



การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการใช้เทคนิค Multiplex PCR สำหรับตรวจสอบ
การติดปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Centrocestus*
formosanus ในปลาทอง (*Carassius auratus*)

INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL AND MULTIPLEX PCR TECHNIQUE
TO DETECTING THE MONOGENETIC TREMATODE IN GENUS *DACTYLOGYRUS*
AND INTESTINAL TREMATODE, *CENTROCESTUS FORMOSANUS*
INFECTIONS IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)

พลกวิน จารุบุญญากกร

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการใช้เทคนิค Multiplex PCR สำหรับตรวจสอบ
การติดปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Centrocestus*
formosanus ในปลาทอง (*Carassius auratus*)



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL AND MULTIPLEX PCR TECHNIQUE
TO DETECTING THE MONOGENETIC TREMATODE IN GENUS *DACTYLOGYRUS*
AND INTESTINAL TREMATODE, *CENTROCESTUS FORMOSANUS*
INFECTIONS IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)



PHONKAWIN JARUBOONYAKORN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Biology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการใช้เทคนิค Multiplex PCR สำหรับตรวจสอบ
การติดปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Centrocestus formosanus* ในปลา
ทอง (*Carassius auratus*)

ของ

พลกวิน จารุบุญญากร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ)

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรียา ภู่วิโรจน์กุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการใช้เทคนิค Multiplex PCR สำหรับตรวจสอบ การติดปลิงใสสกุล <i>Dactylogyrus</i> และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็ก ชนิด <i>Centrocestus formosanus</i> ในปลาทอง (<i>Carassius auratus</i>)
ผู้วิจัย	พลกวิน จารุบุญญานกร
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพนา ชลธนานารถ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวินิจฉัยพยาธิใบไม้ 2 ชนิด (*Dactylogyrus* spp. และ *Centrocestus formosanus*) ที่ก่อให้เกิดโรคในปลาทอง (*Carassius auratus*) พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยา โดยพัฒนาวิธี simplex และ multiplex PCR สำหรับวินิจฉัยโรคพยาธิพยาธิทั้ง 2 ชนิด ร่วมกับการทดสอบคุณสมบัติที่เหมาะสม ความจำเพาะ ความไว และขีดจำกัดการตรวจจับ ในปฏิกิริยา จากผลการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ที่พบในบริเวณซีเหงือกของปลาทอง ถูกระบุอยู่ในสกุล *Dactylogyrus* และเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ตามลำดับ ผลการศึกษา ความจำเพาะในปฏิกิริยาพบว่ามีเฉพาะสำหรับพยาธิปลิงใส *Dactylogyrus* spp. และพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตที่ติดเชื้อร่วมชนิดอื่น ๆ รวมถึงโฮสต์ที่นำมาทดสอบ สำหรับการทดสอบความไวในปฏิกิริยาพบว่าสามารถตรวจจับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต่ำสุด สำหรับ *Dactylogyrus* spp. ที่ 0.078 ng และ *C. formosanus* ที่ 0.625 ng นอกจากนี้การทดสอบ ขีดจำกัดการตรวจจับในปฏิกิริยาพบว่าสามารถตรวจจับพยาธิปลิงใส *Dactylogyrus* spp. ได้ที่ อัตราส่วน 1:12 และพยาธิชนิด *C. formosanus* ที่อัตราส่วน 1:2 ตามลำดับ การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการศึกษาได้แสดงให้เห็นถึงข้อดีในการประหยัดเวลาและมีปริมาณงานที่สูงสำหรับ ตรวจจับโรคปรสิต 2 ชนิดได้พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับ วินิจฉัยโรคเชิงระบาดวิทยาและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้อีกด้วย

คำสำคัญ : Molecular detection, Multiplex PCR, *Dactylogyrus* spp., *Centrocestus formosanus*

Title INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL AND MULTIPLEX PCR
TECHNIQUE
TO DETECTING THE MONOGENETIC TREMATODE IN GENUS
DACTYLOGYRUS
AND INTESTINAL TREMATODE, *CENTROCESTUS FORMOSANUS*
INFECTIONS IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)

Author PHONKAWIN JARUBOONYAKORN

Degree MASTER OF SCIENCE

Academic Year 2021

Thesis Advisor Assistant Professor Dr. Thapana Chontanarith

This study aims to investigate the morphology and molecular detection of two pathogenic flukes, *Dactylogyrus* spp. and *Centrocestus formosanus* in goldfish (*Carassius auratus*). Differential simplex and multiplex polymerase chain reaction (PCR) methods were developed. Two pairs of species-specific primer targeted the 18S ribosomal DNA gene (18S) (156 bp) of *Dactylogyrus* spp., and the Cytochrome b gene (*Cytb*) (609 bp) of *C. formosanus*, respectively. The optimal reaction conditions, including specificity, sensitivity, and detection limit were also investigated. The results demonstrated that the morphological features of monogenetic and digenetic trematodes on the gill of goldfish were identified as *Dactylogyrus* spp. and *C. formosanus*, respectively. The specificity of molecular detection was specific to *Dactylogyrus* spp. and *C. formosanus* without cross-amplification with other co-infection parasites and their hosts. The sensitivity test results showed that the PCR assay could amplify two target genes with the lowest DNA concentration at 0.078 ng for *Dactylogyrus* spp. and 0.625 ng for *C. formosanus*. The detection limit was detected at the ratios of 1:12 and 1:2 for *Dactylogyrus* spp. and *C. formosanus*, respectively. The m-PCR assay described here is time-saving and high throughput, which has potential application for diagnoses and epidemiological investigation in endemic areas or the aquaculture industry.

Keyword : Molecular detection, Multiplex PCR, *Dactylogyrus* spp., *Centrocestus formosanus*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่าง ๆ มากมาย ตลอดจนการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความอดทนและตั้งใจ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล ที่ให้ความกรุณาและเป็นเกียรติในการเป็นประธานกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญาโท ซึ่งได้ให้แนวคิดและคำแนะนำต่าง ๆ จนงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญาโท และให้คำแนะนำในการทำปริญญาโทฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำรวมถึงเอื้อเฟื้อในการใช้สถานที่ อุปกรณ์ สิ่งอำนวยความสะดวกอื่น ๆ ในการทำปริญญาโทฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้อง และเพื่อน ๆ ที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีในการทำงานวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พลกวิน จารุบุญญากร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยครั้งนี้.....	5
ขอบเขตการศึกษา	5
สมมติฐานของงานวิจัย.....	6
สถานที่ทำการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	7
ข้อมูลทั่วไปของปลาทอง.....	7
ข้อมูลทั่วไปของพยาธิปลิงใส.....	9
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.	10
วงชีวิตของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.	11
พยาธิสภาพจากการติดพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.....	12
การระบาดของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp. ในปลาทอง	13

การศึกษาทางอนุชีววิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.	15
ข้อมูลทั่วไปของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด <i>Centrocestus formosanus</i>	16
การจัดจำแนกพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กสกุล <i>Centrocestus</i>	16
ข้อมูลของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด <i>C. formosanus</i>	17
ระบาดวิทยาและการกระจายตัว	18
วงชีวิตของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด <i>C. formosanus</i>	19
ลักษณะทางพยาธิสภาพ	31
การศึกษาทางอนุชีววิทยา	35
การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	38
การระบุชนิดพยาธิใบไม้โดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา	43
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	46
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	47
1. การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย	47
2. การเก็บตัวอย่างปลาทอง	47
3. การตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในปลาทอง	47
3.1 การตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp. ในปลาทอง	47
3.2 การตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด <i>C. formosanus</i> ในปลาทอง	48
4. การเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยและระยะไข่ของพยาธิชนิด <i>C. formosanus</i> ในสัตว์ทดลอง	48
5. การศึกษาทางอนุชีววิทยา	49
5.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา	49
5.2 การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของปรสิตที่นำมาทดสอบ	49

5.3 การนำไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน <i>Cytb</i> ของพยาธิใบไม้หลายชนิดมาทดสอบกับพยาธิชนิด <i>C. formosanus</i>	50
5.4 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด <i>C. formosanus</i>	51
5.5 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิปลิงไสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.....	51
5.6 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์จากไพรเมอร์จำเพาะ	52
5.7 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา simplex PCR	52
5.8 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (optimal temperature)	52
5.9 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR (specificity of multiplex PCR assay).....	53
5.10 การทดสอบค่าความไวของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (sensitivity of multiplex PCR assay).....	53
5.11 การทดสอบขีดจำกัดในปฏิกิริยา multiplex PCR (Detection limit of multiplex PCR assay).....	53
5.12 การทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ในตัวอย่างภาคสนาม	53
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	54
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงไสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.	54
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กกระยะเมตาเซอรคาเรียชนิด <i>C. formosanus</i>	55
การทดสอบความจำเพาะของพยาธิปลิงไสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp. ในปฏิกิริยา simplex PCR.....	56
การทดสอบความจำเพาะของพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. formosanus</i> ในปฏิกิริยา simplex PCR... ..	58
การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์จากไพรเมอร์จำเพาะ	61
การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา multiplex PCR (optimal temperature)	64

การทดสอบความจำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (specificity of multiplex PCR assay)	65
การทดสอบค่าความไวของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (sensitivity of multiplex PCR assay)	66
การทดสอบขีดจำกัดของปฏิกิริยา multiplex PCR (Detection limit of multiplex PCR assay)	67
การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. formosanus</i> ในระยะต่าง ๆ (Detection of the various stages of <i>C. formosanus</i>)	68
การทดสอบปฏิกิริยาในตัวอย่างภาคสนาม (Assessment and accuracy confirmation on field goldfish samples)	69
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	71
สรุปผลการทดลอง	71
อภิปรายผลการทดลอง	72
บรรณานุกรม	78
ประวัติผู้เขียน	96

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 พยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp. ที่พบในปลาทอง (<i>Carassius auratus</i>)	13
ตาราง 2 รายงานข้อมูลโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 ของพยาธิใบไม้ชนิด <i>Centrocestus formosanus</i> .	27
ตาราง 3 ข้อมูลโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 ของพยาธิชนิด <i>Centrocestus formosanus</i> ในประเทศไทย	28
ตาราง 4 ผลการตรวจสอบการติดพยาธิในปลาทองทั้ง 3 วิธีจากตัวอย่างภาคสนาม.....	69



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 สายพันธุ์ปลาทอง (<i>Carassius auratus</i>).....	8
ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> sp.....	10
ภาพประกอบ 3 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.....	11
ภาพประกอบ 4 พยาธิสภาพที่เกิดการติดพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.....	12
ภาพประกอบ 5 ภาพระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิด <i>C. formosanus</i> (scale bar = 0.05 mm) ..	17
ภาพประกอบ 6 การกระจายตัวของพยาธิสกุล <i>Centrocestus</i> ในปัจจุบัน	18
ภาพประกอบ 7 วงชีวิตของพยาธิใบไม้ชนิด <i>Centrocestus formosanus</i>	20
ภาพประกอบ 8 ไข่ของพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. formosanus</i> (scale bars = 20 μ m).....	21
ภาพประกอบ 9 ภาพระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. formosanus</i>	23
ภาพประกอบ 10 การติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย	24
ภาพประกอบ 11 ภาพพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยชนิด <i>C. formosanus</i> (scale bar = 100 μ m) 26	
ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางพยาธิสภาพของพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. formosanus</i>	32
ภาพประกอบ 13 ลักษณะที่เห็งอกที่พัฒนาผิดปกติ	32
ภาพประกอบ 14 พยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด <i>C. formosanus</i> ที่ฝังตัวภายในชั้น sub mucosa ของลำไส้เล็ก.....	33
ภาพประกอบ 15 พยาธิสภาพของพยาธิชนิด <i>C. formosanus</i> ในบริเวณลำไส้ <i>A. ralloides</i>	33
ภาพประกอบ 16 สารพันธุกรรมในนิวเคลียสของพยาธิใบไม้	36
ภาพประกอบ 17 จีโนมไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด <i>H. taichui</i>	37
ภาพประกอบ 18 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. formosanus</i> ที่พบในปลาน้ำจืด 5 ชนิด	40
ภาพประกอบ 19 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>H. pumilio</i> และ <i>C. formosanus</i> 42	

ภาพประกอบ 20 พยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp. ที่พบในปลาทอง	55
ภาพประกอบ 21 พยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอ์คาเรียชนิด <i>Centrocestus formosanus</i>	56
ภาพประกอบ 22 บริเวณยีน 18S ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.	57
ภาพประกอบ 23 การทดสอบความจำเพาะของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp. ในปฏิกิริยา simplex PCR	58
ภาพประกอบ 24 บริเวณยีน <i>Cytb</i> ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. formosanus</i>	59
ภาพประกอบ 25 การทดสอบความจำเพาะของพยาธิชนิด <i>C. formosanus</i> ในปฏิกิริยา simplex PCR.....	60
ภาพประกอบ 26 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิปลิงใสชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp.....	62
ภาพประกอบ 27 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด <i>Centrocestus formosanus</i>	63
ภาพประกอบ 28 การทดสอบอณูโมลิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา multiplex PCR	64
ภาพประกอบ 29 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR	65
ภาพประกอบ 30 การทดสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR	66
ภาพประกอบ 31 การทดสอบขีดจำกัดในปฏิกิริยา multiplex PCR.....	67
ภาพประกอบ 32 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. formosanus</i> ในระยะอื่น ๆ	68
ภาพประกอบ 33 การตรวจสอบการติดพยาธิชนิด <i>Dactylogyrus</i> spp. และ <i>C. formosanus</i> ในปฏิกิริยา multiplex PCR จากตัวอย่างภาคสนาม	70

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

จังหวัดราชบุรีตั้งอยู่ในภาคตะวันตกของประเทศไทยมีพื้นที่ 3,247 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 11.27 ของเนื้อที่ในภาคตะวันตก ประกอบด้วยพื้นที่ป่า พื้นที่ภูเขาสูง พื้นที่ราบสูง พื้นที่ราบลุ่ม รวมถึงพื้นที่ราบต่ำ มีความอุดมสมบูรณ์ของดินค่อนข้างดี รวมถึงมีแหล่งน้ำตามธรรมชาติอย่าง แม่น้ำแม่กลองไหลผ่าน 3 อำเภอ คือ อำเภอบ้านโป่ง พุทธาราม และอำเภอเมืองราชบุรี ส่งผลให้ประชาชนนิยมทำการเกษตรกรรมหลายประเภท ได้แก่ การทำไร่ การทำนา การทำปศุสัตว์ และการทำประมง สำหรับการประกอบอาชีพประมงในจังหวัดราชบุรีมีเกษตรกรที่ขึ้นทะเบียนประมงทั้งหมด 3,618 ครัวเรือน นับเป็นพื้นที่ประมาณ 48,321 ไร่ สำหรับการทำประมงในจังหวัดราชบุรีนั้นสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยมากกว่า 500 ล้านบาทต่อปี อีกทั้งมีพื้นที่สำหรับการเพาะเลี้ยงปลามากที่สุดอยู่ในอำเภอเมือง อำเภอพุทธาราม และอำเภอบ้านโป่ง ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงปลาทองในจังหวัดราชบุรี ถือได้ว่าเป็นจังหวัดที่มีการจำหน่ายปลาทองสูงที่สุดในประเทศไทย อีกทั้งยังมีตลาดกลางที่จำหน่ายปลาสวยงามขนาดใหญ่อย่าง Fish Village ตั้งอยู่ในจังหวัดราชบุรี ดังนั้นอาชีพการเพาะเลี้ยงปลาทองจึงเป็นธุรกิจที่น่าสนใจอีกประเภทหนึ่ง และมีความต้องการทางตลาดเป็นอย่างมาก มีอัตราการขยายตัวของธุรกิจอย่างต่อเนื่อง มีขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อนมากนักสามารถทำการเพาะเลี้ยงในครัวเรือนเพื่อลดต้นทุนแรงงานได้ โดยทั่วไปพบการเพาะเลี้ยงปลาทองอยู่ 2 รูปแบบ คือ การเลี้ยงปลาทองในบ่อซีเมนต์ และในบ่อดิน ซึ่งจะให้ผลผลิต และคุณภาพที่แตกต่างกันออกไป (สำนักงานจังหวัดราชบุรี, 2556)

ปลาทอง (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) มีชื่อสามัญคือ “Goldfish” ถูกจัดอยู่ในกลุ่มปลาสวยงามชนิดหนึ่งที่รู้จักอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ โดยแรกเริ่มมีการนำเข้าปลาทองมาจากประเทศจีน ต่อมาได้มีการคัดสายพันธุ์จนได้สายพันธุ์ปลาทองต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นที่ประเทศญี่ปุ่น สายพันธุ์ปลาทองในปัจจุบันสามารถแบ่งประเภทตามลักษณะของครีบ เช่น ปลาทองครีบเดี่ยว (single fin) ประกอบด้วย สายพันธุ์โคเมท (comet) และสายพันธุ์ชูบุงกิง (shubunkin) และสายพันธุ์ครีบคู่ (duplicated caudal fin) ประกอบด้วย สายพันธุ์ออรันดา (oranda) สายพันธุ์ริวกิน (ryukin หรือ veittail) สายพันธุ์ตาโปน (telescope-eyes goldfish) สายพันธุ์มัวร์ (moor) หรือเลห์ (black moor หรือ black telescope-eye goldfish) สายพันธุ์ตาโปนสามสี (calico telescope-eyes goldfish) สายพันธุ์ตาลูกโป่ง (bubble eye goldfish) สายพันธุ์ตากลับ (celestial goldfish) สายพันธุ์เกล็ดแก้ว (pearl scale goldfish) สายพันธุ์หัวสิงห์

(lionhead goldfish หรือ ranchu) ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทั้ง ขนาด รูปร่าง และสีสัน เป็นปลาที่มีความทนทาน เลี้ยงง่าย จึงเป็นที่นิยมในการเลี้ยงปลาสวยงามโดยทั่วไปในประเทศไทย (ภวพล ศุภนันถนันทน์, 2557) นอกจากนี้ปลาทองสามารถสร้างมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามติด 1 ใน 20 อันดับ ตั้งแต่ในปี พ.ศ. 2543 จนถึงปัจจุบัน เริ่มตั้งแต่จำนวน 101,133 ตัว ในปี พ.ศ. 2543 และมีการส่งออกในจำนวนที่มากขึ้นถึง 2,571,154 ตัว โดยมีมูลค่าการส่งออกมากที่สุดเป็นอันดับที่ 2 รองจากปลากัดมากถึง 26,347,132.76 ล้านบาทในปี พ.ศ. 2551 และมีแนวโน้มการขยายตัวการส่งออกที่เพิ่มมากขึ้นจนถึงปัจจุบัน แม้ว่าการส่งออกปลาทองจะมีแนวโน้มที่สูงขึ้นแต่ก็มักพบกับปัญหาต่าง ๆ ได้แก่ มาตรฐานการผลิตที่ลดลง โดยมีสาเหตุมาจากการเกิดโรคระบาดในปลาหลายชนิด ส่งผลให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม (Bari & Yamazaki, 2018) โรคที่พบในปลาที่ทำการเพาะเลี้ยงในปัจจุบันมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น เกิดจากโรคไวรัส เชื้อรา แบคทีเรีย โรคพยาธิ คุณภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยงที่ไม่เหมาะสม รูปแบบที่ทำการเพาะเลี้ยง รวมไปถึงคุณภาพของแหล่งน้ำ (นฤชยา ไกลเนตร, 2553)

หนึ่งในโรคที่พบได้บ่อยคือ การเกิดโรคเหงือกเน่า (gill flukes diseases) เป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) ระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria หรือ infective stage) และการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. โดยเฉพาะการติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย ชนิด *C. formosanus* ที่บริเวณเหงือกของปลา สังเกตลักษณะการติดพยาธิได้จากอาการบวมแดงที่บริเวณเหงือก บริเวณกระพุ้งแก้ม เปิดอ้าอยู่ตลอดเวลา ลอยตัวบริเวณผิวน้ำ ลำตัวชูบผอม เป็นต้น เมื่อเกิดการติดเชื้อโฮสต์จะมีการสร้างเมือกออกมาป้องกันพยาธิชนิดดังกล่าวที่บริเวณเหงือกจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดการลดประสิทธิภาพในการหายใจของปลาและยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อฉวยโอกาสอื่น ๆ เพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้ปลาตายในที่สุด (López, 1987; Jiang et al., 2013 และ Tu et al., 2015) ในปัจจุบันการติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* ในประเทศไทยยังพบรายงานการระบาดในกลุ่มปลาเกล็ดขาววงศ์ Cyprinidae หลายชนิดซึ่งทำหน้าที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 (Saenphet et al., 2008; Wongsawad et al., 2000 และ Noikong et al., 2011) ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิดนี้อาศัยอยู่ในบริเวณระบบทางเดินอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายประเภท ได้แก่ สัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงมนุษย์ที่เป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (Waikagul et al., 1997 & Chai et al., 2013) โดยมีการติดพยาธิจากการรับประทานปลาน้ำจืดที่มีระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าสู่ร่างกาย ยิ่งไปกว่านั้นพยาธิชนิดนี้ยังพบรายงานการติดสู่มนุษย์ผ่านการรับประทานปลาน้ำจืดที่ปรุงไม่สุกจากรายงานในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย (Waikagul et al., 1997; Van et

al., 2011 และ Chai et al., 2013) สำหรับพยาธิใบไม้ชนิดนี้มีข้อมูลการศึกษาที่ค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับพยาธิใบไม้ชนิด *S. falcatus* และ *O. viverrini* (Sripalwit et al., 2015 และ Boonmars et al., 2009)

อีกประการคือ การติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ในปลาที่ทำการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจปลาสวยงามที่สำคัญ (Reed et al., 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดพยาธิปลิงใสในปลาทองซึ่งถือได้ว่าเป็นหนึ่งในโฮสต์ที่มีการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. มากที่สุดจากรายงานในหลายประเทศ (Šimková et al., 2004; Jalali & Barzegar, 2005; Molnár, 2009, Shamsi et al., 2009; Rasouli et al., 2012; Borisov, 2013 และ Tu et al., 2015) สำหรับปลาทองพบการติดพยาธิปลิงใสหลายชนิด ได้แก่ *D. vastator*, *D. intermedius*, *D. anchoratus*, *D. baueri* และ *D. formosus* เป็นต้น (Evans & Lester, 2001; Fletcher, 1998 และ Ling et al., 2016) ส่งผลให้เกิดความเสียหายที่บริเวณซีเหงือกจากการที่เซลล์ผิว (epithelial cell) ถูกทำลาย และถูกสร้างขึ้นมาทดแทนในจำนวนที่มากกว่าปกติ รวมถึงการเชื่อมกันของซีเหงือก ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการหายใจของปลาลดลง (Thurston, 1965 และ Molnár, 1971) อย่างไรก็ตามการติดพยาธิปลิงใสสามารถพบได้ในทุกช่วงฤดูกาล โดยจะพบมากในช่วงฤดูร้อน (Borji et al., 2012) อีกทั้งยังพบสาเหตุอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ความเครียดของปลาในระหว่างการเลี้ยงที่แออัด อุณหภูมิของแหล่งน้ำ คุณภาพของแหล่งน้ำ (Modu, 2012) ดังนั้นในขั้นตอนการขนส่งสัตว์น้ำระหว่างประเทศที่ขาดการควบคุมโรคจะนำไปสู่การเพิ่มจำนวนค่าความชุกของการติดเชื้อและเป็นสาเหตุของการระบาดในพื้นที่นั้น ๆ อย่างกว้างขวาง (Mousavi et al., 2009)

ดังนั้นขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายหรือส่งออกระหว่างประเทศจึงมีความจำเป็นต้องมีการควบคุมและการตรวจคัดกรองสุขภาพอย่างละเอียด ซึ่งวิธีการวินิจฉัยแบบดั้งเดิมคือ การตรวจสอบการติดปรสิตจากกล้องจุลทรรศน์เพียงอย่างเดียว ซึ่งขนาดของปรสิตมีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร จึงเป็นเรื่องยากสำหรับการจำแนกหรือการคัดกรองโรคได้อย่างแม่นยำ อีกทั้งต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ชำนาญในการระบุถึงระดับชนิด ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยามากขึ้น ส่งผลให้การวินิจฉัยโรคพยาธิเป็นไปอย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพ สามารถให้ข้อมูลถึงแหล่งระบาดของโรคได้อย่างชัดเจนจากอนุกรมวิธานของปรสิตเหล่านั้น (Shamsi et al., 2009) เช่น จากงานวิจัยโดยศึกษาการใช้ยีนไมโทคอนเดรียที่สามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุชนิดของพยาธิใบไม้หลายชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันและการใช้บริเวณ Internal transcribed spacer 2 (ITS2) ร่วมกับยีน

อื่น ๆ ที่อยู่ในนิวเคลียสเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Nagataki et al., 2015 และ Simsek et al., 2018) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR, qPCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) สำหรับใช้ในการระบุชนิดพยาธิใบไม้ด้วยความแม่นยำที่สูงขึ้น (Collins et al., 2010; Caron et al., 2011 และ Arimatsu et al., 2015) ซึ่งการพัฒนาเครื่องมือหรือวิธีการระบุชนิดปรสิตมีความก้าวหน้าอย่างมากในปัจจุบันและมีความแม่นยำที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้การพัฒนาเทคนิคที่เชื่อถือได้และมีความแม่นยำจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการการวินิจฉัยการติดเชื้อปรสิตดังกล่าว อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการวินิจฉัยโรคพยาธิทั้ง 2 ชนิด (*Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus*) พร้อมกันในปลา

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ชนิด *Dactylogyrus* spp. และพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* ที่ก่อให้เกิดโรคเหงือกเน่าในปลาทองอย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำ สามารถตรวจจับโรคพยาธิทั้ง 2 ชนิดได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วกว่าวิธีลูกโซ่พอลิเมอร์โดยทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคพยาธิทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวในพื้นที่เพาะเลี้ยงเพื่อประเมินสถานการณ์การระบาดของอย่างต่อเนื่องในอนาคต



ความมุ่งหมายของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับการตรวจสอบการติดพยาธิปลิงไส้ชนิด *Dactylogyrus* spp. และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus* ระยะเวลาเมตาเซอรัคคาเรียที่พบในปลาทองพร้อมกันภายในหนึ่งปฏิบัติการ

เพื่อนำเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาแล้วมาทดสอบกับตัวอย่างภาคสนามกับตัวอย่างปลาทองจำนวน 50 ตัวที่เก็บรวบรวมจากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาทองจำนวน 3 ฟาร์ม ในจังหวัดราชบุรี เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพสำหรับการนำไปใช้ในการวินิจฉัยจริง

ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้สามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อใช้สำหรับการวินิจฉัยการติดพยาธิทั้ง 2 ชนิดในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาทองอย่างรวดเร็วและแม่นยำภายในปฏิบัติการเดียวกัน รวมทั้งสามารถนำไปทดสอบในตัวอย่างภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยครั้งนี้

เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาแล้วสามารถใช้ในการตรวจสอบการพยาธิปลิงไส้ชนิด *Dactylogyrus* spp. และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเมตาเซอรัคคาเรียชนิด *C. formosanus* ที่ก่อให้เกิดโรคเหงือกเน่ากับตัวอย่างภาคสนาม อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิชนิด *C. formosanus* ในระยะอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขอบเขตการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างปลาทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดราชบุรี จากนั้นทำการแยกตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอรัคคาเรียชนิด *C. formosanus* และพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. ออกจากบริเวณเหงือกของปลาทองด้วยวิธีการตัดเหงือก พร้อมทั้งนำพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรัคคาเรียชนิด *C. formosanus* แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกใช้พยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรัคคาเรียสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR ส่วนที่สองใช้สำหรับการชักนำให้เกิดการติดพยาธิในสัตว์ทดลองเพื่อนำระยะไข่และระยะตัวเต็มวัยมาทำการทดสอบในขั้นตอนการวินิจฉัยเพิ่มเติม ในส่วนของพยาธิปลิงไส้ชนิด *Dactylogyrus* spp. ทำการเก็บรักษาสภาพในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR

สมมติฐานของงานวิจัย

การพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี multiplex PCR สามารถใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเมตาเซอ์คาเรียชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลาทองภายใต้การติดเชื้อร่วมกันในปฏิกิริยาเดียว

สถานที่ทำการวิจัย

ฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาทองในจังหวัดราชบุรี

ห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลทั่วไปของปลาทอง

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Subclass Teleostei

Order Cypriniformes

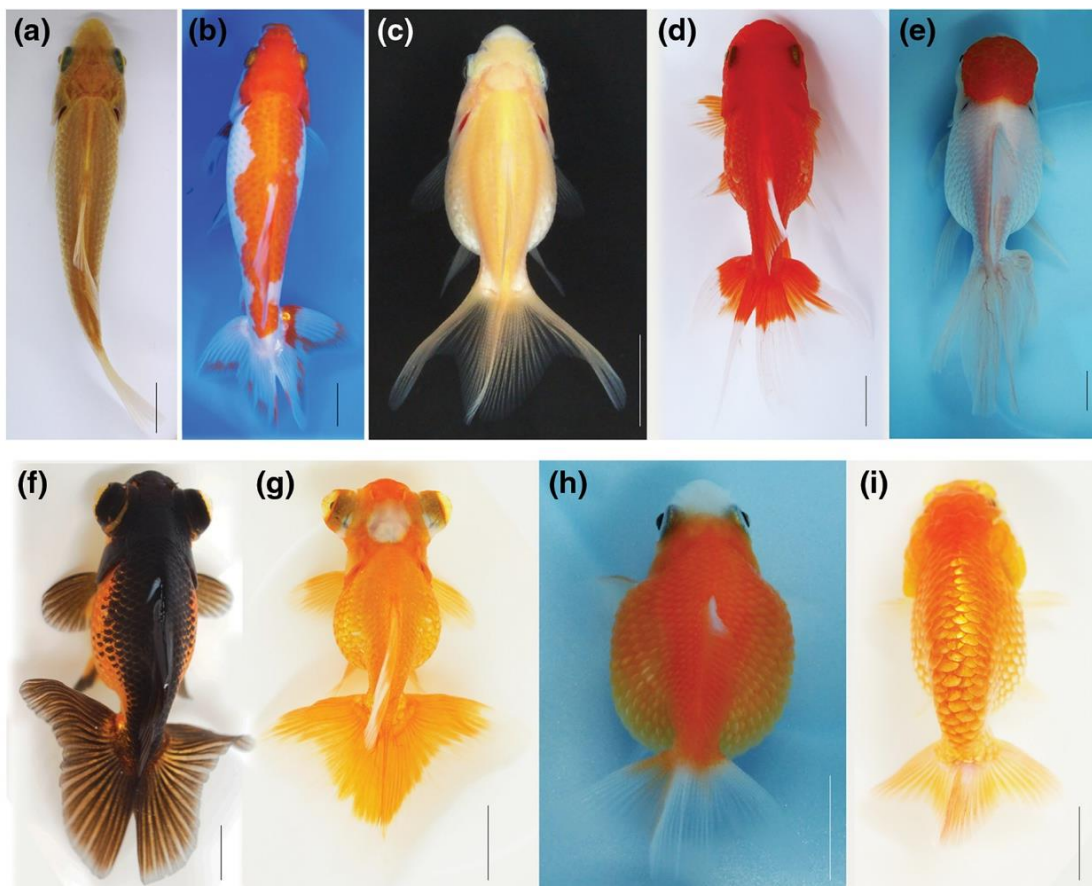
Suborder Cyprinoidei

Family Cyprinidae

Genus *Carassius*

Species *C. auratus* (Linnaeus, 1758)

ปลาทอง (goldfish) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน ในปัจจุบันปลาทองชนิดนี้มีการพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายมากขึ้นที่ประเทศญี่ปุ่น จัดอยู่ในวงศ์ปลาเกล็ดขาว (Cyprinidae) เช่นเดียวกับปลาไน เป็นวงศ์ที่มีจำนวนชนิดของปลามากกว่า 2,000 ชนิด (ภาพประกอบ 1) ในการจัดจำแนกชนิดของปลาทองนั้น ยังไม่ได้รับการยอมรับเนื่องจากมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่สูง อีกทั้งปลาทองในชนิด *C. auratus* ยังมีการจัดจำแนกได้อีกอย่างน้อย 3 ชนิด คือ *C. auratus*, *C. carassius* และ *C. cuvieri* โดยเฉพาะในสายพันธุ์ *C. auratus* มีความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูง ส่งผลให้เกิดเป็นชนิดย่อย (subspecies) อีก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. (a.) burgeri*, *C. (a.) gibelio*, *C. (a.) grandoculis* และ *C. (a.) langsdorfii* เป็นต้น (Komiyama et al., 2009) แต่สำหรับประเทศไทย จะเรียกเป็นชื่อสายพันธุ์ตามลักษณะรูปร่าง โดยมีมากถึง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์โคเมท (comet), พันธุ์ชูบุงกิน (shubunkin), พันธุ์ออรันดา (oranda), พันธุ์ริวกิ้น (ryukin หรือ reittail), พันธุ์ตาโปน (telescope eyes), พันธุ์เล่ห์ (black moor), พันธุ์ตาลูกโป่ง (bubble eye), พันธุ์ตา กลับ (celestial), พันธุ์เกล็ดแก้ว (pearl scale goldfish) และพันธุ์หัวสิงห์ (lionhead หรือ ranchu) เป็นต้น (อรุณี รอดลอย และคณะ, 2552)



