

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ประวัติการพบพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

พยาธิชนิดนี้ มีรายงานพบครั้งแรกโดย Verdun และ Bruyant ในปี ค.ศ. 1908 ในจังหวัด Tonkin ประเทศเวียดนาม และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น *O. felinus* สำหรับประเทศไทยได้มีการพบปรสิตชนิดนี้ ตั้งแต่ ค.ศ. 1911 จากการผ่าศพนักโทษคนหนึ่งซึ่งจังหวัดเชียงใหม่ ต่อมาอีกประมาณ 16 ปี จึงมีรายงานว่าพบอีกครั้งโดยนายแพทย์เฉลิม พรหมมาส เมื่อ ค.ศ.1927 จากการผ่าศพผู้ที่เสียชีวิตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ แต่ผู้รายงานเข้าใจว่าเป็น *O. felinus* แต่เมื่อมีการศึกษาอย่างละเอียดพบว่า เป็นพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* โดย Sadun (1955)

พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็นพยาธิใบไม้ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี (Kurathong et al., 1985; Haswell-Elkins et al., 1992, 1994) โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Vatanasapt et al., 1990; Sriamporn et al., 2004) โดยจัดอยู่ใน Phylum Platyhelminthes, Class Trematoda, Subclass Digenea, Family Opisthorchiidae, genus *Opisthorchis*

2. รูปร่างลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้ (general morphology)

2.1 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้

มีรูปร่างแบนเหมือนใบไม้ โดยแบนทางด้านท้องและหลัง (dorso-ventrally flattened) มีอวัยวะสำหรับดูดเกาะเนื้อเยื่อของโฮสต์ (sucker) 2 อัน ได้แก่ oral sucker อยู่ทางด้านหน้าเป็นกล้ามเนื้ออยู่รอบๆ ปาก และ ventral sucker หรือ acetabulum อยู่ทางด้านท้อง รูปร่างเป็นรูปกล้วยปลายนั่น ผนังลำตัวในพยาธิใบไม้บางชนิดมีหนาม (spine) เกส็ด (scale) หรือปุ่ม (tubercle) ซึ่งมีรูปร่าง ขนาด การเรียงตัวและการกระจายตัว แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดจึงใช้ประกอบการจำแนกชนิดของพยาธิได้

พยาธิใบไม้บางชนิดมีลักษณะเฉพาะของ genus หรือ family ซึ่งเป็นที่สังเกตได้ง่าย เช่น มี cephalic cone ลักษณะเป็นรูปกรวย พบในพยาธิใบไม้ตับแกะ (*Fasciola* sp.) มี circumoral disc ลักษณะเป็นกระเปาะรูปเกือกม้าและรอบๆ ปากและมีหนาม (collar spine) อยู่บน circumoral disc พบในพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดกลาง (Echinostomes) เป็นต้น

3. รูปร่างลักษณะของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*

3.1 พยาธิใบไม้ตับตัวเต็มวัย รูปร่างคล้ายใบไม้ ลำตัวแบน ยาว ส่วนท้ายป้านกว่าส่วนหัว มีขนาดยาว 5 – 10 ไมโครเมตร ขณะมีชีวิตมีสีแดงเรื่อๆ เป็นพยาธิที่มีอวัยวะสืบพันธุ์สองเพศในตัวเดียวกัน มี oral sucker อยู่เกือบปลายสุดของส่วนหัว คอหอยมีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อหลอดอาหารสั้น ลำไส้แยกเป็นสองแขนงยาวไปทางด้านข้างส่วนท้าย ventral sucker อยู่ประมาณ 1/5 ของลำตัวจากส่วนหัว รังไข่มีลักษณะเป็นกลีบขนาดค่อนข้างเล็ก พบอยู่ประมาณ 2/3 ของลำตัวจากส่วนหัว มดลูกยาวขดไปมาอยู่กลางลำตัวตั้งแต่ระดับ ventral sucker ไปจนถึงรังไข่ และมีไข่อยู่เป็นจำนวนมาก vitelline follicle เรียงตัวเป็นกลุ่มๆ กระจายอยู่สองข้างตรงกลางลำตัว อวัยวะมีสองอันมีลักษณะเป็น lobe วางตัวเยื้องกันเล็กน้อย และอยู่เกือบท้ายสุดของลำตัว excretory bladder เป็นท่อยาวตั้งแต่ระดับรังไข่ไปจนจรดส่วนท้าย

