



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยเรื่อง

“อัตลักษณ์ทางอณูชีววิทยาและการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของ
พยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ในลุ่มน้ำปิงตอนบน”

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

จัดทำโดย

๑. รองศาสตราจารย์ ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์
๒. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์
๓. ศาสตราจารย์ ดร.นพ. คม สุคนธสรทรัพย์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง อุตลักษณ์ทางอนุชีววิทยา และการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของ พยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ในลุ่มน้ำปึงตอนบน เป็นโครงการที่ได้รับสนับสนุนทุนวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2555 ผ่านสถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้ได้บรรลุ วัตถุประสงค์ และประสบผลสำเร็จ ลุล่วงโดยสมบูรณ์ ผลสำเร็จจากการวิจัยครั้งนี้สามารถเป็น ประโยชน์ในการวางแผนจัดการตรวจสอบ และป้องกันการระบาดของพยาธิได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถเผยแพร่ผลงานนี้ในงานประชุมวิชาการ และตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ ทั้งใน และต่างประเทศต่อไปได้

ขอขอบคุณ หน่วยวิจัยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีในการศึกษาความหลากหลายทาง ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ห้องปฏิบัติการวิจัย ปรสิตวิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และโครงการ ศูนย์วิจัยและบริการจีโนมพืชเศรษฐกิจ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ เครื่องมือในการทำวิจัย

ขอบคุณ รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย รศ.ดร. นริทธิ์ สีตะสุวรรณ และ Prof. Dr. Jong Yil-Chai ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้คำชี้แนะ และช่วยแก้ปัญหาในการทำวิจัยด้วยดีตลอด มา และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณ คุณสุขสรรค์ ชูบุญ คุณวราภรณ์ น้อยไข และคุณอนวัทย์ ผาสี ที่มีส่วนช่วยในการวิจัยในครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

ชื่อเรื่อง

อัตรลักษณ์ทางอณูชีววิทยา และการกระจายเชิง
ภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ในลุ่ม
น้ำปึงตอนบน

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์
ศาสตราจารย์ ดร.นพ. คม สุคนธ์สรรพ์

บทคัดย่อ

อัตรลักษณ์ทางอณูชีววิทยา และการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ในลุ่มน้ำปึงตอนบน แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกศึกษาการระบาดของตัวอ่อนของพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอย และเมตาเซอร์คาเรียในปลา และส่วนที่สองเป็นการศึกษาทางอณูชีววิทยา 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

การศึกษาอัตรลักษณ์ทางอณูชีววิทยาเพื่อบ่งบอกคุณลักษณะเฉพาะตัวของพยาธิด้วยเทคนิค 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 ในขณะที่เดียวกันยังไม่ละทิ้งวิถีชีวิต และวัฒนธรรมการบริโภคอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการติดพยาธิ นอกจากนี้ชาวบ้านบางส่วนยังรู้จักการป้องกันและรักษาตัวเอง โดยการตรวจจุงูจระ รวไปถึงกินยาถ่ายพยาธิเป็นระยะๆ 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

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.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ณ
บทที่ 1 บทนำ และวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา	7
บทที่ 4 ผลการศึกษา	13
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	60
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา	68
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	76
ภาคผนวก ข	79

สารบัญภาพ

	หน้า
1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างปลา และหอยในกลุ่มแม่น้ำปิงตอนบน	14
2 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ <i>Haplorchis taichui</i>	17
3 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ <i>Stellantchasmus falcatus</i>	17
4 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ <i>Haplorchoides</i> sp.	20
5 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ <i>Centrocestus caninus</i>	20
6 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ <i>Posthodiplostomum</i> sp.	22
7 ความชุกกรรมของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจากปลาในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง	23
8 ความชุกของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจากปลาในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง	25
9 ภาพถ่าย และภาพวาดของ xiphidiocercaria	26
10 ภาพถ่าย และภาพวาดของ monostome cercaria	26
11 ภาพถ่าย และภาพวาดของ distome cercaria	27
12 ภาพถ่าย และภาพวาดของ pleurolophocercous cercaria	27
13 ภาพถ่าย และภาพวาดของ parapleurolophocercous cercaria	28
14 ภาพถ่าย และภาพวาดของ echinostome cercaria	28
15 ภาพถ่าย และภาพวาดของ furcocercous cercaria	29
16 ภาพถ่าย และภาพวาดของ transversotrema cercaria	29
17 ความชุกกรรมของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียจากหอยในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง	30
18 ความชุกของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียจากหอยในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง	33
19 แผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลา	34
20 แผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่พบในหอย	35
21 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 811	36
22 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 813	37
23 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 817	37
24 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 820	38
25 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 826	38
26 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 840	39
27 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 845	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
28 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 848	40
29 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 857	40
30 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 890	41
31 Dendrogram ที่ได้จากรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จาก ISSR primer ของพยาธิแต่ละชนิด	42
32 แถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS-2 ของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ BD2-R และ 3s-F	43
33 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของบริเวณ ITS-2 ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี UPGMA	49
34 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS-2 ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี NJ	50
35 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของบริเวณ ITS-2 ของ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย <i>M. tuberculata</i> และ <i>Ta. Granifera</i>	51
36 แถบดีเอ็นเอบริเวณ COX I ของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ Tre_COX R และ Tre_COX F ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 400 bps	51
37 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ บริเวณ COX I gene ของพยาธิที่พบเปรียบเทียบกับพยาธิที่พบใน Genbank	53
38 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ Ht-R1 และ Ht-F1	54
39 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ St-R และ St-F	54
40 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ Hpc-R1 และ Hpc-F1	55
41 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ CC-R และ CC-F1	56
42 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ OV-R1 และ OV-F1	57
43 วิทยาการได้นัดแนะ และเตรียมการเผยแพร่ข้อมูลร่วมกับหัวหน้าชุมชน และชาวบ้าน	58
44 วิทยาการอธิบายสาเหตุการติดพยาธิ พร้อมทั้งวิธีการป้องกันการติดพยาธิ	59
45 วิทยาการอธิบายวิธีการกรอกแบบสอบถาม และแจกแบบสอบถามแก่ชาวบ้าน	59

สารบัญตาราง

	หน้า
1 ตำแหน่ง และพิกัดของแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง	14
2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของแต่ละ primers หลังจากการทำ PCR และตรวจสอบโดย Gel electrophoresis	41

บทที่ 1

บทนำ และวัตถุประสงค์

พยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae เป็นพยาธิที่มีการระบาดในเขตภาคเหนือ ซึ่งมีรายงานการติดพยาธิกลุ่มนี้ในคนอย่างต่อเนื่อง ได้มีการศึกษาการระบาดในคน ปลา และหอย รวมไปถึงถึงสถานศึกษา ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาแบบพื้นฐาน แต่การศึกษาอัตลักษณ์ทางอณูชีววิทยาเพื่อบ่งบอกคุณลักษณะเฉพาะตัวของพยาธิในกลุ่มนี้ยังมีการศึกษาน้อย โดยการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาใหม่ ๆ เช่น ISSR marker, Specific primer และ Phylogenetic relationship จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ Internal Transcribed Spacer Subunit 2 (ITS-2) และ Cytochrome C Oxidase (COX1) เพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของพยาธิ ร่วมกับศึกษาอัตราการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในปลา และหอย และการศึกษาทางสถานศึกษาของพยาธิเพื่อประเมินสถานะการระบาด จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาการระบาดเชิงพื้นที่ (spatial distribution) โดยการจัดทำแผนที่การระบาดของพยาธิ ซึ่งในปัจจุบันถือว่ามีความจำเป็นต่อการวางแผนการควบคุมการระบาดของพยาธิในคน รวมทั้งการระบาดในโฮสต์กึ่งกลาง เช่น ปลา และหอย โดยกำหนดพื้นที่ศึกษาในกลุ่มน้ำปิงตอนบน เนื่องจากแม่น้ำปิงเป็นแม่น้ำสายหลักที่มีความสำคัญต่อการทำเกษตร และการทำประมง แม่น้ำปิงมีแหล่งต้นน้ำอยู่ในอำเภอเชียงดาว และอำเภอเวียงแหง ไหลผ่านเขตอำเภอเมือง และไหลลงสู่ทะเลสาบดอยเต่า อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ ครอบคลุมพื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูนในพื้นที่อำเภอป่าซาง และจังหวัดแม่ฮ่องสอนในพื้นที่อำเภอปายบางส่วน ซึ่งมีแม่น้ำสาขาที่สำคัญ คือ แม่น้ำแจ่ม แม่น้ำแม่งัด แม่น้ำกวง และแม่น้ำลี ทำให้เกิดเป็นลุ่มน้ำที่สำคัญต่อประชาชนในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดใกล้เคียง ประชาชนที่อาศัยอยู่รอบๆ แม่น้ำส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม และบางส่วนประกอบอาชีพประมง ลักษณะทั่วไปของแม่น้ำปิง และลำน้ำสาขาจะมีฝายท่อน้ำขนาดเล็กกั้นอยู่เป็นระยะ ๆ ทำให้มีน้ำขังอยู่ตลอดเวลาช่วยให้เกษตรกรสามารถทำการเกษตรได้ตลอดทั้งปี ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของปลา และหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิหลายชนิด โดยเฉพาะพยาธิใบวงศ์ Heterophyidae ซึ่งพยาธิใบนี้ เป็นพยาธิกลุ่มหลักที่ระบาดในเขตภาคเหนือตอนบน ทั้งนี้การระบาดของพยาธิมีสาเหตุจากประชาชนนิยมรับประทานอาหารที่ปรุงจากปลาดิบ เช่น ส้าปลา ลาบปลาดิบ อาหารเหล่านี้เป็นอาหารที่นิยมรับประทานมาอย่างช้านาน หากจะเปลี่ยนพฤติกรรมมารับประทานนั้นทำได้ยาก ประกอบกับปลาที่มีตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อกันนั้นสามารถหา

รับประทานได้ง่าย ทำให้มีรายงานการติดพยาธิกลุ่มนี้ในประชาชนอย่างต่อเนื่อง การควบคุมการติดพยาธิในคนนั้นทำได้ยาก ในการแก้ปัญหาการระบาดของพยาธินั้นจะต้องมีการแก้ปัญหาอย่างบูรณาการ โดยการนำความรู้ด้านต่างๆ มาใช้ควบคู่กันไปจึงจะสามารถควบคุมการระบาดของพยาธิได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการบูรณาการความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ ภูมิศาสตร์ และสังคมศาสตร์มาควบคุมการระบาดของพยาธิ โดยนำข้อมูลจากการศึกษาอัตลักษณ์ทางอนุชีววิทยา และการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของพยาธิ มาใช้ในการวางแผนรณรงค์ป้องกันการติดพยาธิในคน รวมทั้งเผยแพร่ข้อมูลแก่ชุมชนเพื่อเป็นประโยชน์ต่อชาวบ้านที่จะได้รับความรู้ อันตรายที่อาจเกิดจากการบริโภคปลาดิบ การรับประทานอาหารให้ถูกสุขลักษณะ รวมทั้งยังเป็นการช่วยป้องกันการระบาดของพยาธิไม่ให้ติดต่อมาสู่คน และสัตว์เลี้ยงได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาความชุกของพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ในปลา และหอย ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางจากลุ่มแม่น้ำปิงตอนบน จังหวัดเชียงใหม่
2. ศึกษาสายพหิมพีดีเอ็นเอของพยาธิที่สำรวจพบด้วยเทคนิค inter-simple sequence repeats, ISSR) และสร้างไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primers) ที่เจาะจงต่อพยาธิแต่ละชนิด
3. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS-2 และ COX1 gene ของพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae
4. ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationships) ของพยาธิที่สำรวจพบจาก ISSR markers และลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS-2 และ COX1 gene
5. สร้างแผนที่การระบาดของพยาธิ โดยใช้เทคโนโลยีระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (Geographic information system, GIS)

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

แม่น้ำปิงมีต้นกำเนิดจากเทือกเขาผีปันน้ำในพื้นที่เขตอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ไหลลงมาทางทิศใต้ผ่านหุบเขาเข้าสู่เขตอำเภอแม่แตง มีแม่น้ำแม่จัดไหลมาบรรจบทางฝั่งซ้าย และน้ำแม่แตงไหลมาบรรจบทางฝั่งขวา เข้าสู่พื้นที่ราบลุ่มจังหวัดเชียงใหม่ และมีน้ำแม่กวง ซึ่งเป็นสาขาของแม่น้ำปิงไหลมาบรรจบทางฝั่งซ้าย บริเวณพื้นที่ อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน จากนั้นแม่น้ำปิงจะไหลไปทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ โดยมีแม่น้ำลี้ ซึ่งไหลผ่านจากอำเภอลี้ มาบรรจบกับแม่น้ำปิงที่อำเภอจอมทองทางฝั่งซ้าย และจากอำเภอจอมทอง แม่น้ำปิงจะไหลลงไปทางใต้ มีแม่น้ำแม่แจ่มไหลมาบรรจบทางฝั่งขวา ที่อำเภอฮอด ก่อนจะไหลเข้าสู่อ่างเก็บน้ำดอยเต่าที่อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ มีพื้นที่ลุ่มน้ำประมาณ 22,400 ตารางกิโลเมตร (กวิ, 2547) ประชาชนที่อาศัยอยู่ในบริเวณโดยรอบส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทำการเกษตร เช่น ปลูกข้าว ถั่วเหลือง ถั่วกระถิน กล้วย กระทือ หอมแดง ฯลฯ นอกจากนี้ชาวบ้านส่วนหนึ่งก็ยังคงประกอบอาชีพทำการประมง

อัตราการติดเชื้อหนอนพยาธิโดยเฉพาะพยาธิใบไม้ยังในประเทศไทยยังคงอยู่ในระดับสูง โดยเฉพาะสังคมเกษตรกรรมในที่ราบลุ่มแอ่งกระทะเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเนื่องจากประชากรไม่มีความรู้ทางด้านสาธารณสุขที่เพียงพอ และการนิยมบริโภคอาหารพื้นเมืองที่ปรุงไม่สุก โดยเฉพาะอาหารที่ปรุงจากเนื้อปลา (Radomyos *et al.*, 1998) ซึ่งมีตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ที่สำคัญหลายชนิด เช่น พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ที่มีการระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Sithithaworn *et al.*, 1991) และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก *Haplorchis taichui* ซึ่งมีรายงานการระบาดของพยาธิชนิดนี้ในภาคเหนือ และพบตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิชนิดนี้ในปลาสร้อยขาว (*Henicorhynchus siamensis*) อย่างหนาแน่น (Wongsawad *et al.*, 2000 ; Kumchoo *et al.*, 2005) เนื่องจากที่ราบลุ่มแอ่งกระทะเป็นพื้นที่รับน้ำจากแนวเขารอบด้าน เกิดการสะสมของน้ำทิ้งจากระบบการเกษตร และบ้านเรือนที่อยู่อาศัย ส่งผลให้มีการระบาดของพยาธิใบไม้ ทั้งในระยะ metacercaria ในปลาเกล็ดขาว ระยะ cercaria ในหอยและระยะไข่ของตัวเต็มวัยที่พบในอุจจาระคน ยังคงมีรายงานอย่างต่อเนื่อง จนถึงปัจจุบัน จากรายงานการสำรวจปลาเกล็ดขาวในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนพบระยะเมตาเซอร์คาเรียของ *H. taichui* ปนกับ *Haplorchoides* sp. ซึ่งต้องมีความชำนาญมากในการจำแนกจึงจะแยกชนิดได้ (Namue *et al.*,

1998) การสำรวจการติดพยาธิในสัตว์มีกระดูกสันหลังจากลำน้ำแม่สา จังหวัดเชียงใหม่ ก็พบพยาธิในวงศ์ Heterophyidae ถึง 4 ชนิด (Wongsawad *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Kumchoo *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิ *H. taichui* ระยะเมตาเซอร์คาเรียจากปลาเกล็ดขาว 15 ชนิดในอำเภอจอมทอง และอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีค่าความชุกของการติดพยาธิถึง 91.4% และ 83.8% ความหนาแน่นของการติดพยาธิโดยเฉลี่ย 249.9 และ 107.4 ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้ายังพบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. ร่วมอยู่ด้วย ต่อมาในปีเดียวกันนี้ Boonchot and Wongsawad (2005) ทำการสำรวจหนอนพยาธิในปลาเกล็ดขาว 5 ชนิด พบพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ถึง 3 ชนิด คือ *H. taichui*, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. การศึกษาค้นคว้าพบว่าฤดูหนาวมีการติดพยาธิมากที่สุด รองลงมาคือฤดูร้อน และฤดูฝน โดยมีค่าความชุกรวมเท่ากับ 85.45% 76.13% และ 76.0% ตามลำดับ ส่วน Saenphet *et al.* (2006) ศึกษาพยาธิสภาพของลำไส้หนูแรทที่ติดพยาธิ *C. caninus* การศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ในภาคเหนือมีอัตราการระบาดของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae สูงมาก นอกจากการระบาดในโฮสต์กึ่งกลางแล้วยังมีรายงานว่าระยะไข่ของพยาธิในวงศ์นี้หลายชนิดที่พบจากอุจจาระคนมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (Sukontason *et al.*, 1999) ซึ่งการตรวจวินิจฉัยต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะ และอาจผิดพลาดเนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันมากทางสัณฐานวิทยา จากรายงานของ Chuboon and Wongsawad (2003) พบไข่พยาธิใบไม้ *Haplorchis taichui* เพียงชนิดเดียวจากอุจจาระคนในตำบล สบตึ๊ยะ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ และ Kumchoo *et al.* (2003) พบการระบาดของระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลาเกล็ดขาวจำนวนมาก จากรายงานทั้งสองนี้ไม่พบการแพร่ระบาดของพยาธิใบไม้ตับทั้งระยะติดต่อในปลาเกล็ดขาวและระยะไข่ในคน

ปัจจุบันนอกจากมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการวิจัยทางด้านปรสิตวิทยามากขึ้นโดยเฉพาะพยาธิใบไม้ขนาดเล็กในลำไส้ในวงศ์ Heterophyidae ซึ่งพบมีการระบาดมากในเขตภาคเหนือของประเทศไทย เช่น การศึกษาคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมของพยาธิใบไม้หลายชนิดจากรยะไข่ เมตาเซอร์คาเรีย และ ตัวเต็มวัยโดยเทคนิค HAT-RAPD (Wongsawad *et al.*, 2006) การตรวจหาตัวติดตามพยาธิใบไม้ *S. falcatus* (Sripalwit *et al.*, 2003) การตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ *H. taichui* ด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา (Wongsawad *et al.*, 2009) การตรวจสอบพยาธิใบไม้ตับโดยการพัฒนา mitochondrial-based multiplex PCR สำหรับตรวจสอบและจำแนกพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และ *Clonorchis sinensis* พบว่า *O. viverrini* เกิด PCR product ขนาด 1,357 bp ส่วน *Clonorchis sinensis* เกิด PCR product

ขนาด 612 bp (Le *et al.*, 2006) สำหรับเทคนิค Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) จากรายงานการศึกษาพบว่าเทคนิค ISSR Markers ถูกนำมาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความจำเพาะมากกว่าเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เพราะว่าคุณสมบัติของ primers ที่ใช้ใน ISSR (16–20 bp) มีความยาวมากกว่า RAPD (10 bp) อีกประการหนึ่งคือ ISSR primers ออกแบบมาจากบริเวณที่เป็น repeated sequences ที่มีอยู่อย่างหลากหลายใน genomes เช่น (AGTG)₄ หรือ (AG)₈ ซึ่งบริเวณนี้จะมี ความไวต่อการผันแปร หรือกลายพันธุ์มากกว่า coding regions (Wolfe *et al.*, 1998)

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ Ribosomal DNA (rDNA) cluster เป็นโครงสร้างที่ประกอบอยู่ในไรโบโซมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากมีลำดับเบสที่ซ้ำกันจำนวนมาก สลับกับบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ที่เรียกว่า Internal Transcribed Spacer (ITS) gene (Hillis and Dixon, 1991) ลำดับเบสจากบริเวณ ITS 2 ถือเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะในระดับชนิดของสิ่งมีชีวิต ในขณะที่ ITS 1 จะมีความจำเพาะและความคงตัวในการเป็น conserved region น้อยกว่า ITS 2 (Luton *et al.*, 1992) ซึ่ง Sequences ของบริเวณดังกล่าวนี้ มักจะถูกอนุมานว่ามีความเหมือนกันในประชากรกลุ่มเดียวกัน ตามหลักการมีวิวัฒนาการร่วมกัน (concerting evolution) ของสิ่งมีชีวิต (Dover, 1982; Hillis and Davis, 1988) ส่วน Cytochrome C Oxidase I (COX I) เป็น gene ที่มีอยู่ใน Mitochondrial genome ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมระบบการหายใจ และ metabolism กล่าวโดยสรุปแล้ว COX I มีความสำคัญในการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับ ITS 2 โดยมีความจำเพาะและความคงตัวในการเป็น conserved region และมีความเหมือนกันในประชากรกลุ่มเดียวกัน ตามหลักการมีวิวัฒนาการร่วมกัน (concerting evolution) ของสิ่งมีชีวิตและที่สำคัญมีความจำเพาะและคงตัวทางวิวัฒนาการตามกฎ Maternal inheritance (Le *et al.*, 2002)

เทคโนโลยีอีกรูปแบบหนึ่งคือ การนำระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (geographic information system, GIS) และ remote sensing (RS)) มาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นเครื่องมือในการศึกษาระบาดวิทยา ซึ่งเป็นระบบโปรแกรมอัตโนมัติ ทำงานโดยคอมพิวเตอร์เป็นหลัก สามารถจัดการ แสดงผล วิเคราะห์ ข้อมูลเชิงภูมิศาสตร์ ที่มีจำนวนมาก มีความซับซ้อนได้ดี โดยมี 4 ขั้นตอนคือ เก็บข้อมูล วิเคราะห์ผล ค้นหาพิกัดเป้าหมาย และ แสดงผลในแผนที่ที่สร้างขึ้น (Chaikoolvatana *et al.*, 2008) นับตั้งแต่ Cross *et al.* (1984) ได้ใช้ข้อมูลจากดาวเทียม LandsatTM ในการทำนายอุบัติการณ์ของพยาธิใบไม้เลือด (schistosomes) ในประเทศฟิลิปปินส์ และประเทศแถบคาริบเบียน ซึ่งต่อมาทำให้ GIS/RS เป็นที่นิยมในการวิจัย และผลการวิจัย

ยืนยันว่า GIS/RS สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์เกี่ยวกับระบาดวิทยา และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องในระดับมหัพภาค เนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคโดยรวม มักเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะบรรยากาศ (Brooker *et al.*, 2006) ในประเทศไทยระยะแรก GIS/RS ถูกนำมาใช้ในการควบคุมและจัดการการระบาดของไข้เลือดออก ต่อมา มีการศึกษาการใช้ GIS เพื่อประเมินพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของเชื้อไข้หวัดนก (avian influenza) ในจังหวัดขอนแก่น (Mongkolsawat and Kamchai, 2008) ใช้ตรวจสอบการกระจายตัวของพาหะไข้เลือดออกในจังหวัดอุบลราชธานี (Chaikoolvatana *et al.*, 2008) การประยุกต์ใช้ GIS ในการทำนายพื้นที่ระบาดของเชื้อมาลาเรีย ในประเทศอิหร่าน (Razheghi *et al.*, 2008) ศึกษาการเกิดโรค Shigellosis ในประเทศเวียดนาม ซึ่งจะเห็นได้ว่าการนำระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ หรือ GIS มาใช้เพื่อศึกษาการระบาดของโรคหลายชนิด แต่สำหรับการระบาดของพยาธิยังไม่มีการศึกษามากนัก การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (geographic information system, GIS) มาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นเครื่องมือในการศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ร่วมกับเทคโนโลยีด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) ในลุ่มน้ำปิงตอนบน ซึ่งเป็นแอ่งที่ราบขนาดใหญ่แห่งหนึ่งของภาคเหนือที่มีความสำคัญทางการเกษตร เช่นการปลูกข้าว ลำไย และพืชไร่หลายชนิด มีพื้นที่ครอบคลุมตลอดความยาวของจังหวัดเชียงใหม่จากทิศเหนือจรดทิศใต้ และบางพื้นที่ของจังหวัดลำพูน ปัจจุบันการเกษตรสมัยใหม่ส่วนใหญ่เป็นแบบทุนนิยมเชิงเดี่ยวของเสียที่เกิดจากการเกษตร และบ้านเรือนที่อยู่อาศัยถูกชะล้าง และสะสมมายาวนาน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนและระบาดของเชื้อปรสิตและหนอนพยาธิ นอกจากนั้นแล้ว ยังได้ศึกษาการระบาดวิทยาการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ ทั้งในกลุ่มปลาเกล็ดขาว และในหอย เพื่อประเมินสภาวะการระบาด ร่วมกับวิธีตรวจสอบด้วยสัณฐานวิทยา อณูชีววิทยา และทำแผนที่การระบาดด้วยเทคโนโลยีทางภูมิศาสตร์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีรายละเอียดครบถ้วนสมบูรณ์ เป็นประโยชน์ต่อการรักษาและป้องกันกำจัดพยาธิที่ถูกต้อง รวมทั้งเป็นเครื่องมือประกอบการวางแผนจัดการที่มีประสิทธิภาพทั้งในปัจจุบัน และอนาคต งานวิจัยนี้สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับสากล และเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการต่อไปได้

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร และวาดรูป
 - 1.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus System Compound microscope : Model BHA) พร้อมอุปกรณ์ถ่ายรูป อุปกรณ์วาดรูป (Drawing tube) รวมทั้ง ocular และ stage micrometer
 - 1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (stereo microscope : Olympus System, Model XTR)
 - 1.3 กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
 - 1.4 แผ่นความร้อนสำหรับวางสไลด์ (slide warmer)
 - 1.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ว : Petri-dish, beaker, dropper, Stender-dish, staining jar
 - 1.6 เครื่องมืออื่นๆ เช่น ถังมือ เข็มเขี่ย หน้ากาก ฟุ้งกัน ถังพลาสติก กระจกเลเบล กระจก ชำระ ปากกา ฯลฯ
2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยด้านอณูชีววิทยา
 - 2.1 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (BIO-RAD : My Cycler™ Thermal Cycler)
 - 2.2 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
 - 2.3 โกร่งบดตัวอย่าง
 - 2.4 หม้อนิ่งความดันไอ (autoclave)
 - 2.5 เครื่องทำความเย็น (ตู้เย็น 4 °C และตู้แช่ -20 °C)
 - 2.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath : Julabo Model Eco TemTW20)
 - 2.7 เครื่องผสมเขย่า (vortex mixer) ยี่ห้อ Seoulin รุ่น MyLab Combispin SLFVL-2400
 - 2.8 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด 3 ตำแหน่ง (OHAUS : Adventurer™)
 - 2.9 เต้าไมโครเวฟ
 - 2.10 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ แบบแวนอน (BIO-RAD)
 - 2.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) บริษัท BIO-RAD
 - 2.12 Adjustable automatic pipettes
 - 2.13 Eppendorf tube
 - 2.14 Tip ขนาดต่างๆ

- 2.15 PCR tube
- 2.16 เครื่องถ่ายภาพจุล (Kodak Digital Science ID Image Analysis System with a DC 100 camera)
- 2.17 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ กระจกตวง ขวดรูปชมพู่ ฯลฯ
- 3. วัสดุอื่น ๆ เช่น ถังมือ คีมคีบ ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร พลาสติกใสอย่างบาง ถังพลาสติก ถาดพลาสติก กระดาษ ฯลฯ

