



สถานการณ์การระบาดและการระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด

Haplorchoides mehrai ในจังหวัดสระแก้ว

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF LARVAL
STAGES OF INTESTINAL TREMATODE, *HAPLORCHOIDES MEHRAI*, IN SA KAEO
PROVINCE

วรากร บุญประเสริฐ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สถานการณ์การระบาดและการระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด

Haplorchoides mehrai ในจังหวัดสระแก้ว



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF LARVAL
STAGES OF INTESTINAL TREMATODE, HAPLORCHOIDES MEHRAI, IN SA KAEO
PROVINCE



WARAKORN BUNPRASERT

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

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

สถานการณัการระบาดของการระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด

Haplorchooides mehrai ในจังหวัดสระแก้ว

ของ

วรากร บุญประเสริฐ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพนา ชลธนานารถ) (รองศาสตราจารย์วัชรียา ภูรีวิโรจน์กุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ

(ดร.ธนวรรณ เตชางกูร) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล)

ชื่อเรื่อง	สถานการณ์การระบาดของและการระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิ ใบไม้ในลำไส้ชนิด <i>Haplorchoides mehrai</i> ในจังหวัดสระแก้ว
ผู้วิจัย	วรากร บุญประเสริฐ
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภานา ชลธนานารถ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ธนวรรณ เตชางกูร

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้
จังหวัดสระแก้ว และระบุชนิดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับ
วิธีการทางอณูชีววิทยา โดยตรวจการติดพยาธิของตัวอย่างหอยฝาดียวจำนวน 4,750 ตัวอย่าง
จากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 64 จุด พบว่ามีค่าความชุกรวม (total prevalence) เท่ากับร้อยละ
6.90 ส่วนค่าความชุกของ *parapleurolophocercous cercaria* ที่ติดในหอยชนิด *Melanoides*
tuberculata เพียงชนิดเดียวเท่ากับร้อยละ 3.55 สำหรับการระบุชนิดเชิงโมเลกุลโดยใช้ไพรเมอร์
จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่ให้ชิ้นส่วนเป้าหมายขนาด 143 คู่เบส พบว่าตัวอ่อน
พยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercaria* ทั้งหมดที่พบเป็นพยาธิ
ใบไม้ชนิด *H. mehrai* ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่จัดให้ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ
เซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercaria* อยู่ในกลุ่มเดียวกับพยาธิใบไม้ชนิด *H.*
mehrai โดยพบการระบาดในพื้นที่อำเภอตาพระยาและอำเภอวังน้ำเย็นซึ่งเป็นรายงานแรกของ
สถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย
นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ออกแบบยังมีความไว (sensitivity) ที่สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของ
H. mehrai ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.01 ng/μl ข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถนำไป
ประยุกต์ใช้สำหรับวางแผน ป้องกันการระบาดของพยาธิอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

คำสำคัญ : *Haplorchoides mehrai*; สถานการณ์การระบาด; ไพรเมอร์จำเพาะ

Title EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF LARVAL STAGES OF INTESTINAL TREMATODE, HAPLORCHOIDES MEHRAI, IN SA KAEO PROVINCE

Author WARAKORN BUNPRASERT

Degree MASTER OF EDUCATION

Academic Year 2019

Thesis Advisor Assistant Professor Thapana Chontanarith , Ph.D.

Co Advisor Thanawan Tejangrura , Ph.D.

This study aimed to investigate the epidemiological situation of trematodes in Sa Kaeo province and to identify the trematode species using their morphological characteristics and molecular methods. All 4,750 snail specimens from 64 sampling sites were examined for trematode infections. The results showed that the total prevalence was 6.90% , while the prevalence of parapleurolophocercous cercaria infection in *M. tuberculata* was 3.55% . The molecular identification used a specific primer, based on the ITS2 region, successfully amplified the 143 bp specific fragment. All the parapleurolophocercous cercariae in this study were identified as *H. mehrai*, in accordance with the phylogenetic tree, which clustered the cercariae together in the *H. mehrai* clade. The Ta Phraya and Wang Nam Yen districts were found in the cercarial infection and the first report of a *H. mehrai* outbreak was in Eastern Thailand. Moreover, the sensitivity of a specific primer enables the detection of *H. mehrai* DNA template at a minimum concentration of 0.01 ng/ μ l. The information in this study can apply for effective protection programs for trematode outbreaks in the future.

Keyword : Haplorchoides mehrai; epidemiological situation; specific primer

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพนา ชลธนานารถ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์และอาจารย์ ดร. ธนวรรณ เตชางกูร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมปริญญาานิพนธ์ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้ความรู้ และให้การสนับสนุนด้านการวิจัย รวมทั้งแนวคิดและหลักปฏิบัติสำหรับการทำงาน ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงต้องขอกราบขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วัชรียา ภูรีวิโรจน์กุล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณนายปรีชา เตมดี และคณะ ที่ให้ความกรุณาในการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่มอบทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการทำปริญญาานิพนธ์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางด้านวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้อง และเพื่อนๆ ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจจนทำให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วรากร บุญประเสริฐ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
สมมติฐานของการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. ลักษณะทั่วไปและวงชีวิตของพยาธิใบไม้	6
2. ตัวอ่อนพยาธิใบไม้	11
3. การระบุชนิดของพยาธิ	17
4. ลักษณะทั่วไปของหอยฝาเดียว	25
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	32
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	38
การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์	38

การกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างและการสุ่มเก็บหอยฝาเดียว	38
การตรวจหาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในตัวอย่างหอยฝาเดียว	39
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดพยาธิใบไม้	39
การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาเพื่อระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิใบไม้	40
การศึกษาค่าความชุกและการทำแผนที่ค่าความชุกของตัวอ่อนพยาธิใบไม้	44
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	45
ตัวอย่างหอยฝาเดียวที่พบในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว	45
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้	47
ค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้ในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว	57
การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิใบไม้ชนิด <i>H. mehrari</i> ด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา	59
การจัดทำแผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่จังหวัด สระแก้ว	63
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	66
สรุปผลการวิจัย	66
อภิปรายผลการวิจัย	67
ข้อเสนอแนะ	71
บรรณานุกรม	72
ประวัติผู้เขียน	91

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 เปรียบเทียบเซอร์คาล์วแต่ละรูปแบบ	12
ตาราง 2 บริเวณของสารพันธุกรรมที่มีรายงานการใช้ระบุชนิดพยาธิ	22
ตาราง 3 เปรียบเทียบการติดพยาธิของหอยวงศ์ต่าง ๆ	29
ตาราง 4 หอยที่พบในจังหวัดสระแก้ว.....	45



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 วงชีวิตโดยทั่วไปของพยาธิใบไม้	9
ภาพประกอบ 2 ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ชนิด <i>H. mehrai</i>	10
ภาพประกอบ 3 ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย	15
ภาพประกอบ 4 ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย	17
ภาพประกอบ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียส	20
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของเปลือกหอยฝาเดียว	26
ภาพประกอบ 7 ลักษณะและลวดลายบนเปลือกหอย	27
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของฝาปิดเปลือกหอยแบบต่าง ๆ	28
ภาพประกอบ 9 แผนที่แสดงจำนวนจุดเก็บตัวอย่างของแต่ละอำเภอ	38
ภาพประกอบ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ชนิด <i>Haplorchoides mehrai</i> จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcript spacer 2.....	42
ภาพประกอบ 11 หอยที่พบในจังหวัดสระแก้ว	46
ภาพประกอบ 12 สัดส่วนหอยแต่ละชนิดที่พบในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว	47
ภาพประกอบ 13 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>Haplorchoides mehrai</i> (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด).....	48
ภาพประกอบ 14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>parapleurolophocercous cercaria</i> (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)	49
ภาพประกอบ 15 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>armatae cercaria</i> (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)	50
ภาพประกอบ 16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>virgulate cercaria</i> (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)	51

ภาพประกอบ 17 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ brevifurcate apharyngete cercaria (ก.ภาพถ่าย และ ข.ภาพวาด)	52
ภาพประกอบ 18 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ Transversotrema cercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด).....	53
ภาพประกอบ 19 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ amphistome cercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด).....	54
ภาพประกอบ 20 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ monostome cercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด).....	55
ภาพประกอบ 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ distome cercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด).....	56
ภาพประกอบ 22 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ metacercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด).....	57
ภาพประกอบ 23 ค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้แต่ละอำเภอในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว	58
ภาพประกอบ 24 ค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้ในหอยแต่ละวงศ์จากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว ...	58
ภาพประกอบ 25 ค่าความชุกของการติดพยาธิใบไม้ในหอยแต่ละชนิดจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว	59
ภาพประกอบ 26 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์	60
ภาพประกอบ 27 การทดสอบความไวของไพรเมอร์โดยการเจือจาง 10 เท่า	61
ภาพประกอบ 28 การตรวจสอบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ต่พยาธิใบไม้ชนิด Haplorchoides mehrai	62
ภาพประกอบ 29 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียและระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ชนิด H. mehrai โดยใช้ maximum likelihood ที่ 10,000 รอบ	63
ภาพประกอบ 30 แผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ ในหอยฝาดียวจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว	64
ภาพประกอบ 31 แผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ชนิด H. mehrai ในหอยฝาดียวชนิด M. tuberculata จากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว	65

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

พยาธิใบไม้เป็นสาเหตุหนึ่งของปัญหาสุขภาพทั่วโลก ทำให้องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) กำหนดให้โรคพยาธิใบไม้เป็นปัญหาทางสาธารณสุขในหลายประเทศ โดยมีรายงานว่าประชากรทั่วโลกมีอัตราการติดพยาธิใบไม้มากกว่า 40 ล้านคนในปี 1991 (World Health Organization, 1995) นอกจากนี้มนุษย์แล้วโฮสต์เฉพาะ (definitive host) ของพยาธิใบไม้ยังประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญ เช่น ไก่ โค กระบือ สุกร ปลา ในกรณีที่พบว่ามี การติดพยาธิใบไม้ในปริมาณมาก (heavy infection) จะก่อให้เกิดพยาธิสภาพหรืออาการทางคลินิก เช่น มะเร็งท่อน้ำดี ตับแข็ง ลำไส้อักเสบ หลอดลมอักเสบเรื้อรัง (John & Petri, 2013)

สำหรับในประเทศไทยพยาธิใบไม้ยังคงมีการรายงานการระบาดอย่างต่อเนื่อง ทั้งในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง (first intermediate host) เช่น หอยน้ำจืดฝาดเดียว (Dechruksa et al., 2007; Krailas et al., 2012; Krailas et al., 2014; Kulsantiwong et al., 2015) ในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง (second intermediate host) เช่น ปลาน้ำจืด (Sukontason et al., 1999; Kumchoo et al., 2005; Pinlaor et al., 2013; Krailas et al., 2016) และในโฮสต์เฉพาะที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดต่าง ๆ รวมถึงมนุษย์ (Sangvaranond, 1994; เพ็ญญา ชมะวิต, 2553; จันทร์จุฬา ภาวะเวช, เมธาวิ สบายใจ, และฐาปนา ชลธนานารถ, 2561) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดสระแก้วเป็นหนึ่งในพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากการระบาดของพยาธิใบไม้ ซึ่งมีรายงานว่าประชากรในจังหวัดมีอัตราการป่วยเป็นโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดี ซึ่งมีการตายเป็นอันดับหนึ่งของผู้ป่วยมะเร็งโดยมีสาเหตุมาจากการติดพยาธิใบไม้ ทำให้จังหวัดสระแก้วเป็นจังหวัดเดียวในภาคตะวันออกที่เข้าร่วมโครงการรณรงค์ขจัดพยาธิใบไม้ในตับและต้านภัยมะเร็งท่อน้ำดี (ทีมข่าวภูมิภาค-การศึกษา, 2559, 10 ธันวาคม) สาเหตุหลักของการติดพยาธิใบไม้ของประชากรในจังหวัด คือ ประชากรจังหวัดสระแก้วส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาเดิมอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จึงมีพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ โดยให้เหตุผลว่าให้รสชาติที่อร่อยกว่าการปรุงสุก (ศุภกนก หันตยุง, 2558) ประกอบกับจังหวัดสระแก้วมีความหลากหลายของหอยฝาดเดียวซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้ ตามรายงานของประทีน บุญงาม และคณะ (2553) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายชนิดของหอยน้ำจืดจังหวัดสระแก้ว และรายงานว่าในพื้นที่จังหวัดสระแก้วพบหอยน้ำจืด

5 วงศ์ 7 สกุล 10 ชนิด ได้แก่ *Filopaludina sumatrensis polygramma*, *F. sumatrensis speciosa*, *F. martensii martensi*, *Eyriesia eyriesi*, *Pila polita*, *Adamietta housei*, *Clea helena*, *Pilsbryochocha exilis exilis*, *P. exilis compressa* และ *Scabies phaselus* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ของจังหวัดสระแก้วที่มีแหล่งน้ำอยู่เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นที่อยู่ของโฮสต์ของพยาธิใบไม้ โดยมีลุ่มน้ำหลักที่สำคัญของจังหวัด 2 ลุ่มน้ำ คือ ลุ่มน้ำปราจีนบุรี และลุ่มน้ำโตนเลสาป และมีอ่างเก็บน้ำทั้งหมด 12 แห่ง ได้แก่ อ่างเก็บน้ำท่ากะบาก อ่างเก็บน้ำคลองทราย อ่างเก็บน้ำช่องกล่าบน อ่างเก็บน้ำช่องกล่าล่าง อ่างเก็บน้ำคลองเกลือ อ่างเก็บน้ำห้วยชัน อ่างเก็บน้ำห้วยปรัง อ่างเก็บน้ำห้วยยาง อ่างเก็บน้ำห้วยตะเคียน อ่างเก็บน้ำคลองสามสิบ อ่างเก็บน้ำเขารัง และอ่างเก็บน้ำเขาดิน (โครงการชลประทานจังหวัดสระแก้ว, ม.ป.ป.)

จากปัญหาการระบาดของพยาธิใบไม้ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้ต้องหาแนวทางการควบคุมและป้องกันการระบาด โดยสามารถประเมินจากสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้เชิงพื้นที่ ด้วยวิธีการประมาณอัตราการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในโฮสต์กึ่งกลาง และนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้สำหรับวางแผนควบคุมและป้องกันการระบาดของพยาธิใบไม้ที่เป็นปัจจุบันได้อย่างมีประสิทธิภาพ หอยฝาดเดียวเป็นโฮสต์กึ่งกลางที่ได้รับความนิยมสำหรับศึกษาสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้เนื่องจากสามารถพบพยาธิใบไม้ได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น Schmidt & Fried (1997) ได้ทำการสำรวจหอยน้ำจืดชนิด *Helisoma trivolvis* บริเวณฟาร์มในรัฐเพนซิลเวเนีย และพบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิหลายชนิดประกอบด้วย echinostome cercaria ของ *Echinostoma trivolvis*, amphistome cercaria ของ *Zygocotyle lunata* และ *psilostome cercaria* ของ *Ribeiroia* sp. ประกอบกับหอยฝาดเดียวเป็นสัตว์ที่มีการเคลื่อนที่ช้า ทำให้มีถิ่นที่อยู่ตลอดช่วงชีวิตอย่างจำกัดจึงเป็นตัวแทนที่ดีที่จะศึกษาการระบาดของพยาธิในพื้นที่นั้น โดย Michel, McIntyre, & Chan (2007) ได้ทำการสำรวจหอยฝาดเดียว 3 ชนิด ได้แก่ *Lavigeria coronata*, *L. grandis* และ *L. nassa* พบว่าหอยทั้ง 3 ชนิดมีอัตราเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่เพียง 49.4 เซนติเมตร/วัน

โดยทั่วไปการกำจัดจำแนกตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาและลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียมีความคล้ายคลึงกัน ทำให้ต้องใช้ผู้มีความเชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์สูงในการจัดจำแนก เช่น ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurophocercous cercariae* สามารถพัฒนาไปเป็นพยาธิตัวเต็มวัยได้หลายชนิด ได้แก่ *Haplorchoides mehrai*, *Haplorchis taichui*, *Ha. pumilio*, *Stictodora tridactyla* และ

Heterophyes heterophyes (วิริชุตตา, 2549; พีรพล รัตนไทย, 2553; Manpratum et al., 2017) จึงทำให้ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อระบุและจัดจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ เช่น Shumenko, Tatonova, & Besprozvannykh (2017) ใช้การระบุชนิดเชิงโมเลกุลโดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer 1-5.8S ribosomal RNA - internal transcribed spacer 2 (ITS1-5.8S-ITS2) และ 28S ribosomal RNA (28S) ในการจัดจำแนกพยาธิใบไม้ชนิด *Metagonimus suifunensis* ออกจากพยาธิใบไม้ในสกุลเดียวกัน ได้แก่ *M. yokogawai*, *M. takahashii* และ *M. miyatai* ได้อย่างมีประสิทธิภาพแม้พยาธิใบไม้ทั้ง 4 ชนิด จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างคล้ายคลึงกันก็ตาม ประกอบกับ Wanlop et al. (2017) ได้ประยุกต์วิธีการทางอณูชีววิทยาโดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สำหรับการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ชนิด *Centrocestus formosanus* ในปลาสงายงามหลายชนิดในจังหวัดเชียงใหม่ โดยพบว่ามีค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้ชนิดนี้สูงถึงร้อยละ 33.33 นอกจากนี้ Teimoori et al. (2019) ได้ประยุกต์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 เพื่อตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *Ha. taichui* ในสุนัขจิ้งจอกชนิด *Canis aureus* ซึ่งบริเวณปลาที่เป็นพาหะของพยาธิใบไม้ชนิดนี้ในพื้นที่ตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอิหร่าน

พยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* จัดอยู่ในพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ ลำไส้ขนาดเล็กที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ โดยมีตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่มีความคล้ายคลึงกับพยาธิใบไม้ชนิด *Ha. taichui*, *Ha. pumilio*, *Heterophyes* sp. และ *Stictodora tridactyla* ที่มีการรายงานการระบาดในหลายพื้นที่ของประเทศไทย (Namchote et al., 2015; Sritongtae et al., 2015; Dechruksa et al., 2017) ในขณะที่พยาธิชนิด *H. mehrai* มีการศึกษาการระบาดเพียงบางจังหวัด เช่น จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดเชียงใหม่ (Manpratum et al., 2017; Apiwong et al., 2018)

จากข้อมูลทีกล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *H. mehrai* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีการทางอณูชีววิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว โดยนำข้อมูลที่ได้มาจัดทำแผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *H. mehrai* ในพื้นที่ เพื่อเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลเกี่ยวกับการระบาดของพยาธิใบไม้ในจังหวัดสระแก้วให้เป็นปัจจุบัน และนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผน ควบคุม ป้องกันและดำเนินการจัดการกับการระบาดของพยาธิใบไม้ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. ตรวจสอบค่าความชุกของการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว
2. ระบุชนิดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการทางอนุชีววิทยาสำหรับระบุชนิดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียว
3. จัดทำแผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

ความสำคัญของงานวิจัย

การศึกษาสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ในจังหวัดสระแก้ว ทำให้ทราบถึงค่าความชุกและชนิดของพยาธิใบไม้ในพื้นที่ โดยจำแนกจากลักษณะสัณฐานวิทยาและวิธีการทางอนุชีววิทยา ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลที่ต้องการและเป็นปัจจุบัน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนควบคุม ป้องกัน ติดตาม และเฝ้าระวังการติดพยาธิใบไม้เชิงพื้นที่อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวางแผนควบคุม ป้องกัน ติดตามและเฝ้าระวังการระบาดของพยาธิใบไม้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป
2. สามารถจำแนกตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวและพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการทางอนุชีววิทยา สำหรับระบุชนิดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ขอบเขตของการวิจัย

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียว 50 ตัวอย่างต่อ 1 ชนิดต่อ 1 จุดเก็บตัวอย่าง ครอบคลุมทั้ง 9 อำเภอของจังหวัดสระแก้ว ระหว่างเดือนธันวาคม 2561 ถึง เดือนธันวาคม 2562 หลังจากนั้นตรวจการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ด้วยวิธีการทุบ (crushing) และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับวิธีการทางอนุชีววิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ที่พบ เพื่อระบุชนิดของพยาธิใบไม้และจัดทำแผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในพื้นที่

สมมติฐานของการวิจัย

จังหวัดสระแก้วมีแหล่งน้ำกระจายทั่วจังหวัดและมีรายงานการกระจายตัวของไฮสตรัทของพยาธิใบไม้หลายชนิด จึงทำให้มีโอกาสเกิดการระบาดของพยาธิใบไม้ในพื้นที่ ประกอบกับพยาธิใบไม้หลายชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ทำให้ต้องใช้วิธีการทางอนุชีววิทยา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุชนิดให้มีความถูกต้องและแม่นยำ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปและวงชีวิตของพยาธิใบไม้

- ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้
- ลักษณะทางสรีรวิทยาของพยาธิใบไม้
- วงชีวิตของพยาธิใบไม้
- พยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *H. mehrari*

2. ตัวอ่อนพยาธิใบไม้

- ลักษณะทั่วไปของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย
- ลักษณะทั่วไปของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

3. การระบุชนิดของพยาธิ

- การระบุชนิดของพยาธิโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
- การระบุชนิดของพยาธิโดยใช้วิธีการทางอณูชีววิทยา

4. ลักษณะทั่วไปของหอยฝาเดียว

- ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหอยฝาเดียว
- การติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียว

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

- การจัดจำแนกพยาธิใบไม้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการทางอณูชีววิทยา
- การศึกษาระบาดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียว

1. ลักษณะทั่วไปและวงชีวิตของพยาธิใบไม้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ (เบญจวรรณ ปีตาสวัสดิ์, 2558)

พยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยจะมีรูปร่างยาวรีหรือเป็นรูปไข่ ลักษณะสมมาตรด้านซ้ายและขวา (bilateral symmetry) ทางด้านหน้าของลำตัวมีลักษณะยาวเรียวและบานออกทางด้านท้าย ลำตัวแบน (dorsoventrally flattened) ไม่มีลักษณะเป็นข้อปล้อง ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายใบไม้จึงมีชื่อสามัญว่าพยาธิใบไม้ มีขนาดแตกต่างกันตามชนิดของพยาธิ เช่น พยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *Fasciolopsis buski* มีขนาดลำตัวยาว 20–75 มิลลิเมตร ในขณะที่พยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด เช่น *H. mehrari* มีขนาดลำตัวยาว 0.22–0.56 มิลลิเมตร *Ha. taichui* มีขนาดลำตัวยาว

0.43–1.18 มิลลิเมตร และ *Ha. pumilio* มีขนาดลำตัวยาว 0.29–0.43 มิลลิเมตร และในพยาธิกลุ่มนี้จะมีอวัยวะที่ช่วยในการเกาะติดโฮสต์ (attachment organ) ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงของกล้ามเนื้อที่นูนขึ้นมา มีลักษณะทรงกลมคล้ายรูปถ้วยหรือจาน เรียกว่า ซักเกอร์ (sucker) พยาธิใบไม้ส่วนใหญ่มีซักเกอร์ 2 ชนิด คือ ออรัลซักเกอร์ (oral sucker) อยู่บริเวณส่วนหัวล้อมรอบช่องปากที่ต่อกับทางเดินอาหารภายในลำตัว และเวนทรัลซักเกอร์ (ventral sucker) มักมีขนาดใหญ่กว่าออรัลซักเกอร์ อยู่บริเวณด้านท้องของพยาธิ โดยพยาธิใบไม้บางชนิด เช่น *Heterophyes heterophyes* อาจมีซักเกอร์อีก 1 ชนิดคือ เจนนิทาล ซักเกอร์ (genital sucker) อยู่ล้อมรอบรูเปิดของระบบสืบพันธุ์ พยาธิใบไม้เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีช่องว่างในลำตัว (acoelomate) โดยจะมีเนื้อเยื่อพาเรงคิมา (parenchyma) ที่แทรกอยู่ตลอดลำตัว ทำหน้าที่ยึดและค้ำจุนอวัยวะต่าง ๆ ให้สามารถคงรูปร่างและตำแหน่งอยู่ได้

ลักษณะทางสรีรวิทยาของพยาธิใบไม้ (เบญจวรรณ ปีตาสวัสดิ์, 2558)

พยาธิใบไม้จะมีอวัยวะที่ทำงานเชื่อมโยงเป็นระบบต่าง ๆ เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ประกอบไปด้วย ระบบผนังลำตัวและกล้ามเนื้อ ระบบทางเดินอาหาร ระบบขับถ่าย ระบบประสาท และระบบสืบพันธุ์

ระบบผนังลำตัวและกล้ามเนื้อ (tegument and muscular system)

พยาธิใบไม้มีผนังลำตัวที่ประกอบไปด้วยโครงสร้างของเซลล์ที่มีความยืดหยุ่นและทนต่อสภาพแวดล้อม มีหน้าที่ป้องกันอันตราย รับความรู้สึก แลกเปลี่ยนสาร รวมถึงสร้างและหลั่งสารต่าง ๆ ผนังลำตัวแบ่งออกเป็น 2 ส่วนโดยผนังชั้นนอกอาจมีปุ่มหรือหนามนูนขึ้นมา ในขณะที่ผนังชั้นในมีชั้นกล้ามเนื้อประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อเรียงตัวในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อวง (circular muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่อยู่ชั้นนอกสุด กล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle) เป็นชั้นกล้ามเนื้อที่เรียงตัวตามแนวยาวที่ทอดจากทางด้านหัวไปยังด้านหลัง กล้ามเนื้อแนวทแยง (oblique muscle) เป็นชั้นกล้ามเนื้อที่เรียงตัวตามแนวทแยงอยู่บริเวณด้านข้างของลำตัว และสุดท้ายจะเป็นกล้ามเนื้อที่ยึดบริเวณส่วนหลังกับส่วนท้อง นอกจากนี้ยังมีเส้นใยกล้ามเนื้อที่ทำงานร่วมกับอวัยวะต่าง ๆ เช่น ทางเดินอาหาร อวัยวะเกาะติด อวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเคลื่อนไหวได้หลายทิศทาง

ระบบทางเดินอาหาร (alimentary system)

พยาธิใบไม้มีระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างผนังลำตัวและท่อทางเดินอาหารที่ประกอบด้วย ปากที่อยู่บริเวณส่วนหัวและล้อมรอบด้วยออรัลซักเกอร์ ถัดต่อมาเป็น ช่องปาก คอหอย หลอดอาหาร และลำไส้ที่ส่วนปลายสุดจะตันไม่มีช่องทวารเปิดออกภายนอกร่างกาย ดังนั้นพยาธิใบไม้จึงมีระบบทางเดินอาหารไม่สมบูรณ์ (incomplete

digestion) โดยสารอาหารที่ได้จากการย่อยภายในทางเดินอาหารจะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์บุผนังลำไส้ ในขณะที่ของเสียที่เหลือจะขับออก (egestion) ทางปาก

ระบบขับถ่าย (excretory system or osmoregulatory system)

พยาธิใบไม้มีระบบขับถ่ายที่ประกอบด้วย เฟลมเซลล์ (flame cell) ท่อขับถ่ายย่อย (excretory capillary) ที่รวบรวม (collecting tubule) กระเพาะขับถ่ายของเสีย (excretory bladder) และช่องสำหรับขับถ่าย (excretory pore) ที่อยู่บริเวณส่วนปลายสุดของลำตัว ซึ่งทำหน้าที่ขับถ่ายของเสียและควบคุมการปรับสภาวะของน้ำและสารเคมีภายในร่างกายให้สมดุล (osmoregulation)

ระบบประสาท (nervous system)

พยาธิใบไม้มีระบบประสาทไม่ซับซ้อนและมีลักษณะสมมาตรด้านซ้ายและขวา ประกอบด้วย ปมประสาทส่วนหัว (cephalic ganglion) 1 คู่ เส้นประสาทตามยาว (longitudinal nerve) 3 คู่ และมีเส้นประสาทตามขวาง (transverse commissure nerve) ที่เชื่อมระหว่างเส้นประสาททั้ง 3 คู่ในลักษณะเป็นวงแหวนตามแนวขวางของลำตัวอีกจำนวนมาก โดยมีปลายประสาทไปสู่อวัยวะต่าง ๆ เช่น อวัยวะเกาะติด ทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ ผนังลำตัว พยาธิใบไม้บางชนิดยังมีปมประสาทพิเศษ (special ganglion) บริเวณโครงสร้างสืบพันธุ์ และมีปลายประสาทที่ไวต่อแสงอยู่บริเวณส่วนหน้าของลำตัว

ระบบสืบพันธุ์ (reproductive system)