3.1.1 ลักษณะภายนอกของผนังลำตัวพยาธิ ผนังลำตัวปกคลุมไปด้วยรอยพับย่นสูงรอบๆ ตัวพยาธิ microvillus เจริญเต็มที่ในช่วงหนึ่งสัปดาห์แรกที่ออกจากถุงหุ้ม microvillus อยู่กันอย่างอัดแน่นใกล้ชิดกัน มีลักษณะสั้นและตอหนา มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5–0.7 ไมโครเมตร และสูง 0.6–0.9 ไมโครเมตร ส่วนมากพบที่ด้านท้องมีขนาดและจำนวนมากทางด้านหลัง ไม่พบหนามบนตัวพยาธิในระยะนี้ ในระหว่าง microvillus ส่วน sensory papilla ที่พบมีแบ่งได้ 3 ชนิด ซึ่งมีขนาดใหญ่กระจายอยู่บนผนังลำตัวของพยาธิ (Apinhasmit et al., 1993)

3.1.2 ลักษณะภายในของผนังลำตัวพยาธิแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือชั้นนอกลักษณะเป็น syncytium วางตัวอยู่บนชั้น basal lamina หรือ basement membrane ไม่มีนิวเคลียส เกิดจากส่วนยื่นขึ้นมาของ tegumental cell ที่อยู่ลิกลงไป เชื่อมต่อกันตลอดลำตัว ใน syncytial มี mitochondria จำนวนมาก เชื่อว่ามีหน้าที่เกี่ยวกับ active transport พบเมือกที่เป็นสารพวก mucopolysaccharide ทำหน้าที่ป้องกันการถูกทำลายจากเอนไซม์ (enzyme) ของโฮสต์ นอกจากนี้ใน syncytium ยังพบ endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lipid globule, vesicle (Kaewkes, 2003) บางครั้งอาจพบปลายประสาท (nerve ending) ได้ ซึ่งมีลักษณะต่างๆ กัน เช่น เป็นปุ่มและมีขนสั้นๆ (ciliated sensory papilla) หรือเป็นแอ่งเว้าและมีขน (ciliated pit type sense organ) พบ papilla หลายชนิดกระจายอยู่บนผนังลำตัวพยาธิ ชั้นในถัดจาก basement membrane ของ syncytium ลงมาเป็นกล้ามเนื้อลาย 3 ชั้น มีการจัดเรียงตัวจากชั้นนอกไปชั้นใน ดังนี้ circular, oblique และ longitudinal muscle และยังมีกล้ามเนื้อทอดขวางระหว่างด้านท้องไปด้านหลัง กล้ามเนื้อเหล่านี้ทำหน้าที่ในการเคลื่อนไหวของลำตัว (Tesana, 2005)

3.2 พยาธิใบไม้ตับระยะเมตาเซอร์คาเรีย : เป็นตัวอ่อนระยะติดต่อที่อาศัยอยู่ในกล้ามเนื้อปลา มีลักษณะรูปไข่ขนาดเฉลี่ย 200 x 167 ไมโครเมตร ตัวพยาธิเคลื่อนไหวอย่างรุนแรงอยู่ในซิสต์ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมองเห็น oral sucker, ventral sucker และ excretory bladder ซึ่งมีสีน้ำตาลชัดเจนเปลือกซิสต์ชั้นนอกหนา 3–8 ไมโครเมตร ส่วนเปลือกด้านในบางมาก และสังเกตเห็นได้ยาก (Vajrasthira et al., 1961; Wykoff et al., 1965)