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 1. สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร
 - 1.1 Ethyl alcohol 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85% และ 95%
 - 1.2 Formalin 10%
 - 1.3 Butyl alcohol
 - 1.4 Xylene
 - 1.5 Permount
 - 1.6 สีย้อมชนิดต่างๆ (Borax Carmine และ Haematoxyline)
 - 1.7 NaCl
- 2. สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านอณูชีววิทยา
 - 2.1 Agarose (Vivantis, Malaysia)
 - 2.2 Deionized H₂O
 - 2.3 GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia)
 - 2.4 Ethidium Bromide
 - 2.5 Ethyl alcohol
 - 2.6 Isopropanol
 - 2.7 Liquid nitrogen
 - 2.8 Loading dye
 - 2.9 Magnesium chloride
 - 2.10 Arbitrary primers (Operon Technology, USA)
 - 2.11 *Taq* polymerase (Vivantis, Malaysia)
 - 2.12 TBE buffer

วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาทางด้านระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (GIS)

1. GPS, Garmin etex venture
2. คอมพิวเตอร์
3. ArcGis Desktop ver. 9.3 software

วิธีการศึกษา

1. สำรวจจุดเก็บตัวอย่าง

ลงพื้นที่สำรวจจุดเก็บตัวอย่างเก็บข้อมูลเบื้องต้น และกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง ติดต่อประสานงานกับชาวบ้านในพื้นที่ในลุ่มแม่น้ำปิงตอนบน เพื่อขอความร่วมมือในการทำวิจัย เช่น สอบถ้ำแหล่งจับปลา และหอย เพื่อประโยชน์ในการเก็บตัวอย่างไฮสท์กึ่งกลาง

2. การศึกษาทางด้านการระบาด และความหลากหลายของพยาธิในหอยและปลา

2.1 เก็บตัวอย่างหอยในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งวัดพิกัดจุดเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบการระบาดของพยาธิโดยหุตัวอย่างหอยให้แตก ใช้เข็มเย็บฉีกเนื้อหอยให้แยกออกจากกันเพื่อให้ตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียหลุดออกมา นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo จากนั้นนับจำนวน และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความชุก (%prevalence) และค่าความหนาแน่น (intensity) ของพยาธิที่พบ

2.2 เก็บตัวอย่างปลาในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งวัดพิกัดจุดเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบการระบาดของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย โดยนำปลาที่ได้แต่ละตัวมาป้อนให้ละเอียด รวมกับสารละลาย pepsin 1% แล้วนำไป incubate ใน water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วย sieve mesh ขนาดต่างๆ เพื่อแยกเอากากและเศษของเนื้อปลาที่ย่อยไม่หมดออก ล้างด้วยสารละลาย NaCl 0.85 % จนใสแล้ว นำไปตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo จากนั้นนับจำนวนเมตาเซอร์คาเรีย และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความชุก (%prevalence) และค่าความหนาแน่น (intensity) ของพยาธิที่พบ

3. การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาของพยาธิ

นำตัวอย่างพยาธิที่สำรวจพบในหอย และปลา มาทำ permanent slides เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา โดยคงสภาพด้วยฟอร์มอลิน 5% ย้อมสีด้วย Haematoxylene / Borax carmine ตี้น้ำออกโดยใช้ grading alcohols ทำให้ใสโดย xylene แล้ว mount ด้วย permount จากนั้นนำ permanent slide ที่ได้มาถ่ายรูป วาดภาพ และวัดขนาด เพื่อประกอบการการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน

4. การศึกษาทางอณูชีววิทยา

4.1 นำตัวอย่างพยาธิที่รวบรวมไว้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) เพื่อเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการทำ PCR ดีเอ็นเอที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาไม่ให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ

4.2 ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิที่สำรวจพบด้วยเทคนิค inter-simple sequence repeats, (ISSR) โดยใช้ ISSR primers โดยการนำดีเอ็นเอของพยาธิพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ที่สำรวจพบมาเพิ่มปริมาณโดยกระบวนการ PCR ร่วมกับ ISSR primers จำนวน 10 primers โดยใช้ My Cycler^R Thermocycler (Bio-Rad) ซึ่งมีองค์ประกอบ และเงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

(1) ในปฏิกิริยา PCR แต่ละครั้งจะมีปริมาตรของสารละลายรวมทั้งหมด $20\ \mu\text{l}$ โดยมีองค์ประกอบดังนี้

Buffer	2.0 μl
MgCl ₂	0.6 μl
dNTP	0.4 μl
Primer	1.0 μl
DNA template	1.0 μl
Taq polymerase	0.3 μl
dH ₂ O	14.7 μl

(2) เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้ (ภาพ 1)

Initial denaturation	94 $^{\circ}\text{C}$ 2 นาที
Denatulation	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 วินาที
Primer anedding	48 $^{\circ}\text{C}$ 30 วินาที
Extention	72 $^{\circ}\text{C}$ 45 นาที
จำนวน 35 รอบ	
Final extention	72 $^{\circ}\text{C}$ 7 นาที

จากนั้น นำ PCR products ที่ได้มาทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.4% agarose ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 35 นาที จากนั้นนำ gel ที่ได้ ย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นเวลา 10 นาที แล้ว destain ด้วยน้ำกลั่นอีก 10 นาที และตรวจสอบ gel ด้วย UV- transilluminator พร้อมบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล Kodak

Gel LOGIC 100 และนำแถบ DNA ที่ได้จาก primer ทั้งหมดมานับจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้น แล้วนำไปแทนค่าข้อมูลให้เป็นระบบตัวเลขมาตรฐาน (0,1) เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม Clustal w

4.3 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS-2 และ COX1 gene ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae โดยการนำดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ที่สำรวจพบมาเพิ่มปริมาณโดยกระบวนการ PCR ร่วมกับการใช้ ITS-2 และ COX1 primer โดยมีองค์ประกอบ และเงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

(1) ในปฏิกิริยา PCR แต่ละครั้งจะมีปริมาตรของสารละลายรวมทั้งหมด 20 μ l โดยมีองค์ประกอบดังนี้

Buffer	2.0 μ l
MgCl ₂	0.6 μ l
dNTP	0.4 μ l
Primer	1.0 μ l
DNA template	1.0 μ l
<i>Taq</i> polymerase	0.3 μ l
dH ₂ O	14.7 μ l

(2) เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้ (ภาพ 1)

Initial denaturation	94 °C	2 นาที
Denatulation	94 °C	30 วินาที
Primer annealing	65 °C	30 วินาที
Extention	72 °C	45 นาที
จำนวน 35 รอบ		
Final extention	72 °C	7 นาที

จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ ITS-2 และ COX I gene แล้วแยกแถบดีเอ็นเอออกมา ทำให้บริสุทธิ์ (Eluted and Purified) และนำ PCR product ที่ได้ นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationships) โดยใช้โปรแกรม Clustal w

4.4 การตรวจสอบชนิดของพยาธิที่สำรวจพบด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primers) นำ specific primers ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ที่ได้ออกแบบจาก

กระบวนการ HAT-RAPD PCR มาตรวจสอบการติดพยาธิในปลา และหอยซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae

5. การศึกษาการระบาดเชิงพื้นที่โดยใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์

นำข้อมูลค่าความชุกของพยาธิทั้งในหอย และปลามาจัดทำแผนที่การระบาดโดยใช้โปรแกรม ArcGIS Desktop version 9.3 ของบริษัท ESRI, CO.,Ltd และวิเคราะห์แนวโน้มการระบาดของพยาธิในพื้นที่สำรวจ

6. เผยแพร่ข้อมูลการวิจัยที่ได้สู่ชุมชน

รวบรวมข้อมูลการระบาดของพยาธิในพื้นที่ลุ่มน้ำปึงตอนบน เผยแพร่ข้อมูลสู่ชุมชนในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิอย่างรุนแรง โดยการบรรยายให้ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพยาธิชนิดต่างๆ เช่น การก่อให้เกิดโรค การรักษา และการป้องกัน พร้อมทั้งแจกแบบสอบถามเพื่อศึกษาบริบทชุมชน และพฤติกรรมต่างๆ ของชาวบ้าน

7. สรุปผลและวิเคราะห์ผลการวิจัย

ตาราง 1 ตำแหน่ง และพิกัดของแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

จุดเก็บตัวอย่าง	ตำแหน่ง	พิกัด
1	แม่น้ำปิง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่	N 19°17'05.8" E 098°58'20.9"
2	แม่น้ำแม่จัด อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่	N 19°04'23.7" E 098°51'28.9"
3	แม่น้ำแม่แตง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่	N 19°08'45.0" E 099°02'13.8"
4	แม่น้ำปิง อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่	N 18°54'07.4" E 098°58'36.7"
5	แม่น้ำแม่กวง อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน	N 18°32'59.1" E 098°56'33.0"
6	แม่น้ำลี้ อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน	N 18°19'45.5" E 098°48'38.0"
7	แม่น้ำปิง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่	N 18°24'21.1" E 098°42'07.1"
8	แม่น้ำแม่แจ่ม อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่	N 18°12'7.40" E 098°36'52.23"
9	อ่างเก็บน้ำดอยเต่า อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่	N 17°57'18.32" E 098°39'18.09"
10	เขื่อนภูมิพล อำเภอสามเงา จังหวัดตาก	N 18°24'21.7" E 098°42'06.7"

4.2 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ที่พบแต่ละชนิด

การระบาดของพยาธิในปลาแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ จำนวน 5 ชนิด แบ่งเป็นพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae 4 ชนิด ได้แก่ *Haplorchis taichui*, *Haplorchoides* sp., *Stellantchasmus falcatus*, *Centrocestus caninus*. และพยาธิใบไม้วงศ์ Diplostomatidae 1 ชนิด ได้แก่ *Posthodiplostomum* sp. โดยรายละเอียดของพยาธิที่พบแต่ละชนิดมีดังนี้

Haplorchis taichui (Nishigori) Witenberg, 1930 (ภาพ 2)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Heterophyidae

Genus *Haplorchis*

ลักษณะรูปร่าง

เมตาเซอร์คาเรีย มีลักษณะของ cyst กลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.13–0.18 มิลลิเมตร cyst wall มีผนัง 2 ชั้น ภายใน ภายใน cyst พบตัวอ่อนที่ขดตัว และมีการเคลื่อนที่ไปมา ตลอดเวลา มองเห็น spine ขนาดเล็กปกคลุมลำตัวชัดเจน สามารถมองเห็น oral sucker ชัดเจน มองเห็น excretory bladder ที่ภายในเต็มไปด้วยของเสียสีดำ (dark granules) ตัวเต็มวัยมี ลักษณะลำตัวขนาดเล็ก รูปร่าง pyriform หรือ pear-shape มีความกว้าง 0.18 – 0.25 มิลลิเมตร ยาว 0.63 – 0.70 มิลลิเมตร ลำตัวปกคลุมด้วย scale-like spine ส่วนของ oral sucker พบเกือบปลายสุดของลำตัวทางด้านหน้า (anterosubterminal) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.03 – 0.06 มิลลิเมตร มี pharynx มีลักษณะค่อนข้างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.01 – 0.06 มิลลิเมตร esophagus มีความยาว 0.02 – 0.05 มิลลิเมตร ส่วนปลายแยกออกเป็น bifurcate caeca ปลายตัน ยาวไปตามด้านข้างของลำตัวจนถึง posterior ของ testis ส่วน ventral sucker ยื่นไปทางด้านข้าง โค้งเป็นวง มี spine จำนวน 13 – 16 อัน เรียงเป็นรูปคล้ายพัด มี testis อัน เดียว กลมใหญ่ ovary กลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.06–0.08 มิลลิเมตร uterus ขดอยู่เต็ม ทาง posterior ของ ovary ภายในไข่มืออยู่จำนวนมาก มีช่องเปิดร่วมกับ ventral sucker เรียกว่า ventrogenital sac ไซพยาธิมีลักษณะกลมรี เรียวหัวท้าย มีขนาดประมาณ 0.01–0.02 x 0.02–0.03 มิลลิเมตร เห็นโหลไม่ค่อยชัด

Stellantchasmus falcatus Onji & Nishino, 1916 (ภาพ 3)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

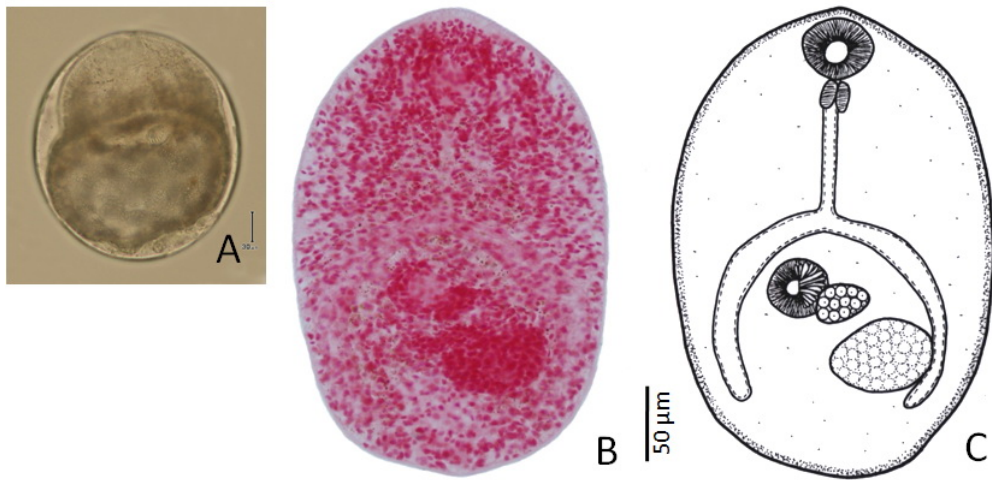
Order Digenea

Family Heterophyidae

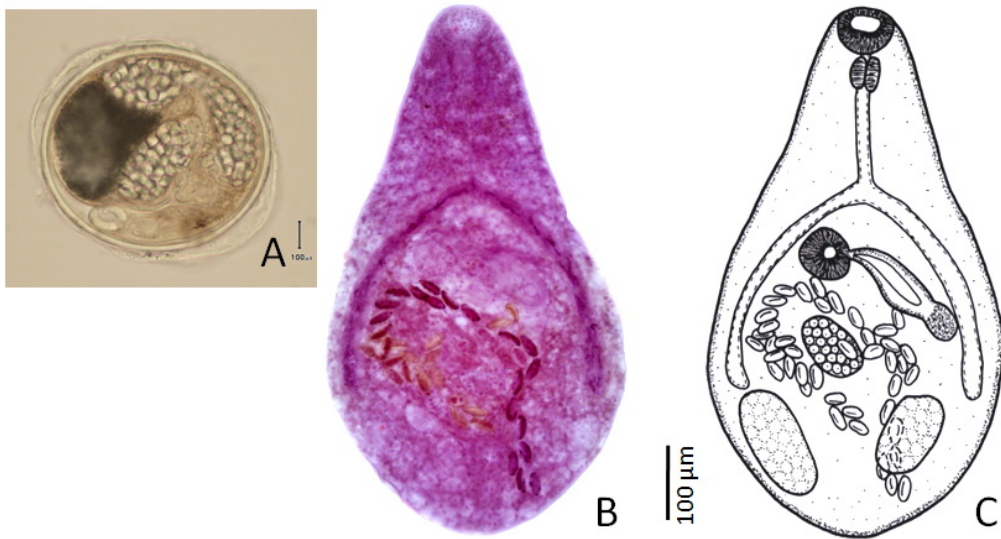
Genus *Stellantchasmus*

ลักษณะรูปร่าง

เมตาเซอร์คาเรียมีขนาดเล็กรูปไข่หรือรี มีความยาว 0.15–0.90 มิลลิเมตร กว้าง 0.12–0.15 มิลลิเมตร มีผนังหนาสามารถมองเห็นตัวอ่อนของพยาธิตัวภายในมีการเคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว มีของเสียที่มีลักษณะเป็นเม็ดอยู่ภายใน excretory bladder ตัวเต็มวัยมีลักษณะลำตัวขนาดเล็ก รูปร่าง pyriform หรือ pear-shaped มีความยาว 0.16–0.19 มิลลิเมตร กว้าง 0.11–0.12 มิลลิเมตร ลำตัวปกคลุมด้วย scale-like spine ส่วนของ oral sucker พบเกือบปลายสุดของลำตัวทางด้านหน้า (anterosubterminal) มีขนาดกว้าง 0.27–0.35 มิลลิเมตร ยาว 0.01–0.03 มิลลิเมตร มี prepharynx ยาว 0.01–0.02 มิลลิเมตร ลักษณะค่อนข้างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.01–0.03 มิลลิเมตร esophagus มีความยาว 0.028–0.035 มิลลิเมตร ส่วนปลายแยกออกเป็น bifurcate caeca ปลายตัน ยาวไปตามด้านข้างของลำตัวจนถึง anterior ของ testis ระบบสืบพันธุ์มี testes 2 อัน สมมาตรกันอยู่เกือบท้ายสุดของลำตัว มีรูปร่างค่อนข้างกลม วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 0.03–0.05 มิลลิเมตร พบว่าส่วนของ seminal vesicle ท่อส่งน้ำเชื้อ (ejaculatory duct) ที่อยู่ในส่วนเดียวกัน เป็นกระเปาะยื่นไปเปิดรวมกับ ventral sucker เรียกว่า expulsor ที่มีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อชัดเจนไปเปิดออกที่ genital pore พบ ovary ตั้งอยู่เกือบกลางของลำตัวทางส่วนท้ายของลำตัว มีรูปร่างค่อนข้างกลม วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 0.02–0.07 มิลลิเมตร



ภาพ 2 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *Haplorchis taichui*
 A. ภาพถ่ายระยะเมตาเซอร์คาเรีย B. ภาพถ่าย C. ภาพวาด



ภาพ 3 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *Stellantchasmus falcatus*
 A. ภาพถ่ายระยะเมตาเซอร์คาเรีย B. ภาพถ่าย C. ภาพวาด

Haplorchoides sp. Chen, 1949 (ภาพ 4)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Heterophyidae

Genus *Haplorchoides*

ลักษณะรูปร่าง

เมตาเซอร์คาเรียมีขนาดเล็กรูปไข่หรือรี มีผนังหนาสามารถมองเห็นตัวอ่อนของพยาธิ อยู่ภายในมีการเคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว มีของเสียที่มีลักษณะเป็นเม็ดอยู่ภายใน excretory bladder ตัวเต็มวัยลำตัวรูปร่างขนาดเล็ก แบน บาง มีขนาดยาว 0.85–1.325 มิลลิเมตร กว้าง 0.21–0.36 มิลลิเมตร มี spine ปกคลุมลำตัว oral sucker ตั้งอยู่ปลายสุดทางด้านหน้าของ ลำตัว ระบบทางเดินอาหารมีปาก ผ่านไปยัง prepharynx มีลักษณะเป็นท่อยาว ต่อกันไปเป็น pharynx ซึ่งมีขนาดเล็ก ถัดลงไปเป็น esophagus มีลักษณะเป็นท่อนสั้น วัดความยาวได้ 0.07–0.125 มิลลิเมตร ตอนปลายแยกออกเป็น 2 ปาง ของลำไส้ ที่มีลักษณะยาวไปทางด้านท้ายของ ลำตัว อวัยวะสืบพันธุ์อยู่กึ่งกลางค่อนไปทางด้านท้ายลำตัว ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ประกอบด้วย testis 1 อัน อยู่ค่อนไปทางด้านท้ายของลำตัว มีลักษณะกลม วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 0.14–0.22 มิลลิเมตร seminal vesicle ที่มีลักษณะเป็นก้อน (voluminous) แยกกันเป็น 2 ส่วน (bipartite) เจริญดี ไม่มี cirrus และไปเปิดออกที่ genital atrium เป็นกล้ามเนื้อที่มีโครงสร้าง ซับซ้อน ที่เปิดออกพร้อมกับ ventral sucker เรียกว่า ventrogenital sac เปิดอยู่เหนือ ovary เล็กน้อย ระบบสืบพันธุ์เพศเมียมี ovary 1 อัน อยู่ทางด้านหน้าของ testis ในแนวเส้นกลางตัว มี ลักษณะกลม วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 0.07–1.2 มิลลิเมตร พบ seminal receptacle มีลักษณะเป็นก้อนกลม มี uterus อยู่ในช่วงว่างของลำตัว แผ่ขยาย และยึดไปทางด้านท้ายของ ลำตัว ภายในเต็มไปด้วยไข่ ไข่มีขนาดใหญ่ มีลักษณะ oval มีขนาด และ uterus เปิดออกสู่ ภายนอกที่ genital atrium บริเวณ bifurcate caeca ส่วนของเสียมีการขับถ่ายออกสู่ภายนอก ทาง excretory pore เปิดอยู่ท้ายสุดของลำตัว

Centrocestus caninus (ภาพ 5)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Heterophyidae

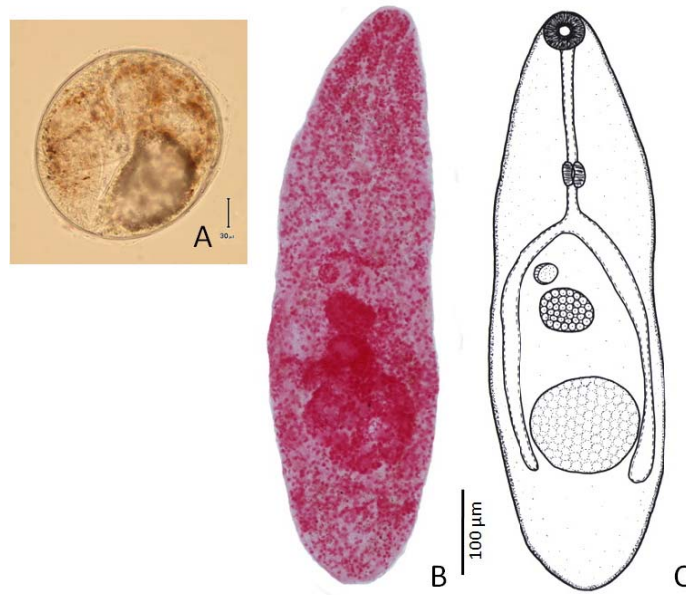
Genus *Centrocestus*

ลักษณะรูปร่าง

เมตาเซอรัคคาเรียมีขนาดเล็ก รูปร่างรีหรือรี มีความยาว 0.15–0.22 มิลลิเมตร กว้าง 0.10–0.12 มิลลิเมตร มีผนังชั้นเดียว สามารถมองเห็นตัวอ่อนของพยาธิอยู่ภายในมีการเคลื่อนที่ไปมาและมีลักษณะสำคัญที่เห็นได้ชัดคือ excretory bladder มีลักษณะเป็นรูป x-shaped และมองเห็น circumoral spine 2 แถว เรียงสลับกันอยู่รอบ oral sucker ตัวเต็มวัยมีขนาดเล็ก รูปร่างค่อนข้างรี หรือรูปไข่ คล้ายไส้กรอก (sausage-shaped) ระยะเวลาเมตาเซอรัคคาเรียฝังอยู่ในซีเหงือก (gill filament) มองเห็นตัวอ่อนของพยาธิเคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว ลักษณะที่บอกได้ชัดเจนว่าเป็นตัวอ่อนระยะเมตาเซอรัคคาเรียของ *Centrocestus caninus* คือมองเห็น excretory bladder มีรูปร่างเป็น X-shaped ได้อย่างชัดเจน และมองเห็น circumoral spine 2 แถว เรียงสลับกันอยู่รอบ oral sucker โดย cyst wall มีชั้นเดียว

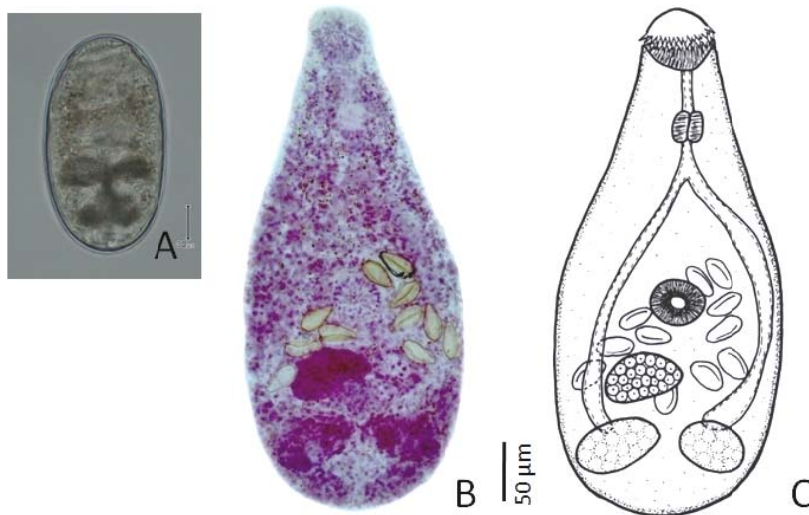
ตัวเต็มวัย ลำตัวมีรูปร่างเป็นหยดน้ำ (pyriform) หรือรูปไข่ คือมีลักษณะเรียวยาวแหลมทางด้านหน้า และทางด้านท้ายของลำตัว ลำตัวมีความกว้าง 0.18–0.32 มิลลิเมตร และยาว 0.43–0.75 มิลลิเมตร ลำตัวปกคลุมด้วย spines จะหนาแน่น ทางด้าน anterior ของลำตัว และค่อยๆ มีขนาดเล็กลง พร้อมทั้งจำนวนก็น้อยลงเรื่อยๆ oral sucker อยู่ปลายสุดของลำตัวทางด้านหน้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.041–0.054 มิลลิเมตร มี circumoral spine จำนวน 2 แถว เรียงสลับกัน (alternate) แถวละ 16 อัน รวม 32 อัน spines แถวในมีขนาดใหญ่และยาวกว่า แถวนอก pharynx มีขนาดกว้าง 0.020–0.041 มิลลิเมตร และยาว 0.034–0.054 มิลลิเมตร esophagus สั้น ตอนปลายแยกออกเป็น bifurcate caeca ปลายตันยื่นลงไปทางด้านท้ายของลำตัว สิ้นสุดบริเวณ anterior ของ ovary ส่วนของ ventral sucker มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่า oral sucker ระบบสืบพันธุ์มี testes 2 อัน มีลักษณะกลมรีตั้งอยู่ส่วนท้ายของลำตัว ระหว่าง branches ของ excretory bladder, ovary มีลักษณะกลม ตั้งอยู่ปลายลำไส้ทางด้านขวา

excretory bladder มีลักษณะเป็น X-shaped เห็นได้ชัดเจนส่วนท้ายของลำตัว เปิดออก
ภายนอกตัวทาง excretory pore



ภาพ 4 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *Haplorchoides* sp.