ภาพประกอบ 1 สายพันธุ์ปลาทอง (*Carassius auratus*)

- (a) สายพันธุ์วาทิงครีบเดี่ยว (b) สายพันธุ์วาทิงครีบคู่ (c) สายพันธุ์วิวกิ้น (d) สายพันธุ์อรรันดา
 (e) สายพันธุ์อรรันดาหัวอุ่น (f) สายพันธุ์ตาโปน (g) สายพันธุ์ตาโปนปีกผีเสื้อ
 (h) สายพันธุ์โกลด์แก้ว (i) สายพันธุ์หัวสิง

ที่มา: Abe et al. (2014)

ข้อมูลทั่วไปของพยาธิปลิงใส

Kingdom Animalia

Phylum Platyhelminthes

Class Trematode

Subclass Monogenea

Order Monopisthocotylea

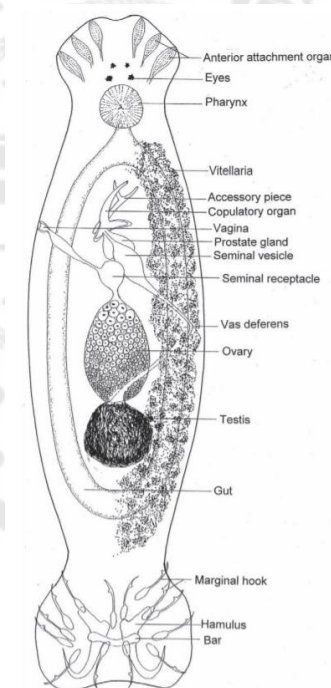
Family Dactylogyridae

Genus *Dactylogyrus* (Diesing, 1850)

พยาธิปลิงใสจัดอยู่ใน Subclass Monogenea ดำรงชีวิตเป็นปรสิตทั้งหมด ส่วนใหญ่พบที่บริเวณผิวหนังหรือเหงือกของปลาสามารถพบได้ทั่วไปในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม ปัจจุบันมีรายงานมากกว่า 5,500 ชนิด จัดเป็น 750 สกุล เป็นหนึ่งในกลุ่มปรสิตที่ยังเป็นปัญหาสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาหรือการส่งออกปลาที่กำลังมีการขยายตัวทางอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะพยาธิปลิงใสในวงศ์ Dactylogyridae Bychowsky, 1933 และ Gyrodactylidae Van Beneden & Hesse, 1863 ที่ยังพบรายงานการระบาดอย่างต่อเนื่องและมีค่าความชุกที่สูงมากกว่าพยาธิปลิงใสในกลุ่มอื่น ๆ โดยแต่ละวงศ์มีจำนวนหลายชนิดตั้งแต่ 500-1,000 ชนิด (Bruno & Woo, 2002 และ Cribb et al., 2002) มีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกันออกไป มีชื่อเรียกของโรคอย่างจำเพาะ สำหรับการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Gyrodactylus* spp. เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคตกเลือดที่บริเวณผิวหนัง ในขณะที่การติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคเหงือกเน่า พยาธิปลิงใสชนิดนี้ส่งผลกระทบต่อระบบหายใจของปลา โดยเฉพาะในกลุ่มปลาเกล็ดขาว (cyprinoid fish) ที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการเพาะเลี้ยงปลา อีกทั้งเป็นสกุลที่มีความจำเพาะต่อโฮสต์ที่สูง (Simkova et al., 2007) โดยการติดพยาธิปลิงใสสกุลนี้จะทำให้ชั้นเยื่อเมือที่บริเวณเหงือก (gill epithelium) มีความหนาขึ้นส่งผลให้เกิดการขัดขวางการทำงานของระบบหายใจ มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าและในกรณีที่มีการติดเชื้อชั้นรุนแรงจะเป็นสาเหตุอันดับต้น ๆ ในการตายของปลา (Thoney & Hargis, 1991)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. (ภาพประกอบ 2) มีลักษณะเด่นคือ มีขนาดเล็กตั้งแต่ 0.5-1 มิลลิเมตร บริเวณส่วนหัว (head organ) แยกออกเป็น 4 แฉก พบจุดตา 2 คู่ (eye spot) มีการพัฒนาของคอหอย (pharynx) เป็นอย่างดี ลำไส้แบ่งออกเป็น 2 แขนง (bifurcate) พบรังไข่ (ovary) อยู่บริเวณส่วนหน้าของอวัยวะ (testis) มีต่อมสร้างไข่ (vitellaria) กระจายตามแนวยาวของลำตัว บริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีอวัยวะที่ช่วยในการยึดเกาะกับโฮสต์เรียกว่า opishaptor ประกอบด้วยหนามโค้งคล้ายสมอ 1 คู่ (anchor) มีแท่งไข้วัดเกาะสมอทั้ง 2 อัน เรียกว่า transverse bar บริเวณรอบ ๆ มีหนามขนาดเล็กเรียกว่า marginal hook จำนวน 14-16 อัน อวัยวะในบริเวณ opishaptor เป็นหนึ่งของอวัยวะที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดได้เบื้องต้น (ประไพศิริ สิริกาญจน, 2538; ชโลบล วงศ์สวัสดิ์, 2555 และวัชรียา ภูวีโรจน์กุล, 2556)

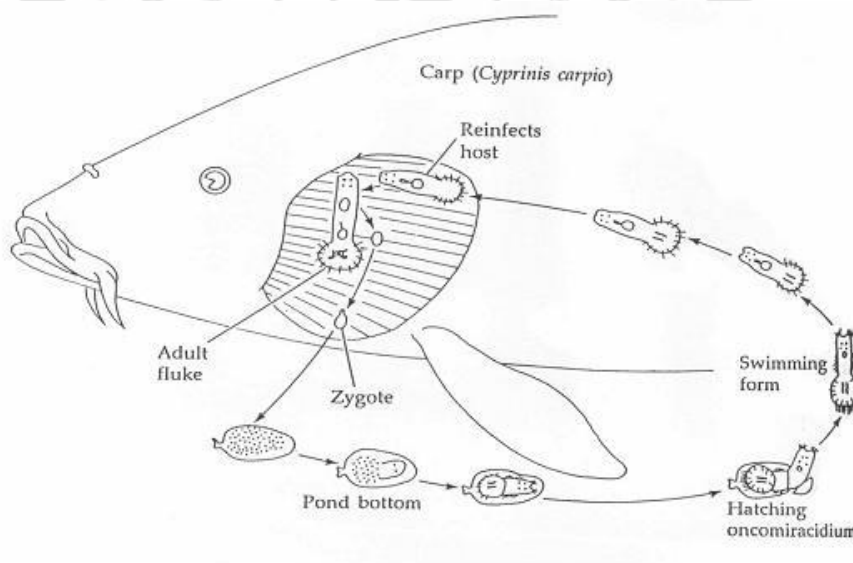


ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* sp.

ที่มา: Schmidt et al. (1977)

วงชีวิตของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

พยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. เป็นสัตว์ 2 เติบโตในตัวเดียวกัน ระยะตัวเต็มวัยสามารถปฏิสนธิได้ภายในตัวเองและผลิตไข่ได้เป็นจำนวนมากตั้งแต่ 1-30 ฟองต่อวัน (ภาพประกอบ 3) โดยที่ไข่ของพยาธิปลิงใสชนิดนี้จะจมลงสู่ก้นบ่อ และพัฒนาเป็นระยะที่เรียกว่า oncomiracidium โดยใช้เวลาเพียง 24-48 ชั่วโมง ในระยะนี้ลักษณะที่คล้ายระยะตัวเต็มวัย มีความสามารถในการเคลื่อนที่ในน้ำได้นานถึง 4-20 ชั่วโมง เพื่อหาโฮสต์อย่างจำเพาะตามกลไกของแสงและกลไกการรับรู้ทางเคมี ในการเข้าสู่โฮสต์สำหรับพยาธิชนิดนี้จะใช้โฮสต์เพียง 1 ชนิดในการพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัย มีการแทรกตัวเข้าสู่เหงือกของปลาโดยใช้อวัยวะยึดเกาะที่แข็งแรง จากนั้นจะพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัยจนกระทั่งสามารถผลิตไข่ออกจากตัวเองได้และใช้เวลาจนครบวงชีวิตอยู่ที่ 12-15 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิสูงจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการออกไข่และพัฒนาเป็นระยะ oncomiracidium ได้ดีกว่าในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำ (Molnár, 2009)

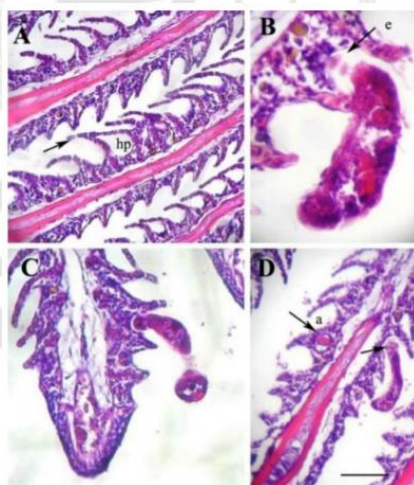


ภาพประกอบ 3 วงชีวิตของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

ที่มา: Brusca et al. (2016)

พยาธิสภาพจากการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

จากการศึกษาการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ที่ส่งผลกระทบต่อสภาพเนื้อเยื่อของโฮสต์ พบว่าในบริเวณเหงือกของปลาที่เกิดการติดพยาธิชนิดดังกล่าวจะมีลักษณะของซีเหงือกที่ผิดไปจากเดิมคือ ลักษณะของซีเหงือกจะมีการโค้งงอ และเกิดการเชื่อมติดกันระหว่างซีเหงือกในบริเวณข้างเคียง โดยมีสาเหตุจากเซลล์เยื่อบุผิวเดิมถูกทำลาย จนมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์เยื่อบุผิวที่มากขึ้นกว่าปกติ (hyperplasia) เพื่อทดแทนในส่วนที่ถูกทำลาย (ภาพประกอบ 4) ส่งผลให้ลักษณะของเซลล์เยื่อบุผิวที่บริเวณนั้นมีจำนวนมากขึ้นจนเป็นเนื้อร้ายและมีลักษณะนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวลิบแบน ไม่อยู่ในบริเวณส่วนกลางของเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้นมีการลดปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่าเมื่อเทียบกับปลาที่ไม่พบการติดพยาธิปลิงใสชนิดนี้ เป็นสาเหตุให้โฮสต์มีการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดออกมาจำนวนมากเพื่อป้องกันพยาธิปลิงใสชนิดดังกล่าว อีกทั้งในบริเวณที่เกิดรอยแผลยังส่งเสริมการติดเชื้อจากแบคทีเรียและเชื้อรา ส่งผลให้เกิดภาวะการขาดออกซิเจน มีภูมิคุ้มกันลดลง และเกิดการเสียชีวิตในที่สุด (Thurston, 1965 Molnár, 1971; Manera & Dezfuli, 2003 และ Yandi et al., 2017)



ภาพประกอบ 4 พยาธิสภาพที่เกิดการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

- A = การเชื่อมกันของซีเหงือก B = บริเวณที่เกิดการลดจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes)
 C = ตำแหน่งที่พยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. เข้าเกาะ
 D = cross-section of *Dactylogyrus* spp. (scale bar 400 μ m)

ที่มา: Yandi et al. (2017)

การระบาดของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ในปลาทอง

จากข้อมูลทางระบาดวิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ที่พบในปลาทองมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะทวีปเอเชียและทวีปยุโรป โดยมีรายละเอียดในตาราง 1 ดังนี้

ตาราง 1 พยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ที่พบในปลาทอง (*Carassius auratus*)

ชนิดของพยาธิปลิงใส	โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1	ประเทศที่พบ	อ้างอิง
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>	Czechia	Šimková et al., 2004
<i>D. dulkeiti</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. inexpectatus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. achmerowi</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. baueri</i>	<i>C. auratus gibelio</i>	Iran	Shamsi et al., 2009
<i>D. dulkeity</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. extensus</i>	<i>C. auratus gibelio</i>		
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus gibelio</i>		
<i>D. intermedioides</i>	<i>C. auratus gibelio</i>		
<i>D. wegeneri</i>	<i>C. auratus gibelio</i>		
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>	China	Tu et al., 2015
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. dulkeiti</i>	<i>C. auratus</i>	Cuba	León et al., 2019
<i>D. baueri</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. vastator</i>	<i>C. auratus auratus</i>	Bulgaria	Borisov et al., 2013
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus auratus</i>		
<i>D. baueri</i>	<i>C. auratus auratus</i>		
<i>D. anchoratus</i>	<i>C. auratus</i>	India	Chaudhary et al., 2017
<i>D. vastator</i>	<i>C. auratus</i>		

ตาราง 1 (ต่อ)

ชนิดของพยาธิปลิงใส	โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1	ประเทศที่พบ	อ้างอิง
<i>D. fraternus</i>	<i>C. auratus</i>	Turkey	Carp, 2007
<i>D. alatus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. anchoratus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. baueri</i>	<i>C. auratus</i>	Mexico	Mendoza-Franco, 2018
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. vastator</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. extensus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>Dactylogyrus</i> sp.	<i>C. auratus</i>		
<i>D. dulkeiti</i>	<i>C. auratus</i>	Japan	Ogawa et al., 1979
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. baueri</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. anchoratus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. dulkeiti</i>	<i>C. auratus</i>	Iraq	Abdullah & Abdullah, 2016
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>		Al-Saadi & Mohammed., 2018
<i>D. inexpectatus</i>	<i>C. auratus</i>		Mhaisen et al., 2003
<i>D. vastator</i>	<i>C. auratus</i>		Mhaisen & Abdul-Ameer, 2019
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. lamellatus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. microcirrus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. minutus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. anchoratus</i>	<i>C. auratus</i>	Brazil	Tancredo et al., 2019
<i>D. baueri</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. formosus</i>	<i>C. auratus</i>	Thailand	ประไพศิริ สิริกาญจน, 2538
<i>D. intermedius</i>	<i>C. auratus</i>		ชโลบล วงศ์สวัสดิ์, 2555
<i>D. vastator</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>D. extensus</i>	<i>C. auratus</i>		
<i>Dactylogyrus</i> sp.	<i>C. auratus</i>		
<i>Dactylogyrus</i> spp.	<i>C. auratus</i>		

การศึกษาทางอนุชีววิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

Chaudhary et al. (2017) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและจำแนกพยาธิปลิงใส 2 ชนิดที่พบในปลาทองจากประเทศอินเดีย ได้แก่ *D. anchoratus* และ *D. vastator* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 18S ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าพยาธิปลิงใสชนิด *D. vastator* ในการศึกษาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับพยาธิปลิงใสชนิด *D. vastator* ที่พบในประเทศจีนและพยาธิปลิงใสชนิด *D. vastator* ที่พบในปลาคาร์ปจากสาธารณรัฐเช็ก ในขณะที่พยาธิปลิงใสชนิด *D. anchoratus* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับพยาธิปลิงใสชนิด *D. anchoratus* ที่พบในปลาทองและปลาคาร์ปจากสาธารณรัฐเช็ก นอกจากนี้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 28S พบว่าพยาธิปลิงใสชนิด *D. vastator* ถูกแยกกลุ่มออกมาจากพยาธิปลิงใสชนิด *D. extensus* ในฐานข้อมูล ในขณะที่พยาธิปลิงใสชนิด *D. anchoratus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับพยาธิปลิงใสชนิด *D. anchoratus* ที่พบในปลาคาร์ปจากประเทศอิหร่าน จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้ยีน 18S และ 28S มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาแหล่งที่มาของการระบาดและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

Mozhdeganlou et al. (2011) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 เพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* โดยเส้น forward ได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 498-515 คู่เบส (5'-CTG CGG AAG GAT CAT TAT C-3') ในขณะที่เส้น reverse ได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 1,019-1,028 (5'-GAT CCA CCA CTT GCA GTT GT-3') เป็นต้น ผลการวิจัยพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขนาดของพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* ได้โดยให้ผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังมีขนาด 532 คู่เบส หลังจากการทดสอบปฏิกิริยาปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส

Ahmadi et al. (2017) ได้ใช้ยีน 28S เพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* โดยเส้น forward มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5' GCGAGTGAACGGAGATTAGC-3' ในขณะที่เส้น reverse มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5' CCATTATTGACCGTGATGTATG-3' เพื่อใช้สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Sharma et al. (2011) ได้นำไพรเมอร์จำเพาะที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณบางส่วนของยีน 18S และบริเวณ ITS1 จากงานวิจัยของ Sinnappah et al. (2001) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพยาธิปลิงใสชนิด *D. anchoratus* โดยได้ผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังเท่ากับ 1.0–1.5 กิโลเบส (Kb)

ข้อมูลทั่วไปของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Centrocestus formosanus*

Phylum Platyhelminthes

Class Trematode

Subclass Digenea

Order Opisthorchiida

Family Heterophyidae

Genus *Centrocestus*

Species *C. formosanus* (Nishigori, 1924)

การจัดจำแนกพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กสกุล *Centrocestus*

การจัดจำแนกในระดับชนิด (species) ของพยาธิใบไม้ในลำไส้สกุล *Centrocestus* พิจารณาตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิระยะตัวเต็มวัย โดยการนับจำนวนหนามที่อยู่บริเวณปากดูดส่วนหน้า มีการเรียงตัวแบบสลับกัน (alternate) จำนวน 2 ชั้น ประกอบด้วย 3 กลุ่ม ดังนี้ (Waikagul et al., 1997)

กลุ่มที่ 1 มีจำนวนหนาม 26-36 หนาม ได้แก่

Centrocestus cuspidatus (Looss, 1896)

Centrocestus formosanus (Nishigori, 1924) [syn. *C. cuspidatus caninus* Leiper, 1913; *Stephenopirum longus* Onji and Nishio, 1916; *C. yokogawai* Kobayashi, 1942 และ *C. caninus* Travassos, 1922]

Centrocestus asadai (Mishima, 1959)

กลุ่มที่ 2 มีจำนวนหนาม 38-48 หนาม ได้แก่

Centrocestus amatus (Tanabe, 1922) [syn. *Stamnosoma nycticoracis* Izumi, 1935]

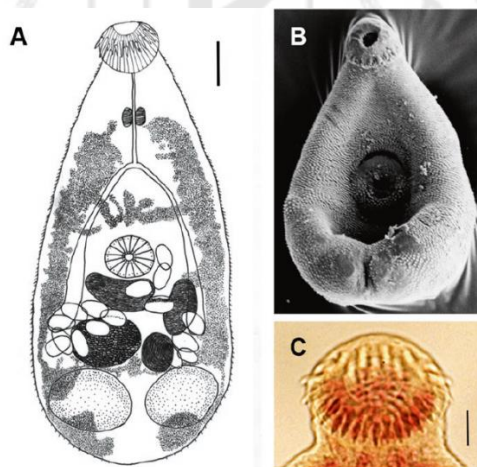
Centrocestus kurokawai (Kurokawa, 1935)

กลุ่มที่ 3 มีจำนวนหนาม 50-60 หนาม ได้แก่

Centrocestus polyspinosus (Kobayashi, 1942)

ข้อมูลของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus*

พยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus* (ภาพประกอบ 5) เดิมทีถูกระบุเป็นพยาธิชนิด *C. cuspidatus caninus* โดย Leiper ในปี 1913 และมีพยาธิชนิดนี้เพียงตัวอย่างเดียวที่เก็บไว้อย่างไม่สมบูรณ์โดย Ransom ในปี 1920 ต่อมาถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *C. caninus* โดย Travassos ในปี 1922 อย่างไรก็ตาม Faust และ Nishigori ในปี 1926 ได้จัดให้ *C. caninus* เป็นชื่อพ้องกับ *Stamnosoma formosanum* ต่อมาในปี 1952 Morozov ได้รับรองให้ *C. armatus*, *C. cuspidatus* และ *C. formosanus* อยู่ในสกุล *Centrocestus* เท่านั้นโดยไม่มีชนิด *C. caninus* สำหรับประเทศไทย Waikagul และคณะในปี 1997 ได้ยอมรับให้ *C. caninus* เป็นชื่อพ้องของ *C. formosanus* โดยอ้างอิงจากงานของ Yamaguti ปี 1958 ส่งผลให้ในปัจจุบันมีการรับรองให้ *C. armatus*, *C. cuspidatus*, *C. formosanus*, *C. kurokawai*, *C. polyspinosus* และ *C. asadai* อยู่ในสกุล *Centrocestus* (Chai et al. 2013) และมีเพียง 4 ชนิด ที่ยังมีข้อมูลการกระจายตัวในปัจจุบัน คือ *C. armatus*, *C. cuspidatus*, *C. formosanus* และ *C. kurokawai* (Chai, 2019)



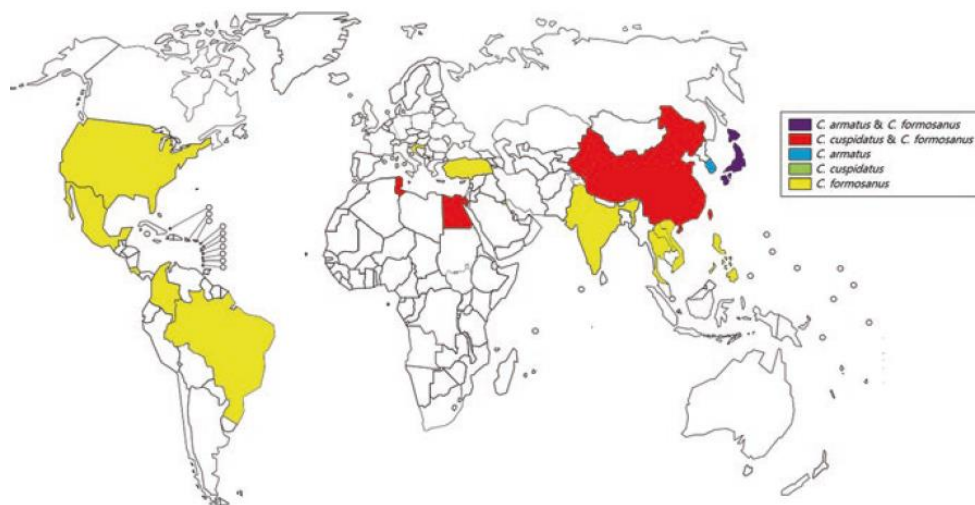
ภาพประกอบ 5 ภาพระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิด *C. formosanus* (scale bar = 0.05 mm)

- (a) ภาพวาดระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิด *C. formosanus*
- (b) ภาพระยะตัวเต็มวัยเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (scanning electron microscopic) ความยาว 280 μm
- (c) ภาพหนาม (circumoral spines) บริเวณรอบ ๆ oral sucker

ที่มา: Chai et al. (2013) (ภาพ a) และ Han et al. (2008) (ภาพ b-c)

ระบาดวิทยาและการกระจายตัว

จากข้อมูลการกระจายตัวของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus* ในปัจจุบันพบการกระจายตัวในแถบทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปอเมริกาใต้ ทวีปยุโรป และทวีปเอเชีย เป็นชนิดที่สามารถพบการกระจายตัวได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Centrocestus* จากรายงานการระบาดในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน จีน ฟิลิปปินส์ อินเดีย ตุรกี ไครเอเชีย สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก โคลอมเบีย เปรู บราซิล คอสตาริกา อียิปต์ ตูนิเซีย เวียดนาม ลาว และไทย เป็นต้น (Chen, 1942; Martin, 1958; Yamaguti, 1975; Madhavi, 1986; Yu and Mott, 1994; Waikagul et al., 1997; Mitchell et al., 2000; Velásquez et al., 2006; Gjurcevic et al., 2007; Thien et al., 2007; Chi et al., 2008; Van and Le, 2011; Pinto et al., 2013; Chai et al., 2013; Najet et al., 2014; Yousif et al., 2016 และ Pulido-Murillo et al., 2018) อย่างไรก็ตามในประเทศไทยในปัจจุบันพบการระบาดของพยาธิในสกุลนี้เพียง 1 ชนิด คือ *C. formosanus* เท่านั้น (Chai, 2019)

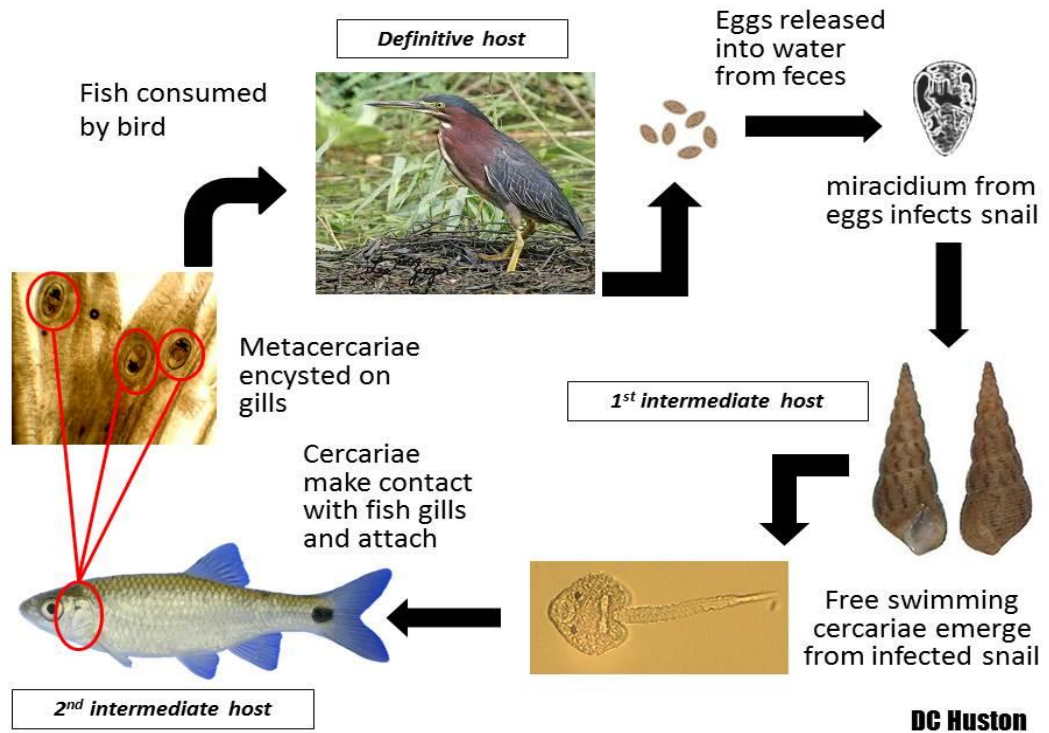


ภาพประกอบ 6 การกระจายตัวของพยาธิสกุล *Centrocestus* ในปัจจุบัน

ที่มา: Chai (2019)

วงชีวิตของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus*

วงชีวิตของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* (ภาพประกอบ 7) เป็นพยาธิใบไม้ที่มีวงชีวิตซับซ้อน ระยะตัวเต็มวัยพบได้ในสัตว์หลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ทำหน้าที่เป็นโฮสต์เฉพาะ (definitive host) เริ่มจากระยะไมราซิเดียมออกจากไข่โดยการออกจากฝาปิด (operculum) รูปร่างลักษณะคล้ายโพโรโทซัวมี cilia อยู่รอบ ๆ ลำตัว ลอยลอยอยู่ในกระแสน้ำมีโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 เป็นหอยน้ำจืดชนิด *Melanoides tuberculata*, *Semisulcospira libertine* และ *Stenomelania newcombi* (Nishigori, 1924; Martin, 1958; Ito, 1964; Chao et al., 1993; Lo and Lee, 1996; Scholz & Salgado-Maldonado, 2000; Pinto et al., 2018 และ Pulido-Murillo et al., 2018) เมื่อถึงสภาวะที่เหมาะสม ระยะไมราซิเดียมจะพัฒนาเป็นระยะสปอโรซีสต์รีเดีย และพัฒนาเป็นระยะเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะสุดท้ายที่อยู่ในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 มีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 คือ มีส่วนหางคล้ายคืบ สามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้อย่างรวดเร็วโดยการโบกหางเป็นรูปตัว “S” เมื่อระยะเซอร์คาเรียสมบูรณ์จะออกจากโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 แล้วทำการไชเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 โดยทำการสลัดหางทิ้งเพื่อเก็บพลังงานไว้ใช้ในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวเองและสร้างถุงหุ้ม (cyst) กลายเป็นระยะเมตาเซอร์คาเรีย ซึ่งเป็นระยะติดต่อ มักพบได้ในกลุ่มปลาน้ำจืดวงศ์ปลาเกล็ดขาว บริเวณที่พยาธิชนิดนี้จะเข้าไปเจริญเติบโตเป็นระยะเมตาเซอร์คาเรียส่วนมากพบอยู่ที่บริเวณซีเหงือกของปลา เมื่อมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังที่เป็นโฮสต์เฉพาะ เช่น นก สุนัข แมว ไก่ หรือมนุษย์ที่อาจเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (Chai et al., 2013) ได้รับประทานปลาที่มีระยะเมตาเซอร์คาเรียอยู่เข้าไปภายในระบบย่อยอาหาร เมื่อช่วงเวลาผ่านไปพยาธิบางส่วนที่ไม่ถูกน้ำย่อยทำลายจะสามารถพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัยได้ ในกรณีที่พบการติดพยาธิจำนวนมากพยาธิจะใช้อวัยวะยึดเกาะทำการเกาะติดอยู่ที่บริเวณผนังลำไส้ของโฮสต์มากขึ้นในชั้น mucosa เพื่อดูดซึมอาหารและสารต่าง ๆ (Sumuduni et al., 2018) ส่งผลให้ผนังลำไส้ทะลุ และอาจทำให้ตัวพยาธิหรือไข่สามารถหลุดเข้าสู่อวัยวะข้างเคียงได้รวมไปถึงระบบประสาท และอาจนำไปสู่การเสียชีวิตขึ้นได้ อย่างไรก็ตามพยาธิระยะตัวเต็มวัยสามารถผลิตสเปิร์มและไข่ออกมาเพื่อปฏิสนธิภายในตัวเอง จากนั้นไข่ที่ได้รับการผสมแล้วถูกปล่อยออกมาพร้อมกับอุจจาระของโฮสต์ เมื่อโฮสต์มีการขับถ่ายลงสู่แหล่งน้ำไหลของพยาธิจะกลับเข้าสู่วงชีวิตและเริ่มต้นอีกครั้ง (Chai et al., 2013) โดยจะแบ่งรายละเอียดทางสัตววิทยาเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

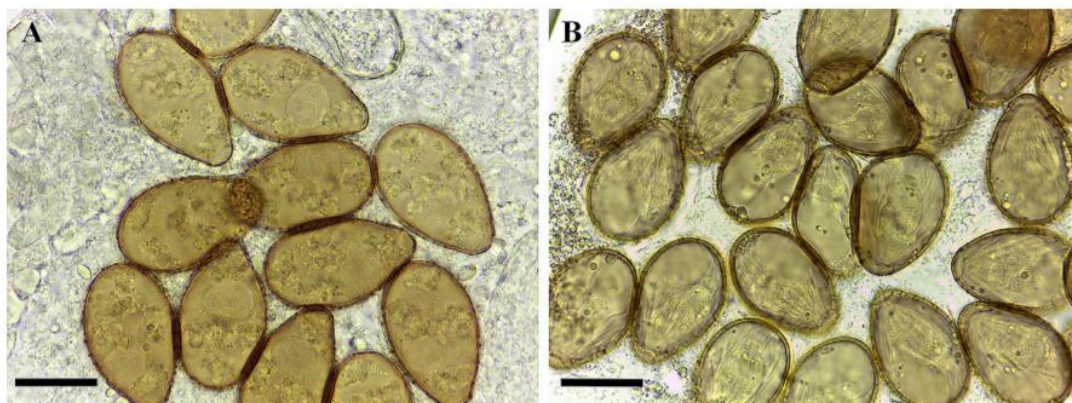


ภาพประกอบ 7 วงชีวิตของพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus formosanus*

ที่มา: Huston et al. (2014)

ระยะไข่

ลักษณะของไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะมีขนาดที่เล็ก รูปร่างคล้ายหยดน้ำ มีความยาวประมาณ 35 ± 2 (33-39) μm และความกว้าง 19 ± 1 (18-21) μm มีสีเหลืองอ่อน พบฟลาปิด พบต่อมสร้างไข่ (vitelline) กระจายตัวอยู่ และภายในไข่พบตัวอ่อน (single cell stage) โดยที่มีขนาดประมาณ 10 ± 1 μm (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 ไข่ของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* (scale bars = 20 μ m)

(a) ไข่ที่ยังไม่ได้รับการปฏิสนธิ (non-embryonated egg)

(b) ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (embryonated egg)

ที่มา: Pinto et al. (2018)