3.2.1 ลักษณะภายนอกของผนังลำตัวพยาธิ ลักษณะผิวที่ผนังลำตัวของพยาธิพบว่า พยาธิใบไม้ตับในระยะตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรีย (newly excysted) มีลักษณะผิวที่ผนังลำตัวมีลักษณะเป็นสันนูนแบบไม่ต่อเนื่องตามแนวขวางของลำตัว มีหนามขนาดเล็กเรียงตัวเป็นวงรอบๆ ตัวพยาธิ ยกเว้นที่บริเวณด้านหน้าส่วนหลังของตัวพยาธิ และที่บริเวณรอบๆ sucker ทั้งสอง พบหนามมีลักษณะเป็นแฉก 2-3 แฉกที่ส่วนปลายของหนามอยู่บริเวณส่วนหน้าและพบหนามแบบปลายเดี่ยวที่บริเวณส่วนหลังของลำตัวพยาธิ (Apinhasmit et al., 1993) นอกจากหนามแล้วที่ผิวผนังลำตัวพยาธิยังพบโครงสร้างที่เชื่อว่าเป็นโครงสร้างรับความรู้สึก (sensory structure) ที่มีรูปร่างและลักษณะแตกต่างกัน

3.2.2 ลักษณะภายในของผนังลำตัวพยาธิมีลักษณะคล้ายพยาธิระยะตัวเต็มวัย มี basal lamina เป็นตัวแบ่งผนังลำตัวพยาธิออกเป็น 2 ชั้น ลักษณะเป็นเปลือกบางหุ้มอยู่ สร้างสารคัดหลั่ง มีชั้น syncytium ที่หนาปกคลุมตลอดทั้งตัวของพยาธิที่ชั้นนี้ไม่มี nucleus แต่จะพบ nucleus ได้ที่ tegumentary cell องค์ประกอบทั่วไปของ cytoplasm ประกอบไปด้วย mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, ribosome, glycogen granule, lipid และ vacuole โครงสร้างพิเศษใน cytoplasm ได้แก่ electron-dense, tegumental disk, dense body และ multi-laminar body เซลล์พิเศษเหล่านี้มีหน้าที่เฉพาะคือช่วยให้ผนังหุ้มลำตัวมีการเจริญอย่างสม่ำเสมอและช่วยสร้างขนหรือหนามขึ้นมาทดแทน ที่ชั้นในเป็นชั้นของกล้ามเนื้อ และพบ nucleus ในชั้นนี้ด้วย (Sobhon, Apinhasmit, 1996) นอกจากนี้ยังพบ microvilli ที่กำลังพัฒนาสั้นๆ โดยกระจายทั่วทั้งผิวตัวของพยาธิ (Apinhasmit et al., 1993)

4. ระบบประสาทของพยาธิใบไม้

พยาธิใบไม้มีระบบประสาทเป็นแบบเครือข่าย (network) (He, 1991; Bogue, Cairn, 2001) โดยปมประสาทใหญ่ (cerebral ganglion) อยู่บริเวณคอหอยและหลอดอาหาร ซึ่งจะส่งแขนงไปเลี้ยงบริเวณส่วนหน้า 3 แขนงหลัก แล้วแตกแขนงลงมาทางด้านท้ายของลำตัว โดยมีแขนงประสาททั้งด้านบนและด้านล่างของลำตัว ระหว่างแขนงด้านบนและด้านล่างจะมีแขนงประสาทเชื่อมต่อกัน คล้ายวงแหวนรอบตัวพยาธิ นอกจากนี้ยังมีปมประสาทพิเศษในบริเวณส่วนสำคัญของอวัยวะสืบพันธุ์ และมีปลายประสาทรับความรู้สึกทางด้านหัวซึ่งมีความไวต่อแสง (องุ่น เกียรติวุฒิ, 2545) จากการศึกษาาระบบประสาทของพยาธิใบไม้ตับชนิด *C. sinensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *O. viverrini* พบว่าระบบประสาททั้งสองข้างของพยาธิมีความสมมาตรกัน มีแขนงประสาทที่ออกจากปมประสาทใหญ่ 4 คู่ ยื่นออกไปเลี้ยงส่วนหน้า และมีแขนงประสาทอีก 3 เส้นที่ยื่นออกมาเพื่อไปเลี้ยงด้านหลังของลำตัว (He, 1991) นอกจากนี้แขนงประสาทเหล่านี้ยังแตกแขนงเป็นประสาทสั่งการส่วนปลาย (motor ending) และประสาทรับความรู้สึกส่วนปลาย (sensory ending) ไปยังกล้ามเนื้อและผนังลำตัว