A. ภาพถ่ายระยะเมตาเซอร์คาเรีย B. ภาพถ่าย C. ภาพวาด



ภาพ 5 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *Centrocestus caninus*

A. ภาพถ่ายระยะเมตาเซอร์คาเรีย B. ภาพถ่าย C. ภาพวาด

Posthodiplostomum sp. Chen, 1949 (ภาพ 6)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Diplostomidae

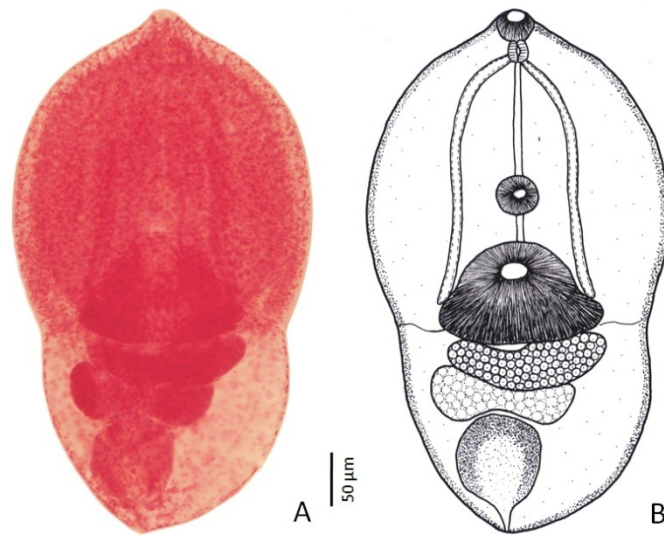
Subfamily Diplostominae

Genus *Posthodiplostomum*

ลักษณะรูปร่าง

เมตาเซอร์คาเรียมีขนาดค่อนข้างใหญ่ มีผนังบางใส มองเห็นตัวอ่อนพยาธิที่อยู่ภายในได้อย่างชัดเจน เมตาเซอร์คาเรียมีขนาดรูปร่างรี หรือรูปไข่ มีความกว้าง 0.66–0.83 มิลลิเมตร ยาว 0.72–0.88 มิลลิเมตร ภายในมีของเสียกระจายอยู่รอบตัวพยาธิ ตัวอ่อนพยาธิมีการเคลื่อนที่ไปมาอย่างช้า ๆ ผนังลำตัวไม่มีหนามปกคลุม ลำตัวแยกออกเป็น 2 ส่วนชัดเจน

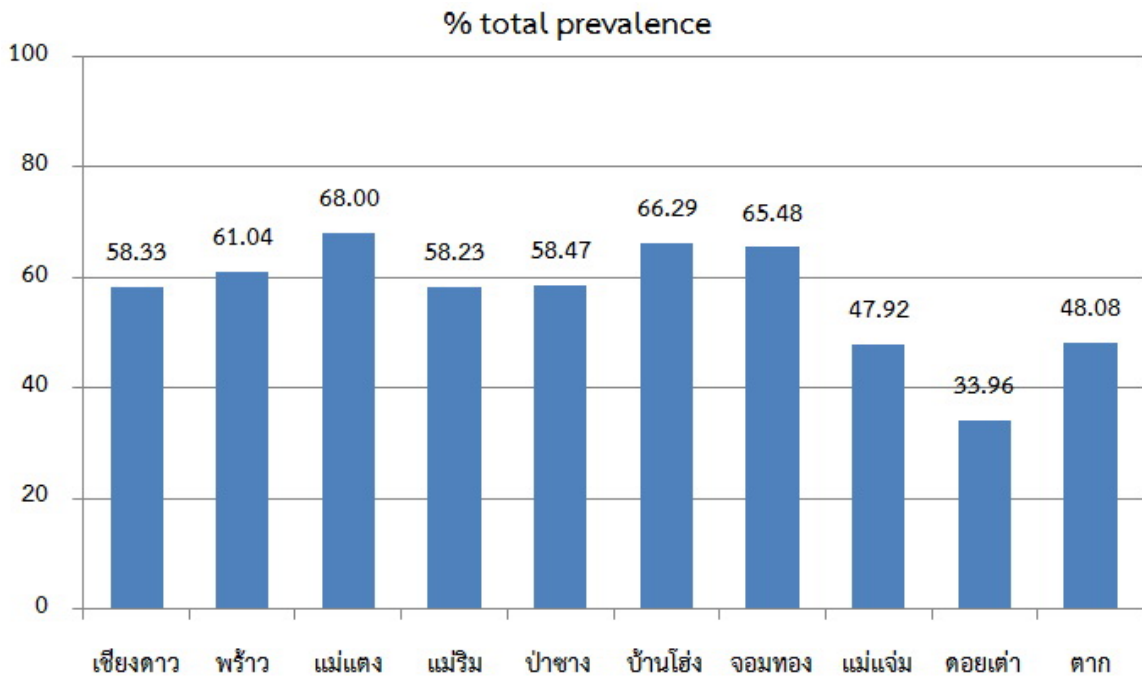
excysted metacercaria พบว่าลำตัวแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ fore body และ hind body โดยมีรอยคอด (constriction) แบ่งลำตัวชัดเจน ลำตัวมีความยาว 0.45–0.6 มิลลิเมตร ส่วน fore body (ตั้งแต่ส่วนหน้าสุดถึงรอยคอด) มีรูปร่างยาวรี มีความกว้าง 0.28–0.35 มิลลิเมตร ยาว 0.31–0.42 มิลลิเมตร ด้านหน้าสุดมี oral sucker ขนาดเล็ก รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.03 มิลลิเมตร มี pharynx ขนาดเล็ก esophagus สั้น ตอนปลายแยกออกเป็น 2 ปาง (bifurcate ceca) ยื่นไปตามความยาวของลำตัว และสิ้นสุดบริเวณเดียวกับ testis ที่อยู่ในส่วน hind body มี ventral sucker อยู่บริเวณกึ่งกลางของลำตัวของส่วน fore body มีขนาดเล็กแต่ใหญ่กว่า oral sucker เล็กน้อย มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.04 มิลลิเมตร ส่วน hind body มีขนาดเล็กกว่า fore body โดยมีความกว้าง 0.15–0.21 มิลลิเมตร ยาว 0.10–0.24 มิลลิเมตร testis มีลักษณะเป็นก้อน (lobe) ติดกัน 2 อัน อันที่อยู่ทางด้านท้ายมีขนาดใหญ่กว่าอันที่อยู่ทางด้านหน้า ส่วน ovary มีลักษณะเป็นก้อน เช่นเดียวกับ testis อยู่ทางด้านข้างของลำตัวในส่วน hind body เหนือ testis



ภาพ 6 ลักษณะทั่วไปของพยาธิ *Posthodiplostomum* sp.
A. ภาพถ่าย B. ภาพวาด

4.3 การศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลา

จากการศึกษาการระบาดของพยาธิในปลา จำนวนทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ ปลากระสูบขีด กระดี่หม้อ แก้มขี้ เข้ม ซ่า ชิวควาย ชิวควายแถบดำ ชิวหนวดยาว ตะเพียนขาว ตะเพียนทราย นางอ้าว น้ำหมึก นวลจันทร์ สร้อยขาว สร้อยนกเขา หนามหลัง และหมอล พบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ ทั้งหมด 5 ชนิด แบ่งเป็นพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae 4 ชนิด ได้แก่ *Haplorchis taichui*, *Haplorchoides* sp., *Stellantchasmus falcatus*, *Centrocestus caninus* และพยาธิใบไม้ วงศ์ Diplostomatidae 1 ชนิด ได้แก่ *Posthodiplostomum* sp. ซึ่งความชุกชุมของเมตาเซอร์คาเรียที่ติดเชื้อในปลาแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พบว่าจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอแม่แตง มีค่าความชุกชุมมากที่สุด เท่ากับ 68.00% รองลงมาคือ จุดเก็บตัวอย่างในอำเภอบ้านโฮ่ง เท่ากับ 66.29% และจุดเก็บตัวอย่างที่มีค่าความชุกชุมน้อยที่สุด คืออำเภอดอยเต่า มีค่าเท่ากับ 33.96% (ภาพ 7)



ภาพ 7 ความชุกของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจากปลาในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 (S1) แม่น้ำปิง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 48 ตัว 5 ชนิด ได้แก่ ปลาแก้มช้ำ ชีวกายแถบดำ ตะเพียนขาว สร้อยขาว และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *C. caninus*, *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 6.25%, 33.33% และ 31.25% ตามลำดับ โดยปลาตะเพียนขาวมีค่าความชุกมากของ *Haplorchoides* sp. มากที่สุดเท่ากับ 100% (ภาพ 8)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 (S2) แม่น้ำแม่จัด อำเภอพริ้ว จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 77 ตัว 6 ชนิด ได้แก่ ปลาแก้มช้ำ ชีวควาย ชีวหนวดยาว ตะเพียนทราย สร้อยขาว และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *C. caninus*, *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 12.99%, 20.78% และ 27.27% ตามลำดับ ซึ่งปลาตะเพียนทรายมีค่าความชุกของ *Haplorchoides* sp. มากที่สุดเท่ากับ 75% (ภาพ 8)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 (S3) แม่น้ำแม่แตง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 75 ตัว 7 ชนิด ได้แก่ ปลากะสูบขีด แก้มช้ำ ชีวควาย ซ่า ตะเพียนทราย สร้อยขาว และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *C. caninus*, *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 8.00%, 16.00% และ 44.00% ตามลำดับ ซึ่งปลาตะเพียนทรายและ ซ่ามีค่าความชุกของ *Haplorchoides* sp. มากที่สุดเท่ากับ 75% (ภาพ 8)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 (S4) แม่น้ำปิง อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 79 ตัว 4 ชนิด ได้แก่ปลาซ่า สร้อยขาว สร้อยนกเขา และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 27.85% และ 30.38% ตามลำดับ ทั้งนี้ปลาสร้อยขาวมีค่าความชุกของ *Haplorchoides* sp. มากที่สุดเท่ากับ 40.91% (ภาพ 8)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 (S5) แม่น้ำแม่กวง อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน พบปลาทั้งหมด 118 ตัว 8 ชนิด ได้แก่ปลาแก้มช้ำ เข้ม ชิวหนวดยาว ตะเพียนขาว ตะเพียนทราย น้ำหมึก สร้อยขาว และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *C. caninus*, *H. taichui*, *Haplorchoides* sp. และ *Posthodiplostomum* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 5.08%, 25.42%, 24.58% และ 3.39% ตามลำดับ ซึ่งปลาตะเพียนขาวมีค่าความชุกของ *H. taichui* มากที่สุดเท่ากับ 63.64% (ภาพ 8)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 (S6) แม่น้ำลี้ อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน พบปลาทั้งหมด 89 ตัว 6 ชนิด ได้แก่ปลาแก้มช้ำ เข้ม ชิวควาย ตะเพียนขาว สร้อยขาว และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *C. caninus*, *H. taichui*, *Haplorchoides* sp. และ *S. falcatus* มีค่าความชุกเท่ากับ 2.25%, 26.97%, 32.58% และ 4.49% ตามลำดับ ซึ่งปลาเข้มีค่าความชุกของ *S. falcatus* มากที่สุดเท่ากับ 100% (ภาพ 8)

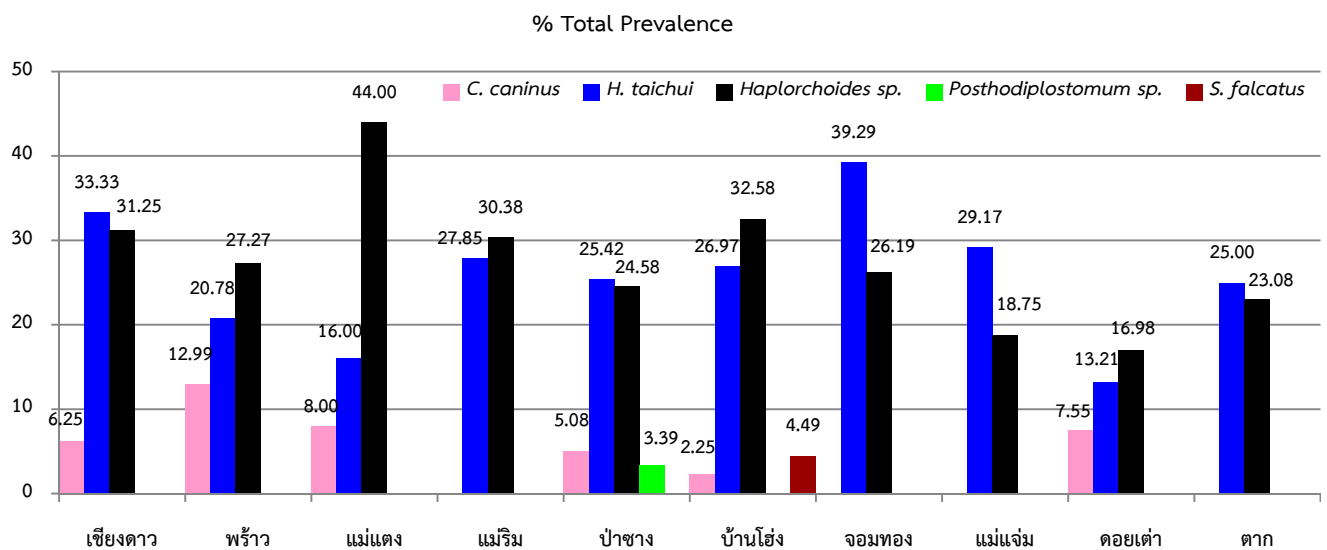
จุดเก็บตัวอย่างที่ 7 (S7) แม่น้ำปิง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 84 ตัว 6 ชนิด ได้แก่ปลาแก้มช้ำ ซ่า ตะเพียนขาว นางฮ้าว สร้อยนกเขา และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 39.29% และ 26.19% ตามลำดับ โดยปลานางฮ้าว มีค่าความชุกของ *H. taichui* มากที่สุดเท่ากับ 80% (ภาพ 8)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 8 (S8) แม่น้ำแม่แจ่ม อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 48 ตัว 5 ชนิด ได้แก่ปลากะสูบขีด แก้มช้ำ ตะเพียนขาว สร้อยขาว และหนามหลัง พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 29.17% และ 18.75% ตามลำดับ ซึ่งปลาตะเพียนขาว มีค่าความชุกของ *H. taichui* มากที่สุดเท่ากับ 44.44% (ภาพ 8)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 (S9) อ่างเก็บน้ำดอยเต่า อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 53 ตัว 5 ชนิด ได้แก่ปลาชิวควาย ชิวหนวดยาว ตะเพียนขาว ตะเพียนทราย และสร้อยขาว พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *C. caninus*, *H. taichui* และ

Haplorchoides sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 7.55%, 13.21% และ 16.98% ตามลำดับ ซึ่งปลาตะเพียนทราย มีค่าความชุกของ *Haplorchoides* sp. มากที่สุดเท่ากับ 50.00% (ภาพ 8)

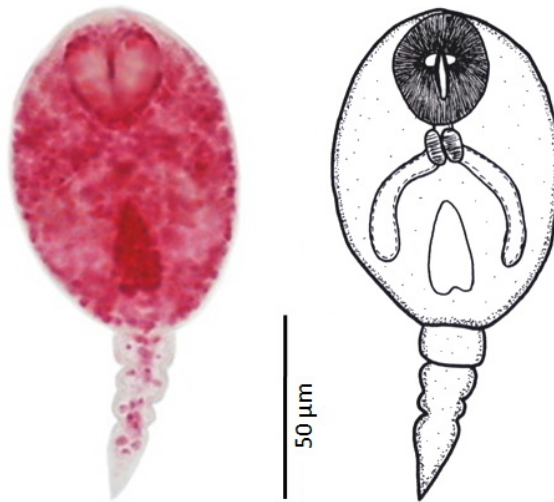
จุดเก็บตัวอย่างที่ 10 (S10) เชื้อนภูมิพล อำเภอสสามเงา จังหวัดตาก พบปลาทั้งหมด 52 ตัว 8 ชนิด ได้แก่ปลากะสูบขีด กระดี่หม้อ ตะเพียนขาว ตะเพียนทราย นวลจันทร์ สร้อยขาว หนามหลัง และหม้อ พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกเท่ากับ 25.00 % และ 23.08% ตามลำดับ ซึ่งปลาสร้อยขาว มีค่าความชุกของ *H. taichui* มากที่สุดเท่ากับ 57.14% (ภาพ 8)



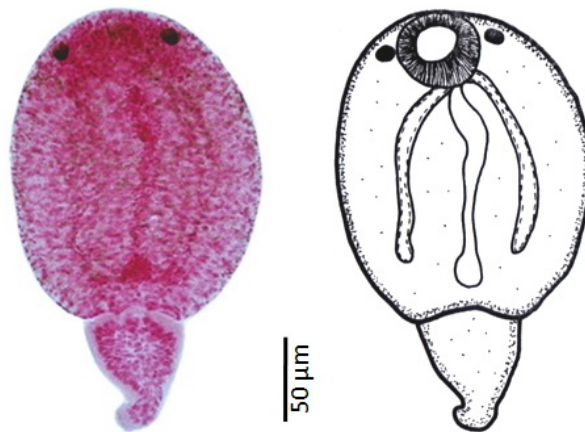
ภาพ 8 ความชุกของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจากปลาในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

4.4 การศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอย

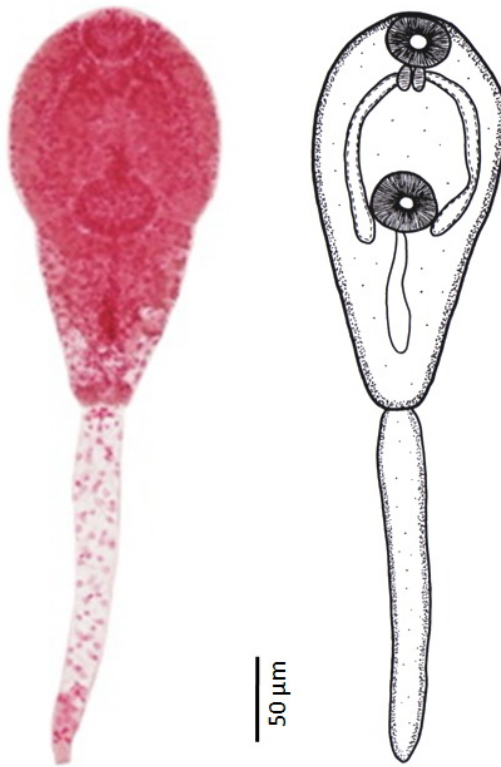
จากการศึกษาการระบาดของพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอย จำนวนทั้งหมด 1,233 ตัว จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ *Brotia costula costula*, *Br. citrina*, *Br. baccata*, *Tarebia granifera*, *Physa acuta*, *Filopaludina martensi martensi*, *F. dorliaris*, *F. polygamma*, *Thiara scabra*, *Melanoides tuberculata*, *M. jugicostis*, *Bithynia siamensis*, *Eyriesia eyriesi*, *Indoplanorbis* sp. และ *Lymnia* sp. พบเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ ทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ xiphidiocercaria, monostome cercaria, distome cercaria, pleurolophocercous cercaria, parapleurolophocercous cercaria, echinostome cercaria, furcocercous cercaria และ transversotrema cercaria (ภาพ 9-16)



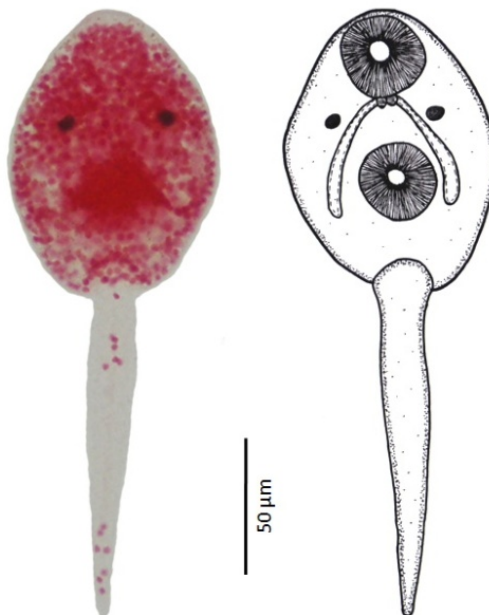
ภาพ 9 ภาพถ่าย และภาพวาดของ xiphidiocercaria



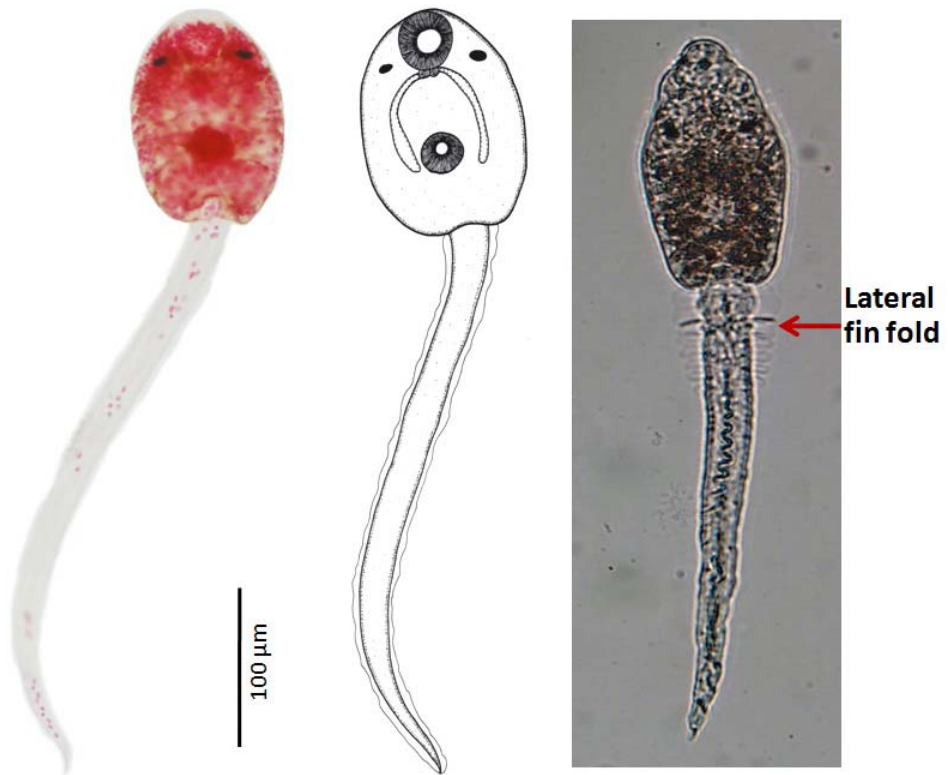
ภาพ 10 ภาพถ่าย และภาพวาดของ monostome cercaria



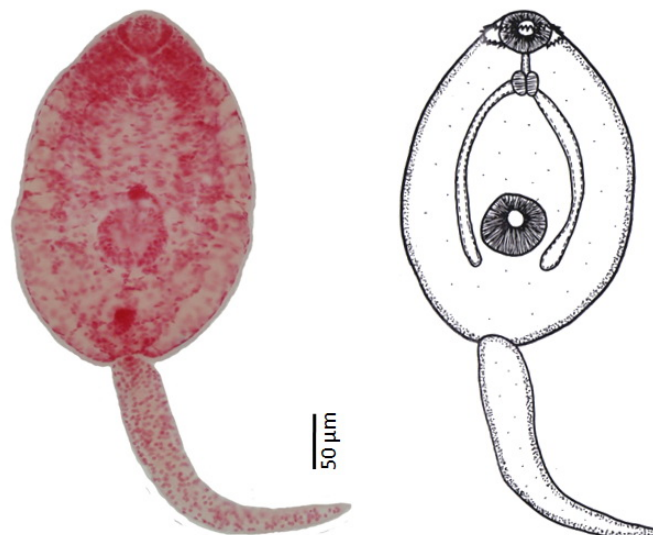
ภาพ 11 ภาพถ่าย และภาพวาดของ distome cercaria



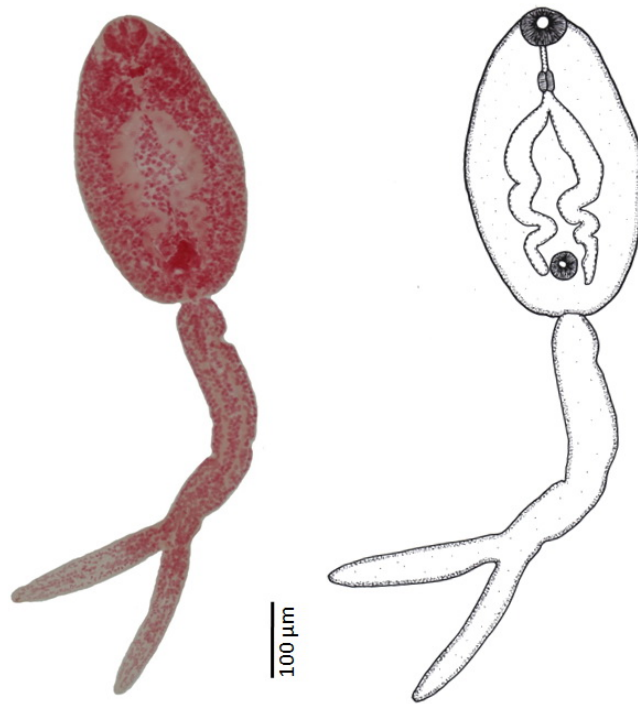
ภาพ 12 ภาพถ่าย และภาพวาดของ pleurolophocercous cercaria



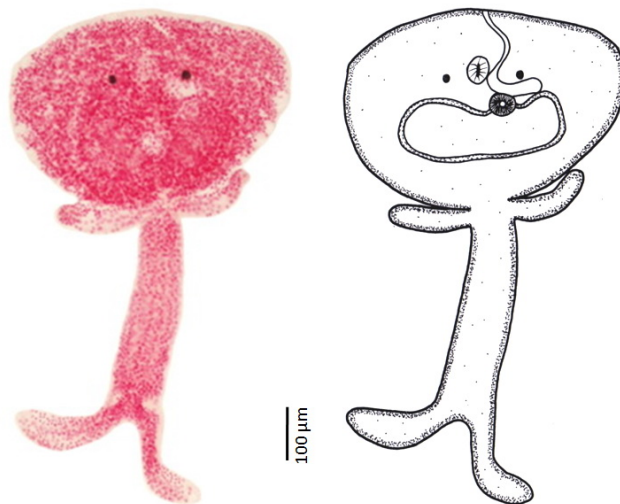
ภาพ 13 ภาพถ่าย และภาพวาดของ parapleurolophocercous cercaria



ภาพ 14 ภาพถ่าย และภาพวาดของ echinostome cercaria

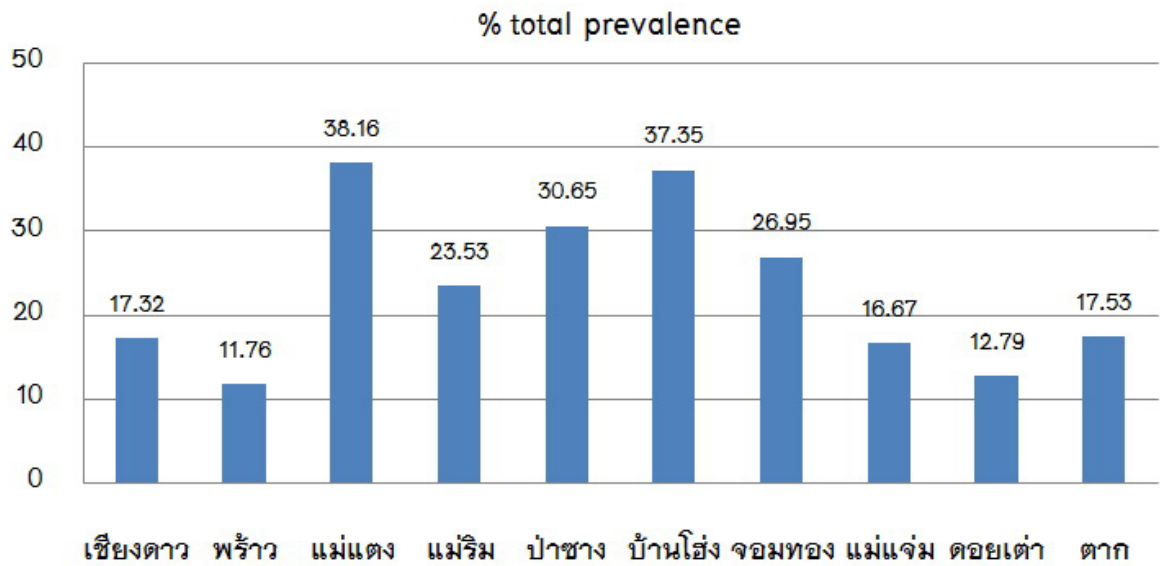


ภาพ 15 ภาพถ่าย และภาพวาดของ furcocercous cercaria



ภาพ 16 ภาพถ่าย และภาพวาดของ transversotrema cercaria

ความชุกชุมของเซอร์คาเรียที่พบในหอยแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พบว่าจุดเก็บตัวอย่างใน
 อำเภอมะนัง มีค่าความชุกชุมมากที่สุด เท่ากับ 38.16% รองลงมาคือ จุดเก็บตัวอย่างใน
 อำเภอป่าซาง เท่ากับ 30.65% และจุดเก็บตัวอย่างที่มีค่าความชุกชุมน้อยที่สุด คือ อำเภอ
 พริ้ว มีค่าเท่ากับ 11.76% (ภาพ 17)