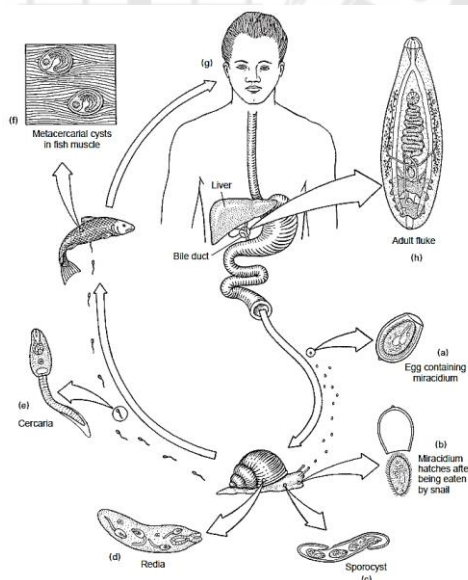
พยาธิใบไม้มีระบบสืบพันธุ์ที่เจริญพัฒนาดีและสมบูรณ์ พยาธิใบไม้ส่วนใหญ่มี 2 เพศในตัวเดียวกัน (monoecious) หรือเรียกว่ากะเทย (hermaphrodite) ยกเว้นพยาธิใบไม้เลือดมีเพศผู้และเพศเมียแยกกันคนละตัว (dioecious)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ประกอบด้วย อัณฑะ (testes) 2 ก้อน และโครงสร้างอื่น ๆ ได้แก่ วาส แอฟเฟอเรนส์ (vas efferens) ท่อนำอสุจิ (vas deferens) ถุงเซอรัล (cirrus sac) ถุงผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal vesicle) ต่อมลูกหมาก (prostate glands) และท่อปล่อยอสุจิ (ejaculatory duct) ที่เปิดสู่ช่องเปิดร่วมของระบบสืบพันธุ์ (genital pore) ในพยาธิใบไม้บางชนิด เช่น พยาธิใบไม้เลือดสกุล *Schistosoma* มีอัณฑะมากกว่า 2 ก้อน ในขณะที่พยาธิใบไม้ลำไส้สกุล *Haplorchis* และ *Haplorchoides* มีอัณฑะเพียงก้อนเดียว

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ประกอบด้วย รังไข่ (ovary) และโครงสร้างอื่น ๆ ได้แก่ ท่อนำไข่ (oviduct) บริเวณที่รับอสุจิ (seminal receptacle) ต่อมวิเทลลิน (vitelline glands) อนุไทป์ (ootype) ต่อมเมห์ลิส (Mehlis' glands) และมดลูก (uterus) ส่วนปลายสุดของท่อนำไข่เป็นกล้ามเนื้อแข็งแรงที่เปิดออกสู่ภายนอกทางช่องเปิดร่วมของระบบสืบพันธุ์

วงชีวิตของพยาธิใบไม้ (Robert & Janovy, 2000)

วงชีวิตของพยาธิใบไม้มีรูปแบบที่จำเพาะไปตามชนิดของพยาธิ แต่รูปแบบที่พบได้ทั่วไป คือ หลังจากตัวเต็มวัยปล่อยไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (fertilized egg) ออกมาทางรูเปิดมดลูก (uterine pore) พร้อมกับอุจจาระ จากนั้นเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมจะฟักตัวเป็นตัวอ่อนพยาธิระยะไมราซิเดียม (miracidium) ซึ่งมีซิเลียปกคลุมผิวลำตัวอาศัยในน้ำ ทันทีที่ออกจากเปลือกตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมจะเคลื่อนที่และไชเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นหอยฝาเดียว น้ำจืด เข้าไปอยู่ในฮีโมคิล (hemocoel) ของหอย ระยะไมราซิเดียมจะมีการพัฒนาเป็นระยะถัดไปซึ่งมีลักษณะเป็นถุง เรียกว่า ระยะสปอโรซิสต์ (sporocyst) ที่ภายในบรรจุเซลล์สืบพันธุ์หลายก้อน (germ ball) โดยแต่ละก้อนจะมีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะถัดไป ที่เรียกว่า ริเดีย (redia) ซึ่งโครงสร้างภายในคล้ายกับสปอโรซิสต์ แต่ละเซลล์สืบพันธุ์จะมีการเจริญไปเป็นระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ภายในริเดีย เซอร์คาเรียเป็นตัวอ่อนที่มีทางเดินอาหาร คือ ชักเกอร์เพื่อออกจากหอยและว่ายน้ำเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง เช่น ปลาหรือพืชน้ำ หลังจากนั้นระยะเซอร์คาเรียจะเข้าเกาะและสลัดหางทิ้งเพื่อที่จะเข้าสู่ระยะฟักกลายเป็นระยะเมตาเซอร์คาเรีย เมื่อโฮสต์เฉพาะที่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกินโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองเข้าไป ระยะเมตาเซอร์คาเรียจะออกจากซิสต์ที่ห่อหุ้ม และเริ่มเคลื่อนย้ายไปบริเวณจำเพาะเพื่อเจริญไปเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (ภาพประกอบ 1)



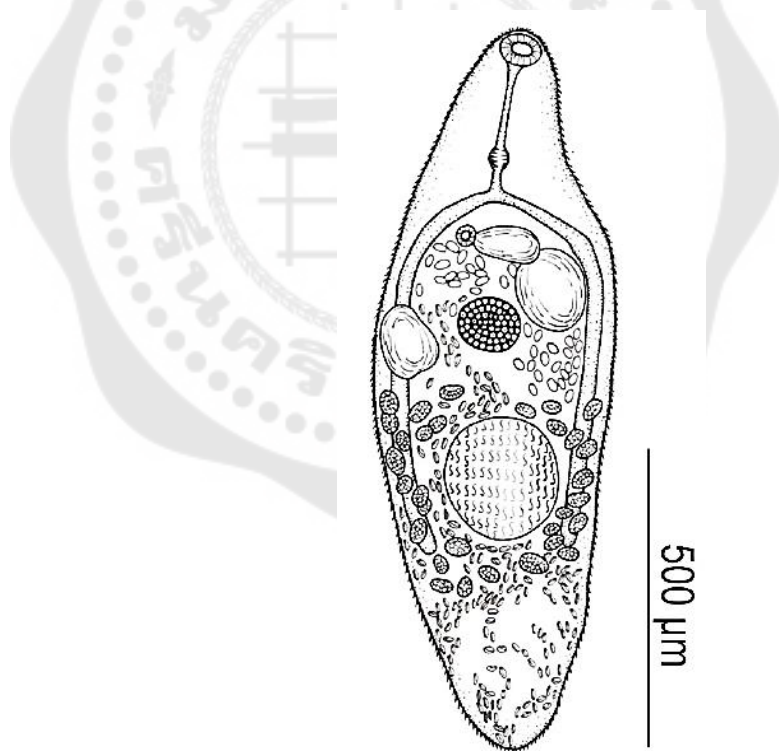
ภาพประกอบ 1 วงชีวิตโดยทั่วไปของพยาธิใบไม้

ที่มา : Robert & Janovy (2000)

พยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *H. mehrai*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ลำไส้ *H. mehrai*

เป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 0.12–0.28 x 0.46–0.79 มิลลิเมตร ผิวมีหนามคลุมทั่วลำตัว ออร์ลซีกเกอร์อยู่เกือบปลายสุดทางด้านหน้าของลำตัวขนาดประมาณ 41 x 46 ไมโครเมตร หลอดอาหาร (esophagus) ก่อถึงคอหอย (pharynx) ยาวประมาณ 139 ไมโครเมตร คอหอยค่อนข้างกลมขนาดประมาณ 31 x 35 ไมโครเมตร หลอดอาหารยาวประมาณ 44 ไมโครเมตร ลำไส้แยกเป็น 2 ทาง (bifurcate) ส่วนเวนทรัลซีกเกอร์ อยู่ใกล้กับทางแยกของลำไส้ กลางตัวมีหนามเรียงตัวเป็น 3 กลุ่ม อันตะมีอันเดี่ยวรูปร่างกลมอยู่กึ่งกลางของลำตัวขนาดประมาณ 46 x 51 ไมโครเมตร รังไข่มีจำนวนมากและมีลักษณะกลมขนาดประมาณ 27 x 28 ไมโครเมตร อยู่ส่วนหน้าของอันตะ ภาวะปะสสาวะอยู่ตรงส่วนท้ายของอันตะ (Apiwong et al., 2018) (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai*

ที่มา : Apiwong et al. (2018)

การระบาดของพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *H. mehrari* ในประเทศไทย

ในประเทศไทยพบรายงานการระบาดของพยาธิชนิดนี้ 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น โดย Manpratum et al. (2017) ศึกษาการระบาดของพยาธิชนิด *H. mehrari* ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น พบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดชนิด *Melanoides tuberculata* พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) และพบระยะตัวเต็มวัยในปลาน้ำจืดชนิด *Mystus nemurus* ต่อมาเป็นจังหวัดเชียงใหม่โดย Apiwong et al. (2018) ทำการศึกษาค่าความชุกของการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* พื้นที่อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ในปลา 2 ชนิด ได้แก่ *Cyclocheilichthys repasson* และ *Barbonymus schwanenfeldii* พบว่า มีค่าความชุกการติดพยาธิในปลาแต่ละชนิดคิดเป็นร้อยละ 100 และ 73.33 ตามลำดับ

2. ตัวอ่อนพยาธิใบไม้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย

ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียเป็นระยะสุดท้ายของพยาธิใบไม้ที่อยู่ในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง มีการพัฒนามาจากระยะสปอโรซิสต์และเจริญตามลำดับ โดยจะมีลำตัวรี อาจมีหางอยู่ที่บริเวณท้ายของลำตัว มีออร์ัลซัคเกอร์ทางด้านหน้าของลำตัวที่เป็นอวัยวะที่ใช้ในการยึดเกาะกับโฮสต์ บริเวณกลางลำตัวจะมีเวนทรัลซัคเกอร์ เป็นอวัยวะยึดเกาะส่วนท้อง ในบางชนิดอาจมีจุดตา (eyespot) ลักษณะของลำไส้ภายในลำตัวแยกออกเป็น 2 ทาง มีต่อมพินิเทรชัน (penetration gland) ที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการเจาะเข้าสู่โฮสต์ และมีต่อมซิสโทจีนัส (cystogenous gland) ที่ทำหน้าที่สร้างซิสต์ (cyst) ในการพัฒนาเป็นระยะเมตาเซอร์คาเรียต่อไป (พีรพล รัตนไทย, 2553)

ลักษณะของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียมีลักษณะที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบสามารถพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัยได้แตกต่างกัน โดยสามารถจำแนกเป็นลักษณะต่าง ๆ ได้ดัง ตาราง 1 และ ภาพประกอบ 3 (Schell, 1970; Malek & Cheng, 1974)

ตาราง 1 เปรียบเทียบเซอ์คาร์เรียแต่ละรูปแบบ

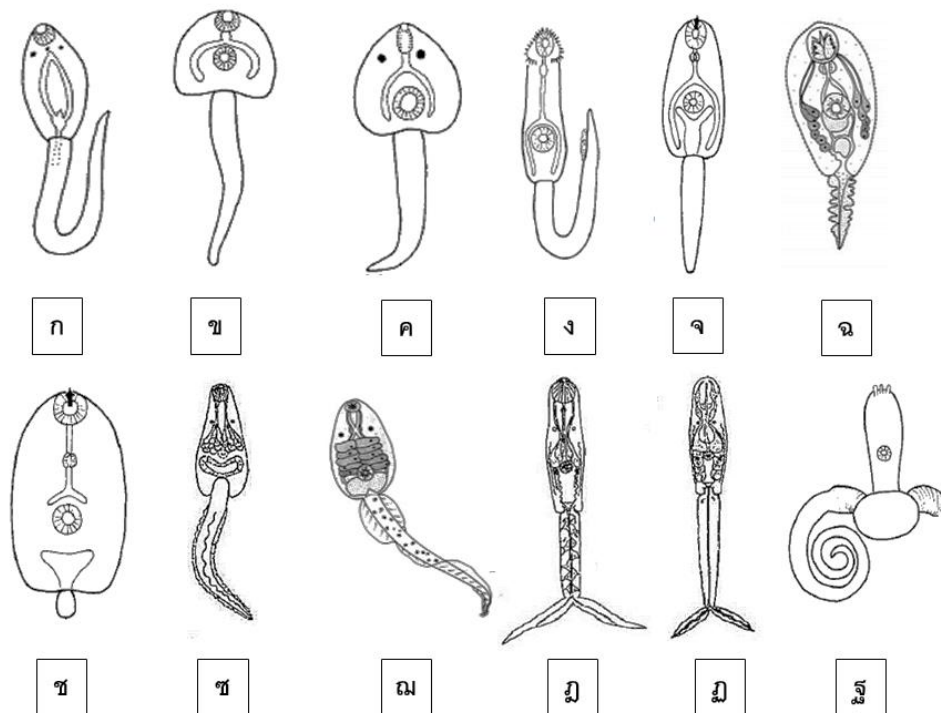
รูปแบบของเซอ์คาร์เรีย	ลักษณะเด่น	วงศ์ของพยาธิที่จะพัฒนาต่อไป
monostome cercariae	มีขนาดใหญ่และมีกล้ามเนื้อล้อมรอบ ออรัลซัคเกอร์ไม่มีเวนทรัลซัคเกอร์ อาจมี 2 หรือ 3 จุดตา มีเม็ดสี (pigment) อยู่ส่วนหัวของลำตัว มีระบบขับถ่ายแบบสทีโนสโตเมต (stenostomate) มีอวัยวะพิเศษอยู่บริเวณด้านท้ายของลำตัว เรียกว่า adhesive organ มีต่อมซิสโทจีนัสในลำตัว	Notocotyloidea
gymnocephalus cercariae	มีลำตัวกลม มีต่อมซิสโทจีนัส ทางตรง ธรรมดา ไม่มีครีบหาง (fin fold) เคลื่อนที่ช้า อาศัยบริเวณก้นแหล่งน้ำ	Fasciolidae
amphistome cercariae	มีเวนทรัลซัคเกอร์ขนาดใหญ่อยู่ส่วนท้ายของลำตัว หางสั้นและเล็ก มีจุดตา มีขนาดใหญ่ ระบบขับถ่ายแบบสทีโนสโตเมต	Paramphistomatoidea
echinostome cercariae	มีคอลลาร์ สไปาย (collar spine) รอบ ออรัลซัคเกอร์ มีซีกา (caeca) ที่ยาว มีหางรูปทรงกระบอก มีระบบขับถ่ายแบบสทีโนสโตเมต มีรูเปิดออกด้านข้างใกล้ฐานส่วนต้นของหาง	Echinostomatoidea

ตาราง 1 (ต่อ)

รูปแบบของเซอ์คาเรีย	ลักษณะเด่น	วงศ์ของพยาธิที่จะพัฒนาต่อไป
xiphidiocercariae	มีเข็ม (stylet) อยู่ในออร์ลซั๊กเกอร์ ภายในลำตัวมีต่อมพินิเทรชัน และต่อมมิวคอยด์ (mucoid gland) เจริญเติบโตสมบูรณ์ในบางชนิด มีระบบขับถ่ายแบบมีไซสโตเมต (mesostomate)	Plagiorchiodea
virgulate cercariae	มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ xiphidiocercariae แต่จะมีเวอ์กูลา (virgula organ) บนออร์ลซั๊กเกอร์ ที่มีลักษณะคล้ายปีกผีเสื้อ	Lecithodendriidae
microcercous cercariae	เป็นเซอ์คาเรียที่มีหางสั้นและบริเวณหางจะมีลักษณะเป็นปุ่ม (knoblike) หรือรูปร่างเป็นถ้วย (cupshape) บริเวณส่วนลำตัวจะมีเข็มอยู่ในออร์ลซั๊กเกอร์และมีเวนทริลซั๊กเกอร์ขนาดใหญ่กว่า	Troglodytidae
pleurophocercous cercariae	มีลำตัวกลมรี ภายในลำตัวพบต่อมพินิเทรชันและต่อมซิสโทจีนัส มีเวนทริลซั๊กเกอร์ที่ไม่ชัดเจน จุดตามีเม็ดสี ส่วนหางมีครีบตรงกลางสันหาง (dorso-ventral fin fold) มีระบบขับถ่ายแบบมีไซสโตเมต	Opisthorchiodea

ตาราง 1 (ต่อ)

รูปแบบของ เซอ์คาเรีย	ลักษณะเด่น	วงศ์ของพยาธิที่จะ พัฒนาต่อไป
parapleuropho cercous cercariae	มีลำตัวกลมรี ภายในลำตัวพบต่อมพินิเทรชันและ ต่อมซิสโทจีนัส มีเวนทรัลซีกเกอร์ที่ไม่ชัดเจน จุด ตามีเมดลีส พบครีบริบตรงกลางสันหาง และครีบริบหาง ที่ ง ด้ ำ น ี่ ำ ง (lateral-fin fold) มีระบบขับถ่ายแบบมีโซสโตเมต	Heterophyidae
longifurcate furcocercous cercariae	ปลายหางแฉกยาวกว่าส่วนต้นหาง ลำตัวกลมรีมี ออร์ลซีกเกอร์ คอหอย ทางเดินอาหารสมบูรณ์ มี เวนทรัลซีกเกอร์ และต่อมพินิเทรชัน ภายในลำตัว จุดตามีเมดลีสหรือไม่มี มีครีบริบหางที่ปลายหางแฉก มีระบบขับถ่ายแบบมีโซสโตเมต	Strigeoidea
brevifurcate furcocercous cercariae	ปลายหางแฉกจะสั้นกว่าส่วนต้นหาง ลำตัวกลมรี มีออร์ลซีกเกอร์เปลี่ยนแปลงเป็นต่อมพินิเทรชัน ไม่มีคอหอยและซีกา มีเวนทรัลซีกเกอร์ มีต่อมพินิ เทรชัน 2 ชนิด บางชนิดไม่มีจุดตาและ ครีบริบหาง มีระบบขับถ่ายแบบมีโซสโตเมตมีรูเปิด ที่ปลายหางแฉก	Schistosomatoidea
gasterostome cercariae	มีปากอยู่ตรงกลางของส่วนลำตัว ลำไส้มีรูปร่าง คล้ายถุง มีหางสั้น แยกออกเป็นสองแฉก สมมาตรกันแต่จะมีลักษณะที่แตกต่างจากพยาธิ กลุ่ม furcocercous cercariae โดยพยาธิตัวเต็ม วัยจะทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ลำไส้ของปลา	Bucephalidae



ภาพประกอบ 3 ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอรรีคาเรีย

- ก. monostome cercariae ข. gymnocephalus cercariae ค. amphistome cercariae
 ง. echinostome cercariae จ. xiphidiocercariae ฉ. virgulate cercariae
 ช. microcercous cercariae ซ. pleurophocercous cercariae
 ฅ. parapleurocercous cercariae ฌ. longifurcate furcocercous cercariae
 ญ. brevifurcate furcocercous cercariae ฎ. gasterostome cercariae

ที่มา : Schell (1970); Robert & Janovy (2000); Anucherngchai, Tejangkura, & Chontanarth (2016)

ลักษณะทั่วไปของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียเป็นระยะติดต่อก่อน (infective stage) ของพยาธิใบไม้ที่อยู่ในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง เช่น หอยฝาเดียว ปลาน้ำจืด แมลง รวมทั้งพืชน้ำ โดยจะมีลักษณะกลมหรือรี มีผนังซีสต์ห่อหุ้มร่างกายไว้ ตัวอ่อนภายในซีสต์มีกระเพาะขับถ่ายของเสีย ออร์ลซั๊กเกอร์ และเวนทริลซั๊กเกอร์ โดยตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิแต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน (Pande & Shukla, 1976; Pearson & Ow-Yang, 1982; Scholz, Ditrich, & Giboda, 1991; Sohn et al., 2009)

H. mehrai

ถุงซีสต์มีลักษณะใสและโปร่งแสงรูปไข่ด้านยาวมีขนาด 202–252 ไมโครเมตร ด้านกว้างมีขนาด 180–245 ไมโครเมตร มีผนังหุ้ม 2 ชั้น มีหนามขนาดเล็กปกคลุมรอบลำตัวตลอดอาหารก่อนถึงคอหอยยาว มีหนามขนาดเล็ก 3 กลุ่มบริเวณด้านท้อง มีกระเพาะขับถ่ายของเสียสีน้ำตาลอยู่บริเวณด้านท้ายของร่างกาย มีอัตรหะ 1 ก้อน (ภาพประกอบ 4)

Ha. taichui

ถุงซีสต์มีลักษณะใสและโปร่งแสงรูปไข่ ด้านยาวมีขนาด 188–220 ไมโครเมตร ด้านกว้างมีขนาด 155–185 ไมโครเมตร มีผนังหุ้ม 2 ชั้น ช่องเปิดร่วมของระบบสืบพันธุ์มีลักษณะเป็นรูปถุงมือเบสบอล ด้านท้องมีหนามขนาดเล็กประมาณ 13–16 อันเรียกว่า อะเซ็ปทาบูลาร์ สไปน (acetabular spine) เรียงตัวเป็นรูปพัด (fan-shape) มีกระเพาะขับถ่ายของเสียเป็นรูปตัววีขนาดใหญ่อยู่บริเวณด้านท้ายของร่างกาย มีอัตรหะ 1 ก้อน (ภาพประกอบ 4)

Ha. pumilio

ถุงซีสต์มีลักษณะใสและโปร่งแสงรูปไข่ ด้านยาวมีขนาด 155–188 ไมโครเมตร ด้านกว้างมีขนาด 138–163 ไมโครเมตร มีหนามขนาดเล็กปกคลุมรอบลำตัว มีคอหอย มีหนามขนาดเล็ก 36–42 อันเรียงเป็น 2 แถว รอบช่องเปิดร่วมของระบบสืบพันธุ์เรียงตัวเป็นรูปเลขสามกลับด้าน มีกระเพาะขับถ่ายของเสียเป็นรูปตัวโอขนาดใหญ่อยู่บริเวณด้านท้ายของร่างกาย มีอัตรหะ 1 ก้อน (ภาพประกอบ 4)

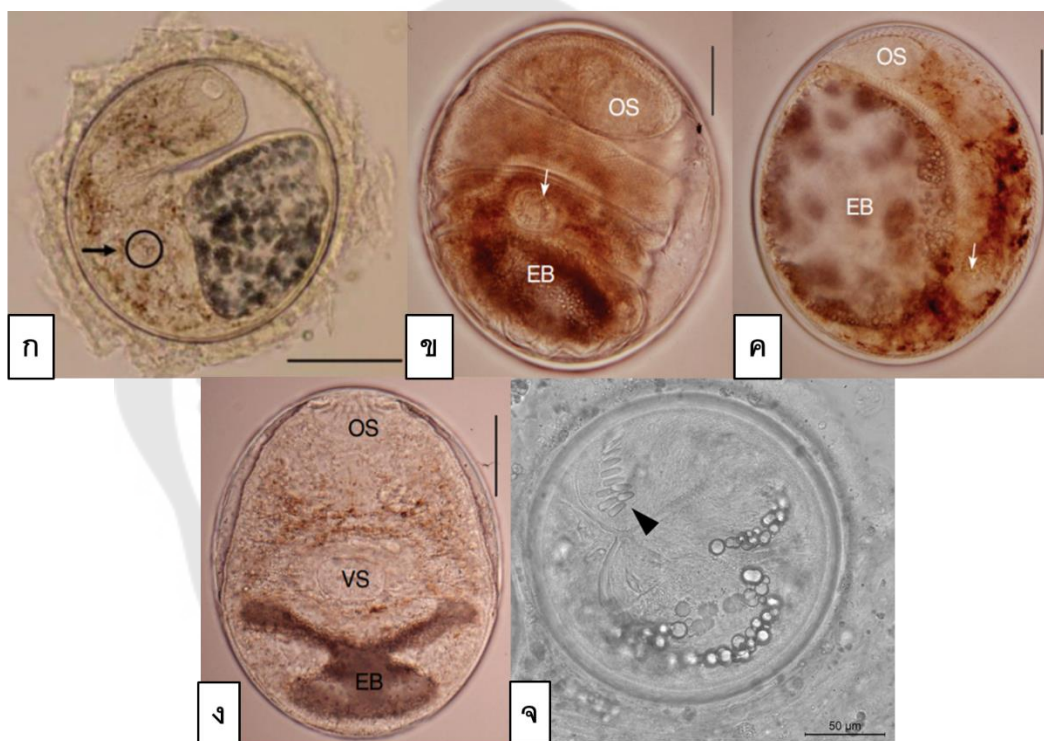
Centrocestus formosanus

ถุงซีสต์มีลักษณะใสและโปร่งแสงรูปไข่ ด้านยาวมีขนาด 173–233 ไมโครเมตร ด้านกว้างมีขนาดประมาณ 135–178 ไมโครเมตร มีออร์ลซั๊กเกอร์และหนามขนาดใหญ่อยู่ด้านบนของลำตัวชัดเจน มีคอหอยยาว มีหนามขนาดเล็กกรอบออร์ลซั๊กเกอร์ จำนวน 32 อัน

เรียงเป็น 2 แถว เรียกว่า เซอร์คัมอรัล สไปน (circumoral spine) มีกระเพาะขับถ่ายของเสีย เป็นรูปตัวเอ็กซ์ (x-shape) อยู่บริเวณด้านท้ายของร่างกาย (ภาพประกอบ 4)

E. revolutum

มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 170–190 ไมโครเมตร มีผนังไต 2 ชั้น โดยส่วนมากจะมีคอลลาร์ สไปน ที่เป็นหนามอยู่ตรงบริเวณส่วนหัวของพยาธิ 37 อัน ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของพยาธิในวงศ์ Echinostomatidae บริเวณลำตัวพบ excretory granule เรียงตัวเป็นแนวยาวทั้งสองข้าง (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 4 ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

ก. *H. mehrai* ข. *Ha. taichui* ค. *Ha. pumilio* ง. *C. formosanus* จ. *E. revolutum*

ที่มา : Sohn et al. (2009); Manpratum et al. (2017) และ Anucherngchai et al. (2019)

3. การระบุชนิดของพยาธิ

การระบุชนิดพยาธิโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะสังเกตได้ว่า ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ทั้งระยะเซอร์คาเรียและระยะเมตาเซอร์คาเรียแต่ละรูปแบบจะเจริญเป็นพยาธิใบไม้ตัวเต็มวัยต่างชนิดกัน ทำให้สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ได้ ตัวอย่างเช่น Devkota et al. (2011) ได้ศึกษาการติดพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืด บริเวณจังหวัดจันทัน (Chitwan) ประเทศเนปาล ระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนตุลาคม ปีค.ศ. 2008 โดยทำการศึกษาตัวอย่างหอยน้ำจืดจำนวน 1,448 ตัว จำแนกได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Bellamyia bengalensis*, *Gabbia orcula*, *Gyraulius euphraticus*, *Indoplanorbis exustus*, *Lymnaea luteola*, *Melanoides tuberculata*, *Pila globosa*, *Thiara granifera* และ *T. lineate* หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจการติดตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียด้วยวิธี shedding พบว่ามีค่าความชุกรวมเท่ากับร้อยละ 4.3 หรือคิดเป็นจำนวน 62 ตัวจากทั้งหมด ซึ่งสามารถจำแนกตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้เป็น 6 รูปแบบ ได้แก่ amphistome, longifurcate – pharyngeate, clinostome, gymnocephalus, brevifurcate – apharyngeate และ xiphidiocercaria ต่อมา Luka & Mbaya (2015) ได้ตรวจสอบการกระจายตัวของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยฝาเดียวในมลรัฐบอร์โน (Borno) ประเทศไนจีเรีย โดยเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวได้จำนวน 1,700 ตัว 3 ชนิด คือ *Bulinus forskalli*, *B. globosus* และ *Ly. natalensis* และนำมาศึกษาหาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียด้วยวิธีการ shedding พบว่ามีหอยที่ติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียร้อยละ 0.94 หรือ 16 ตัว ซึ่งจำแนกชนิดของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบมีการติดตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียแบบ bifurcate cercaria ที่จะเจริญเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *S. haematobium* และ distome cercaria ที่จะเจริญเป็นพยาธิใบไม้ในสกุล *Fasciola* ทำให้ทราบถึงความเป็นไปได้ที่ประชาชนในบริเวณนี้ติดพยาธิทั้งสองชนิดได้เนื่องจากมีหอยฝาเดียวที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิทั้งสองชนิดนี้

ในส่วนของประเทศไทยมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียอย่างต่อเนื่องโดย Yutemsuk et al. (2017) ตรวจสอบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Clea* จากอ่างเก็บน้ำ 11 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่ามีค่าความชุกเฉลี่ยในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้เป็นร้อยละ 1.92 ซึ่งพบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ cotylomicrocercous cercariae, furcocercous cercariae และ cercariaeum cercariae มีค่าความชุกคิดเป็นร้อยละ 0.96, 0.64 และ 0.32 ตามลำดับ ต่อมา Chantima, Suk-Ueng, & Kampan (2018) ได้ทำการศึกษาตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวน้ำจืดบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมในอำเภอแม่