ระยะไมราซีเดียม

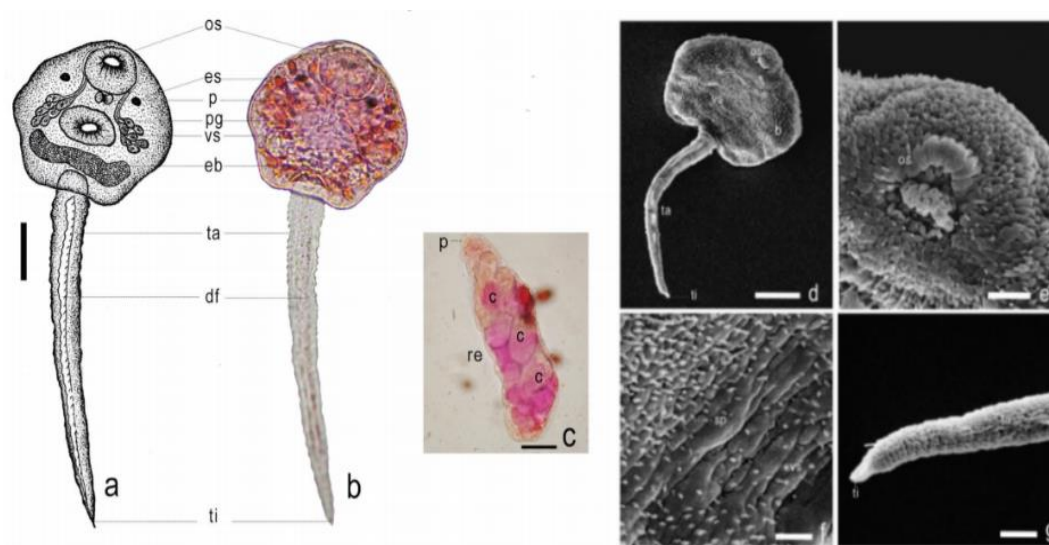
เมื่อไข่ถูกกินโดยโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 ระยะไมราซีเดียมจะมีลักษณะรูปร่างคล้ายโพรงทิวสามารถสร้าง germ cell พัฒนาไปเป็นตัวอ่อนหรือระยะต่อไปได้ โดยจะมีขนาดความยาวประมาณ $23 \pm 3 \mu\text{m}$ และความกว้าง $12 \pm 1.5 \mu\text{m}$ (Pinto et al., 2018)

ระยะสปอโรซิส และรีเดย์

เมื่อระยะไมราซีเดียมเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 ส่วนใหญ่เป็นหอยชนิด *Melanooides tuberculata* โดยเข้าสู่อวัยวะภายในของหอย เช่น ตับ (hepatopancreas) มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะสปอโรซิสลักษณะเป็นทรงกระบอกเรียวยาว มีช่องทางเดินอาหารสั้น ภายในมีตัวอ่อนจำนวนมากที่กำลังพัฒนาเป็น daughter sporocyst หรือพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะรีเดย์ มีลักษณะคล้ายระยะสปอโรซิสสามารถสร้างตัวอ่อนเป็นระยะต่อไปได้ และได้รับอาหารจากโฮสต์โดยการดูดซึมผ่านทางผนังลำตัวโดยตรง (Scholz & Maldonado, 2000)

ระยะเซอ์คาเรีย

ระยะรีเดียภายในพบตัวอ่อนจำนวนมากที่สามารถพัฒนาเป็นระยะต่อไปคือระยะเซอ์คาเรีย จำนวนของระยะเซอ์คาเรียพบได้จำนวนมากต่อจำนวน 1 รีเดีย ลักษณะรูปร่างของระยะเซอ์คาเรีย มีลักษณะที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของพยาธิ แต่สำหรับพยาธิในสกุล *Centrocestus* sp. จะเป็นรูปแบบ pleurolophocercus cercaria (ภาพประกอบ 9) มีลักษณะเด่นคือ ลำตัวเป็นรูปไข่ (Krailas, 2014) หรือเป็นรูปหัวใจ (heart shape) มีความยาวลำตัวขนาด 47-122 μm ความกว้าง 26-71 μm ส่วนหางมีความยาว 62-98 μm ความกว้าง 11-15 μm (Nishigori, 1924) สีของลำตัวเป็นสีเหลือง-น้ำตาล บริเวณปากดูดส่วนหน้ามีขนาดประมาณ 332.8 μm ปกคลุมด้วยหนามขนาดเล็กเรียงตัวจำนวน 9 หนาม ทั้งหมด 2 แถว (Krailas, 2014) บริเวณผนังของถุงขับถ่ายของเสีย (excretory vesicle) มีลักษณะหนา มีการพัฒนาในส่วนของหางสามารถใช้เคลื่อนที่ในน้ำได้ดี เริ่มมีการพัฒนาคอคอยเล็กน้อย อย่างไรก็ตามระยะนี้มีช่วงอายุสั้นอยู่ที่ประมาณ 24-48 ชั่วโมง ไม่สามารถกินอาหารได้เองและมีการเคลื่อนที่ออกจากโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 เข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 อย่างรวดเร็วเพื่อเก็บพลังงานไว้ใช้สำหรับการพัฒนาเป็นระยะถัดไป โดยระยะเซอ์คาเรียทำการไชออกจากหอยน้ำจืดโดยอาศัยปัจจัยภายนอกเป็นตัวกระตุ้น เช่น อุณหภูมิ (positive thermotropism) หรือแสง (positive phototropism) ซึ่งพยาธิบางชนิดอาจใช้ปัจจัยอื่น ๆ นอกเหนือจากนี้ร่วมด้วย (Erasmus, 1972) นอกจากนี้ลักษณะการว่ายน้ำของพยาธิชนิดนี้ในระยะเซอ์คาเรียจะมีทิศทางเป็นแนวตรงด้วยความเร็วประมาณ 0.5 มิลลิเมตร/วินาที โดยที่การติดเชื้อไปสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 จะสำเร็จได้โดยการถูกดูดเข้าไปในบริเวณปากผ่านระบบหายใจของปลา จากนั้นทำการฝังตัวในบริเวณที่เหงือกและพัฒนาเป็นระยะต่อไป ส่งผลให้พยาธิชนิดนี้มีตำแหน่งการติดเชื้อ (site of infection) อยู่ที่ระบบหายใจหรือเหงือกของปลาเป็นหลักและไม่พบการติดเชื้อผ่านการเจาะเข้าสู่ผิวหนังของปลาโดยตรง (Lo & Lee, 1996)



ภาพประกอบ 9 ภาพระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus*

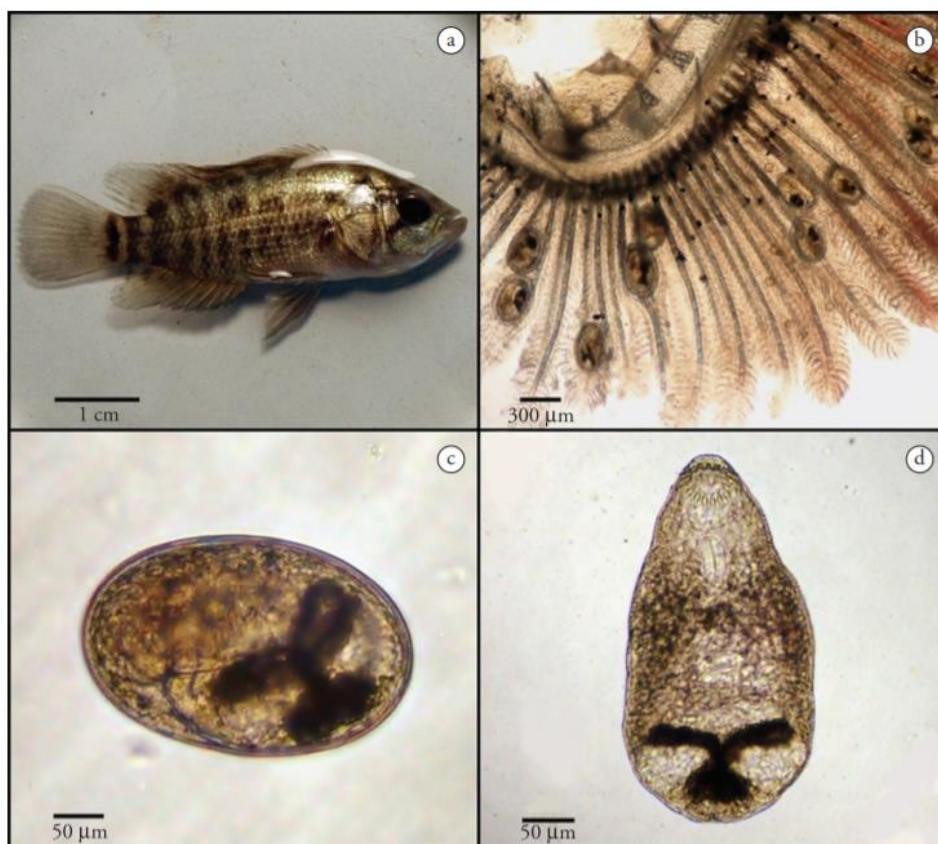
- (a) ภาพวาดระยะเซอร์คาเรีย (b) ภาพระยะเซอร์คาเรียที่ถูกย้อมด้วย 0.5% neutral red
 (c) ภาพระยะรีเดียที่ถูกย้อมด้วย 0.5 % neutral red (d.- g) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
 (scanning electron microscope) Abbreviations: os - oral sucker, es - eye spot,
 p - pharynx, pg - penetration gland, vs - ventral sucker, eb - excretory bladder, ta - tail,
 df - dorsal finfold, ti - tip, re - redia, c - cercaria, b - body, sp - spine
 (scale a, b = 100 μ m, c = 10 μ m)

ที่มา: Krailas et al. (2014)

ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

หลังจากที่ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียทำการไชเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 ส่วนใหญ่เป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ Cyprinidae มักพบการติดตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิในสกุลนี้คือบริเวณที่เหงือก ระยะเซอร์คาเรียที่เข้ามาจะเคลื่อนที่ผ่านบริเวณระบบหายใจของปลา และไชเข้าไปฝังตัวในบริเวณดังกล่าว จากนั้นทำการสลัดหางทิ้งพร้อมเปลี่ยนรูปร่างโดยการผลิตสารออกมาจากต่อม cytogenous glands เพื่อสร้างถุงซีสต์ออกมาห่อหุ้มตัว (encystation) โดยจะเรียกระยะที่เข้าสู่ถุงซีสต์นี้ว่าระยะเมตาเซอร์คาเรีย (ภาพประกอบ 10) ซึ่งเป็นระยะติดต่อ มีช่วงชีวิต

ที่ยาวนานหลายปีจนกว่าโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 ตาย ในระยะนี้มีรูปร่างเป็นทรงกลม-รีขนาด $211.8 \times 160.8 \mu\text{m}$ มีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัยเมื่อออกจากถุงหุ้ม บริเวณปากดูดส่วนหน้ามีการพัฒนาอย่างชัดเจนโดยมีขนาด $56.5 \times 29.3 \mu\text{m}$ และพบหนามจำนวน 32-34 หนาม เรียงสลับเป็น 2 ชั้น ในบริเวณคอหอยเริ่มมีการพัฒนา ลักษณะคล้ายรูปแมล็ดถั่ว ปากดูดด้านท้องมีการพัฒนาอย่างช้า ๆ และมีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ของพยาธิในสกุลนี้ คือ ถุงขับถ่ายของเสีย (excretory bladder) มีสีดำเป็นรูปตัว "X" (X-shaped) อยู่ที่บริเวณส่วนท้ายของลำตัว (Nishigori, 1924)

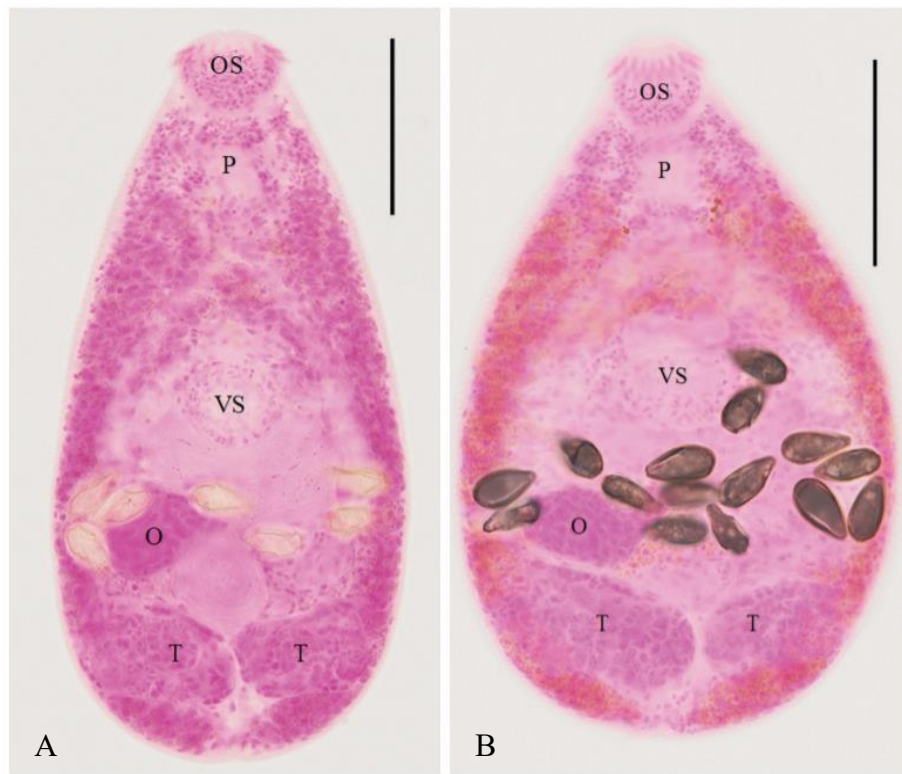


- ภาพประกอบ 10 การติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย
- (a) ภาพโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 ของพยาธิชนิด *C. formosanus*
- (b) ภาพพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียฝังตัวที่บริเวณซี่เหงือก
- (c) ภาพแสดงถุงขับถ่ายของเสียของพยาธิชนิด *C. formosanus*
- (d) ภาพระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุงหุ้ม (excysted)

ที่มา: Pinto & Melo (2012)

ระยะตัวเต็มวัย (adult)

เมื่อระยะเมตาเซอรคาเรียที่อยู่ในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 ถูกโฮสต์เฉพาะ เช่น ไก่ นก สุนัข แมว และหนู กินปลาที่มีระยะเมตาเซอรคาเรียอยู่เข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร พยาธิระยะเมตาเซอรคาเรียมีการพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัยภายในลำไส้ของโฮสต์ (ภาพประกอบ 11) โดยที่ระยะตัวเต็มวัยมีขนาดอยู่ในช่วง $333(289-389) \times 201(187-238) \mu\text{m}$ และบริเวณปากดูดส่วนหน้ามีขนาด $50 \times 47 \mu\text{m}$ โดยลักษณะเด่นของพยาธิชนิดนี้ระยะตัวเต็มวัยคือ บริเวณรอบ ๆ ปากดูดส่วนหน้ามีหนาม 2 ชั้น เรียงตัวแบบสลับ (alternate) จำนวน 32-34 หนาม ซึ่งหนามช่วยเพิ่มความสามารถในการเกาะที่บริเวณผนังลำไส้ของโฮสต์เพื่อดูดซึมอาหารหรือแร่ธาตุที่ใช้ในการพัฒนาตัวเองจนเจริญเติบโตเต็มที่ และเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยอย่างสมบูรณ์ เมื่อเข้าสู่ช่วงพัฒนาเต็มที่พบว่าบริเวณปากดูดส่วนหน้ามีขนาดใหญ่ขึ้นและเห็นซี่หนามชัดเจน หลอดอาหารมีขนาดสั้นมาก คอหอยมีขนาดประมาณ $40-47 \times 20-35 \mu\text{m}$ รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว ปากดูดด้านท้อง (ventral sucker) มีขนาดประมาณ $39-55 \times 36-43 \mu\text{m}$ ซึ่งเล็กกว่าบริเวณปากดูดส่วนหน้าเพียงเล็กน้อยอยู่ในบริเวณกึ่งกลางของลำตัว มีลำไส้แบ่งออกเป็น 2 ทาง เรียงตัวตามแนวยาวลงมาถึง 2 ใน 3 ของความยาวลำตัว มีอวัยวะ 2 อัน อยู่บริเวณเกือบท้ายสุดของลำตัว ขนาดของอวัยวะด้านขวาจะมีขนาดใหญ่กว่าทางด้านซ้าย โดยที่อวัยวะด้านขวามีขนาด $89(77-100) \times 43(37-58) \mu\text{m}$ และอวัยวะด้านซ้ายมีขนาด $78(55-100) \times 42(35-55) \mu\text{m}$ พบรังไข่มีลักษณะกลม-รี มีขนาดประมาณ $54(50-63) \times 40(37-43) \mu\text{m}$ พบการสร้างไข่ออกมาจำนวนมาก ในบริเวณถุงขับถ่ายของเสียมีสีดำเป็นรูปตัว X อยู่ที่บริเวณส่วนท้ายของลำตัวและยังปกคลุมไปด้วยหนามขนาดเล็กตลอดลำตัว (Nishigori, 1924)



ภาพประกอบ 11 ภาพพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยชนิด *C. formosanus* (scale bar = 100 μ m)

(A) ภาพแสดงระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิด *C. formosanus* (normal type)

(B) ภาพวาดระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิด *C. formosanus* (plump type)

ที่มา: Chai et al. (2017)

ตาราง 2 รายงานข้อมูลโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 ของพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus formosanus*

รูปร่างของเซอร์คาเรีย	โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1	ประเทศที่พบ	อ้างอิง
Pleurophocercus cercaria	<i>Melanoides tuberculata</i>	Egypt	Nishigori, 1924
	<i>Melanoides jugicostis</i>	USA	Chao et al., 1993
	<i>Neoradina prasongi</i>	Taiwan	Pulido-Murillo et al., 2018
	<i>Semisulcospira libertina</i>	Japan	Pinto et al., 2018
	<i>Semisulcospira reiniana</i>	Sri Lanka	Lo & Lee, 1996
	<i>Stenomelania newcombi</i>	Mexico	Martin, 1958
	<i>Tarebia granifera</i>	India	Ito, 1964
	<i>Thiara scabra</i>	China	Scholz & Salgado, 2000
	<i>Bithynia siamensis</i>	Iran	Ukong, et al., 2007
	<i>Brotia crostula</i>	Brazil	Yamaguti, 1975
		Turkey	Krailas et al., 2014
		Tunisia	Chontanarth et al., 2013
		Thailand	

ตาราง 3 ข้อมูลโฮสต์ที่กึ่งกลางตัวที่ 2 ของพยาธิชนิด *Centrocestus formosanus* ในประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ค่าความชุก (%)	พื้นที่	อ้างอิง
<i>Cyclocheilichthys enoplos</i>	ปลาตะโกก	0.36	ลพบุรี	Krailas et al., 2016
<i>Labiobarbus siamensis</i>	ปลาช่า	0.14	ลพบุรี	Krailas et al., 2016
<i>Puntioplites proctozysron</i>	ปลากะมั่ง	0.03	ลพบุรี	Krailas et al., 2016
<i>Oxyeleotris marmorata</i>	ปลานูทราย	0.14	ลพบุรี	Krailas et al., 2016
<i>Henicorhynchus siamensis</i>	ปลาสร้อยขาว	-	เชียงใหม่	Saenphet et al., 2008
		0.43	ลพบุรี	Krailas et al., 2016
<i>Carassius auratus</i>	ปลาทอง	-	เชียงใหม่	Saenphet et al., 2006
		83.30	ลพบุรี	Wanlop et al., 2017
<i>Cyprinus carpio</i>	ปลาคาร์ป	36.70	เชียงใหม่	Wanlop et al., 2017
<i>Poecilia latipinna</i>	ปลาสอด	16.70	เชียงใหม่	Wanlop et al., 2017
<i>Danio rerio</i>	ปลาม้าลาย	20.00	เชียงใหม่	Wanlop et al., 2017
<i>Puntigrus tetrazona</i>	ปลาเสือสุมาตรา	10.00	เชียงใหม่	Wanlop et al., 2017
<i>Luciosoma bleekeri</i>	ปลาชีวอำว	6.00	เชียงราย	Jitkham et al., 2020
<i>Anematachthys repasson</i>	ปลาใต้ดินตาขาว	13.00	เชียงราย	Jitkham et al., 2020
<i>Rasbora metallicus</i>	ปลาชีวนวดยาว	91.30	เชียงใหม่	Noikong et al., 2011
<i>Xenentodon cancila</i>	ปลากะตุงเทว	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2000
<i>Channa striata</i>	ปลาชอน	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2000
<i>Channa gachua</i>	ปลาก้างอินเดีย	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2000
<i>Acantopsis thiemmedhi</i>	ปลารากกล้วย	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2000
<i>Lepidocephalichthys birmanicus</i>	ปลาอีต	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2000
<i>Amblyrhynchichthys truncatus</i>	ปลาดามิน	-	เชียงใหม่	Wongsawad & Wongsawad, 2011
<i>Barbonymus gonionotus</i>	ปลาคะเพียนขาว	-	เชียงใหม่	Kumchoo et al., 2005
<i>Cyclocheilichthys armatus</i>	ปลาปากเหลี่ยม	-	เชียงใหม่	Wongsawad & Wongsawad, 2011
<i>Cyclocheilichthys repasson</i>	ปลาใต้ดินตาขาว	-	เชียงใหม่	Noikong et al., 2011
<i>Discherodontus ashmeadi</i>	ปลาแดงน้อย	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004
<i>Hampala dispar</i>	ปลากะตุงจุด	-	เชียงใหม่	Srisawangwong et al., 1997
<i>Hampala macrolepidota</i>	ปลากะตุงขีด	-	เชียงใหม่	Kumchoo et al., 2005
<i>Labiobarbus leptocheilus</i>	ปลาสร้อยลูกกล้วย	-	เชียงใหม่	Boonchot & Wongsawad, 2005
<i>Mystacoleucus atridorsalis</i>	ปลาหนามหลังคืบดำ	-	เชียงใหม่	Srisawangwong et al., 1997
<i>Mystacoleucus marginatus</i>	ปลาหนามหลัง	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004
<i>Osteochilus vittatus</i>	ปลาสร้อยนกเขา	-	เชียงใหม่	Noikong et al., 2011
<i>Puntioplites proctozysron</i>	ปลากะมั่งครีบสั้น	-	เชียงใหม่	Saenphet et al., 2008
<i>Schistura breviceps</i>	ปลาค้อหัวสั้น	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004
<i>Schistura bucculenta</i>	ปลาค้อ	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004
<i>Schistura poculi</i>	ปลาค้อลายถี่	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004

ตาราง 3 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ค่าความชุก (%)	พื้นที่	อ้างอิง
<i>Puntius brevis</i>	ปลาตะเพียนทราย	-	เชียงใหม่	Noikong et al., 2011
		-	เชียงใหม่	Srisawangwong et al., 1997
<i>Puntius orphoides</i>	ปลาแก้มช้ำ	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004
<i>Rasbora argyrotaenia</i>	ปลาชิวควายข้างเงิน	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004
<i>Schistura breviceps</i>	ปลาค้อ	-	เชียงใหม่	Noikong et al., 2008
<i>Barbonymus schwanenfeldii</i>	ปลากระแห	-	เชียงใหม่	Noikong et al., 2008
<i>Rasbora paviana</i>	ปลาชิวควายแถบดำ	-	เชียงใหม่	Saenphet et al., 2008
<i>Rasbora tomieri</i>	ปลาชิวควาย	-	เชียงใหม่	Saenphet et al., 2008
<i>Macrogathus siamensis</i>	ปลาหลด	-	เชียงใหม่	Wongsawad et al., 2004
<i>Trichogaster microlepis</i>	ปลากระดิ่งนาง	-	เชียงใหม่	Saenphet et al., 2008
<i>Trichopsis vittata</i>	ปลากริม	-	เชียงใหม่	Saenphet et al., 2008

การติดพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ในโฮสต์เฉพาะ

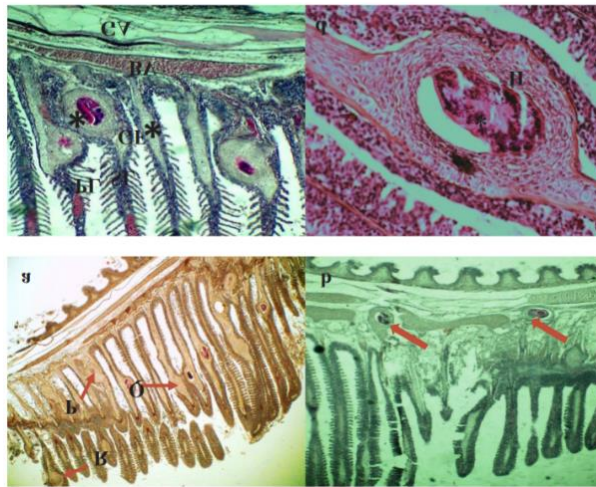
พบรายงานการติดพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ในโฮสต์เฉพาะหลายชนิด ได้แก่ นก กินปลาชนิด *Butorides vitrescens*, *B. striatus*, *Ardeola grayii*, *Nycticorax nycticorax*, *Ardea alba* และสุนัข เป็นต้น (Chen, 1942; Premvati & Pande, 1974; Scholz & Salgado-Maldonado, 2000 และ Mitchell et al., 2002) ในขณะที่พยาธิระยะตัวเต็มวัยมีรายงานการทำให้ติดพยาธิในสัตว์ทดลองหลายชนิด ได้แก่ หนูเม้าส์ หนูแรท (*Rattus norvegicus*) สุนัข แมว กระต่าย และเป็ด เป็นต้น (Tanabe, 1922; Nishigori, 1924; Chen, 1942; Saenphet et al., 2006; Han et al., 2008; Pinto et al., 2015 และ Yousif et al., 2016)

จากรายงานของ Waikagul et al. (1997) พบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* (ภายใต้ชื่อ *C. caninus*) ระยะเวลาตัวเต็มวัยในมนุษย์จำนวน 2 ราย ได้แก่ รายแรกพบการติดพยาธิระยะตัวเต็มวัยในผู้ป่วยเพศชาย อายุ 27 ปี จากอำเภอคลองสะแกต จังหวัดเชียงใหม่ หลังการให้ยารักษา praziquantel มีการตรวจพบพยาธิหลายชนิดร่วมด้วย เช่น *O. viverrini* จำนวน 1 ตัว พยาธิชนิด *C. caninus* จำนวน 5 ตัว และพยาธิชนิด *Haplorchis taichui* จำนวน 1 ตัว ร่วมกับการพบพยาธิตัวกลมเพศเมียชนิด *Enterobius vermicularis* ในรายที่ 2 พบการติดพยาธิในผู้ป่วยเพศหญิง อายุ 44 ปี จากอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย หลังการให้ยารักษา praziquantel มีการตรวจพบพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยหลายชนิด เช่น พยาธิชนิด *C. caninus* จำนวน 1 ตัว ร่วมกับการพบพยาธิชนิด *Haplorchis taichui* จำนวน 70 ตัว นอกจากนี้ในประเทศญี่ปุ่นพบการติดพยาธิชนิดนี้ในมนุษย์ที่เมือง Hiroshima (Ito, 1964 และ Premvati & Pande, 1974) ประเทศจีนพบการติดพยาธิชนิดนี้ในมนุษย์ที่เมือง Fujian โดยพบการติดพยาธิชนิดนี้ในผู้ป่วยจำนวน 2 ราย นอกจากนี้ Chai et al. (2013) ยังพบการติดพยาธิสกุล *Centrocestus* ในผู้ป่วยจำนวน 7 ราย อายุอยู่ในช่วง 23-42 ปี จากอำเภอจำปาสัก อำเภอเชียงขวาง อำเภอคำม่วน และอำเภอสาละวัน ในประเทศลาว จากการซักประวัติผู้ป่วยพบว่ามีอาการรับประทานปลาน้ำจืดที่ไม่ถูกสุกจนน้ำเข้าไปและมีตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียอยู่ภายในปลาเหล่านั้น ลักษณะอาการของผู้ป่วยคือ มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน และเกิดอาการท้องอืด แน่นท้อง แพทย์จึงให้ยา praziquantel เพื่อรักษาอาการและได้ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระพบว่ามีการติดพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยหลายชนิด ได้แก่ พยาธิระยะตัวเต็มวัยชนิด *O. viverrini*, *Centrocestus* sp. และ *H. taichui* เป็นต้น ภายหลังมีการศึกษาชนิดของพยาธิในสกุล *Centrocestus* พบว่าเป็นชนิด *C. formosanus* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบหนามจำนวน 32 หนาม ร่วมกับการศึกษาด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 18S ribosomal RNA เทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยพบจำนวนพยาธิชนิด *C. formosanus* รวมทั้งหมด 122 ตัว จากผู้ป่วยจำนวน 7 ราย

ลักษณะทางพยาธิสภาพ

Sumuduni et al. (2018) พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเมตาเซอรรีคาเรียสามารถแทรกตัวอยู่บริเวณซีเหงือก (ภาพประกอบ 12) และบริเวณที่เกิดการติดเชื่อพบว่า เซลล์กระดูกอ่อนเกิดการสร้างออกมามากกว่าปกติ (epithelial hyperplasia) (ภาพประกอบ 13) เพื่อทดแทนส่วนที่สูญเสียไป นอกจากนี้ยังพบการผลิตเซลล์เมือกจำนวนมาก (mucous cells) บริเวณรอบ ๆ ตัวพยาธิ เป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของโฮสต์โดยตัวอ่อนของพยาธิชนิดนี้ ถูกห่อหุ้มด้วยถุงที่มีลักษณะใสและในบริเวณรอบ ๆ ที่พบการติดพยาธิระยะเมตาเซอรรีคาเรียจะพบชั้นของเซลล์กระดูกอ่อน (chondroblasts หรือ chondrocytes) ที่ถูกสร้างจากตัวของโฮสต์เองจำนวนมาก อีกทั้งลักษณะนิวเคลียสของเซลล์แต่ละเซลล์ดังกล่าวจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปโดยบริเวณรอบ ๆ ตัวอ่อนของพยาธิจะมีลักษณะนิวเคลียสที่ลิบแบน ในขณะที่บริเวณรอบนอกที่ไม่ติดเชื่อจะมีลักษณะกลมเป็น 3 มิติ

Sumuduni et al. (2018) ศึกษาการติดพยาธิชนิด *C. formosanus* ระยะตัวเต็มวัยในโฮสต์เฉพะจากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological sections) ในบริเวณลำไส้เล็ก duodenum, jejunum และ ileum พบว่าการติดพยาธิส่วนใหญ่แล้วพบในบริเวณลำไส้ส่วน duodenum และ jejunum โดยพบพยาธิใบไม้ชนิดนี้เกาะติดอยู่ที่บริเวณ villi ของผนังลำไส้จนเกิดความเสียหายที่บริเวณ epithelium cell นอกจากนี้ยังพบการฝังตัวของพยาธิระยะตัวเต็มวัยชนิดนี้ อยู่ในชั้น sub mucosa ของลำไส้ในบริเวณ duodenum (ภาพประกอบ 14) และพบการสร้างไข่ของพยาธิใบไม้ชนิดนี้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ในบางบริเวณพยาธิยังมีการบุกรุกเข้าไปในผนังลำไส้ชั้น tunica muscularis ได้อีกด้วย (ภาพประกอบ 15) โดยพยาธิใบไม้ที่พบในลำไส้ดังกล่าว นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีขนาดเล็กเป็นรูปหยดน้ำประกอบด้วยหนามจำนวน 32 หนาม เรียงตัวอยู่บนบริเวณปากดูดส่วนหน้า ท่อขับของเสียมีลักษณะเป็นรูปตัว X และมีการสร้างไข่อยู่ภายใน



ภาพประกอบ 12 ลักษณะทางพยาธิสภาพของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus*

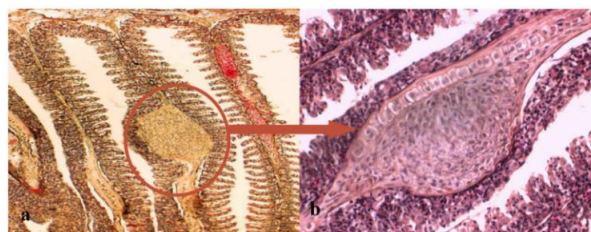
(a) เหงือกของปลาแคร์ป (*Cyprinus carpio*)

(b) ภาวะอักเสบของพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่แทรกอยู่บริเวณซี่เหงือก

(c) การเรียงตัวของซี่เหงือกที่บิดเบี้ยว

(d) ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย

ที่มา: Sumuduni et al (2018)