ภาพ 17 ความชุกของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียจากหอยในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 127 ตัว 4 ชนิด ได้แก่ *Brotia costula costula*, *Br. citrina*, *Tarebia granifera* และ *Physa acuta* พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรีย ในหอยเพียง 1 ชนิด คือ *Ta. granifera* โดยพบเซอร์คาเรีย จำนวน 2 แบบ คือ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria มีค่าความชุกเท่ากับ 1.82% และ 38.18% ตามลำดับ (ภาพ 18)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 85 ตัว 4 ชนิด ได้แก่ *Filopaludina martensi martensi*, *F. dorliaris*, *F. polygamma*, *Ta. granifera*, *Thiara scabra* และ *Melanoides tuberculata* พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรีย ในหอย 2 ชนิด คือ *Ta. granifera* และ *M. tuberculata* โดยพบ parapleurolophocercous cercaria ในหอยทั้ง 2 ชนิด มีค่าความชุกเท่ากับ 8.33% และ 27.27% ตามลำดับ (ภาพ 18)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 283 ตัว 9 ชนิด ได้แก่ *Bithynia siamensis*, *Br. baccata*, *Eyriesia eyriesi*, *F. dorliaris*, *F. matensi matensi*, *Physa acuta*, *M. tuberculata*, *M. jugicostis* และ *T. granifera* พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรีย ในหอย จำนวน 5 แบบ คือ monostome cercaria, distome cercaria, echinostome cercaria, transversotrema cercaria และ parapleurolophocercous cercaria โดยพบว่า distome cercaria พบในหอย 3 ชนิด คือ *Br. baccata*, *M. tuberculata* และ *M. jugicostis* มีค่าความชุกเท่ากับ 58.06%, 33.33% และ 73.91% ตามลำดับ และพบว่าหอย *Ta. granifera* พบเซอร์คาเรีย

จำนวน 2 แบบ คือ *tranversotrema cercaria* และ *parapleurolophocercous cercaria* มีค่าความชุกเท่ากับ 17.65% และ 82.35% ตามลำดับ ขณะที่หอย *F. dorliaris* พบ *echinostome cercaria* มีค่าความชุกเท่ากับ 100% หอย *Bi. siamensis* พบ 60.81% และไม่พบการติดเชื้อเซอร์คาเรียในหอย *E. eyriesi*, *F. matensi matensi* และ *P. acuta* (ภาพ 18)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 85 ตัว 5 ชนิด ได้แก่ *Br. costula costula*, *Thiara scabra*, *M. tuberculata*, *F. matensi matensi* และ *Ta. granifera* พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรียในหอย 2 ชนิด คือ *M. tuberculata* และ *F. matensi matensi* โดยหอย *M. tuberculata* พบเซอร์คาเรีย จำนวน 2 แบบ คือ *distome cercaria* และ *parapleurolophocercous cercaria* มีค่าความชุกเท่ากับ 33.33% และ 11.11% ตามลำดับ ขณะที่ *F. matensi matensi* พบ *furcocercous cercaria* มีค่าความชุกเท่ากับ 37.50% (ภาพ 18)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน พบปลาทั้งหมด 186 ตัว 8 ชนิด ได้แก่ *Bi. siamensis*, *F. dorliaris*, *F. matensi matensi*, *Indoplanorbis* sp., *Lymnia* sp., *M. tuberculata*, *Ta. granifera* และ *Th. scabra* พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรียในหอย จำนวน 5 แบบ คือ *monostome cercaria*, *echinostome cercaria*, *xiphidiocercaria* และ *parapleurolophocercous cercaria* โดยพบ *echinostome cercaria* ในหอย 2 ชนิด คือ *F. dorliaris* และ *F. matensi matensi* มีค่าความชุกเท่ากับ 42.11% และ 34.29% ตามลำดับ และพบ *parapleurolophocercous cercaria* ในหอย 2 ชนิด คือ *M. tuberculata* และ *Ta. granifera* มีค่าความชุกเท่ากับ 56.10% และ 22.73% ตามลำดับ ขณะที่ *monostome cercaria* พบในหอย 1 ชนิด คือ *Bi. siamensis* มีค่าความชุกเท่ากับ 14.81% และ *xiphidiocercaria* พบในหอย 1 ชนิด คือ *Ta. granifera* มีค่าความชุกเท่ากับ 22.73% และไม่พบการติดเชื้อเซอร์คาเรียในหอย *F. dorliaris*, *F. matensi matensi*, *Indoplanorbis* sp., *Lymnia* sp. และ *Th. scabra* (ภาพ 18)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน พบปลาทั้งหมด 83 ตัว 4 ชนิด ได้แก่ *F. matensi matensi*, *M. tuberculata*, *Tarebia granifera* และ *Th. scabra* พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรีย จำนวน 3 แบบ คือ *echinostome cercaria*, *parapleurolophocercous cercaria* และ *furcocercous cercaria* พบ *parapleurolophocercous cercaria* ในหอย 2 ชนิด คือ *M. tuberculata* และ *Ta. granifera* มีค่าความชุกเท่ากับ 37.50% และ 45.83% ตามลำดับ และในหอย *F. matensi matensi* พบ *echinostome cercaria* และ *furcocercous cercaria* มีค่าความชุกเท่ากับ 24.24% และ 18.18% ตามลำดับ สำหรับหอย *Th. scabra* ไม่พบการติดเชื้อ (ภาพ 18)

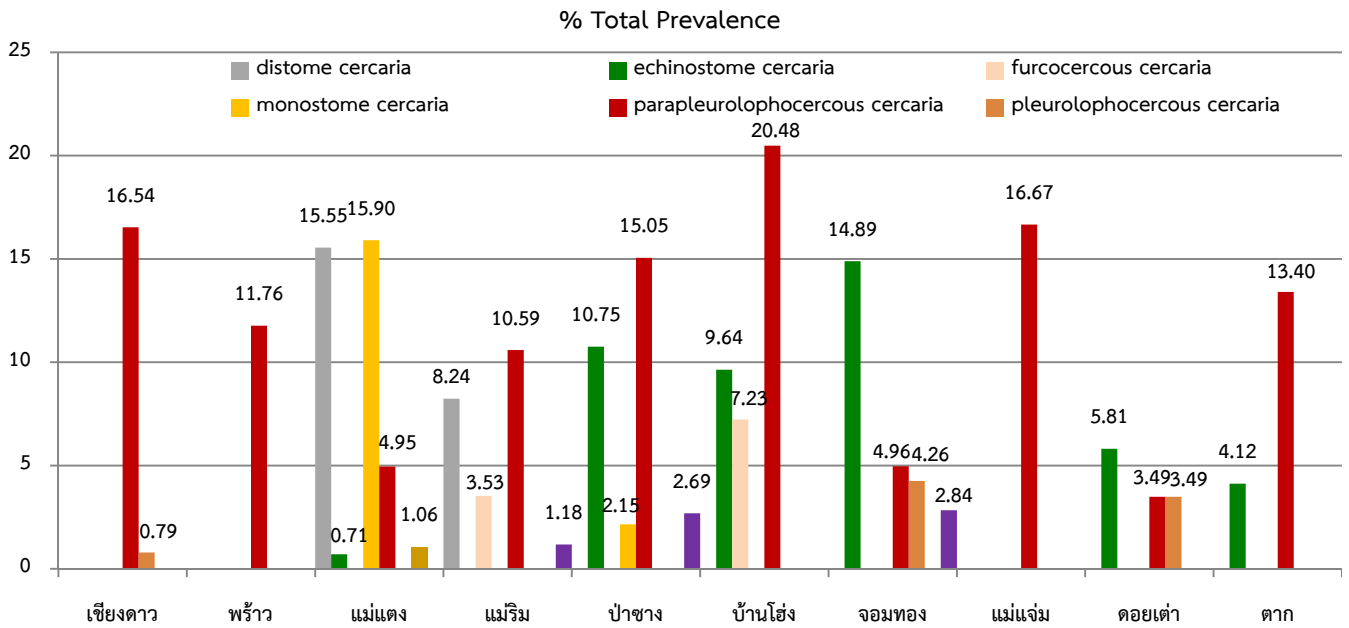
จุดเก็บตัวอย่างที่ 7 อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 141 ตัว 7 ชนิด ได้แก่ *Br. costula costula*, *F. dorliaris*, *Lymnia* sp., *M. tuberculata*, *Ta. granifera* และ

Th. scabra พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรีย จำนวน 3 แบบ คือ echinostome cercaria, xiphidiocercaria และ parapleurolophocercous cercaria พบ parapleurolophocercous cercaria ใน หอย 2 ชนิด คือ *M. tuberculata* และ *Ta. granifera* มีค่าความชุกเท่ากับ 37.50% และ 14.29% ตามลำดับ และพบ echinostome cercaria ในหอย *F. dorliaris* มีค่าความชุกเท่ากับ 65.63% xiphidiocercaria พบ ในหอย *Ta. granifera* สำหรับหอย *Th. scabra* และ *Lymnia* sp. ไม่พบการ ติดเชื้อ (ภาพ 18)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 8 อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 60 ตัว 4 ชนิด ได้แก่ *Brotia costula costula*, *M. tuberculata* และ *Ta. granifera* พบการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรีย พบ เซอร์คาเรีย จำนวน 1 แบบ คือ parapleurolophocercous cercaria โดยพบในหอย 2 ชนิด คือ *M. tuberculata* และ *Ta. granifera* มีค่าความชุกเท่ากับ 21.43% และ 17.95% ตามลำดับ สำหรับ หอย *B. costula costula* ไม่พบการติดเชื้อ (ภาพ 18)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ พบปลาทั้งหมด 86 ตัว 4 ชนิด ได้แก่ *F. matensi matensi*, *M. tuberculata*, *Ta. granifera* และ *Th. scabra* พบการติดเชื้อระยะ เซอร์คาเรีย จำนวน 3 แบบ คือ echinostome cercaria, pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria โดยพบ echinostome cercaria ในหอย *F. matensi matensi* มี ค่าความชุกเท่ากับ 14.71% pleurolophocercous cercaria พบในหอย *Ta. granifera* มีค่าความชุก เท่ากับ 7.14% และ parapleurolophocercous cercaria พบในหอย *M. tuberculata* มีค่าความชุก สูงที่สุดเท่ากับ 50.00% สำหรับหอย *Th. scabra* ไม่พบการติดเชื้อ (ภาพ 18)

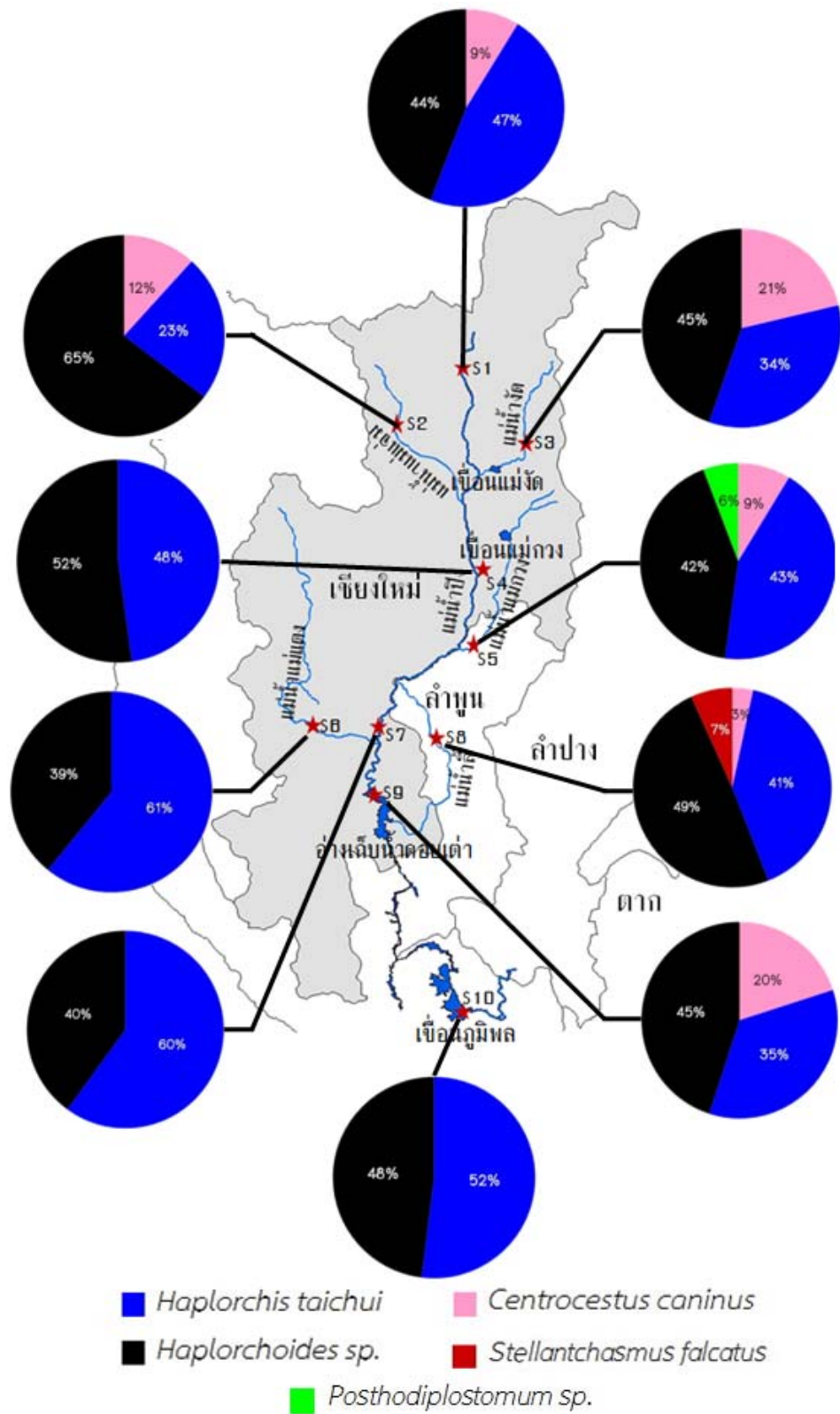
จุดเก็บตัวอย่างที่ 10 อำเภอสามเงา จังหวัดตาก พบปลาทั้งหมด 97 ตัว 5 ชนิด ได้แก่ *F. matensi matensi*, *Lymnia* sp., *M. tuberculata*, *Ta. granifera* และ *Th. scabra* พบการติด เชื้อระยะเซอร์คาเรีย จำนวน 2 แบบ คือ echinostome cercaria และ parapleurolophocercous cercaria โดยพบ echinostome cercaria ในหอย *F. matensi matensi* มีค่าความชุกเท่ากับ 33.33% และ parapleurolophocercous cercaria พบในหอย 2 ชนิด คือ *M. tuberculata* และ *Ta. granifera* มีค่าความชุกเท่ากับ 24.24% และ 17.86 สำหรับหอย *Lymnia* sp. และ *Th. scabra* ไม่พบการติดเชื้อ (ภาพ 18)



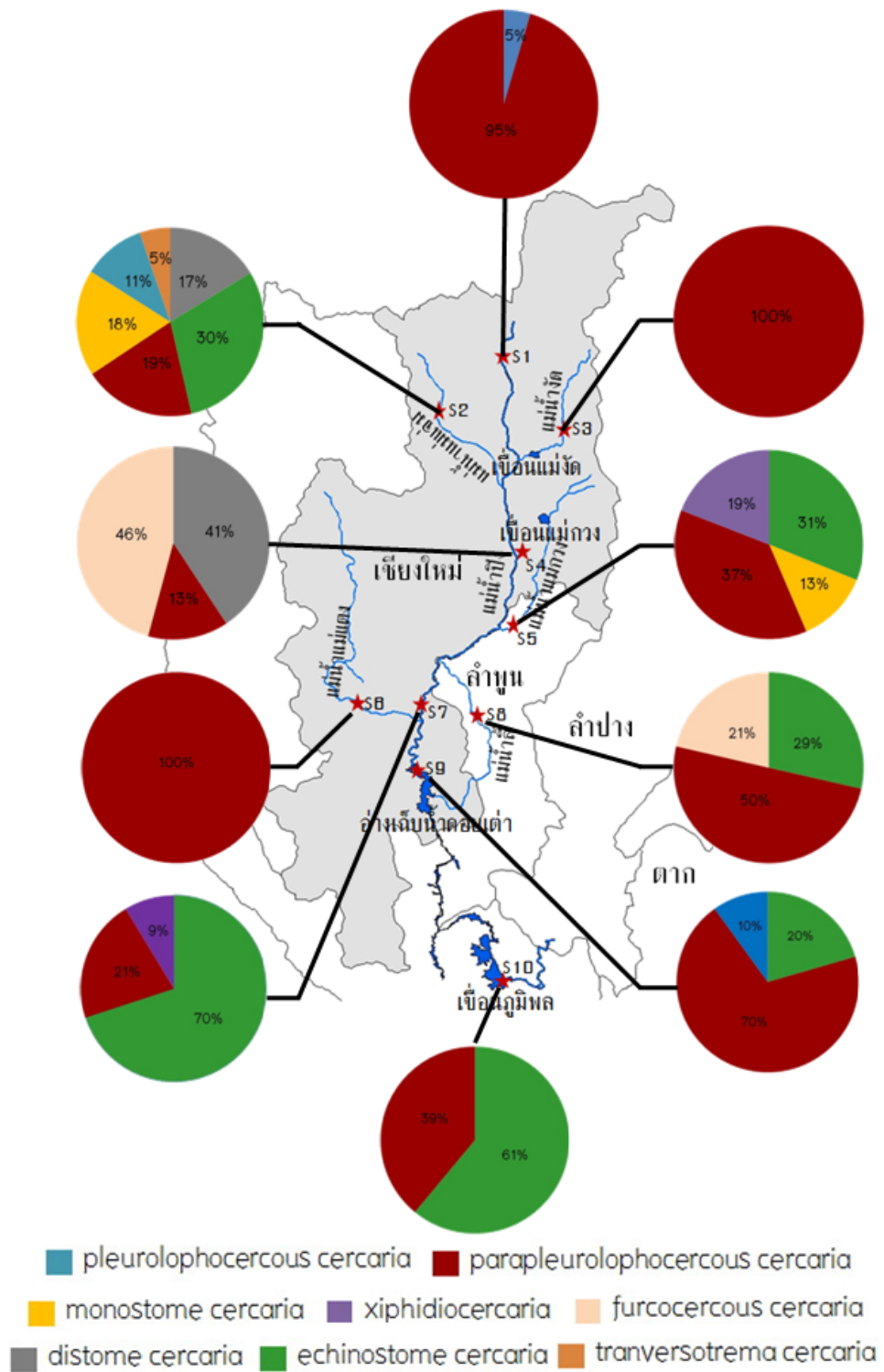
ภาพ 18 ความชุกของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียจากหอยในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

4.5 แผนที่การระบาดของพยาธิที่พบในปลา และหอย

เมื่อนำข้อมูลการระบาดของพยาธิที่พบในปลา และหอยมาสร้างเป็นแผนที่การระบาด เพื่อศึกษาแนวโน้มการระบาด โดยใช้โปรแกรม ArcGis ver. 9.3 ทำให้ได้แผนที่การระบาด และทราบแนวโน้มการระบาดของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ โดยพบว่าในลุ่มน้ำปิงตอนบน มีการระบาดของพยาธิใบไม้ในกลุ่ม Heterophyidae หลายชนิด เช่น *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. โดยพยาธิ *Haplorchoides* sp. พบการระบาดในทุกจุดเก็บตัวอย่างตลอดลุ่มน้ำปิงตอนบน (ภาพ 19) ทั้งนี้ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาการระบาดของพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยชนิดต่างๆ โดยพบว่า *parapleurophocercous cercaria* มีจำนวนมาก และสามารถพบได้ในทุกจุดเก็บตัวอย่าง ซึ่ง *parapleurophocercous cercaria* สามารถพัฒนาไปเป็นพยาธิ *Haplorchoides* sp. ส่วน *transversotrema cercaria* พบการระบาดน้อยที่สุดเพียงจุดเก็บตัวอย่างเดียว (ภาพ 20)



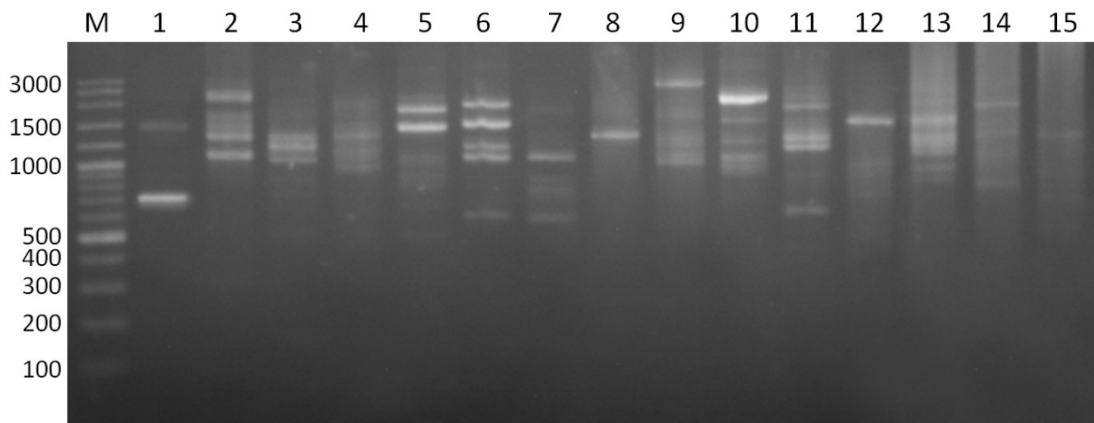
ภาพ 19 แผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลา



ภาพ 20 แผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่พบในหอย

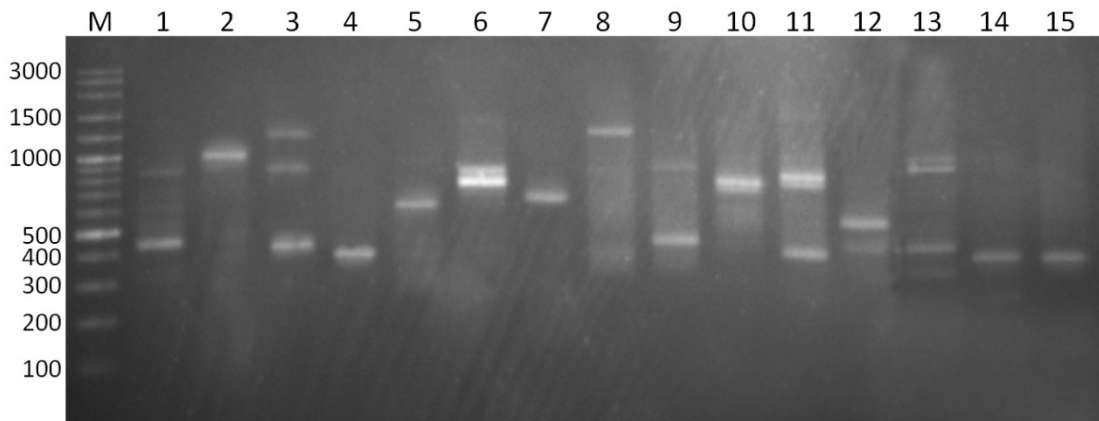
4.6 การศึกษาสายพหิมัพีดีเอ็นเอของพยาธิที่พบด้วยเทคนิค inter-simple sequence repeats, ISSRs)

หลังจากนำตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลาทั้งหมด 5 ชนิด คือ *H. taichui*, *C. caninus*, *S. falcatus*, *Haplorchoides* sp. และ *Posthodiplostomum* sp. และตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่พบในหอย ทั้งหมด 8 แบบ คือ pleurolophocercous cercaria, parapleurolophocercous cercaria, monostome cercaria, xiphidiocercous cercaria, furcocercous cercaria, echinostome cercaria, distome cercaria และ *Transversotrema* cercaria มาสกัด DNA จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่าง DNA ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย และพยาธิชนิดอื่นๆ คือ *Opisthorchis viverrini* และ *Fasciola gigantica* โดยการนำ DNA ของพยาธิที่ได้ทั้งหมด ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค inter-simple sequence repeats, ISSRs โดยใช้ ISSR primer ในกลุ่ม UBC จาก Biotechnology Laboratory, The University of British Columbia, Canada จำนวน 10 primers ได้แก่ UBC 811, UBC 813, UBC 817, UBC 820, UBC 826, UBC 840, UBC 845, UBC 848, UBC 857 และ UBC 890 ทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic DNA) ในช่วง 80–3000 bp. และทั้ง 10 primers สามารถทำให้เกิด %polymorphic band เท่ากับ 100% (ตาราง 2) โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละ primer มีดังต่อไปนี้ (ภาพ 21–30)



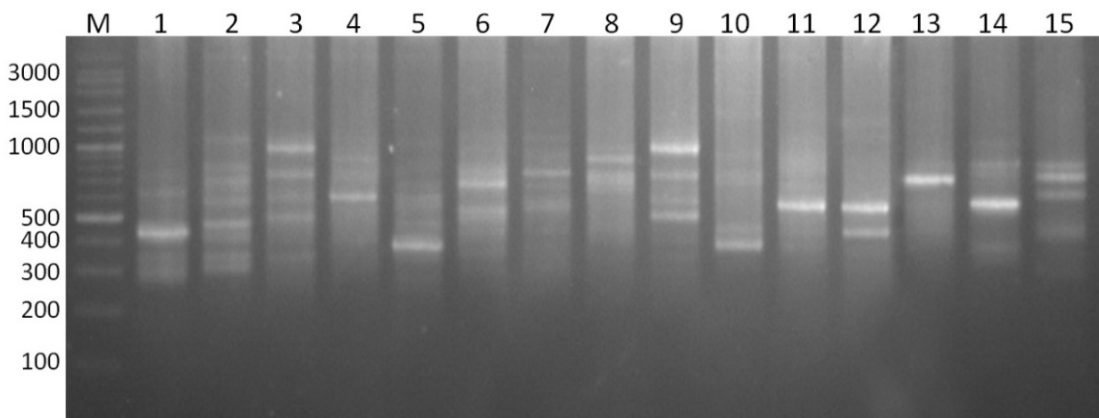
ภาพ 21 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 811