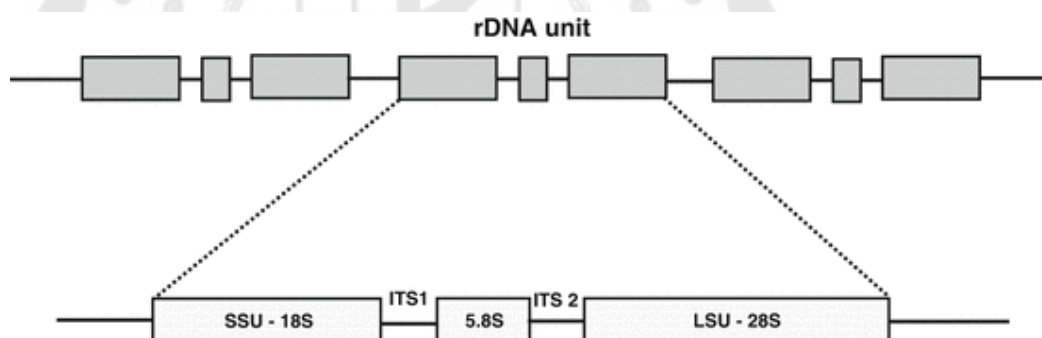
ลาว โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 14 จุดในช่วงเดือนสิงหาคม ปีค.ศ. 2016 ถึงเดือนตุลาคม ปีค.ศ. 2017 พบหอยที่ติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bithynia siamensis siamensis*, *Filopaludina sumatrensis polygramma* และ *M. tuberculata* และพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียทั้งหมด 7 รูปแบบ ได้แก่ echinostome, monostome, gymnocephalous, virgulate, parapleurolophocercous, pleurolophocercous และ megalurous cercariae โดยเซอร์คาเรียรูปแบบ parapleurolophocercous มีค่าความชุกสูงที่สุดคือ ร้อยละ 41.2 ประกอบกับ Haruay & Piratae (2019) ได้ศึกษาสถานการณ์การระบาดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยจากอ่างเก็บน้ำสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ในช่วงเดือนเมษายน ปีค.ศ. 2018 ถึงเดือนมิถุนายน ปีค.ศ. 2018 พบว่ามีค่าความชุกรวมในการติดพยาธิใบไม้เป็นร้อยละ 1.69 โดยพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียทั้งหมด 4 รูปแบบ ได้แก่ cercariaeum cercaria, virgulate cercaria, cotylomicrocercous cercaria และ furcocercous cercaria นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีการศึกษาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดเช่นกัน โดย Noikong et al. (2014) ได้รายงานค่าความชุกของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ลำไส้สกุล *Echinostoma* ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่จังหวัดลำปาง ซึ่งพบว่า หอยฝาเดียวชนิด *F. dorliaris* และ *F. martensi* มีค่าความชุกเฉลี่ยในการติดพยาธิใบไม้เป็นร้อยละ 40.89 และ 36.27 ตามลำดับ ต่อมา Chantima, Suk-Ueng, & Kampan (2018) ได้ทำการศึกษาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่อำเภอแม่ลาว จังหวัดเชียงรายพบว่าการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในสกุล *Echinostoma* โดยมีค่าความชุกเฉลี่ยเป็นร้อยละ 7.6 และมีความหนาแน่นเฉลี่ยเป็น 11 ต่อหอย 1 ตัว ซึ่งพบในหอย 3 สกุล ได้แก่ *Filopaludina*, *Bithynia* และ *Clea* ประกอบกับ Phalee, Phalee & Wongsawad (2018) ได้ทำการศึกษาการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้วงศ์ Thapariellidae ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย พบว่ามีค่าความชุกเฉลี่ยในการติดพยาธิใบไม้เป็นร้อยละ 22.3 และมีความหนาแน่นเฉลี่ยเป็น 17 ต่อหอย 1 ตัว โดยหอยฝาเดียวชนิด *F. martensi* พบว่ามีค่าความชุกสูงที่สุดเป็นร้อยละ 24

การระบุชนิดของพยาธิโดยใช้วิธีการทางอนุชีววิทยา

สังเกตได้ว่าการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการระบุชนิดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้เป็นวิธีที่นิยม เนื่องจากเป็นเพียงการพิจารณาลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของตัวอ่อนพยาธิใบไม้แต่ละชนิด (วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์, 2554) ทำให้สามารถระบุชนิดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้และนำไปสู่การตรวจสอบชนิดของพยาธิในระยะตัวเต็มวัยได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะทาง

สัณฐานวิทยาในการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญและต้องใช้ระยะเวลามากในการระบุชนิด อีกทั้งตัวอ่อนพยาธิใบไม้ของพยาธิบางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ทำให้ต้องหาวิธีการที่มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดมากขึ้น โดยวิธีการทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีที่สามารถยืนยันและมีความแม่นยำในการระบุชนิดของพยาธิระยะตัวเต็มวัยสูง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ ยังเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ยืนยันหลังจากทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียและเมตาเซอร์คาเรียเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ในการระบุชนิดเชิงโมเลกุลทางปรีดิคตินิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากนิวเคลียสและไม่โทคอนเดรีย ตัวอย่างเช่น 18S, 28S, ITS2, *cytochrome oxidase subunit 1 (CO1)* ซึ่งบริเวณ ITS2 เป็นบริเวณที่นิยมใช้สำหรับจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตระดับสปีชีส์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายในระดับชนิดที่เหมาะสม (Prasad et al., 2009; Prasad et al., 2011) โดยบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในนิวเคลียสจะเรียงเป็นชุดซ้ำ ๆ กันตาม (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียส

ซึ่งประกอบด้วยยีน 18S บริเวณ ITS1 ยีน 5.8S บริเวณ ITS2 และยีน 28S เรียงเป็นชุดซ้ำกัน

ที่มา : Krishnamoorthy et al. (2017)

การระบุชนิดของพยาธิใบไม้โดยใช้วิธีการทางอณูชีววิทยามีหลากหลายวิธี เช่น Chuboon & Wongsawad (2009) และ Wongsawad et al. (2013) ประยุกต์ใช้เทคนิค high annealing temperature random amplified - polymorphic DNA (HAT-RAPD) สำหรับระบุชนิดของพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ที่พบในหอยและปลาน้ำจืดของประเทศ พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ในการระบุชนิดของพยาธิได้หลายชนิด เช่น *Haplorchoides sp.*, *Ha. taichui*,

S. falcatus และ *C. caninus* โดยมีลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการนี้แตกต่างกันอย่างชัดเจน ต่อมา Apiwong et al. (2018) ได้ประยุกต์การสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน CO1 โดยพบว่าพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ทั้งระยะเมตาเซอร์คาเรียและระยะตัวเต็มวัยที่ได้จากปลาน้ำจืดถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งแยกออกจากกลุ่ม *Haplorchis* และ *Metagonimus* แบบ monophyletic แม้ว่าจะอยู่ในวงศ์ Heterophyidae เดียวกัน นอกจากนี้ Le et al. (2006) ได้พัฒนาเทคนิค multiplex polymerase chain reaction เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบและจำแนกความแตกต่างของพยาธิใบไม้ในตับชนิด *Clonorchis sinensis* และ *Opisthorchis viverrini* ในระยะไข่ เมตาเซอร์คาเรีย และตัวเต็มวัย โดยเลือกใช้บริเวณยีนไมโทคอนเดรียสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับระบุชนิดของพยาธิ สำหรับพยาธิใบไม้ในตับชนิด *C. sinensis* มีการใช้ยีน *NADH dehydrogenase subunit 2 (NAD2)* เป็น forward primer และยีน *NADH dehydrogenase subunit 1 (NAD1)* เป็น reverse primer ซึ่งมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 612 คู่เบส ในขณะที่พยาธิใบไม้ในตับชนิด *O. viverrini* ได้ใช้ยีน *NAD1* เป็น forward primer และยีน *TRNS1 (mitochondrially encoded tRNA serine 1)* เป็น reverse primer ซึ่งมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 1,357 คู่เบส เมื่อนำไปทดสอบจริงพบว่าสามารถระบุชนิดของ *C. sinensis* และ *O. viverrini* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของพยาธิทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดเพียง 0.39 ng/ μ l

เทคนิคการใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) เป็นอีกหนึ่งวิธีการในวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้สำหรับการระบุชนิดของพยาธิ เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่มีความซับซ้อนและใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว เช่น Parvathi et al. (2008) ได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะโดยใช้โปรแกรม Primer 3 สำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบพยาธิใบไม้ในตับชนิด *O. viverrini* ในปลาน้ำจืด โดยได้มีการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับพยาธิใบไม้ที่พบในปลา เช่น *Ha. taichui*, *C. formosanus* หรือพยาธิใบไม้ในตับที่มีความใกล้เคียงกับพยาธิชนิดนี้ เช่น *C. Sinensis* และ *O. felineus* ผลปรากฏว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *O. viverrini* ทั้งระยะตัวเต็มวัยและระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลา สำหรับในหอยฝาดเดียว นิยมใช้ไพรเมอร์จำเพาะเช่นกัน โดย Velusamy, Singh, & Raina (2004) ได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในตับชนิด *Fasciola gigantica* ในหอยน้ำจืดฝาดเดียวชนิด *L. auricularia* โดยได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากการใช้ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับพยาธิสกุล *Fasciola* โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *Fa. gigantica* และ

สามารถตรวจสอบจากเนื้อหอยที่พบการติดพยาธิใบไม้ในตับชนิดนี้ได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้ Cucher et al. (2006) ได้ใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน CO1 ในไมโทคอนเดรีย สำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในตับชนิด *Fa. hepatica* ในหอยน้ำจืดฝาเดียวชนิด *L. columella* และ *L. viatrix* โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะกับพยาธิใบไม้ในตับชนิด *Fa. hepatica* และไม่จับกับดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของหอยชนิด *L. columella* และ *L. viatrix* นอกจากนี้ ไพรเมอร์ยังมีความไวสูงโดยสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของพยาธิได้แม้จะมีดีเอ็นเอของพยาธิเพียง 100 พิโคกรัม

จากที่กล่าวไปข้างต้น วิธีการทางอณูชีววิทยาที่เลือกใช้จะวิเคราะห์สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการเลือกบริเวณของสารพันธุกรรมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ย่อมมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากยีนของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มจะมีบริเวณที่อนุรักษ์และบริเวณที่มีความแปรผันแตกต่างกันโดยมีสารพันธุกรรมหลายบริเวณที่นิยมนำมาใช้ระบุชนิดของพยาธิชนิดต่าง ๆ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีบริเวณอนุรักษ์และบริเวณที่มีความแปรผันที่เหมาะสม ดังตาราง 2

ตาราง 2 บริเวณของสารพันธุกรรมที่มีรายงานการใช้ระบุชนิดพยาธิ

บริเวณสารพันธุกรรมที่เลือกใช้/ยีน	ชนิดของพยาธิใบไม้	ผู้วิจัย
ITS1 - 5.8S - ITS2	<i>Fasciola</i> spp.	Mahami-Oskouei et al. (2011)
ITS2	<i>Fa. hepatica</i> , <i>Fascioloides magna</i> และ <i>Paramphistomum cervi</i>	Bazsalovicsová et al. (2010)
	<i>Fascioloides magna</i>	Pyziel, Demiaszkiewicz, & Kuligowska (2014)

ตาราง 2 (ต่อ)

บริเวณสารพันธุกรรมที่เลือกใช้/ยีน	ชนิดของพยาธิใบไม้	ผู้วิจัย
ITS2	<i>Ha. pumilio</i> และ	Van Van et al. (2009)
	<i>Ha. taichui</i>	
	<i>Fasciola</i> sp.	Prasad et al. (2009)
	<i>P. leydeni</i>	Sanabria, Moré, & Romero (2011)
18S	<i>H. pumilio</i> , <i>Ha. taichui</i> และ	Dzikowski et al. (2004)
	<i>Centrocestus</i> sp.	
	<i>Clonorchis sinensis</i> ,	Pyo et al. (2013)
	<i>Gymnophalloides seoi</i> ,	
	<i>Pygidiopsis summa</i> ,	
<i>Metagonimus yokogawai</i> และ		
<i>He. continua</i>		
	<i>Fa. hepatica</i> และ <i>Fa. gigantica</i>	Karimi (2008)
28S	<i>Ha. pumilio</i> และ <i>Ha. taichui</i>	Le et al. (2017)
	<i>C. formosanus</i> , <i>Ha. taichui</i> ,	Wongsawad et al. (2016)
	<i>Haplorchoides</i> sp. และ	
	<i>Stellantchasmus falcatus</i>	
28S และ 18S	<i>Austrobilharzia</i> sp.	Al-Kandari et al. (2012)

ตาราง 2 (ต่อ)

บริเวณสารพันธุกรรมที่เลือกใช้/ยีน	ชนิดของพยาธิใบไม้	ผู้วิจัย
mitochondrial genome	<i>O. viverrini</i> และ <i>C. sinensis</i>	Cai et al. (2012)
	<i>P. leydeni</i>	Ma et al. (2015)
CO1	<i>S. mansoni</i> , <i>S. rodhaini</i> , <i>S. intercalatum</i> , <i>S. haemotobium</i> , <i>S. mekongi</i> และ <i>S. japonicum</i>	Bowles, Blair, & McManus (1995)
	<i>O. felineus</i> และ <i>Metorchis bilis</i>	Pauly, Schuster, & Steuber (2003)
	<i>O. viverrini</i> และ <i>Ha. taichui</i>	Thaenkham, Visetsuk, & Waikagul (2007)
	<i>C. sinensis</i> , <i>Ha. pumilio</i> และ <i>Ha. taichui</i>	Van De & Le (2011)
	<i>Fa. gigantea</i>	Nguyen et al. (2012)
	<i>H. mehrai</i>	Apiwong et al. (2018)
	cytochrome b (CYTB)	<i>E. revolutum</i> <i>Fa. gigantea</i>
NAD1	<i>E. trivolvis</i> , <i>E. paraensei</i> , <i>E. caproni</i> และ <i>E. revolutum</i>	Morgan & Blair (1998)

ตาราง 2 (ต่อ)

บริเวณสารพันธุกรรมที่เลือกใช้/ยีน	ชนิดของพยาธิใบไม้	ผู้วิจัย
NAD1	<i>Fa. hepatica</i>	Morozova et al. (2004)
	<i>Fa. gigantica</i>	Nguyen et al. (2012)
	<i>S. mansoni</i>	Lu et al. (2016)
NADH dehydrogenase subunit 5 (NAD5)	<i>S. mansoni</i>	Lu et al. (2016)

4. ลักษณะทั่วไปของหอยฝาเดียว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหอยฝาเดียว

หอยฝาเดียวมีลักษณะ คือ ส่วนหัวที่เจริญและมีขนาด 1 - 2 คู่ มีตา 1 คู่ ส่วนหัวจะติดกับส่วนเท้าที่ปรากฏให้เห็นขณะยื่นออกมาจากเปลือก โดยส่วนหัวและส่วนเท้ามีกล้ามเนื้อที่ยึดกับแกนกลางของเปลือก (columella muscle) ทำให้สามารถยืดหรือหดหัวและเท้าเข้า-ออกจากเปลือกได้ เท้าของหอยฝาเดียวมีลักษณะเป็นแผ่นแบน มีซิเลียและต่อมผลิตเมือกเป็นจำนวนมากประกอบบกกล้ามเนื้อตามขวาง (transverse muscle) ที่พัฒนาดีเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ (บพิธ และ นันทพร, 2545) โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหอยฝาเดียวประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. รูปร่างของเปลือกหอย

โดยทั่วไปหอยฝาเดียวมักมีรูปร่างเปลือกเป็นทรงกรวย แต่จะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปขึ้นกับการขดวนของเปลือกกรอบแกนของหอย การพิจารณารูปร่างของเปลือกหอยต้องพิจารณานาฬิกาของมุมสไปร์ (spire angle) ซึ่งเป็นมุมยอดเปลือก

2. ลักษณะส่วนประกอบต่างๆ ของเปลือก (ภาพประกอบ 6) ได้แก่

2.1 ยอดเปลือก (apex) เป็นชั้นเล็กสุดของเปลือก สร้างก่อนส่วนอื่นของเปลือก ตั้งแต่ระยะตัวอ่อน

2.2 เวิร์ล (whorl) ลักษณะการขดวนของเปลือกหอย เริ่มจากส่วนของเปลือกวนเป็นชั้น ๆ รอบแนวแกน

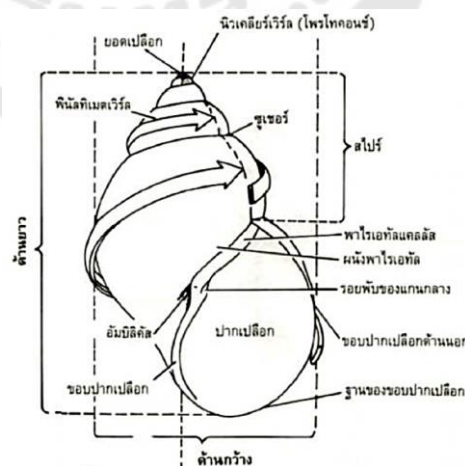
2.3 สไปร์เวิร์ล (spire whorl) เป็นชั้นของขดจากยอดเปลือก ถึงเวิร์ลรองสุดท้าย

2.4 บอดีเวิร์ล (body whorl) เป็นส่วนเวิร์ลสุดท้ายและเป็นเวิร์ลที่ถูกสร้างหลังสุดของเปลือก

2.5 ปากเปลือก (aperture) อยู่ปลายสุดของบอดีเวิร์ล เพื่อเป็นช่องให้ตัวหอย คืบคลานเข้าปากเปลือก เมื่อหอยเปลือกขึ้นจะเห็นปากเปลือกเป็นแนวโค้ง ที่ฐานของปากเปลือก จะมีขอบเขตปากเปลือกด้านนอกและด้านใน บรรจบกันเป็นแนวโค้งที่ต่อเนื่อง เรียกว่า โฮโลสโตมาทัส (holostomatous) ถ้าไม่บรรจบกันอย่างต่อเนื่องเรียกว่า ไฮโฟโนสโตมาทัส (siphonstomatous)

2.6 ซูเชอร์ (suture) เป็นบริเวณที่เวิร์ลมาต่อกัน

2.7 อัมบิลิคัส (umbilicus) เป็นช่อง รู หรือ รอยบุ๋มที่บอดีเวิร์ลหรือส่วนฐานของปากเปลือก

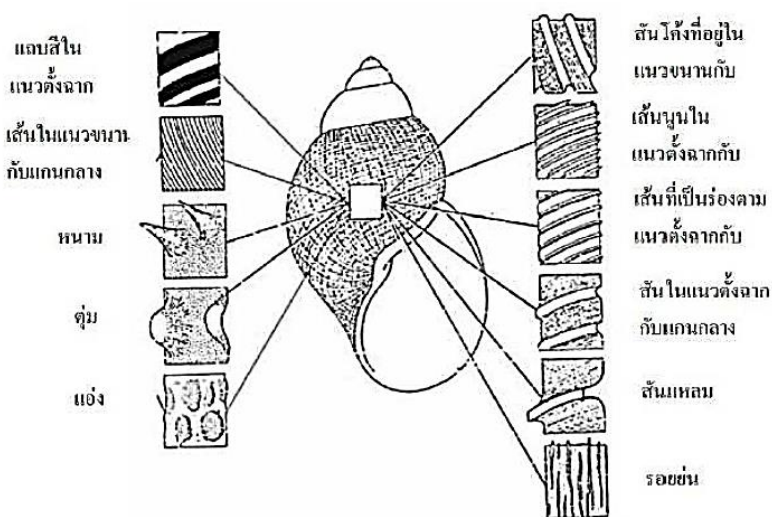


ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของเปลือกหอยฝาเดียว

ที่มา : สุขชาติ อุปถัมภ์ และคณะ (2538)

3. ลวดลายบนเปลือกหอยและลวดลายของสีเปลือก

ผิวด้านนอกของเปลือกจะมีลวดลายต่าง ๆ เช่น หนาม ตุ่ม รอยย่น สันคมหนา เป็นสันปลายมนขนาดกลาง เป็นสันนูนเล็ก ๆ หรือบาง ๆ (ภาพประกอบ 7)

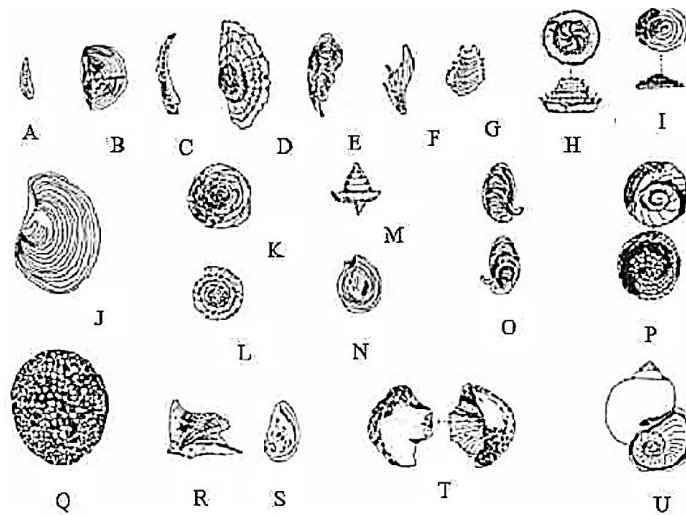


ภาพประกอบ 7 ลักษณะและลวดลายบนเปลือกหอย

ที่มา : สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ (2538)

4. แผ่นปิดปากเปลือก (operculum)

อยู่ด้านบนของแผ่นเท้าของหอย สร้างจากแผ่นเท้า หน้าทีหลัก คือ ปิดปากเปลือกเมื่อตัวหอยหดเข้าไปในเปลือก โดยทั่วไปแผ่นปิดปากเปลือกจะสามารถปิดปากเปลือกได้สนิท สามารถป้องกันอันตรายให้กับตัวหอยที่อยู่ภายในได้ มีลักษณะเป็นแผ่นแบน มีรูปร่างหลายแบบ อาจเป็นวงกลม วงรี หรือ มีลายขดแตกต่างกันตามชนิดของหอย ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของหอยได้เช่นกัน ลวดลายบนแผ่นปิดปากเปลือกด้านนอก อาจมีลักษณะวนเป็นวงต่อกันหลายวง เรียกว่า มัลติสไปรัล (multispiral) หรืออาจเป็นวงเล็ก ๆ เรียกว่า พอซิสไปรัล (paucispiral) เป็นวงเดี่ยว ซ้อนกันหลาย ๆ วง เรียกว่า คอนเซนทริก (concentric) หรืออาจจะเป็นวงเดี่ยวและตรงกลางมีวงหลายวง ซ้อนกันเป็นวงเล็ก ๆ วนต่อเนื่องกัน เรียกว่า คอนเซนทริกที่มีสไปรัลนิวเคลียส (spiral nucleus) (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของฝาดัดเปลือกหอยแบบต่าง ๆ

ที่มา : สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ (2538)

จากที่กล่าวมา จะสังเกตได้ว่าหอยแต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกันตั้งแต่รูปทรงของเปลือกไปจนถึงลวดลายที่อยู่บนเปลือก ดังนั้นจึงสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกชนิดของหอยฝาดเดียวที่ต้องการศึกษาได้

การติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาดเดียว

หอยฝาดเดียวเป็นโฮสต์กึ่งกลางที่สำคัญสำหรับพัฒนาการของพยาธิใบไม้ให้ครบวงจร เนื่องจากอาศัยอยู่บริเวณที่มีโฮสต์เฉพาะและมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม โดยหอยแต่ละวงศ์จะมีการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ต่างชนิดกัน ดังนี้ (ตาราง 3)

ตาราง 3 เปรียบเทียบการติดพยาธิของหอยวงศ์ต่าง ๆ

วงศ์ของหอยฝาเดียว	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รูปแบบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ที่พบ
Ampullariidae	เปลือกมีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ รูปร่างกลมบ่อม มีอัมบิลิคัส ผิวเปลือกเรียบ ประกอบด้วยเส้นการเจริญเติบโตที่อยู่ในแนวแกนหรือแนวตั้งของเปลือก ปากเปลือกขนาดยาวใหญ่ และเป็นรูปไข่หรือรูปรี และเป็นแบบเด็กซ์ทริล แผ่นปิดปากเปลือกสามารถปิดปากเปลือกได้สนิทหนาแข็ง	<i>Cercaria cumanensis</i> (microcotylous xiphidiocercariae) (Nasir, 1965) <i>Stomylotrema gratiosu</i> (Pinto et al., 2015)
Bithyniidae	เปลือกทรงกรวยรูปไข่ ผิวเปลือกเรียบ ปากเปลือกกลมหรือรีและเป็นมุมที่ส่วนฐานของปากเปลือก แผ่นปิดปากเปลือก เป็นแบบคอนเซนทริกและมีสไปรัลนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง ตัวหอยปกคลุมด้วยรงควัตถุเมลานินและรงควัตถุสีเหลือง เทนเทเคลียวเรียวยาว ตาติดอยู่ที่ฐานของเทนเทเคลิล ด้านหน้าของส่วนหัวยื่นยาว ใช้เหงือกและแรดูลาในการกินอาหาร	<i>O. viverrini</i> (Giboda et al., 1991; Ditrich et al., 1992; Adam et al., 1993; Kulsantiwong et al., 2015) <i>Asymphylogadora tincae</i> , <i>Parasymphylogadora</i> sp., <i>Echinoparyphium aconiatum</i> , <i>Ec. recurvatum</i> , <i>Ec. cleric</i> , <i>E. revolutum</i> , <i>E. uralensis</i> , <i>Cyathocotyle bushiensis</i> , <i>Cy. bithyniae</i> , และ <i>Cotylurus cornutus</i> (Serbina, 2014) <i>Catatropis indicus</i> (Yousif et al., 2011)

ตาราง 3 (ต่อ)

วงศ์ของหอย ฝาเดียว	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รูปแบบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ที่พบ
Buccinidae	เปลือกมีทั้งขนาดกลางและขนาดใหญ่ รูปทรงกรวย และมีรูปร่างหลายแบบ ตั้งแต่รูปไข่ รูปผลเพอร์ รูปกลม หรือรูป ยาว เปลือกหนา แต่บางชนิดจะเปราะ ผิวเปลือกอาจจะเรียบหรือ ขรุขระ บางชนิดมีสีส้ม และลวดลายสะดุดตา ปากเปลือกกว้าง แผ่นปิดปากเปลือกเป็น มันเงา	<i>Stephanostomum baccatum</i> (Wolfgang, 1955; MacKenzie & Liversidge, 1975) <i>Tormopsolus</i> sp. (acanthocolpid cercaria) (Bartoli & Gibson, 1998)
Bulinidae	ลักษณะเปลือกเป็นรูปกระดุม ขดวน เล็กน้อย มีรอยยวบเข้าตรงกลาง เปลือก แข็งแรง สีน้ำตาลดำ	<i>S. indicum</i> (furcocercous cercaria) (Singh, 1959; Devkota et al., 2014) <i>S. spindale</i> (De Bont et al., 1991; Ditrich et al., 1992) <i>S. nasale</i> (De Bont et al., 1991)

ตาราง 3 (ต่อ)

วงศ์ของหอย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รูปแบบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ที่พบ
ฝาเดียว		
Viviparidae	เป็นหอยขนาดกลาง รูปร่างเปลือกทรงกรวยรูปไข่ ผิวเปลือกอาจเรียบหรืออาจมีตุ่มหรือสันยื่นออกมา บางชนิดอาจพบแถบสีบนเปลือกด้วย แผ่นปิดปากเปลือกเป็นมันเงาไม่หนามาก และเป็นแบบคอนเซนตริก เทนเทเคลิขวาของหอยเพศผู้เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์	<i>E. cinetorchis</i> (Chung & Jung, 1999) <i>Plagiorchis</i> sp., <i>Echinostoma</i> sp. (Choubisa, 2008) <i>E. revolutum</i> (Chai et al., 2011)
Thiaridae	มีรูปทรงกรวยยาวหรืออาจเป็นทรงกรวยรูปไข่ มีลักษณะเด่นที่วงขด (whorl) เรียงซ้อนไปสู่ยอดเปลือกเหมือนเจดีย์ ผิวเปลือกไม่เรียบ อาจเป็นสันหรือมีลวดลายนูนเป็น สัน วงขดด้านบน (spire) มักลึกร้อน แผ่นปิดเปลือกบางและเป็นมัน และเป็นแบบพอซิปไปรัล	<i>Ha. taichui</i> (Giboda et al., 1991; Ditrich et al., 1992; Chontanarth & Wongsawad, 2010; Krailas, Namchote, & Rattanathai, 2011; Boonmekam et al., 2016) <i>Ha. pumilio</i> (Krailas, Namchote & Rattanathai, 2011) <i>C. formosanus</i> (Pinto & Melo, 2010; Paula-Andrade et al., 2012)

ตาราง 3 (ต่อ)

วงศ์ของหอย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รูปแบบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ที่พบ
ฝาเดียว		
Lymnaeidae	เปลือกมีรูปร่างตั้งแต่ทรงกรวยยาวคล้าย เข็มไปจนถึงทรงเตี้ยคล้ายฝาชี พวกที่ เป็นทรงกรวย ปากเปลือกจะเป็นแบบ เด็กซ์ทรัล ปากเปลือกมีขนาดใหญ่และ แนวแกนของเปลือกมักบิดเป็นเกลียว ส่วนพวกที่มีเปลือกคล้ายฝาชี เปลือกจะ มีขนาดใหญ่และมียอดเปลือกค่อนข้างมา ทางด้านหน้ามากกว่าด้านหลัง หอย มีเทเนเทเคลิกกว้างแบนและเป็นรูป สามเหลี่ยม ไม่มี pseudobranch ที่ บริเวณด้านข้างของลำตัวใกล้กับรูหายใจ	<i>Fa. gigantica</i> (Ditrich et al., 1992) <i>Fa. hepatica</i> (Dreyfuss, Vignoles, & Rondelaud, 2003) <i>Fascioloides magna</i> (Vignoles et al., 2006) <i>Tetracotyle lymnaei</i> (Choubisa, 2008)