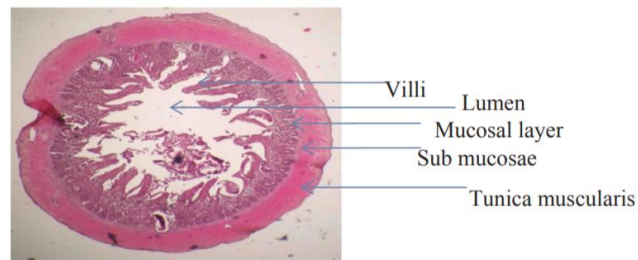


ภาพประกอบ 13 ลักษณะซี่เหงือกที่พัฒนาผิดปกติ

(a) จำนวนเซลล์ที่มีมากกว่าปกติ (hyperplasia) บริเวณซี่เหงือก

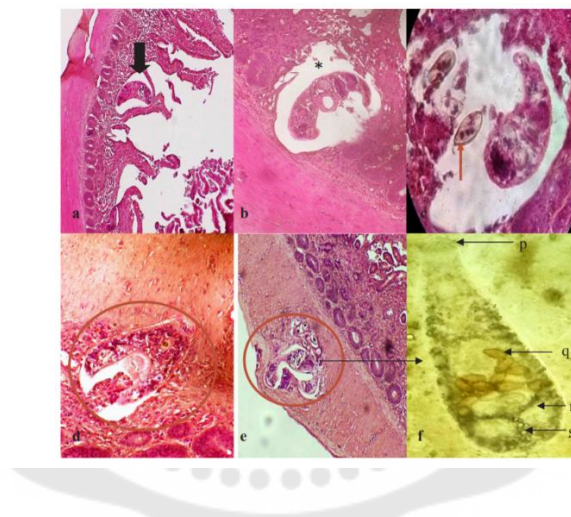
(b) กำลังขยายของภาพ a ($\times 100$, H&E)

ที่มา: Sumuduni et al. (2018)



ภาพประกอบ 14 พยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กรชนิด *C. formosanus* ที่ฝังตัวภายในชั้น sub mucosa ของลำไส้เล็ก

ที่มา: Sumuduni et al. (2018)



ภาพประกอบ 15 พยาธิสภาพของพยาธิชนิด *C. formosanus* ในบริเวณลำไส้ *A. ralloides*

(a) ระยะเวลาตัวเต็มวัยของพยาธิชนิด *C. formosanus* ที่กำลังถูกล้อมรอบด้วย villi ($\times 40$, H&E)

(b) *C. formosanus* ในบริเวณชั้น sub mucosae

(c) พยาธิที่กำลังปล่อยไข่ออกมาที่บริเวณหัวลูกศร ($\times 400$, H&E)

(d) *C. formosanus* ในบริเวณชั้น tunica muscularis ($\times 400$, H&E)

(e) *C. formosanus* ในบริเวณชั้น tunica muscularis ($\times 100$, H&E)

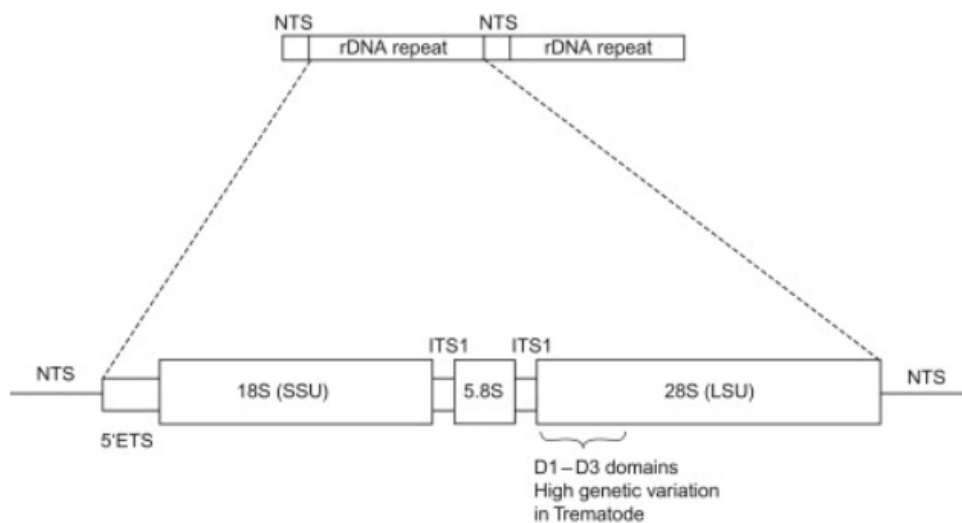
(f) *C. formosanus* ระยะเวลาตัวเต็มวัย ในลำไส้เล็กของ *A. ralloides*

ที่มา: Sumuduni et al. (2018)

Africa et al. (1940) ศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพและอาการของโรคที่เกิดจากการติดพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae พบว่าทั่วไปแล้วมนุษย์ไม่ใช่โฮสต์เฉพาะตามธรรมชาติแต่เป็นเพียงการติดพยาธิกลุ่มนี้โดยบังเอิญ (accidental host) ผ่านการรับประทานปลาน้ำจืดที่ไม่ถูกสุกจนมัย ส่งผลให้มนุษย์ได้รับการติดพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าสู่ร่างกาย ในกรณีพบการติดพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียจำนวนน้อยมักไม่ส่งผลเสียใด ๆ มากนักหรือไม่แสดงอาการ ในผู้ป่วยที่พบทั่วไป จะพบการอักเสบของเยื่อภายในลำไส้ (abdominal tenderness) เล็กน้อย ร่วมกับอาการท้องเสียเรื้อรัง ถ่ายเหลวเกิน 2 ครั้ง/วัน หรือมากกว่านั้น (chronic diarrhea) เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน (abdominal pain) อาจมีอาการถ่ายเป็นเลือดได้ (bloody diarrhea) ในผู้ป่วยบางราย แต่สำหรับกรณีที่มีการติดพยาธิจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรง หรือเกิดการตายของเซลล์ (necrosis) ในบริเวณชั้นเยื่อของผนังลำไส้ (mucosa) เป็นผลให้เกิดรูที่บริเวณผนังลำไส้ พยาธิหรือไข่ของพยาธิอาจเข้าไปสู่ระบบหมุนเวียนเลือดได้ รวมทั้งอวัยวะข้างเคียงอื่น ๆ เช่น ตับ ปอด ไชสันหลัง และอาจขึ้นไปสู่เยื่อหุ้มสมองได้ อย่างไรก็ตามลักษณะอาการเหล่านี้ขึ้นอยู่กับจำนวนของพยาธิรวมทั้งระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล (acquired immunity) เป็นกลไกที่คอยป้องกันสิ่งแปลกปลอมเมื่อเข้าสู่ร่างกายสำหรับมนุษย์

การศึกษาทางอณูชีววิทยา

วิธีการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตถูกสร้างขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการบ่งบอกถึงความเหมือนหรือความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ โดยใช้ลักษณะการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาค แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดในหลาย ๆ ด้าน ได้แก่ ข้อมูลการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ มีไม่เพียงพอที่จะสามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน รวมถึงการเก็บตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ไม่สมบูรณ์ เช่น ตัวอย่างมีสภาพที่แห้งหรือชำรุด ส่งผลให้การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการบกพร่องและไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นเรื่องยากหากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว จำเป็นต้องใช้ความชำนาญสูงในการจัดจำแนกของนักอนุกรมวิธานจึงเกิดการแก้ปัญหาในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้การศึกษาในระดับโมเลกุลที่เรียกว่า การทดสอบด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) โดยเริ่มจากการนำมาใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรีย หรือการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อย่างชัดเจนรวมไปถึงการระบุชนิดของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ จนเป็นผลสำเร็จในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่วิธีการเหล่านั้นยังไม่ประสบความสำเร็จในสิ่งมีชีวิตชั้นที่สูงกว่าในช่วงนั้น (Frézal & Leblois, 2008) อย่างไรก็ตาม Hebert (2003) ได้คิดค้นการใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า “ดีเอ็นเอบาร์โค้ด” (DNA barcode) โดยมีต้นแบบมาจากบาร์โค้ดของสินค้าในห้างสรรพสินค้าที่สามารถบ่งบอกข้อมูลได้อย่างละเอียดตั้งแต่รายชื่อของสินค้า ราคา วันผลิตและวันหมดอายุของสินค้าขึ้นนั้นเพื่อใช้เป็นเอกลักษณ์สำหรับการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น (Vrijenhoek, 1994; Zhang and Hewitt, 1997 และ Frézal and Leblois, 2008)

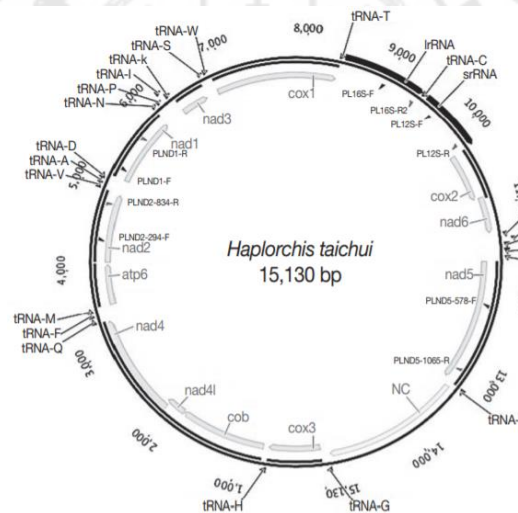


ภาพประกอบ 16 สารพันธุกรรมในนิวเคลียสของพยาธิใบไม้

ที่มา: Waikagul & Thaekham (2014)

สารพันธุกรรมที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear ribosomal DNA) คือ บริเวณที่ถูกถอดรหัสเป็นโมเลกุลไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (rRNA) ร่วมกับโปรตีนกลายเป็นไรโบโซมขนาดต่าง ๆ สามารถพบได้จำนวนมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอตทุกชนิด (ภาพประกอบ 17) เนื่องจากยีนในไรโบโซมเป็น multicopy gene family มีความแปรผันสูงในระหว่างสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกัน แต่จะพบลำดับเบสและความยาวเหมือนกันภายในสายพันธุ์เดียวกัน (closely related species) เป็นยีนที่มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก โดยปกติยีนในไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียงตัวซ้ำ ๆ กัน (tandem repeat) กระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนมมากถึง 5,000 ชุด โดยแต่ละหน่วยถูกแยกออกจากกันด้วยบริเวณที่เรียกว่า intergenic spacer (IGS) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นยีน (coding regions) ได้แก่ 18S, 5.8S และ 28S rDNA และส่วนที่ไม่ใช่ยีน เช่น internal transcribed spacer region (non-coding region) ได้แก่ ITS1 เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง 18S และ 5.8S rDNA และบริเวณ ITS2 อยู่ระหว่างยีน 5.8S และ 28S rDNA เรียงตัวต่อกันจากบริเวณ 5' ไปยังปลาย 3' โดยมีเอนไซม์ RNA Polymerase I ทำหน้าที่ถอดรหัสกลุ่มยีนดังกล่าวได้เป็น pre-rRNA ขนาด 45S ร่วมกับการตัดบริเวณ ITS1 และ ITS2 (Subbotin & Moens, 2006) ในกระบวนการ rRNA processing ได้เป็น mature rRNA 3 ขนาด

คือ 18S, 5.8S และ 28S โดยที่ 18S rRNA รวมกับโปรตีน 30 ชนิด กลายเป็น 40S (small ribosomal subunit) และ 5.8S, 28S และ 5S rRNA รวมกับโปรตีนจำนวน 50 ชนิด ได้เป็น 60S (large ribosomal subunit) ประกอบรวมกันเป็นไรโบโซมขนาด 80S (Gerbi, 1985) ส่งผลให้ปัจจุบันได้รับความนิยมในการใช้ยีนหรือบริเวณ ITS ดังกล่าวในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตรวมถึงศึกษาวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้หลายชนิด เช่น การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ในปอดชนิด *Paragonimus paishuihoensis* (วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์, 2554) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ในตับชนิด *Opisthorchis viverrini* (อิสระพงศ์ โพธิ์สุข, 2556) พยาธิใบไม้ในตับชนิด *O. viverrini* ร่วมกับพยาธิชนิด *Clonorchis siensis* (Park, 2007) พยาธิใบไม้ในเลือดชนิด *Schistosoma hippopotami* (Despres, 1995) พยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *H. pumilio* (Pulido-Murillo, 2018) พยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus* (Wanlop et al., 2017)



ภาพประกอบ 17 จีโนมในไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *H. taichui*

ที่มา: Lee et al. (2013)

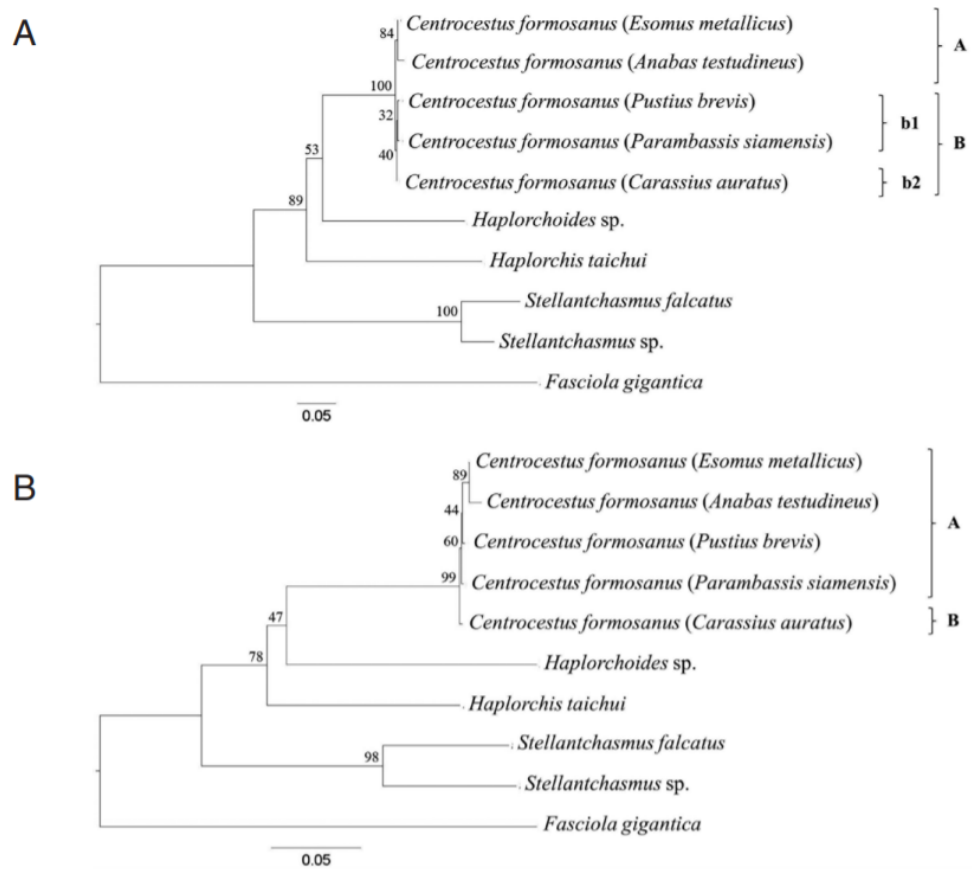
ในปัจจุบันการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้โดยทั่วไปหรือพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กได้รับความนิยมในการใช้ยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (ภาพประกอบ 18) รวมถึงการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (DNA marker) ในการระบุชนิดของพยาธิใบไม้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรีย

นั้นมีขนาดที่สั้นกว่าสารพันธุกรรมในนิวเคลียสและไม่มีความซับซ้อนมากนัก โดยสารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กมีจำนวนประมาณ 13-24 กิโลเบส ประกอบด้วย 37 ยีน โดยมี 11 ยีนที่สามารถถอดรหัสให้โปรตีนเพื่อใช้ในกระบวนการ oxidative phosphorylation โดยแบ่งออกเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อน 4 ชนิด คือ โปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 1 (protein complex I) คือ NADH ubiquinone reductase (ND) จำนวน 7 ยีน ได้แก่ *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4l*, *nad5* และ *nad6* เป็นต้น มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 906, 870, 306, 1281, 264, 1587 และ 459 ตามลำดับ โปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 3 (protein complex III) คือ ubiquinone cytochrome reductase จำนวน 1 ยีน คือ *cytochrome b (Cytb)* มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,110 คู่เบส โปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 4 (protein complex IV) คือ cytochrome oxidase จำนวน 3 ยีน ได้แก่ *coxI*, *coxII* และ *coxIII* เป็นต้น มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1542, 624 และ 657 คู่เบส ตามลำดับ โปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 5 คือ ATP synthase จำนวน 1 ยีน คือ *atp6* มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 516 คู่เบส เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (Lee et al., 2013)

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Wanlop et al. (2017) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ในชนิด *Centrocestus* sp. ที่พบในปลาทอง (ภาพประกอบ 19) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 พบว่าพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus* sp. ที่พบในปลาทองจัดอยู่ในกลุ่มของพยาธิในชนิด *Centrocestus* sp. อื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ JQ390545, JQ390546, KF658455, KF658456, KF658457, KF658458 KF658459 และ KJ 630836 โดยมีค่า bootstrap อยู่ที่ 100% และยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพยาธิชนิดอื่น ๆ วงศ์ Heterophyidae ได้แก่ *H. taichui*, *Haplochoides* sp. และ *S. falcatus* ด้วยวิธี maximum-likelihood (ML) โดยมีค่า bootstrap อยู่ที่ 74% และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้วิธี neighbor-joining (NJ) พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus* sp. ชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยมีค่า bootstrap อยู่ที่ 98% นอกจากนี้พบว่าพยาธิที่พบในปลาทองมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ วงศ์ Heterophyidae อีกด้วย

Wongsawad et al. (2017) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* (ภาพประกอบ 20) ที่เก็บรวบรวมได้จากปลา 5 ชนิด ได้แก่ ปลาชิวหนวดยาว (*E. metallicus*) ปลาตะเพียนทราย (*P. brevis*) ปลาหมอ (*A. testudineus*) ปลาแบนแก้ว (*P. siamensis*) และปลาทอง (*C. auratus*) โดยการสร้างแผนภาพวิวัฒนาการในรูปแบบ cladogram ด้วยวิธี maximum-likelihood ที่ได้จากการทำ Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) ของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* จากบริเวณ ITS2 และยีน COI จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่ามีการแบ่งออกเป็น 2 clade หลัก คือ clade A พยาธิชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลาชิวหนวดยาว ปลาตะเพียนทราย มีนามจำนวน 32 นาม อยู่ใน clade เดียวกันทั้ง 2 ชนิด และ clade B พยาธิชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลาหมอ ปลาแบนแก้ว และปลาทอง จัดให้อยู่ใน clade B จากปลาทั้งหมด 3 ชนิด มีจำนวนนามตั้งแต่ 32-34 นาม นอกจากนี้ยังถูกแยกออกเป็น clade ย่อยคือ b1 ได้แก่ *C. formosanus* ที่พบในปลาหมอ และปลาแบนแก้ว clade b2 คือ *C. formosanus* ที่พบในปลาทองเพียงชนิดเดียวโดยมีจำนวนนามคือ 34 นาม อย่างไรก็ตามภาพ B เป็นการสร้างแผนภาพวิวัฒนาการในรูปแบบ Cladogram ด้วยวิธี neighbor-joining ของพยาธิชนิด *C. formosanus* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS2 และยีน COI จำนวน 1,000 ซ้ำ ถูกแบ่งออกเป็น 2 clade หลัก คือ clade A พยาธิชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลาชิวหนวดยาว ปลาตะเพียนทราย ปลาหมอ และปลาแบนแก้ว มีจำนวนนามจำนวน 32 นาม อยู่ใน clade เดียวกันทั้ง 4 ชนิด และ clade B พยาธิชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลาปลาทองนั้นได้จัดให้อยู่ใน clade B เพียงชนิดเดียว โดยมีจำนวนนาม 34 นาม อย่างไรก็ตามพยาธิชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลาน้ำจืดทั้ง 5 ชนิด ยังถือได้ว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกันจากภาพ A โดยการสร้างแผนภาพวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum-likelihood มีค่า bootstrap values อยู่ที่ 100% และภาพ B การสร้างแผนภาพด้วยวิธี neighbor-joining มีค่า bootstrap values อยู่ที่ 99% อีกทั้งยังสามารถแยก clade ออกจากพยาธิชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Haplorchoides* sp., *H. taichui* และ *S. falcatus* วงศ์ Heterophyidae อีกด้วย

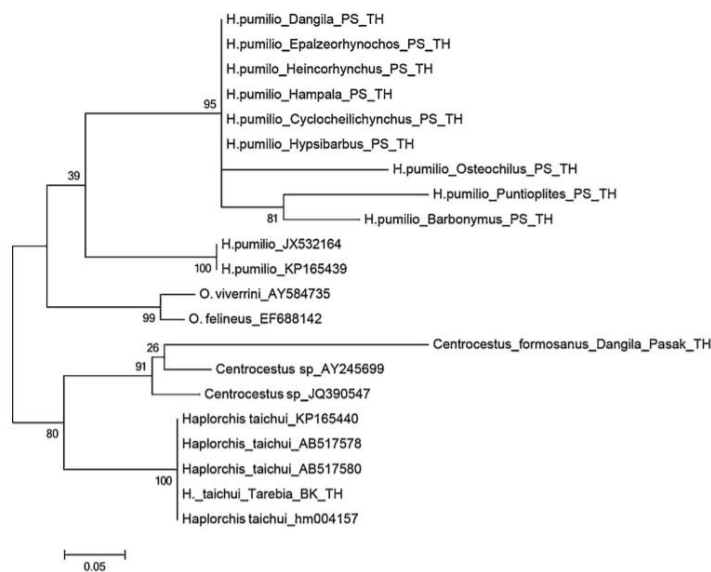


ภาพประกอบ 18 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลาน้ำจืด 5 ชนิด

- (a) การสร้างแผนภาพวิวัฒนาการในรูปแบบ cladogram ด้วยวิธี maximum-likelihood ของพยาธิชนิด *C. formosanus* บริเวณ ITS2 และยีน *COI* จำนวน 1,000 ซ้ำ
- (b) การสร้างแผนภาพวิวัฒนาการในรูปแบบ cladogram ด้วยวิธี neighbor-joining ของพยาธิชนิด *C. formosanus* บริเวณ ITS2 และยีน *COI* จำนวน 1,000 ซ้ำ

ที่มา: Wongsawad et al. (2017)

Krailas et al. (2016) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาอินทรีที่ถูกรับ ตัวอย่างได้จากปลาน้ำจืดจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ (ภาพประกอบ 21) จำนวน 25 ชนิด ได้แก่ *Parambassis siamensis*, *Parambassis wolffii*, *Anabas testudineus*, *Oreochromis niloticus*, *Barbonymus altus*, *Barbonymus schwanenfeldii*, *Cyclocheilichthys enoplos*, *Hampala dispar*, *Henicorhynchus siamensis*, *Hypsibarbus wetmorei*, *Labeo chrysophekadion*, *Labeo rohita*, *Labiobarbus siamensis*, *Osteochilus hasseltii*, *Paralaubuca riveroi*, *Puntioplites proctozysron*, *Rasbora daniconius*, *Oxyeleotris marmorata*, *Zenarchopterus ectuntio*, *Pristolepis fasciata*, *Chitala ornate*, *Notopterus notopterus*, *Trichopodus microlepis*, *Trichopodus pectoralis* และ *Toxotes microlepis* พบ การติดพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย จำนวน 2 ชนิด คือ *H. pumilio* และ *C. formosanus* จากปลา เพียง 10 ชนิด เท่านั้น ได้แก่ *Barbonymus altus*, *Barbonymus schwanenfeldii*, *Cyclocheilichthys enoplos*, *Hampala dispar*, *Henicorhynchus siamensis*, *Hypsibarbus wetmorei*, *Labiobarbus siamensis*, *Osteochilus hasseltii*, *Puntioplites proctozysron* และ *Oxyeleotris marmorata* จากนั้นทำการแยกตัวอย่างพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย 2 ชนิด มาสกัดดีเอ็นเอพร้อมทั้งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (ITS1 regions: ITS1-F: 5'-GTA TGC TTC GGC AGC TCG ACC GG-3 ITS1-R: 5'-GGCTGC GCT CTT CAT CGA CAC ACG-3) และ ITS2 (ITS2 regions: ITS2-F: 5'-CTT GAACGC ACA TTG CGG CCA TGG G-3 ITS2-R: 5'-GCG GGT AAT CACGTC TGA GCC GAG G-3) ได้ผลิตภัณฑ์ของปลาอินทรีชนิด *H. pumilio* เท่ากับ 1,250 และ 380 คู่เบส ตามลำดับ โดยที่พยาธิชนิด *C. formosanus* ได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 700 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากนั้นไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี maximum likelihood โดยใช้รูปแบบ Tamura-Nei จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่าพยาธิชนิด *H. pumilio* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพยาธิชนิด *H. pumilio* ในฐานข้อมูล (JX532164 และ KP165439) โดยมีค่า bootstrap อยู่ที่ 39% และพยาธิชนิด *C. formosanus* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับพยาธิชนิด *Centrocestus* sp. ในฐานข้อมูล (AY245699 และ JQ390547) โดยมีค่า bootstrap อยู่ที่ 26% เมื่อเทียบจากฐานข้อมูล



ภาพประกอบ 19 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *H. pumilio* และ *C. formosanus*

ที่มา: Krailas (2016)

Pulido-Murillo et al. (2018) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ในลำไส้ ขนาดเล็กระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ pleurolophocercous cercaria จากหอยน้ำจืดชนิด *M. tuberculata* (ภาพประกอบ 22) โดยการเพิ่มปริมาณ DNA บางส่วนของยีน 28S rDNA จำนวน 1,176 คู่เบส พบว่าพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบดังกล่าวมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ในประเทศเวียดนาม (KY369153) และ *C. formosanus* ในประเทศไทย (HQ874609) อีกทั้งพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ parapleurolophocercous จากหอยชนิด *M. tuberculata* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *H. pumilio* ในประเทศเวียดนาม (KY369155) และประเทศไทย (HM004186) จากฐานข้อมูลโดยใช้วิธี bayesian inference (BI) และ maximum likelihood จากรายงานดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ pleurolophocercous cercaria สามารถพัฒนาเป็นพยาธิชนิด *C. formosanus* ระยะตัวเต็มวัยได้ และพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ parapleurolophocercous สามารถพัฒนาเป็นพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิด *H. pumilio* ได้

การระบุชนิดพยาธิใบไม้โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

Pace et al. (2020) พัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยมีการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจสอบการติดพยาธิชนิด *C. formosanus* ที่พบในปลา Zebrafish (*Danio rerio*) ซึ่งใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ ITS2_Centr_F 5' ATGAAGAGCGCAGCCAAC-3' และ ITS2_Centr_R 5' CGTGCAATGTTTGCATCGGA-3' ผลิตรหัสที่ได้เท่ากับ 393 คู่เบส ตรวจสอบผลิตรหัสด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตชนิดอื่น ๆ

สุรัชย์ พิกุลแก้ว และคณะ (2556) ได้ตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรัคคารีไม่ทราบชนิดในปลาทองปวยจำนวน 10 ตัว โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ก่อนการตรวจวินิจฉัยพบลักษณะทางคลินิก คือ หายใจลำบาก มีการลอยตัวบนผิวน้ำและพบปลาบางตัวตายในแหล่งเดียวกัน จากนั้นทำการส่งตรวจตัวอย่างจากร่างกายของปลา เช่น เมือก ผิวน้ำ ครีบ และเหงือกปลา จากการตรวจสอบพบการติดปรสิตภายนอก คือ พยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ประมาณ 30-40 ตัว และการตรวจสอบปรสิตภายในโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบการติดพยาธิตัวอ่อนที่บริเวณเหงือกและเริ่มเก็บตัวอย่างเหงือกเพื่อใช้ในการวินิจฉัยด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit และทำการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *C. formosanus* (AY245759.1) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Primer3 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะคือ Cfo-F 5' ACG ATC AGA TCC GTC CTA GTT C 3' และ Cfo-R 5' GGA TAC AGA GGA CAG GCG TAC T 3' จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและตรวจสอบผลิตรหัสที่ได้จากการทำ gel electrophoresis พบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรัคคารีชนิด *C. formosanus* แสดงผลจากการทำ gel electrophoresis โดยมีผลิตรหัสที่ได้เท่ากับ 389 คู่เบส และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

Chontanarith (2017) ตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ด้วยเทคนิค multiplex PCR เพื่อระบุพยาธิชนิด *C. caninus* (ในปัจจุบันเป็นชื่อพ้องของพยาธิชนิด *C. formosanus*) และ *S. falcatus* โดยในการศึกษานี้มีการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ของพยาธิทั้ง 2 ชนิด โดยการใส่ไพรเมอร์จำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ ITS3 (5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3') เป็นเส้น forward primer และ ITS4 (5' TCC TCCGCTTATTGATATGC 3') เป็น reverse primer ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนที่บริเวณ

ITS2 ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิชนิด *C. caninus* โดยใช้ CC-F (5' CGG CGT GAT TTC CTT GTG CTTTGC) เป็น forward primer และ CC-R (5' GCA CAC ATT AGA AAC GCG TGC AAT) เป็น reverse primer โดยมีผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 231 คู่เบส และออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิชนิด *S. falcatius* โดยใช้ ST-F (5/CTGTTG TAG GGT GCC GGA TC) เป็น forward primer และ ST-R (5/GCA CAC ATTAGA AAC GCG TGC AAT) เป็น reverse primer โดยมีผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 137 คู่เบส จากผลการทดลองสามารถแยกความแตกต่างของพยาธิใบไม้ทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) กับพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ วงศ์ Heterophyidae และการทดสอบค่าความไว (sensitivity) โดยการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอลงไปถึง 2 เท่า (two-fold serial dilution) โดยเริ่มต้นที่ 10 - 0.3125 ng/μL พบว่าสามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอได้น้อยที่สุดสำหรับพยาธิชนิด *C. caninus* เท่ากับ 2.5 ng/μL และพยาธิชนิด *S. falcatius* มีค่าเท่ากับ 0.3125 ng/ml นอกจากนี้การทดสอบ multiplex PCR พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 2.5 ng/μL

Wongsawad et al. (2017) ศึกษาระบาดของพยาธิและระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิใบไม้ในปลาไส้ขนาดเล็กชนิด *Centrocestus* spp. ในกลุ่มหอยเจดีย์ และปลาเกล็ดขาวบริเวณภาคเหนือตอนบน จากการศึกษาพบการระบาดของพยาธิใบไม้ *Centrocestus* spp. ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ pleurolophocercous cercaria ในหอยจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *M. tuberculata*, *T. granifera*, *B. siamensis* และ *L. rubiginosa* ปลาน้ำจืดทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ ปลาชิวหนวด ยาว ปลากระดี่หม้อ ปลาแก้มขี้ ปลาชิวควาย ปลาตะเพียนทราย ปลาหมอไทย ปลาไส้ตันตาขาว ปลากริมควาย ปลาตะเพียนขาว ปลากระดี่นาง ปลาหมอตาล ปลาแป้นแก้ว ปลาหนามหลัง และปลาทอง ในการศึกษานี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้เทคนิค SRAP-PCR ในบริเวณ ITS2 และยีน COI พบว่าพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus* spp. มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับพยาธิชนิด *C. formosanus* ในประเทศลาว และแยกกลุ่มออกจากพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ ที่อยู่วงศ์ Heterophyidae ได้ จากการศึกษาพบว่าพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus* spp. ที่พบในปลาน้ำจืดจากประเทศลาว 4 ชนิด ได้แก่ ปลาชิวหนวดยาว ปลาตะเพียนทราย ปลาหมอ และปลาแป้นแก้ว มีจำนวนหนามทั้งหมด 32 หนาม ยกเว้นในปลาทองพบพยาธิใบไม้ชนิดนี้มีจำนวนหนามถึง 34 หนาม จากการศึกษานี้ได้ติดตามการตรวจสอบของพยาธิชนิดนี้ด้วยเทคนิค Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP- PCR) โดยใช้ SRAP primer 11 คู่ ได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 500 คู่เบส ที่จำเพาะต่อพยาธิชนิด *C. formosanus* จากไพรเมอร์คู่ ME5 และ

EM6 จากนั้นส่งสังเคราะห์ไพรเมอร์จำเพาะขึ้นหลังจากหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 20 คู่เบส ดังนี้ forward primer; CF-F: 5'GGCTGCGTCGATTTTGTTCAG 3' และ reverse primer; CF-R: 5' AGGAGCCCAGGGTAATCTCC 3' เมื่อนำมาทดสอบกับพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยพยาธิชนิด *C. formosanus* พบผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 275 คู่เบส พร้อมทั้งทดสอบกับพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย และระยะเซอร์คาเรียทุกรูปแบบที่พบในหอย 3 ชนิด พบผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 275 คู่เบส ในปลาทั้ง 10 ชนิด และเซอร์คาเรียรูปแบบ pleurolophocercous cercaria เท่านั้น ดังนั้นการศึกษานี้สามารถยืนยันได้ว่ามีปลาน้ำจืดหลายชนิดเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 ของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus* รวมทั้งสามารถยืนยันได้ว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ pleurolophocercous cercaria สามารถพัฒนาเป็นพยาธิระยะตัวเต็มวัยชนิด *C. formosanus* ได้อีกด้วย