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



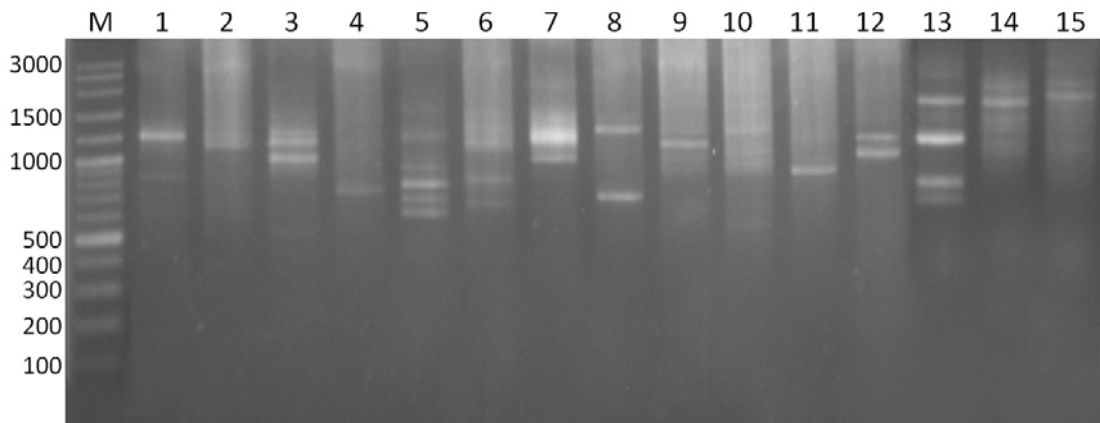
ภาพ 22 แออบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 813

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



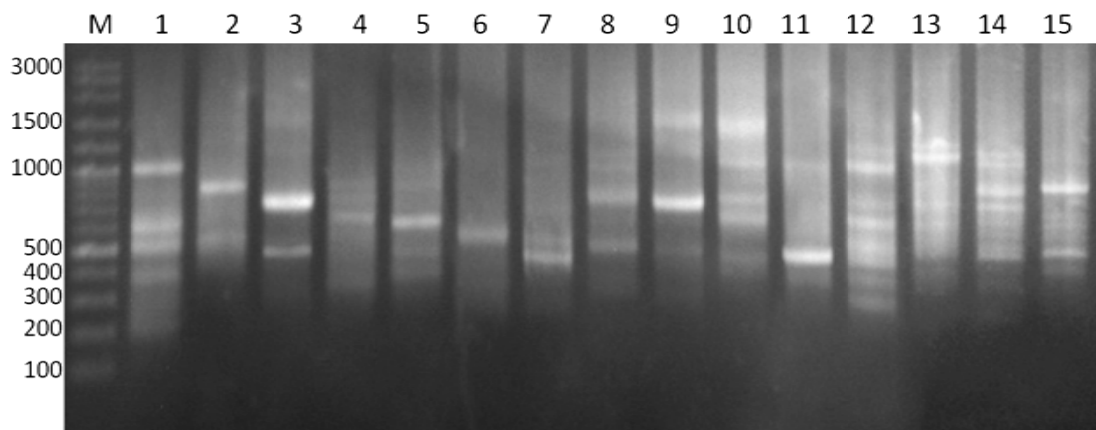
ภาพ 23 แออบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 817

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



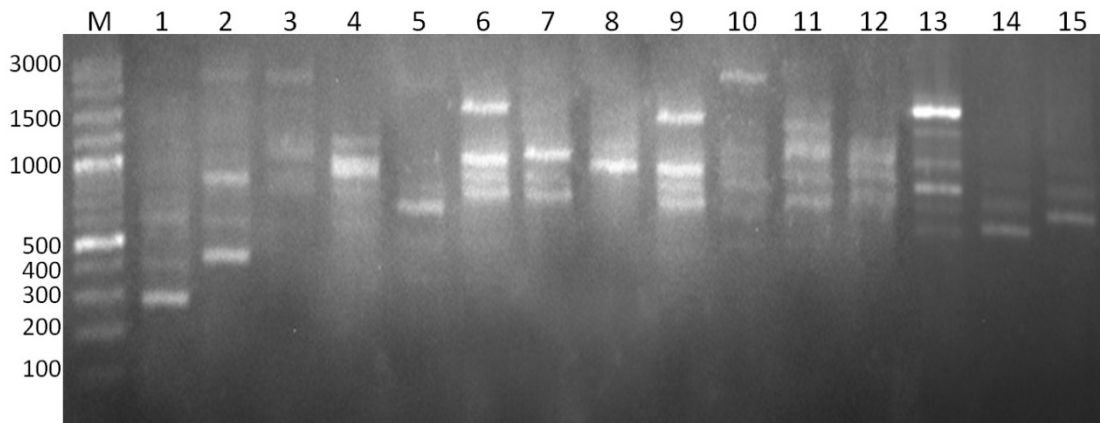
ภาพ 24 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 820

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantea*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



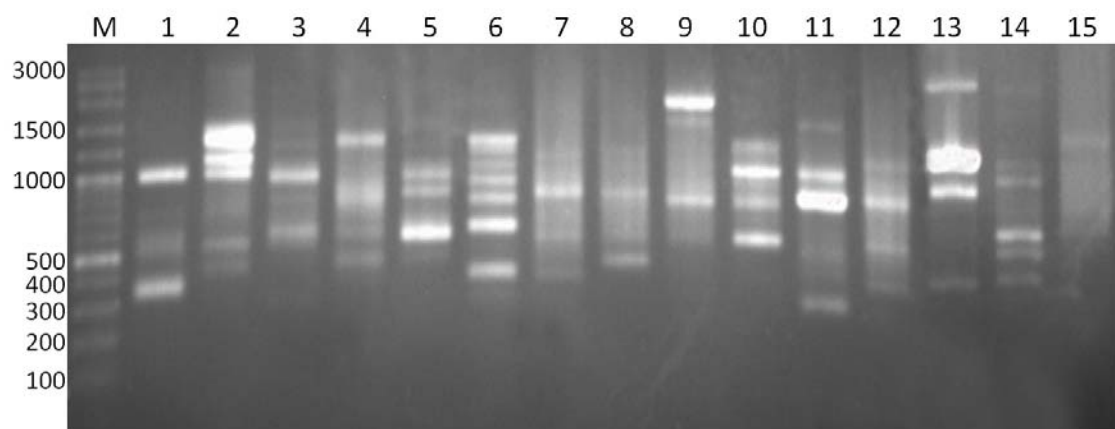
ภาพ 25 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 826

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantea*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



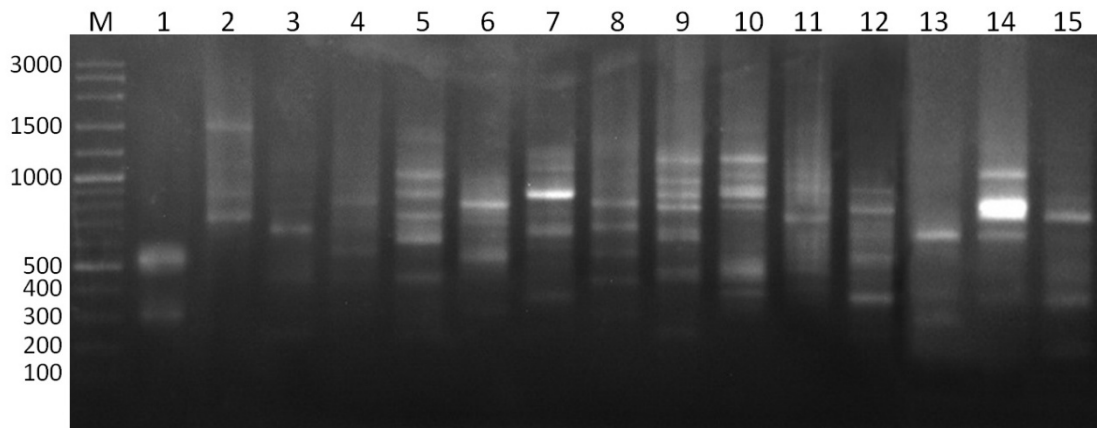
ภาพ 26 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 840

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



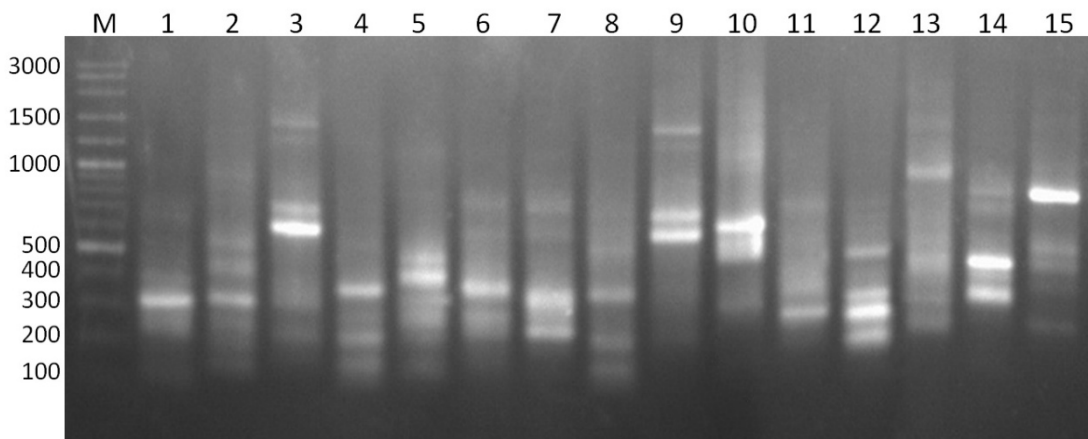
ภาพ 27 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 845

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



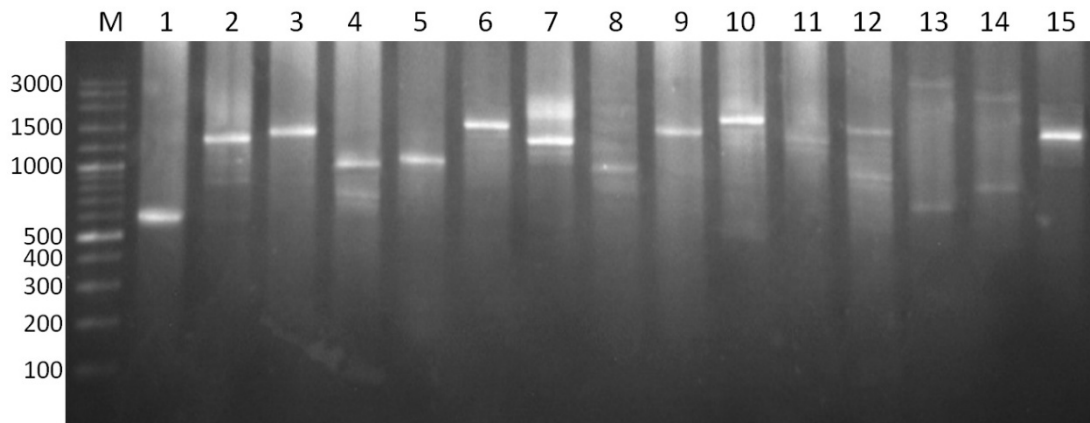
ภาพ 28 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 848

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



ภาพ 29 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 857

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



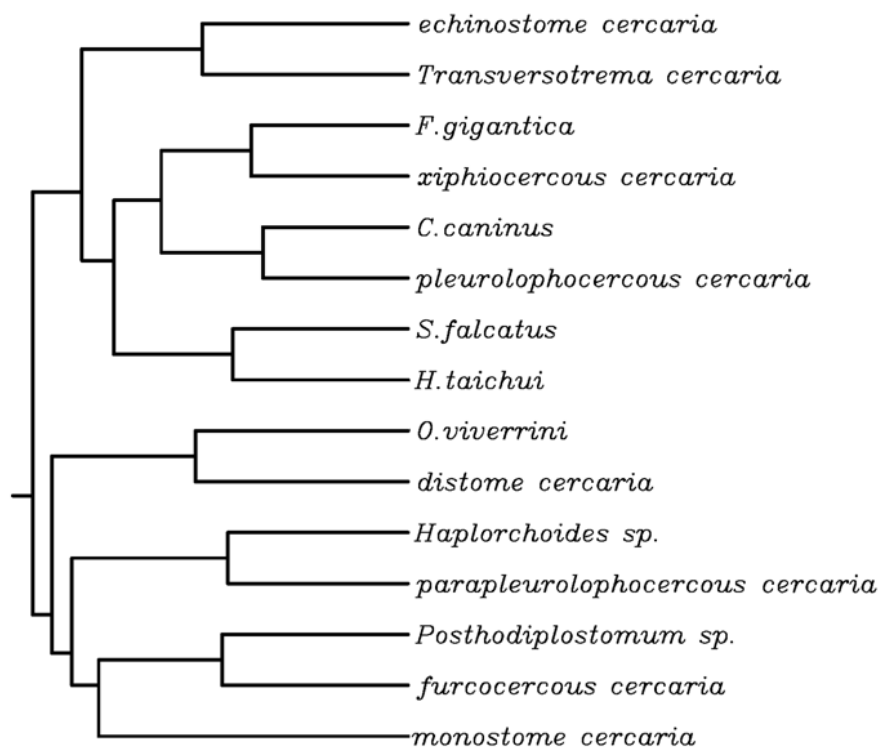
ภาพ 30 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer UBC 890

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria

ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของแต่ละ primers หลังจากการทำ PCR และตรวจสอบโดย Gel electrophoresis

Primers	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'	ขนาด (bps)	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	polymorphic band	% polymorphic
UBC 811	(GA) ₈ C	500-3000	32	32	100
UBC 813	(CT) ₈ T	350-1500	20	20	100
UBC 817	(CA) ₈ A	280-1100	24	24	100
UBC 820	(GT) ₈ T	600-2100	34	34	100
UBC 826	(AC) ₈ C	200-1500	51	51	100
UBC 840	(AG) ₈ YT	300-2600	47	47	100
UBC 845	(CT) ₈ RG	300-2500	50	50	100
UBC 848	(CA) ₈ RG	300-1500	46	46	100
UBC 857	(AC)8YG	80-1400	53	53	100
UBC 890	VHV(GT) ₇	600-2500	20	20	100

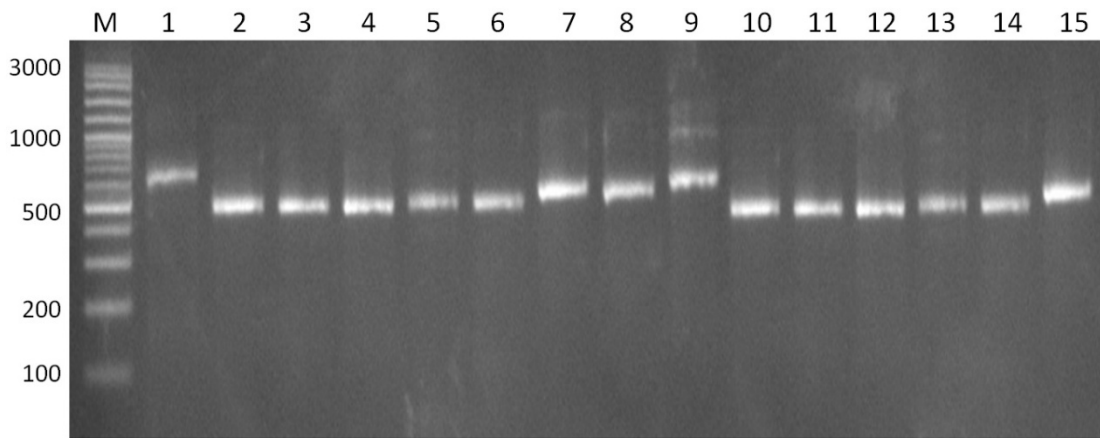
เมื่อนำแถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์ ไปแทนค่าข้อมูลให้เป็นระบบตัวเลขมาตรฐาน (0,1) เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม Clustal w พบว่า พยาธิในวงศ์ Heterophyidae มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria โดยที่พยาธิ *H. taichui* *C. caninus* และ *S. falcatus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ pleurolophocercous cercaria และ *Haplorchoides* sp. มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ parapleurolophocercous cercaria (ภาพ 31)



ภาพ 31 Dendrogram ที่ได้จากรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จาก ISSR primer ของพยาธิแต่ละชนิด

4.7 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน internal transcribed spacer 2 (ITS-2)

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลา 5 ชนิด ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* *Haplorchoides* sp. และ *Posthodiplostomum* sp. และตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอย จำนวน 8 รูปแบบ คือ pleurolophocercous cercaria, parapleurolophocercous cercaria, xiphidocercous cercaria, distome cercaria, monostome cercaria, echinostome cercaria, furcocercous cercaria และ *Transversotrema* cercaria โดยใช้ไพรเมอร์ BD2-R (5'-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT-3') และ 3S-F (5'-GGT ACC GGT GGA TCA CTC GGC TCG TG-3') (Bowles *et al.*,1995) ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 450-600 bp (ภาพ 32)



ภาพ 32 แถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS-2 ของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ BD2-R และ 3s-F
 Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, 10: xiphidioocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิดที่เกิดจากไพรเมอร์ BD2-R และ 3S-F ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

พยาธิ *H. taichui*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ *H. taichui* ที่ได้มีขนาด 485 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```

1   CCCCCGATA  ATAAGTAAAA  GCTCTAGTTG  TGATAAATGT  GAACTGCCCA
51  AAGCTTTGAA  CATCGACATC  TTGAACGCAC  ATTGCGGCCA  TGGGTTTTCC
101 TGTGGCCACG  CCTGTCCGAG  GGTTCGGCTTA  TAAACTATCA  CGACGCCCAA
151 ATAGTCGTGG  CTTGGGTCTT  GCCAGCTGGC  GTGATTTTCT  TGTGCTTTTG
201 CATAGGGTGC  CAGATCTATG  GCTTTTCCCT  AATGTGCCGG  ACGCAACCAT
251 GTCTTTGGCTG  ACGGCCTGGA  TGAGGAAGTG  GCGGCGGAGT  CGTGGCTCAA
301 TGAAAATTGT  CCGCGCGCTC  CAAAGCTTAA  CCTCTGTCTG  GGCTGACGGC
351 TTGGATGAGG  AAGTGGCGGC  GGAGTCGTGG  CTCAATGAAA  ATTGTGCGCG
401 CTCCAAAGCT  TAACCTCTGT  CTGGGCTGAC  GGTTTGGATG  AGGAACCGGC
451 GCGGAGTCCG  TGGCTCAATG  AAAATTGTCC  ACGCG
  
```

พยาธิ *S. falcatus*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ *S. falcatus* ที่ได้มีขนาด 459 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   CGAGGGGCGG TTGGGGCGCA GCCACTGTGT GATTAATGTG AACTGCCTAC
51  TGCTTTTGAAC ATCGACATCT TGAACGCACA TTGCGGCCAC GGGTTTTCCC
101 GTGGCTACGC CTGTCCGAGG GTCGGCTTAT AAAC TATCAC GACGCCATA
151 AAGTCGTGGC TTGGGTCTTG CCAGCTGGCG TGATATCCCT GCGTCTGTTG
201 TAGGGTGCCG GATCTGTGGC TTTTCCCCAA TGTGCCGGAT GCAACCATAT
251 CTAGGCAGGC TGCCTGGAAA CGGGGGTGAC GGC GGAGTCG TGGCTCAATT
301 GCTAATGTGA ATAATGTGCG CGCTCCGTTG TCAATTATTT ACCCGATGTT
351 TGGCTGATGC TTTGATATGG CAATGCACCT GACTATTTGT TTTGCACTGA
401 CGTGCCAACC CATCCTGACC TCGGATCAGA CGTGAATACC CGCTGAATTT
451 AAGCATAAA
```

พยาธิ *C. caninus*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ *C. caninus* ที่ได้มีขนาด 460 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   CCCC GGCAAG GATTGACCCA GCTCTTGTGT GATAAATGTG AACTGCAAAA
51  CTGCTTTGAA CATCGACATC TTGAACGCAC ATTGCGGCCA TGGGTTTTCC
101 TGTGGCCACG CCTGTCCGAG GGTCGGCTTA TAAACTATCA CGACGCCCAA
151 AAAGTCGTGG CTTGGGTCTT GCCAGCCGGC GTGATTTCTT TGTGCTTTGC
201 ATGGGGTGCC GGATCTATGG CTTTTCCCTA ATGTGCCGGA CGCAACCATC
251 TCCAGGCTGG CGGTCTGGAT GAGGAAGTGG CGGCGGAGTC GTGGCTCAAT
301 GATACATATA TATATATATA AAGCGCGCTC TGTGTCTAT TCTTTGTGTG
351 TGTCTCTGTG GTTGTGTGTG GGGATGCATC CTATGCAAAA ATTGCGCACT
401 TTTCTAATGT GTGTTATTTT CCCGACCTCT CATCACACGT AAATACACCC
451 TCATTTTAAA
```

พยาธิ *Haplorchoides* sp.

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ *Haplorchoides* sp. ที่ได้มีขนาด 444 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   CGGCAATTAA CCCC GCCACT TTTGTGTGAT TAATGTGAAC TGCCTACTGC
51  TTTGAACATC GACATCTTGA ACGCATATTG CGGCCATGGG TTTTCCTGTG
101 GCCACGCCTG TCCGAGGGTC GGCTTATAAA CTATCACGAC GCCCAAAAAG
151 TCGTGGCTTG GGTCTTGCCA GCTGGCGTGA TTTCCCTGTG CTTTTGTGTG
201 GGGTGCCAGA TCTATGGCTT TTCCTTAATG TGCCGGACGC ATCCACATTC
251 GGGCTGTATA CCGGGATGAG GAAGTGGCGG CAGAGTCGTG GCTCATTTTG
301 TGA ACTGTAT AAATGC GCGC TCTGCTGTCT AACCTGTCTT GGTTGAAGCT
351 TGATGTGTCA ATGCATCTGA TGCAAATTTT GGTGCGCTTG CGTACTATTC
401 CTGACCTCGG ATCAGACGTG AATACCCGCT GAATTTAACC ATAA
```

พยาธิ *F. gigantea*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ *F. gigantea* ที่ได้มีขนาด 533 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   GCGGATTAAT ATTGAGTGAG CATACTGTGT GATTAATGCA AACTGCATAC
51  TGCTTTTGAAC ATCGACATCT TGAACGCATA TTGCGGCCAT GGGTTAGCCT
101 GTGGCCACGC CTGTCCGAGG GTCGGCTTAT AAACATCAC GACGCCAAA
151 AAGTCGTGGC TTGGGTTTTG CCAGCTGGCG TGATCTCCTC TATGAGTAAT
201 CATGTGAGGT GCCAGATCTA TGGCGTTTCC CTAATGTATC CGGATGCACC
251 CTTGTCTTGG CAGAAAGCCG TGGTGAGGTG CAGTGGCGGA ATCGTGGTTT
301 AATAATCGGG TTGGTACTCA GTTGT CAGTG TGTTCGGCGA TCCCCTAGTC
351 GGCACACTCA TGATTTCTGG GATAATTCCA TACCAGGCAC GTTCCGTTAC
401 TGTTACTTTG TCATTGGTTT GATGCTGAAC TTGGT CATGT GTCTGATGCT
451 ATTT CATATA ACGACGGTAC CCTTCGTGGT CTGTCTTCCT GACCTCGGTT
501 CAGACGTGAT TACCCGCTGA ATTTAAGAAT AAA
```

พยาธิ *O. viverrini*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ *O. viverrini* ที่ได้มีขนาด 470 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   TCGAAGCTGA AAGGGGCGCT GCCTACTGTG TGATTAATGC GAACTGCATA
51  CTGCTTTGAA CATCGACATC TTGAACGCAT ATTGCGGCCA TGGGTTTGCC
101 TGTGGCCACG CCTGTCCGAG GGTTCGGCTTA TAAACTATCA CGACGCCCAA
151 AAAGTCGTGG CTTGGGTCTT GCCAGCTGGC ATGATTTCCC CGCGCAATTG
201 TGTGGGGTGC CGGATCTATG GCTTTTCCCC AATGTGCCGG ACGCAACCAT
251 GTCTGGGCTG ACTGCCTAGA TGAGGGGGTG GCGGCGGAGT CGTGGCTCAA
301 TTGTTGTTAT TGTTGTTGTG AATGCGCGCG CTCCGTTGTT GTTCCTTTGT
351 CTTTGGTTGA GGCTCCAGTA GTGGCAATGC ATTCGATGCA AATCGGTTTT
401 GCACTTTGGT GCTTAACAAC TTTCCCTGACC TCGGATCAGA CGTGATTACC
451 CGCTGAATTT AAGAATAAAN
```

พยาธิ *Prosthodiplostomum* sp.