Sensory papilla เป็นโครงสร้างที่พบบนผนังลำตัวพยาธิตัวแบน ซึ่งเชื่อว่าทำหน้าที่เป็นตัวรับความรู้สึก (sensory receptor) ของพยาธิ (Fujino et al., 1979; Bogue, Caira, 2001) เป็นตัวรับ mechanoreceptor, chemoreceptor, photoreceptor และ osmoreceptor เป็นต้น โครงสร้างดังกล่าวอ้างอิงหน้าที่จากการศึกษาโครงสร้างอย่างละเอียด (fine ultrastructure) โดยเฉพาะในกลุ่มพยาธิใบไม้มีการจัดเรียงตัว รูปร่างลักษณะ และ ultrastructure ของ sensory papilla ในพยาธิใบไม้ระยะต่างๆ ดังนี้

4.1 การศึกษาการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ด้วยการย้อม silver nitrate ในพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย พบว่า sensory papilla ที่ย้อมติด silver nitrate มีลักษณะกลมสีน้ำตาลตรงกลางติดสีจางๆ หรือมีลักษณะคล้ายโดนัท เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 ไมโครเมตร (Chapman, Willson, 1970; Fried, Fujino, 1987) โดยเรียกว่า sensory papilla ที่ย้อมติด silver nitrate ว่า argentophilic sensory papilla (Dimitrov et al., 1998) มีการกระจายตัวของ sensory papilla สมมาตรกันทั้งสองข้างของลำตัวและที่หาง โดยศึกษาในพยาธิ *Himasthla secunda* พบการกระจายตัวของ sensory papilla สมมาตรกันทั้งสองข้างของลำตัว เรียงตัวในแนวขวางระหว่างแต่ละแถวของหนามบนตัวพยาธิ มีการจัดเรียงตัวของ sensory papilla สมมาตรกันทั้งสองข้างลำตัวและที่หาง (Chapman, Wilson, 1970) ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Dimitrov และคณะ (1998) ที่ทำการศึกษา sensory papilla ที่อยู่บนผิวของพยาธิใบไม้ลำไส้ *Echinochasmus* พบว่าการเรียงตัวเป็นไปอย่างมีระเบียบ และสมมาตรกันทั้งสองข้างลำตัว พบการเรียงตัวเป็นแถวตามยาวของลำตัว ส่วนการศึกษาใน *Echinostoma caproni* พบที่มีการกระจายของ papilla หลายตำแหน่ง แทรกอยู่ระหว่างหนามที่ collar, รอบๆ oral sucker, บริเวณ ventral sucker, ด้านข้างของลำตัวพยาธิและที่หาง การจัดเรียงตัวของ papilla บนผนังลำตัวพยาธิสมมาตรทุกส่วน (Nakano, Fujino, 2003)