บทที่ 3

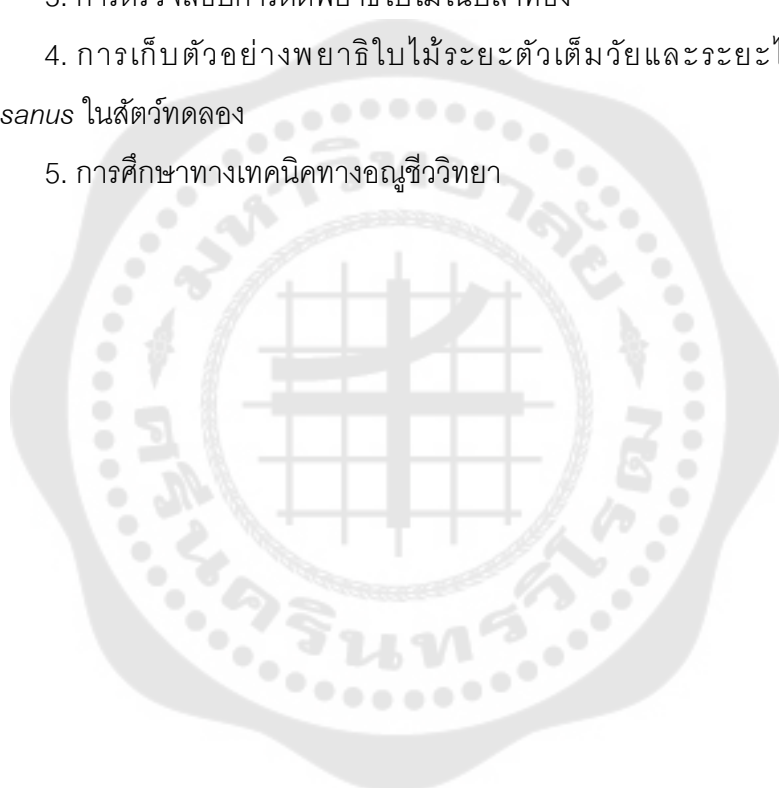
วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย
2. การเก็บตัวอย่างปลาทอง
3. การตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในปลาทอง
4. การเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยและระยะไข่ของพยาธิชนิด

C. formosanus ในสัตว์ทดลอง

5. การศึกษาทางเทคนิคทางอนุชีววิทยา



ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย

การทดลองได้ดำเนินการขออนุญาตการใช้สัตว์ทดลองและได้รับการอนุมัติให้สามารถดำเนินการภายใต้การควบคุม เพื่อการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (SWU-A-024-2563)

2. การเก็บตัวอย่างปลาทอง

เก็บตัวอย่างปลาทอง (*Carassius auratus*) ขณะยังมีชีวิตจากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาทองในจังหวัดราชบุรีจำนวน 10 ฟาร์ม ฟาร์มละ 30 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) จากนั้นขนส่งตัวอย่างทั้งหมดเข้าสู่ห้องปฏิบัติการประมงวิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

3. การตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในปลาทอง

3.1 การตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ในปลาทอง

ตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. โดยนำตัวอย่างปลาทองที่รวบรวมมาทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู (Javahery et al, 2012) จากนั้นตรวจสอบพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ที่บริเวณเหงือกของปลาทองโดยวิธี gill biopsy และ gill necropsy (Gussev, 1983 และ Silas et al., 2001) เริ่มจากขั้นตอนการเปิดแผ่นเปิดเหงือกของปลาทอง ทำการตัดชิ้นส่วนของเหงือก (รวมถึง gill rakers) ด้วยกรรไกรผ่าตัดและนำออกมาวางลงในจานเพาะเชื้อ (petri dish) พร้อมทั้งเทน้ำให้ท่วมเหงือก จากนั้นทำการตรวจสอบการติดพยาธิที่บริเวณเหงือกปลาทองภายใต้กล้องสเตอริโอ พร้อมทั้งนำตัวอย่างพยาธิมาจัดจำแนกในระดับสกุลเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาตาม Yamaguti, 1963; Šimková et al., 2006; ประไพสิริสิริกาญจน, 2538 และวัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล, 2556 จากนั้นนำพยาธิปลิงใสบรรจุลงในหลอดเก็บตัวอย่าง (microcentrifuge tube) แล้วทำการรักษาสภาพตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการศึกษาทางอนุชีววิทยา

3.2 การตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด

C. formosanus ในปลาทอง

เนื่องจากพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* มีตำแหน่งการติดเชื้อในบริเวณที่เหงือกของปลา จึงมีการตรวจสอบการติดพยาธิชนิดนี้โดยการนำตัวอย่างปลาทองที่เก็บได้มาทำการสลับปลาและตรวจหาพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วยวิธีในข้อ 3.1 ภายใต้กล้องสเตอริโอ จากนั้นเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่งใช้สำหรับการทดลองทำให้พยาธิในสัตว์ทดลองเพื่อให้ได้ระยะตัวเต็มวัยสำหรับใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา ส่วนที่สองใช้สำหรับการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาโดยการเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียบรรจุใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างรักษาสภาพด้วยแอลกอฮอล์ 95% และเก็บไว้ในตู้เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้ในการศึกษาทางอนุชีววิทยา

4. การเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยและระยะไข่ของพยาธิชนิด

C. formosanus ในสัตว์ทดลอง

ขั้นตอนนี้ได้ทำการทดลองในหนูแฮมสเตอร์ชนิด *Phodopus sungorus* เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์ โดยการนำพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* ที่คัดแยกได้ในข้อ 3.2 มาป้อนในสัตว์ทดลองด้วยวิธี oral force-feeding method (Wongsawad & Wongsawad, 2007) ในหนูทดลองจำนวน 200 เมตาเซอร์คาเรียในหนู 1 ตัว จากนั้นเลี้ยงสัตว์ทดลองไว้เป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้พยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียพัฒนาไปเป็นระยะตัวเต็มวัย โดยระยะตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในบริเวณลำไส้เล็กของสัตว์ทดลอง เมื่อผ่านไป 4 วันหลังการติดเชื้อจึงตรวจสอบการติดพยาธิในสัตว์ทดลองโดยการผ่าหนุตามวิธีการของ Chai et al. (2017) เพื่อรวบรวมพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะตัวเต็มวัยชนิด *C. formosanus* ภายในลำไส้ของสัตว์ทดลอง โดยการค่อย ๆ เชียตัวพยาธิออกมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น พบจำนวนพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยทั้งหมด 146 ตัว นำตัวอย่างบางส่วนมาทำการเลี้ยงเพื่อให้พยาธิปล่อยไข่ออกมาและบางส่วนถูกฆ่าแช่เพื่อรวบรวมระยะไข่สำหรับทดสอบทางอนุชีววิทยาเพิ่มเติม จากนั้นนำพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่เหลือรักษาสภาพในแอลกอฮอล์ 95% เพื่อใช้สำหรับการทดสอบทางอนุชีววิทยา

5. การศึกษาทางอนุชีววิทยา

5.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา

การทดสอบความจำเพาะของพยาธิปลิงไส้ชนิด *Dactylogyrus* spp. และพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* จำเป็นต้องใช้พยาธิใบไม้ชนิดอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันหรือมีรายงานการติดเชื่อร่วมกันมาทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยเก็บตัวอย่างปรสิตจากปลาน้ำจืดโดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้: *Trichodina* spp., *Gyrodactylus* spp., และ *Argulus* sp. รวบรวมจาก *C. auratus* สำหรับปรสิตชนิด *Paradiplozoon* sp. และ *Haplorchis taichu* รวบรวมจาก *Henicorhynchus siamensis*, *Stellantchasmus falcatus* และ *Posthodiplostomum* sp. รวบรวมจาก *Dermogenys pusilla*, *Opisthorchis viverrini* รวบรวมจาก *Barbonymus gonionotus* ในขณะที่ *Haplorchoides* sp. รวบรวมจาก *Osteochilus vittatus* และ *Clinostomum* sp. รวบรวมจาก *Trichopodus trichopterus* รวมถึงรวบรวมตัวอย่างระยะเซอร์คาเรียของพยาธิชนิด *C. formosanus* จากหอยน้ำจืดชนิด *Melanoides tuberculata* ด้วยวิธี crushing method (Caron et al., 2008) ที่รวบรวมได้จากบริเวณรอบ ๆ บ่อเลี้ยงปลาทองในจังหวัดราชบุรี ตัวอย่างปรสิตทั้งหมดถูกตรวจสอบการติดพยาธิตามวิธีของ Sohn et al. (2009) และ Waikagul et al. (2014) พร้อมทั้งจัดจำแนกพยาธิตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อธิบายโดย Schmidt et al. (1977), Sohn et al. (2009), Rodrigues et al. (2019) และ Chai (2019) จากนั้นเก็บตัวอย่างพยาธิดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

5.2 การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของปรสิตที่นำมาทดสอบ

5.2.1 นำตัวอย่างปรสิตทั้งหมดที่เกี่ยวข้องรวมถึงโฮสต์ของพยาธิชนิดดังกล่าวมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction kit นำดีเอ็นเอที่สกัดแล้วมาวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นด้วยเครื่อง nanodrop และทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากันที่ประมาณ 5.0 ng จากนั้นเก็บรักษาสภาพไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเตรียมพร้อมสำหรับใช้ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

5.2.2 หลังจากทำการสกัดดีเอ็นเอปรสิตทั้งหมดแล้ว ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปรสิตที่เกี่ยวข้องเพื่อยืนยันชนิดก่อนนำตัวอย่างไปทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ จากนั้นทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่อง thermal cycler ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ของ Barber et al. (2000) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 5.8S และ 28S รวมทั้งบริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ได้หลายชนิด โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ ITS3-F (5'- GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC -3') และ ITS4-R (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3')

5.2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ใน TBE 50 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมสีเขียวอมเหลืองด้วย safe green ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 150 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV-transilluminator พร้อมทั้งบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

5.2.4 เมื่อได้ผลิตภัณฑ์หลังจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแล้ว ทำการส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE Company (Malaysia)

5.2.5 เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาทำการเปรียบเทียบ (multiple alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนแต่ละชนิดในฐานข้อมูล (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST สำหรับยืนยันชนิดโปรตีนเหล่านี้ก่อนการนำมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในขั้นตอนต่อไป

5.3 การนำไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *Cytb* ของพยาธิใบไม้หลายชนิดมาทดสอบกับพยาธิชนิด *C. formosanus*

เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในปัจจุบันของพยาธิชนิด *C. formosanus* ในฐานข้อมูล Genbank มีเพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S, 5.8S และ 28S รวมทั้งบริเวณ ITS1 และ ITS2 นอกจากนี้ยังมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียเฉพาะยีน COI เท่านั้น อีกทั้งยีนดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* กับพยาธิใบไม้ที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษายีนใหม่ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอโดยเริ่มจากขั้นตอนดังนี้

5.3.1 เตรียมไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *Cytb* สำหรับพยาธิใบไม้ได้หลายชนิดจากการศึกษาของ Bunprasert (2019) (unpublish) จากนั้นทำการสังเคราะห์ขึ้นที่บริษัท Integrated DNA Technologies โดยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจะมีลำดับ ดังนี้ F: 5' CCT ACT AAA GTT TCT TTG AGG TAT T 3' และ 5' AAA TAC CAC TCA GGC TTT AT 3'

5.3.2 นำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทดสอบกับตัวอย่างพยาธิชนิด *C. formosanus* ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนจากยีน *Cytb* ได้ จากนั้นทดสอบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่อง thermal cycler

5.3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose ใน TBE 50 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมสีเขียวอมเหลืองด้วย safe green ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 150 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV-transilluminator พร้อมทั้งบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

5.3.4 เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ของตัวอย่างพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* จากยีน *Ctyb* หลังการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแล้ว ทำการส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE Company (Malaysia)

5.3.5 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* จากยีน *Ctyb* ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ รวมถึงโฮสต์ของพยาธิชนิดนี้จากฐานข้อมูล โดยในขั้นตอนนี้จะได้อำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. formosanus* จากยีน *Ctyb* เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับใช้ในขั้นตอนถัดไป

5.4 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *C. formosanus*

5.4.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* จากยีน *Ctyb* ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae และปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่พบในปลาทอง รวมไปถึงโฮสต์ของพยาธิชนิดนี้จากฐานข้อมูลมาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ พร้อมทั้งตรวจสอบบริเวณที่มีความแปรผัน (variation) เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิชนิด *C. formosanus*

5.4.2 ตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์จำเพาะทั้ง 2 เส้นของของ forward primer และ reverse primer โดยใช้โปรแกรม Oligo Analyzer Tool version 3.1 (Nazina et al., 2015)

5.4.3 นำไพรเมอร์ที่ออกแบบและมีการตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์แล้ว ทำการสังเคราะห์ขึ้นที่บริษัท Integrated DNA Technologies

5.5 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

5.5.1 ตรวจสอบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ในบริเวณบางส่วนของยีน 18S จากฐานข้อมูล GenBank มาทำการเปรียบเทียบ พร้อมทั้งศึกษาบริเวณที่มีความอนุรักษ์ของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. และตรวจสอบบริเวณที่มีความแปรผันกับปรสิตชนิดอื่น ๆ รวมถึงโฮสต์ของพยาธิชนิดนี้ที่อยู่ในฐานข้อมูล ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้นของ forward primer และ reverse primer โดยใช้โปรแกรม Oligo Analyzer Tool version 3.1 (Nazina et al., 2015)

5.5.2 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบคุณสมบัติแล้วส่งส่งเคราะห์ขึ้นที่บริษัท Integrated DNA Technologies จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาทดสอบกับตัวอย่างพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

5.6 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์จากไพรเมอร์จำเพาะ

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของไพรเมอร์จำเพาะที่เป็นผลบวกของพยาธิทั้ง 2 ชนิด (*Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus*) จากข้อ 5.4 และ 5.5 ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE Company (Malaysia) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบแล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พร้อมทั้งศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum-likelihood ที่ 10,000 รอบ โดยใช้โมเดล Jukes-Cantor (JC) (Jukes and Cantor, 1969) และสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยใช้โปรแกรม MEGA-X (Kumar et al., 2018)

5.7 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา simplex PCR

5.7.1 นำไพรเมอร์จำเพาะทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตที่มีการรายงานในประเทศไทยร่วมกับโฮสต์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *H. taichui*, *S. falcatius*, *Haplorchoides* sp., *O. viverrini*, *Clinostomum* sp., *Fasciola gigantica*, *Paradiplozoon* sp., *Gyrodactylus* spp., *Trichodina* spp., *Argulus* sp. *C. auratus*, *Cy. carpio*, *Systemus rubripinnis*, *Rasbora* sp., *Anabas testudineus*, *Melanoides tuberculata*, *Tarebia granifera*, *Phodopus sungorus* และ *G. galus domesticus* โดยวิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่อง thermal cycler

5.7.2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการทำ agarose gel electrophoresis ด้วย 1.2% agarose พร้อมทั้งเติมสีย้อมเจลด้วย safe green ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 150 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV-transilluminator พร้อมทั้งบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

5.8 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (optimal temperature)

การทดลองนี้ได้ทำการทดสอบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. และพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ด้วยวิธี multiplex PCR โดยมีส่วนประกอบและช่วงอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ น้ำปราศจากไอออน (deionised water), 1X Buffer A, MgCl₂ ความเข้มข้น 1.0 mM, ไพรเมอร์จำเพาะคู่ที่ 1 คือ D-18S ความเข้มข้น 0.08 μM, ไพรเมอร์จำเพาะคู่ที่ 2 คือ CF-Cytb ความเข้มข้น 0.16 μM, ส่วนผสมของ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 0.1 mM, 1.5 U Taq polymerase และ

ใช้ gDNA ของพยาธิแต่ละชนิดจำนวน 5.0 ng เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับขั้นตอนการทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสได้ดำเนินการทดสอบในช่วงอุณหภูมิเริ่มจาก 50.0, 50.7, 51.9, 53.8, 56.2, 58.1, 59.3, จนถึง 60.0 °C ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยใช้ 1.2% agarose gel electrophoresis

5.9 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR (specificity of multiplex PCR assay)

การทดสอบความจำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR ได้ดำเนินการทดสอบความจำเพาะกับปรสิตที่พบในปลาหลายชนิด ได้แก่ *Haplorchis taichui*, *Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchoides* sp., *Paradiplozoon* sp., *Gyrodactylus* spp., *Trichodina* spp. และ *Argulus* sp., และโฮสต์ ได้แก่ *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Barbonymus gonionotus*, *Rasbora* sp., *Betta splendens*, *Systemus rubripinnis* และ *Anabas testudineus* ตามลำดับ โดยใช้ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเช่นเดียวกันกับข้อ 5.8 โดยกำหนดอุณหภูมิที่ 55.0°C

5.10 การทดสอบค่าความไวของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (sensitivity of multiplex PCR assay)

การทดสอบค่าความไวของไพรเมอร์ดำเนินการโดยใช้วิธีการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นลงไปสองเท่า (two-fold serial dilution) และความเข้มข้นของดีเอ็นเอถูกกำหนดเริ่มต้นที่ประมาณ 5.0 ng/ μ L สำหรับเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

5.11 การทดสอบขีดจำกัดในปฏิกิริยา multiplex PCR (Detection limit of multiplex PCR assay)

การทดสอบนี้ดำเนินการโดยนำปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจ (*Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus*) ผสมกับตัวอย่างของโฮสต์ในนี้คือปลาทองในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:1 – 1:13 ng/ μ L ตามลำดับ

5.12 การทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ในตัวอย่างภาคสนาม

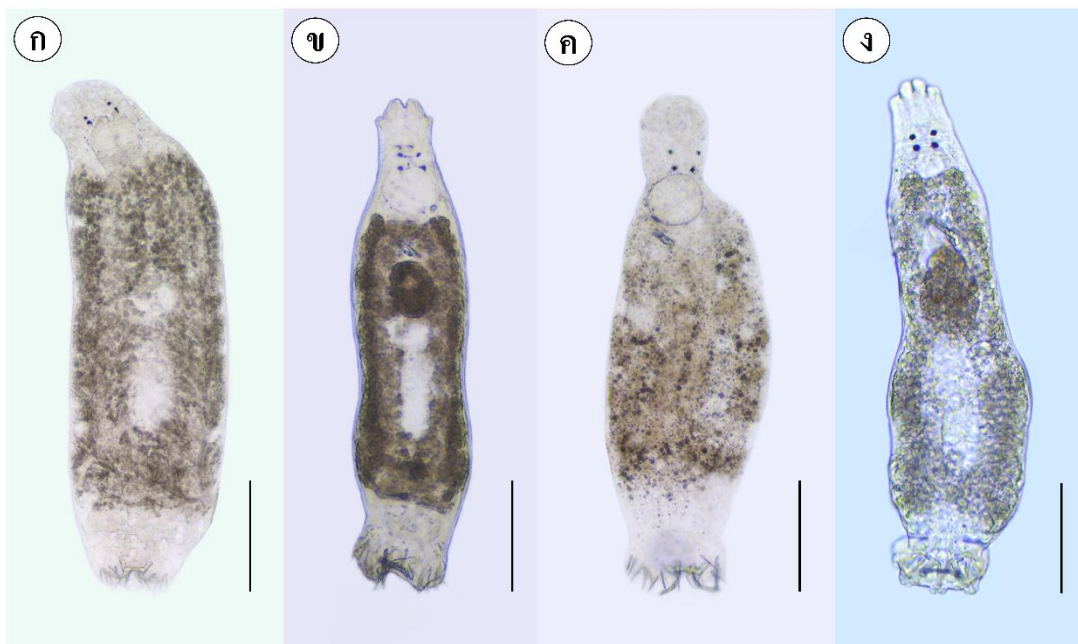
เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาทองจำนวน 50 ตัวจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดราชบุรี จำนวน 3 ฟาร์ม ด้วยวิธีการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) จากนั้นทำการตัดซีเหงือกของปลาทองแต่ละตัวออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้สำหรับการทดสอบในปฏิกิริยา multiplex PCR

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

Dactylogyrus spp. อยู่ใน Family Dactylogyridae เป็นปรสิตที่มักพบในบริเวณที่เหงือกของปลาทองจำนวนมาก โดยภาพรวมลักษณะของลำตัวมีรูปร่างคล้ายทรงกระสวย มีลักษณะเรียบ-แบน ส่วนหน้า (head organ) ประกอบด้วย อวัยวะยึดเกาะส่วนหน้า (anterior attachment organ) พบจุดตา (eye spot) จำนวน 2 คู่ เรียงขนานกัน ได้บริเวณจุดตาพบคอกหอย (pharynx) ติดกับทางเดินอาหาร โดยที่ลำไส้จะแยกออกเป็น 2 ข้าง (bifurcate) เรียงตัวตามแนวยาว มีต่อมวิทเทลลาเรีย (vitellaria) ทับซ้อนตามแนวยาวของลำไส้ บริเวณกึ่งกลางลำตัวพบโคพูลาทอหรือออร์แกน (copulatory organ) ซึ่งเป็นอวัยวะยึดเกาะสำหรับการผสมพันธุ์ พบรังไข่ (ovary) มีขนาดใหญ่อยู่บริเวณใกล้กึ่งกลางของลำตัวลักษณะเป็นทรงไข่ ได้รังไข่พบอณฑะ (testis) จำนวน 1 คู่ บริเวณส่วนท้ายของลำตัวพบอวัยวะที่ใช้สำหรับการยึดเกาะกับโฮสต์คือ โอฟีสแฮพเตอร์ (opishaptor) ภายในประกอบด้วยสมอ (anchor) ขนาดใหญ่จำนวน 2 คู่ โดยแต่ละคู่ถูกยึดกับแท่งกระดูกขนาดใหญ่เรียกว่า dorsal bar พบหนามขนาดเล็ก (marginal hook) จำนวน 7 คู่ บริเวณรอบ ๆ ของโอฟีสแฮพเตอร์ จากการศึกษาในครั้งนี้พบพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* ทั้งหมด 4 ชนิดที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ *Dactylogyrus* sp. 1 ลำตัวมีรูปร่างคล้ายทรงกระบอก บริเวณส่วนหน้ามีลักษณะกลม-มน มีคอกหอยขนาดใหญ่ พบอณฑะขนาดใหญ่ อยู่ในบริเวณ 1 ใน 3 ของความยาวลำตัว ลักษณะของโคพูลาทอหรือออร์แกนขนาดเล็กมากคล้ายตัว Y จำนวน 1 คู่ บริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีสมอขนาดใหญ่จำนวน 1 อัน พบหนามขนาดเล็กจำนวน 7 คู่ บริเวณรอบ ๆ ของโอฟีสแฮพเตอร์ สำหรับ *Dactylogyrus* sp. 2 ลำตัวมีลักษณะเรียวยาว บริเวณส่วนหน้าพบ anterior attachment ที่ยื่นออกมาเล็กน้อย ลักษณะคล้ายนิ้วขนาดใหญ่ และขนาดเล็กอย่างละ 1 คู่ พบคอกหอยขนาดใหญ่ ส่วนท้ายของลำตัวมีสมอขนาดใหญ่จำนวน 1 อัน พบหนามขนาดเล็กจำนวน 7 คู่ ในขณะที่ *Dactylogyrus* sp. 3 ลำตัวมีลักษณะเป็น plump shape บริเวณส่วนหน้ากลม-มน คล้ายกับ *Dactylogyrus* sp. 1 และพบคอกหอยมีลักษณะกลมคล้ายกับ *Dactylogyrus* sp. 2 พบโคพูลาทอหรือออร์แกนจำนวน 1 คู่ ที่ซ้อนทับกัน ในส่วนท้ายของลำตัวพบ dorsal bar ขนาดใหญ่จำนวน 1 อัน พบหนามขนาดเล็กจำนวน 7 คู่ และ *Dactylogyrus* sp. 4 ลำตัวมีลักษณะเรียวยาวส่วนหน้าพบ anterior attachment มีลักษณะคล้ายนิ้วยื่นออกมาจำนวน 4 อัน ลักษณะคล้ายกับ *Dactylogyrus* sp. 2 แต่มีขนาดของคอกหอยที่เล็กกว่าและในบริเวณส่วนท้ายของลำตัวพบ dorsal bar จำนวน 1 อัน (ภาพประกอบ 20)



ภาพประกอบ 20 พยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ที่พบในปลาทอง

(ก) *Dactylogyrus* sp. 1 (scale bar 200 μ m)

(ข) *Dactylogyrus* sp. 2 (scale bar 200 μ m)

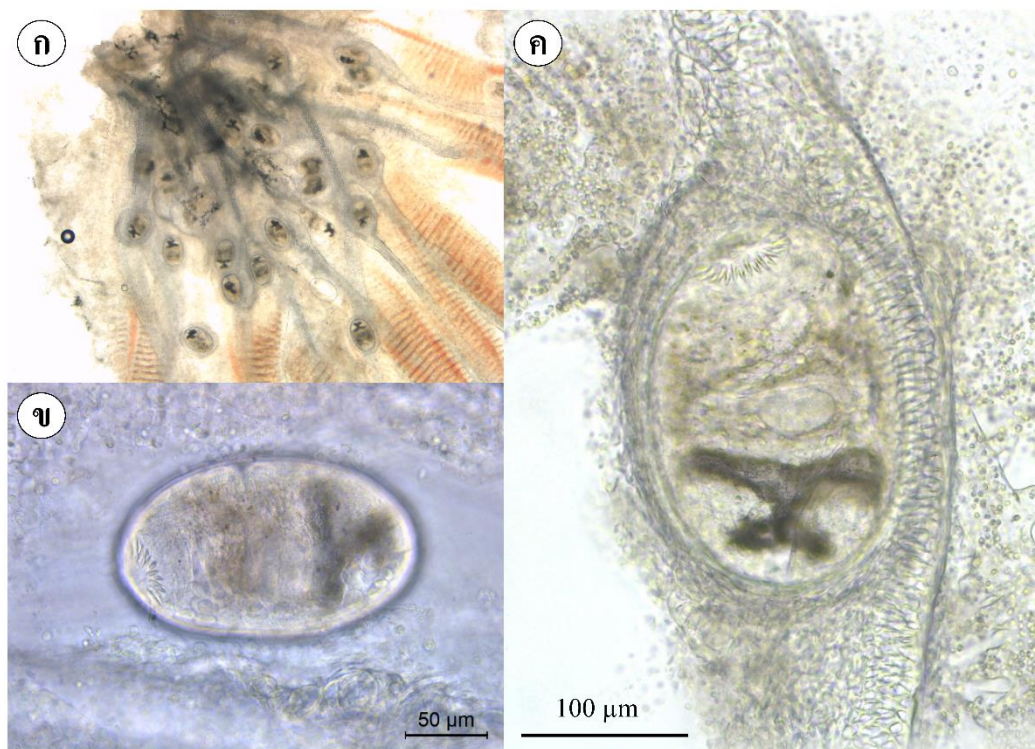
(ค) *Dactylogyrus* sp. 3 (scale bar 200 μ m)

(ง) *Dactylogyrus* sp. 4 (scale bar 200 μ m)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด

C. formosanus

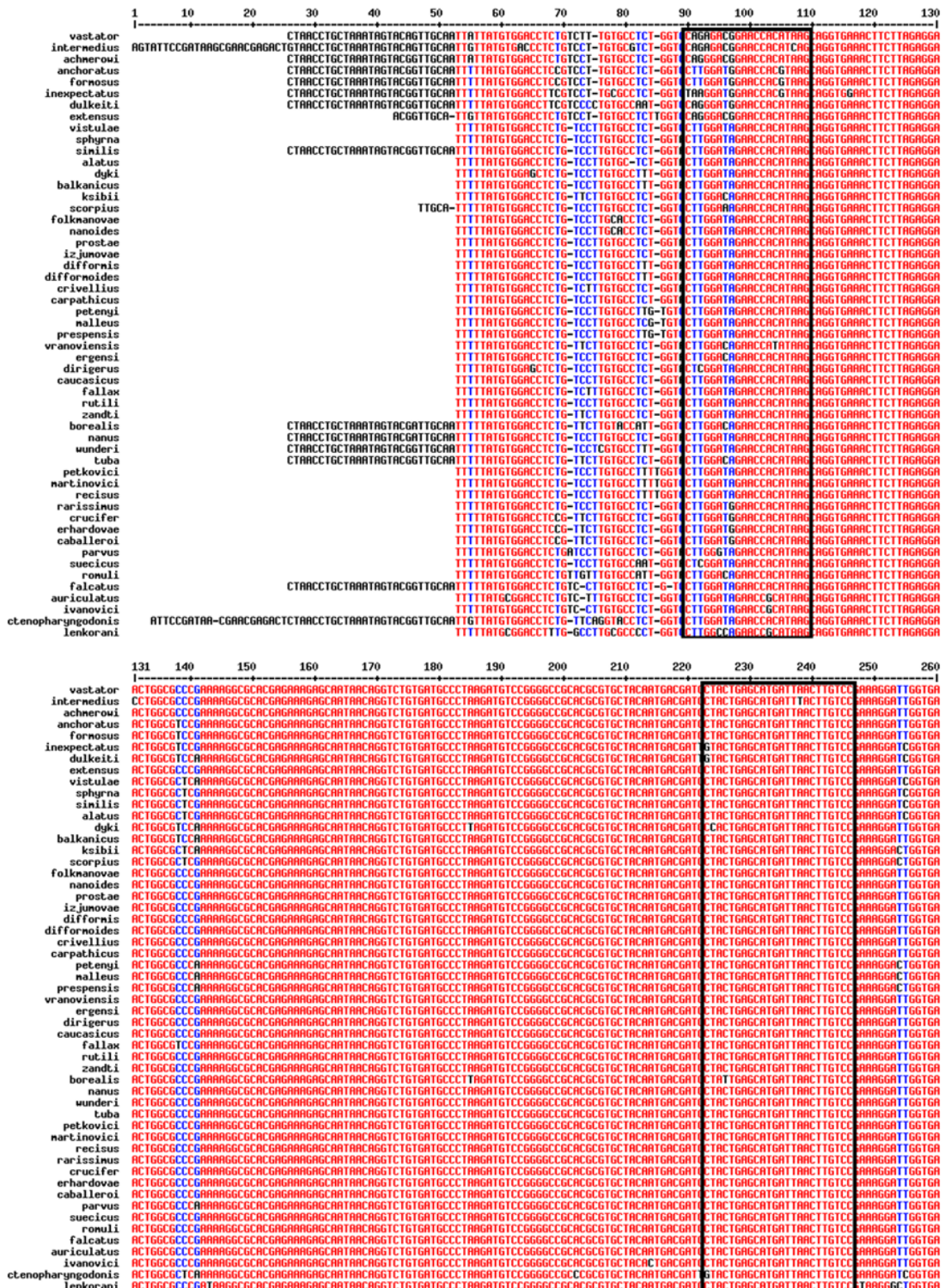
Centrocestus formosanus ระยะเมตาเซอร์คาเรียเป็นพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae พบในบริเวณที่เหงือกของปลาทองจำนวนมาก มีลักษณะเป็นทรงไข่ (oval shape) เส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาด 234.04-188.17(201.56) ไมโครเมตร (n=10) มีถุงหุ้ม (cyst wall) จำนวน 2 ชั้น ลักษณะบางใส ในระยะนี้มีลักษณะเด่นคือ พบหนาม (circumoral spines) จำนวน 34 หนาม เรียงตัวอยู่บนบริเวณปากดูดส่วนหน้า (oral sucker) เป็น 2 แถว แบบสลับกัน (alternate) ในบริเวณปากดูดด้านท้อง (ventral sucker) มีการพัฒนาอย่างดีและในบริเวณส่วนท้ายของลำตัวพบถุงขับถ่ายของเสียเป็นสีดำ (excretory bladder) มีลักษณะเป็นรูปตัวเอกซ์ (x-shape) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียในสกุลนี้ (ภาพประกอบ 21)



ภาพประกอบ 21 พยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *Centrocestus formosanus*
 (ก) ภาพระยะเมตาเซอร์คาเรียฝังตัวอยู่บริเวณซี่เหงือกของปลาทองสังเกตภายใต้กล้องสเตอริโอ
 (ข) ภาพระยะเมตาเซอร์คาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (scale bar 50 μm)
 (ค) ภาพระยะเมตาเซอร์คาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (scale bar 100 μm)

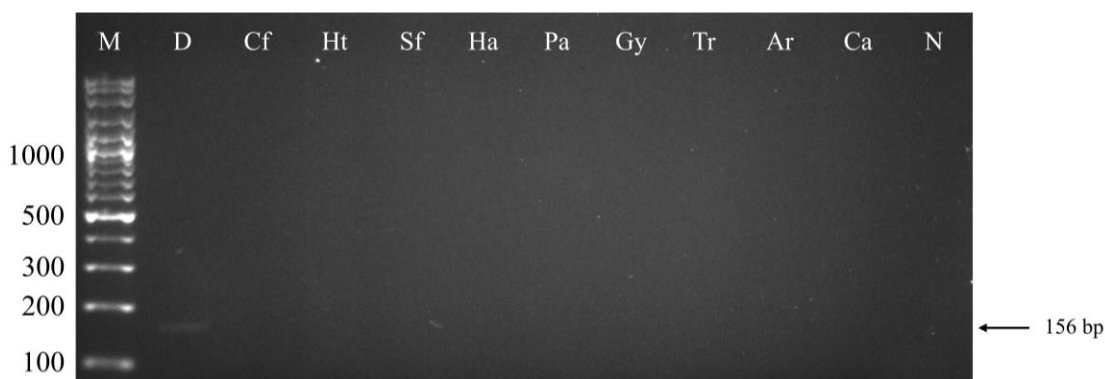
การทดสอบความจำเพาะของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ในปฏิกิริยา simplex PCR

การศึกษานี้ได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. จากยีน 18S (ภาพประกอบ 22) ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบในการทดลองนี้ คือ D-18S primer set (Forward: 5'-CAG AGA CGG AAC CAC ATA AG-3'/Reverse 5'-GGA CAA GTT AAT CAT GCT CAG TAG-3') ผลการทดสอบความจำเพาะพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-amplification) กับปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่พบในปลาน้ำจืดรวมถึงโฮสต์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Centrocestus formosanus*, *Haplorchis taichui*, *Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchoides* sp., *Paradiplozoon* sp., *Gyrodactylus* spp., *Trichodina* spp., *Argulus* sp. และ *Carassius auratus* เป็นต้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 156 คู่เบส (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 22 บริเวณยีน 18S ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิปลิงใสชนิด

Dactylogyrus spp.