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ *Prosthodiplostomum* sp. ที่ได้มีขนาด 461 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   CCGGGGCTTG GTGAGGAGGA GCTACTGTGT GATTAATGTG ACCTGCGGAA
51  TGCTTTTGAAC ATCGACATCT TGAACGCATA TTGCGGCCGC GGGATATCCC
101 GTGGCCACGC CTGGCCGAGG GTCGGCTTAT CATTATCAC GACGCCAAT
151 TAGTCGTGGC TTGGAAGTTG TGCCAGCTGG CTTGTTTTCC CCAATTATGG
201 GGTGCTGTGC TATGGCTCCT TCCTAATGTG TCCGTTACA TCCAACGTGG
251 GATTTGATTC TCGGGTTGGG ATGTGGTGTG GGATATTGCA TGAGTCGTGG
301 CTCAATGACT TGATCGCGCT CATGCCTTGT TCACGCTATG TTCCATTTCCG
351 GTGATCGGTT CCATATAATG GGCAATGTAA CTGATGCGGT GTGCGTACGC
```

401 ACCCTATTAT TGACCCTGAC CTCGGATCAG ACGTGAATAC CCGCTGAATT
451 TAAGAATAAA A

Pleurolophocercous cercaria

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Pleurolophocercous cercaria ที่ได้มีขนาด 465 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

1 GTGGTCGAAA GAGGGCGCAG CCACTGTGTG ATTAATGTGA ACTGCATACT
51 GCTTTGAACA TCGACATCTT GAACGCACAT TGCGGCCATG GGTTTTCTTG
101 TGGCCACGCC TGTCCGAGGG TCGGCTTATA AACTATCACG ACGCCCAAAA
151 AGTCGTGGCT TGGGTCTTGC CAGCCGGCGT GATTTCTTGTG TGCTTTGCAT
201 GGGGTGCCGG ATCTATGGCT TTTCCCTAAT GTGCCGGACG CAACCATCTC
251 CAGGCTGGCG GTCTGGATGA GGAAGTGGCG GCGGAGTCGT GGCTCAATGA
301 TACATATATA TATATATATA ATGCGCGCTC CGTTGTCTAT TCCTTGTCTG
351 TGATCTCGGC ATTGGGTTTG GCAATGCATC CGATGCAAAC ATTGCACGCG
401 TTTCTAATGT GTGCTATTTT CCTGACCTCA GATCACACGT GAATACCCGC
451 TGAATTTAAG CATAA

Parapleurolophocercous cercaria

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Parapleurolophocercous cercaria ที่ได้มีขนาด 441 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

1 GCGATTGAGA GCGCAGCCAC TGTGTGATTA ATGTGAACTG CCTACTGCTT
51 TGAACATCGA CATCTTGAAC GCATATTGCG GCCATGGGTT TTCCTGTGGC
101 CACGCCTGTC CGAGGGTCGG CTTATAAACT ATCACGACGC CCAAAAAGTC
151 GTGGCTTGGG TCTTGCCAGC TGGCGTGATT TCCCTGTGCT TTTGTGTGGG
201 GTGCCAGATC TATGGCTTTT CCTTAATGTG CCGGACGCAT CCACATTCCG
251 GCTGTATAACC GGGATGAGGA AGTGGCGGCA GAGTCGTGGC TCAATTTGTG
301 AACTGTATAA ATGCGCGCTC TGCTGTCTAA CCTGTCTTGG TTGAAGCTTG
351 ATGTGGCAAT GCATCTGATG CAAATTTTGG TGCCTTGGC TACTATTCCT
401 GACCTCGGAT CAGACGTGAA TACCCGCTGA ATTTAAGCAT A

Xiphidiocercaria

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Xiphidiocercaria ที่ได้มีขนาด 417 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

1 GGGGTCTGAT GGAGCGCAGC TACTGTGTGA TTAATGTGAT CTGCATACTG
51 CCTTGAACAT CGACATCTTG AACGCATCTT GCGGCCATGG GTTAGCCTAT
101 GGCCACGCCT GTCCGAGGGT CGGCTTATAA ACTATCACGA CGCCCTTAAA
151 GTCGTGGCTT GGGTCTTGCC AACCGGCGTG ATTTCTCAG CCTGCTGTTA
201 TGGTGGTGCT GGGGTGCCGG GTCTATGGCT TCTCCCTAAT GTGTCCGGAC
251 ATCCATGTGC AACATGTGAT GGCGGAGTCG TGGCTTAATG GTTTTGC GCG
301 CGCTCCAATC ACTGGCATGG TCTCTGTCTG TTAATTTGGT TGTGTGCTC

351 AAGTGCTTCA CAGCCTATCT ACCTGACCTC GGATCAGACG TGAATACCCG
401 CTGAATTTAA GCATAAA

Distomecercaria

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Distomecercaria ที่ได้มีขนาด 865 bp

โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

1 GGGCCGGAGG AGAGTGCAGC CACTGTGTGA TTAATGTGAA CTGCATACTG
51 CTTTGAACAT CGACATCTTG AACGCATATT GCGGCCATGG GTTATCCTGT
101 GGCCACGCCT GTCCGAGGGT CGGCTTATAA ACTATCACGA CGCACAAAAA
151 GTCGTGGCTT GGGTTTTGCC AGCTGGCGTG AATTCCCCAT TGTATTGGTA
201 TATGTTATTG TGGGGTGCCA GATCTATGGC GTTTCCTAA TGTGTCCGGA
251 CGCAACCAGT TCTTGGCTAT GGCTCGATT GGGTGCGGCG GCGGAGTCGT
301 GGATTAATAT GGCTATGCCC CGTTTTTCAGT GTGCTTGGCG CAATCCTAGT
351 CGGCATACTT ATGATTACGG GTGGAGCTGT TATTCGGGTT GGTACCTCGT
401 TATCAGCGTG TTTGGCGCGA TCCTAGTCGG CATGCTTATG ATCTCGAGGG
451 TAATTCCATA CCATACGCGT TCCGTCGTCG TCCTCCTTCG TGGGTTGTAT
501 GTTGGGAGAT GGTCCAGTGT CTGTTGACTG ATGAATTTGT CGGGACGCAA
551 CTGTGTTGTG TGGAAGGTCT TGTCAGAGTC CAGTGTTGGA GCGTTGGTTA
601 TTTTGGCTAT GCCCCGTTTT CGGTGTGTCC GCGCAATCC TAGTCGGCAT
651 GCTTACGATT ACGGGTGGAG CTTTTTCGGA TTGGTTTCCC GTTTCAGTG
701 TATTTGGCGC GATCCTAGTC GATAACTTA TGGCTTCGGG TATAATTCCA
751 TGTCAGGCGC GCTCCTCATT GGTTCCTTTG ATTTAGGCTG GAAGCCTCAC
801 GTTGCATGTG TTCCGCATTC CTGACCTCGG ATCAGACGTG AATACCCGCT
851 GAATTTAAGC ATAAA

Monostomecercaria

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Monostomecercaria ที่ได้มีขนาด 451 bp

โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

1 CGGTCGGATG AGATGCAGCC ACTGTGTGAT TAATGTGAAC TGCTTACTGC
51 TTTGAACATC GACATCTTGA ACGCACATTG CGGCCACGGG TTAGCTCGTG
101 GCCACGCCTG TCCGAGGGTC GGCTTATAAA CTATCACGAC GCCCAAATAG
151 TCGTGGATTG GATTTTGCCA GCTGGCGTGA TTTCTCTGT GCTAATTTGC
201 ACGTGAGGTG CCGGATCTAT GGCTTTTTCC CAATGTACTC GAGACAACC
251 ACTTCGTGCT GGTGGCACGG ATGATGGTGT TCGGATAGAG TCGTGGCTCA
301 ATGGTATATG TATGTGAAAG CACGTTCTAT CAATACGCCT TGTTTTGTCC
351 GCTAGAATGG ATGGTGGCAA TGTGCTTGCA CTGTACTTGT GACTGATAAG
401 TCACTTTCCT GACCTCGGTT CAGACGTGAA TACCCGCTGA ATTTAAGCAT
451 A

Echinostomecercaria

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Echinostomecercaria ที่ได้มีขนาด 599 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   TGGTCTAATG AGAGCGCAGC CACTGTGTGA TTAATGTAAA CTGCATACTG
51  CTTTGAACAT CGACATCTTG AACGCATATT GCGGCCATGG GTTAGCCTGT
101 GGCCACGCCT GTCCGAGGGT CGGCTTATAA ACTATCACGA CGCCCAAAAA
151 GTCGTGGCTT GGGTTTTGCC AGCTGGCGTG ATTTCCCTCTG TGACTTGTCA
201 CGTGAGGTGC CAGATCTATG GCGTTTCCCT AATGTATCCG GACGCATCCT
251 TGTCTTGGCT GAAAGCCATG GTAGGGTGTG GTGGCGGAAT CGTGGTTTAA
301 TATGACTATG CCCC GTTTTC AGCATGTTTG GCGATCTCCT AGTCGGCATG
351 CATATGACTA CGGGTGGAGT TATGATCGGG TTGGTACCTC GTTTTCAGTA
401 TGTTTGGCGC TTTCAGTCGG CATACTTATG AACTCGAGGG TAATTCCATA
451 CCAGGCACGT TCCGTTACTT TCACTCTGTC GTTGGTTGGA AGCTGGCTTG
501 GGCAATGCAT CTGATGTTAC AGATTGATTA ACAGTTGCCT GTTGGCACTG
551 TTTCCCTGACC TCGGTT CAGA CGTGATTACC CGCTGAATTT AAGCATAAA
```

Furcocercouscercaria

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Furcocercouscercaria ที่ได้มีขนาด 499 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   GTCGAATGAA GGTGCAGCCA CTGTGTGATT AATGTGAACT GCATAATGCT
51  TTGAACATCG ACATCTTGAA CGCATATTGC GGCCGCGGGA TATCCCGTGG
101 CCACGTCTGG CCGAGGGTCG GCTTATAAAA TATCACGACG CCCAAAAAGT
151 CGTGGCCTGG AAGCGTGCCA GCTAGCGTGA TTTCCCCTAG GCGCAATTCA
201 GCAATGATTT GTGCTTAAGG GGTGCTAGTC TATGGCTCCT TCCCAATGTG
251 TCCGTTTACA ACCACGTCTA AGCACTTCAC AAGGTCGTAG GTGTGCATCG
301 GGCTGTACAT GGGTCGTGGC TCAATGTTTT GATCACGCTC ATGTAACAGC
351 CTTGCAATAC ACGGGCCGAC TGGGGTGATT GCTAGGCTGT GGCAATGTAA
401 CTCGAGGCTA TAAATGTTGA GGCAAACATG GTGTACAAAG CATGCCTCTA
451 TGACCCTGAC CTCGGATCAG TCGTGAATAC CCGCTGAATT TAAGCATAA
```

Transversotrema cercaria

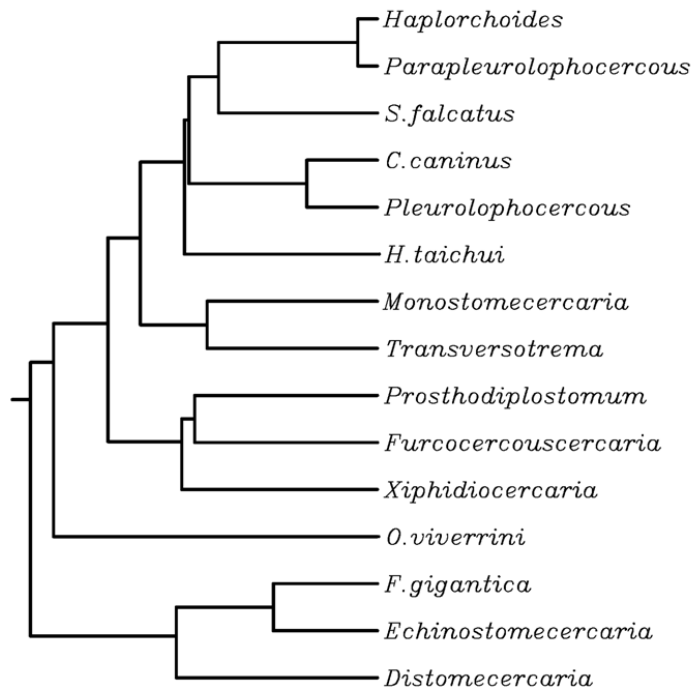
ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 ของพยาธิ Transversotrema cercaria ที่ได้มีขนาด 372 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   GGGTCGAAGG AGAGCGCAGC GACTGTGTGA TTAATGTGAA CTGCTTCCTG
51  CCATGAACAT CGACAACCTG AACGCACATT GCGGCCATGG GTTAGCCTGT
101 GGCCACGCCT GTCCGAGAGT CGGCTTATAA ACTATCACGA TGCTCAAAAA
151 GTCGTGGCTT GGGAGTCTGC CAGCTGACAT TGTCAGATCT GTGGCTTCTC
201 TCTAATTCAT CCAAAGAACA CCTTTGCGGT TGTGGACGGA GTCGTGGCTT
251 AGTGTATGCA GACAGCTCAT GCCTCGTTCA CCAACCTTGT TTTGGTTTAT
```

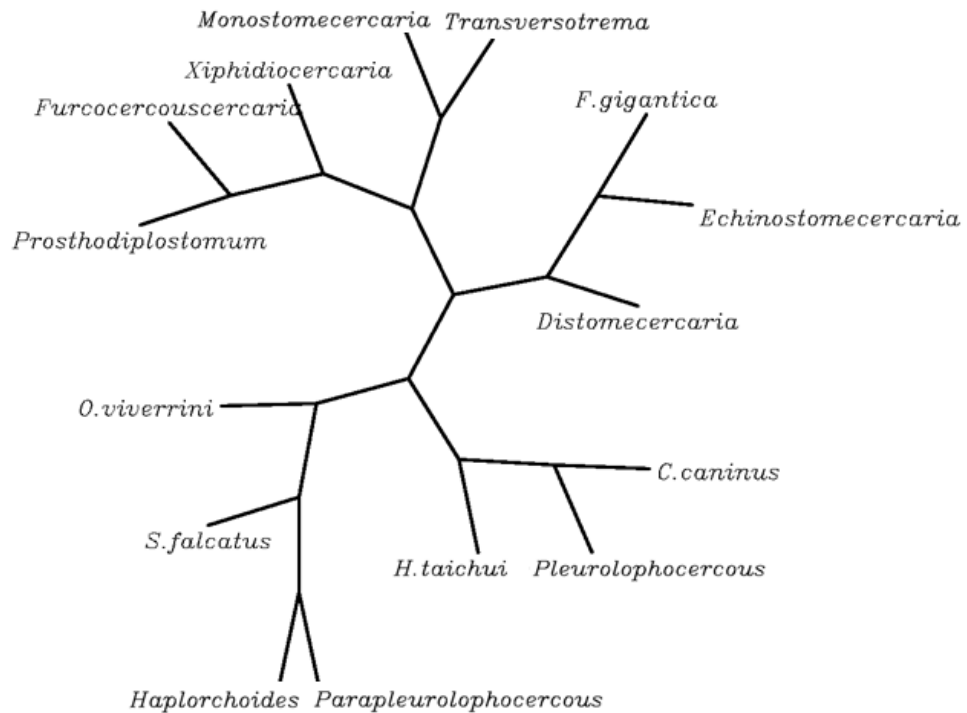
301 TTTGGTGTG GGATGTTGCC TTTTATCCT GACCTCGGAT CAGACGTGAA
351 TACCCGCTGA ATTTAAGCAT AA

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิ โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) และ Neighbour-joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม clustal w ทำให้ได้ phylogenetic tree ดังนี้

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิ โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) และวิธี Neighbour-joining (NJ) พบว่าให้ผลคล้ายคลึงกับการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จาก ISSR primer โดยพยาธิในวงศ์ Heterophyidae มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria เช่นเดียวกัน (ภาพ 33-34)

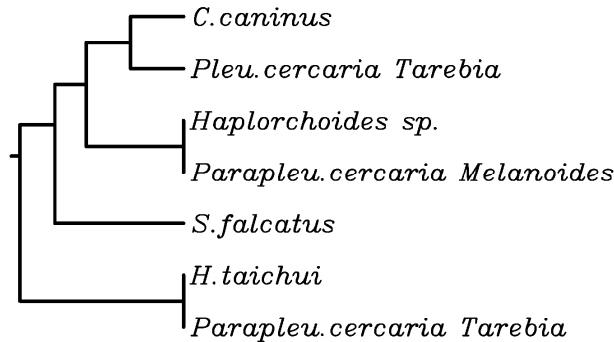


ภาพ 33 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ บริเวณ ITS-2 ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี UPGMA



ภาพ 34 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS-2 ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี NJ

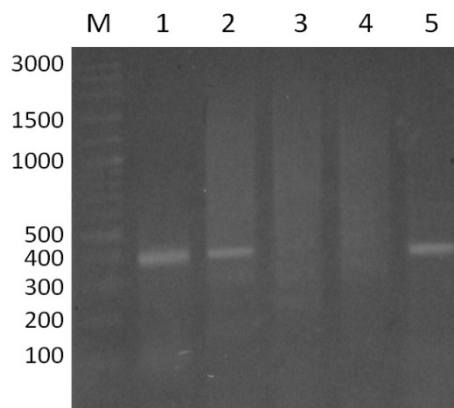
ผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าพยาธิในวงศ์ Heterophyidae ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* และ *Haplorchooides* sp. มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียมี 2 รูปแบบ คือ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria ซึ่งเซอร์คาเรียเหล่านี้พบในหอย *Melanoides tuberculata* และ *Tarebia granifera* เมื่อนำเซอร์คาเรียทั้ง 2 รูปแบบที่พบในหอยต่างชนิดกันมาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน ITS-2 พบว่า parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *Melanoides tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *Haplorchooides* sp. ขณะที่ parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *Tarebia granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *H. taichui* สำหรับพยาธิ *S. falcatus* พบมีความใกล้เคียงกับ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria ที่พบทั้งในหอย *Melanoides tuberculata* และ *Tarebia granifera* นอกจากนี้หอย *Tarebia granifera* ยังพบ pleurolophocercous cercaria ที่มีความใกล้เคียงกับพยาธิ *C. caninus* (ภาพ 35)



ภาพ 35 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS-2 ของ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *M. tuberculata* และ *Ta. granifera*

4.8 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน cytochrome c oxidase I (COX I)

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COX I ของพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบใหม่ปลา 5 ชนิด ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus*, *Haplorchoides sp.* และ *Opisthorchis viverrini* โดยใช้ไพรเมอร์ Tre_COX R (5'-AAA CCA HGK RTC ATG HAA-3') และ Tre_COX F (5'-TTY GGT ATD RTD AGD CA-3') ได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบใน Genbank พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิจำนวน 3 ชนิด คือ *H. taichui*, *S. falcatus* และ *Opisthorchis viverrini* ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 400 bp (ภาพ 36)



ภาพ 36 แถบดีเอ็นเอบริเวณ COX I ของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ Tre_COX R และ Tre_COX F ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 400 bp

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides sp.*, lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

พยาธิ *H.taichui*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COX I ของพยาธิ *H.taichui* ที่ได้มีขนาด 374 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   TGCCGGGGTT CGGTATAGTG AGACACATTT GTAGGACGTT AACAAATAAA
51  GATTCCTTGT TTGGTTATGG GGGTTTAGTT CTTGCTATGT TTTCTATAGT
101 CTGTTTGGGG AGTGTGTTTT GAGCTCATCA TATGTTTATG GTTGGGTTGG
151 ATGTTAAGAC GGCTGTTTTT TTTAGTTCTG TGACCATGGT TATAGGAGTC
201 CCCACAGGTA TAAAGGTTTT TTCTTGGCTG TATATGTTGG CGGGAAGTCG
251 GGGCCGGTTF TGGGATCCGA TAATGTGGTG GATATTGGGT TTTATTGTCT
301 TATTTACTAT CGGGGGGGTG ACCGGGATTG TGTTGTCTTC TTCTATAATG
351 GATACTTTGT TGCATGACAC TTGG
```

พยาธิ *S.falcatus*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COX I ของพยาธิ *S.falcatus* ที่ได้มีขนาด 376 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

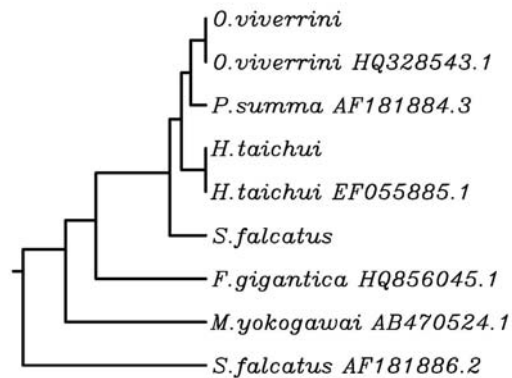
```
1   CCTGGTTTTG GTATGGTAAG TCATGTGTGT AGTAAATTAG GCTGTTTATA
51  TGATACTTTT GGTTTTTATG GTTTATTATT TGCTATGTTT TCTATAGTGT
101 GTTTAGGTAG CGTGGTTTGG GGTCCACCACA TGTTTACTGT GGGGTTGGAC
151 GTGAAGACTG CTGTTTTTCTT TAGTTCTGTG ACTATGATTA TTGGGGTTCC
201 CACGGGTATA AAGGTGTTTT CTTGGCTTTA TATGATTTTA AATAGTCGTG
251 CTTCTGTTGC TGAGCCTGTG TTTTGATGGG TTTTATCCTT TATTGTGTTG
301 TTTACTATGG GTGGTGTAC TGGTATAATT CTTTCTGCTT GTGTGTTGGA
351 TAAAATCTTG CATGACACGT GGTTTG
```

พยาธิ *O.viverrini*

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COX I ของพยาธิ *O.viverrini* ที่ได้มีขนาด 312 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