4.2 รายงานการศึกษารูปร่างและลักษณะของ sensory papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากการค้นคว้างานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากลุ่มพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียมีความหลากหลายของรูปร่างและลักษณะของ sensory papilla ยกตัวอย่างเช่น ใน *Echinostoma revolutum* ระยะเซอร์คาเรีย แบ่ง papilla ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ แบบ unciliate และ multiciliate papillae (Fried, Fujino, 1987) ซึ่งคล้ายกับ *Crepidostomum* sp. และ *Bunodera* sp. (Bogue, Caira, 2001), *Echinostoma caproni* (Nakano, Fujino, 2003) และ *Mesorchis denticulatus* (Koie, 1987) พบ papilla กระจายอยู่ที่ผนังลำตัว และโดยเฉพาะที่ oral และ ventral sucker พบ sensory papilla ทั้งแบบ nonciliate และ multiciliate papillae พบอยู่เป็นอันเดียวและเป็นกลุ่ม (Fujino et al., 1979a; Fried, Fujino, 1987; Koie, 1987; Bogue, Caira, 2001; Nakano, Fujino, 2003) จัดเรียงตัวสมมาตรกันทั้งสองข้างลำตัวทั้งด้านท้องและด้านหลังลำตัว (Fujino, et al., 2003) ในระยะเมตาเซอร์คาเรียหรือระยะที่ตัวอ่อนเพิ่งออกจากถุงหุ้ม พบว่ามี sensory papilla มี 2 ชนิด คือ unciliate และ non-ciliate papillae อยู่เป็นอันเดียวและแบบเป็นกลุ่ม แต่ไม่พบ sensory papilla ชนิด multiciliate papillae

(Fujino et al., 1979a; Koie, 1987; Apinhasmit et al., 1993; Chai et al., 1998) รูปร่างลักษณะปุ่มของ sensory papilla พบได้หลายแบบ คือ ชนิดที่ 1 ผนังลำตัวยกตัวขึ้นเป็นปุ่มเล็ก มี cilium ยื่นออกมาจาก cone-shaped base (Fujino et al., 1979; Koie, 1987; Apinhasmit et al., 1993) ชนิดที่ 2 cilium ยื่นออกมาจากผนังลำตัวแบบไม่มีปุ่มนูน ข้อมูลการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ที่ได้จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น พบว่ามีการจัดเรียงแบบสมมาตรกันทั้งสองข้างของลำตัวพยาธิ และพบ sensory papilla จำนวนมากที่ oral และ ventral sucker ทั้งในระยะเซอร์คาเรียและเมตาเซอร์คาเรีย (Fujino et al., 1979a; 1979b; Apinhasmit et al., 1993; Chai et al., 1998; Han et al., 2003)

4.3 รายงานการศึกษาโครงสร้างภายในของ sensory papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ามีการศึกษาในระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้หลายชนิดเช่น ใน *Clonorchis sinensis* (Fujino et al., 1979b), *Nicolla gallica* (Pariselle, Matricon-Gondran, 1985), *Multicotyle purvisi* (Rohde, Watson, 1990), *Echinostoma revolutum* (Zd'arska, 1992), *Diplostomum pseudospathaceum* (Czubaj, Niewiadomska, 1996), *Notocotylus imbricatus* (Dimitrov et al., 1998), *Allopodocotyle* sp. (Bogea, Cairra, 2001), *Clonorchis sinensis* (Nakano et al., 2003) และ *Crepidostomum metoecus* (Zd'arska, Nebesarova, 2003; 2004) ส่วนการศึกษาในระยะเมตาเซอร์คาเรียหรือตัวเต็มวัย เช่นใน *Clonorchis sinensis* (Fujino et al., 1979a) แม้ว่าจะมีการศึกษา ultrastructure ที่ผนังลำตัวของพยาธิ *O. viverrini* แต่ในงานวิจัยดังกล่าวมิได้กล่าวถึงรายละเอียดของ sensory papilla เลย (Apinhasmit et al., 1994) รายงานการศึกษา ultrastructure ของ sensory papilla ในพยาธิหลายชนิดแบ่ง sensory papilla ได้เป็น เช่น unciliate, multiciliate และ non-ciliate papillae ซึ่งแบ่งโดยอาศัยการมีหรือไม่มี cilium เป็นหลักในการแบ่ง องค์ประกอบหลักของ sensory papilla ที่พบได้แก่ มี bulbous ending หรือ nerve bulb ฝังอยู่ใต้ผนังลำตัวโดยมี septate desmosome เป็นตัวยึดระหว่าง sensory papilla bulb กับเซลล์ผนังลำตัว มีการเชื่อมต่อกับ nerve fiber ที่ส่วนฐานของ bulbous ending (Fujino et al., 1979b; Rohde, Watson, 1990; Zd'arska, 1992; Czubaj, Niewiadomska, 1996; Zd'arska, Nebesarova, 2003; 2004)