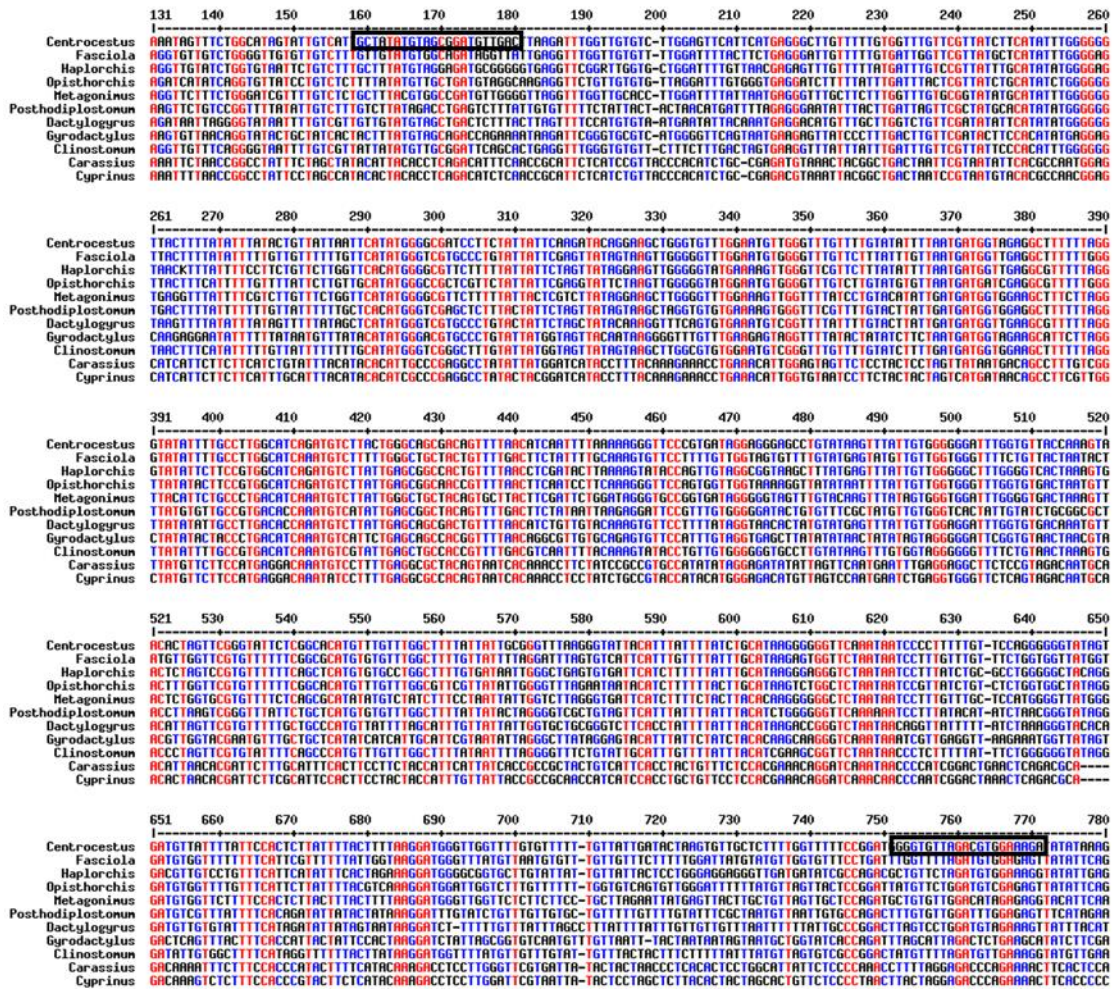


ภาพประกอบ 23 การทดสอบความจำเพาะของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyruis* spp. ในปฏิกิริยา simplex PCR

(Lane M: 100 bp DNA marker, Lane D: *Dactylogyruis* spp. positive control, Lane Cf: *C. formosanus*, Lane Ht: *H. taichui*, Lane Sf: *S. falcatus*, Lane Ha: *Haplorchoides* sp., Lane Pa: *Paradiplozoon* sp. Lane Gy: *Gyrodactylus* spp., Lane Tr: *Trichodina* spp., Lane Ar: *Argulus* sp. และ Lane N: negative control)

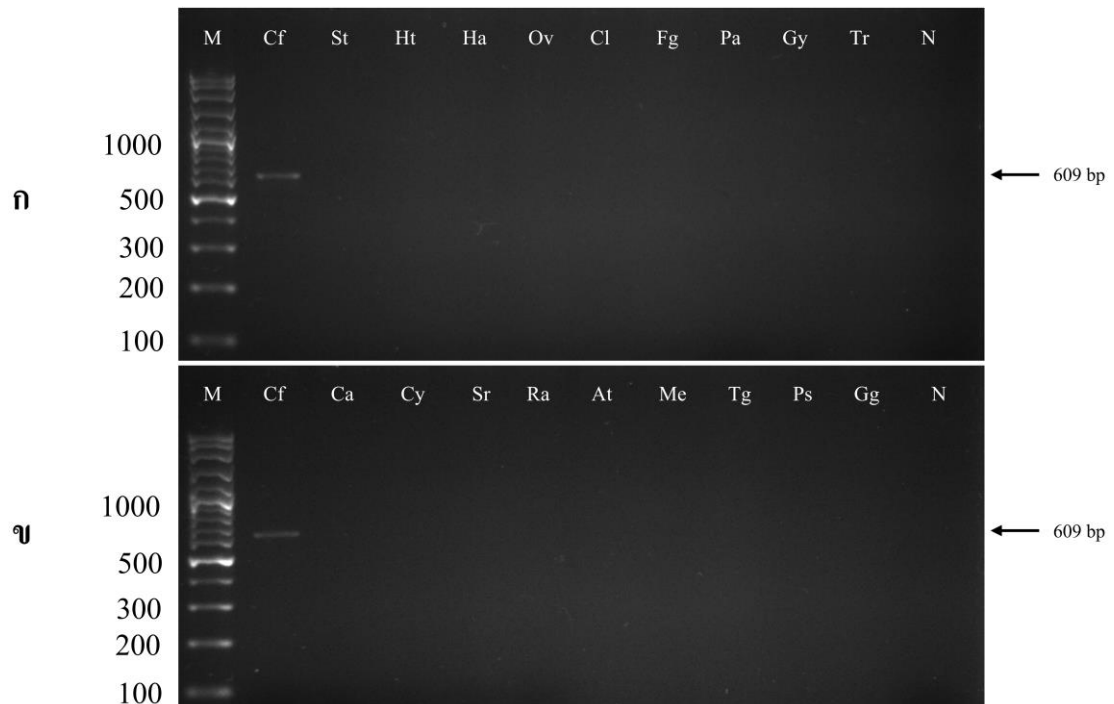
การทดสอบความจำเพาะของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ในปฏิกิริยา simplex PCR

การศึกษานี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* จากบริเวณยีน *Cytb* (ภาพประกอบ 24) ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบในการทดลองนี้ คือ CF-Cytb primer set (Forward: 5'-GCT ATA TGT AGC GGA TGT TGA C-3'/Reverse 5'-TCT TTC CAC GTC TAA CAC CC-3') ผลการทดสอบความจำเพาะพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchis taichui*, *Haplorchoides* sp., *Opisthorchis viverrini*, *Clinostomum* sp., *F. gigantea*, *Paradiplozoon* sp., *Gyrodactylus* spp., และ *Trichodina* spp. เป็นต้น รวมทั้งโฮสต์หลายชนิด ได้แก่ *Carasius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Systomus rubripinnis*, *Rasbora* sp., *Anabas testudineus*, *Melanoides tuberculata*, *Tarebia granifera*, *Phodopus sungorus* และ *Gallus gallus domesticus* เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 609 คู่เบส (ภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 24 บริเวณยีน *Cytb* ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพยาธิใบไม้ชนิด

C. formosanus



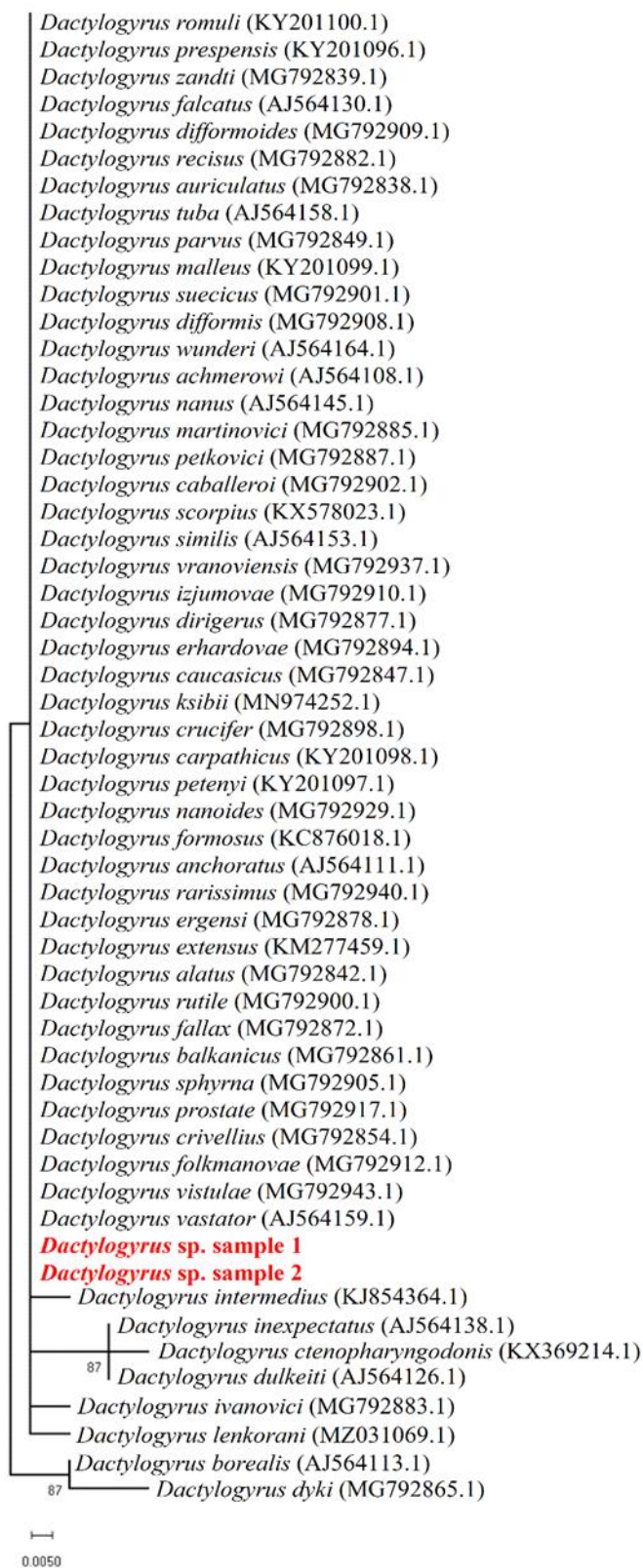
ภาพประกอบ 25 การทดสอบความจำเพาะของพยาธิชนิด *C. formosanus*
ในปฏิกิริยา simplex PCR

(Lane M: 100 bp DNA marker, Lane Cf: *C. formosanus* positive control, Lane Sf: *S. falcatus*, Lane Ht: *H. taichui*, Lane Ha: *Haplorchoides* sp., Lane Ov: *O. viverrini*, Lane Cl: *Clinostomum* sp., Lane Fg: *Fasciola* sp., Lane Pa: *Paradiplozoon* sp. Lane Gy: *Gyrodactylus* spp., Lane Tr: *Trichodina* spp. และ Lane N: negative control: Lane Ca: *C. auratus*, Lane Cy: *Cy. Carpio*, Lane Sr: *S. rubripinnis*, Lane Ra: *Rasbora* sp., Lane At: *A. testudineus*, Lane Me: *M. tuberculata*, Lane Tg: *T. granifera*, Lane Ps: *P. sungorus*, และ Lane Gg: *G. galus domesticus*)

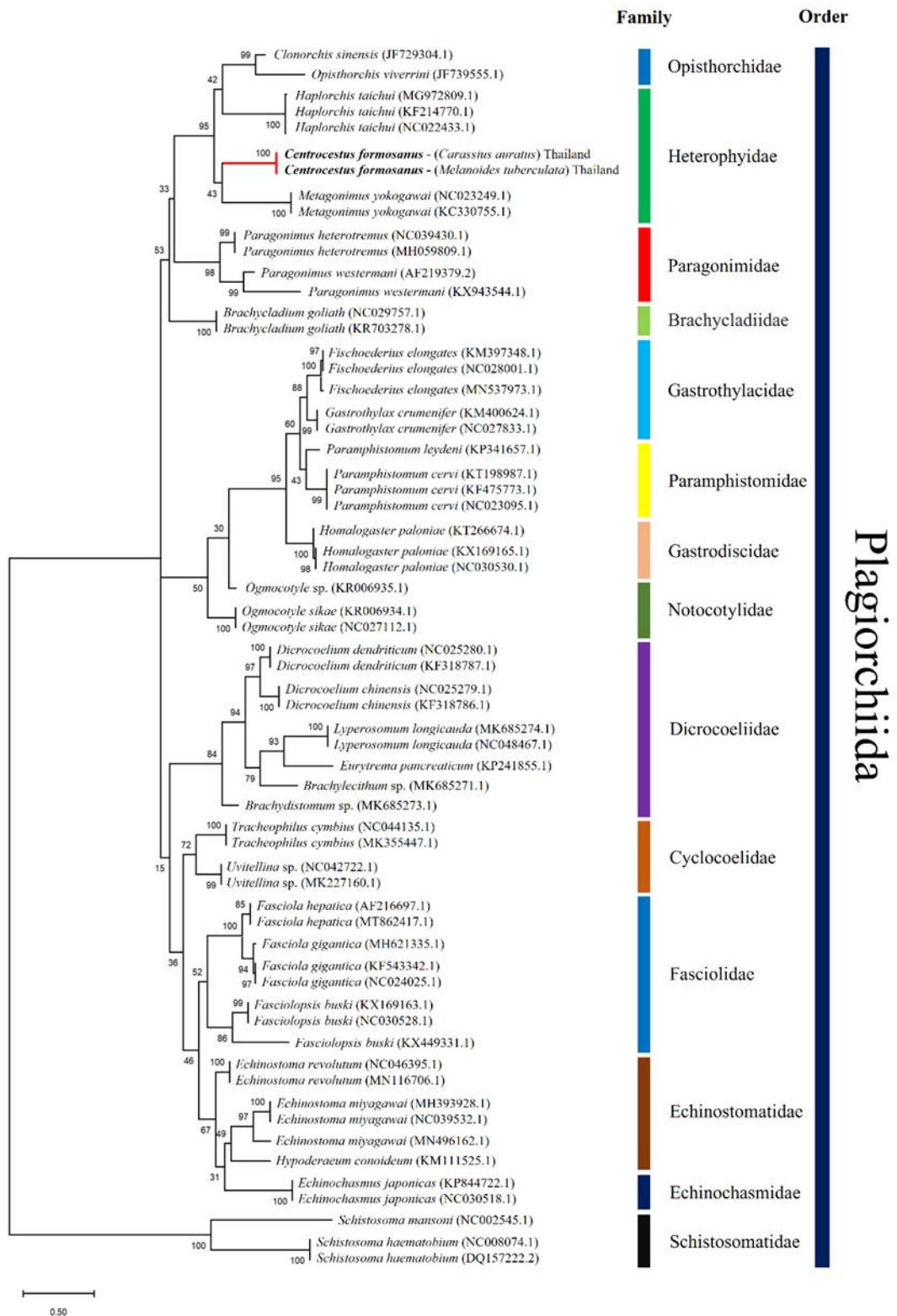
การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์จากไพรเมอร์จำเพาะ

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลบวกของพยาธิทั้ง 2 ชนิด (*Dactylogyrus* spp. จำนวน 156 คู่เบส และ *C. formosanus* จำนวน 609 คู่เบส) ด้วยการทดสอบปฏิกิริยา simplex PCR นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLASTn) กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* sp. ที่รวบรวมจากซีเหี้ยอกปลาทองในทั้ง 2 ตัวอย่างมีความเหมือนกับพยาธิปลิงใสชนิด *D. vastator* (MZ358871.1 และ AJ564159.1) เท่ากับ 100%, *Dactylogyrus* sp. (MT112255.1) เท่ากับ 100% และ *D. vistulae* (MK434943.1 และ MK434942.1) เท่ากับ 99.98% ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียและระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับพยาธิใบไม้ชนิด *Fascioloides magna* (KU060148.1) เท่ากับ 79.19%, *Fasciola gigantica* (KY246469.1) เท่ากับ 78.11% และ *Echinostoma miyagawai* (MN116740.1) เท่ากับ 77.23% ตามลำดับ (ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *Cytb* ของพยาธิชนิด *C. formosanus* ไม่มีอยู่ในฐานข้อมูล) นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบชนิดโปรตีนในโปรแกรม BLASTx พบว่าโปรตีนของพยาธิชนิด *C. formosanus* มีความเหมือนกับโปรตีนที่ถูกสร้างจากยีน *Cytb* ของพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Metagonimus yokogawai* (YP_008994155.1) ที่ 82.35% และพยาธิใบไม้ชนิด *H. taichui* (ATY46016.1) ที่ 80.75% ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการยังแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* sp. จากยีน 18S มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพยาธิปลิงใสชนิด *D. vastator* (AJ564159.1) ทั้ง 2 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ 26) ในขณะที่พยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กชนิด *C. formosanus* ในระยะเซอร์คาเรียและระยะเมตาเซอร์คาเรียมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กวงศ์ Heterophyidae ชนิด *Metagonimus yokogawai* (NC023249.1 และ KC330755.1) ดังนั้นโดยรวมแล้วจากผลการทดสอบที่เป็นผลบวกนั้นเป็นผลบวกแท้จริง (true positive) สำหรับพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* และพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเซอร์คาเรียและระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* ตามลำดับ (ภาพประกอบ 27)

Dactylogyridae



ภาพประกอบ 26 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิปลิงไสชนิด *Dactylogyrus* spp.

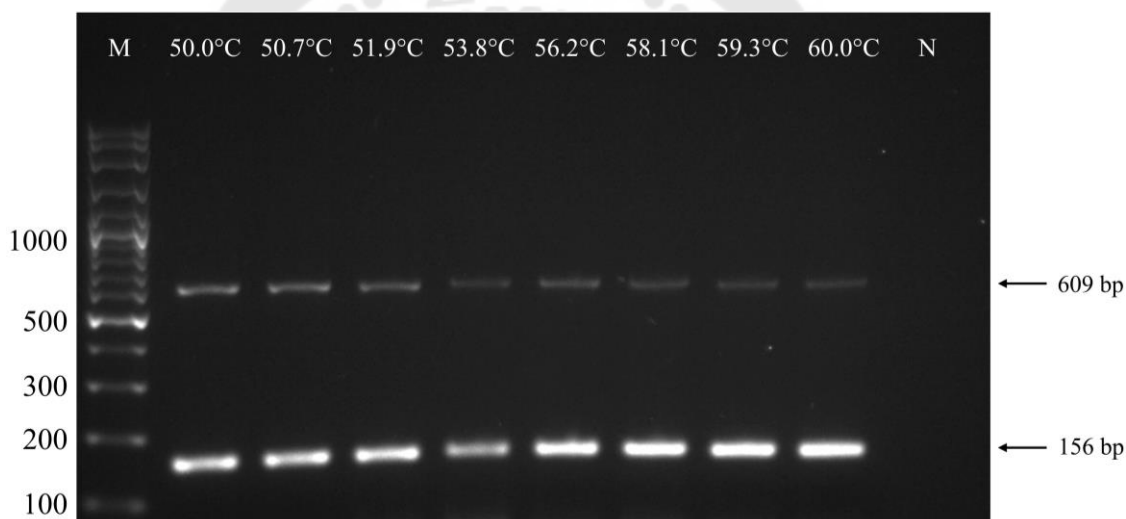


ภาพประกอบ 27 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด

Centrocestus formosanus

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา multiplex PCR (optimal temperature)

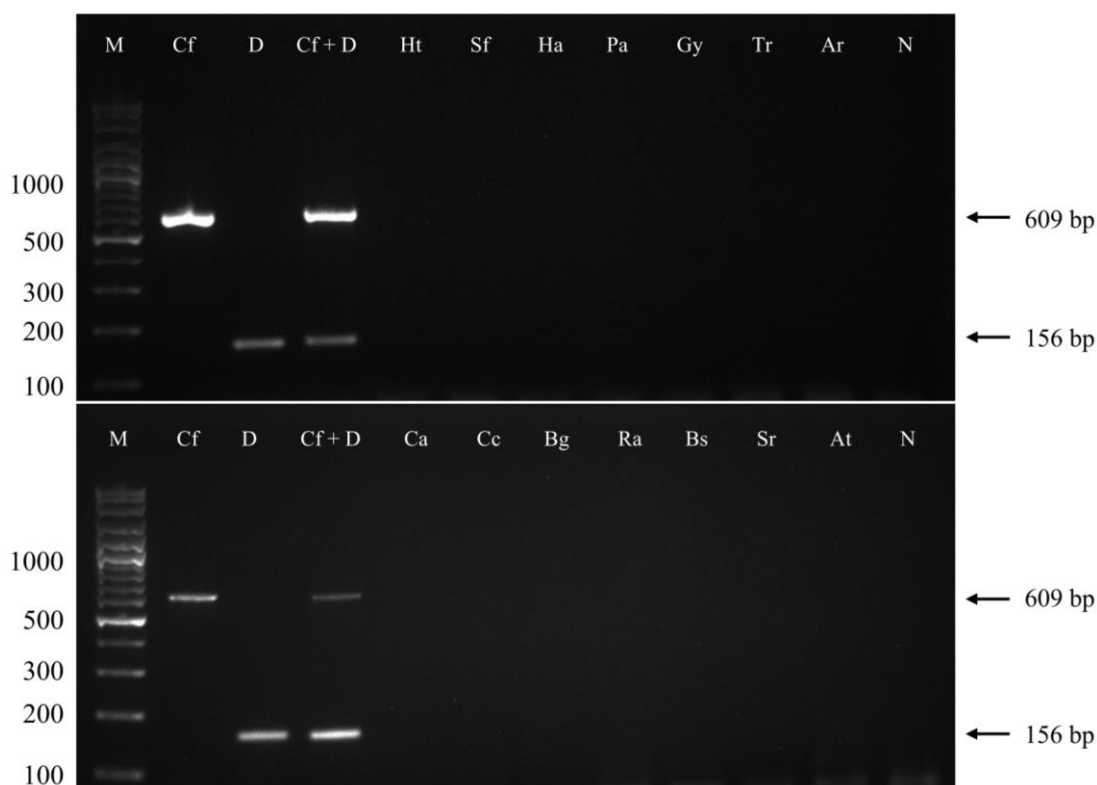
การทดลองนี้ได้ทดสอบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์จำเพาะสามารถเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิได้ทั้ง 2 สกุล โดยที่พยาธิปลิงไสชนิด *Dactylogyrus* spp. เกิดผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะที่ 156 คู่เบส และพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* เกิดขนาดผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะที่ 609 คู่เบส โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 50.0, 50.7, 51.9, 53.8, 56.2, 58.1, 59.3, และ 60.0 °C ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ช่วงอุณหภูมิที่ 55-56.2 °C เกิดขนาดผลิตภัณฑ์ได้ชัดเจนที่สุด โดยผู้วิจัยได้ทำการเลือกที่อุณหภูมิ 55.0 °C สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป (ภาพประกอบที่ 28)



ภาพประกอบ 28 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา multiplex PCR

การทดสอบความจำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (specificity of multiplex PCR assay)

จากการทดสอบความจำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ พบว่ามีความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* โดยได้ผลิตภัณฑ์ที่ประมาณ 156 และ 609 คู่เบส ตามลำดับ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตที่พบในปลาน้ำจืด รวมถึงโฮสต์ที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบที่ 29)

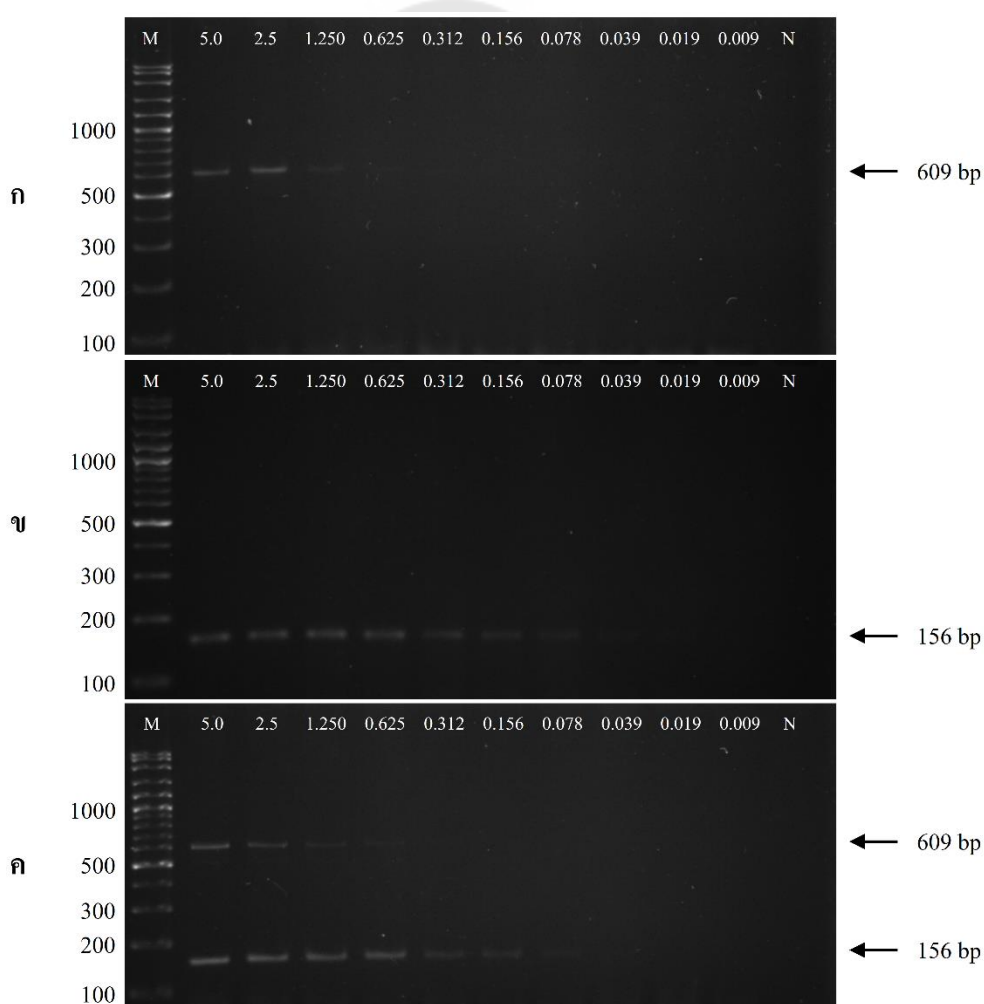


ภาพประกอบ 29 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR

(Lane M: 100 bp DNA marker, Lane Cf: *C. formosanus* positive control, Lane D: *Dactylogyrus* spp. positive control, Lane Cf+D: mixed gDNA template of *Dactylogyrus* spp. and *C. formosanus*, Lane Ht: *H. taichui*, Lane Sf: *S. falcatus*, Lane Ha: *Haplorchoides* sp., Lane Pa: *Paradiplozoon* sp., Lane Gy: *Gyrodactylus* spp., Lane Tr: *Trichodina* spp., Lane Ar: *Argulus* sp., Lane N: negative control และ Lane Ca: *C. auratus*, Lane Cc: *Cy. Carpio*, Lane Bg: *B. gonionotus*, Lane Ra: *Rasbora* sp., Lane Bs: *Be. splendens*, Lane Sr: *S. rubripinnis* และ Lane At: *A. testudineus*)

การทดสอบค่าความไวของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR (sensitivity of multiplex PCR assay)

การทดสอบความไวของไพรเมอร์ดำเนินการโดยใช้วิธีการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นลงไปสองเท่า (two-fold serial dilution) ซึ่งความเข้มข้นของดีเอ็นเอถูกกำหนดให้เริ่มต้นที่ 5.0 ng ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้สำหรับพยาธิปลิงไส้ชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* คือ 0.078 และ 0.625 ng ตามลำดับ และเกิดผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะที่ประมาณ 156 และ 609 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพประกอบ 30)



ภาพประกอบ 30 การทดสอบความไวของไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR

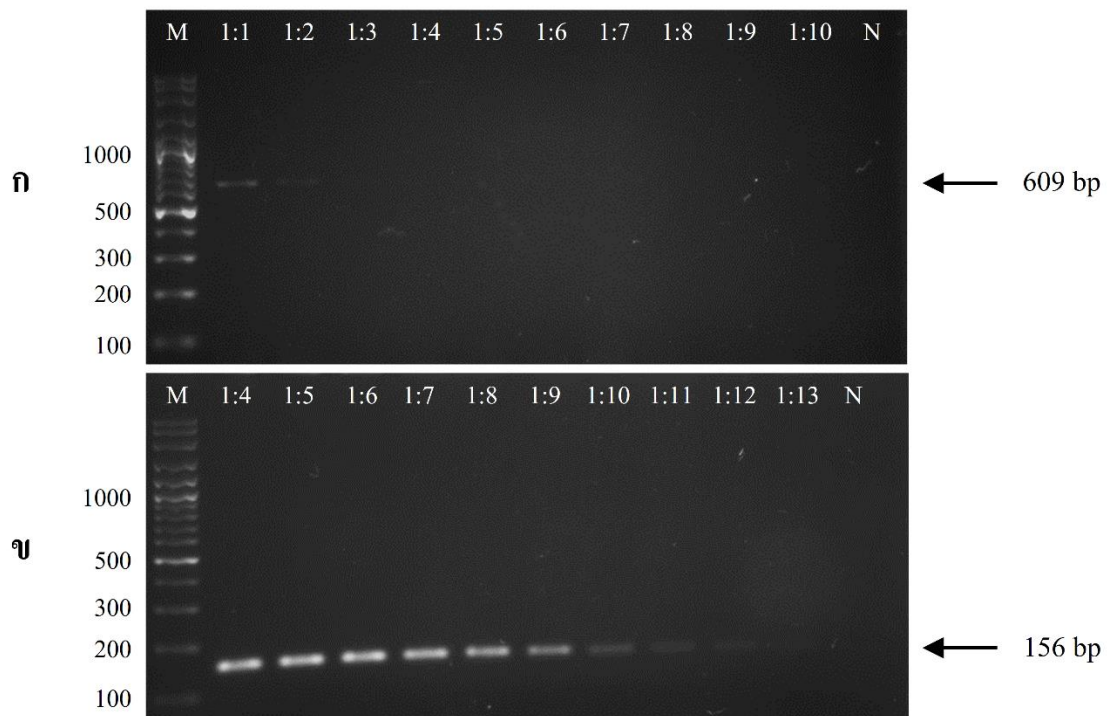
(ก) การทดสอบความไวของพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus*

(ข) การทดสอบความไวของพยาธิปลิงไส้ชนิด *Dactylogyrus* spp.

