

ชื่อเรื่อง

อัตลักษณ์ทางอนุชีววิทยา และการกระจายเชิง
ภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ในลุ่ม
น้ำปิงตอนบน

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์
ศาสตราจารย์ ดร.นพ. คม สุคนธสรณ์

บทคัดย่อ

209213

อัตลักษณ์ทางอนุชีววิทยา และการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ในลุ่มน้ำปิงตอนบน แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกศึกษาการระบาดของตัวอ่อนของพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอย และเมตาเซอร์คาเรียในปลา และส่วนที่สองเป็นการศึกษาทางอนุชีววิทยา การศึกษาการระบาดของพยาธิในปลา พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ จำนวน 5 ชนิด แบ่งเป็นพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae 4 ชนิด ได้แก่ *Haplorchis taichui*, *Haplorchoides* sp., *Stellantchasmus falcatus*, *Centrocestus caninus* และพยาธิใบไม้วงศ์ Diplostomatidae 1 ชนิด ได้แก่ *Posthodiplostomum* sp. โดยพยาธิที่พบการระบาดในอัตราที่สูง และพบในทุกจุดเก็บตัวอย่าง คือ *Haplorchoides* sp. และ *H. taichui* ส่วนการศึกษาการระบาดของพยาธิในหอย พบตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ xiphidiocercaria, monostome cercaria, distome cercaria, pleurolophocercous cercaria, parapleurolophocercous cercaria, echinostome cercaria, furcocercous cercaria และ transversotrema cercaria

การศึกษาอัตลักษณ์ทางอนุชีววิทยาเพื่อบ่งบอกคุณลักษณะเฉพาะตัวของพยาธิด้วยเทคนิค Inter-Simple Sequence Repeats, ISSRs โดยใช้ ISSR primer ทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic DNA) ในช่วง 80–3,000 bp และสามารถทำให้เกิด %polymorphic band เท่ากับ 100% เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าพยาธิวงศ์ Heterophyidae มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria โดยที่พยาธิ *H. taichui*, *C. caninus* และ *S. falcatus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ pleurolophocercous cercaria และ *Haplorchoides* sp. มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ parapleurolophocercous cercaria

สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ Internal Transcribed Spacer Subunit 2 (ITS-2) โดยใช้ไพรเมอร์ BD2-R และ 3S-F สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับพยาธิที่ทำการศึกษาทุกชนิด จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิ พบว่าพยาธิในวงศ์ Heterophyidae ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียมี 2 รูปแบบ คือ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COX I ของพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลา 4 ชนิด ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. พร้อมกับเปรียบเทียบกับพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* โดยใช้ไพรเมอร์ Tre-COX R และ Tre-COX F พบว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิจำนวน 3 ชนิด คือ *H. taichui*, *S. falcatus* และ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 400 bps เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำไปหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใน Genbank พบว่า พยาธิ *H. taichui* และ *O. viverrini* เป็นพยาธิชนิดเดียวกันกับพยาธิที่พบใน Genbank ขณะที่พยาธิ *S. falcatus* กลับมีความแตกต่างกันกับพยาธิที่พบใน Genbank

การตรวจสอบชนิดของพยาธิที่สำรวจพบ โดยใช้ specific primer ของพยาธิแต่ละชนิด พบว่า *H. taichui* มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียแบบ parapleurolophocercous cercaria พบในหอย *Tarebia granifera* ขณะที่ *S. falcatus* มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียแบบ parapleurolophocercous cercaria ซึ่งพบในหอย *Melanoides tuberculata* สำหรับ *Haplorchoides* sp. มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียแบบ parapleurolophocercous cercaria พบในหอย *Melanoides tuberculata* ส่วน *C. caninus* มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียแบบ pleurolophocercous cercaria พบในหอย *Tarebia granifera*

การเผยแพร่ข้อมูล พบว่าชาวบ้านมีการตื่นกลัวต่อการติดพยาธิ ในขณะเดียวกันยังไม่ละทิ้งวิถีชีวิต และวัฒนธรรมการบริโภคอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการติดพยาธิ นอกจากนี้ชาวบ้านบางส่วนยังรู้จักการป้องกันและรักษาตัวเอง โดยการตรวจอุจจาระ รวมถึงกินยาถ่ายพยาธิเป็นระยะๆ แต่อย่างไรก็ตามยังมีบางคนที่ยังจัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการติดพยาธิ เพราะไม่มีการป้องกันรักษา ซึ่งการนำเสนอผลการวิจัย และให้ความรู้ผ่านการเผยแพร่ข้อมูลเป็นการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้สู่ชาวบ้าน การมีโอกาสแลกเปลี่ยนความคิดเห็น อภิปรายผลการวิจัยร่วมกัน จึงเป็นการสร้างโอกาส และวิธีการในการแก้ปัญหาที่ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุด

Title Molecular Genotyping and Geographic Distribution of Heterophyid Trematodes in Upper Part of Ping River Basin

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

Abstract

209213

Molecular identities and geographical distribution of heterophyid trematodes (Family Heterophyidae) in upper Ping river basin were investigated. This research is comprised with 2 major sectors, first is epidemiological study of cercarial infection in some freshwater snails and metacercarial infection in fish. While the remaining is molecular identities of heterophyid trematodes found. The result showed that, there were 5 metacercarial species recorded from fish, 4 of these were belonged to those of Heterophyid trematodes; *Haplorchis taichui*, *Haplorchoides* sp., *Stellantchasmus falcatus* and *Centrocestus caninus* whereas 1 remaining species was classified into Family Diplostomatidae; *Posthodiplostomum* sp. *H. taichui* and *Haplorchoides* sp. were recorded as high infection rate and recovered in all sampling sites. For cercarial infection, 8 different cercarial types were recorded; xiphidiocercaria, monostome cercaria, distome cercaria, pleurolophocercous cercaria, parapleurolophocercous cercaria, echinostome cercaria, furcocercous cercaria and transversotrema cercaria respectively.

Molecular identities using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) method showed that different polymorphic DNA patterns were generated with fragment sizes ranging from 80–3000 bp and 100% polymorphism among trematodes found in this study. Phylogenetic relationships analysis demonstrated heterophyid trematodes showed closely relation with pleurolophocercous cercaria and parapleurolophocercous cercaria. *H. taichui*, *C. caninus* and *S. falcatus* were clustered in the same branch with pleurolophocercous cercaria, whereas *Haplorchoides* sp. was in the same with parapleurolophocercous cercaria respectively.

By using 3S–F and BD2–R primers, approximately 485 bp fragments of Internal Transcribed Spacer subunit 2 (ITS–2) were generated in all trematodes studied. Based on

ITS-2 nucleotide sequences, phylogenetic analysis was also conducted and revealed that, *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* and *Haplorchoides* sp. possessed with 2 cercarial types; pleurolophocercous cercaria and parapleurolophocercous cercaria

According to nucleotide sequences of mitochondrial Cytochrome C oxydase subunit 1 (COX I) gene by using Tre-COX F and Tre-COX R primers, 4 heterophyid flukes; *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* and *Haplorchoides* sp. including liver fluke, *O. viverrini* were tested. Only 3 fluke species; *H. taichui*, *S. falcatus* and *O. viverrini* were annealed and amplified with these primers. Approximately 400 bp amplicons were generated and they were then sequenced through commercial biotechnologies service. Phylogenetic relationship was calculated and COX I sequences of related species that available in Genbank were also included. It was found that, *H. taichui* and *O. viverrini* showed maximum identities with Genbank databases, while *S. falcatus* seemed to be different.

Molecular detection of larval heterophyid trematode in freshwater snail by using specific primers designed was resulted that, *H. taichui* showed positive with parapleurolophocercous cercaria collected from *Tarebia granifera* snail. *S. falcatus* yielded positive with parapleurolophocercous cercaria collected from *Melanoides tuberculata* snail, *Haplorchoides* sp. was positive with parapleurolophocercous cercaria from *M. tuberculata* snail whereas *C. caninus* was positive with pleurolophocercous cercaria from *Ta. granifera* snail respectively.

After finished this research, our results were contributed to villagers who inhabited along with/nearby study sites through training program. Socio-economic data was also collected via questionnaire and it was found that, people still realized or be conscious in order of parasitic infection, but they cannot abandon their traditional life being particularly for consuming culture of under/inadequately cooked food that has been recognized as the main cause of parasitic infection. However, some people attempted to protect themselves by always passed stool examination including take vermicide tablets. Whereas some people still living with various risk of infection by without any protection. The contribution of research results to villagers/ communities, participatory-action and interaction are clarified to be appropriate solution of infection diseases which required for the promotion of sustaining development.