5. วงจรชีวิต

พยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีเล็ก (secondary bile duct) ในตับของมนุษย์ สุนัข และแมว ในบางรายที่มีพยาธิจำนวนมากอาจพบพยาธิในท่อน้ำดีใหญ่ ถุงน้ำดีหรือท่อน้ำดีอ่อน เมื่อตัวเต็มวัยออกไข่ปะปนออกมากับน้ำดี เข้าสู่ลำไส้ส่วน duodenum ออกจากโฮสต์ปะปนมากับอุจจาระ ถ้าไข่ตกลงสู่แหล่งน้ำถูกหอยซึ่งเป็นโฮสต์กลางตัวที่ 1 คือหอยไซ (*Bithynia* sp.) กินเข้าไป ในภาคกลางคือ *Bithynia (Digoniostoma) siamensis* ภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ *B. siamensis goniomphalos* ภาคเหนือคือ *B. funiculata* หลังจากหอยกินไข่ ที่มีตัวอ่อน

6. ระบาดวิทยา

อัตราความชุกของผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ในประเทศไทยพบมากที่สุดในพื้นที่ภาคเหนือประมาณ 19.3% รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบประมาณ 15 % และในภาคกลางพบน้อยที่สุดประมาณ 3.8% แต่ไม่พบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในภาคใต้ (Jongsuksantigul, 2003) ต่อมาในปี พ.ศ. 2535 ได้มีการศึกษาอัตราการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้โดยการถ่ายพยาธิผู้ที่ตรวจพบไข่พยาธิขนาดเล็กด้วยยา praziquantel แล้วเอาตัวเต็มวัยมาจำแนกชนิด พบว่าเป็นพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในภาคเหนือเพียง 11.6 % แต่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือสูงถึง 92.2 % ความหนาแน่นของพยาธิใบไม้ตับในคนเพิ่มสูงขึ้นตามอายุที่มากขึ้น เนื่องจากการติดเชื้อสะสมประมาณกันว่ามีคนติดพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ถึง 9 ล้านคน ตามรายงานการสำรวจข้างต้นพยาธิใบไม้ตับยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีการระบาดมากที่สุด ส่วน incidence of infection พบสูงในเด็กอายุต่ำกว่า 10 ปี ปัจจัยสำคัญที่ทำให้คนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือมีอัตราความชุกของพยาธิใบไม้ตับสูงคือการชอบรับประทานปลาดิบ หรือสุกๆดิบๆ เช่น ก้อยปลา ลาบปลา ปลาต้ม จ่อมปลาน้อย หม่าปลา ปลาชิวสตรับประทานกับส้มตำ เป็นต้น พยาธิชนิดนี้นอกจากพบในประชากรที่บริโภคอาหารไม่ถูกสุขอนามัยแล้ว ยังพบในประชากรที่เป็นเกษตรกร ถึงแม้จะมีการรณรงค์สร้างส้วมแต่ชาวบ้านยังต้องออกไปทำการเกษตร ซึ่งอยู่ห่างไกลหมู่บ้าน จึงยังมีการถ่ายอุจจาระตามป่า ตามทุ่งนา นอกจากนี้สุนัขและแมวที่เป็นรังเก็บโรค (reservoir host) ยังเป็นตัวแพร่เชื้อลงสู่แหล่งน้ำ (สมาน เทศนา, 2544)