จากตารางจะสังเกตได้ว่าหอยในแต่ละวงศ์สามารถเป็นโฮสต์กึ่งกลางให้กับพยาธิได้หลายชนิด ดังนั้นหอยจึงเป็นตัวแทนที่เหมาะสมสำหรับศึกษาสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ เนื่องจากจะทำให้ทราบสถานการณ์หรือประเมินโอกาสที่จะเกิดการระบาดของพยาธิใบไม้ได้หลายชนิด

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดจำแนกพยาธิโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับอณูชีววิทยา

จากที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าการจัดจำแนกพยาธิโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานมีความสะดวกและรวดเร็ว แต่มีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้จากความเชี่ยวชาญของผู้จัดจำแนก เนื่องจากตัวอ่อนระยะเซอ์คาเรียของพยาธิใบไม้บางชนิดอาจมีความคล้ายคลึงกัน (พีรพล รัตนไทย, 2553) ทำให้มีการประยุกต์ใช้อณูชีววิทยาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่ง

เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดจำแนกและระบุชนิดของพยาธิมีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้ในปัจจุบันได้มีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับวิธีการทางอณูชีววิทยาเพื่อระบุและจัดจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ดังนี้

Chontanarith & Wongsawad (2010) ได้ตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในหอยฝาดเดียวจากอำเภอแม่แตง โดยจำแนกตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียได้ทั้งหมด 4 รูปแบบ ได้แก่ pleurolophocercous cercaria, distome cercaria, transversotrema cercaria และ monostome cercaria นอกจากนี้ยังได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *Ha. taichui* เพื่อใช้สำหรับระบุชนิดของตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย โดยพบว่ามีการติดพยาธิใบไม้ของพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *Ha. taichui* ร้อยละ 8.3 ต่อมา Portier et al. (2012) ได้ตรวจสอบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยชนิด *Planorbis planorbis* และ *Anisus vortex* โดยพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ furcocercariae จากนั้นจึงนำไประบุชนิดด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาโดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ซึ่งพบว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่พบเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *Alaria alata* ประกอบกับ Wongsawad et al. (2016) ได้ศึกษาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียจากหอยฝาดเดียวในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างหอยฝาดเดียวจำนวน 1,256 ตัว จาก 8 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2558 เป็นหอยฝาดเดียวทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ *B. siamensis*, *Brotia costula costula*, *Br. citrina*, *Br. baccata*, *T. granifera*, *Physa acuta*, *F. martensi martensi*, *F. dorliaris*, *F. polygamma*, *T. scabra*, *M. tuberculata*, *M. jugicostis*, *Indoplanorbis* sp. และ *Ly. auricularia rubiginosa* หลังจากนั้นจำแนกชนิดของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียได้เป็น 8 รูปแบบ ได้แก่ distome cercaria, echinostome cercaria, furcocercous cercaria, monostome cercaria, parapleurolophocercous cercaria, pleurolophocercous cercaria, transversotrema cercaria และ xiphidiocercaria ต่อมานำมาศึกษาทางอณูชีววิทยาโดยใช้ยีนบริเวณ 28S พบว่า distome cercaria มีการจัดกลุ่มกับพยาธิชนิด *Philophthalmus* spp., echinostome cercaria มีการจัดกลุ่มกับพยาธิชนิด *Echinostoma* spp., furcocercous cercaria มีการจัดกลุ่มกับพยาธิชนิด *Posthodiplostomum* sp., *A. taxideae* และ *Hysteromorpha triloba*, monostome cercaria มีการจัดกลุ่มกับพยาธิชนิด *Catantropis indicus*, parapleurolophocercous cercaria มีการจัดกลุ่มกับพยาธิชนิด *Haplorchoides* sp., pleurolophocercous cercaria มีการจัดกลุ่มกับพยาธิชนิด *C. formosanus*, transversotrema cercaria มีการจัดกลุ่มกับพยาธิชนิด *Transversotrema* spp. และ xiphidiocercaria มีการจัด

กลุ่มกับพยาธิชนิด *Prosthodendrium* spp. ประกอบกับ Forte-Gil et al. (2016) ได้ทำการศึกษา การติดพยาธิใบไม้เลือดสกุล *Cardicola* จากปลาทูน่า (*Thunnus thynnus*) ในพื้นที่ทางตะวันตก ของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยในการศึกษารั้งนี้ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่ที่แตกต่าง กัน ร่วมกับการศึกษาด้วยวิธีทางทางอณูชีววิทยา โดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และ ยีน 28S ซึ่งผลจากการจำแนกทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน โดยพบว่าไข่ที่มีลักษณะเป็นรูปเดี่ยว รูปทรงกระสวย และรูปทรงกลมเป็นพยาธิชนิด *Ca. opisthorchis*, *Ca. forsteri* และ *Cardicola* sp. ตามลำดับ และสุดท้าย Besprozvannykh et al. (2018) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ อณูชีววิทยาของพยาธิชนิด *Diplodiscus japonicas* และ *D. mehrai* โดยเก็บตัวอย่างหอยน้ำจืด ชนิด *Anisus centrifugops* จำนวน 250 ตัว จากเขตการปกครองปริมอร์สกี ประเทศรัสเซีย พบว่า ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ทั้งสองชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกันในด้าน ขนาดของตัวและขนาดของอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลทางอณูชีววิทยาที่ยีนบริเวณ 18S และ 28S ที่แสดงผลเป็นแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการว่าพยาธิทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันแบบ monophyletic

การศึกษาระบาดวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาดเดียว

การศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิใบไม้ในประเทศไทยนั้น มีการศึกษาด้วย หลากหลายวิธี เช่น การตรวจจุลจากระ ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานและง่ายต่อการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการ ติดพยาธิใบไม้ การวินิจฉัยโดยการตรวจพยาธิตัวเต็มวัย อาจได้จากการผ่าศพผู้ป่วยเสียชีวิตแล้ว หรือได้จากการผ่าตัดทางช่องท้อง เช่น การผ่าตัดถุงน้ำดี การผ่าตัดตับหรืออาจได้จากน้ำที่ดูดจาก ซีสต์ของตับ (สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดอำนาจเจริญ, 2552) แต่วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ต้อง ตรวจจากบุคคลและเป็นการตรวจหาพยาธิในระยะตัวเต็มวัยแล้ว ซึ่งก่อให้เกิดความยุ่งยาก สิ้นเปลืองงบประมาณและเวลา อีกทั้งยังทำให้ผู้ป่วยรู้ตัวช้าว่าติดพยาธิและยากต่อการรักษา จึงได้ มีการศึกษาการระบาดของพยาธิใบไม้จากระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในหอยฝาดเดียวเพื่อใช้ สำหรับประเมินสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในพื้นที่ ดังนี้

Chowdhury et al. (1994) ได้ตรวจหอยน้ำจืดชนิด *Ly. auricularia* ในประเทศ บังกลาเทศ และพบว่าติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *gymnocephalous ceracariae* ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิสกุล *Fasciola* โดยมีค่าความชุกร้อยละ 0.13 ต่อมา Loy & Haas (2001) ได้ทำการตรวจการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียใน หอยฝาดเดียวบริเวณทางตอนใต้ของประเทศเยอรมันนี้ พบค่าความชุกของการติดพยาธิสูงถึงร้อยละ 44.9 โดยพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของพยาธิหลายชนิด ดังนี้

Diplostomum spathaceum, *Trichobilharzia ocellata*, *Apatemon minor*, *E. revolutum*, *Pseudechinoparyphium echinatum*, *Hypoderaeum conoideum*, *Isthmiophora melis* และ Faltýnková et al. (2007) พบตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ furcocercous cercariae ซึ่งเป็นตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ 4 วงศ์ ได้แก่ Strigeidae, Diplostomidae, Schistosomatidae และ Sanguinicolidae ในหอยน้ำจืดจากทะเลสาบ Konnevesi บริเวณตอนกลางของประเทศฟินแลนด์ นอกจากนี้ยังพบว่าหอยชนิด *Valvata macrostoma* เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่งสำหรับพยาธิชนิด *Australapatemon* sp. และ *Sanguinicola* sp. โดยมีค่าความชุกของการติดพยาธิเป็นร้อยละ 12.9 ในส่วนของประเทศไทย Nithiuthai et al. (2003) ได้สำรวจตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียว น้ำจืดชนิด *B. goniomphalos* จากอำเภอห้วยแถลง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวจำนวน 527 ตัวในปี ค.ศ. 2000 โดยพบค่าความชุกของการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้คือ ร้อยละ 3.04 แบ่งเป็นตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ amphistome cercariae ร้อยละ 75, virgulate cercariae ร้อยละ 18.75 และ armatae cercariae ร้อยละ 6.25 ต่อมาวิวิชชุตตา เดชรักษา (2549) ได้ตรวจสอบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยฝาเดียววงศ์ Thiaridae บริเวณภาคเหนือของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวจากจุดเก็บตัวอย่าง 26 จุด ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 หลังจากนั้นนำมาตรวจการติดพยาธิด้วยวิธีการ shedding และ crushing และพบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ *Acanthatrium hitaense*, *Ha. pumilio*, *C. formosanus*, *Ha. taichui*, *Loxogenoides bicolor*, *Transversotrema laruei*, *Haematoloechus similis*, *Ca. alseae*, *Cloacitrema philippinum* และ *A. mustelae* หอยฝาเดียวชนิด *T. granifera* พบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้สูงถึงร้อยละ 5.00 และสามารถเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้หลายชนิด ประกอบกับ Dechruksa et al. (2007) ได้ตรวจสอบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดวงศ์ Thiaridae จาก 5 จุดเก็บตัวอย่างของแม่น้ำเชิงในประเทศไทยช่วงเดือนธันวาคม ปีค.ศ. 2004 ถึง เดือน ตุลาคม ปีค.ศ. 2005 โดยเก็บตัวอย่างหอยทั้งหมดทั้งหมด 9,568 ตัว โดยพบเซอร์คาเรียทั้งหมด 2 รูปแบบคือ parapleurolophocercous cercariae ประกอบด้วยตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *Ha. pumilio* และ *C. formosanus* และ xiphidiocercariae ประกอบด้วยตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ชนิด *Ac. hitaense*, *Lo. bicolor* และ *Haematoloechus similis* โดยมีอัตราการติดพยาธิเป็นร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.1 ตามลำดับ และหอยชนิด *T. granifera* มีอัตราการติดพยาธิสูงสุดคือร้อยละ 26.1 ในลำดับถัดมาพีรพล รัตยไทย (2553) ได้ศึกษาการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยฝาเดียววงศ์ Thiaridae บริเวณภาคใต้

ของประเทศไทย กำหนดจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 34 จุดในพื้นที่ 14 จังหวัด ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2552 มีการพบหอยฝาเดียว 8 ชนิด คือ *M. tuberculata*, *M. jugicostis*, *T. granifera*, *T. scabra*, *Sermyla riquetti*, *Br. costula*, *Adamietta housei* และ *Neoradiana prasongi* หลังจากนั้นนำมาตรวจการติดพยาธิด้วยวิธีการ shedding และ crushing โดยมีอัตราการติดพยาธิคิดเป็นร้อยละ 24.09, 6.41, 7.88, 2.66, 1.01, 0.35, 21.51 และ 7.74 ตามลำดับ Krailas, Namchote, & Rattanathai (2011) ได้ศึกษาการติดพยาธิตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *Ha. taichui* และ *Ha. pumilio* ในหอยฝาเดียววงศ์ Thiaridae และ Pachychilidae จากภาคใต้ของประเทศไทย ในช่วงเดือนมกราคม ปี ค.ศ. 2008 ถึงเดือนกันยายน ปี ค.ศ. 2009 โดยนำหอยมาตรวจการติดพยาธิด้วยวิธีการ shedding และ crushing จากผลการตรวจพบตัวอย่างพยาธิใบไม้ในหอย 3 ชนิด ได้แก่ *M. tuberculata*, *M. jugicostis* และ *N. prasongi* ซึ่งอัตราการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ 2 ชนิด ได้แก่ *Ha. taichui* และ *Ha. pumilio* คิดเป็นร้อยละ 0.59 และ 0.12 ตามลำดับ ต่อมา Namchote et al. (2015) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการติดตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียในโฮสต์กึ่งกลางลำดับที่หนึ่ง ซึ่งเป็นหอยฝาเดียวน้ำกร่อยบริเวณระบบนิเวศป่าชายเลน 6 จังหวัดชายทะเลฝั่งอ่าวไทย ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดชุมพร จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสงขลา พบว่าหอยฝาเดียวชนิด *Cerithidea cingulata*, *Ce. djadjariensis*, *Ce. alata*, *Ce. quadrata*, *Clithon pequensis*, *Sermyla riqueti* และ *Assimineia brevicula* มีอัตราการติดพยาธิเป็นร้อยละ 0.19, 0.05, 0.01, 0.01, 0.05, 0.72 และ 0.07 ตามลำดับ ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ทำให้สามารถจัดจำแนกและระบุชนิดของพยาธิได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Cloacitrema philippinum*, *Parorchis acanthus*, *Ha. taichui*, *Me. intermedius*, *St. tridactyla*, *Ascorhytis charadriiformis*, *Mesostephanus appendiculatoides*, *Hy. conoideum* และ *Himasthla interrupta* ต่อมา Namsanor et al. (2015) ได้ตรวจสอบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของพยาธิในตับชนิด *O. viverrini* จากโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง คือ หอยฝาเดียวน้ำจืดชนิด *B. siamensis* จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ช่วงปี ค.ศ. 2012 ถึง ค.ศ. 2013 ทั้ง 3 ฤดู โดยฤดูหนาวมีค่าความชุกของการติดพยาธิสูงที่สุดคือร้อยละ 1.05 ต่อมาเป็นฤดูร้อนและหน้าร้อนคือร้อยละ 0.37 และ 0.31 ตามลำดับ

ดังนั้นจากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า การศึกษาการระบาดของพยาธิใบไม้ที่มีการใช้ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียต้องมีการใช้วิธีการจัดจำแนกทั้งทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับวิธีการระบุชนิดเชิงโมเลกุล โดยมีการใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการระบุชนิดที่มีความถูกต้องและแม่นยำ



บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

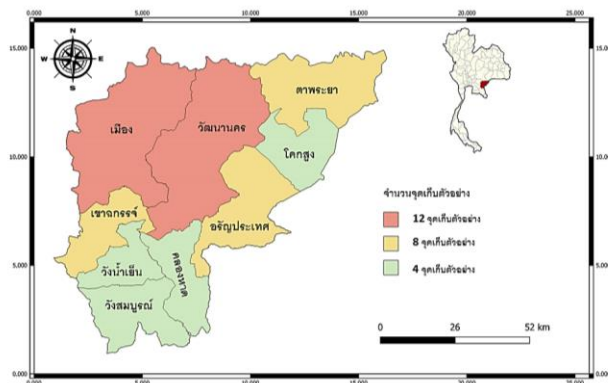
ในการศึกษาผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอน ดังนี้

การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์

การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองต้องมีการขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองเพื่อรับรองว่าผู้วิจัยได้ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองอย่างถูกต้องและมีจริยธรรม โดยพิจารณาจากขั้นตอนและวิธีการทดลองในสัตว์และวิธีการการุณยฆาต โดยทั้งนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการภายใต้การควบคุมตามใบอนุญาตใช้สัตว์หมายเลข SWU-A-001-2562

การกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างและการสุ่มเก็บหอยฝาเดียว

จังหวัดสระแก้วประกอบด้วย 9 อำเภอแต่ละอำเภอมีขนาดพื้นที่แตกต่างกัน จึงได้กำหนดจำนวนจุดเก็บตัวอย่างของแต่ละอำเภอให้สอดคล้องกับขนาดพื้นที่ของอำเภอนั้น ๆ โดยใช้วิธีสุ่มตัวอย่างแบบแบ่งชั้น (stratified random sampling) เพื่อให้ได้จุดเก็บตัวอย่างที่ครอบคลุมทั่วพื้นที่ โดยเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวในแต่ละจุด เก็บตัวอย่างชนิดละ 50 ตัว (Tong et al., 2015) และจัดจำแนกชนิดของหอยฝาเดียวจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามรูปวิธานของ Brandt (1974) นอกจากนี้ยังทำการบันทึกพิกัดจุดเก็บตัวอย่างโดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์โลก (Geographic Information System: GIS) ซึ่งแสดงหน่วยเป็น UTM (Universal Transverse Mercator) เพื่อแสดงให้เห็นถึงจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมดในจังหวัดสระแก้ว (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 แผนที่แสดงจำนวนจุดเก็บตัวอย่างของแต่ละอำเภอ

การตรวจหาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในตัวอย่างหอยฝาเดียว

นำตัวอย่างหอยฝาเดียวที่เก็บได้มาตรวจหาการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ด้วยวิธีทุบ (crushing) (Noikong et al., 2014) โดยนำหอยฝาเดียวมาทุบครั้งละ 1 ตัว หลังจากนั้นนำหอยฝาเดียวที่ถูกทุบใส่ลงในจานแก้ว จากนั้นเติมน้ำให้ท่วมตัวหอยและใช้เข็มเขี่ยเนื้อเยื่อหอยเพื่อตรวจหาตัวอ่อนพยาธิระยะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เมื่อพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ใช้หลอดหยดสารดูดตัวอ่อนพยาธิใบไม้แยกออกมา หลังจากนั้นล้างตัวอ่อนพยาธิใบไม้ด้วยน้ำสะอาด และจำแนกชนิดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ และแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้การทำสไลด์สด (wet mount) และส่วนที่ 2 เก็บรักษาตัวอย่างสำหรับจำแนกตัวอ่อนพยาธิใบไม้ด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยา โดยการดูดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่บรรจุ absolute ethanol จากนั้นเก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาสภาพตัวอ่อนพยาธิ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดพยาธิใบไม้

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้เพื่อใช้สำหรับระบุชนิดโดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ระยะตัวเต็มวัยที่พบในปลากดเหลือง (*Hemibagrus filamentus*) โดยสามารถเตรียมได้โดยการผ่าตรวจปลาบริเวณลำไส้ของปลาเพื่อหาระยะตัวเต็มวัย (Purivirojkul & Areechon, 2008; Apiwong, Wongsawad, & Butboonchoo, 2018) ซึ่งจะนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการทำสไลด์ถาวรย้อมสีตัวอย่าง (staining) ด้วย haematoxylin มีขั้นตอน ดังนี้

นำตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยวางบนแผ่นสไลด์ (slide) จากนั้นปิดทับด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover glass) และพันด้วยด้ายเพื่อให้พยาธิแบนบางและติดสีย้อมได้ดี จากนั้นคงสภาพตัวอย่างด้วย 4% formalin เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้อมสีตัวอย่างด้วย haematoxylin เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย้อมสีมาล้าง (washing) และดึงน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ด้วย ethyl alcohol series ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไล่จาก 30% ถึง 100% หลังจากนั้นกำจัดสีส่วนเกิน (destain) นำตัวอย่างแช่ใน ethyl alcohol series ที่ความเข้มข้น 70%, 80%, 95% ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างแช่ใน alcohol : butyl 1 : 1 และ butyl alcohol จากนั้นดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วย butyl alcohol : xylene 1 : 1 และ butyl alcohol : xylene 1 : 2 ตามลำดับ หลังจากนั้นทำตัวอย่างให้ใส (clearing) ด้วย xylene เป็นเวลา 1 นาที และผนึกตัวอย่างกับแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วย permount จากนั้นนำตัวอย่างวางบนเครื่อง

อุ่นสไลด์ (slide warmer) เพื่อให้ตัวอย่างแห้งสนิท หลังจากนั้นนำมาระบุชนิดโดยใช้รูปวิธานของ Yamaguti (1958) ร่วมกับรูปวิธานของ Gibson, Jones, & Bray (2002) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด หลังจากนั้นจะนำมาวาดรูปเหมือนและบรรยายลักษณะเพื่อให้เห็นลักษณะที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นและใช้ในการระบุชนิด

ส่วนที่ 2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ที่ได้จากการตรวจสอบการติดพยาธิในหอยฝาเดียวจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว โดยการทำสไลด์สด ใช้สีย้อม 0.5 % neutral red เพื่อจัดจำแนกลักษณะของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่พบแต่ละรูปแบบตามรูปวิธานของ Schell (1970) หลังจากนั้นจะนำมาวาดรูปเหมือนและบรรยายลักษณะเพื่อให้เห็นลักษณะที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นและใช้ในการระบุชนิด

การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาเพื่อระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิใบไม้

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้จะเลือกสร้างหรือพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *H. mehrari* เพื่อใช้ในการระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *H. mehrari* โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ ITS2 ซึ่งมีขั้นตอนทางอนุชีววิทยา ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างพยาธิ

ในการศึกษาทางอนุชีววิทยาจำเป็นต้องมีพยาธิใบไม้ในระยะตัวเต็มวัย เพื่อนำมาออกแบบและทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ โดยต้องมีการเตรียมตัวอย่างของพยาธิต่อไปนี้

1) ตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลา สามารถเตรียมตัวอย่างได้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sohn (2009) ซึ่งจะนำซากปลาแต่ละชนิดที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางที่ส่องของพยาธิใบไม้ที่ต้องการมาบดด้วยเครื่อง mixer blender พร้อมกับเติมสารละลายเปปซิน (0.25% w/v pepsin A, 0.85% w/v NaCl, 1.5% v/v HCl) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อปลาต่อสารละลาย pepsin เท่ากับ 1 : 3 บดจนละเอียด จากนั้นนำไปบ่มใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมากรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่องห่าง 850, 710 และ 250 ไมโครเมตร ตามลำดับ เพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออกจากตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนในน้ำเกลือ (0.85% normal saline) แล้วนำตะกอนมาตรวจหาระยะเมตาเซอร์คาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ เพื่อหาจำนวนและชนิดของเมตาเซอร์คาเรียโดยใช้รูปร่างและลักษณะตามรูปวิธานของ Pearson & Ow-Yang (1982); Scholz, Ditrich, & Giboda. (1991); Sohn et al. (2009)

2) ตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในหอยฝาเดียว สามารถเตรียมตัวอย่างได้โดยนำหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางที่สองของพยาธิใบไม้ที่ต้องการมาสลบด้วยน้ำมันกานพลู (clove oil) (Billbao et al., 2010; Bianchini et al., 2017) และตรวจหาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วยวิธีการทาบและตรวจหาบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจของหอยด้วยกล้องจุลทรรศน์สแตอริโอควิปคู่กับกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ เพื่อหาปริมาณและชนิดของเมตาเซอร์คาเรียตามวิธีของ Anucherngchai et al. (2019)

3) ตัวอย่างพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยในโฮสต์ทดลอง (experimental host) ที่มีโฮสต์เฉพาะเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น *Ha. taichui*, *Ha. pumilio*, *E. revolutum* สามารถเตรียมได้โดยการนำตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ได้บ้อนให้แฮมสเตอร์แคระขาว (*Phodopus sungorus*) โดยวิธี oral force-feeding (Wongsawad & Wongsawad, 2007) เพื่อให้ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัย หลังจากบ้อน 7-15 วันตามชนิดของพยาธิ จากนั้นการุณยฆาตหนูด้วย diethyl ether (Sen, 1972) และผ่าหนุตรวจหาระยะตัวเต็มวัยบริเวณลำไส้เล็กของหนุตามวิธีการของ Chai et al. (2017)

2. การยืนยันชนิดตัวอย่างพยาธิที่นำมาใช้ในการศึกษา

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความสามารถระบุชนิดของพยาธิใบไม้จำเป็นต้องมีการยืนยันตัวอย่างพยาธิที่นำมาเป็นตัวอย่างสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้สามารถใช้ระบุชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่

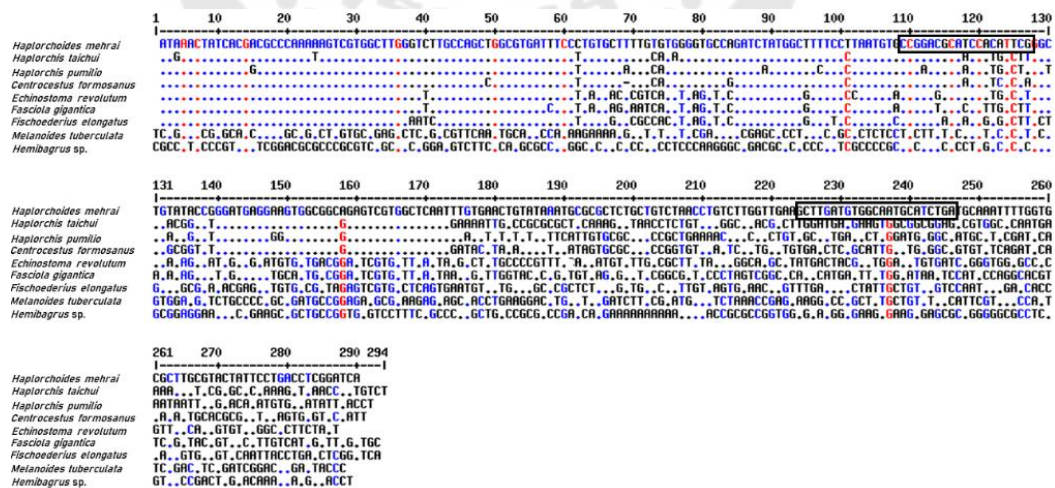
1) การระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการทำสไลด์ถาวรโดยย้อมสีตัวอย่างด้วย haematoxylin ซึ่งมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai*

2) การระบุชนิดโดยใช้วิธีการทางอณูชีววิทยา โดยนำตัวอย่างพยาธิที่เตรียมไว้ทั้งตัวอย่างของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* และตัวเทียบมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ GF-1 tissue DNA extraction kit (Vivantis Company, Malaysia) และตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้เท่ากัน จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ต่อมนำดีเอ็นเอเข้าสู่กระบวนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยเลือกใช้บริเวณที่จะใช้ในการระบุชนิดเป็นบริเวณ ITS2 เนื่องจากเป็นบริเวณที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นบริเวณอนุรักษ์ภายในสปีชีส์เดียวกันแต่มีความหลากหลายกับต่างสปีชีส์ และสามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ได้ ซึ่งการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์ของ Barber, Mkoji, & Loker (2000) ซึ่ง

มี forward primer คือ ITS3: 5' – GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC – 3' และมี reverse primer คือ ITS4: 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3' ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 480 คู่เบส โดยจะนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่โปรแกรม BLAST เพื่อเปรียบเทียบและระบุชนิดของตัวอย่างพยาธิใบไม้

3. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai*

การระบุชนิดของพยาธิต้องมีไพรเมอร์ที่สามารถระบุชนิดของพยาธิใบไม้ได้อย่างจำเพาะ โดยออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยที่จัดเตรียมไว้ ได้แก่ *H. mehrai* (MN902350), *Ha. taichui* (MN902349), *Ha. pumilio* (MN902351), *C. formosanus* (MN902348), *E. revolutum* (MN629216) และ *Fi. elongatus* (MN902352) ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้และโฮสต์จาก Genbank database ได้แก่ *Fa. gigantica* (AM900371), *M. tuberculata* (AY014160) และ *Hemibagrus* sp. (KC009848) เพื่อหาบริเวณที่มีความจำเพาะต่อพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* โดยใช้โปรแกรม Clustal W หลังจากนั้นนำมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม MEGA-X (Kumar et al., 2008) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ forward primer คือ 5'-CCGGACGCATCC ACATTCG-3' และ reverse primer คือ 5'-TCAGATGCATTGCCACATCAAGC-3' ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 143 คู่เบส (ภาพประกอบ 10) หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์โดยใช้ Oligo Analyzer 3.1 (Nazina et al., 2015)



ภาพประกอบ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ชนิด

Haplorchoides mehrai จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcript spacer 2

4. ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของไพรเมอร์

เมื่อออกแบบไพรเมอร์ต้องมีการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมและข้อจำกัดของไพรเมอร์ เพื่อให้สามารถนำไพรเมอร์ไปใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดได้ ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1) ทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยจะมีศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์โดยทำการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการดำเนินปฏิกิริยา และศึกษาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้เหมาะสมที่สุดเพื่อเกิดปฏิกิริยา เช่น $MgCl_2$, ไพรเมอร์, *Taq* DNA polymerase และ dNTPs

2) ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อพยาธิที่ต้องการศึกษา โดยการนำไพรเมอร์มาทดสอบกับพยาธิที่มีการติดร่วมกับพยาธิที่ต้องการศึกษาในโฮสต์ระยะต่าง ๆ เช่น *Ha. taichui*, *Ha. pumilio*, *E. revolutum* และเนื้อเยื่อโฮสต์ประกอบด้วย *M. tuberculata* และ *Hemibagrus filamentus* โดยมีน้ำกลั่นเป็น negative control

3) ทดสอบความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดในการดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเจือจางดีเอ็นเอครั้งละ 10 เท่า โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นที่ความเข้มข้น 1 ng/μl โดยมีน้ำกลั่นเป็น negative control

5. การตรวจสอบพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai*

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ *H. mehrai* และผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติ คือ forward primer: 5'-CCGGACGCATCCACATTCG-3' และ reverse primer 5'-TCAGATGCATTGCCACATCAAGC-3' ใช้ตรวจสอบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ parapleurolophocercous cercariae ที่ได้จากหอยฝาเดียวจากจังหวัดสระแก้ว โดยใช้ระยะตัวเต็มวัยของ *H. mehrai* เป็น positive control และมีน้ำกลั่นเป็น negative control นอกจากนี้ยังมีการทำแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้ maximum likelihood ที่ 10,000 รอบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 จากไพรเมอร์ของ Barber, Mkoji, & Loker (2000) ด้วยโปรแกรม MEGA-X เพื่อยืนยันการระบุชนิดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียหลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จัดทำแผนที่แสดงการระบาด