(ค) การทดสอบความไวของพยาธิทั้ง 2 ชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน

การทดสอบขีดจำกัดของปฏิกิริยา multiplex PCR (Detection limit of multiplex PCR assay)

การทดสอบขีดจำกัดดำเนินการโดยนำดีเอ็นเอของ *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ผสมกับตัวอย่างของโฮสต์ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ผลการทดลองพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาสำหรับพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ที่อัตราส่วน 1:12 และ 1:2 ตามลำดับ และได้ผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะที่ประมาณ 156 และ 609 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพประกอบ 31)



ภาพประกอบ 31 การทดสอบขีดจำกัดในปฏิกิริยา multiplex PCR

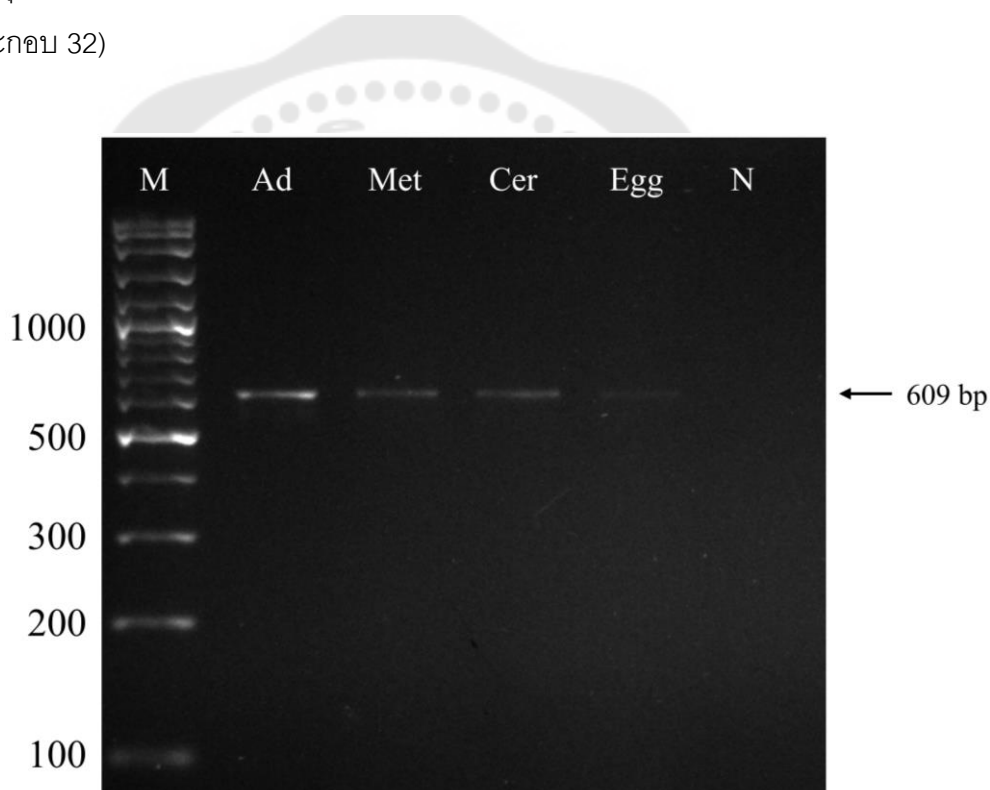
(ก) การทดสอบขีดจำกัดของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus*

(ข) การทดสอบขีดจำกัดของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp.

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ในระยะต่าง ๆ

(Detection of the various stages of *C. formosanus*)

การทดสอบนี้ได้ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะเพื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างในระยะอื่น ๆ ของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* จากผลการทดลองพบว่าการทดสอบในปฏิกิริยา multiplex PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ได้ทุกระยะของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ระยะตัวเต็มวัย ระยะเมตาเซอร์คาเรีย ระยะเซอร์คาเรีย และระยะไข่ เกิดผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะที่ประมาณ 609 คู่เบส ขนาดของผลิตภัณฑ์แสดงผลชัดเจนที่สุดในระยะตัวเต็มวัย ระยะเมตาเซอร์คาเรีย ระยะเซอร์คาเรีย และระยะไข่ ตามลำดับ (ภาพประกอบ 32)



ภาพประกอบ 32 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ในระยะอื่น ๆ

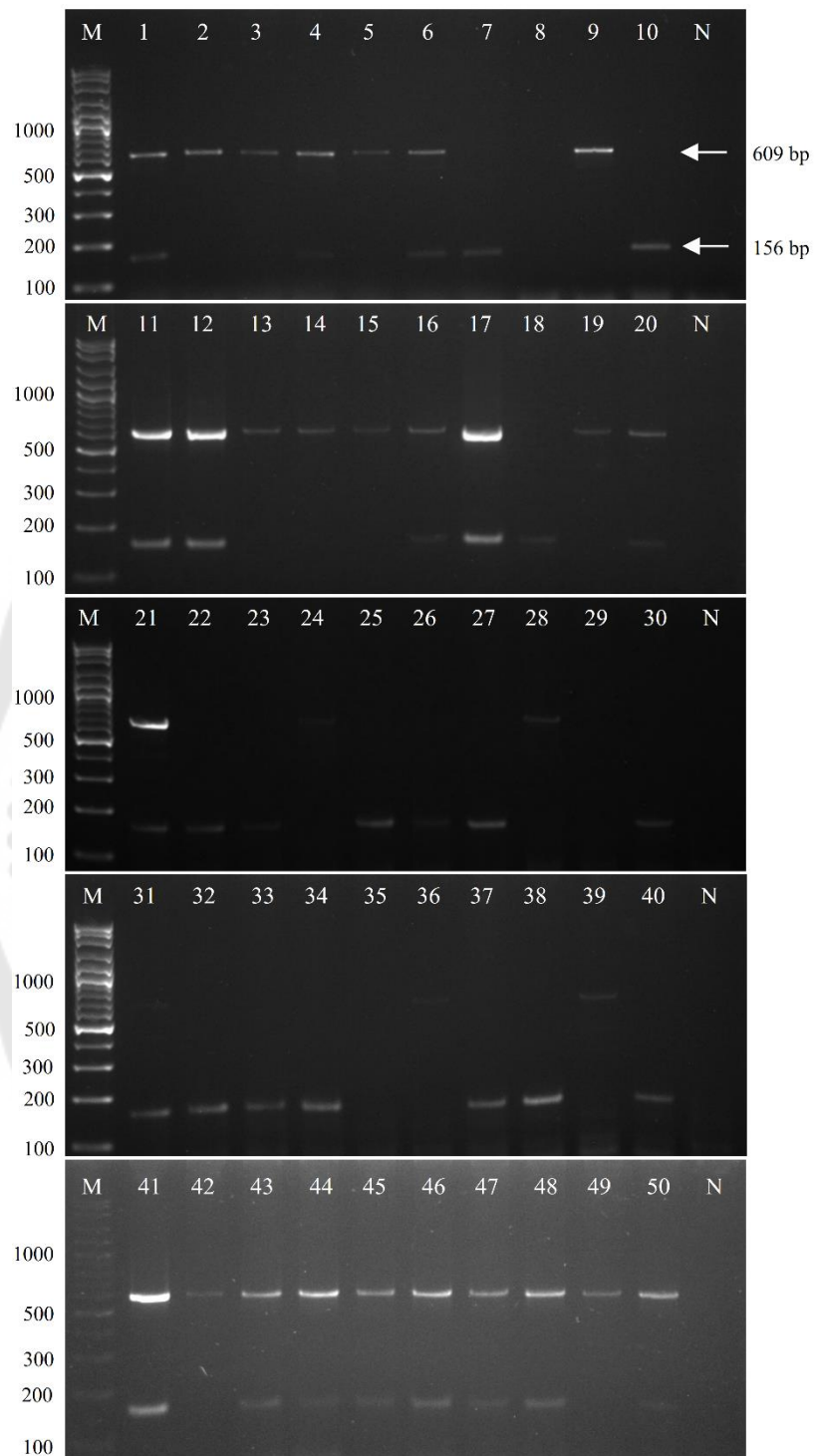
(Lane M: 100 bp DNA marker, Lane Ad: adult stages, Lane Met: metacercarial stages, Lane Cer: cercarial stages, Lane Egg: egg stages และ Lane N: negative control)

การทดสอบปฏิกิริยาในตัวอย่างภาคสนาม (Assessment and accuracy confirmation on field goldfish samples)

จากการตรวจสอบการติดพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ในตัวอย่างภาคสนามจำนวน 50 ตัวอย่าง ที่เก็บจากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาทองในจังหวัดราชบุรี ด้วยการทดสอบทั้ง 3 วิธี (morphology, simplex และ multiplex PCR) ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 4 ผลทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างภาคสนาม พบว่าเกิดผลติดพยาธิอย่างจำเพาะที่ประมาณ 156 และ 609 คู่เบส สำหรับพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ตามลำดับ (ภาพประกอบ 33)

ตาราง 4 ผลการตรวจสอบการติดพยาธิในปลาทองทั้ง 3 วิธีจากตัวอย่างภาคสนาม

Methods	Parasite species	No. of positive	
		Positive	Negative
Light microscope	Positive	<i>Dactylogyrus</i> spp. single infection	13
		<i>C. formosanus</i> single infection	14
		Co-infections	18
	Negative		-
	Total		45
Simplex PCR	Positive	<i>Dactylogyrus</i> spp. single infection	15
		<i>C. formosanus</i> single infection	14
		Co-infections	18
	Negative		-
	Total		47
Multiplex PCR	Positive	<i>Dactylogyrus</i> spp. single infection	15
		<i>C. formosanus</i> single infection	14
		Co-infections	18
	Negative		-
	Total		47



ภาพประกอบ 33 การตรวจสอบการติดพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus*

ในปฏิกิริยา multiplex PCR จากตัวอย่างภาคสนาม

(Lane M: 100 bp DNA marker, Lane 1-50 goldfish specimens

และ Lane N: negative control)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบการติดพยาธิปลิงใสและพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเมตาเซอรรีคาเรียในปลาทองที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดราชบุรี พบว่าพยาธิปลิงใสและพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กระยะเมตาเซอรรีคาเรียอาศัยอยู่ในบริเวณที่เหงือกของปลาทอง โดยพยาธิปลิงใสถูกตรวจพบในสกุล *Dactylogyrus* ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้เป็น 4 ชนิด ที่มีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในขณะที่พยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรรีคาเรียที่พบในปลาทองถูกตรวจพบว่าเป็นชนิด *C. formosanus* สำหรับการตรวจจับปรสิตทั้ง 2 สกุล ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะอาศัยยีน 18S สำหรับการตรวจจับพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* และอาศัยยีน *Cytb* สำหรับ พัฒนาเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลเพื่อตรวจจับพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ในปลาทอง ผลการทดลองพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างปรสิตหรือโฮสต์ที่นำมาทดสอบในปฏิกิริยา เกิดผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะที่ประมาณ 156 คู่เบส สำหรับพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. และได้ผลิตภัณฑ์ประมาณ 609 คู่เบส สำหรับพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรรีคาเรียชนิด *C. formosanus* ตามลำดับ จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของไพรเมอร์จำเพาะโดยการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าพยาธิปลิงใสในการศึกษานี้มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพยาธิปลิงใสชนิด *D. vastator* (MZ358871.1 และ AJ564159.1) ในขณะที่การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. formosanus* ในระยะเซอรรีคาเรียและระยะเมตาเซอรรีคาเรียมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็กวงศ์ Heterophyidae ชนิด *Metagonimus yokogawai* (NC023249.1 และ KC330755.1) สำหรับการทดสอบอุนทิมูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา multiplex PCR พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทุกช่วงอุนทิมูมิสำหรับพยาธิทั้ง 2 ชนิด การทดสอบความจำเพาะในปฏิกิริยา multiplex PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างปรสิตหรือโฮสต์ที่นำมาทดสอบ การทดสอบความไวของปฏิกิริยา multiplex PCR พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้สำหรับพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* คือ 0.078 และ 0.625 ng ตามลำดับ การทดสอบขีดจำกัดของปฏิกิริยา multiplex PCR พบว่าเกิดปฏิกิริยาสำหรับพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ที่อัตราส่วน 1:12 และ 1:2 ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะในระยะต่าง ๆ ของพยาธิชนิด

C. formosanus ในปฏิกิริยา multiplex PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ชนิด *C. formosanus* ได้ทุกระยะสำหรับตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ระยะตัวเต็มวัย ระยะเมตาเซอรรคาเรีย ระยะเซอรรคาเรีย และระยะไข่ เกิดผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะที่ประมาณ 609 คู่เบส สำหรับการตรวจสอบการติดพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ในตัวอย่างภาคสนามจำนวน 50 ตัวอย่าง ทั้ง 3 วิธี (morphology, simplex และ multiplex PCR) พบว่าการตรวจสอบด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยามีผลบวกสำหรับการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* จำนวน 18 ตัวอย่าง ให้ผลบวกสำหรับการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. เพียงอย่างเดียวจำนวน 13 ตัวอย่าง ให้ผลบวกสำหรับการติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรรคาเรียชนิด *C. formosanus* เพียงชนิดเดียวจำนวน 14 ตัวอย่าง และจำนวน 3 ตัวอย่างไม่พบการติดเชื้อ ตามลำดับ ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี simplex และ multiplex PCR พบว่ามีผลบวกสำหรับการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* จำนวน 18 ตัวอย่าง ให้ผลบวกสำหรับการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. เพียงอย่างเดียวจำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ผลบวกสำหรับการติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรรคาเรียชนิด *C. formosanus* เพียงชนิดเดียวจำนวน 14 ตัวอย่าง และจำนวน 3 ตัวอย่างไม่พบการติดเชื้อตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

การติดพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ในปลายังคงเป็นปัญหาสำคัญสำหรับภาคอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย เนื่องจากการติดพยาธิทั้งสองชนิดดังกล่าวส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปลาโดยตรงและเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ปลามีอัตราการตายที่สูงขึ้น นำมาสู่ความสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจของการเพาะเลี้ยงปลาที่สำคัญทั้งทางตรงและทางอ้อม (Scholz and Salgado-Maldonado, 2000; Mitchell et al., 2005; Reed et al., 2009; Tu et al., 2015) นอกจากนี้ลักษณะอาการทางคลินิกของการติดพยาธิใบไม้ทั้งสองชนิดนั้นมีความคล้ายคลึงกันยากต่อการระบุถึงสาเหตุหากปราศจากการวิเคราะห์ในระบบห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันวิธีการตรวจหาแบบทั่วไปคือเทคนิคการตรวจชิ้นเนื้อและการชันสูตรเป็นวิธีการที่ใช้สำหรับการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยการติดพยาธิเบื้องต้น โดยพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Gussev, 1983; Silas et al., 2001) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของความแม่นยำ ความรวดเร็วและอาศัยประสบการณ์ความเข้าใจในการระบุชนิดของผู้ชำนาญ นอกจากนี้การวินิจฉัยแบบดั้งเดิมเพื่อจำหน่าย-ส่งออกไปยังประเทศปลายทางยังคงแสดงให้เห็นว่าสามารถพบการติด

พยาธิปลิงใสในประเทศปลายทางได้จนถึงปัจจุบัน เช่น ในประเทศออสเตรเลียพบการติดพยาธิปลิงใสจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *D. anchoratus*, *D. baueri*, *D. formosus*, *D. intermedius*, *D. vastator* และ *Dactylogyrus* sp. จากปลาทอง (*Carassius auratus*) ที่ประเทศไทยส่งออกไปสู่ประเทศออสเตรเลีย โดยมีค่าความชุกอยู่ในช่วง 3.3-60% (Trujillo-González et al., 2018) ในประเทศบังคลาเทศพบการติดพยาธิปลิงใสชนิด *D. lampam* และ *D. siamensis* จากปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ที่เคยมีการนำปลาชนิดนี้จากประเทศไทยเข้ามาทำการเพาะเลี้ยงภายในประเทศ (Mohanta & Chandra, 2000) ในประเทศซีกเกียพบพยาธิปลิงใสชนิดใหม่ถึง 3 ชนิด ได้แก่ *D. coartatus* n. sp., *D. macrocolpius* n. sp. และ *D. melanopteri* n. sp. จากปลาฉลามหางไหม้ (*Balantiocheilos melanopterus*) ที่นำเข้ามาจากประเทศไทย (Rehulková & Gelnar, 2006) และในประเทศออสเตรเลียพบการติดพยาธิปลิงใสจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *D. anchoratus*, *D. formosus*, *D. intermedius* และ *D. vastator* จากปลาทองในประเทศไทยที่ถูกนำเข้ามาสู่ประเทศออสเตรเลีย (Trujillo-González et al., 2019) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ส่งผลให้การศึกษาระดับโมเลกุลถูกนำมาใช้อย่างหลากหลาย เนื่องจากมีความสะดวกสบายมีประสิทธิภาพและความแม่นยำที่สูงขึ้น ได้ปริมาณงานที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไป ตัวอย่างเช่น วิธี PCR (Mozhdeganlou et al., 2011; Jalali et al., 2020) และ qPCR (Trujillo-González et al., 2019) ได้มีการพัฒนาเพื่อใช้สำหรับการตรวจจับพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* หลายชนิด ซึ่งวิธีการเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำและมีความจำเพาะที่แตกต่างกันออกไปตามลักษณะของงาน ด้วยเหตุนี้วิธีการวินิจฉัยที่อาศัยความรวดเร็ว แม่นยำ และปริมาณงานสูง เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาเพื่อนำไปใช้สำหรับการวินิจฉัยการติดปรสิตเหล่านี้ในฟาร์มเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่พัฒนาการตรวจจับโรคพยาธิสองชนิดหลักในปลาพร้อมกัน (*Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus*)

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* จำนวน 4 ชนิดในการศึกษานี้ พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายอย่างที่มีความคล้ายคลึงกัน ได้แก่ ลักษณะของลำตัวที่ค่อนข้างเรียวยาว จำนวนของ marginal hook มี 7 คู่ลักษณะของ anchor และพบ dorsal bar จำนวน 1 อันทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันเพียงลักษณะของโคพูลาหรือออร์แกน โอฟีสแฮพเตอร์ และลักษณะของคอคอย อย่างไรก็ตามจากรายงานก่อนหน้าพบความหลากหลายของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* มากถึง 6 ชนิด จากปลาทองที่ได้รับมาจากประเทศไทย สิ่งนี้เป็นที่ยืนยันว่าปลาทองสามารถติดพยาธิปลิงใสสกุล

Dactylogyrus ได้หลายชนิดซึ่งสนับสนุนงานวิจัยของ Trujillo-González et al. (2018) นอกจากนี้การจัดจำแนกพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ในปัจจุบันถูกแบ่งออกเป็นเชื้อสายต่าง ๆ ตามลักษณะของ haptor ventral connective bars หรือ haptor sclerotized ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโฮสต์ที่พบ โดยพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ที่พบใน *C. carpio* และ *Carassius* spp. (รวมถึง *Gymnocephalus cernuus* ของ family Percidae) ถูกจัดอยู่ในเชื้อสายที่ไม่พบโครงสร้างที่เรียกว่า ventral bar ได้แก่ *D. vastator*, *D. formosus*, *D. anchoratus*, *D. inexpectatus*, *D. achmerowi* และ *D. falciformis* เป็นต้น (Šimková et al., 2006; Šimková & Morand, 2008; และ Benovics et al., 2021) อีกทั้งพยาธิปลิงใส 2 ชนิด คือ *D. vastator* และ *D. intermedius* ที่พบใน *C. auratus* จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีโครงสร้างของ dorsal bar จำนวน 1 อัน เหมือนกันทั้ง 2 ชนิด และไม่พบ ventral bar ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาทั้ง 2 ชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกันมาก มีความแตกต่างเพียงแค่ขนาดของ hard parts เท่านั้น รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 18S rDNA และบริเวณ ITS-1 มีความแปรผันระหว่าง 2 ชนิดนี้ต่ำมาก (5.9%) ซึ่งการระบุพยาธิปลิงใส 2 ชนิดนี้ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 18S rDNA และบริเวณ ITS-1 เพียงอย่างเดียวนั้นอาจนำไปสู่การระบุชนิดที่คลาดเคลื่อน (Ling et al., 2016) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิปลิงใสสกุล *Dactylogyrus* ในการศึกษาที่มีแนวโน้มว่าเป็น *D. vastator* ซึ่งเป็นชนิดที่พบรายงานได้ทั่วไปในปลาทอง (Šimková et al., 2006; Šimková & Morand, 2008; Trujillo-González et al., 2018) อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียดเพิ่มเติม สำหรับการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอรรคาเรียที่พบใน *C. auratus* ถูกระบุว่าเป็นชนิด *C. formosanus* ตามจำนวนของ circumoral spines ซึ่งมีจำนวน 34 หนาม เรียงตัวแบบสลับกันจำนวน 2 แถว ลักษณะของ excretory bladder เป็นรูปตัว X อยู่ในบริเวณส่วนท้ายของลำตัว สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Chi et al., 2008; Van & Le, 2011; Pinto et al., 2013; Chai et al., 2013; Najet et al., 2014; Yousif et al., 2016; Wanlop et al., 2017; Wongsawad et al., 2017; Pulido-Murillo et al., 2018 และ Chai, 2019) นอกจากนี้ข้อมูลการกระจายตัวของพยาธิใบไม้สกุล *Centrocestus* ในประเทศไทยพบการรายงานเพียงแค่ว่าพบ *C. caninus* ในประเทศไทย (วัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล, 2554) แต่พยาธิใบไม้ชนิดนี้ถูกย้ายให้เป็นชื่อพ้องของ *C. formosanus* ดังนั้นส่งผลให้มีพยาธิใบไม้สกุลนี้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (*C. formosanus*) ที่ถูกรายงานในประเทศไทยจนถึงปัจจุบัน

นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ยังได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับตรวจจับพยาธิทั้งสองชนิดคือ *Dactylogyrus* spp. และ *C. formosanus* ซึ่งได้ทดสอบความจำเพาะโดยใช้ตัวอย่างปรสิตที่พบในประเทศไทยและปรสิตชนิดอื่น ๆ ที่พบในปลาน้ำจืดมากกว่า 10 ชนิด รวมถึงโฮสต์ที่พบรายงานการติดพยาธิทั้งสองชนิดมากกว่า 10 สายพันธุ์โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับปรสิตและโฮสต์ที่นำมาทดสอบ สำหรับไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. ได้พัฒนาหรือออกแบบจากยีน 18S ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใสในสกุล *Dactylogyrus* ได้หลายชนิด เนื่องจากยีนนี้มีความอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์และให้ความแปรผันระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สูง อีกทั้งยีนดังกล่าวได้รับการพิสูจน์แล้วว่าประสิทธิภาพในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. (Šimková et al., 2017) ยิ่งไปกว่านั้นยีน 18S ยังได้รับการพัฒนาให้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับตรวจจับการติดพยาธิชนิด *H. taichui* ในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 (Chontanarth et al., 2018) และใช้ตรวจจับการติดพยาธิใบไม้ในปลาหลายชนิด (Pyo et al., 2013) สำหรับไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *C. formosanus* เมื่อพิจารณาถึงยีนที่มีความเป็นไปได้สำหรับการนำมาใช้เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ชนิดนี้ มีเพียง 2 ยีนหรือบริเวณเท่านั้นที่มีอยู่ในฐานข้อมูลคือ COI และ ITS2 ซึ่งขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อยีนหรือบริเวณดังกล่าวมีขนาดที่สั้นและไม่พบช่วงที่มีความแปรผันระหว่างชนิด (inter-specific variation) มากนัก อีกทั้งพบบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงโดยเฉพาะพยาธิใบไม้ที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน ได้แก่ พยาธิใบไม้ชนิด *M. yokogawai*, *S. falcatus* และ *H. taichui* ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกยีน *Cytb* สำหรับการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *C. formosanus* เนื่องจากยีนดังกล่าวอยู่ในไมโทคอนเดรียที่มีจำนวนสำเนาดีเอ็นเอมากถึง 1000 ชุดต่อจำนวน 1 เซลล์ มีอัตราการกลายพันธุ์สูง (high mutation rate) ไม่เกิดการรวมกันใหม่ของยีน (non-genetic recombination) และไม่มีความซับซ้อนมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในนิวเคลียส (Le et al., 2002; McManus and Blair, 2004) นอกจากนี้ยีน *Cytb* ยังถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้สำหรับการตรวจจับการติดพยาธิชนิด *Echinostoma revolutum* (Anucherngchai et al., 2019) และระยะไข่ของพยาธิชนิด *Fasciola* sp. ในตัวอย่างอุจจาระได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chontanarth & Parawat, 2019) ในเรื่องความจำเพาะของชุดไพรเมอร์สำหรับการตรวจจับพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. โดยทั่วไปจากงานวิจัยของ Mozhdeganlou et al. (2011) และ Jalali et al. (2020) และการตรวจจับพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียชนิด *C. formosanus* ในปลาน้ำจืดของ Zhiliang et al. (2016) และ Pace et al. (2020) ยังไม่มีการนำตัวอย่างปรสิตหรือโฮสต์เข้ามาศึกษาในปฏิกิริยาซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ สำหรับค่าความไว

ในปฏิกิริยาของการศึกษานี้สำหรับพยาธิชนิด *Dactylogyrus* spp. มีค่าความไวของปฏิกิริยาอยู่ที่ 0.078 ng และสำหรับพยาธิชนิด *C. formosanus* อยู่ที่ 0.625 ng โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chontanarith (2017) ได้ทำการทดสอบความไวสำหรับการตรวจจับพยาธิชนิด *C. formosanus* อยู่ที่ 2.5 ng ซึ่งถือได้ว่างานนี้มีค่าความไวที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบภายใต้การทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน (multiplex PCR) อย่างไรก็ตามค่าความไวที่แตกต่างกันอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของ gDNA ในตัวอย่างที่ทดสอบ จำนวนหรือเป้าหมายของยีนที่แตกต่างกันในระบบ ส่วนผสมหรืออัตราส่วนของสารต่าง ๆ ในปฏิกิริยา PCR รวมถึงช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์จำเพาะในแต่ละการทดสอบ นอกจากนี้การพัฒนากการตรวจจับพยาธิเหล่านี้โดยอาศัยวิธี PCR อื่น ๆ เช่น การทดสอบด้วยวิธี real-time PCR ยังมีส่วนช่วยในการวินิจฉัยพยาธิชนิด *Gyrodactylus* spp. (Collins et al., 2010) และ *Dactylogyrus* spp. (Trujillo-González et al., 2019) โดยนำเสนอค่าความไวในเชิงปริมาณที่แตกต่างกันอีกด้วย สำหรับขีดจำกัดการตรวจจับของ *Dactylogyrus* spp. ตรวจพบที่อัตราส่วน 1:12 และสำหรับ *C. formosanus* ถูกตรวจพบที่อัตราส่วน 1:2 ตามลำดับ ซึ่งขีดจำกัดของการตรวจจับพยาธิชนิด *C. formosanus* พบว่ามีค่าน้อยกว่าจากการศึกษาก่อนหน้านี้ใน *O. viverrini* ที่อัตราส่วน 1:210 (Zhiliang et al., 2016) อย่างไรก็ตามขีดจำกัดที่ต่างกันอาจเป็นผลจากชนิดของพยาธิและวิธีการที่นำมาทดสอบนั้นมีความแตกต่างกัน (simplex และ multiplex PCR) นอกจากนี้เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาแล้วเมื่อนำไปทดสอบการตรวจจับระยะต่าง ๆ ของพยาธิชนิด *C. formosanus* พบว่าสามารถตรวจจับได้ทุกระยะที่นำมาทดสอบตั้งแต่ระยะตัวเต็มวัย ระยะเมตาเซอรัคคาเรีย ระยะเซอรัคคาเรีย และระยะไข่ ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR นี้ อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจหาระยะไข่ของผู้ป่วยในพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิชนิดดังกล่าว ซึ่งเครื่องมือนี้อาจช่วยบ่งบอกความแตกต่างระหว่างระยะไข่ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับพยาธิใบไม้ชนิดอื่น ๆ ที่พบในปลาน้ำจืดได้ เช่น *O. viverrini*, *H. taichui* และ *S. falcatus* รวมถึงการประยุกต์นำไปทดสอบการติดพยาธิชนิด *C. formosanus* ในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 คือหอยน้ำจืด เครื่องมือนี้อาจช่วยประเมินหรือให้ความเข้าใจเกี่ยวกับสถานะการระบาดของพยาธิชนิดนี้ในโฮสต์กึ่งกลางจากในบริเวณพื้นที่เสี่ยงได้อีกด้วย ดังนั้นเครื่องมือนี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นเครื่องมือที่มีความเหมาะสมโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยวิธีการวินิจฉัยอื่น (เช่น การระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิในระยะตัวอ่อนหรือระยะไข่ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน)

การทดสอบความเสถียรภาพหรือความแม่นยำของวิธี multiplex PCR ได้ถูกนำไปใช้ในการตรวจจับการติดพยาธิทั้งสองชนิดในปลาทองจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับ การทดสอบ 2 วิธี (morphology และ simplex PCR) ผลการทดลองพบว่าการตรวจสอบด้วยวิธีทาง สันฐานวิทยาไม่สามารถตรวจจับการติดพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ได้ในตัวอย่างที่ 23 และ 26 ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี simplex และ multiplex PCR พบผลบวกในตัวอย่าง ดังกล่าว สิ่งนี้อาจเป็นเพราะการทดสอบด้วยวิธีทางสันฐานวิทยาอาจจำเป็นต้องพบตัวอย่างที่ สมบูรณ์สำหรับใช้ในการระบุชนิดอย่างแม่นยำ ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี simplex และ multiplex PCR สามารถตรวจจับดีเอ็นเอของพยาธิปลิงใสชนิด *Dactylogyrus* spp. ได้ต่ำสุดถึง 0.078 ng แม้ว่าตัวอย่างพยาธิชนิดดังกล่าวอาจไม่สมบูรณ์ก็ตาม (โดยทั่วไปพยาธิชนิด *Dactylogyrus* จำนวน 1 ตัวอย่างจะสกัดดีเอ็นเอได้ประมาณ 1-3 ng) อาจเป็นผลให้ในตัวอย่างที่ 23 และ 26 เป็นผลบวกขึ้นได้ นอกจากนี้การทดสอบภาคสนามแสดงให้เห็นว่าวิธี multiplex PCR ที่ได้รับการพัฒนาแล้วมีความแม่นยำและความไวสูง ไม่จำเป็นต้องใช้ทักษะที่สูงเกินไปสำหรับการ ระบุพยาธิไปไม่ในเหล่านี้ในระดับชนิดและประหยัดเวลา ในทำนองเดียวกันการทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR ยังเผยให้เห็นว่าการทดสอบนี้มีความไวเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี simplex PCR ที่มีข้อดีในการตัดปริมาณงานและค่าใช้จ่ายของรีเอเจนต์ ดังนั้นโดยรวมแล้วการ ทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับ การวินิจฉัยการติดพยาธิสองชนิดหลักพร้อมกันในหนึ่งปฏิบัติการและจะเป็นเครื่องมือที่มีค่าสำหรับ การวินิจฉัยและการติดตามสถานการณ์การแพร่ระบาดในพื้นที่เสี่ยงต่อไป

บรรณานุกรม

- Abdullah, Y. S., & Abdullah, S. M. (2016). *Dactylogyrus dulkeiti* Bychowsky, 1936 (Monogenea: KJAR Short Article Dactylogyride): first occurrence on the gills of *Carassius auratus* Linnaeus, 1758 from Dukan Lake in Kurdistan Region, Iraq. *Kurdistan Journal of Applied Research*, 1(1), 66-69.
- Abe, G., Lee, S. H., Chang, M., Liu, S. C., Tsai, H. Y., & Ota, K. G. (2014). The origin of the bifurcated axial skeletal system in the twin-tail goldfish. *Nature Communications*, 5(1), 1-7.
- Africa, C., Leon, W. d., & Garcia, E. (1940). Visceral complications in intestinal heterophyidiasis of man. Paper presented at the International Congress (3rd) for Microbiology (pp. 447-449), New York, *Report of Proceedings*.
- Ahmadi, A., Borji, H., Naghibi, A., Nasiri, M. R., & Sharifiyazdi, H. (2017). Morphologic and molecular (28S rDNA) characterization of *Dactylogyrus* spp. in *Cyprinus carpio* and *Ctenopharyngodon idella* in Mashhad, Iran. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 81(4), 280-284.
- Al-Saadi, A. A. J., & Mohammed, H. J. (2018). First occurrence of three species of the genus *Dactylogyrus* Diesing, 1850 (Monogenea: Dactylogyridae) in Iraq from some Diyala river fishes, Diyala province. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Science*, 31(1), 1-8.
- Anucherngchai, S., Chontanarith, T., Tejangkura, T., & Chai, J. Y. (2019). The study of *Cytochrome B (CYTB)*: species-specific detection and phylogenetic relationship of *Echinostoma revolutum*, (Froelich, 1802). *Journal of Parasitic Diseases*, 43(1), 66-74.
- Arimatsu, Y., Kaewkes, S., Laha, T., & Sripa, B. (2015). Specific diagnosis of *Opisthorchis viverrini* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting parasite microsatellites. *Acta Tropica*, 141, 368-371.
- Barber, K. E., Mkoji, G. M., & Loker, E. S. (2000). PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya. *The American*

- Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(4), 434-440.
- Bari, M. L., & Yamazaki, K. (2018). *Seafood Safety and Quality*: CRC Press. pp. 1-322.
- Benovics, M., Vukic, J., Šanda, R., Rahmouni, I., & Šimková, A. (2020). Disentangling the evolutionary history of peri-Mediterranean cyprinids using host-specific gill monogeneans. *International Journal for Parasitology*, 50(12), 969-984.
- Boonchot, K., & Wongsawad, C. (2005). A survey of helminths in cyprinoid fish from the Mae Ngad Somboonchon Reservoir, Chiang Mai Province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 36(1), 103-107.
- Boonmars, T., Boonjaraspinyo, S., & Kaewsamut, B. (2009). Animal models for *Opisthorchis viverrini* infection. *Parasitology Research*, 104(3), 701-703.
- Borisov, E. (2013). Representatives of dactylogyridae family of the Monogenea class in gold fish (*Carassius auratus auratus*) imported in Bulgaria from Singapore. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(2), 237-242.
- Borji, H., Naghibi, A., Nasiri, M. R., & Ahmadi, A. (2012). Identification of *Dactylogyrus* spp. and other parasites of common carp in northeast of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 36(2), 234-238.
- Bruno, D. W., & Woo, P. (2002). Sporadic and emerging diseases. In *Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture* (pp. 352), CABI Publishing Oxon England.
- Brusca, R., Moore, W., & Shuster, S. (2016). Invertebrates (p. 1104). *Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc. [Google Scholar]*, 402.
- Bychowsky, B. (1933). Notes about trematodes genus *Dactylogyrus* diesing crucian carps in ponds of park of Petergoff. Biological Research Institute. *Trudy Biologicheskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta LGU*, 10, 269-296.
- Caron, Y., Righi, S., Lempereur, L., Saegerman, C., & Losson, B. (2011). An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* sp. in lymnaeid snails. *Veterinary Parasitology*, 178(1-2), 93-99.
- Caron, Y., Rondelaud, D., & Losson, B. (2008). The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitology Research*, 103(4), 735-744.

- Carp, C. (2007). Metazoan Parasites of Bleak (*Alburnus alburnus*), Crucian Carp (*Carassius carassius*) and Golden Carp (*Carassius auratus*) in Enne Dam Lake, Turkey" Mustafa Koyun and "F. Naci Altunel" Institute of Science and Technology, Uludag University, Bursa, Turkey. *International Journal of Zoological Research*, 3(2), 94-100.
- Chai, J. Y. (2019). Human Intestinal Flukes: From Discovery to Treatment and Control pp. 96-103. Dordrecht, The Netherlands: *Springer Nature B.V.*
- Chai, J. Y., Sohn, W. M., Yong, T. S., Eom, K. S., Min, D. Y., Lee, M. Y., . . . Rim, H. J. (2013). *Centrocestus formosanus* (Heterophyidae): human infections and the infection source in Lao PDR. *The Journal of Parasitology*, 99(3), 531-536.
- Chai, J. Y., Sohn, W. M., Na, B. K., Park, J. B., Jeoung, H. G., Hoang, E. H., & Tin, H. H. (2017). Zoonotic trematode metacercariae in fish from Yangon, Myanmar and their adults recovered from experimental animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 55(6), 631-641.
- Chao, D., Wang, L. C., & Huang, T. C. (1993). Prevalence of larval helminths in freshwater snails of the Kinmen Islands. *Journal of Helminthology*, 67(4), 259-264.
- Chaudhary, A., Chiary, H. R., & Singh, H. S. (2017). First molecular confirmation of the *Dactylogyrus anchoratus* and *D. vastator* (Monogenea, Dactylogyridae) from *Carassius auratus* in western India. *BioInvasions Record*, 6(1), 79-85.
- Chen, H. (1942). The metacercaria and adult of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924), with notes on the natural infection of rats and cats with *C. armatus* (Tanabe, 1922). *The Journal of Parasitology*, 28(4), 285-298.
- Chi, T. T., Dalsgaard, A., Turnbull, J. F., Tuan, P. A., & Darwin Murrell, K. (2008). Prevalence of zoonotic trematodes in fish from a Vietnamese fish-farming community. *Journal of Parasitology*, 94(2), 423-428.
- Chontanarith, T. (2017). Multiplex PCR assay for discrimination of *Centrocestus caninus* and *Stellantchasmus falcatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 103-106.
- Chontanarith, T., Anucherngchai, S., & Tejangkura, T. (2018). The rapid detection

- method by polymerase chain reaction for minute intestinal trematodes: *Haplorchis taichui* in intermediate snail hosts based on 18s ribosomal DNA. *Journal of Parasitic Diseases*, 42(3), 423-432.
- Chontanarith, T., & Parawat, J. (2019). Development of *Cytochrome B*, a new candidate gene for a high accuracy detection of *Fasciola* eggs in fecal specimens. *Veterinary Parasitology*, 274, 108922.
- Chontanarith, T., & Wongsawad, C. (2013). Epidemiology of cercarial stage of trematodes in freshwater snails from Chiang Mai province, Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(3), 237-243.
- Collins, C. M., Kerr, R., McIntosh, R., & Snow, M. (2010). Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. *Diseases of Aquatic Organisms*, 90(2), 135-142.
- Cribb, T. H., Chisholm, L. A., & Bray, R. A. (2002). Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? *International Journal for Parasitology*, 32(3), 321-328.
- Despres, L., Kruger, F., Imbert-Establet, D., & Adamson, M. (1995). ITS2 ribosomal RNA indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species. *International Journal for Parasitology*, 25(12), 1509-1514.
- Diesing, K. (1850). Systema helminthum (Vol. 1, p. 679). *Vindobonae: Wilhelmum Braumüller*.
- Erasmus, D. A. (1972). The biology of trematodes. In *The biology of trematodes*: Edward Arnold (Publishers) 312 pp. Ltd., 25 Hill Street, London, W1X 8LL.
- Evans, B. B., & Lester, R. J. (2001). Parasites of ornamental fish imported into Australia. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 21(2), 51-55.
- Faust, E. C., & Nishigori, M. (1926). The life cycles of two new species of Heterophyidae, parasitic in mammals and birds. *The Journal of Parasitology*, 13(2), 91-128.
- Fletcher, A. S. (1998). A parasite-host checklist for Monogenea from freshwater fishes in Australia, with comments on biodiversity. *Systematic Parasitology*, 41(3), 159-168.
- Frézal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and

- prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736.
- Gerbi, S. (1985). Evolution of ribosomal DNA. *Molecular Evolutionary Genetics*, 419-517.
- Gjurcevic, E., Petrincec, Z., Kozaric, Z., Kužir, S., Kantura, V. G., Vucemilo, M., & Džaja, P. (2007). Metacercariae of *Centrocestus formosanus* in goldfish (*Carassius auratus* L.) imported into Croatia. *Helminthologia*, 44(4), 214-216.
- Gussev, A. (1983). The methods of collection and processing of fish parasitic monogenean materials. In: Nauka, Leningrad, USSR, p 48 (In Russian).
- Han, E. T., Shin, E. H., Phommakorn, S., Sengvilaykham, B., Kim, J. L., Rim, H. J., & Chai, J. Y. (2008). *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) encysted in the freshwater fish, *Puntius brevis*, from Lao PDR. *The Korean Journal of Parasitology*, 46(1), 49.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Huston, D. C., Cantu, V., & Huffman, D. G. (2014). Experimental exposure of adult San Marcos salamanders and larval leopard frogs to the cercariae of *Centrocestus formosanus*. *The Journal of Parasitology*, 100(2), 239-241.
- Ito, J. (1964). Metagonimus and other human heterophyid trematodes. *Progress of Medical Parasitology in Japan*, 1, 317-393.
- Izumi, M. (1935). Studies on the metacercariae parasitic in freshwater fishes in Hyogo Prefecture. *Tokyo Iji Shinshi*, 2950, 2531-2543.
- Jalali, B., & Barzegar, M. (2005). *Dactylogyrus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) in common carp (*Cyprinus carpio* L, 1750) of fresh water fishes of Iran and description of the pathogenicity of *D. sahuensis* Ling, 1985. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 7, 9-16.
- Jalali, M. H. R., Larki, S., Peyghan, R., & Bastami, M. (2020). Morphologic and Molecular Detection of *Dactylogyrus* species in *Cyprinus carpio* and *Ctenopharyngodon idella* in Southwestern Iran. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13(3), 241-247.
- Javahery, S., Nekoubin, H., & Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in

- fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1545-1552.
- Jiang, B., Chi, C., Fu, Y. W., Zhang, Q. Z., & Wang, G. X. (2013). In vivo anthelmintic effect of flavonol rhamnosides from *Dryopteris crassirhizoma* against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 112(12), 4097-4104.
- Jitkham, P., Wongsawad, C., Koychusakun, P., & Phalaraksh, C. (2020). Prevalence of trematode Metacercariae in Cyprinoid fish and food consumption behaviors of people from Chiang Rai Province, Northern Thailand. *Journal of Agricultural Technology*, 16(6), 1385-1396.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R., & Munro, H. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Kobayashi, H. (1942). Studies on trematodes in Hainan Island. II. Trematoda found in the intestinal tracts of dogs by experimental feeding with certain fresh and brackish water fish. *Japanese Journal of Medical Sciences and Pathology*, 6, 187-227.
- Komiyama, T., Kobayashi, H., Tateno, Y., Inoko, H., Gojobori, T., & Ikeo, K. (2009). An evolutionary origin and selection process of goldfish. *Gene*, 430(1-2), 5-11.
- Krailas, D., Namchote, S., Koonchornboon, T., Dechruksa, W., & Boonmekam, D. (2014). Trematodes obtained from the thiarid freshwater snail *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) as vector of human infections in Thailand. *Zoosystematics and Evolution*, 90, 182-184.
- Krailas, D., Veeravechsukij, N., Chuanprasit, C., Boonmekam, D., & Namchote, S. (2016). Prevalence of fish-borne trematodes of the family Heterophyidae at Pasak Cholasid Reservoir, Thailand. *Acta Tropica*, 156, 79-86.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Kumchoo, K., Wongsawad, C., Chai, J. Y., Vanittanakom, P., & Rojanapaibul, A. (2005). High prevalence of *Haplorchis taichui* metacercariae in cyprinoid fish from Chiang

- Mai Province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36(2), 451-455.
- Kurokawa, T. (1935). On a new trematode of genus *Stamnosoma* proved from a man. *Tokyo Iji Shinji*, 2915, 293-298.
- Le, T. H., Blair, D., & McManus, D. P. (2002). Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends in Parasitology*, 18(5), 206-213.
- Lee, D., Choe, S., Park, H., Jeon, H. K., Chai, J. Y., Sohn, W. M., . . . Eom, K. S. (2013). Complete mitochondrial genome of *Haplorchis taichui* and comparative analysis with other trematodes. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(6), 719-726.
- Leiper, R. T. (1913). Observations on certain helminths of man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(8), 265-297.
- León, F. L. P., Vara, E. M. R., Pérez, M. M., Nuñez, A. N., & Valdés, A. P. (2019). New Records of Four Species of *Dactylogyrus* (Monogenea: Dactylogyridae) from Goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)(Pisces: Cyprinidae), in Cuba. *Comparative Parasitology*, 86(2), 114-121.
- Ling, F., Tu, X., Huang, A., & Wang, G. (2016). Morphometric and molecular characterization of *Dactylogyrus vastator* and *D. intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 115(5), 1755-1765.
- Linnaeus, C. V. (1758). Systema Naturae, edition X, vol. 1 (Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata). *Holmiae Salvii*, 824-826.
- Lo, C. T., & Lee, K. M. (1996). Infectivity of the cercariae of *Centrocestus formosanus* and *Haplorchis pumilio* (Digenea: Heterophyidae) in *Cyprinus carpio*. *Zoological Studies Taipei*, 35, 305-309.
- Looss, A. (1896). *Recherches sur la faune parasitaire d'Égypte Première partie. Mém Inst égypt (Égypte)* (Vol. 3).
- López, S. (1987). Manual de identificación y tratamiento para controlar las principales parasitosis que afectan a los peces bajo cultivo (No. 3): *Dirección de Operación*,

Departamento de Nutrición y Sanidad Acuicola.

- Madhavi, R. (1986). Distribution of metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) on the gills of *Aplocheilichthys panchax*. *Journal of Fish Biology*, 29(6), 685-690.
- Manera, M., & Dezfuli, B. S. (2003). *Lernanthropus kroyeri* infections in farmed sea bass *Dicentrarchus labrax*: pathological features. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(1-2), 177-180.
- Martin, W. (1958). The life histories of some Hawaiian heterophyid trematodes. *The Journal of Parasitology*, 44(3), 305-318.
- McManus, D. P., Le, T. H., & Blair, D. (2004). Genomics of parasitic flatworms. *International Journal for Parasitology*, 34(2), 153-158.
- Mendoza-Franco, E. F., Caspeta-Mandujano, J. M., & Osorio, M. T. (2018). Ecto-and endoparasitic monogeneans (Platyhelminthes) on cultured freshwater exotic fish species in the state of Morelos, South-Central Mexico. *ZooKeys*. (776), 1-12.
- Mhaisen, F. T., & Abdul-Ameer, K. N. (2019). Checklists of *Dactylogyrus* species (Monogenea) from fishes of Iraq. *Biological and Applied Environmental Research*, 3(1), 1-36.
- Mhaisen, F. T., Balasem, A. N., Al-Khateeb, G. H., & Asmar, K. R. (2003). Recording of five monogenetic trematodes for the first time from fishes of Iraq. *Bulletin of the Iraq Natural History Museum*, 10(1), 31-38.
- Mishima, T. (1959). On a new species of the genus *Centrocestus* with its life history. *Tokyo Iji Shinji*, 76(5), 291-299.
- Mitchell, A. J., Goodwin, A. E., Salmon, M. J., & Brandt, T. M. (2002). Experimental infection of an exotic heterophyid trematode, *Centrocestus formosanus*, in four aquaculture fishes. *North American Journal of Aquaculture*, 64(1), 55-59.
- Mitchell, A. J., Overstreet, R. M., Goodwin, A. E., & Brandt, T. M. (2005). Spread of an exotic fish-gill trematode: a far-reaching and complex problem. *Fisheries*, 30(8), 11-16.
- Mitchell, A. J., Salmon, M. J., Huffman, D. G., Goodwin, A. E., & Brandt, T. M. (2000).

- Prevalence and pathogenicity of a heterophyid trematode infecting the gills of an endangered fish, the fountain darter, in two central Texas spring-fed rivers. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(4), 283-289.
- Modu, B., Saiful, M., Kassim, Z., Hassan, M., & Shaharom-Harrison, F. (2012). A New Species of Gill Monogenea (*Dactylogyrus* Diesing, 1850) from *Hampala macrolepidota* van Hasselt and Kuhl 1823 (Cyprinidae) in Sungai Kiang and Tanjung Mentong, Tasik Kenyir Lake: Malaysia. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 4(4), 488-491.
- Mohanta, S., & Chandra, K. (2000). Monogenean infestations in Thai silver barb (*Barbodes gonionotus* Bleeker) and their adaptations in Bangladesh waters. *Bangladesh Journal of Fisheries Research*, 4(2), 147-155.
- Molnár, K. (1971). Studies on gill parasitosis of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) caused by *Dactylogyrus lamellatus* Achmerov, 1952. *Acta Veterinaria Hungarica*, 21, 267-289.
- Molnár, K. (2009). Data on the parasite fauna of the European common carp *Cyprinus carpio carpio* and Asian common carp *Cyprinus carpio haematopterus* support an Asian ancestry of the species. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 2(4), 391-400.
- Morozov, F. (1952). Superfamily Heterophyoidea Faust, 1929. *Trematodes of animals and man*, KI Skrjabin (ed.), 6, 153-645.
- Mousavi, H. E., Mood, S., Omrani, B., Mokhayer, B., Ahmadi, M., Soltani, M., . . . Pazooki, J. (2009). Gill ectoparasites of goldfish (*Carassius auratus*, pearl scale variety) imported into Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 29(5), 175-180.
- Mozhdeganlou, Z., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Shayan, P., Soltani, M., Ebrahimzadeh, E., & Rostami, M. (2011). Detection of single *Dactylogyrus* spp. in DNA extracted from infected gill tissue of fishes using polymerase chain reaction. *International Journal of Veterinary Research*, 5(2), 77-144.
- Nagataki, M., Tantrawatpan, C., Agatsuma, T., Sugiura, T., Duengai, K., Sithithaworn, P., .

- . . Saijuntha, W. (2015). Mitochondrial DNA sequences of 37 collar-spined echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR reveals presence of two species: *Echinostoma revolutum* and *E. miyagawai*. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 56-62.
- Najet, G., Sabah, D., & Hayet, H. (2014). *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) in Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 13(27), 2774-2777.
- Nazina, T., Shumkova, E., Sokolova, D. S., Babich, T., Zhurina, M., Xue, Y.-F., . . . Tourova, T. (2015). Identification of hydrocarbon-oxidizing Dietzia bacteria from petroleum reservoirs based on phenotypic properties and analysis of the 16S rRNA and *gyrB* genes. *Microbiology*, 84(3), 377-388.
- Nishigori, M. (1924). On a new trematode *Stamnosoma formosanum* n. sp. and its development. *Taiwan Igakkai Zasshi*, 234, 181-228.
- Noikong, W., Wongsawad, C., & Phalee, A. (2011). Seasonal variation of metacercariae in cyprinoid fish from Kwa Noi Bamroongdan Dam, Phitsanulok province, northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42, 58-62.
- Ogawa, K., & Egusa, S. (1979). Six species of *Dactylogyrus* (Monogenea: Dactylogyridae) collected from goldfish and carp cultured in Japan. *Fish Pathology*, 14(1), 21-31.
- Onji, Y., & Nishio, T. (1916). On intestinal distomes. *Iji Shimbun*, 949, 589-593.
- Pace, A., Dipineto, L., Aceto, S., Censullo, M. C., Valoroso, M. C., Varriale, L., . . . Borrelli, L. (2020). Diagnosis of *Centrocestus formosanus* Infection in Zebrafish (*Danio rerio*) in Italy: A Window to a New Globalization-Derived Invasive Microorganism. *Animals*, 10(3), 456.
- Park, G. M. (2007). Genetic comparison of liver flukes, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*, based on rDNA and mtDNA gene sequences. *Parasitology Research*, 100(2), 351-357.
- Pinto, H. A., Gonçalves, N. Q., López-Hernandez, D., Pulido-Murillo, E. A., & Melo, A. L. (2018). The life cycle of a zoonotic parasite reassessed: Experimental infection of

- Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) with *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) *PLOS ONE*, 13(4), 1-13.
- Pinto, H. A., Mati, V. L. T., & de Melo, A. L. (2013). New records and a checklist of trematodes from *Butorides striata* (Aves: Ardeidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(4), 1100-1110.
- Pinto, H. A., Mati, V. L. T., & de Melo, A. L. (2015). Experimental centrocestiasis: worm burden, morphology and fecundity of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in dexamethasone immunosuppressed mice. *Parasitology International*, 64(5), 236-239.
- Pinto, H. A., & Melo, A. L. D. (2012). Metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in *Australoheros facetus* (Pisces: Cichlidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(3), 334-337.
- Premvati, G., & Pande, V. (1974). On *Artyfechinostomum malayanum* (Leiper, 1911) Mendheim, 1943 (Trematoda: Echinostomatidae) with synonymy of allied species and genera. *Proceed Helminthol Soc Washington*, 41(41), 151-160.
- Pulido-Murillo, E. A., Furtado, L. F. V., Melo, A. L., Rabelo, É. M., & Pinto, H. A. (2018). Fishborne zoonotic trematodes transmitted by *Melanoides tuberculata* snails, Peru *Emerging Infectious Diseases*, 24(3), 606-608.
- Pyo, K. H., Kang, E. Y., Hwang, Y. S., Jun, H. C., Sohn, W. M., Cho, S. H., . . . Shin, E. H. (2013). Species identification of medically important trematodes in aquatic food samples using PCR-RFLP targeting 18S rRNA. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(3), 290-292.
- Ransom, B. H. (1920). *Synopsis of the trematode family Heterophyidae with descriptions of a new genus and five new species* (Vol. 57): US Government Printing Office.
- Rasouli, S., Nekuifard, A., Azadikhah, D., Ahari, H., Anvar, A., Khodadadi, A., & Ghasemi, A. (2012). Ectoparasite infection of *Carassius carassius* in water resources of west Azerbaijan, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(1), 156-164.
- Reed, P., Francis-Floyd, R., Klinger, R., & Petty, D. (2009). Monogenean parasites of fish. Fisheries and aquatic sciences. University of Florida UF, *IFAS Extension*. FA28,

USA, 4, 1-4.

- Rehulková, E., & Gelnar, M. (2006). Three new species of *Dactylogyrus* Diesing, 1850 (Monogenea: Dactylogyridae) from the gills of the bala sharkminnow *Balantiocheilos melanopterus* (Cyprinidae) from Thailand. *Systematic Parasitology*, 64(3), 215-223.
- Rodrigues, F. S., Assane, I. M., Valladão, G. M. R., Paula, F. G. d., Andrade, C. L., Moraes, A. P. d., . . . Pascoal, L. M. (2019). First report of *Trichodinella* and new geographical records of trichodinids in *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(2), 229-237.
- Saenphet, S., Wongsawad, C., Saenphet, K., Rojanapaibul, A., Vanittanakom, P., & Chai, J. Y. (2008). The occurrence of heterophyid metacercariae in cyprinoid fish in Chiang Mai province. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 39(1), 56-61.
- Schmidt, G. D., Roberts, L. S., & Janovy, J. (1977). *Foundations of Parasitology*, p. 293: Mosby Saint Louis.
- Scholz, T., & Salgado-Maldonado, G. (2000). The introduction and dispersal of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924)(Digenea: Heterophyidae) in Mexico: a review. *The American Midland Naturalist*, 143(1), 185-200.
- Shamsi, S., Jalali, B., & Aghazadeh, M. M. (2009). Infection with *Dactylogyrus* spp. among introduced cyprinid fishes and their geographical distribution in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(1), 70-74.
- Sharma, P., Agarwal, N., & Kumar, S. (2011). Ribosomal DNA and morphological analysis of *Dactylogyrus* species from freshwater fishes of India. *Journal of Parasitic Diseases*, 35(2), 210-214.
- Silas, E., Gopalakrishnan, A., Ramachandran, A., Anna Mercy, T., Sarkar, K., Pushpangadan, K., . . . Anikuttan, K. (2011). Guidelines for green certification of freshwater ornamental fish. p. 34-39. In: Marine Products Export Development Authority.
- Šimková, A., Benovics, M., Rahmouni, I., & Vukic, J. (2017). Host-specific *Dactylogyrus*

- parasites revealing new insights on the historical biogeography of Northwest African and Iberian cyprinid fish. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1-16.
- Šimková, A., & Morand, S. (2008). Co-evolutionary patterns in congeneric monogeneans: a review of *Dactylogyrus* species and their cyprinid hosts. *Journal of Fish Biology*, 73(9), 2210-2227.
- Šimková, A., Morand, S., Jobet, E., Gelnar, M., & Verneau, O. (2004). Molecular phylogeny of congeneric monogenean parasites (*Dactylogyrus*): a case of intrahost speciation. *Evolution*, 58(5), 1001-1018.
- Šimkova, A., Pecinkova, M., Rehulkova, E., Vyskocilova, M., & Ondracková, M. (2007). *Dactylogyrus* species parasitizing European Barbus species: morphometric and molecular variability. *Parasitology*, 134(12), 1751.
- Šimková, A., Verneau, O., Gelnar, M., & Morand, S. (2006). Specificity and specialization of congeneric monogeneans parasitizing cyprinid fish. *Evolution*, 60(5), 1023-1037.
- Simsek, E., Yildirim, A., Yilmaz, E., Inci, A., Duzlu, O., Onder, Z., . . . Pekmezci, G. Z. (2018). Occurrence and molecular characterization of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomidae) in freshwater fishes caught from Turkey. *Parasitology Research*, 117(7), 2117-2124.
- Sohn, W. M., Eom, K. S., Min, D. Y., Rim, H. J., Hoang, E. H., Yang, Y., & Li, X. (2009). Fishborne trematode metacercariae in freshwater fish from Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(3), 249-257.
- Sripalwit, P., Wongsawad, C., Chontanarith, T., Anuntalabhochai, S., Wongsawad, P., & Chai, J. Y. (2015). Developmental and phylogenetic characteristics of *Stellantchasmus falcatus* (Trematoda: Heterophyidae) from Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 53(2), 201-207.
- Srisawangwong, T., Sithithaworn, P., & Tesana, S. (1997). Metacercariae isolated from cyprinoid fishes in Khon Kaen District by digestion technic. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 28, 224-226.
- Subbotin, S., & Moens, M. (2006). Molecular taxonomy and phylogeny. *Plant nematology*, 33-58.

- Sumuduni, B. G., Munasinghe, D. H., & Arulkanthan, A. (2018). Chronological analysis of the damages caused by the metacercariae of *Centrocestus formosanus* in the gills of *Cyprinus carpio* and lesions caused by the adult flukes in *Ardeola ralloides*: An experimental study. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(2), 165-171.
- Tanabe, H. (1922). Studien uber die Trematoden mit Susswasserfischen als Zwischenwirt. I. *Stamnosoma armatum* ng, n. sp. *Kyoto Igaku Zasshi*, 19, 239-252.
- Tancredo, K. R., da Costa Marchiori, N., Pereira, S. A., & Martins, M. L. (2019). Toxicity of formalin for fingerlings of *Cyprinus carpio* var. koi and in vitro efficacy against *Dactylogyrus minutus* Kulwiec, 1927 (Monogenea: Dactylogyridae). *Journal of Parasitic Diseases*, 43(1), 46-53.
- Thien, P. C., Dalsgaard, A., Thanh, B. N., Olsen, A., & Murrell, K. D. (2007). Prevalence of fishborne zoonotic parasites in important cultured fish species in the Mekong Delta, Vietnam. *Parasitology Research*, 101(5), 1277-1284.
- Thoney, D., & Hargis Jr, W. (1991). Monogenea (Platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 133-153.
- Thurston, J. P. (1965). The pathogenicity of fish parasites in Uganda. *Proceedings of the East African Academy*, 3, 45-51.
- Travassos, L. (1922). Informações sobre a fauna helminthologica de Matto Grosso. *Folha Medica*, 3(24), 187-190.
- Trujillo-González, A., Becker, J., Vaughan, D., & Hutson, K. (2018). Monogenean parasites infect ornamental fish imported to Australia. *Parasitology Research*, 117(4), 995-1011.
- Trujillo-González, A., Edmunds, R., Becker, J., & Hutson, K. (2019). Parasite detection in the ornamental fish trade using environmental DNA. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- Tu, X., Ling, F., Huang, A., & Wang, G. (2015). The first report of *Dactylogyrus formosus* Kulwiec, 1927 (Monogenea: Dactylogyridae) from goldfish (*Carassius auratus*) in central China. *Parasitology Research*, 114(7), 2689-2696.
- Ukong, S., Krailas, D., Dangprasert, T., & Channgarm, P. (1970). Studies on the

- morphology of cercariae obtained from freshwater snails at Erawan Waterfall, Erawan National Park, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(2), 302-312.
- Van Beneden, P., & Hesse, C. (1863). Second appendice au Mémoire-Sur les Bdelloides et les trématodes. *Mémoires de l'Académie Royale de Belgique*, 34, 62-149.
- Van De, N., & Le, T. H. (2011). Human infections of fish-borne trematodes in Vietnam: prevalence and molecular specific identification at an endemic commune in Nam Dinh province. *Experimental Parasitology*, 129(4), 355-361.
- Velásquez, L. E., Bedoya, J. C., Areiza, A., & Vélez, I. (2006). Primer registro de *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) en Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77(1), 119-121.
- Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial *Cytochrome c oxidase subunit I* from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5), 294-299.
- Waikagul, J., & Thaekham, U. (2014). Approaches to research on the systematics of fish-borne trematodes. pp. 1-109, Academic Press.
- Waikagul, J., Wongsaraj, T., Radomyos, P., Meesomboon, V., Praewanich, R., & Jongsuksantikul, P. (1997). Human infection of *Centrocestus caninus* in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 28, 831-835.
- Wanlop, A., Wongsawad, C., Prattapong, P., Wongsawad, P., Chontanarith, T., & Chai, J. Y. (2017). Prevalence of *Centrocestus formosanus* metacercariae in ornamental fish from Chiang Mai, Thailand, with molecular approach using ITS2. *The Korean Journal of Parasitology*, 55(4), 445-449.
- Wongsawad, C., Rojanapaibul, A., Mhad-arehin, N., Pachanawan, A., Marayong, T., Suwattanacoupt, S., . . . Nichapu, A. (2000). Metacercaria from freshwater fishes of Mae Sa stream, Chiang Mai, Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, (Suppl 1), 54-57.
- Wongsawad, C., Rojtinnakorn, J., Wongsawad, P., Rojanapaibul, A., Marayong, T., Suwattanacoupt, S., . . . Jadhav, B. (2004). Helminths of vertebrates in Mae Sa

- Stream, Chiang Mai, Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(Suppl 1), 140-146.
- Wongsawad, C., Wongsawad, P., Sukontason, K., Maneepitaksanti, W., & Nantararat, N. (2017). Molecular phylogenetics of *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) originated from freshwater fish from Chiang Mai Province, Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 55(1), 31-37.
- Wongsawad, P., & Wongsawad, C. (2007). DNA fingerprints of some heterophyid trematodes from adult and metacercarial stages in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38, 110-114.
- Wongsawad, P., & Wongsawad, C. (2011). Infection dynamics and molecular identification of metacercariae in cyprinoids from Chiang Mai and Sakon Nakhon provinces. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(1), 53-57.
- Yamaguti, S. (1958). Systema Helminthum. Vol. I. The Digenetic Trematodes of Vertebrates-Part II. Systema Helminthum. Vol. I. The Digenetic Trematodes of Vertebrates-Part II.
- Yamaguti, S. (1963). Systema Helminthum. Vol. V. Acanthocephala (Vol. 5).
- Yamaguti, S. (1975). Synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates Keigaku Publishing Co, Tokyo, pp 1-590 with 219 figure plates.
- Yandi, I., Kayis, S., & Er, A. (2017). Histopathological effects of etiological and non-etiological agents in some fish gills. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26, 995-1000.
- Yousif, F., Ayoub, M., Tadros, M., & El Bardicy, S. (2016). The first record of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924)(Digenea: Heterophyidae) in Egypt. *Experimental Parasitology*, 168, 56-61.
- Yu, S. H., Mott, K. E., & Organization, W. H. (1994). Epidemiology and morbidity of food-borne intestinal trematode infections. (No. WHO/SCHISTO/94.108. Unpublished). World Health Organization.
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical*

Systematics and Ecology, 25(2), 99-120.

Zhiliang, W., Aukkanimart, R., Boonmars, T., Vanisaveth, V., Wai, A. P., Sanephonasa, A., & Laymanivong, S. (2016). Identification of fish-borne trematode DNA in cyprinoid fish using molecular detection. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 21(4), 1-7.

ชโลบล วงศ์สวัสดิ์. (2555). ประวัติวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: ชมพูการพิมพ์.

นฤชยา ไกลเนตร. (2553). การป้องกันและการกำจัดโรคปลา. In (pp. 1-40). โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ประไพสิริ สิริกาญจน. (2538). ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ (5 ed.). กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

สุรัชย์ พิgulแก้ว และปัญญาญา ไปติบุตร. (2556). ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *Centrocestus* spp. ที่เห้งอกในปลาทอง (*Carassius auratus*). เชียงใหม่สัตวแพทยสาร, 11(3), 263-269.

ภวพล ศุภนันถนานนท์. (2557). คู่มือเลี้ยงปลาทอง (Vol. 1): บ้านและสวน.

วัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล. (2554). การสำรวจชนิดของปลาที่ติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียจากบางท้องถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 5, 75-86.

วัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล. (2556). ประวัติวิทยาของสัตว์น้ำ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-655.

วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์. (2554). การระบุถิ่นฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ *Paragonimus paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรี. (ปริญญานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

สำนักงานจังหวัดราชบุรี. (2556). ข้อมูลพื้นฐานของจังหวัดราชบุรี. Retrieved from <http://www.rtc.ac.th/data9/ratchaburi/data/2560.pdf>

อรุณี รอดลอย, สุจินต์ หนูขวัญ, จารุวรรณ เรืองทอง และนาฎดา ศุภผล. (2552). 100 สายพันธุ์ปลาสวยงามต่างประเทศ. กรุงเทพฯ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

อิสระพงศ์ โพธิ์สุข .(2556). อัตราความชุก ลักษณะทางคลินิกและการจำแนกสปีชีส์ทางชีวโมเลกุลของการติดเชื้อพยาธิทริโคสตรองไจลัส ในผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์. (ปริญญาโท).

มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พลกวิน จารุบุญญากร
วัน เดือน ปี เกิด	12 มกราคม 2537
สถานที่เกิด	อำเภอบางกะปิ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา จังหวัดกรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2559 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	267 หมู่บ้านสุขสันต์ 4 ซอยลาดพร้าว 136 แขวงคลองจั่น เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