```
1   TGTTCGGTTA TGGTGGTTTT GTGTTGGCCA TGTTTGCTAT AGTCTGTTTA
51  AGAAGGGTGG TTTGGGCTCA TCATATGTTT ACGGTTGGGC TGGATTTGGG
101 CACCGCTGTG TTTTTTACCT CGGTTACTAT GATTATAGGG GTTCCACTG
151 GAATAAAGGT TTTTCTTGG TTGTATATGC TTGCGGGTAC TCGTGAGCGT
201 TTTTGGGACC CGATTATGTG GTGGATAGTT GGGTTCGTAG TACTTTTTAC
251 TATAGGGGGG GTTACTGGTA TAGTTCTTTC TGCTTCGGTT ATAGATGCTT
301 TGTTCATGTA CA
```

จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใน Genbank (ภาคผนวก ก) และนำไปหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า พยาธิ *H. taichui* และ *O. viverrini* (พยาธิที่ใช้เปรียบเทียบ) เป็นพยาธิชนิดเดียวกันกับพยาธิที่พบใน Genbank ขณะที่พยาธิ *S. falcatus* กลับมีความแตกต่างกันกับพยาธิที่พบใน Genbank (ภาพ 37)



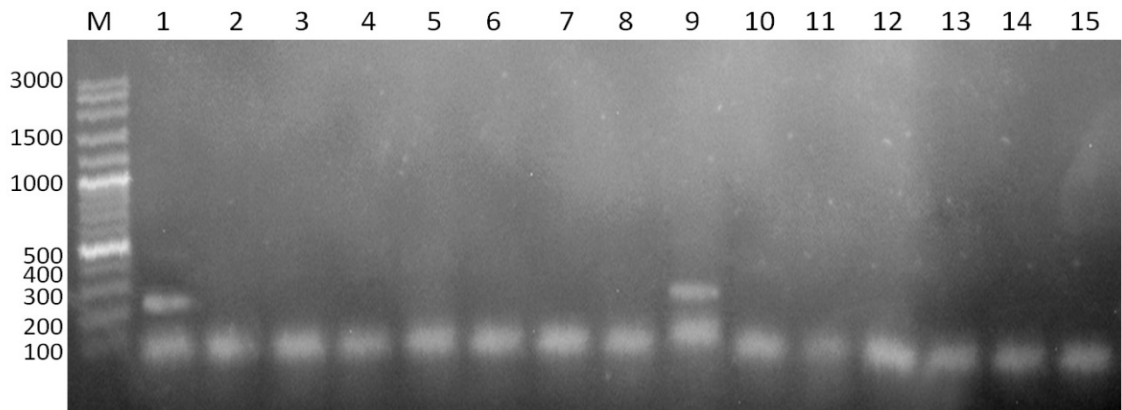
ภาพ 37 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ COX I gene ของพยาธิที่พบเปรียบเทียบกับพยาธิใน Genbank

4.8 การตรวจสอบพยาธิที่สำรวจพบโดยใช้ไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer)

การตรวจสอบผลการติดพยาธิด้วย specific primers โดยใช้ specific primer จำนวน 5 คู่ของพยาธิ *H. taichui*, *S. falcatus*, *Haplorchoides* sp. *C. caninus* และ *O. viverrini* ผลการตรวจสอบโดยใช้ specific primer มีผลดังนี้

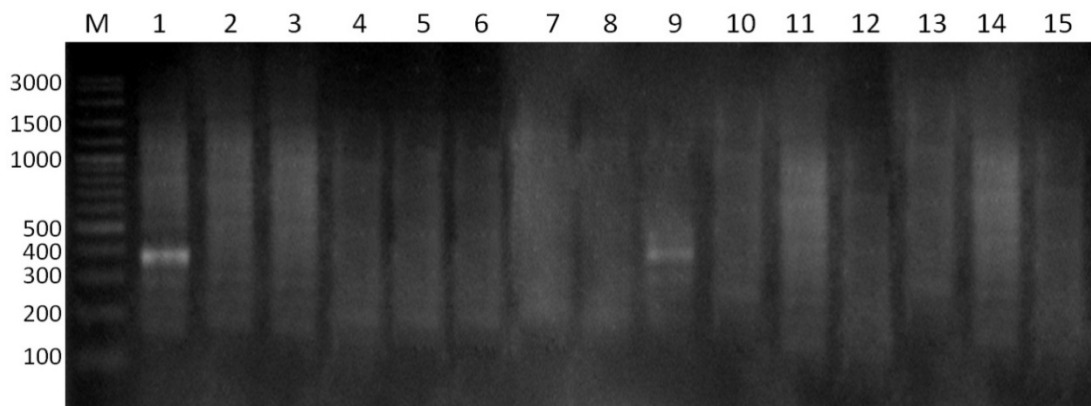
พยาธิ *H. taichui* ทำการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Hapt-F: 5'-GGC CAA CGC AAT CGT CAT CC-3' และ Hapt-R: 5'-GCG TCG GGT TTC AGA CAT GG-3' (Wongsawad *et al.*, 2009) สามารถ amplify และทำให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 256 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *H. taichui* และ *parapleurolophocercous* cercaria แสดงว่า *parapleurolophocercous* cercaria ที่พบในหอย *Ta. granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *H. taichui* (ภาพ 38)

พยาธิ *S. falcatus* ทำการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ St-F 5'-GGC CAA CGC AAT CGT CAT CC-3' และ St-R 5'-GCG TCG GGT TTC AGA CAT GG-3' (Wongsawad, 2011) สามารถ amplify และทำให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 380 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *S. falcatus* และ *parapleurolophocercous* cercaria แสดงว่า *parapleurolophocercous* cercaria ที่พบในหอย *M. tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *S. falcatus* (ภาพ 39)



ภาพ 38 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ Ht-R1 และ Ht-F1

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *H. taichui*, lane 2: *S. falcatus*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantea*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



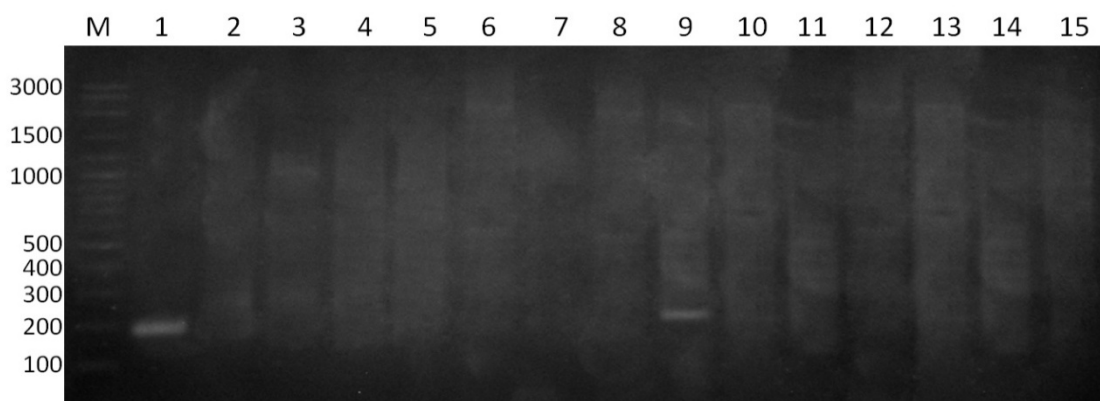
ภาพ 39 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ St-R และ St-F

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *S. falcatus*, lane 2: *H. taichui*, lane 3: *Haplorchoides* sp., lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantea*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria

นอกจากนี้ได้ออกแบบ specific primer จากกระบวน HAT-RAPD PCR ของพยาธิ *Haplorchoides* sp. และ *C. caninus* ได้แก่ โพรเมอร์ HPC-F1: 5'-CCA AAA AGT CGT GGC TTG GG-3' และ HPC-R1: 5'-ACA GGT TAG ACA GCA GAG CG-3' และ CC-F: 5'-CCA AAA AGT CGT GGC TTG GG -3' และ CC-R: 5'- GTG TGA TGA GAG GTC GGG AA-3' โดยให้ผลการตรวจสอบดังนี้

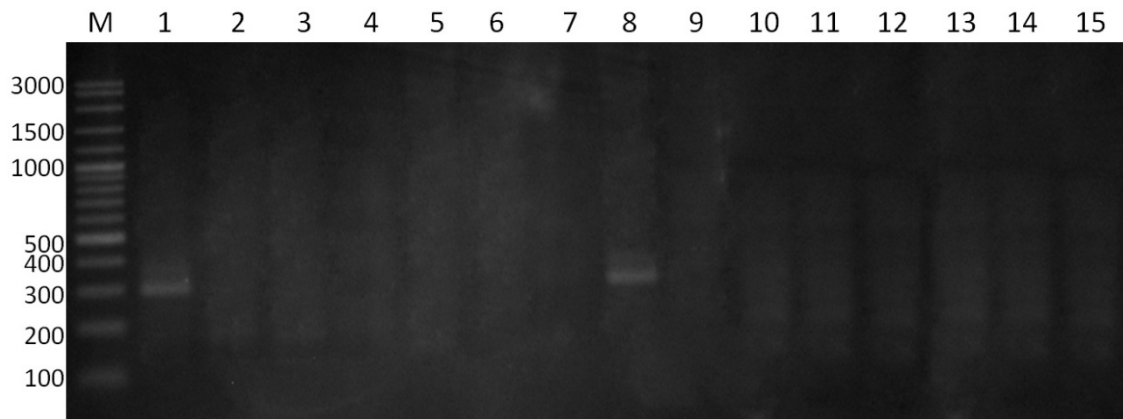
พยาธิ *Haplorchoides* sp. ทำการตรวจสอบด้วยโพรเมอร์ HPC-F1 และ HPC-R1 สามารถ amplify และทำให้ PCR product ขนาดประมาณ 195 bps จากการตรวจสอบพบว่าโพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *Haplorchoides* sp. และ *parapleurolophocercous* cercaria แสดงว่า *parapleurolophocercous* cercaria ที่พบในหอย *M. tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *Haplorchoides* sp. (ภาพ 40)

พยาธิ *C. caninus* ทำการตรวจสอบด้วยโพรเมอร์ CC-F และ CC-R สามารถ amplify และทำให้ PCR product ขนาดประมาณ 292 bps จากการตรวจสอบพบว่าโพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *C. caninus* และ *pleurolophocercous* cercaria แสดงว่า *parapleurolophocercous* cercaria ที่พบในหอย *Ta. granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *C. caninus* (ภาพ 41)



ภาพ 40 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากโพรเมอร์ Hpc-R1 และ Hpc-F1

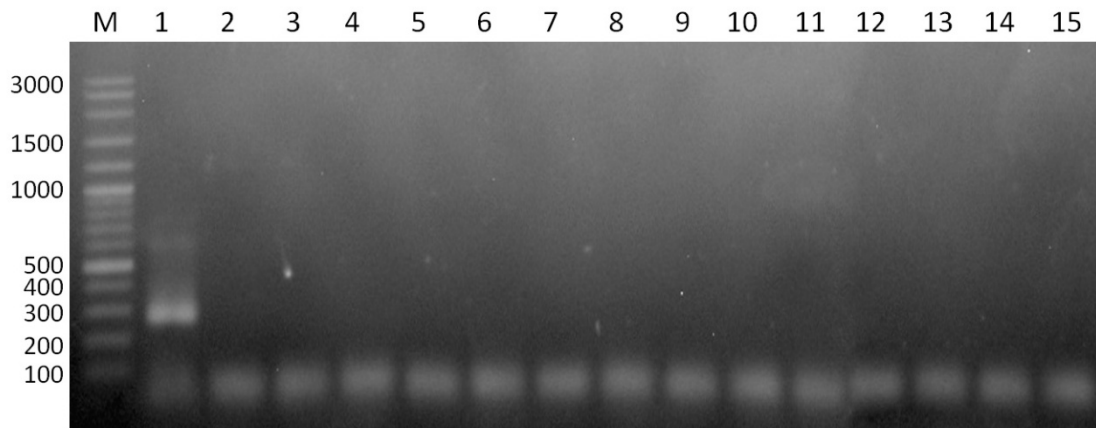
Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *Haplorchoides* sp., lane 2: *H. taichui*, lane 3: *S. falcatu*s, lane 4: *C. caninus*, lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: *pleurolophocercous* cercaria, lane 9: *parapleurolophocercous* cercaria, lane 10: *xiphidiocercous* cercaria, lane 11: *distome* cercaria, lane 12: *monostome* cercaria, lane 13: *echinostome* cercaria, lane 14: *furcocercous* cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria



ภาพ 41 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ CC-R และ CC-F1

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *C. caninus*, lane 2: *H. taichui*, lane 3: *S. falcatus*, lane 4: *Haplorchoides* sp., lane 5: *O. viverrini*, lane 6: *F. gigantea*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria

ขณะเดียวกันยังใช้ specific primer ของพยาธิ *O. viverrini* โดยใช้ไพรเมอร์ OpV-1F: 5'-AAT CGG GCT GCA TAT TGA CCG AT-3' และ OpV-1R: 5'-CGG TGT TGC TTA TTT TGC AGA CAA-3' (Wongsawad and Wongsawad, 2012) สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 330 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *O. viverrini* ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (ภาพ 42)



ภาพ 42 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่พบ ซึ่งเกิดจากไฟโรเมอร์ OV-R1 และ OV-F1

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *O. viverrini*, lane 2: *H. taichui*, lane 3: *S. falcatus*, lane 4: *Haplorchoides* sp., lane 5: *C. caninus*, lane 6: *F. gigantica*, lane 7: *Posthodiplostomum* sp., lane 8: pleurolophocercous cercaria, lane 9: parapleurolophocercous cercaria, lane 10: xiphidiocercous cercaria, lane 11: distome cercaria, lane 12: monostome cercaria, lane 13: echinostome cercaria, lane 14: furcocercous cercaria, lane 15: *Transversotrema* cercaria

4.9 กิจกรรมการเผยแพร่ข้อมูล

กิจกรรมเผยแพร่ข้อมูลคณะผู้วิจัยได้เผยแพร่ข้อมูลในบ้านท่าหลุก ตำบลสบเตี๊ยะ อำเภोजอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ในวันที่ 27 ตุลาคม 2555 ทั้งนี้บ้านท่าหลุกเป็นหมู่บ้านที่ตั้งอยู่ริมฝั่งแม่น้ำปิง ทำให้มีการจับปลาเพื่อการบริโภค และจำหน่ายเป็นจำนวนมาก โดยที่พฤติกรรมการบริโภคปลาของชาวบ้านนิยมบริโภคปลาดิบ ทำให้มีรายการติดพยาธิชนิดต่างๆ ในคนอยู่เป็นระยะ ทำให้คณะผู้วิจัยให้ความสนใจในการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับพยาธิที่ได้ทำการศึกษา เพื่อปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการบริโภคอาหารของชาวบ้านให้ถูกสุขลักษณะ และลดอัตราเสี่ยงของการติดพยาธิของชาวบ้าน (ภาพ 43-45)

ผลจากการสำรวจแบบสอบถามพบว่าผู้ให้ข้อมูลในการกรอกแบบสอบถามจำนวน 86 คน พบว่าเป็นชายจำนวน 72.10% และเพศหญิง 27.91% ส่วนใหญ่มีอายุอยู่ในช่วง 41-50 ปี (53.49%) รองลงมาอยู่ในช่วง 50 ปีขึ้นไป (27.91%) และน้อยที่สุดอยู่ในช่วง 31-40 ปี (20.93%) ด้านการศึกษาส่วนใหญ่อยู่ในระดับประถมศึกษา (76.74%) ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทำการเกษตร (67.44%) รองลงมาเป็นอาชีพรับจ้าง (13.95%) ส่วนใหญ่มีรายได้ต่อเดือนมากกว่า อยู่ในช่วง 2,000-5,000 บาท (55.81%) จากการประเมินเกี่ยวกับความรู้ความเข้าใจและการได้รับและเข้าถึงข้อมูลข่าวสารเกี่ยวกับการติดพยาธิ พบว่าส่วนใหญ่มีความรู้ความ

เข้าใจและรู้จักพยาธิในระดับน้อย (67.44%) ส่วนใหญ่ชาวบ้านรู้จักพยาธิจำนวน 2 ชนิด คือ พยาธิตัวดีด และพยาธิตัวกลม (56.98%) และ 3 ชนิด คือ พยาธิตัวดีด พยาธิตัวกลม และ พยาธิใบไม้ (27.91%) โดยชาวบ้านทราบถึงสาเหตุของการติดพยาธิส่วนใหญ่จำนวน 2 ข้อ ได้แก่ การรับประทานปลาดิบ และรับประทานเนื้อดิบ (70.93%) และรู้ถึงการก่อให้เกิดโรค ร้ายแรงจากการติดพยาธิอยู่ในระดับปานกลาง (52.33%) และกลัวการติดพยาธิอยู่ในระดับ มากที่สุด (67.44%) โดยอาหารที่ชาวบ้านนิยมรับประทานคือลาบปลาดิบ (32.56%) รองลงมา เนื้อดิบ (20.93%) การรับประทานอาหารที่ทำจากปลาดิบ พบว่าชาวบ้านส่วนใหญ่รับประทาน นาน ๆ ครั้ง (63.95%) และการรับประทานอาหารที่ทำจากเนื้อหรือหมูดิบนาน ๆ ครั้ง (68.60%) สำหรับความถี่ในการตรวจอุจจาระนั้นพบว่าชาวบ้านตรวจอุจจาระนาน ๆ ครั้ง (52.33%) ขณะเดียวกันยังพบว่าชาวบ้านไม่เคยตรวจอุจจาระ (9.30%) และในการรับประทาน ยาถ่ายพยาธินั้นพบว่าส่วนใหญ่รับประทานนาน ๆ ครั้ง (68.60%) ในจำนวนนี้มีผู้ที่ไม่เคยถ่าย พยาธิจำนวน 29.07%



ภาพ 43 วิทยากรได้นัดแนะ และเตรียมการเผยแพร่ข้อมูลร่วมกับหัวหน้าชุมชน และชาวบ้าน



ภาพ 44 วิทยากรอธิบายสาเหตุการติดพยาธิ พร้อมทั้งวิธีการป้องกันการติดพยาธิ



ภาพ 45 วิทยากรอธิบายวิธีการกรอกแบบสอบถาม และแจกแบบสอบถามแก่ชาวบ้าน

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาอัตลักษณ์ทางอนุชีววิทยาและการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้ วงศ์ Heterophyidae ในลุ่มน้ำปิงตอนบน เป็นการศึกษาเพื่อปกป้องบอกคุณลักษณะเฉพาะตัวของพยาธิ โดยการนำเทคนิคทางอนุชีววิทยาใหม่ ๆ คือ ISSR marker, Specific primer ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของบริเวณ Internal Transcribed Spacer Subunit 2 (ITS-2) และ Cytochrome C Oxidase (COX I) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของพยาธิ ร่วมกับการศึกษาอัตราการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในปลา และหอย และการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของพยาธิเพื่อประเมินสภาวะการระบาด จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาการระบาดเชิงพื้นที่ (spatial distribution) โดยการจัดทำแผนที่การระบาดของพยาธิ ซึ่งในปัจจุบันถือว่ามีความจำเป็นต่อการวางแผนการควบคุมการระบาดของพยาธิในคน รวมทั้งการระบาดในโฮสต์ กึ่งกลาง เช่น ปลา และหอย โดยกำหนดพื้นที่ศึกษาในลุ่มน้ำปิงตอนบน ทั้งหมด 10 จุดเก็บ ตัวอย่าง ตลอดจนแม่น้ำปิง และแม่น้ำสาขา ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และตาก

การศึกษากการระบาดของพยาธิในปลาแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ ระยะเมตาเซอร์คาเรีย จำนวน 5 ชนิด แบ่งเป็นพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae 4 ชนิด ได้แก่ *Haplorchis taichui*, *Haplorchoides* sp., *Stellantchasmus falcatus*, *Centrocestus caninus*. และพยาธิใบไม้วงศ์ Diplostomatidae 1 ชนิด ได้แก่ *Posthodiplostomum* sp. โดยพบว่าในจุดเก็บ ตัวอย่างอำเภอแม่แตงมีค่าความชุกกรรมของพยาธิสูงที่สุด เท่ากับ 68.00% และจุดเก็บตัวอย่าง ในอำเภอดอยเต่ามีค่าความชุกกรรมน้อยที่สุด เท่ากับ 33.96% สำหรับพยาธิที่พบการระบาดใน อัตราที่สูง และพบทุกจุดเก็บตัวอย่าง คือ *Haplorchoides* sp. และ *H. taichui* ซึ่งพบมากในกลุ่ม ปลาเกล็ดขาว ซึ่งสอดคล้องกับ Kumchoo *et al.* (2005) รายงานว่าโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 ที่มีความจำเพาะเจาะจง ต่อ *H. taichui* สูงมาก คือ ปลาสร้อยขาว (*Henicorhynchus siamensis*) โดยมีการแพร่กระจายตามแหล่งน้ำทั่วไป และเป็นปลาที่ชาวบ้านนิยมนำมาบริโภคมากที่สุด ปลาในกลุ่มนี้เป็นปลาที่มีการกระจายตัวอยู่เป็นจำนวนมากในแม่น้ำปิง และแม่น้ำสาขา ส่วนพยาธิ *C. caninus* และ *S. falcatus* เป็นพยาธิที่มีค่าความชุกค่อนข้างต่ำ เนื่องจากพยาธิสอง ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อโฮสต์กึ่งกลางที่เป็นปลาสูงมาก โดยพยาธิ *C. caninus* พบในเฉพาะ ปลาตะเพียนทราย และปลาชิวหนวดยาวเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับ Phalee *et al.* (2009)

รายงานพบว่าพบพยาธิชนิดนี้ในปลาตะเพียนทราย แต่แตกต่างกับรายงานของ Srisawangwong *et al.* (1997) และ Gjurcevic *et al.* (2007) รายงานการพบพยาธิชนิดนี้ในปลาทอง ขณะที่พยาธิ *S. falcatus* พบเฉพาะในปลาเข้ม และพบในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอบ้านโสังเพียงจุดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจของ Sripalwit *et al.* (2003) สำรวจพบพยาธิ *S. falcatus* จำนวนมากในปลาเข้ม นอกจากนี้ยังพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้วงศ์ Diplostomatidae 1 ชนิด ได้แก่ *Posthodiplostomum* sp. ซึ่งตรงกับรายงานการวิจัยของ ชโลบล และคณะ (2543) มีการพบพยาธิชนิดนี้ในปลาเข้มเช่นเดียวกัน ทั้งนี้จากการศึกษาการระบาด ของพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ในปลา ทำให้พบการระบาดของพยาธิใบไม้มีอัตรา ค่อนข้างสูงในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำปิงตอนบน โดยพบพยาธิที่มีความสำคัญทางการแพทย์จำนวน 3 ชนิด คือ พยาธิ *H. taichui*, *C. caninus* และ *S. falcatus* พยาธิเหล่านี้สามารถติดเชื้อในคน และสัตว์เลี้ยงได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Wongsawad *et al.* (2012) ศึกษาการติดพยาธิใน อุจจาระของคนจากอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พบไข่ของพยาธิ *H. taichui* เป็นส่วนใหญ่ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าพยาธิเหล่านี้ที่พบในปลาสามารถติดไปยังคนในพื้นที่ได้ การระบาดของ พยาธิเหล่านี้ในอัตราสูงในพื้นที่ทำให้คน และสัตว์เลี้ยงมีอัตราเสี่ยงสูงต่อการติดพยาธิใน กลุ่มนี้สูงตามไปด้วย

สำหรับการศึกษาการระบาดของพยาธิในหอยพบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิ ใบไม้ ทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ xiphidiocercaria, monostome cercaria, distome cercaria, pleurolophocercous cercaria, parapleurolophocercous cercaria, echinostome cercaria, furcocercous cercaria และ transversotrema cercaria ค่าความชุกกรรมของเซอร์คาเรียที่พบใน หอยแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พบว่าจุดเก็บตัวอย่างอำเภอแม่แตง มีค่าความชุกกรรมมากที่สุด เท่ากับ 38.16% รองลงมาคือ จุดเก็บตัวอย่างอำเภอป่าซาง เท่ากับ 30.65% และจุดเก็บ ตัวอย่างที่มีค่าความชุกกรรมน้อยที่สุด คือ อำเภอพร้าว มีค่าเท่ากับ 11.76% ซึ่งจากการศึกษา ทางอณูชีววิทยาสามารถยืนยันได้ว่า parapleurolophocercous cercaria และ pleurolophocercous cercaria เป็นตัวอ่อนของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae สอดคล้องกับ การศึกษาของ Chuboon and Wongsawad (2009) โดยใช้ HAT-RAPD PCR พบว่า pleurolophocercous cercaria เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *H. taichui* จากผลการศึกษาดังกล่าว สอดคล้องกับการศึกษาการระบาดในปลา ซึ่งส่วนใหญ่พบพยาธิใบไม้ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. ในการศึกษาครั้งนี้พบ parapleurolophocercous cercaria ในหอยทุกจุดเก็บ ตัวอย่าง และมีอัตราการระบาดในอัตราที่สูงกว่าเซอร์คาเรียแบบอื่นๆ การระบาดของเซอร์

คาเรียในหอยในอัตราสูงทำให้โอกาสของพยาธิที่ส่งผ่านไปยังโฮสต์กึ่งกลางในลำดับต่อไป เช่น ปลา สูงตามไปด้วย

การศึกษาการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae นั้น เมื่อนำข้อมูลการระบาดของพยาธิที่พบในปลา และหอยมาสร้างเป็นแผนที่การระบาด เพื่อศึกษาแนวโน้มการระบาด โดยใช้โปรแกรม ArcGis ver. 9.3 ทำให้ได้แผนที่การระบาด และทราบแนวโน้มการระบาดของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ โดยพบว่าในกลุ่มน้ำปึงตอนบน มีการระบาดของพยาธิใบไม้ในกลุ่ม Heterophyidae หลายชนิด เช่น *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. โดยพยาธิ *Haplorchoides* sp. พบการระบาดในทุกจุดเก็บตัวอย่างตลอดลุ่มน้ำปึงตอนบน ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาการระบาดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ เซอร์คาเรียในหอยชนิดต่างๆ โดยพบว่า *parapleurophocercous cercaria* มีจำนวนค่อนข้างมาก และสามารถพบได้ในทุกจุดเก็บตัวอย่าง ซึ่ง *parapleurophocercous cercaria* สามารถพัฒนาไปเป็นพยาธิ *Haplorchoides* sp. ทั้งนี้ในเขตลุ่มน้ำปึงตอนบนมีแม่น้ำปึงเป็นแม่น้ำสายหลัก และมีแม่น้ำสาขาต่างๆ มากมาย เช่น แม่น้ำแม่จืด แม่น้ำแม่แตง แม่น้ำแม่กวง แม่น้ำลี และแม่น้ำแม่แจ่ม รวมไปถึงอ่างเก็บน้ำดอยเต่า และเขื่อนภูมิพล ทำให้มีการแพร่กระจายของปลาต่างมากมาย โดยเฉพาะปลาในกลุ่มปลาเกล็ดขาว ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของพยาธิใบไม้หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีหอยซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่งสามารถเจริญเติบโต และแพร่กระจายในพื้นที่ได้ตลอดเวลา ขณะเดียวกันจากแผนที่การระบาด พบว่าเขตอำเภอแม่แตง มีการระบาดของพยาธิในอัตราที่สูงกว่าจุดเก็บตัวอย่างอื่นๆ เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าวเป็นเขตพื้นที่ชลประทานของเขื่อนแม่จืดสมบูรณ์ชล ทำให้มีน้ำขังตลอดเวลาเหมาะสำหรับการแพร่กระจายของปลา และหอย ซึ่งสอดคล้องกับ Tum *et al.* (2004) พบว่าอัตราเสี่ยงจะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ใกล้แม่น้ำสายหลัก และทะเลสาบ และอัตราเสี่ยงจะลดลงเมื่ออยู่ใกล้กับแม่น้ำ และทะเลสาบ และในพื้นที่สูง

การศึกษาอัตลักษณ์ทางอนุชีววิทยาเพื่อบ่งบอกคุณลักษณะเฉพาะตัวของพยาธิ โดยการนำ DNA ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลาทั้งหมด 5 ชนิด คือ *H. taichui*, *C. caninus*, *S. falcatus*, *Haplorchoides* sp. และ *Posthodiplostomum* sp. และตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่พบในหอย ทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ *pleurolophocercous cercaria*, *parapleurolophocercous cercaria*, *monostome cercaria*, *xiphidiocercous cercaria*, *furcocercous cercaria*, *echinostome cercaria*, *distome cercaria* และ *Transversotrema cercaria* ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค Inter-Simple Sequence Repeats, ISSRs โดยใช้ ISSR primer จำนวน 10 primers ซึ่งทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic DNA)

ในช่วง 80–3000 bp และทั้ง 10 primers สามารถทำให้เกิด % polymorphic band เท่ากับ 100% เมื่อนำแถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดขึ้นในแต่ละ primer ไปแทนค่าข้อมูลให้เป็นระบบตัวเลขมาตรฐาน (0,1) เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า พยาธิวงศ์ 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) โดยการนำ DNA ของพยาธิที่สำรวจพบทั้งหมด มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BD2-R (5'-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT-3') และ 3S-F (5'-GGT ACC GGT GGA TCA CTC GGC TCG TG-3') (Bowles *et al.* 1993) สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับพยาธิที่ทำการศึกษาทุกชนิด โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วง 480–650 bp เมื่อนำแถบดีเอ็นเอไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิ ทำให้ทราบว่าพยาธิในวงศ์ Heterophyidae ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียมี 2 รูปแบบ คือ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria ซึ่งพบในหอย *Melanooides tuberculata* และ *Tarebia granifera* เมื่อนำเซอร์คาเรียทั้ง 2 รูปแบบที่พบในหอยต่างชนิดกันมาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน ITS-2 โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) และวิธี Neighbour-joining (NJ) ซึ่งทั้ง 2 วิธีให้ผลการศึกษาใกล้เคียงกัน โดย parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *M. tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *Haplorchoides* sp. ขณะที่ parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *Tarebia granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *H. taichui* สำหรับพยาธิ *S. falcatus* พบมีความใกล้ชิดกับทั้ง pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria ที่พบทั้งในหอย *M. tuberculata* และ *Tarebia granifera* นอกจากนี้หอย *Tarebia granifera* ยังพบเซอร์คาเรียแบบ pleurolophocercous cercaria มีความใกล้ชิดกับพยาธิ *C. caninus*

ขณะที่การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COX I ของตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลา 4 ชนิด ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus*, และ *Haplorchoides* sp. พร้อมกับเปรียบเทียบกับพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* โดยใช้ไพรเมอร์ Tre-COX R (5'-AAA CCA HGK RTC ATG HAA-3') และ Tre-COX F (5'-TTY GGT ATD RTD AGD CA-3') โดยไพรเมอร์ดังกล่าวได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใบไม้ชนิดต่างๆ ใน Genbank

พบว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิจำนวน 3 ชนิด คือ *H. taichui*, *S. falcatus* และ *Opisthorchis viverrini* ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 400 bp เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใน Genbank พบว่าพยาธิ *H. taichui* และ *O. viverrini* เป็นพยาธิชนิดเดียวกันกับพยาธิที่พบใน Genbank ขณะที่พยาธิ *S. falcatus* กลับมีความแตกต่างกับพยาธิที่พบใน Genbank

เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาทางอณูชีววิทยาทั้ง 3 วิธี พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-2 และ COX I มีความเหมาะสมสำหรับนำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิในวงศ์ Heterophyidae เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลในระดับนิวคลีโอไทด์ โดยทั้ง 2 วิธี มีความจำเพาะและความคงตัวในการเป็น conserved region และมีความเหมือนกันในประชากรกลุ่มเดียวกัน ขณะที่การใช้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจาก ISSRs นั้น สามารถใช้เพื่อจำแนกชนิดของพยาธิเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งคล้ายกับ RAPD marker แต่ ISSRs marker มีความจำเพาะมากกว่าเทคนิค RAPD เพราะความยาวของ primers ที่ใช้ใน ISSR (16–20 bp) มีความยาวมากกว่า RAPD (10 bp) อีกประการหนึ่งคือ ISSR primers ออกแบบมาจากบริเวณที่เป็น repeated sequences ที่มีอยู่อย่างหลากหลายใน genomes เช่น (AGTG)₄ หรือ (AG)₈ ซึ่งบริเวณนี้จะมีความไวต่อการผันแปร หรือกลายพันธุ์มากกว่า coding regions (Wolfe *et al.*, 1998) แต่ทั้ง ISSRs และ RAPD มีข้อเสีย คือ ในบางครั้งแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นไม่ชัดเจน ทำให้การนับจำนวนแถบดีเอ็นเอเป็นไปได้ยากลำบาก ซึ่งการนับแถบดีเอ็นเอเพื่อนำไปคำนวณหาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตจะนับเฉพาะแถบที่ชัดเจนเท่านั้น เมื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณความแตกต่างทำให้ค่าที่ได้มีความคลาดเคลื่อน

การตรวจสอบชนิดของพยาธิที่สำรวจพบ โดยใช้ specific primer ของพยาธิแต่ละชนิด ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วยเทคนิค HAT-RAPD จำนวน 5 คู่ พบว่า specific primer ของพยาธิแต่ละชนิดที่ทำการศึกษามีความสามารถ amplify และทำให้ PCR product ที่มีขนาดต่างๆ กันของพยาธิแต่ละชนิด จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิแต่ละชนิด โดยพยาธิ *H. taichui* ทำการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Hapt-F: 5'-GGC CAA CGC AAT CGT CAT CC-3' และ Hapt-R: 5'-GCG TCG GGT TTC AGA CAT GG-3' สามารถ amplify และทำให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 256 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *H. taichui* และ *parapleurolophocercous cercaria* ซึ่งแสดงว่า *parapleurolophocercous cercaria* ที่พบใน

หอย *Tarebia granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *H. taichui* ส่วนพยาธิ *S. falcatus* ทำการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ St-F 5'-GGC CAA CGC AAT CGT CAT CC-3' และ St-R 5'-GCG TCG GGT TTC AGA CAT GG-3') ซึ่งสามารถ amplify และทำให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 380 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *S. falcatus* และ *parapleurolophocercous cercaria* ซึ่งแสดงว่า *parapleurolophocercous cercaria* ที่พบในหอย *Melanoides tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *S. falcatus* ขณะที่พยาธิ *Haplorchoides* sp. ทำการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ HPC-F1: 5'-CCA AAA AGT CGT GGC TTG GG-3' และ HPC-R1: 5'-ACA GGT TAG ACA GCA GAG CG-3' ซึ่งสามารถ amplify และทำให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 195 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *Haplorchoides* sp. และ *parapleurolophocercous cercaria* ซึ่งแสดงว่า *parapleurolophocercous cercaria* ที่พบในหอย *Melanoides tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *Haplorchoides* sp. สำหรับพยาธิ *C. caninus* ทำการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ CC-F: 5'- CCA AAA AGT CGT GGC TTG GG -3' และ CC-R: 5'- GTG TGA TGA GAG GTC GGG AA-3' ซึ่งสามารถ amplify และทำให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 292 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *C. caninus* และ *pleurolophocercous cercaria* ซึ่งแสดงว่า *parapleurolophocercous cercaria* ที่พบในหอย *Tarebia granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *C. caninus* นอกจากนี้ยังใช้ specific primer ของพยาธิ *O. viverrini* โดยใช้ไพรเมอร์ OpV-1F: 5'-AAT CGG GCT GCA TAT TGA CCG AT-3' และ OpV-1R: 5'-CGG TGT TGC TTA TTT TGC AGA CAA-3' ซึ่งสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 330 bp จากการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *O. viverrini* ที่ใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น จากการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับ Wongratanacheewin *et al.* (2001) และ Maleewong *et al.* (2003) ได้นำ primers และ probe ไปใช้ทดสอบ sensitivity ในการตรวจหาพยาธิใบไม้ตับ ทั้งในระยะไข่จากอุจจาระของสัตว์ทดลอง และจากไฮสตรังก์กลางที่ทดลอง พบว่าสามารถตรวจหาพยาธิใบไม้ตับได้ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น ซึ่งให้ตรงกับการศึกษาในครั้งหน้าที่ทดสอบการใช้ specific primers กับพยาธิชนิดอื่นๆ พบว่าไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับพยาธิชนิดอื่นเลย แสดงว่า specific primers มีความจำเพาะต่อพยาธิ *H. taichui* และพยาธิ *O. viverrini* โดยเกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 256 bp ในพยาธิ *H.*

taichui และเกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 330 bp ในพยาธิ *O. viverrini* เพียงแถบเดียว นอกจากนั้น ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่า การศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบ primer จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการ ทำ PCR ด้วยเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sripalwit *et al.*, (2003) ตามที่กล่าวมาข้างต้น แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Hamburger *et al.* (2001) ที่ออกแบบ primer มาจาก ส่วนที่เป็น highly repeat sequence ที่มีขนาด 121 bp ซึ่งพบจากการ sequence จีโนม ของพยาธิ *Schistosoma mansoni* และยังแตกต่างจากการศึกษาของ Pontes *et al.* (2002) ซึ่งใช้ส่วนที่เป็น highly repeat sequence ในการออกแบบ primer เพื่อตรวจสอบ *S. mansoni* เช่นเดียวกัน แต่ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอเป้าหมาย มีขนาด 110 bp นอกจากนั้นยังแตกต่าง จากการการศึกษาของ Hertel *et al.* (2002) ที่ได้ออกแบบ primer ในการตรวจหาพยาธิ *Trichobilhazia ocellata* จากส่วน tandem repeat DNA sequence ที่มีขนาด 396 bp ซึ่งได้จากการ sequence จีโนมของพยาธิ นอกจากนี้จะมีการใช้ข้อมูลส่วนที่เป็น repeat sequence ในจีโนม แล้ว ยังมีการการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณอื่นในการออกแบบ primer ด้วย เช่น การศึกษาของ Dinkel *et al.* (1998) ที่ใช้ส่วน mitochondrial 12S rRNA gene ในการตรวจหา พยาธิ *Echinococcus multilocularis* และให้ PCR product ที่เกิดจาก specific primer ขนาด 250 bp ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาในครั้งนี้ คือ PCR product ที่เกิดจาก specific primer ขนาด 267 bp แต่การศึกษาครั้งนี้ออกแบบ primer มาจาก species-specific HAT-RAPD marker นอกจากนี้ในการศึกษาของ Magalhaes *et al.* (2004) ที่ได้ออกแบบ specific primer ที่ใช้ ตรวจสอบพยาธิ *Fasciola hepatica* ในหอย *Lymnea columella* โดยใช้ complete mitochondrial DNA sequence จาก Genebank และตรวจสอบด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ร่วมกับ primers ที่ ไป amplify ส่วน Internal Transcribe Spacer 2 (ITS 2) เพื่อทำหน้าที่เป็น internal control ซึ่ง แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ ที่ใช้ primers เพียงคู่เดียว การใช้ primers หลายคู่ทำงานร่วมกัน ในเทคนิค multiplex PCR จะช่วยลดความผิดพลาดในการเข้าไปเกาะกับ DNA template ของ specific primers คือช่วยให้มีความแม่นยำในการเกาะกับ DNA template ในตำแหน่งที่ต้องการ ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถพัฒนาเทคนิค และวิธีการ ในการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพ มากยิ่งขึ้นได้ ในอนาคต

ผลจากการสำรวจแบบสอบถามพบว่า มีผู้ให้ข้อมูลในการกรอกแบบสอบถามจำนวน 86 คน พบว่าเป็นชายจำนวน 72.10% และเพศหญิง 27.91% ส่วนใหญ่มีอายุอยู่ในช่วง 41-50 ปี (53.49%) รองลงมาอยู่ในช่วง 50 ปีขึ้นไป (27.91%) และน้อยที่สุดอยู่ในช่วง 31-40 ปี (20.93%) ด้านการศึกษาส่วนใหญ่อยู่ในระดับประถมศึกษา (76.74%) ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพ ทำการเกษตร (67.44%) รองลงมาเป็นอาชีพรับจ้าง (13.95%) ส่วนใหญ่มีรายได้ต่อเดือน

มากกว่า อยู่ในช่วง 2,000–5,000 บาท (55.81%) จากการประเมินเกี่ยวกับความรู้ความเข้าใจ และการได้รับและเข้าถึงข้อมูลข่าวสารเกี่ยวกับการติดพยาธิ พบว่าส่วนใหญ่มีความรู้ความเข้าใจและรู้จักพยาธิในระดับน้อย (67.44%) ซึ่งส่วนใหญ่ชาวบ้านรู้จักพยาธิจำนวน 2 ชนิด คือ พยาธิตัวดีด และพยาธิตัวกลม (56.98%) และ 3 ชนิด คือ พยาธิตัวดีด พยาธิตัวกลม และพยาธิใบไม้ (27.91%) โดยชาวบ้านทราบถึงสาเหตุของการติดพยาธิส่วนใหญ่จำนวน 2 ข้อ ซึ่งได้แก่ การรับประทานปลาดิบ และรับประทานเนื้อดิบ (70.93%) และรู้ถึงการก่อให้เกิดโรคร้ายแรงจากการติดพยาธิอยู่ในระดับปานกลาง (52.33%) และกลัวการติดพยาธิอยู่ในระดับมากที่สุด (67.44%) ซึ่งอาหารที่ชาวบ้านนิยมรับประทานคือลาบปลาดิบ (32.56%) รองลงมาคือเนื้อดิบ (20.93%) การรับประทานอาหารที่ทำจากปลาดิบ พบว่าชาวบ้านส่วนใหญ่รับประทานนาน ๆ ครั้ง (63.95%) และการรับประทานอาหารที่ทำจากเนื้อหรือหมูดิบนาน ๆ ครั้ง (68.60%) สำหรับความถี่ในการตรวจจุกจุกจระนั้นพบว่าชาวบ้านตรวจจุกจุกจระนาน ๆ ครั้ง (52.33%) ขณะเดียวกันยังพบว่าชาวบ้านไม่เคยตรวจจุกจุกจระ (9.30%) และในการรับประทานยาถ่ายพยาธินั้นพบว่าส่วนใหญ่รับประทานนาน ๆ ครั้ง (68.60%) ในจำนวนนี้มีผู้ที่ไม่เคยถ่ายพยาธิจำนวน 29.07% โดยสรุปแล้วจากการได้รับข่าวสารข้อมูล ชาวบ้านมีการตื่นกลัวต่อการติดพยาธิ ในขณะเดียวกันก็ยังไม่ละทิ้งวิถีชีวิต และวัฒนธรรมในการบริโภคอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการติดพยาธิ นอกจากนี้ชาวบ้านบางส่วนก็ยังรู้จักการป้องกันและรักษาตัวเอง โดยการตรวจจุกจุกจระ กินยาถ่ายพยาธิเป็นระยะๆ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีบางคนที่ยังจัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการติดพยาธิ ไม่มีการป้องกันรักษา ซึ่งการนำเสนอผลการวิจัย และให้ความรู้ผ่านการเผยแพร่ข้อมูล เป็นการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้สู่ชาวบ้าน การมีโอกาสแลกเปลี่ยนความคิดเห็น อภิปรายผลการวิจัยร่วมกัน จึงเป็นการสร้างโอกาสและวิธีการในการแก้ปัญหาที่ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุด

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การศึกษากาการระบาดของพยาธิในปลา พบตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ จำนวน 5 ชนิด แบ่งเป็นพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae 4 ชนิด ได้แก่ *Haplorchis taichui*, *Haplorchoides* sp., *Stellantchasmus falcatus*, *Centrocestus caninus*. และพยาธิใบไม้วงศ์ Diplostomatidae 1 ชนิด ได้แก่ *Posthodiplostomum* sp. โดยพบว่าจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอแม่แตงมีค่าความชุกชุมของพยาธิสูงที่สุด เท่ากับ 68.00% และจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอดอยเต่ามีค่าความชุกชุมน้อยที่สุด เท่ากับ 33.96% สำหรับพยาธิที่มีการระบาดในอัตราที่สูง และพบทุกจุดเก็บตัวอย่าง คือ *Haplorchoides* sp. และ *H. taichui* การศึกษากาการระบาดของพยาธิในหอย พบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ ทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ xiphidiocercaria, monostome cercaria, distome cercaria, pleurolophocercous cercaria, parapleurolophocercous cercaria, echinostome cercaria, furcocercous cercaria และ transversotrema cercaria สำหรับค่าความชุกชุมของเซอร์คาเรียที่พบในหอยแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พบว่าจุดเก็บตัวอย่างในอำเภอแม่แตง มีค่าความชุกชุมมากที่สุด เท่ากับ 38.16% รองลงมาคือ จุดเก็บตัวอย่างในอำเภอป่าซาง เท่ากับ 30.65% และจุดเก็บตัวอย่างที่มีค่าความชุกชุมน้อยที่สุด คือ อำเภอพร้าว มีค่าเท่ากับ 11.76%

การศึกษากาการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae นั้น เมื่อนำข้อมูลกาการระบาดของพยาธิที่พบในปลา และหอยมาสร้างเป็นแผนที่กาการระบาด โดยพบว่าในลุ่มน้ำปิงตอนบนมีการระบาดของพยาธิใบไม้ในกลุ่ม Heterophyidae หลายชนิด เช่น *H. taichui*, *S. falcatus*, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. โดยพยาธิ *Haplorchoides* sp. พบกาการระบาดในทุกจุดเก็บตัวอย่างตลอดลุ่มน้ำปิงตอนบน

การศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาเพื่อบ่งบอกคุณลักษณะเฉพาะตัวของพยาธิ โดยการนำดีเอ็นเอของพยาธิที่พบไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค Inter-Simple Sequence Repeats, ISSRs โดยใช้ ISSR primer จำนวน 10 primers ซึ่งทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic DNA) ในช่วง 80–3000 bps และทั้ง 10 primers สามารถทำให้เกิด %polymorphic band เท่ากับ 100% เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าพยาธิในวงศ์ Heterophyidae มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria โดยที่พยาธิ *H. taichui*, *C. caninus* และ *S. falcatus* มี

ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ pleurolophocercous cercaria และ Haplorchoides sp. มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ parapleurolophocercous cercaria

สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ Internal Transcribed Spacer Subunit 2 (ITS-2) โดยการนำ DNA ของพยาธิที่สำรวจพบทั้งหมด มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BD2-R และ 3S-F สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับพยาธิที่ทำการศึกษาทุกชนิด ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วง 480-650 bps เมื่อนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิ พบว่าพยาธิในวงศ์ Heterophyidae ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatu*s, *C. caninus* และ *Haplorchoides* sp. มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียมี 2 รูปแบบ คือ pleurolophocercous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria

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

การตรวจสอบชนิดของพยาธิที่พบ โดยใช้ specific primer ของพยาธิแต่ละชนิด พบว่า specific primer ของ *H. taichui* สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะ *H. taichui* และ parapleurolophocercous cercaria ซึ่งแสดงว่า parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *Ta. granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *H. taichui* ขณะที่ specific primer ของ *S. falcatu*s มีความเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *S. falcatu*s และ parapleurolophocercous cercaria ซึ่งแสดงว่า parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *M. tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *S. falcatu*s สำหรับ specific primer ของ *Haplorchoides* sp. มีความเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *Haplorchoides* sp. และ parapleurolophocercous cercaria ซึ่งแสดงว่า parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *M. tuberculata* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *Haplorchoides* sp. และ specific primer ของ *C. caninus* มีความเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *C. caninus* และ pleurolophocercous cercaria ซึ่งแสดงว่า parapleurolophocercous cercaria ที่พบในหอย *Ta. granifera* เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *C. caninus* นอกจากนี้ยังใช้ specific primer ของพยาธิ *O. viverrini* สามารถเข้าไป

เกาะกับดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *O. viverrini* ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น

จากการออกเผยแพร่ข้อมูล พบว่าชาวบ้านมีการตื่นกลัวต่อการติดพยาธิ ขณะเดียวกันยังไม่ละทิ้งวิถีชีวิต และวัฒนธรรมการบริโภคอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการติดพยาธิ นอกจากนี้ชาวบ้านบางส่วนยังรู้จักการป้องกัน รักษาตัวเอง โดยการตรวจอุจจาระ และกินยาถ่ายพยาธิเป็นระยะๆ อย่างไรก็ตามยังมีบางคนที่ยังจัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการติดพยาธิ และไม่มีการป้องกันรักษา ซึ่งการนำเสนอผลการวิจัย และให้ความรู้ผ่านการเผยแพร่ข้อมูล และเป็นการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้สู่ชาวบ้าน การมีโอกาสแลกเปลี่ยนความคิดเห็น และอภิปรายผลการวิจัยร่วมกัน จึงเป็นการสร้างโอกาสและวิธีการในการแก้ปัญหาที่ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

- กวี วรภิน. แผนที่ความรู้ท้องถิ่นไทยภาคเหนือ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์บริษัทพัฒนาคุณภาพวิชาการ (พว.) จำกัด. กรุงเทพฯ. 2547. 88 หน้า.
- ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ อำนาจ โรจนไพบูลย์ จิราพร โรจน์ทินการ พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์ ธนู มะระยงค์ และสัชชัย สุวัฒน์คุปต์. ความหลากหลายของหนอนพยาธิในลำน้ำแม่สาอุทยานแห่งชาติ ดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่. รายงานการวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรม. 2543.
- Boonchot K, Wongsawad C. A survey of helminthes in cyprinoid fish from the Mae Ngad somboonchon reservoir, Chaing Mai province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2005; 36(1): 103–107.
- Brooker S. Spatial epidemiology of human schistosomiasis, transmission dynamics and control. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygeine*. 2007; 101:1–8.
- Bowles J, Hope M, Tiu WU, Liu SX, McManus DP. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop*. 1993; 55:217–229.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular Phylogeny of the Human Schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1995; 4(2); 103–109.
- Chaikoolvatana A, Singhasivanon P, Haddawy P. The Development of a Geographic Information System for Dengue Vector and Hemorrhagic Fever Surveillance in Northeastern Thailand. *Geoinformation Technology for Better Health*. Second International Conference on Health GIS. Bangkok Thailand. 2008; 26–33.
- Cross ER, Perrine R, Sheffield C, Pazzaglia G. Predicting are endemic for schistosomiasis using weather variables and Lansat database. *Military Medicine*. 1984; 149: 542–543.
- Chuboon S, Wongsawad C, Ruamsuk A, Nithikathkul C. Survival of *Haplorchis taichui* Metacercia in Lab-Pla, Thai Traditional Food Preparation. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2005; 36(4): 110–111.

- Dinkel A, Nickisch-Roseneck M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: Coprodiagnosis by PCR as an Alternative to necropsy. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(7): 1871–1876.
- Dover G A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*. 1982; 299: 111–117.
- Gjurcevic E, Petrinc Z, Kozaric Z, Kuzir S, Gjurcevic Kantura V, Vucemilo M, Dzaja P. Metacercariae of *Centrocestus formosanus* in goldfish (*Carassius auratus L.*) imported into Croatia. *Helminthologia*. 2007; 44: 214–216.
- Hamburger J, He-Na, Abbasi I, Ramzy R M, Jourdane J, Ruppel A. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium* : A potential tool for monitoring schistosome-infested water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65(6): 907–911.
- Hertel J, Hamburger J, Harberl B, Hass W. Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter hybridization. *Experimental Parasitology*. 2002; 101: 57–63.
- Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolutions and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*. 1991; 66: 411–453.
- Hillis DM, Davis SK. Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogenetic reconstruction. *Systematic of Zoology*. 1988; 37: 63–66.
- Kumchoo K, Wongsawad C, Chai J Y, et al. *Haplorchis taichui* metacercariae in cyprinoid fish from Chiang Mai Province. 4th Seminar on Food and Water borne Parasitic Zoonoses, 2nd International Meeting on Gnathostomiasis and Joint International Tropical Medicine Meeting. 2003: 286.
- Kumchoo K, Wongsawad C, Chai JY, Vanittanakom P, Rojanapaibul A. High prevalence of *Haplorchis taichui* metacercariae in cyprinoid fish from Chiang Mai province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2005; 36(2): 451–455.
- Le TH, De NV, Blair D, McManus DP. Mitochondrial Genomes of Parasitic Flatworms. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(5): 206–213.

- Le TH, De NV, 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; 112: 109–114.
- Magalhaes KG, Jannotti-passos LK, Cavalho OS. Detection of *Lymnea columella* infection by *Fasciola hepatica* through multiplex PCR. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2004; 99(4): 421–424.
- Maleewong W, Intapun P.M, Wongkam C, Wongsaroj T, Komsuwan T, Phumidonming W, Pongsakulchoti P. Detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected bithynid snails and cyprinoid fishes by PCR-based method. *J. Parasitol*. 2003; 126; 63–67.
- Mongkolsawat C, Kamchai T. GIS Modeling for Avian Influenza Risk Areas. *Geoinformation Technology for Better Health*. Second International Conference on Health GIS. Bangkok Thailand. 2008; 3 –7.
- Namue C, Rojanapaibul A, Wongsawad C. Occurrence of two heterophyid metacercariae *Haplorchis* and *Haplorchoides* sp. in cyprinoid fish of some district in Chiang Mai and Lamphun Province. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1998; 29(2): 401–405.
- Phalee A, Wongsawad C, Wongsawad P, Chuboon S. Infection rate of trematode, *Centrocestus caninus* (Leiper, 1913) in *Puntius brevis* from Mae Teang District, Chiang Mai Province. *Journal of Yala Rajabhat University*. 2009; 4(2): 93–99.
- Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2002; 66(2): 157–162.
- Radomyos B, Wongsaroj T, Wilairatana P, et al. Opisthorchiasis and intestinal fluke infection in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1998; 29:123–127.
- Razeghi SM, Sadrabadi ES, Dizabadi FB, Zadeh AS. Prediction of Malaria Incidence Using GIS. *Geoinformation Technology for Better Health*. Second International Conference on Health GIS. Bangkok Thailand. 2008; 17–21.
- Saenphet S, Wongsawad C, Saenphet K, Rojanapaibul A, Vanittanakom P, Chai JY. Chronological Observations of Intestinal Histopathology in Rat (*Rattus norvegicus*)

- infected with *Centrocestus caninus*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2006; 37 (suppl 3): 69–73.
- Sithithaworn P, Tesana S, Pipitgool V, Kaewkes S, Pairojgul C, Sripa B, Paupairoj A, Thaiklar P. Relationship between faecal egg count and worm burden of *Opisthorchis viverrini* in human autopsy cases. *Journal of Parasitology*. 1991; 102: 277–281.
- Sripalwit P, Wongsawad C, Chai J Y, Rojanapaibul A, Anantalabhochai S. Development of Hat–RADP Technique for the identification of *Stellanchasmus falcatius*. 4th Seminar on Food and Water borne Parasitic Zoonoses, 2nd International Meeting on Gnathostomiasis and Joint International Tropical Medicine Meeting. 2003; 289.
- Sripalwit, P, Wongsawad C, Chai JY, Rojanapaibul A, Anantalabhochai S. Development of Hat–RADP Technique for the identification of *Stellanchasmus falcatius*. 4th Seminar on Food and Water borne Parasitic Zoonoses, 2nd International Meeting on Gnathostomiasis and Joint International Tropical Medicine Meeting. 2003. p289.
- Sukontason K, Piangjai S, Muangyimpong Y, Methinitikorn R, Chaithong U. Prevalence of trematode metacercariae in Cyprinoid fish of Ban Pao district, Chaing Mai Province, Northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1999; 30: 365–370.
- Tum S, Puotinen ML, Copeman DB. A geographic information systems model for mapping risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. *Veterinary Parasitology*. 2004; 122:141–149.
- Wongratanacheewin S., Phumidonming W., Sermsawan R. W. and Maleewong W. Development of a PCR– based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamster. *J. Parasitol*. 2001; 122: 175–180.
- Wongsawad C, Rojanapaibul A, Mhad– arehin. Metacercariae from fresh water fish of Mae Sa stream, Chiang Mai, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000; 31: 54–57.
- Wongsawad C, Wongsawad P, Chai J Y, Paratasilpin T, Anuntalabhochai S. DNA quantities and qualities from various stages of some trematodes using optical and HAT–RAPD methods. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37 (suppl 3): 62–68.

- Wongsawad C, Rojtinnakorn J, Wongsawad P, Rojanapaibul A. Helminths of vertebrates from Maesa stream. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2004; 35(Suppl 1): 140–146.
- Wongsawad C, Wongsawad P, Chai JY, Anuntalabhochai S. *Haplorchis taichui*, Witenberg, 1930: Development of a HAT–RAPD marker for the detection of minute intestinal fluke infection . *Experimental Parasitology*. 2009; 123(2): 158–161.
- Wongsawad C. Development of HAT–RAPD Marker for Detection of *Stellantchasmus falcatus* Infection. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2011; 42 (1): 46–52.
- Wongsawad C, Phalee A, Noikong W, Chuboon S, Nithikathkul C. Co–infection with *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* detected by human fecal examination in Chomtong district, Chiang Mai Province, Thailand. *Parasitology International*. 2012; 61(1):56–59.
- Wongsawad C, Wongsawad P. *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui*: Development of a multiplex PCR assay for their detection and differentiation using specific primers derived from HAT–RAPD. *Experimental Parasitology*. 2012; 132 (2): 237–242.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

***Haplorchis taichui* cytochrome c oxidase subunit 1 (coxI) gene, partial cds; mitochondrial**

GenBank: EF055885.1

GenBank Graphics

>gi|119855482|gb|EF055885.1| *Haplorchis taichui*
cytochrome c oxidase subunit 1 (coxI) gene, partial cds;
mitochondrial

TGTGCTGATTTTGCCGGGGTTCGGTATAGTGAGACACATTTGTAGGACGTTAACAAA
TAAAGATTCCTTGTGGTTATGGGGTTTAGTTCTTGCTATGTTTTCTATAGTCTG
TTTGGGGAGTGTGGTTGAGCTCATCATATGTTTATGGTTGGGTTGGATGTTAAGAC
GGCTGTTTTTTTTAGTTCTGTGACCATGGTTATAGGAGTCCCCACAGGTATAAAGGT
TTTTTCTTGGCTGTATATGTTGGCGGGAAGTCGGGGCCGGTTTTGGGATCCGATAAT
GTGGTGGATATTGGGTTTTATTGTCTTATTTACTATCGGGGGGGTGACCGGGATTGT
GTTGTCTTCTTCTATAATGGATACTTTGTTGCATGACACTTGGTTTGGTTTA

***Stellantchasmus falcatus* 28S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: AF181886.2

GenBank Graphics

>gi|46981922|gb|AF181886.2| *Stellantchasmus falcatus* 28S
ribosomal RNA gene, partial sequence

GCTGCATTCACAAACAACCCCGACTCCAAGGTCTATCCAGGAAGGTGCTGTCATTTTC
TGCCTCTCCACCCCAACGGGCCTTTCACCCTCTCTGGGCCATGTCAGCATTACCGTA
CTCATTGCTGGACTTGGAATGGAGCAGCACCTCCGCGGAACGACCTGAACACCACAT
TGCCTAGTGACCAATTGGCCACAGGCTTCGGTGCTGGGCTTTTCCCTGTTCACTCGC
CGTTACTGAGGGAATCCTTGTAGTTTCTTTTCCCTCCGCTTAGTGATATGCTTAAGT
TCAGCGGGTAATC

***Metagonimus yokogawai* genes for 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete sequence, isolate: MyITS2-12**

GenBank: AB470524.1

GenBank Graphics

>gi|305682275|dbj|AB470524.1| *Metagonimus yokogawai* genes
for 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete
sequence, isolate: MyITS2-12

TGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACCTGTGTGAATTAATGTGAACTGCCTACTGCTTTGA
ACATCAACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTTTTCTGTGGCCACGCCTGTC
CGAGGGTTCGGCTTATAAACTATCACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCC
AGCTGGCGTGATTTCCCTGTGCTATTGTGTAGGGTGCCAGATCTATGGCTTTTCCCT

AATGTGCCGGACGCAACCATATCTGGGCTGACTGCCTAGGTGAGGGAGTGGCGGCGG
AGTCGTGGCTCAATGATATTGTACGTGGTAAATGTGCGCGCTCCGTTGTCTGTTCTT
CATCCTGGGTTGAGGCTTTGTCTATGGCAATGCATCTGTTGTTGTTTGTGTTTGCCT
CCTGTGCTTGACCTCCCTGACCTCGGATCAGACGTGAAT

***Pygidiopsis summa* cytochrome c oxidase subunit I-like
(COI) gene, partial sequence; mitochondrial**

GenBank: AF181884.3

GenBank Graphics

>gi|288563287|gb|AF181884.3| *Pygidiopsis summa* cytochrome
c oxidase subunit I-like (COI) gene, partial sequence;
mitochondrial

GTGTTAATATTCGGGGTTTGGTATGATTAGTCACATTTGTACTIONTTAACAGGTAA
AGATTCGTTGTTTGGTTATGGGGCTTGGTGTGGCTATGTTTGTCTATAGTTTGTCT
GGGTAGGGTGGTTTGGCTCATCATATGTTTACTGTTGGGCTGGATTTGGGGACTGC
TGTTTTTTTTAGCTCGGTTACTATGATTATAGGTGTGCCTACGGGGATTAAGGTTTT
TTCATGATTATATATGCTTGCTGGAACCTCGGGAGCGTCTATGAGATCCAATCATGTG
GTGGATAATCGGGTTTGTGGTGCTTTTCACTATAGGCGGGTTACTGGGATAGTTCT
TTCTGCTTCTGTAATTGATGCCTTGTGTTGTGATACTTGGTTTGTATTGCT

***Opisthorchis viverrini* isolate Nax2 cytochrome
c oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds;
mitochondrial**

GenBank: HQ328543.1

GenBank Graphics PopSet

>gi|316992172|gb|HQ328543.1| *Opisthorchis viverrini*
isolate Nax2 cytochrome c oxidase subunit I (cox1) gene,
partial cds; mitochondrial

ATTGATTCTTTGTTTCGGTTATGGTGGTTTGGTGTGGCCATGTTTGTCTATAGTCTGT
TTAAGAAGGGTGGTTTGGGCTCATCATATGTTTACGTTGGGCTGGATTTGGGCACC
GCTGTGTTTTTTTACCTCGGTTACTATGATTATAGGGGTTTCTACTGGAATAAAGGTT
TTTTCTTGGTTGTATATGCTTGCGGGTACTCGTGAGCGTTTTTGGGACCCGATTATG
TGGTGGATAGTTGGGTTTCGTAGTACTTTTTACTATAGGGGGGGTTACTGGTATAGTT
CTTTCTGCTTCGGTTATAGATGCTTTGTTGCATGACACTTGGTTT

***Fasciola gigantica* isolate Fsp-MNo01
cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds;
mitochondrial**

GenBank: HQ856045.1

GenBank Graphics

>gi|319430924|gb|HQ856045.1| *Fasciola gigantica* isolate
Fsp-MNo01 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene,
partial cds; mitochondrial
GATTTATATGTTGATTGGTCTTTGGGGTGGATTTTTTGGTCTTTCTTTGAGTATTTT
GGTTCGTTTGAATTATTTGGATCCTTATTTTAATTTGGTGTCTCCTGAGGTTTATAA
TTATGTTGTGACGGGGCATGGTGTATTATGATTTTTTTCTTTTAAATGCCTGTGTT
GATTGGGGGGTTTGGTAATTATTTATGCTTTGCTTTTGGGTATTCCTGATTTGAA
TTTGCCTCGTTTAAATGCTTTGAGTGCTTGGTTGTTGCTTCCTGCTTGTGTTTGT
GTCGTTTGGTTTGGATGGGGGTATGGGTGTTGGTTGGACTTTTTATCCCCCTCTTC
TAGATTGGATTATTCTGGTTGGGGGTGATTTTTTAATGTTTTCTCTTCATTTGGC
TGGTGTCTCTAGTCTTTTGGGTCTA

ภาคผนวก ข



ภาพ 46 จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 แม่น้ำปิง อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่



ภาพ 47 จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 แม่น้ำแม่จัด อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่



ภาพ 48 จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 แม่น้ำแม่แตง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่



ภาพ 49 จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 แม่น้ำปิง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่



ภาพ 50 จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 แม่น้ำแม่กวัง อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน



ภาพ 51 จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 แม่น้ำลือ อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน



ภาพ 52 จุดเก็บตัวอย่างที่ 7 แม่น้ำปิง อําเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่



ภาพ 53 จุดเก็บตัวอย่างที่ 8 แม่น้ำแม่แจ่ม อําเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่



ภาพ 54 จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 อ่างเก็บน้ำดอยเต่า อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่



ภาพ 55 จุดเก็บตัวอย่างที่ 10 เขื่อนภูมิพล อำเภอสามเงา จังหวัดตาก