การศึกษาค่าความชุกและการทำแผนที่ค่าความชุกของตัวอ่อนพยาธิใบไม้

คำนวณค่าความชุกของการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในโฮสต์ เพื่อแสดงให้เห็นถึงโอกาสหรือสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในพื้นที่ได้ โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{ค่าความชุก (\%)} = \frac{\text{จำนวนหอยที่ตรวจพบการติดพยาธิ (ตัว)}}{\text{จำนวนหอยที่ตรวจทั้งหมด (ตัว)}} \times 100$$

หลังจากนั้นนำค่าความชุกที่ได้ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างมาจัดทำแผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดและค่าความชุกของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ เพื่อแสดงถึงโอกาสที่จะเกิดการระบาดในพื้นที่ต่าง ๆ และเป็นแนวทางสำหรับวางแผน ฝั้ระวังและป้องกันการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ โดยทำแผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้โดยใช้โปรแกรม QGIS v.3.4.4 (freeware)



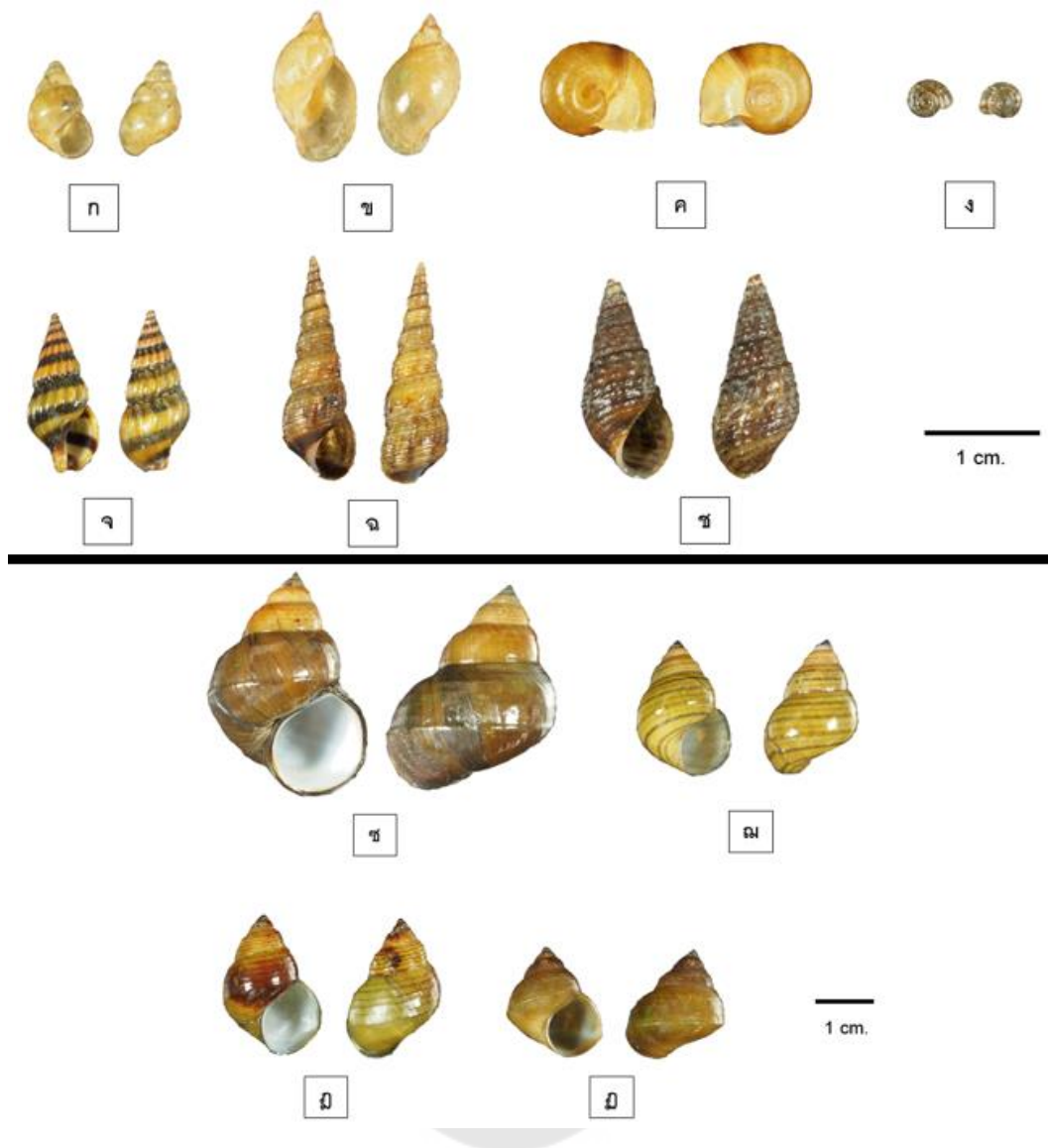
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างหอยฝาเดียวที่พบในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

จากการเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวจากจุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว และนำมาจัดจำแนกโดยใช้รูปวิธานของ Brandt (1947) พบว่าจากจำนวนหอยตัวอย่างทั้งสิ้น 4,750 ตัว จำแนกเป็น 6 วงศ์ 11 ชนิด ดังตาราง 4 และภาพประกอบ 11

ตาราง 4 หอยที่พบในจังหวัดสระแก้ว

วงศ์	แทกซา (taxa)
Bithyniidae	<i>Bithynia siamensis</i>
Thiaridae	<i>Melanoides tuberculata</i>
	<i>Tarebia granifera</i>
Viviparidae	<i>Filopaludina sumatrensis polygramma</i>
	<i>Filopaludina sumatrensis speciosa</i>
	<i>Filopaludina martensi</i>
Planorbidae	<i>Sinotaia</i> sp.
	<i>Indoplanorbis exustus</i>
	<i>Segmentina</i> sp.
Lymnaeidae	<i>Lymnaea auricularia</i>
Buccinidae	<i>Clea helena</i>



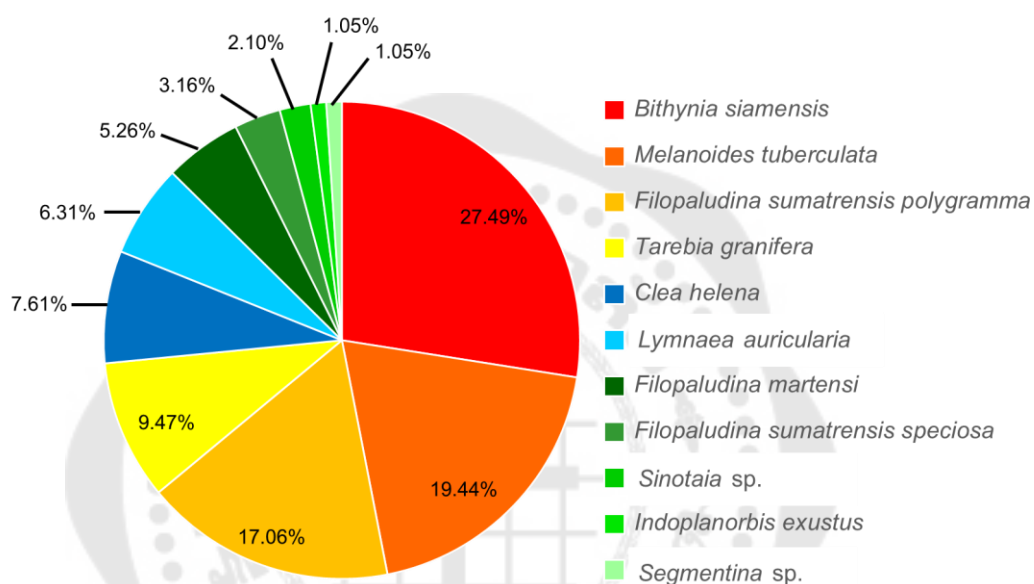
ภาพประกอบ 11 หอยที่พบในจังหวัดสระแก้ว

ก. *B. siamensis* ข. *L. auricularia* ค. *I. exustus* ง. *Segmentina* sp.

ฉ. *C. helena* ช. *M. tuberculata* ซ. *T. granifera* ฅ. *F. martensi*

ฌ. *F. sumatrensis polygramma* ฎ. *F. sumatrensis speciosa* ฏ. *Sinotaia* sp.

จากการเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวในจังหวัดสระแก้วพบว่าหอยฝาเดียวชนิด *B. siamensis* มีจำนวนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 27.49 รองลงมาเป็น *M. tuberculata*, *F. sumatrensis polygramma*, *T. granifera*, *C. helena*, *L. auricularia*, *F. martensi*, *F. sumatrensis speciosa*, *Sinotaia* sp., *I. exustus* และ *Segmentina* sp. คิดเป็นร้อยละ 19.44, 17.06, 9.47, 7.61, 6.31, 5.26, 3.16, 2.10, 1.05 และ 1.05 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 สัดส่วนหอยแต่ละชนิดที่พบในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้

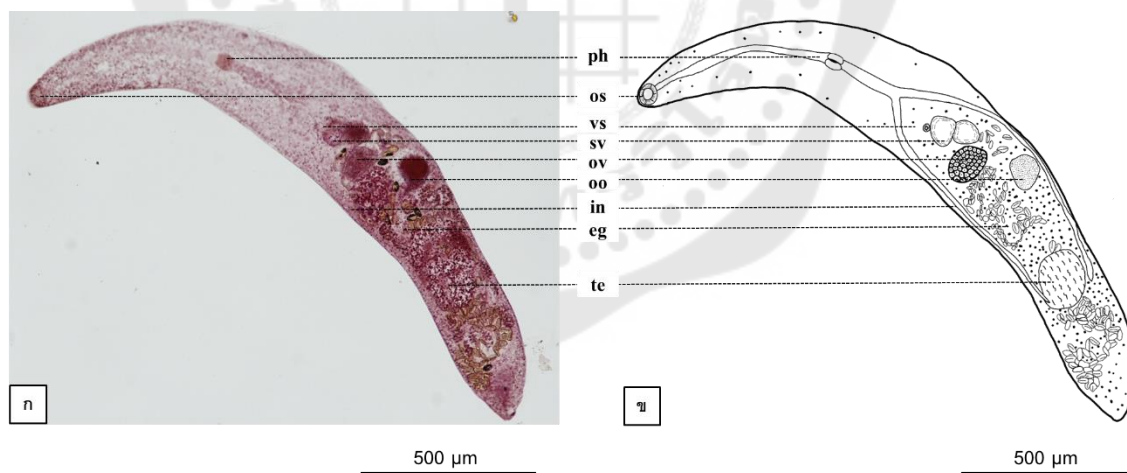
การศึกษาค้นคว้านี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่หนึ่งคือการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ระยะตัวเต็มวัยที่พบในปลาหลดเหลือง (*Hemibagrus filamentus*) และส่วนที่สองคือการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในพื้นที่จังหวัดสระแก้วโดยใช้วิธีทุบ โดยพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย จำนวนทั้งหมด 8 รูปแบบ ได้แก่ parapleurolophocercous cercaria, armatae cercaria, virgulate cercaria, brevifurcate apharyngeate cercaria, *Transversotrema* cercaria, amphistome cercariae, monostome cercaria และ distome cercaria นอกจากนี้ยังพบระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิชนิด *E. revolutum* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

1. พยาธิใบไม้ระยะตัวเต็มวัยชนิด *Haplorchoides mehrai*

โฮสต์เฉพาะ *Hemibagrus filamentus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีรูปร่างเป็นวงรีคล้ายกระสวยกว้าง 0.29 มิลลิเมตร ยาว 1.78 มิลลิเมตร มีออร์ัลซัคเกอร์ที่มีลักษณะกลมตั้งอยู่ปลายสุดทางด้านหน้าของลำตัว และมีเวนทรัลซัคเกอร์ขนาดเล็กกว่าออร์ัลซัคเกอร์อยู่ใกล้ทางแยกของทางเดินอาหาร มีระบบทางเดินอาหารมีปากผ่านไปยังทางเดินอาหารส่วนหน้าของคอหอย (prepharynx) มีคอหอยขนาดเล็ก ถัดลงไปเป็นหลอดอาหาร ซึ่งมีความยาวน้อยกว่า ทางเดินอาหารส่วนหน้าของคอหอยและแตกแขนงแบบ 2 ทาง เป็นลำไส้ซึ่งมีลักษณะยาวไปถึงด้านท้ายของลำตัว อวัยวะสืบพันธุ์อยู่กึ่งกลางค่อนไปทางด้านท้ายของลำตัว โดยมีอัณฑะ 1 ก้อนลักษณะกลมอยู่ระหว่างจุดสิ้นสุดของลำไส้ มีรังไข่ 1 อันมีลักษณะกลมมีไข่อยู่ในบริเวณด้านหน้าของอัณฑะ ผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิที่มีลักษณะกลม 2 อันอยู่หน้ารังไข่ใกล้กับทางแยกของทางเดินอาหาร มีคูโทปี 1 ก้อนอยู่ด้านหลังรังไข่ มีมดลูก อยู่ในช่องว่างของลำตัวและยึดไปทางด้านท้ายของลำตัว ภายในเต็มไปด้วยไข่จำนวนมาก ที่มีลักษณะเป็นรูปวงรี (ภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Haplorchoides mehrai*

(ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

อักษรย่อ ph: pharynx, os: oral sucker, vs: ventral sucker, sv: seminal vesicle,

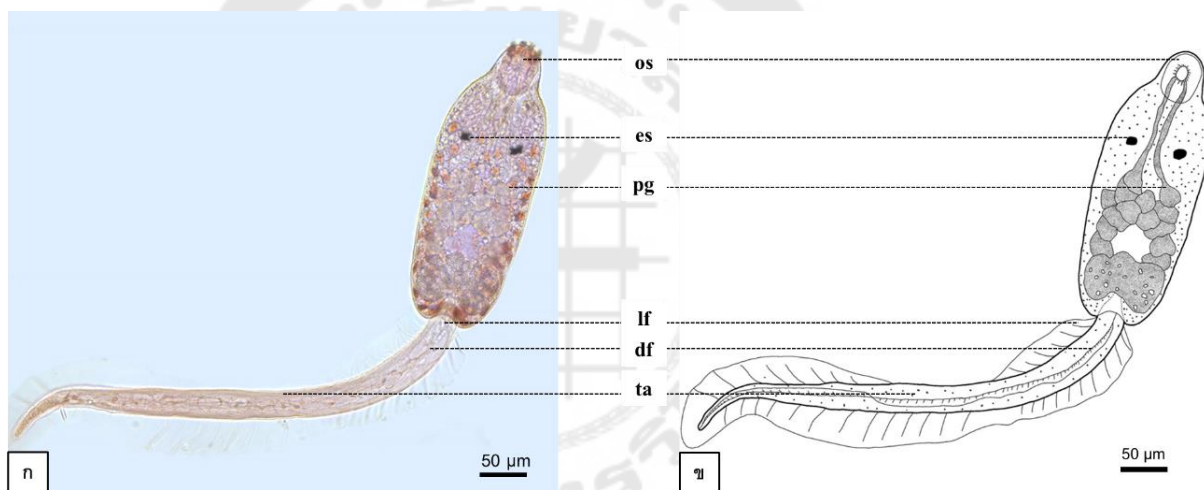
ov: ovary, oo: ootype, in: intestine, eg: egg, te: testis

2. *parapleurolophocercous cercaria*

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Melanoides tuberculata*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีรูปทรงรีกว้าง 102–125 (111 ± 10) ไมโครเมตร ยาว 260–308 (292 ± 13) ไมโครเมตร มีจุดตาขนาดใหญ่ 1 คู่อยู่บริเวณ 1 ใน 3 ของลำตัว มีออร์ัลซัคเกอร์ที่มีลักษณะกลม อยู่บริเวณส่วนหน้าของลำตัว บริเวณเวนทรัลซัคเกอร์ มีต่อมพีนีเทอร์ชั้น 7 คู่กระจายอยู่บริเวณกลางลำตัว หางยาวมีความยาวมากกว่าลำตัวมีลักษณะเรียวยาว ซึ่งมีความกว้าง 32–42 (37 ± 4) ไมโครเมตร ยาว 403–458 (427 ± 19) ไมโครเมตร โดยที่หางจะมีลักษณะพิเศษคือคืบหางทั้งด้านข้างและตรงกลางสันหางครอบคลุมตลอดหาง (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *parapleurolophocercous cercaria*

(ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

อักษาย่อ os: oral sucker, es: eye spot, pg: penetration gland,

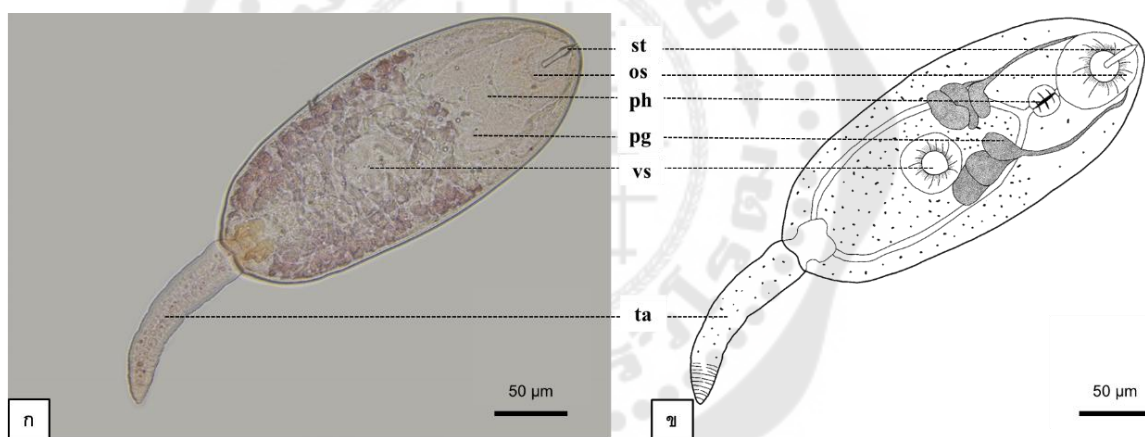
lf: lateral fin-fold, df: dorso-ventral fin-fold, ta: tail

3. armatae cercaria

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Bithynia siamensis*, *Melanoides tuberculata* และ *Filopaludina sumatrensis polygramma*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะรีมีความกว้าง 100–115 (106 ± 6) ไมโครเมตร ยาว 230–260 (245 ± 12) ไมโครเมตร มีออร์ลซัคเกอร์ที่มีลักษณะกลมอยู่บริเวณส่วนหน้าของลำตัว โดยบริเวณออร์ลซัคเกอร์จะมีเข็มซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเซอร์คาเรียรูปแบบนี้ มีคอคอยอยู่ติดกับออร์ลซัคเกอร์ทางเดินอาหารแตกแขนงแบบ 2 ทาง โดยจะแตกแขนงบริเวณกึ่งกลางระหว่างคอคอยและเวนทรัลซัคเกอร์ ซึ่งมีลักษณะกลมและมีขนาดเล็กกว่าออร์ลซัคเกอร์ มีต่อมพีเนเทรชัน 3 คู่ อยู่บริเวณกลางลำตัว มีหางสั้นกว่าลำตัวมีความกว้าง 23–27 (25 ± 2) ไมโครเมตร ยาว 102–120 (109 ± 7) ไมโครเมตร และไม่มีครีบบริเวณหาง (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ armatae cercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

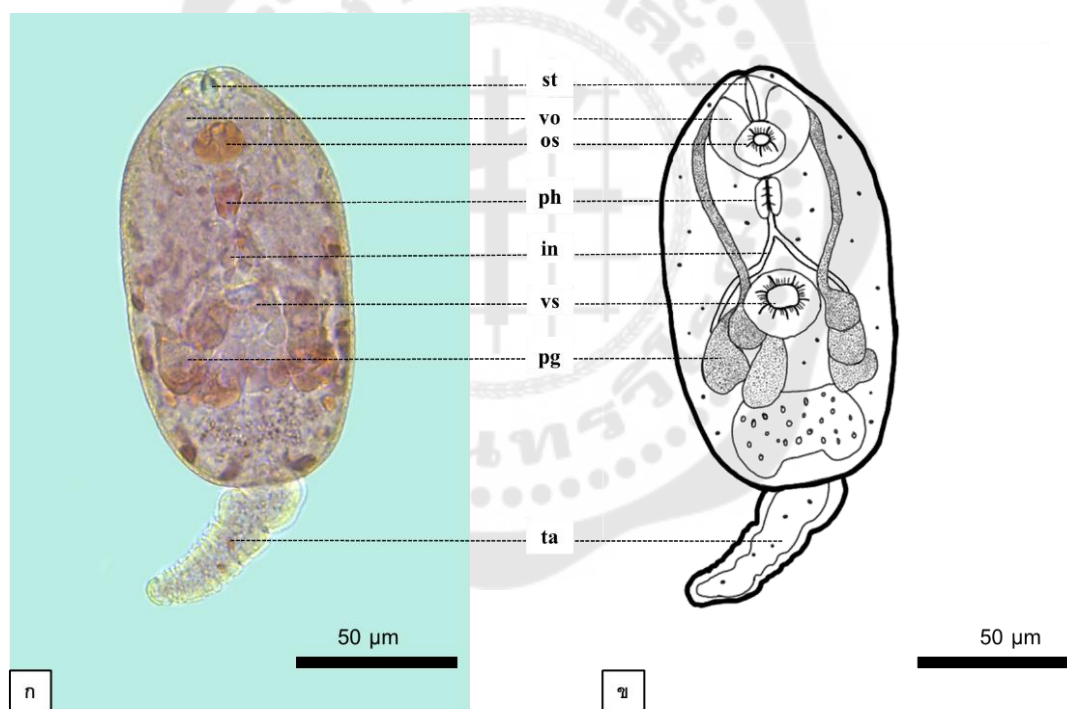
อักษรย่อ st: stylet, os: oral sucker, ph: pharynx, pg: penetration gland,
vs: ventral sucker, ta: tail

4. virgulate cercaria

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Bithynia siamensis*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะรีมีความกว้าง 72–89 (82±7) ไมโครเมตร ยาว 118–147 (136±12) ไมโครเมตร มีออร์ัลซัคเกอร์ที่มีลักษณะกลมอยู่บริเวณส่วนหน้าของลำตัว โดยบริเวณออร์ัลซัคเกอร์จะมีเข็มและมีอวัยวะพิเศษที่เรียกว่า เวอร์กูลา ที่มีลักษณะคล้ายปีกผีเสื้ออยู่ติดกับเข็ม มีคอหอยอยู่ติดกับออร์ัลซัคเกอร์ ทางเดินอาหารแตกแขนงแบบ 2 ทาง โดยจะแตกแขนงบริเวณกึ่งกลางระหว่างคอหอยและเวนทรัลซัคเกอร์ ที่มีขนาดใหญ่กว่าออร์ัลซัคเกอร์ มีต่อมพินีเทรชัน 3 คู่ อยู่บริเวณ 3 ใน 4 ของลำตัว และมีหางสั้นกว่าลำตัวซึ่งมีความกว้าง 20–32 (26±4) ไมโครเมตร ยาว 47–83 (72±14) ไมโครเมตร และไม่มีครีบบริเวณหาง (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ virgulate cercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

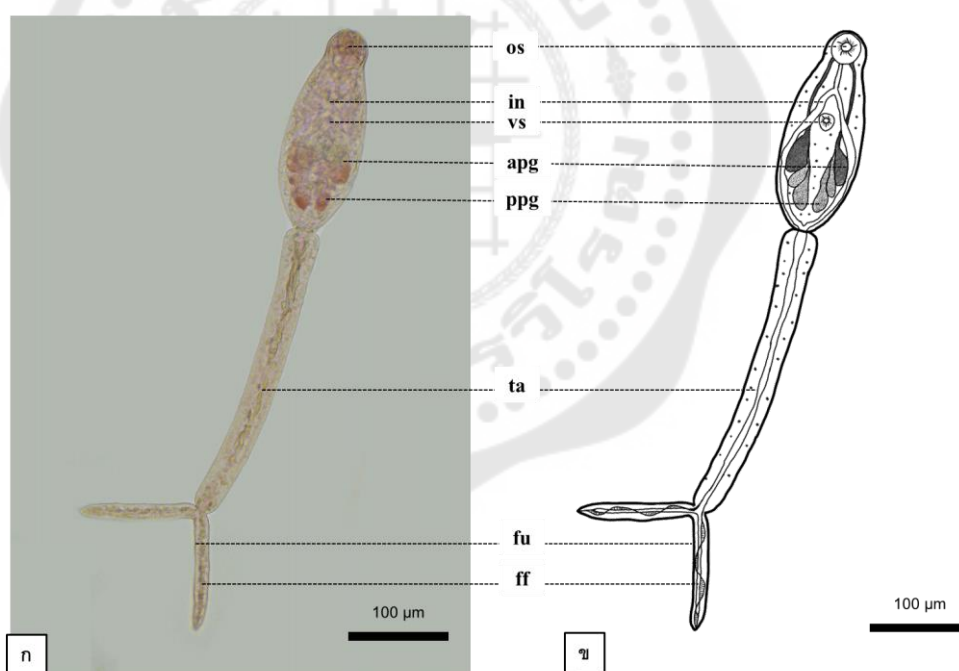
อักษาย่อ st: stylet, vo: virgulate organ, os: oral sucker, ph: pharynx, in: intestine,
vs: ventral sucker, pg: penetration gland, ta: tail

5. brevifurcate apharyngeate cercaria

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Melanoides tuberculata* และ *Lymnaea auricularia*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะรีมีความกว้าง 77–87 (81 ± 4) ไมโครเมตร ยาว 188–212 (200 ± 9) ไมโครเมตร มีออร์ลซัคเกอร์ลักษณะกลมบริเวณส่วนหน้าของลำตัว ไม่มีคอหอย ทางเดินอาหารแตกแขนงแบบ 2 ทางซึ่งแตกแขนงบริเวณระหว่างออร์ลซัคเกอร์และเวนทรัลซัคเกอร์ โดยเวนทรัลซัคเกอร์ มีขนาดเล็กกว่าออร์ลซัคเกอร์ มีต่อมพีนีเทรชัน 2 รูปแบบคือต่อมพีนีเทรชันส่วนหน้า (anterior penetration glands) และต่อมพีนีเทรชันส่วนหลัง (posterior penetration glands) และมีหางยาวกว่าลำตัวซึ่งมีความกว้าง 30–45 (37 ± 6) ไมโครเมตร ยาว 387–430 (405 ± 17) ไมโครเมตร ปลายหางแตกออกเป็น 2 แฉกและมีครีบบริเวณปลายหาง (furcal fin-fold) (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ brevifurcate apharyngeate cercaria

(ก.ภาพถ่าย และ ข.ภาพวาด)

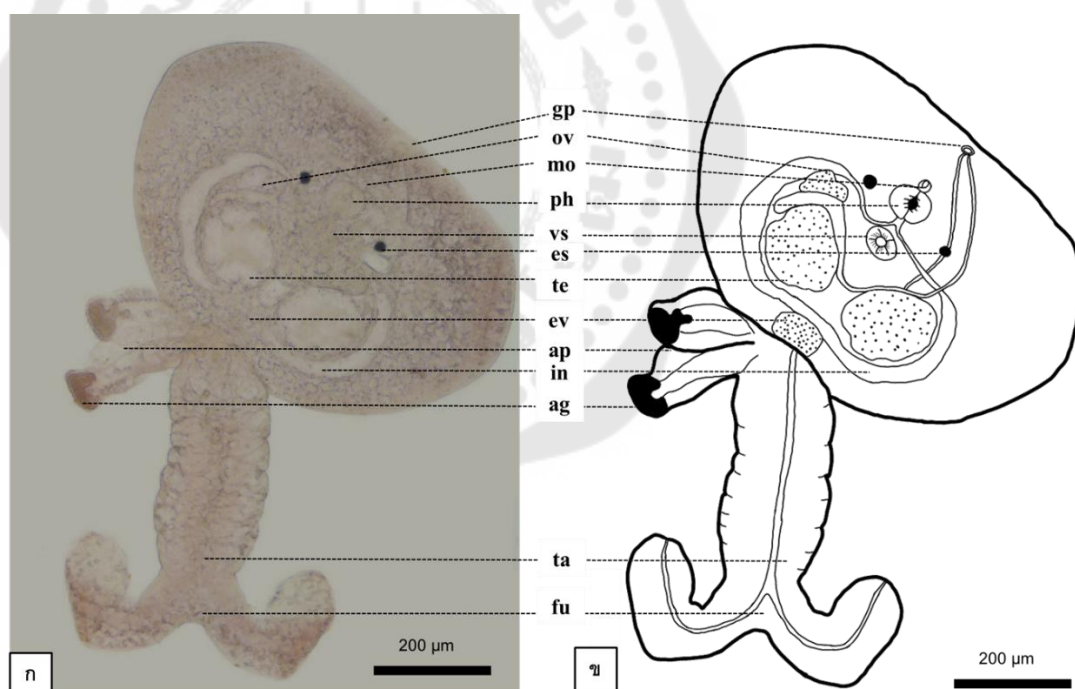
อักษาย่อ os: oral sucker, in: intestine, vs: ventral sucker, apg: anterior penetration glands, ppg: posterior penetration glands ta: tail, fu: furca, ff: furcal fin-fold

6. *Transversotrema cercaria*

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Tarebia granifera*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะเป็นรูปจานมีความกว้าง 698–793 (736±49) ไมโครเมตร ยาว 427–516 (467±39) ไมโครเมตร มีจุดตา 1 คู่ ระหว่างจุดตามีคอหอยมีขนาดใหญ่อยู่ติดกับปาก ไม่มีออร์ลซั๊กเกอร์ มีเวนทรัลซั๊กเกอร์ อยู่บริเวณกลางลำตัว มีช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ (genital pore) อยู่หน้าสุดของส่วนหน้า มีรังไข่ 1 อันใกล้จุดตา และอัณฑะ 1 คู่อยู่บริเวณ 2 ใน 3 ของลำตัว มีกระเพาะขับถ่ายของเสียอยู่ส่วนท้ายของลำตัว หางมีความยาวมากกว่าลำตัวซึ่งมีความกว้าง 169–185 (165±11) ไมโครเมตร ยาว 726–828 (779±42) ไมโครเมตร ที่ปลายหางแตกออกเป็น 2 แฉก และมีรยางค์ (appendages) ค ล้ายแขนอยู่บริเวณ โคนหางที่ปลายรยางค์ มีอวัยวะช่วยในการยึดเกาะ (adhesive gland) (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Transversotrema cercaria*

(ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

อักษรย่อ gp: genital pore, ov: ovary, mo: mouth, ph: pharynx, vs: ventral sucker,

es: eye spot, te: testis, ev: excretory vesicle, ap: appendages, in: intestine,

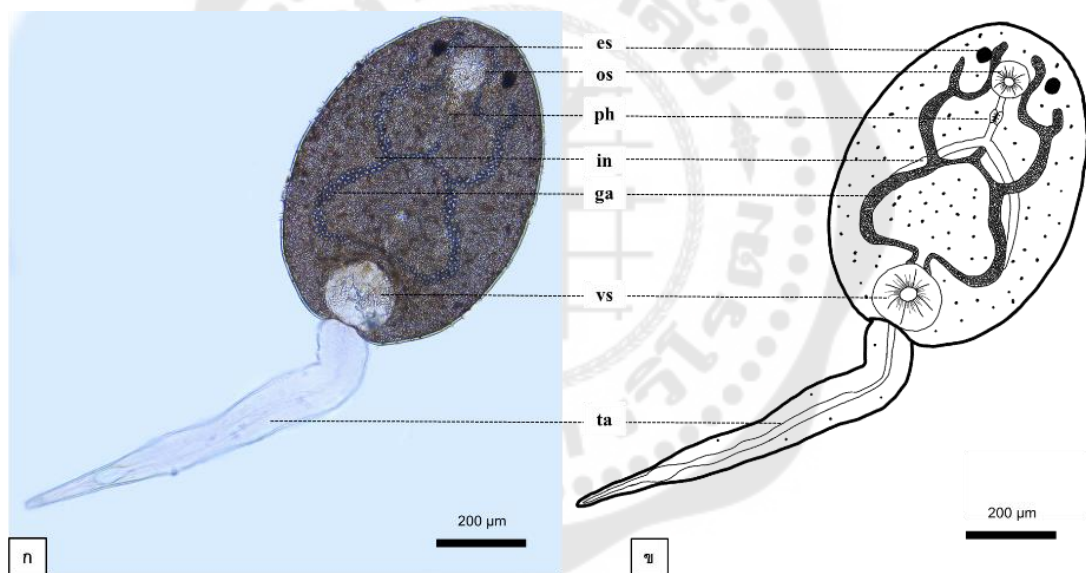
ag: adhesive gland, ta: tail, fu: furca

7. amphistome cercaria

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Bithynia siamensis* และ *Indoplanorbis exustus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะรูปไข่มีความกว้าง 492–547 (510 ± 22) ไมโครเมตร ยาว 670–732 (693 ± 24) ไมโครเมตร มีจุดตาขนาดใหญ่ 1 คู่อยู่บริเวณส่วนหน้าของลำตัว คอหอยมีขนาดเล็ก มีทางเดินอาหารแตกแขนงแบบ 2 ทาง ออร์ลซัคเกอร์ลักษณะกลมอยู่ส่วนหน้าของลำตัวขณะที่เวนทรลซัคเกอร์ อยู่บริเวณโคนหางซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าออร์ลซัคเกอร์ มีเจนนิตัลเอเทรียม (genital atrium) ซึ่งเป็นทางผ่านของเซลล์สืบพันธุ์วางตัวยาวตลอดลำตัวต่อกับเวนทรลซัคเกอร์ หางมีความยาวมากกว่าลำตัว ซึ่งมีความกว้าง 92–116 (102 ± 9) ไมโครเมตร ยาว 833–925 (891 ± 35) ไมโครเมตร ไม่มีครีบบริเวณหาง (ภาพประกอบ 19)



ภาพประกอบ 19 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ amphistome cercaria

(ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

อักษรย่อ es: eye spot, os: oral sucker, ph: pharynx, in: intestine,

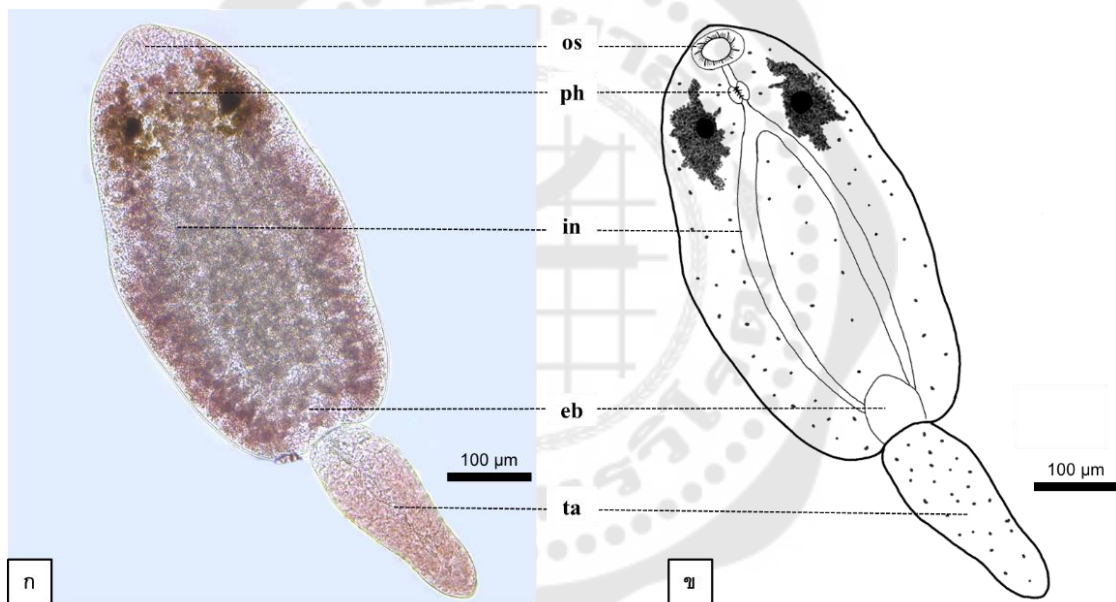
ga: genital atrium, vs: ventral sucker, ta: tail

8. monostome cercaria

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Filopaludina martensi*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะรีมีความกว้าง 203–272 (234 ± 28) ไมโครเมตร ยาว 453–603 (517 ± 58) ไมโครเมตร ออรัลซัคเกอร์ลักษณะกลมอยู่ส่วนหน้าสุดของลำตัว มีจุดตาขนาดใหญ่ 1 คู่ ซึ่งมีรงควัตถุ (pigment) กระจายอยู่บริเวณจุดตาและคอหอย ไม่มีเวนทรัลซัคเกอร์ ทางเดินอาหารแยกออกเป็น 2 ทาง มีกระเพาะขับถ่ายของเสียอยู่ส่วนท้ายของลำตัว หางมีลักษณะหนาและสั้นกว่าลำตัวซึ่งมีความกว้าง 62–112 (90 ± 19) ไมโครเมตร ยาว 225–350 (281 ± 56) ไมโครเมตร ไม่มีครีบบริเวณหาง (ภาพประกอบ 20)



ภาพประกอบ 20 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ monostome cercaria

(ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

อักษรย่อ os: oral sucker, ph: pharynx, es: eye spot, in: intestine,

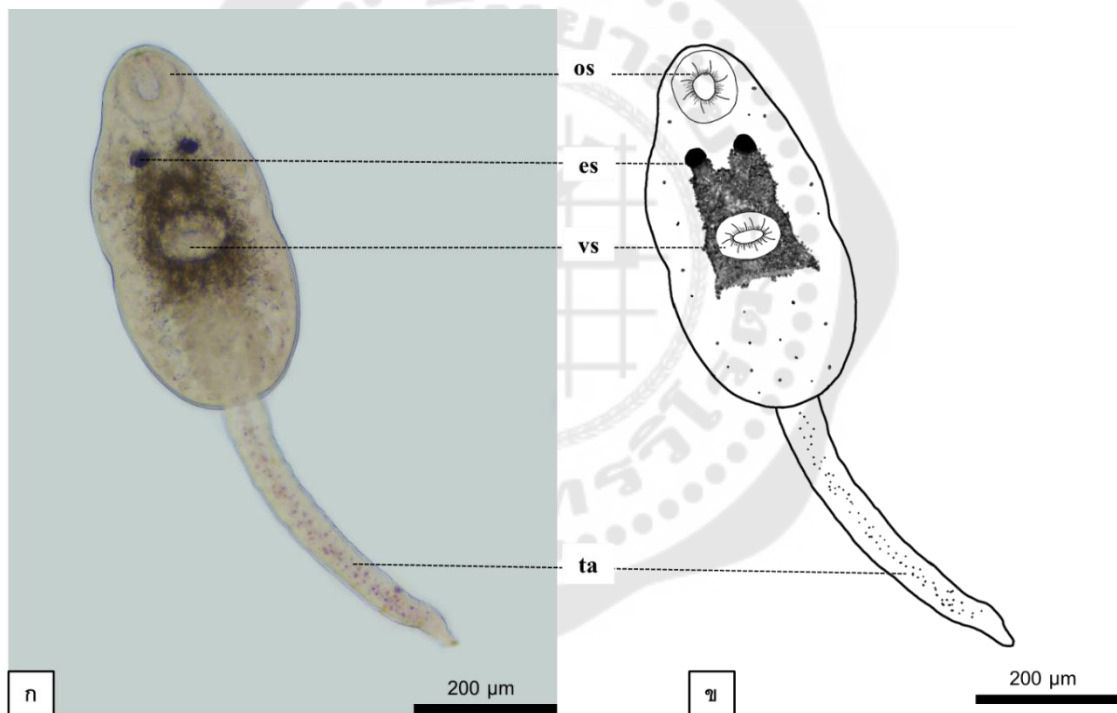
eb: excretory bladder, vs: ventral sucker, ta: tail

9. distome cercaria

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Bithynia siamensis*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลำตัวมีลักษณะรีมีความกว้าง 243–297 (265 ± 23) ไมโครเมตร ยาว 496–573 (540 ± 32) ไมโครเมตร ออรัลซัคเกอร์มีลักษณะกลมอยู่ส่วนหน้าสุดของลำตัว มีเวนทรัลซัคเกอร์ อยู่บริเวณกลางลำตัวมีขนาดใกล้เคียงกับออรัลซัคเกอร์ มีจุดตาขนาดใหญ่ 1 คู่ ซึ่งมีรงควัตถุกระจาย อยู่บริเวณจุดตาและเวนทรัลซัคเกอร์ บริเวณกลางลำตัว หางและลำตัวมีความยาวใกล้เคียงกันมีลักษณะเรียวยาว ซึ่งมีความกว้าง 62–77 (68 ± 6) ไมโครเมตร ยาว 455–493 (478 ± 16) ไมโครเมตร ไม่มีครีบหาง (ภาพประกอบ 21)



ภาพประกอบ 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ distome cercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

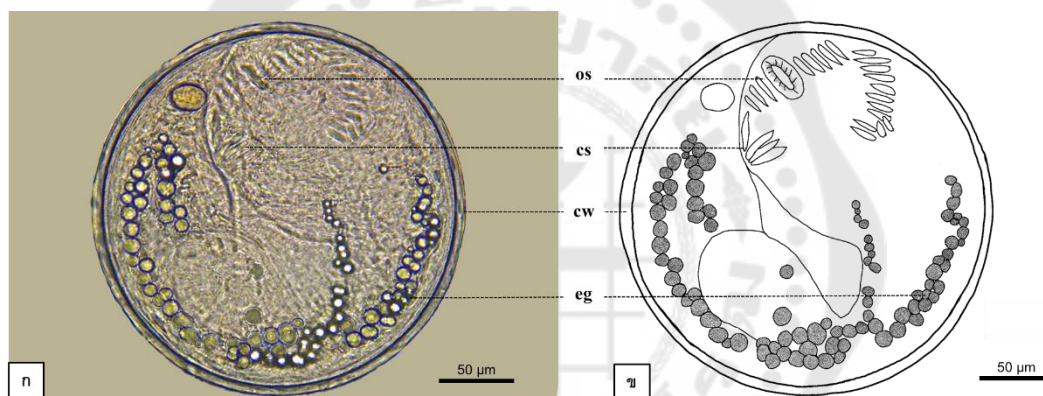
อักษรย่อ os: oral sucker, es: eye spot, vs: ventral sucker, ta: tail

พยาธิใบไม้ระยะ metacercaria ชนิด *E. revolutum*

โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง *Filopaludina sumatrensis polygramma*, *Filopaludina sumatrensis speciosa* และ *Filopaludina martensi*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะเป็นรูปทรงกลมมีผนังใส (cyst wall) 2 ชั้นล้อมรอบตัวอ่อนพยาธิมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 235–251 (244 ± 6) ไมโครเมตร มีออร์ลซัคเกอร์อยู่ส่วนหน้าสุด และมีคอลลาร์ ปลายอยู่บริเวณส่วนหน้าของพยาธิจำนวน 37 หนามซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่น่าจำเพาะและใช้ในการจัดจำแนกของพยาธิใบไม้ชนิด *E. revolutum* บริเวณลำตัวพบ excretory granule เรียงตัวเป็นแนวยาวทั้งสองข้าง (ภาพประกอบ 22)

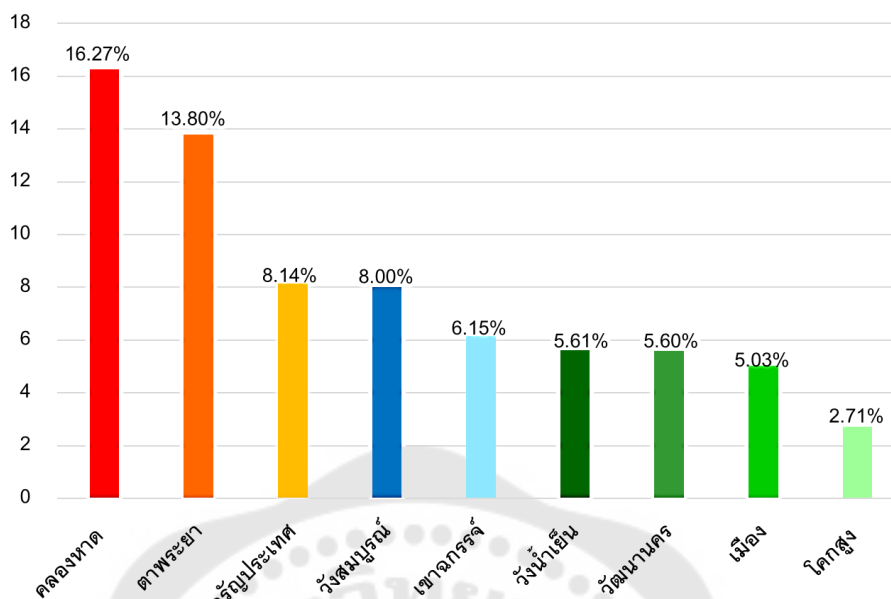


ภาพประกอบ 22 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ metacercaria (ก. ภาพถ่าย และ ข. ภาพวาด)

อักษรย่อ os: oral sucker, cs: collar spine, cw: cyst wall, eg: excretory granule

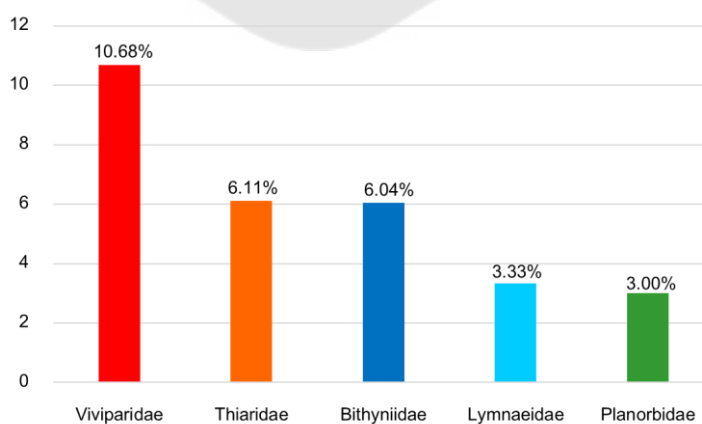
ค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้ในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

การตรวจสอบค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว พบว่ามีค่าความชุกรวม (total prevalence) คิดเป็นร้อยละ 6.90 โดยอำเภอคลองหาดมีค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 16.27 ลำดับถัดไปเป็น อำเภอตาพระยา, อรัญประเทศ, วังสมบูรณ, เขาฉกรรจ์, วังน้ำเย็น, วัฒนานคร, เมือง และโคกสูง โดยมีค่าความชุกรวมในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้เท่ากับ ร้อยละ 13.80, 8.14, 8.00, 6.15, 5.61, 5.6, 5.03 และ 2.71 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 23)



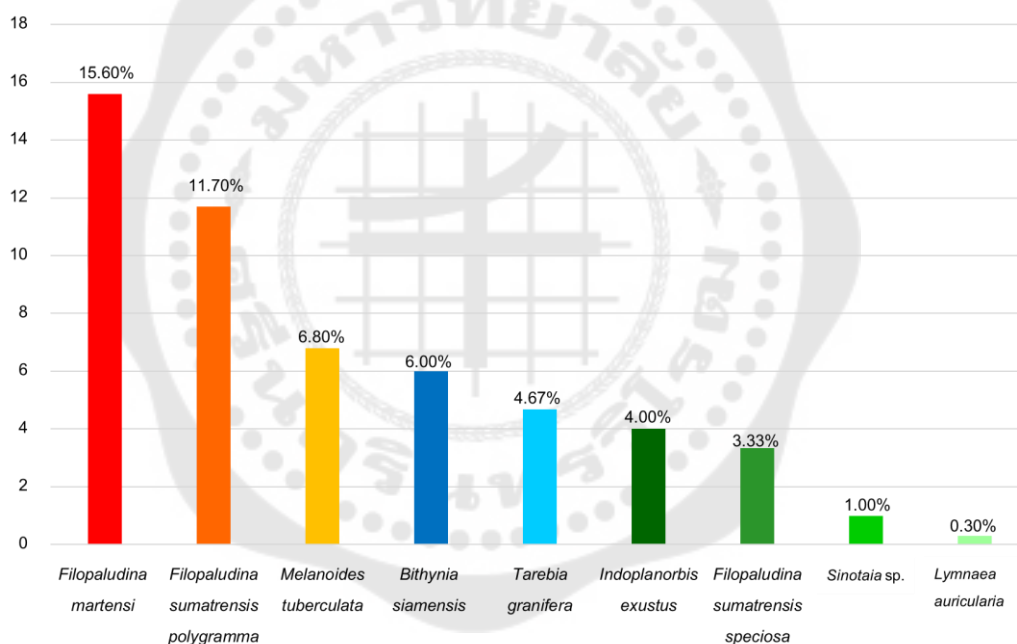
ภาพประกอบ 23 ค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้แต่ละอำเภอในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

จากการตรวจสอบค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้จากหอยฝาเดียวในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว พบว่าจากจำนวนหอยฝาเดียวตัวอย่างทั้งสิ้น 4,750 ตัว จำแนกออกเป็น 6 วงศ์ พบว่าหอยฝาเดียววงศ์ Viviparidae มีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 10.68 รองลงมาเป็นหอยฝาเดียววงศ์ Thiaridae, Bithyniidae, Lymnaeidae และ Planorbidae มีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้เท่ากับ ร้อยละ 6.11, 6.04, 3.33, 3.00 ตามลำดับ ในขณะที่หอยฝาเดียววงศ์ Buccinidae ไม่พบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ (ภาพประกอบ 24)



ภาพประกอบ 24 ค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้ในหอยแต่ละวงศ์จากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

จากการตรวจสอบค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้จากหอยฝาเดียวในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว พบว่าหอยฝาเดียวชนิด *F. martensi* มีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียและเมตาเซอร์คาเรียสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 15.6 รองลงมาเป็นหอยฝาเดียวชนิด *F. sumatrensis polygramma*, *M. tuberculata*, *B. siamensis* *T. granifera*, *I. exustus*, *F. sumatrensis speciosa*, *Sinotaia* sp., *L. auricularia* มีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้เท่ากับร้อยละ 11.7, 6.8, 6.00, 4.67, 4.00, 3.33, 1.00 และ 0.30 ตามลำดับ ในขณะที่หอยฝาเดียวชนิด *Segmentina* sp. และ *C. helena* ไม่พบการติดพยาธิใบไม้ (ภาพประกอบ 25) ซึ่งระยะเมตาเซอร์คาเรียจะพบในหอยสกุล *Filopaludina* เท่านั้น และเมื่อพิจารณาค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียในหอยสกุลนี้พบว่ามีค่าความชุกเท่ากับร้อยละ 11.48

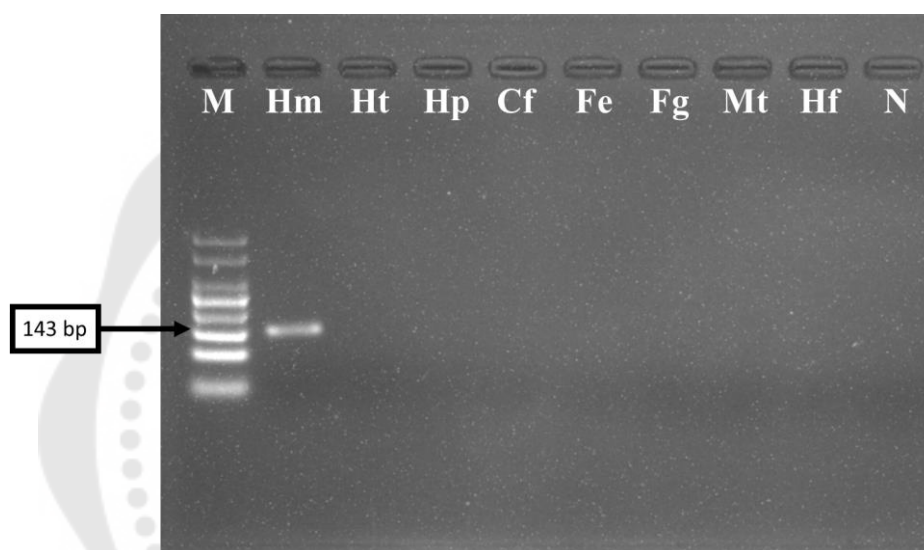


ภาพประกอบ 25 ค่าความชุกของการติดพยาธิใบไม้ในหอยแต่ละชนิดจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

การระบุชนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา

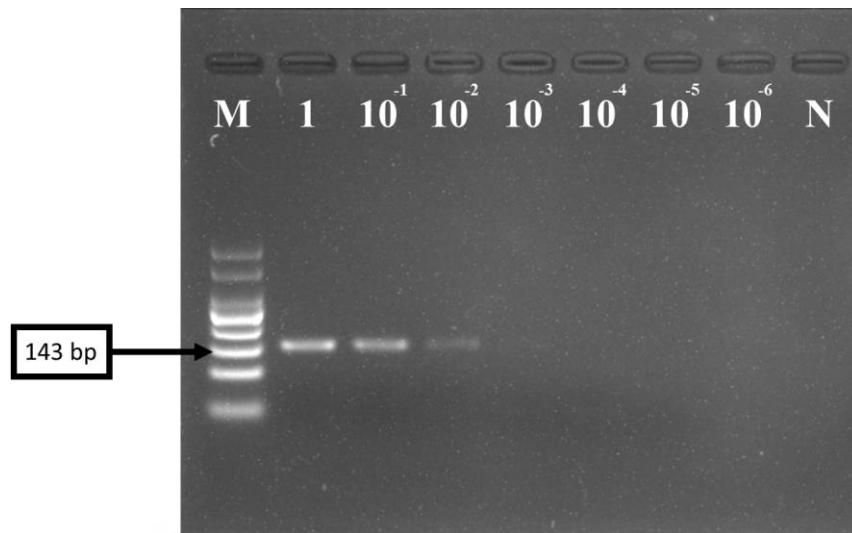
จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* มีความจำเพาะต่อ *H. mehrai* โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้าม (cross-amplification) กับ ดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกับ *H. mehrai* ได้แก่ *Ha. taichui*, *Ha. pumilio*,

C. formosanus, *Fi. elongatus* และ *Fa. gigantica* และโฮสต์กึ่งกลาง และโฮสต์เฉพาะของพยาธิ ได้แก่ *M. tuberculata* และ *Hemibagrus filamentus* (ภาพประกอบ 26) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 143 คู่เบส สำหรับความไวของไพรเมอร์นั้นตรวจสอบโดยใช้วิธีการเจือจางดีเอ็นเอเป็นสิบเท่า (tenfold serial dilution) โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นคือ 1 ng/ μ l พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* เท่ากับ 0.01 ng/ μ l (ภาพประกอบ 27)



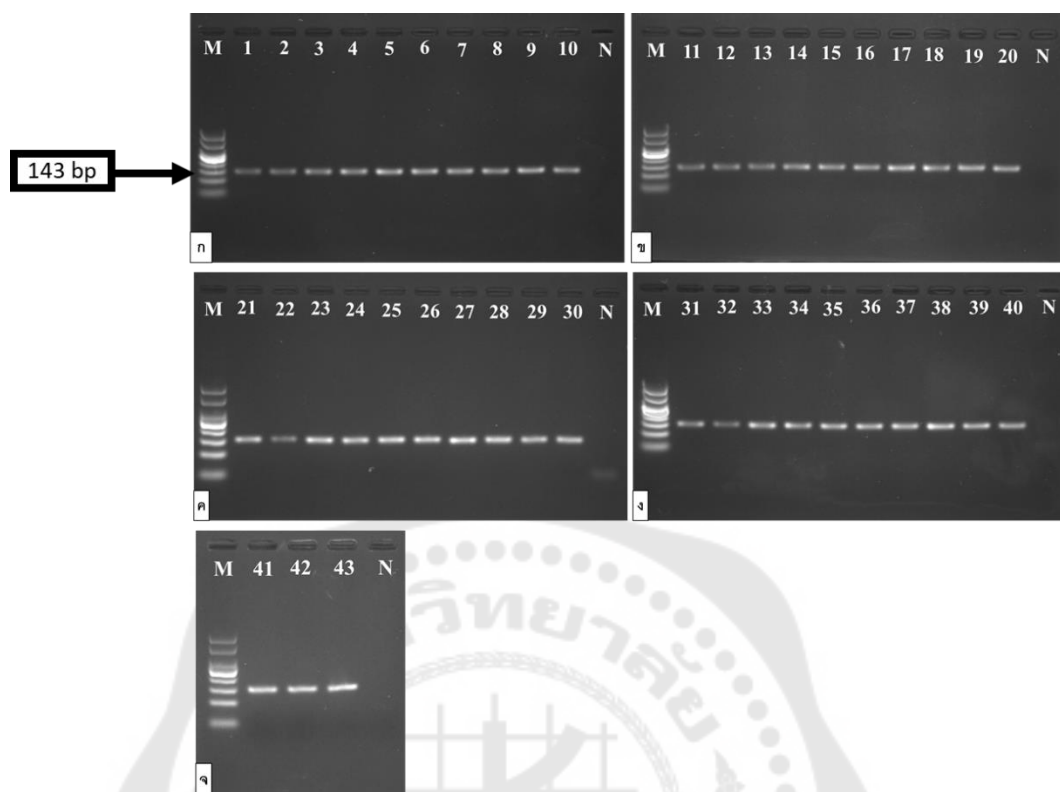
ภาพประกอบ 26 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

M: 50bp ladder, Hm: *Haplorchoides mehrai*, Ht: *Haplorchis taichui*,
 Hp: *Haplorchis pumilio*, Cf: *Centrocestus formosanus*, Fe: *Fischoederius elongatus*,
 Fg: *Fasciola gigantica*, Mt: *Melanoides tuberculata*, Hf: *Hemibagrus filamentus*
 และ N: negative control (distilled water)



ภาพประกอบ 27 การทดสอบความไวของไพรเมอร์โดยการเจือจาง 10 เท่า
 M: 50bp ladder, 1 ng/μl (ดีเอ็นเอตั้งต้น), 10⁻¹ ng/μl, 10⁻² ng/μl, 10⁻³ ng/μl, 10⁻⁴ ng/μl, 10⁻⁵ ng/μl, 10⁻⁶ ng/μl และ N: negative control (distilled water)

หลังจากนั้นเมื่อนำไพรเมอร์ที่ผ่านการทดสอบไปใช้สำหรับการระบุชนิดของตัวอ่อนระยะเซอ์คาเรียรูปแบบ parapleurolophocercous cercariae พบว่าตัวอย่างของเซอ์คาเรียทั้งหมด (42 ตัวอย่าง) ที่พบในหอยฝาเดียวชนิด *M. tuberculata* จากจังหวัดสระแก้ว เป็นพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* (ภาพประกอบ 28)

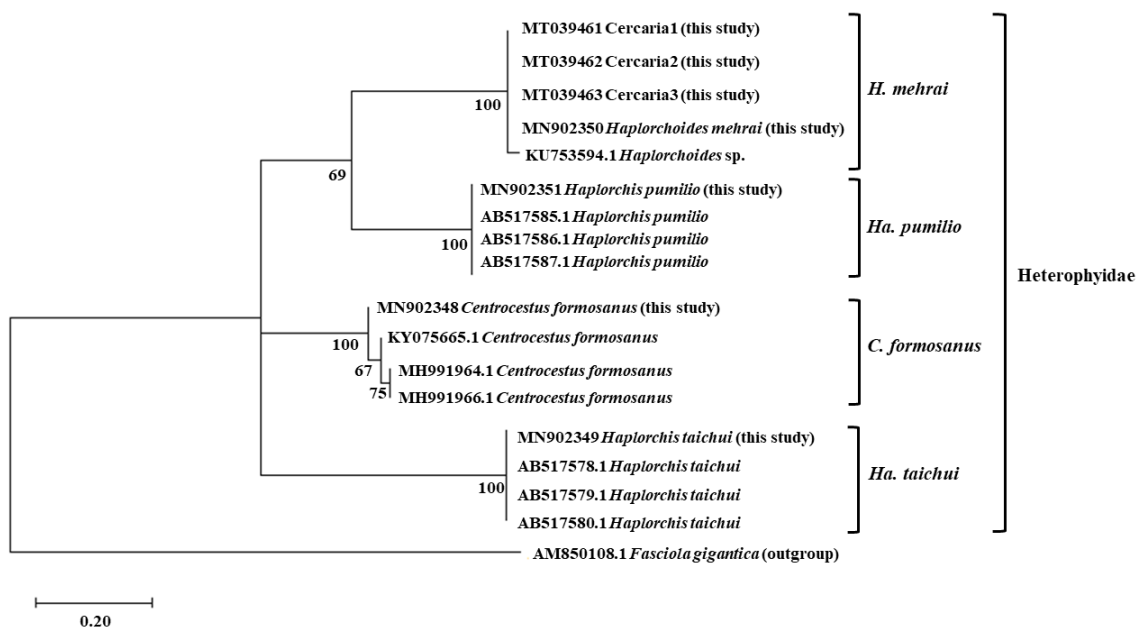


ภาพประกอบ 28 การตรวจสอบตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ
ต่อพยาธิใบไม้ชนิด *Haplorchoides mehrai*

โดย (ก) – (จ) M: 50bp ladder, 1 : ระยะตัวเต็มวัยของ *Haplorchoides mehrai*, 2-43 :
parapleurolophocercous cercariae ที่พบในหอยชนิด *M. tuberculata* จากจังหวัดสระแก้ว
และ N: negative control (distilled water)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ
parapleurolophocercous cercariae ที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิในวงศ์
Heterophyidae ที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *H. mehrai* (ร้อยละ
98.08) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่วิเคราะห์จากแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอ
ไทด์บริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ทั้งระยะเซอร์คาเรียและตัวเต็มวัยร่วมกับพยาธิ
ใบไม้สกุลอื่นในวงศ์ Heterophyidae โดยใช้ maximum likelihood ที่ 10,000 รอบ โดยตัวอ่อน
พยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ parapleurolophocercous cercariae ที่พบถูกจัดอยู่ในกลุ่ม
เดียวกับพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100 ซึ่งแยกจากพยาธิใบไม้ชนิด
อื่นในวงศ์ Heterophyidae แบบ monophyletic ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ

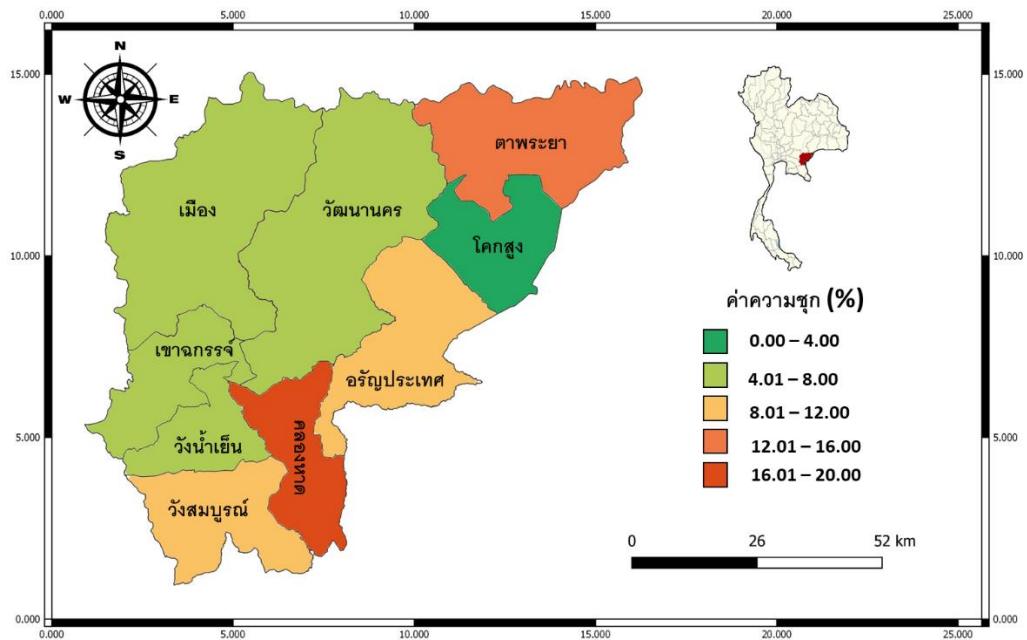
เชอร์คาเรียรูปแบบ parapleurolophocercous cercariae (MT039461, MT039462 และ MT039463) เป็นพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* (ภาพประกอบ 29)



ภาพประกอบ 29 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเชอร์คาเรียและระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* โดยใช้ maximum likelihood ที่ 10,000 รอบ

การจัดทำแผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

จากการนำค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้ของแต่ละจุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดสระแก้วมาสร้างเป็นแผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียว โดยมีความชุกรวมของการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในจังหวัดสระแก้วแบ่งออกเป็น 5 ช่วง และยังมี การแบ่งสีตามช่วงของค่าความชุก เพื่อแสดงถึงปริมาณของค่าความชุกที่เพิ่มขึ้นแต่ละระดับ โดยพื้นที่ของอำเภอคลองหาดมีค่าความชุกสูงสุดที่ค่า 16.27 เป็นพื้นที่ที่สีส้มเข้ม จากนั้นเป็นพื้นที่ของอำเภอตาพระยา มีช่วงของค่าความชุกที่ 13.80 เป็นพื้นที่ที่สีส้มอ่อน อันดับสามอำเภออรัญประเทศและวังสมบูรณ์ซึ่งมีช่วงค่าความชุกที่ 8.14 และ 8.00 ตามลำดับ เป็นพื้นที่สีเหลือง (ภาพประกอบ 30)



ภาพประกอบ 30 แผนที่แสดงสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้
ในหอยฝาดียวจากพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

จากการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ในจังหวัดสระแก้ว พบว่าพื้นที่อำเภอตาพระยาและอำเภอวังน้ำเย็นของจังหวัดสระแก้วมีการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercaria* ในหอยชนิด *M. tuberculata* โดยผลเป็นบวก (positive result) ในการทดสอบเพื่อระบุว่าเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ซึ่งมีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียเท่ากับร้อยละ 3.36 และ 1.19 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากโฮสต์ที่เป็นหอยน้ำจืดชนิด *M. tuberculata* ซึ่งในแผนที่แทนด้วยพื้นที่สีแดงและสีส้ม (ภาพประกอบ 31)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สถานการณ์การระบาดและการระบุชนิดเชิงโมเลกุลของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *Haplorchoides mehrai* ในจังหวัดสระแก้ว สามารถสรุปผลการดำเนินงานวิจัยได้ดังหัวข้อต่อไปนี้

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวจากจุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว 64 จุด เก็บตัวอย่าง และนำมาจัดจำแนกโดยใช้รูปวิธานของ Brandt (1974) พบว่าจากจำนวนตัวอย่างหอยฝาเดียวทั้งหมด 4,750 ตัว จำแนกเป็น 6 วงศ์ 11 ชนิด คือ (1) วงศ์ Bithyniidae ได้แก่ *Bithynia siamensis* (2) วงศ์ Thiaridae ได้แก่ *Melanooides tuberculata* และ *Tarebia granifera* (3) วงศ์ Viviparidae ได้แก่ *Filopaludina sumatrensis polygramma*, *Filopaludina sumatrensis speciosa*, *Filopaludina martensi* และ *Sinotaia* sp. (4) วงศ์ Planorbidae ได้แก่ *Indoplanorbis exustus* และ *Segmentina* sp. (5) วงศ์ Lymnaeidae ได้แก่ *Lymnaea auricularia* (6) วงศ์ Buccinidae ได้แก่ *Clea helena* ซึ่งการศึกษาการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในจังหวัดสระแก้ว ด้วยวิธีหุบบพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียจำนวน 8 รูปแบบ ได้แก่ *parapleurolophocercous cercaria*, *armatae cercaria*, *virgulate cercaria*, *brevifurcate apharyngeate cercaria*, *Transversotrema cercaria*, *amphistome cercariae*, *monostome cercaria* และ *distome cercaria* นอกจากนี้ยังพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ชนิด *Echinostoma revolutum* เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ พบว่ามีค่าความชุกรวมคิดเป็นร้อยละ 6.9 โดยอำเภอคลองหาดมีค่าความชุกรวมในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 16.27 รองลงมาเป็น ตาพระยา, อรัญประเทศ, วังสมบูรณ์, เขาฉกรรจ์, วังน้ำเย็น, วัฒนานคร, เมืองสระแก้ว และโคกสูง ตามลำดับ โดยมีค่าความชุกรวมในการติดพยาธิใบไม้เท่ากับ ร้อยละ 13.80, 8.14, 8.00, 6.15, 5.61, 5.60, 5.02 และ 2.71 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้ในหอยวงศ์ต่าง ๆ พบว่าหอยฝาเดียวในวงศ์ Viviparidae มีค่าความชุกในการติดพยาธิใบไม้สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 10.68 ในขณะที่หอยฝาเดียวในวงศ์ Thiaridae, Bithyniidae, Lymnaeidae และ Planorbidae มีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้เท่ากับ ร้อยละ 6.11, 6.04, 3.33, 3.00 ตามลำดับ ในขณะที่หอยฝาเดียววงศ์ Buccinidae ไม่พบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ สำหรับการระบุชนิดเชิงโมเลกุล

พบว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercaria* ทั้งหมดที่พบในจังหวัดสระแก้วเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการที่จัดให้ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียที่ได้จากการเก็บตัวอย่างอยู่ในกลุ่มเดียวกับพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ซึ่งพบการระบาดของพยาธิใบไม้ชนิดนี้ในพื้นที่อำเภอตาพระยาและอำเภอดงน้ำเย็น การวิจัยครั้งนี้ถือเป็นรายงานการระบาดแรกของพยาธิใบไม้ชนิดนี้ในพื้นที่ตะวันออกของประเทศไทย นอกจากนี้ไพโรเมอร์ที่ออกแบบยังสามารถตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ในโฮสต์กึ่งกลางและโฮสต์เฉพาะได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.01 ng/ μ l

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาศานาการณัการระบาดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาดียวจากพื้นที่จังหวัดสระแก้วพบว่ามีค่าความชุกวมในการติดพยาธิคิดเป็นร้อยละ 6.9 ซึ่งมีค่าสูงกว่ารายงานการระบาดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาดียวหลายพื้นที่ของประเทศไทย ได้แก่ รายงานของ Kulsantiwong et al. (2015) ที่รายงานค่าความชุกวมของการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาดียวจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยเท่ากับร้อยละ 3.15 รายงานของ Anucherngchai, Tejangkura, & Chontanarath (2016) ที่รายงานค่าความชุกของการติดพยาธิใบไม้ในหอยฝาดียวจากพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 5.9 และรายงานของ Haruay & Piratae (2019) ที่รายงานค่าความชุกของการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาดียวจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 1.69 โดยมีสาเหตุมาจากในพื้นที่จังหวัดสระแก้วมีความหลากหลายของหอยฝาดียวน้ำจืดที่เป็นโฮสต์สำคัญของพยาธิใบไม้หลายชนิด ซึ่งมีการค้นพบชนิดของหอยฝาดียวในพื้นที่ทั้งหมดจำนวน 11 ชนิดซึ่งมีความหลากหลายชนิดมากกว่าหลายพื้นที่ เช่น จังหวัดยโสธร, นครราชสีมา, ชัยภูมิ, บุรีรัมย์ และอำนาจเจริญ ที่พบจำนวนชนิดของหอยฝาดียวน้ำจืด เท่ากับ 9 ชนิด, 9 ชนิด, 8 ชนิด, 8 ชนิด และ 7 ชนิด ตามลำดับ (สมร , 2538) ในการศึกษาครั้งนี้ได้พบว่ามีหอยฝาดียวทั้งหมด 9 ชนิดที่พบการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ โดยสอดคล้องกับรายงานของ Kuris (1990) ได้อธิบายว่าหอยเป็นโฮสต์ที่สำคัญของพยาธิเนื่องจากมีส่วนสำคัญที่ทำให้พยาธิใบไม้ติดสูโฮสต์ลำดับถัดไปและทำให้วงจรชีวิตของพยาธิสมบูรณ์ได้ นอกจากนี้ความหลากหลายของโฮสต์ยังส่งผลต่อความหลากหลายของพยาธิใบไม้ในพื้นที่เนื่องจากพยาธิใบไม้แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อโฮสต์หรือความสามารถในการติดสูโฮสต์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นหากในพื้นที่มีความหลากหลายของโฮสต์สูงย่อมทำให้พยาธิใบไม้มีความ

หลากหลายสูงชัน และมีโอกาสที่จะเกิดการระบาดของพยาธิใบไม้ในพื้นที่ได้มากขึ้น (Hechinger & Lafferty, 2005) โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าพื้นที่อำเภอคลองหาดมีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 16.27 อันดับสองคืออำเภอตาพระยาที่มีค่าความชุกในการติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้เท่ากับร้อยละ 13.80 ซึ่งมีค่ามากกว่าอันดับสามอย่างอำเภออรัญประเทศที่มีค่าความชุกเท่ากับร้อยละ 8.14 อย่างเห็นได้ชัด สืบเนื่องมาจากพื้นที่ของอำเภอคลองหาดและอำเภอตาพระยามีพื้นที่ป่าไม้ที่อุดมสมบูรณ์ โดยอำเภอคลองหาดมีพื้นที่ติดกับเขตนุรักษ์และรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโรเนียม ดวน แซม (Roneam Daun Sam) ของประเทศกัมพูชาในขณะที่อำเภอตาพระยาอยู่ในพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติตาพระยา จากการมีพื้นที่ป่าไม้ส่งผลให้สภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงโฮสต์ของพยาธิใบไม้ด้วย และความหลากหลายของโฮสต์จะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับโอกาสในการระบาดของพยาธิใบไม้ดังกล่าวข้างต้น โดยพื้นที่ป่าไม้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของหอย ปลา และสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถทำให้วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้สมบูรณ์ในพื้นที่และมีโอกาสที่จะเพิ่มจำนวนพร้อมทั้งเกิดการระบาดในพื้นที่ได้ ประกอบกับในพื้นที่ดังกล่าวไม่นิยมทำเกษตรกรรม ทำให้ไม่มีการใช้สารเคมีซึ่งส่งผลกระทบต่อโฮสต์และพยาธิใบไม้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rondelaud et al. (2016) ที่ได้รายงานว่ามีบริเวณอุทยานแห่งชาติมีความชุกของการติดพยาธิใบไม้สูงกว่าบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม เนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีสำหรับพืชทางการเกษตรและการทำปศุสัตว์ซึ่งเป็นอันตรายต่อโฮสต์และพยาธิใบไม้ที่ดำรงชีวิตในบริเวณนั้น

โดยทั่วไปรายงานการระบาดของพยาธิใบไม้ในประเทศไทยมีรายงานว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercariae* สามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิใบไม้หลายชนิด ได้แก่ *Ha. taichui*, *Ha. pumilio*, *Metorchis intermedius*, *St. tridactyla*, และ *Stellantchasmus falcatus* (Sritongtae et al., 2015; Anucherngchai, Tejangkura, & Chontanarith, 2016; Veeravechskij et al., 2018) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการยืนยันว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercariae* สามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* นอกจากนี้ยังพบว่าหอยฝาเดียวชนิด *M. tuberculata* เป็นโฮสต์กึ่งกลางที่มีความเหมาะสมต่อพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* สังเกตได้จากตัวอย่างของพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercariae* ที่พบในหอยชนิด *M. tuberculata* ทั้งหมดสามารถระบุชนิดได้เป็นพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shameem & Madhavi (1988), Pinto & De Melo (2010) และ Manpratum et al. (2017) โดยพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทยได้มีรายงานการระบาดของ

พยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ในหอยฝาเดียวหลายชนิด ได้แก่ *Ha. pumilio*, *St. tridactyla* และ *Heterophyes* sp. (Krailas et al., 2014; Namchote et al., 2015) และสำหรับในพื้นที่จังหวัดสระแก้วได้มีการรายงานการระบาดของพยาธิใบไม้ในตับชนิด *O. viverrini* เท่านั้น (Maipanich et al., 2004; Sato et al., 2009; Thaenkham et al., 2010; Boondit et al., 2020) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงถือว่าเป็นรายงานการระบาดแรกของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ในพื้นที่จังหวัดสระแก้วและภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย โดยมีค่าความชุกรวมของการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* เท่ากับร้อยละ 3.55 ซึ่งมีค่าสูงกว่ารายงานของ Krailas et al. (2014) ที่รายงานค่าความชุกของการติดพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ได้แก่ *Ha. pumilio* และ *St. tridactyla* ในหอยฝาเดียวจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทยเท่ากับร้อยละ 2.8 โดยพบว่าอำเภอตาพระยาและอำเภอดงน้ำเย็นมีการระบาดของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* เนื่องจากพื้นที่ของทั้งสองอำเภอพบหอยชนิด *M. tuberculata* มากที่สุดในจังหวัดสระแก้ว โดยหอยชนิดนี้เป็นโฮสต์ที่เหมาะสมสำหรับพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ดังนั้นหากมีหอยชนิด *M. tuberculata* ในพื้นที่ย่อมมีโอกาสเกิดการระบาดของพยาธิใบไม้วงศ์นี้ได้มากขึ้น (Supian & Ikhwanuddin, 2002; Bogéa et al., 2005)

ในอดีตได้มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สำหรับออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้หลายชนิด เช่น *Paragonimus westermani*, *Fasciolopsis buski*, *Fa. gigantica*, *O. viverrini*, *C. caninus* และ *Stellantchasmus falcatus* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 มีความสามารถที่จะใช้ระบุชนิดของพยาธิใบไม้ได้ (Sato et al., 2009; Prasad et al., 2011; Chontanarith, 2017) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สำหรับออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ดังนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ในการวิจัยครั้งนี้จึงถือเป็นครั้งแรกที่มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hostettler et al. (2018) ที่ใช้การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สำหรับระบุชนิดของพยาธิใบไม้ชนิด *H. maiwariensis* และ *H. daguillarensis* ที่พบในปลาชนิด *Neoarius graeffei* จากประเทศออสเตรเลีย โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดคือ 0.01 ng/μl ซึ่งถือว่ามีไวสูงกว่าไพรเมอร์ของ Le et al. (2012) ที่ออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *Fa. hepatica* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น

ต่ำที่สุดคือ 0.024 ng/μl หรือไฟรเมอร์ของ Lovis et al. (2009) และ Chontanarth , Anucherngchai, & Tejangkura (2018) ที่ออกแบบไฟรเมอร์สำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *Ha. taichui* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณยีน 18S และ CO1 ที่พบว่าสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 1.32 ng/μl และ 0.31 ng/μl ตามลำดับ นอกจากนี้ไฟรเมอร์ที่ออกแบบยังสามารถตรวจสอบพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ได้หลายระยะ ได้แก่ ระยะไข่, ระยะตัวอ่อนในโฮสต์กึ่งกลาง และระยะตัวเต็มวัยในโฮสต์เฉพาะ เนื่องจากไฟรเมอร์ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิใบไม้ชนิดอื่นและโฮสต์ของพยาธิ ประกอบกับความไวของไฟรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.01 ng/μl ซึ่งเพียงพอสำหรับการตรวจสอบพยาธิใบไม้ใน ระยะต่าง ๆ โดยแม้ว่า Worrell et al. (2011) ได้รายงานว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ชนิด *Schistosoma japonicum* จำนวน 1 ตัวมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.005 ng/μl แต่อย่างไรก็ตาม McClelland (1965) ได้รายงานว่าในหอย 1 ตัวสามารถพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียได้มากกว่า 2,000 ตัว ดังนั้นความไวของไฟรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นจากการศึกษานี้สามารถตรวจสอบพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยฝาเดียวได้ สำหรับระยะไข่ ระยะเมตาเซอร์คาเรีย และระยะตัวเต็มวัย Wongsawad et al. (2006) ได้รายงานว่าระยะตัวเต็มวัย, ระยะเมตาเซอร์คาเรีย 1 ตัว และระยะไข่ 1 ฟอง ของพยาธิใบไม้ชนิด *Ha. taichui* มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 97.22 ng/μl, 50.70 ng/μl และ 3.92 ng/μl ตามลำดับ จากที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่าไฟรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* มีประสิทธิภาพและสามารถใช้สำหรับตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยจากผลการตรวจสอบพบว่าตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercariae* ทุกตัวที่พบในจังหวัดสระแก้วเป็นตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ข้อมูลของแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับพยาธิใบไม้ชนิดอื่นในวงศ์ Heterophyidae โดยใช้ maximum likelihood ที่ 10,000 รอบพบว่าตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียที่พบจัดอยู่ในกลุ่มของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ที่แยกจากพยาธิใบไม้ชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shameem & Madhavi (1988) และ Manpratum et al. (2017) ที่รายงานว่าพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* มีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียเป็นรูปแบบ *parapleurolophocercous cercariae*

นอกจากการพบการระบาดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียรูปแบบ *parapleurolophocercous cercariae* ที่สามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrari* ในจังหวัดสระแก้วยังพบการระบาดของตัวอ่อนพยาธิใบไม้รูปแบบอื่นในหอยชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่าง

กันไปได้แก่ 1) armatae cercaria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิในวงศ์ Plagiorchiidae ที่เป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ของสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด 2) virgulate cercaria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิในวงศ์ Lecithodendriidae ที่เป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ของสัตว์ปีกและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 3) brevifurcate apharyngeate cercaria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิในวงศ์ Schistosomatidae ที่เป็นพยาธิใบไม้เลือดที่พบการระบาดในหลายพื้นที่ทั่วโลก 4) *Transversotrema* cercaria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิในวงศ์ Transversotrematidae ที่เป็นปรสิตภายนอกของปลาหลายชนิด 5) amphistome cercaria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิในวงศ์ Paramphistomatidae ที่เป็นพยาธิใบไม้กะเพาะผ้าขี้ริ้วของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และ 6) monostome cercaria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิในวงศ์ Nolocotylidae ที่เป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ของสัตว์ปีกหลายชนิด (Dinnik, 1965; Frandsen & Christensen, 1984; Cribb, 1988) นอกจากนี้ยังพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ชนิด *E. revolutum* ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่พบการระบาดในหลายพื้นที่ของประเทศไทย (Chantima, Chai, & Wongsawad 2013; Nagataki et al., 2015) สอดคล้องกับที่กล่าวในข้างต้นว่าจังหวัดสระแก้วเป็นจังหวัดที่มีความเหมาะสมทางด้านระบบนิเวศ ทำให้มีความหลากหลายของสัตว์หลายชนิดรวมถึงโฮสต์ของพยาธิใบไม้ และส่งผลให้วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้หลายชนิดสมบูรณ์ได้ ดังนั้นพื้นที่จังหวัดสระแก้วจึงมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดการระบาดของโรคพยาธิใบไม้ในสัตว์เศรษฐกิจ จากที่กล่าวมาสามารถอธิบายได้ว่าตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียแต่ละรูปแบบสามารถเจริญเติบโตเป็นพยาธิตัวเต็มวัยที่แตกต่างกัน ซึ่งหอยแต่ละกลุ่มจะพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในรูปแบบที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถคาดคะเนโอกาสการระบาดของพยาธิชนิดต่าง ๆ จากชนิดของหอยที่พบในแต่ละพื้นที่ได้ (Yu et al., 1994)

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาศถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ชนิด *H. mehrai* ในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาในพื้นที่จังหวัดสระแก้วเท่านั้น แต่เนื่องจากโฮสต์ของพยาธิใบไม้อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำซึ่งเชื่อมต่อกับแหล่งน้ำในพื้นที่อื่น ทำให้มีโอกาสที่จะเกิดการระบาดของพยาธิใบไม้ชนิดนี้ในพื้นที่อื่นได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาการระบาดหรือการติดพยาธิในพื้นที่ขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้สามารถได้ข้อมูลการระบาดที่เป็นปัจจุบันและนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

- Adam, R., Arnold, H., Pipitgool, V., Sithithaworn, P., Hinz, E., & Storch, V. (1993). Studies on lophocercous cercariae from *Bithynia siamensis goniomphalus* (Prosobranchia: Bithyniidae). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 24(4), 697-700.
- Al-Kandari, W., Al-Bustan, S., Isaac, A., George, B., & Chandy, B. (2012). Molecular identification of *Austroilharzia* species parasitizing *Cerithidea cingulata* (Gastropoda: Potamididae) from Kuwait Bay. *Journal of Helminthology*, 86(4), 470-478.
- Anucherngchai, S., Chontanarath, 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.
- Anucherngchai, S., Tejangkura, T., & Chontanarath, T. (2016). Epidemiological situation and molecular identification of cercarial stage in freshwater snails in Chao-Phraya Basin, Central Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 539-545.
- Apiwong, K., Wongsawad, C., & Butboonchoo, P. (2018). Morphological and molecular characterization of *Haplorchoides mehrai* Pande and Shukla 1976 (Digenea: Heterophyidae) from Chiang Mai province. *Helminthologia*, 55(4), 334-342.
- Barber, K., Mkoji, G., & Loker, E. (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.
- Bartoli, P., & Gibson, D. I. (1998). A new acanthocolpid cercaria (Digenea) from *Cantharus dorbignyi* (Prosobranchia) in the Western Mediterranean. *Systematic Parasitology*, 40(3), 175-184.
- Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Špakulová, M., Reblánová, M., & Oberhauserová, K. (2010). Determination of ribosomal internal transcribed spacer

- 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. *Helminthologia*, 47(2), 76-82.
- Besprozvannykh, V., Rozhkovan, K., Ermolenko, A., & Izrail'skaya, A. (2018). *Diplodiscus mehrai* Pande, 1937 and *D. japonicus* (Yamaguti, 1936): morphology of developmental stages and molecular data. *Helminthologia*, 55(1), 60-69.
- Bianchini, A. E., Cunha, J. A. d., Brusque, I. C. M., Pinheiro, C. G., Schindler, B., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2017). Relaxing effect of eugenol and essential oils in *Pomacea canaliculata*. *Ciência Rural*, 47(10), 1-6.
- Bilbao, A., De Vicose, G. C., Viera, M. D. P., Sosa, B., Fernández-Palacios, H., & Hernández, M. D. C. (2010). Efficiency of clove oil as anesthetic for abalone (*Haliotis tuberculata coccinea*, Reeve). *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 679-683.
- Bogéa, T., Cordeiro, F. M., & Gouveia, J. S. d. (2005). *Melanooides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) as intermediate host of Heterophyidae (Trematoda: Digenea) in Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(2), 87-90.
- Boondit, J., Suwannahitatom, P., Siripattanapong, S., Leelayoova, S., Mungthin, M., Tanariya, P., & Ruang-areerate, T. (2020). An epidemiological survey of *Opisthorchis viverrini* Infection in a lightly infected community, Eastern Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(4), 838-843.
- Boonmekam, D., Namchote, S., Glaubrecht, M., & Krailas, D. (2016). The prevalence of human intestinal fluke infections, *Haplorchis taichui*, in thiarid snails and cyprinid fish in Bo Kluea district and Pua district, Nan province, Thailand. *Silpakorn University Science and Technology Journal*, 10(3), 29-37.
- Bowles, J., Blair, D., & McManus, D. (1995). A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4(2), 103-109.
- Brandt, R. A. M. (1974). The Non - Marine Aquatic Mollusca of Thailand. *Archiv fur Molluskenkunde*, 105, 1-423.

- Cai, X., Liu, G., Song, H., Wu, C., Zou, F., Yan, H., & Zhu, X. (2012). Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitology Research*, 110(1), 235-243.
- 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.
- Chai, J.-Y., Sohn, W.-M., Na, B.-K., & Van De, N. (2011). *Echinostoma revolutum*: metacercariae in *Filopaludina* snails from Nam Dinh Province, Vietnam, and adults from experimental hamsters. *The Korean Journal of Parasitology*, 49(4), 449-455.
- Chantima, K., Chai, J.-Y., & Wongsawad, C. (2013). *Echinostoma revolutum*: freshwater snails as the second intermediate hosts in Chiang Mai, Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(2), 183-189.
- Chantima, K., Suk-Ueng, K., & Kampan, M. (2018). Freshwater snail diversity in Mae Lao agricultural basin (Chiang Rai, Thailand) with a focus on larval trematode infections. *The Korean Journal of Parasitology*, 56(3), 247-257.
- 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*, 108922.
- Chontanarith, T., & Wongsawad, C. (2010). *Haplorchis taichui* infection of the freshwater snails and molecular identification. *Trends Research in Science and Technology*, 2(1), 7-12.

- Choubisa, S. (2008). Focus on pathogenic trematode cercariae infecting fresh water snails (Mollusca: Gastropoda) of tribal region of Southern Rajasthan (India). *Journal of Parasitic Diseases*, 32(1), 47-55.
- Chowdhury, S., Mondal, M., Huq, S., & Rahman, M. (1994). Prevalence of *Fasciola* cercariae in lymnaeid snails in Bangladesh. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 7(3), 401-403.
- Chuboon, S., & Wongsawad, C. (2009). Molecular identification of larval trematode in intermediate hosts from Chiang Mai, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(6), 1216-1220.
- Chung, P., & Jung, Y. (1999). *Cipangopaludina chinensis malleata* (Gastropoda: Viviparidae): a new second molluscan intermediate host of a human intestinal fluke *Echinostoma cinetorchis* (Trematoda: Echinostomatidae) in Korea. *The Journal of parasitology*, 85(5), 963-964.
- Cribb, T. H. (1988). Life-cycle and biology of *Prototransversotrema steeri* Angel, 1969 (Digenea, Transversotrematidae). *Australian Journal of Zoology*, 36(2), 111-129.
- Cucher, M. A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbé, J. H., & Wisnivesky-Colli, C. (2006). PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2), 74-82.
- De Bont, J., Vercruyssen, J., Van Aken, D., Southgate, V., & Rollinson, D. (1991). Studies of the relationships between *Schistosoma nasale* and *S. spindale* and their snail host *Indoplanorbis exustus*. *Journal of Helminthology*, 65(1), 1-7.
- Dechruksa, W., Glaubrecht, M., & Krailas, D. (2017). Natural trematode infections of freshwater snail *Melanoides jugicostis* Hanley & Theobald, 1876 (Family Thiaridae), the first intermediate host of animal and human parasites in Thailand. *ilpakorn University Science and Technology Journal*, 11(1), 9-16.
- Dechruksa, W., Krailas, D., Ukong, S., Inkapatanakul, W., & Koonchornboon, T. (2007). Trematode infections of the freshwater snail family Thiaridae in the Khek river, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(6), 1016-1028.

- Devkota, R., Brant, S. V., Thapa, S., & Loker, E. S. (2014). Two avian schistosome cercariae from Nepal, including a *Macrobilharzia*-like species from *Indoplanorbis exustus*. *Parasitology International*, 63(2), 374-380.
- Devkota, R., Budha, P. B., & Gupta, R. (2011). Trematode cercariae infections in freshwater snails of Chitwan district, Central Nepal. *Himalayan Journal of Sciences*, 7(9), 9-14.
- Dinnik, J. (1965). The snail hosts of certain Paramphistomatidae and Gastrothylacidae (Trematoda) discovered by the late Dr. PL LeRoux in Africa. *Journal of Helminthology*, 39(2-3), 141-150.
- Ditrich, O., Na, V., Scholz, T., & Giboda, M. (1992). Larval stages of medically important flukes (Trematoda) from Vientiane province, Laos. Part II. Cercariae. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 67(3), 75-81.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P., & Rondelaud, D. (2003). Natural infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in Central France. *Parasitology Research*, 91(6), 458-461.
- Dzikowski, R., Levy, M., Poore, M., Flowers, J., & Paperna, I. (2004). Use of rDNA polymorphism for identification of Heterophyidae infecting freshwater fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59(1), 35-41.
- Faltýnková, A., Niewiadomska, K., Santos, M., & Valtonen, E. (2007). Furcocercous cercariae (Trematoda) from freshwater snails in Central Finland. *Acta Parasitologica*, 52(4), 310-317.
- Forte-Gil, D., Holzer, A. S., Pecková, H., Bartošová-Sojtková, P., Peñalver, J., Dolores, E. M., & Muñoz, P. (2016). Molecular and morphological identification of *Cardicola* (Trematoda: Aporocotylidae) eggs in hatchery-reared and migratory Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture*, 450, 58-66.
- Frandsen, F., & Christensen, N. (1984). Introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance taxonomic key. *Acta Tropica*, 41(2), 181-202.

- Giboda, M., Ditrich, O., Scholz, T., Viengsay, T., & Bouaphanh, S. (1991). Human *Opisthorchis* and *Haplorchis* infections in Laos. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(4), 538-540.
- Gibson, D. I., Jones, A., & Bray, R. A. (2002). *Keys to the Trematoda* (Vol. 2). London: CAB International and Natural History Museum.
- Haruay, S., & Piratae, S. (2019). Situation and cercarial infection of freshwater mollusk from Sirindhorn Reservoir, Ubon Ratchathani Province, Thailand. *Iranian Journal of Parasitology*, 14(3), 421-429.
- Hechinger, R. F., & Lafferty, K. D. (2005). Host diversity begets parasite diversity: bird final hosts and trematodes in snail intermediate hosts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1567), 1059-1066.
- Hostettler, R., Cutmore, S. C., & Cribb, T. H. (2018). Two new species of *Haplorchoides* chen, 1949 (Digenea: Heterophyidae) infecting an Australian siluriform fish, *Neoarius graeffei* kner & Steindachner. *Systematic Parasitology*, 95(2-3), 201-211.
- John, D. T., & Petri, W. A. (2013). *Markell and Voge's medical parasitology-E-Book*: Missouri: Elsevier Health Sciences.
- Karimi, A. (2008). Genetic diagnosis of *Fasciola* species based on 18S ribosomal DNA sequences. *Journal of Biological Sciences*, 8(7), 1166-1173.
- Krailas, D., Chotesaengsri, S., Dechruksa, W., Namchote, S., Chuanprasit, C., Veeravechsukij, N., & Koonchornboon, T. (2012). Species diversity of aquatic mollusks and their cercarial infections; Khao Yai National Park, Thailand. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 35(35), 37-47.
- 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, 57-86.
- Krailas, D., Namchote, S., & Rattanathai, P. (2011). Human intestinal flukes *Haplorchris taichui* and *Haplorchris pumilio* in their intermediate hosts, freshwater snails of the families Thiaridae and Pachychilidae, in Southern Thailand. *Zoosystematics and*

Evolution, 87(2), 349-360.

- Krailas, D., Veeravechskij, 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.
- Krishnamoorthy, R., Premalatha, N., Karthik, M., Anandham, R., Senthikumar, M., Gopal, N., & Sa, T. (2017). *Molecular markers for the identification and diversity analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF)*. Cham: Springer.
- Kulsantiwong, J., Prasopdee, S., Piratae, S., Khampoosa, P., Thammasiri, C., Suwannatrai, A., & Tarbsripair, P. (2015). Trematode infection of freshwater snail, family Bithyniidae in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 46(3), 396-405.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 299-306.
- 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.
- Kuris, A. (1990). Guild structure of larval trematodes in molluscan hosts: prevalence, dominance and significance of competition *Parasite communities: patterns and processes*, London: Chapman & Hall.
- Le, T. H., Nguyen, K. T., Nguyen, N. T. B., Doan, H. T. T., & Blair, D. (2017). The ribosomal transcription units of *Haplorchis pumilio* and *H. taichui* and the use of 28S rDNA sequences for phylogenetic identification of common heterophyids in Vietnam. *Parasites & Vectors*, 10(1), 17-26.
- Le, T. H., Nguyen, K. T., Nguyen, N. T. B., Doan, H. T. T., Le, X. T. K., Hoang, C. T. M., & Van De, N. (2012). Development and evaluation of a single-step duplex PCR for simultaneous detection of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (family Fasciolidae, class Trematoda, phylum Platyhelminthes). *Journal of Clinical*

Microbiology, 50(8), 2720-2726.

- Le, T. H., Van De, N., Blair, D., Sithithaworn, P., & McManus, D. P. (2006). *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. *Experimental Parasitology*, 112(2), 109-114.
- Lovis, L., Mak, T. K., Phongluxa, K., Soukhathammavong, P., Sayasone, S., Akkhavong, K., & Felger, I. (2009). PCR diagnosis of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* infections in a Lao community in an area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), 1517-1523.
- Loy, C., & Haas, W. (2001). Prevalence of cercariae from *Lymnaea stagnalis* snails in a pond system in Southern Germany. *Parasitology Research*, 87(10), 878-882.
- Lu, L., Zhang, S.-M., Mutuku, M. W., Mkoji, G. M., & Loker, E. S. (2016). Relative compatibility of *Schistosoma mansoni* with *Biomphalaria sudanica* and *B. pfeifferi* from Kenya as assessed by PCR amplification of the *S. mansoni* ND5 gene in conjunction with traditional methods. *Parasites & Vectors*, 9(1), 166-179.
- Luka, J., & Mbaya, A. W. (2015). Cercarial shedding of trematodes and their associated snail intermediate hosts in Borno State, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(4), 293-298.
- Ma, J., He, J.-J., Liu, G.-H., Zhou, D.-H., Liu, J.-Z., Liu, Y., & Zhu, X.-Q. (2015). Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA dataset supports that *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Digenea) is a distinct rumen fluke species. *Parasites & Vectors*, 8(1), 201.
- MacKenzie, K., & Liversidge, J. M. (1975). Some aspects of the biology of the cercaria and metacercaria of *Stephanostomum baccatum* (Nicoll, 1907) Manter, 1934 (Digenea: Acanthocolpidae). *Journal of Fish Biology*, 7(2), 247-256.
- Mahami-Oskoueï, M., Dalimi, A., Forouzandeh-Moghadam, M., & Rokni, M. (2011). Molecular identification and differentiation of *Fasciola* isolates using PCR-RFLP method based on internal transcribed spacer (ITS1, 5.8 S rDNA, ITS2). *Iranian*

- Journal of Parasitology*, 6(3), 35-42.
- Maipanich, W., Waikagul, J., Watthanakulpanich, D., Muennoo, C., Sanguankiat, S., Pubampen, S., & Visetsuk, K. (2004). Intestinal parasitic infections among inhabitants of the North, West-central and Eastern border areas of Thailand. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 27(2), 51-58.
- Malek, E. A., & Cheng, T. C. (1974). *Medical and economic malacology*. New York and London: Academic Press.
- Manpratum, Y., Kaewkes, W., Echaubard, P., Sripa, B., & Kaewkes, S. (2017). New locality record for *Haplorchoides mehrai* and possible interactions with *Opisthorchis viverrini* metacercariae in cyprinid fishes in Northeast Thailand. *Parasitology Research*, 116(2), 601-608.
- McClelland, W. (1965). The production of cercariae by *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* and methods for estimating the numbers of cercariae in suspension. *Bulletin of the World Health Organization*, 33(2), 270-276.
- Michel, E., McIntyre, P. B., & Chan, J. (2007). A snail's space sets a snail's pace: movement rates of *Lavigeria* gastropods in Lake Tanganyika, East Africa. *Journal of Molluscan Studies*, 73(2), 195-198.
- Morgan, J., & Blair, D. (1998). Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology*, 116(3), 289-297.
- Morozova, E., Chrisanfova, G., Arkhipov, I., & Semyenova, S. (2004). Polymorphism of the ND1 and CO1 mitochondrial genes in populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Russian Journal of Genetics*, 40(7), 817-820.
- Nagataki, M., Tantrawatpan, C., Agatsuma, T., Sugiura, T., Duengngai, 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.
- Namchote, S., Sritongtae, S., Butnin, S., Wongwain, P., & Krailas, D. (2015). Larval stage of

- trematodes obtained from brackish water snails in the central and east coast of the gulf of Thailand. *Scientific Research and Essays*, 10(11), 386-401.
- Namsanor, J., Sithithaworn, P., Kopolrat, K., Kiatsopit, N., Pitaksakulrat, O., Tesana, S., & Petney, T. N. (2015). Seasonal transmission of *Opisthorchis viverrini* sensu lato and a Lecithodendriid trematode species in *Bithynia siamensis goniomphalos* snails in Northeast Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 87-93.
- Nasir, P. (1965). Studies on freshwater larval trematodes. Part 1. a new species of a microcotylous xiphidiocercaria, *Cercaria cumanensis*, from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 32(1), 103-105.
- 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.
- Nguyen, S., Amer, S., Ichikawa, M., Itagaki, T., Fukuda, Y., & Nakai, Y. (2012). Molecular identification of *Fasciola* spp.(Digenea: Platyhelminthes) in cattle from Vietnam. *Parasite: Journal de la Société Française de Parasitologie*, 19(1), 85-89.
- Nithiuthai, S., Wiwanitkit, V., Suwansaksri, J., & Chaengphukeaw, P. (2003). A survey of trematode carcariae in *Bithynia goniomphalos* in Northeast Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 33, 106-109.
- Noikong, W., Wongsawad, C., Chai, J.-Y., Saenphet, S., & Trudgett, A. (2014). Molecular analysis of echinostome metacercariae from their second intermediate host found in a localised geographic region reveals genetic heterogeneity and possible cryptic speciation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4), e2778.
- Pande, B., & Shukla, R. (1976). *Haplorchoides* Chen, 1949 (Haplorchinae: Heterophyidae) in freshwater fishes. *Journal of Helminthology*, 50(3), 181-192.
- Parvathi, A., Umesha, K. R., Kumar, S., Sithithaworn, P., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2008). Development and evaluation of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish. *Acta Tropica*, 107(1), 13-16.

- Paula-Andrade, C., Pinto, H., Coscarelli, D., Vidigal, T., & Melo, A. (2012). The natural infection of *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774)(Mollusca: Gastropoda) by *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924)(Platyhelminthes: Trematoda) in Paranoá lake, Brasília, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 72(2), 419-420.
- Pauly, A., Schuster, R., & Steuber, S. (2003). Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 90(5), 409-414.
- Pearson, J., & Ow-Yang, C. (1982). New species of *Haplorchis* from Southeast Asia, together with keys to the *Haplorchis*-group of heterophyid trematodes of the region. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 13(1), 35-60.
- Phalee, W., Phalee, A., & Wongsawad, C. (2018). New Record of *Thapariella anastomusa* (Trematoda: Thapariellidae) Metacercariae in Northern Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 56(1), 49-52.
- Pinlaor, S., Onsurathum, S., Boonmars, T., Pinlaor, P., Hongsrichan, N., Chaidee, A., & Kaewkes, S. (2013). Distribution and abundance of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in cyprinid fish in Northeastern Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(6), 703-710.
- Pinto, H. A., Cantanhede, S. P. D., Thiengo, S. C., de Melo, A. L., & Fernandez, M. A. (2015). The apple snail *Pomacea maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) as the intermediate host of *Stomylotrema gratiosus* (trematoda: Stomylotrematidae) in Brazil: The first report of a mollusc host of a stomylotrematid trematode. *Journal of Parasitology*, 101(2), 134-139.
- Pinto, H. A., & Melo, A. L. d. (2010). *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) as an intermediate host of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(4), 207-210.
- Portier, J., Jouet, D., Vallée, I., & Ferté, H. (2012). Detection of *Planorbis planorbis* and *Anisus vortex* as first intermediate hosts of *Alaria alata* (Goeze, 1792) in natural

- conditions in France: molecular evidence. *Veterinary Parasitology*, 190(1-2), 151-158.
- Prasad, P. K., mohan Goswami, L., Tandon, V., & Chatterjee, A. (2011). PCR-based molecular characterization and insilico analysis of food-borne trematode parasites *Paragonimus westermani*, *Fasciolopsis buski* and *Fasciola gigantica* from Northeast India using ITS2 rDNA. *Bioinformation*, 6(2), 64-68.
- Prasad, P. K., Tandon, V., Biswal, D. K., Goswami, L. M., & Chatterjee, A. (2009). Use of sequence motifs as barcodes and secondary structures of internal transcribed spacer 2 (ITS2, rDNA) for identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae). *Bioinformation*, 3(7), 314-320.
- Purivirojkul, W., & Areechon, N. (2008). *Parasitic diversity of siluriform fishes in Mekong river, Chiang Rai province*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Watchariya_Puri/publication/47377996
- 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.
- Pyziel, A., Demiaszkiewicz, A., & Kuligowska, I. (2014). Molecular identification of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) from red deer from South-Western Poland (Lower Silesian Wilderness) on the basis of internal transcribed spacer 2 (ITS-2). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(3), 523-525.
- Radomyos, B., Wongsaroj, T., Wilairatana, P., Radomyos, P., Praevanich, R., Meesomboon, V., & Jongsuksuntikul, P. (1998). Opisthorchiasis and intestinal fluke infections in Northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 29, 123-127.
- Roberts, L., & Janovy Jr, J. (2000). Roberts' Foundations of parasitology 6th edition. Edited by: Gerald S Schmidt, Larry S: Boston: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., & Dreyfuss, G. (2016). Larval trematode infections in *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) from the Brenne Regional Natural Park,

- Central France. *Journal of Helminthology*, 90(3), 256-261.
- Sanabria, R., Moré, G., & Romero, J. (2011). Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). *Veterinary Parasitology*, 177(1-2), 182-185.
- Sangvaranond, A. (1994). Parasitic helminths of native chickens in the central part of Thailand. *Kasetsart Journal Natural Science*, 28, 402-412.
- Sato, M., Thaenkham, U., Dekumyoy, P., & Waikagul, J. (2009). Discrimination of *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. pumilio* and *H. taichui* using nuclear DNA-based PCR targeting ribosomal DNA ITS regions. *Acta Tropica*, 109(1), 81-83.
- Schell, S. C. (1970). *How to know the trematodes*. Iowa: Wm.C. Brown Publishers.
- Schmidt, K., & Fried, B. (1997). Prevalence of larval trematodes in *Helisoma trivolvis* (Gastropoda) from a farm pond in Northampton County, Pennsylvania with special emphasis on *Echinostoma trivolvis* (Trematoda) cercariae. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 64(1), 157-159.
- Scholz, T., Ditrich, O., & Giboda, M. (1991). Differential diagnosis of opisthorchiid and heterophyid metacercariae (Trematoda) infecting flesh of cyprinid fish from Nam Ngum Dam Lake in Laos. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 22, 171-173.
- Sen, H. (1972). *Necator americanus*: behaviour in hamsters. *Experimental Parasitology*, 32(1), 26-32.
- Serbina, E. (2014). Larval trematodes in bithyniid snails (Gastropoda: Bithyniidae) in the lake-rivers systems from the steppe zone (The West Siberian Plain, Russia). *Helminthologia*, 51(4), 293-300.
- Shameem, U., & Madhavi, R. (1988). The morphology, life-history and systematic position of *Haplorchoides mehrai* Pande & Shukla, 1976 (Trematoda: Heterophyidae). *Systematic Parasitology*, 11(1), 73-83.
- Shumenko, P., Tatonova, Y., & Besprozvannykh, V. (2017). *Metagonimus suifunensis* sp. n. (Trematoda: Heterophyidae) from the Russian Southern Far East: Morphology, life cycle, and molecular data. *Parasitology International*, 66(1), 982-991.

- Singh, R. (1959). Seasonal infestation of *Indoplanorbis exustus* (Deshayes) with furcocercous cercariae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of India, Section B. Biological Sciences*, 29(2), 62-72.
- Smyth, J. D., & Wakelin, D. (1994). *Introduction to animal parasitology*: Cambridge university press.
- Sohn, W.-M. (2009). Fish-borne zoonotic trematode metacercariae in the Republic of Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(Suppl), 103-113.
- 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.
- Sritongtae, S., Namchote, S., Krailas, D., Boonmekam, D., & Koonchornboon, T. (2015). Cercarial infections of brackish water snails on the east coast of southern Thailand. *Joint International Tropical Medicine Meeting Proceeding*, 4, 1-15.
- Sukontason, K., Piangjai, S., Muangyimpong, Y., Sukontason, K., Methanitikorn, R., & Chaithong, U. (1999). Prevalence of trematode metacercariae from cyprinoid fish of Ban Pao district, Chiang Mai Province, Northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 30(2), 365-370.
- Supian, Z., & Ikhwanuddin, A. (2002). Population dynamics of freshwater molluscs (Gastropod: *Melanoides Tuberculata*) in crocker range park, Sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation*, 1-9.
- Teimoori, S., Mowlavi, G., Arimatsu, Y., Sripa, B., Mobedi, I., Sharifdini, M., & Naddaf, S. R. (2019). Infection of the jackal (*Canis aureus*) by *Haplorchis taichui* (Trematoda: Heterophyidae) in Southwestern Iran: a clue for potential human infection. *Iranian Journal of Parasitology*, 14(1), 120-126.
- Thaenkham, U., Visetsuk, K., & Waikagul, J. (2007). Discrimination of *Opisthorchis viverrini* from *Haplorchis taichui* using COI sequence marker. *Acta Tropica*, 103(1), 26-32.
- Tong, Q.-B., Chen, R., Zhang, Y., Yang, G.-J., Kumagai, T., Furushima-Shimogawara, R., & Lu, S.-H. (2015). A new surveillance and response tool: Risk map of infected *Oncomelania hupensis* detected by Loop-mediated isothermal amplification

- (LAMP) from pooled samples. *Acta Tropica*, 141, 170-177.
- 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.
- Van Van, K., Dalsgaard, A., Blair, D., & Le, T. H. (2009). *Haplorchis pumilio* and *H. taichui* in Vietnam discriminated using ITS-2 DNA sequence data from adults and larvae. *Experimental Parasitology*, 123(2), 146-151.
- Veeravechskij, N., Namchote, S., Neiber, M. T., Glaubrecht, M., & Krailas, D. (2018). Exploring the evolutionary potential of parasites: Larval stages of pathogen digenic trematodes in their thiarid snail host *Tarebia granifera* in Thailand. *Zoosystematics and Evolution*, 94, 425-460.
- Velusamy, R., Singh, B., & Raina, O. (2004). Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 120(1-2), 85-90.
- Vignoles, P., Novobilský, A., Rondelaud, D., Bellet, V., Treuil, P., Koudela, B., & Dreyfuss, G. (2006). Cercarial production of *Fascioloides magna* in the snail *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasitology Research*, 98(5), 462-467.
- 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.
- Wolfgang, R. W. (1955). Studies of the trematode *Stephanostomum bacatum* (Nicoll, 1907): III. Its life cycle. *Canadian Journal of Zoology*, 33(3), 113-128.
- Wongsawad, C., Wongsawad, P., Anuntalabhochai, S., Chai, J.-Y., & Sukontason, K. (2013). Occurrence and molecular identification of liver and minute intestinal flukes metacercariae in freshwater fish from Fang-Mae Ai agricultural Bbsin, Chiang Mai province, Thailand. *Asian Biomedicine*, 7(1), 97-104.
- Wongsawad, C., Wongsawad, P., Chai, J.-Y., Paratasilpin, T., & Anuntalabhochai, S. (2006). DNA quantities and qualities from various stages of some trematodes using optical and HAT-RAPD methods. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine*

and *Public Health*, 37, 62-68.

Wongsawad, C., Wongsawad, P., Sukontason, K., Phalee, A., Noikong-Phalee, W., & Chai, J. Y. (2016). Discrimination 28S ribosomal gene of trematode cercariae in snails from Chiang Mai Province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 47(2), 199-206.

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.

World Health Organization. (1995). *Control of foodborne trematode infections: report of a WHO study group*: Geneva: World Health Organization.

Worrell, C., Xiao, N., Vidal, J. E., Chen, L., Zhong, B., & Remais, J. (2011). Field detection of *Schistosoma japonicum* cercariae in environmental water samples by quantitative PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 77(6), 2192-2195.

Yamaguti, S. (1958). *Digenetic Trematodes of Vertebrates part I Systema helminthum*. New York: Interscience Publishers.

Yousif, F., El Bardicy, S., Tadros, M., & Ayoub, M. (2011). First Record of *Catantropis indicus* Srivastava (Notocotylidae) from *Gabbiella Senaariensis* Küster (Bithyniidae) In Egypt. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9), 724-728.

Yu, S.-H., Mott, K. E., & Organization, W. H. (1994). *Epidemiology and morbidity of food-borne intestinal trematode infections*. Retrieved from World Health Organization.

Yutemsuk, N., Krailas, D., Ananchaenkit, C., Phanpeng, L., & Dechruksa, W. (2017). Trematode infections of freshwater snails genus *Clea* A. Adams, 1855 in the reservoir of lower Northeast Thailand. *Joint International Tropical Medicine Meeting Proceedings*, 6, 7-16.

โครงการชลประทานจังหวัดสระแก้ว. (ม.ป.ป.). อ่างเก็บน้ำจังหวัดสระแก้ว. สืบค้นจาก <http://ridceo.rid.go.th/sakaeo/water/map/>

จันทร์จุฬ่า ภาวะเวช, เมธาวิ สบายใจ, และ สุภาพนา ชลธนานารถ. (2561). ค่าความชุกและสัณฐานวิทยาของหนอนพยาธิในลำไส้กบนาชนิด *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834)

- จากอำเภอโพธิ์ไทร จังหวัดอุบลราชธานี. *แก่นเกษตร*, 46, 986-991.
- ทิมข่าวภูมิภาค-การศึกษา. (2559, 10 ธันวาคม). สระแก้วเปิดรณรงค์สาระแห่งชาติจัดพยาธิใบไม้
ในดับและต้านภัยมะเร็งท่อน้ำดี. *บ้านเมือง*, น. 12.
- บพิธ จารุพันธุ์, และ นันทพร จารุพันธุ์. (2545). *สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์. (2558). พยาธิใบไม้: บทนำ พยาธิใบไม้ปอด และพยาธิใบไม้ในดับ.
เชียงใหม่: ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ประทีน บุญงาม, จิราพร ศรียารัน, ศรารัตน์ ทานะมัย, และ พงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา. (2553).
การศึกษาเบื้องต้นความหลากหลายชนิดของหอยทากบก และหอยน้ำจืดในจังหวัดสระแก้ว.
กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- พีรพล รัตนไทย. (2553). *การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยวงศ์ Thiaridae ใน
ภาคใต้ของประเทศไทย*. (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยศิลปากร,
นครปฐม.
- เพ็ญภา ชมะวิต. (2553). โรคพยาธิใบไม้ปอดในประเทศไทย. *สงขลานครินทร์เวชสาร*, 5, 288-293.
- วิมลมาลย์ ไสพวรรณรัตน์. (2554). *การระบุสัณฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ
Paragonimus paishuihoensis จากจังหวัดจันทบุรี*. (ปริญญาโทบริหารการศึกษา
มหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.
- วิวิชชุดา เดชรักษา. (2549). *การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ ระยะเซอร์คาเรียของหอยน้ำจืดวงศ์
Thiaridae ในภาคเหนือของประเทศไทย*. (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต),
มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- ศุภกนก หันทอง. (2558). ผลของการใช้โปรแกรมสุขศึกษาเพื่อการส่งเสริมพฤติกรรมกำบังโรค
พยาธิใบไม้ดับของประชาชนกลุ่มเสี่ยง ชุมชนบ้านเหล่าอ้อย หมู่ที่ 5 ตำบลหนองสังข์ อำเภอ
อรัญประเทศ จังหวัดสระแก้ว. *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร*, 10, 40-53.
- สมร ขวัญทอง. (2538). การกระจายของสัตว์ท้องถิ่นบางชนิดที่ใช้เป็นอาหารในภาคตะวันออก เชียง
เหนือตอนล่างของประเทศไทย. *จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย*.
- สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดอำนาจเจริญ กลุ่มงานควบคุมโรค. (2552). *แบบรายงานผลการรณรงค์
ตรวจพยาธิใบไม้ดับ*. อำนาจเจริญ: สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดอำนาจเจริญ.
- สุชาติ อุปลัมถ์, มาลียา เครือตาซุ, ศิริวรรณ จันทเดมีย์, และ เขียวลักษณ์ จิตรามวงศ์. (2538). *สัง
วิทยา*. กรุงเทพฯ: ศักดิ์โสภณาการพิมพ์.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วรากร บุญประเสริฐ
วัน เดือน ปี เกิด	12 ตุลาคม 2537
สถานที่เกิด	จังหวัดเพชรบูรณ์
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรีการศึกษาด้านสัตวศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	128/1 ถนนบูรกรรมโกวิท ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000
ผลงานตีพิมพ์	สถานการณ์การระบาดของการระบุนิดเชิงโมเลกุลของพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด <i>Echinostoma revolutum</i> (Froelich, 1802) ในหอยน้ำจืดฝาเดี่ยวสกุล <i>Filopaludina</i> ในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดสระแก้ว
รางวัลที่ได้รับ	การนำเสนอแบบบรรยาย ระดับดีเด่น งานประชุมวิชาการแก่นเกษตรกรครั้งที่ 21