นที่ (The incidence and risk factors for opisthorchiasis and cholangiocarcinoma in Ubonratchathani province)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (1 มีนาคม 2556 - 28 กุมภาพันธ์ 2557) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2556 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
3. เรื่อง “การประเมินการเป็นวัคซีนของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในปลา (The evaluation of leucine aminopeptidase as vaccine candidate against *Opisthorchis viverrini* infection)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (1 ตุลาคม 2556 - 30 กันยายน 2557) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
4. เรื่อง “การโคลนและการศึกษาคุณลักษณะของลิวซีนอะมิโนเปปติเดสของพยาธิตัวตืดพยาธิใบไม้ในปลา (Cloning and characterization of *Opisthorchis viverrini* leucine aminopeptidase)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 2 ปี (2 กรกฎาคม 2555 - 1 กรกฎาคม 2557) แหล่งทุนวิจัย: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการที่เป็นผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. เรื่อง “การวิจัยพยาธิใบไม้ตับแบบสหวิทยาการ (Interdisciplinary research on human liver flukes)” ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 3 ปี (2556 - 2558) แหล่งทุนวิจัย: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย