



การทดลองการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* จากประเทศกัมพูชา
ในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus*



โดย
นางภาพร ฤทธิพิยสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทดลองการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* จากประเทศกัมพูชา
ในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

EXPERIMENTAL INFECTION OF CAMBODIA'S LIVER FLUKE (*OPISTHORCHIS
VIVERRINI*) IN SILVER BARD (*BARBODES GONIONOTUS*).



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOLOGY)
Department of BIOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2017
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ การทดลองการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* จาก
 ประเทศกัมพูชาในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus*
 โดย ภาพร ภูติปิยสวัสดิ์
 สาขาวิชา ชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
 อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน ไกรลาศ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
 ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

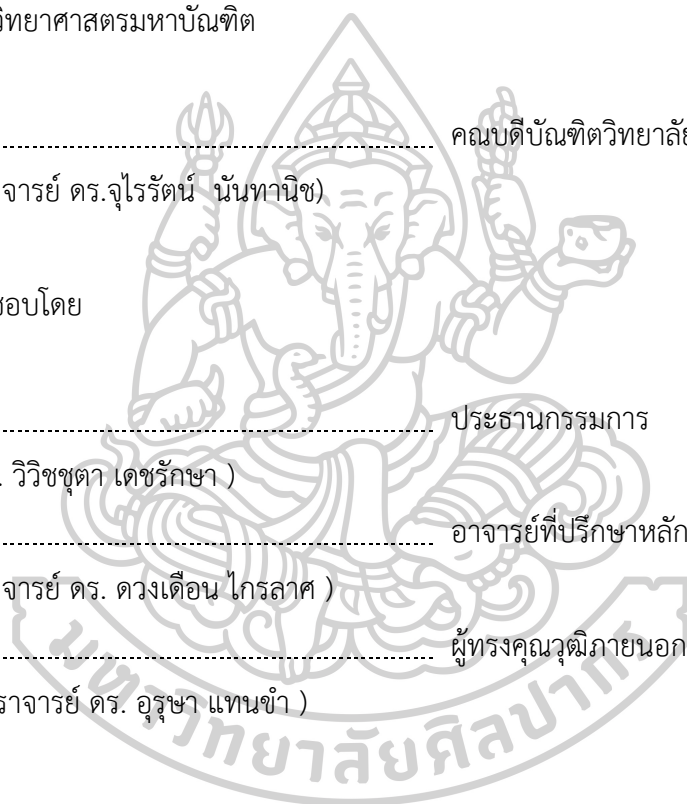
..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย
 (รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
 (อาจารย์ ดร. วิวิชชุดา เดชรักษา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
 (รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน ไกรลาศ)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุษา แทนขำ)



56303208 : ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ในตับ, ปลาตะเพียนขาว, ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย

นาง ภาพร ภูดีปิยสวัสดิ์: การทดลองการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* จากประเทศกัมพูชาในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน ไกรลาศ

โรคพยาธิใบไม้ในตับเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย ลาว กัมพูชา และ เวียดนาม คนและสัตว์ได้รับตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *Opisthorchis viverrini* จากการบริโภคปลาดิบ หรือปลาที่ปรุงไม่สุก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้ คือศึกษาอัตราการติดเชื้อของปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus* จากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ *O. viverrini* ระยะเซอร์คาเรีย ที่ได้จากหอยที่สู่มเก็บจากประเทศกัมพูชา และศึกษาการเจริญพัฒนาของระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลาที่ติดเชื้อ ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ติดเชื้อด้วยเซอร์คาเรีย จำนวน 100, 200 และ 400 เซอร์คาเรียต่อปลา 1 ตัว หลังการติดเชื้อตรวจหาอัตราการติดเชื้อ และตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลาในระยะเวลา 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน นับจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในอวัยวะต่างๆของปลา บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ค่าสถิติ การทดลองในครั้งนี้ได้นำเมตาเซอร์คาเรียจากปลาที่ติดเชื้อมาตรวจสอบชนิดพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยทำ polymerase chain reaction (PCR) ที่ตำแหน่ง cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) ยีน ของ mitochondrial DNA ผลการทดลองพบปลาที่ติดเชื้อจำนวน 200 ตัว จากปลากลุ่มทดลอง 241 ตัว คิดเป็นอัตราการติดเชื้อ 82.99% พบการติดเชื้อสูงสุดในปลากลุ่มทดลองที่ 3 (400 เมตาเซอร์คาเรีย/ปลา 1 ตัว) มีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จำนวนเมตาเซอร์คาเรียที่ตรวจพบในปลา 1 ตัว มีค่าเฉลี่ยเป็น 10.08 (S.D.=9.27) โดยพบจำนวนเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุดบริเวณครีบทอง คิดเป็น 91.5% (183 ตัว), รองลงมาพบบริเวณครีบล้าง และ ครีบท้อง คิดเป็น 70% (140 ตัว) และ 44.00% (88 ตัว) ตามลำดับ พบน้อยที่สุดบริเวณครีบอก 4.5% (9 ตัว) และพบว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียสามารถพัฒนาอวัยวะภายในได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังการติดเชื้อของพยาธิในตัวปลา เหมาะสมที่จะเป็นระยะติดต่อก่อนที่จะสามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยต่อไป

56303208 : Major (BIOLOGY)

Keyword : Opisthorchiasis, silver bard fish, metacercariae

MRS. PAPORN POODEEPIYASAWAT : EXPERIMENTAL INFECTION OF CAMBODIA'S LIVER FIUKE (*OPISTHORCHIS VIVERRINI*) IN SILVER BARD (*BARBODES GONIONOTUS*). THESIS ADVISOR : DUANGDUEN KRAILAS

Opisthorchiasis remains a major public health problem in Southeast Asia, particularly in Thailand, Laos PDR, Cambodia and Vietnam. Human and animals are infected with metacercariae of *O. viverrini* by consumption of traditional raw or uncooked freshwater cyprinid fish. The objectives of this research were to study the infection rates of silver bard fish, *Barbodes gonionotus* that were infected by cercariae from Cambodia's snails, and the development of metacercariae in fish. The experiment was performed in laboratory by 3 replications. Collected fish were divided into 4 groups, namely one control group, and three experimental groups, which were injected with 100, 200, and 400 cercariae respectively. The post infection, infection rates and development of metacercariae in the fish were observed in 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days. The metacercariae from the fish organs were examined. The results were recorded and analyzed by statistical methods. In this study, metacercariae from the experimental fish were identified using molecular techniques. Amplification by polymerase chain reaction (PCR) of cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene of mitochondrial DNA region was performed. Out of 241 experimental fish, 200 were found to be infected by cercariae, equivalent to an 82.99% infection rate. The highest infection rate was in the fourth group, which was significantly different from the other groups ($p < 0.05$). The average number was 10.08 (S.D.=9.27) metacercariae per infected fish. The most metacercariae were found in the tail of 91.5 % samples (183 fish), followed by those in the dorsal fins and pelvic fins of 70.0% samples (140 fish) and 44.0% samples (88 fish) respectively. The least infected area was the muscle of pectoral fins of 4.5% samples (9 fish). It was also found that the metacercariae started to develop in the second week after the infection. At this stage, they would be able to survive and fully develop.

กิตติกรรมประกาศ

การทดลองการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* จากประเทศกัมพูชาในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus* ได้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จากงบประมาณแผ่นดิน (หมวดเงินอุดหนุนทั่วไป) ของบัณฑิตวิทยาลัย ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยศิลปากร และทุนสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ข้าพเจ้าขอขอบคุณหน่วยงาน และผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้การสนับสนุนร่วมมือในงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. ดวงเดือน ไกรลาศ อาจารย์ผู้เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ท่านคอยให้คำสั่งสอน ให้ความรู้ คำแนะนำ ช่วยเหลือแก้ไขปัญหาและเป็นกำลังใจที่สำคัญจนวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ. ดร. อรุษา แทนขำ อาจารย์คณะกรรมการ ดร. วิวิชชุดา เดชรักษา ช่วยให้คำแนะนำ ให้ความรู้ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้ข้อคิดเห็นเพิ่มเติม เพื่อนำไปใช้ปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมทั้งผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานรูปแบบการพิมพ์วิทยานิพนธ์จนรูปเล่มออกมาสมบูรณ์ ขอขอบคุณ คุณสุลักษณ์ นามโชติ ที่ช่วยสอนเทคนิค แนะนำ ให้ความรู้ในการทำปฏิบัติการ รวมทั้งติดต่อประสานงานในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณภาควิชาเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความรู้ในงานด้านทางอณูชีววิทยา ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนร่วมช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ อาจารย์ทุกท่าน เจ้าหน้าที่ทุกคน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้ความรัก กำลังใจ รับฟัง ให้คำปรึกษา และสนับสนุนการทำงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ภาพร ภูติปิยสวัสดิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
Fish - borne zoonotic trematodes (FZT).....	6
การจัดจำแนกชนิดพันธุ์พยาธิใบไม้ตับในวงศ์ Opisthorchiidae (Braun, 1901).....	7
อนุกรมวิธานและสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i> (Poirier, 1886).....	7
วงชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i>	9
ระบาดวิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i>	10
ลักษณะภายนอกของปลา (external anatomy of fish).....	16
1. การแบ่งส่วนต่างๆ ของปลา.....	16
2. อวัยวะภายนอกของปลา.....	17
3. การวัดขนาดและสัดส่วนต่างๆ ของปลา.....	20

ปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i> (Bleeker,1850).....	22
การจัดจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์	22
ลักษณะสัณฐานวิทยาของ ปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	22
การแพร่กระจายพันธุ์ของปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	23
การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i>	23
เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)	25
การจำแนกพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i> ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ	25
ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไรโบโซม (Ribosomal DNA; rDNA).....	26
ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA; mtDNA).....	27
ยีนบริเวณ cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1).....	27
การศึกษา Phylogenetic	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการศึกษา	29
1. ตัวอย่างตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรีย	29
2. การทดลองการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i> ในปลาตะเพียนขาว	29
3. ตรวจหาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i> ในปลาตะเพียนขาว	30
3.1 วัดขนาดความกว้าง ความยาวของปลา และชั่งน้ำหนัก.....	30
3.2 ตรวจหาการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลา ด้วยวิธี compression method.....	30
3.3 การจัดจำแนกชนิดตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา. 30	
3.4 การจัดจำแนกชนิดตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียโดยวิธีทางชีวโมเลกุล.....	31
บทที่ 4 ผลการศึกษา	35
1. การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ <i>Opisthorchis viverrini</i>	35
2. การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ <i>Opisthorchis viverrini</i>	38

2.1 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ <i>O. viverrini</i> ด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	38
2.2 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ <i>O. viverrini</i> ด้วย ลักษณะทางชีวโมเลกุล	39
3. อัตราการติดเชื้อเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ <i>Opisthorchis viverrini</i> ในปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	41
4. การเจริญพัฒนารูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในอวัยวะต่างๆของปลา ในแต่ละสัปดาห์.....	47
บทที่ 5 วิจัยรณผลการศึกษาและสรุปลการศึกษา	58
1. การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i> ในปลาตะเพียนขาว	58
2. การเจริญพัฒนาของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในอวัยวะต่างๆของปลา	60
3. จำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุล	61
สรุปลการศึกษา.....	62
รายการอ้างอิง	63
ภาคผนวก.....	69
ประวัติผู้เขียน.....	77



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1	แผนที่การแพร่กระจายพันธุ์ของพยาธิใบไม้ตับกลุ่ม Opisthorchiidae	11
รูปที่ 2	ตัวเต็มวัย <i>Opisthorchis viverrini</i>	12
รูปที่ 3	ตัวอ่อนระยะเรเดีย <i>Opisthorchis viverrini</i>	13
รูปที่ 4	ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย <i>Opisthorchis viverrini</i>	13
รูปที่ 5	ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย <i>Opisthorchis viverrini</i>	14
รูปที่ 6	วงชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ <i>Opisthorchis viverrini</i>	15
รูปที่ 7	อวัยวะภายนอกและส่วนต่างๆของปลากระดุกแข็ง	17
รูปที่ 8	การวัดขนาดปลา	21
รูปที่ 9	ปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	24
รูปที่ 10	การแพร่กระจายของปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	24
รูปที่ 11	หอยน้ำจืด <i>Bithynia siamensis goniomphalos</i> ที่พบบริเวณจังหวัดกำแพงเพชร กัมพูชา	37
รูปที่ 12	ลักษณะตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ <i>Opisthorchis viverrini</i>	37
รูปที่ 13	ลักษณะตัวอ่อนระยะเรเดียของพยาธิใบไม้ <i>Opisthorchis viverrini</i>	38
รูปที่ 14	การจำแนกชนิดพันธุ์ของตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล	39
รูปที่ 15	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship)	40
รูปที่ 16	อัตราการติดเชื้อตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรีย <i>Opisthorchis viverrini</i> ในแต่ละส่วน ของปลา ตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	45
รูปที่ 17	จำนวนเมตาเซอร์คาเรียเฉลี่ยในส่วนต่างๆของปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	45
รูปที่ 18	ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย <i>Opisthorchis viverrini</i> ที่พบในทางปลาตะเพียนขาว <i>Barbonymus gonionotus</i>	46

- รูปที่ 19 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 1 สัปดาห์... 51
- รูปที่ 20 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 2 สัปดาห์... 52
- รูปที่ 21 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 3 สัปดาห์... 53
- รูปที่ 22 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 4 สัปดาห์... 54
- รูปที่ 23 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 5 สัปดาห์... 55
- รูปที่ 24 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 6 สัปดาห์... 56
- รูปที่ 25 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ภายในถุง cyst 1 - 6 สัปดาห์ 57
- รูปที่ 26 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ออกจากถุง cyst 1- 6 สัปดาห์..... 57



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ข้อมูล DNA sequences ยีนบริเวณ *cox1* ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*, *O. lobatus* และ *C. sinensis* ใน GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Phylogenetic tree 34

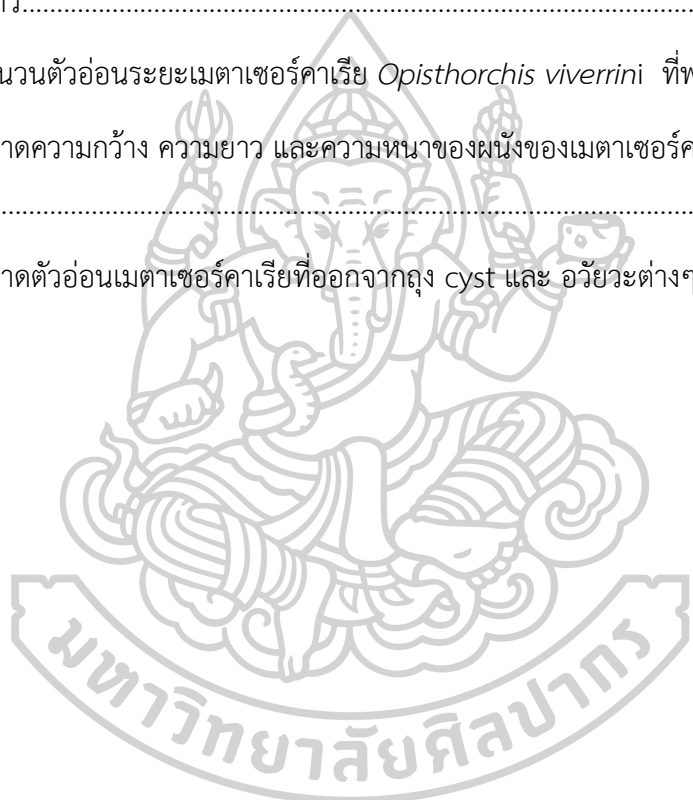
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบขนาดของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย..... 36

ตารางที่ 3 อัตราการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ในปลาตะเพียนขาว..... 43

ตารางที่ 4 จำนวนตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ที่พบในอวัยวะต่างๆ 44

ตารางที่ 5 ขนาดความกว้าง ความยาว และความหนาของผนังของเมตาเซอร์คาเรียในแต่ละสัปดาห์ 49

ตารางที่ 6 ขนาดตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst และ อวัยวะต่างๆในแต่ละสัปดาห์..... 50



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พยาธิใบไม้ตับเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขในประเทศไทย ประเมินการว่ามีผู้ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้มากถึง 8 ล้านคน (Sithithaworn, 2012) โดยพบว่าภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นแหล่งระบาดหลัก และมีความชุกของพยาธิใบไม้ตับสูงกว่าภาคอื่น เมื่อปี พ.ศ. 2546 พบความชุกมากที่สุดในภาคเหนือ รองลงมาเป็นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง โดยมีอัตราความชุกร้อยละ 19.3, 15.7 และ 3.8 ตามลำดับ ต่อมาในปี พ.ศ. 2554 มีรายงานว่าพบความชุกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือสูงถึงร้อยละ 20.39 (Wattanayingcharoenchai et al., 2011) ซึ่งการระบาดของโรคพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางภูมิประเทศ เนื่องจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือมีแหล่งน้ำจืดจำนวนมาก ซึ่งเป็นที่อยู่ของปลาและหอยที่เป็นตัวกลางของการติดต่อโรคพยาธิ อีกทั้งการสุขาภิบาลในชนบทยังไม่ดีพอ ยังคงมีประชาชนที่ไม่ถ่ายอุจจาระลงในห้องสุขาทำให้ไข่พยาธิที่ปนเปื้อนในอุจจาระไหลลงสู่แหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราความชุกของพยาธิใบไม้ตับในแหล่งที่มีการระบาด มีความเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการบริโภคปลาดิบของคนในพื้นที่ โดยเฉพาะ ก้อยปลา ซึ่งเป็นอาหารที่นิยมบริโภคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งปลาร้าและปลาสัมผัก (Upatham & Viyanant, 2003) ในประเทศไทย พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* เป็นพยาธิที่สำคัญ สามารถก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ตับ opisthorchiasis รวมถึงสามารถเหนี่ยวนำให้ก่อโรคมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma; CCA) ผู้ป่วยได้รับพยาธิเข้าสู่ร่างกายโดยการบริโภคปลาน้ำจืดตระกูลปลาตะเพียนที่มีตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ซึ่งเป็นระยะติดต่อของพยาธิ ปรสิตจะเจริญเป็นตัวเต็มวัยและอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีในตับ เมื่อไข่ที่ปนออกมากับอุจจาระตกลงไปในแหล่งน้ำ ไข่จะถูกหอยน้ำจืดซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางตัวที่หนึ่งกินและเจริญเป็นตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย เซอร์คาเรียจะว่ายน้ำออกจากหอยไข่เข้าสู่ปลาน้ำจืดซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางตัวที่สองและเจริญเป็นเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อ ปลาน้ำจืดวงศ์ Cyprinidae คือปลาในวงศ์ตะเพียน มีรายงานจำนวนชนิดมากที่สุดในปลาน้ำจืดของประเทศไทย และเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีการค้าขายตามตลาดปลาทั่วไป นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่มปลาที่ใช้บริโภคกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (ชวลิต วิทยานนท์, 2547) ได้แก่ ปลาตะเพียน ปลาสร้อย ปลายี่สก และปลากระสูบ เป็นต้น จากรายงานการแพร่กระจาย

พันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลา cyprinid บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบปลาที่ติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรีย 6 ชนิด คือ ปลาไส้ตันตาขาว ปลาแก้มขี้ปลา ปลากระสูบจุด ปลาสร้อยขาว ปลาสร้อยนกเขา และ ปลากระมัง และพบว่าปลาที่มีการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียจะอาศัยอยู่บริเวณเขื่อน 70% บริเวณสระน้ำ 23.7% และบริเวณแม่น้ำ 7.7% และพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในปลาแต่ละตัวคือ 0.01-6.5 เมตาเซอร์คาเรีย (Pinlaor et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานการสำรวจชนิดของปลาน้ำจืดที่พบตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียจากบางท้องที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา, เขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์, เขื่อนน้ำอูน และบึงหนองหาน จังหวัดสกลนคร พบว่าปลาที่ตรวจพบเมตาเซอร์คาเรีย 90.13% เป็นปลาในวงศ์ Cyprinidae โดยพบการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ลำไส้ *Haplorchis taichui* มีการแพร่กระจายในปลา 8 ชนิด ได้แก่ ปลากระมัง ปลากระสูบขีด ปลากระสูบจุด ปลาตะเพียนขาว ปลาสร้อยขาว ปลาสร้อยนกเขา ปลาไส้ตันตาขาว และปลาไส้ตันตาแดง พยาธิใบไม้ลำไส้ *Haplorchoides* sp. พบในปลา 6 ชนิด ได้แก่ ปลากระสูบจุด ปลากระแห ปลาแก้มขี้ปลา ปลาตะพาก ปลาสร้อยนกเขา และปลาไส้ตันตาขาว และพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* พบในปลา 1 ชนิด คือปลาตะเพียนขาว (วัชรวิภา ภูริวีโรจน์กุล, 2554) การศึกษาพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลาน้ำจืดเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถประเมินสถานการณ์การระบาดของโรคพยาธิในชุมชนได้ การศึกษาในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ได้จากหอยที่ติดเชื้อพยาธิจากประเทศกัมพูชา ในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus* ซึ่งเป็นปลาที่ประชาชนนิยมบริโภคและพบได้ง่ายในแหล่งน้ำธรรมชาติ รวมถึงการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่เจริญในปลาหลังการติดเชื้อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ได้จากประเทศกัมพูชาในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus*
2. เพื่อศึกษาอัตราการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ได้จากประเทศกัมพูชาในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus*
3. เพื่อศึกษาการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ที่ได้จากประเทศกัมพูชาในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus*

ขอบเขตของการวิจัย

ทดลองการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียของพยาธิ *O. viverrini* จากหอยที่สู่มเก็บจากประเทศกัมพูชา ในปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus* ตรวจสอบอัตราการติดเชื้อและความสามารถในการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิ *O. viverrini* รวมถึงศึกษาการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลาตะเพียนขาวหลังการติดเชื้อ

นิยามศัพท์เฉพาะ

คำศัพท์	ความหมาย
accidental host	โฮสต์ซึ่งติดเชื้อปรสิตโดยบังเอิญ ปรสิตสามารถดำเนินชีวิตจนครบวงจรชีวิตได้ หรืออาจพบว่าปรสิตสามารถเจริญเป็นระยะตัวแก่ได้แต่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้
anal fin	ครีบก้นจะอยู่ระหว่างรูก้น และครีบหลัง
barbel	ส่วนที่เป็นหนวดของปลา จะอยู่บริเวณส่วนหัวใกล้กับปาก และจมูก หรืออยู่ใต้คาง
carrier	โฮสต์ที่มีความต้านทานต่อปรสิต สามารถทำลายปรสิตลง แต่ไม่หมดไป ยังสามารถแพร่กระจายปรสิตให้ผู้อื่นได้
caudal fin	ครีบหางอยู่ท้ายสุดของลำตัวปลา
cercaria	ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ ซึ่งเจริญมาจาก redia หรือ sporocyst
cyprinidae	ปลาน้ำจืดตระกูลปลาตะเพียน
definitive host	โฮสต์สุดท้ายหรือสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นที่อาศัยของปรสิตโดยที่ปรสิตมีเพศพันธุ์แบบอาศัยเพศ
digenetic	เทอมที่ใช้กับ flukes หรือ parasites ที่มีการเจริญสองแบบ คือ asexual เกิดในระยะตัวอ่อน และ sexual เกิดในระยะตัวแก่จึงสมบูรณ์ในวงชีวิตช่วงหนึ่ง
dorsal fin	ส่วนของครีบหลังที่อยู่ส่วนหลังของลำตัวปลา อาจมี 1, 2 หรือ 3 ตอนก็ได้
esophagus	ส่วนที่อยู่ระหว่างปากและลำไส้

excretory bladder	ทำหน้าที่เป็นกระเพาะขับถ่ายของเสีย
excretory duct	ท่อที่ทำหน้าที่สำหรับขับถ่ายของเสีย
excretory pore	ช่องเปิดสำหรับการขับถ่ายของเสีย
excretory vesicle	กลุ่มเซลล์ที่เรียงตัวล้อมรอบเป็นผนังเซลล์ ภายในเป็นช่องว่างใส อยู่ทางด้านท้ายลำตัว (body) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมความเข้มข้นของสารภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับที่สมดุล เช่น การขับถ่าย ของเสียหรือแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์
eyespots	ส่วนตาของพยาธิใบไม้ที่มีหรือไม่มี pigment โดยทั่วไปจะพบ 1 คู่
flame cell	เป็น excretory cell ซึ่งมีขนใช้โบกพัดของเสียออกจากร่างกาย
freshwater fish	ปลาที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด
gland duct	ท่อของต่อมต่างๆ
genital pore	ทางเปิดส่วนรวมของอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวผู้และตัวเมีย
germinal cells	เซลล์เจริญที่พบการกระจายเซลล์จำนวนมากในตัวอ่อนของพยาธิใบไม้
gill raker	เป็นส่วนประกอบของเหงือกที่เกาะอยู่ทางด้านในของกระดูกเหงือกด้านตรงข้ามกับเส้นเหงือก
hermaphrodite	พยาธิใบไม้ที่มีสองเพศในตัวเดียวกัน
infection	การที่ protozoa หรือ helminths เข้าไปในโฮสต์แล้วสามารถเจริญต่อไปเป็นตัวเต็มวัยหรือก่อให้เกิดโรคต่อโฮสต์ได้
intermediate host	โฮสต์ตัวกลางหรือสิ่งมีชีวิตที่ปรสิตเข้าไปอาศัยอยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย แล้วปรสิตเจริญเติบโตเปลี่ยนรูปร่าง จากระยะหนึ่งไปเป็นอีกระยะหนึ่ง แต่ยังไม่ถึงตัวเต็มวัย
laurer's canal	อวัยวะที่เป็นท่อต่อกับ oviduct และภายนอกคล้าย copulatory canal
lateral line	เส้นข้างลำตัวของปลา อยู่ทางด้านข้างของตัวด้านละเส้น ใช้รับความรู้สึกเกี่ยวกับแรงสั่นสะเทือนของน้ำ
metacercaria	ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ที่พัฒนามาจากตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย รูปร่างเป็นถุงชีสต์

miracidium	พยาธิตัวอ่อน (larva) ที่มีขนรอบๆตัวซึ่งฟักออกจากไข่ของ พยาธิใบไม้
operculum	แผ่นปิดเหงือก จะอยู่ 2 ข้างของส่วนหัวของปลา ทำหน้าที่ปิดเปิดเหงือก เพื่อช่วยหายใจ
opercular bone	กระดูกกระพุ้งแก้มหรือกระดูกปิดเหงือก
oral sucker	อวัยวะยึดเกาะรอบปากส่วนบน
parasitism	การอยู่ร่วมกันแบบที่ฝ่ายหนึ่งได้ประโยชน์แต่อีกฝ่ายหนึ่งเสียประโยชน์
pectoral fin	ครีบอก จะเป็นครีบคู่อยู่ถัดจากช่องเหงือกมาทางหลังเล็กน้อย
redia	ตัวอ่อนพยาธิใบไม้เจริญมาจาก sporocyst มีรูปร่างเป็นถุง (sac) ภายในตัวมีหลอดอาหาร และส่วนที่จะเจริญเป็นลำไส้ มีผนังบาง และมีกล้ามเนื้อคอหอย (pharynx) ภายในช่องว่างลำตัวจะมีตัวอ่อนและ germinal cell
reservoir host	สัตว์ที่โดยปกติมีปรสิต และปรสิตนั้นติดสู่คนได้ โฮสต์นี้จะเป็นตัวที่กักตุนให้ปรสิตอยู่ในธรรมชาติได้ และเป็นแหล่งแพร่กระจายปรสิตมาสู่คน ทำหน้าที่คล้ายเป็นรังโรค
seminal receptacle	อวัยวะของตัวเมียที่มีไว้สำหรับเก็บสเปิร์ม
seminal vesicle	ส่วนล่างสุดของ vas deferens ซึ่งขยายใหญ่และเปิดเข้าสู่ cirrus
sucker	อวัยวะสำหรับใช้เกาะยึด ซึ่งอาจอยู่รอบปาก เรียกว่า oral sucker หรืออยู่ด้านท้อง เรียกว่า ventral sucker
vas efferens	ท่อที่ออกจากอัณฑะ (testes) ไปยัง vas deferens
vas deferens	ท่อที่ต่อจาก vas efferens ไปยัง cirrus
ventral sucker	อวัยวะยึดเกาะส่วนท้อง
ventral fin	ครีบท้อง เป็นครีบที่อยู่ด้านล่างของลำตัวโดยอยู่คนละข้าง ของแนวสันท้อง
vitelline glands	ต่อมซึ่งให้สารสำหรับการเจริญเติบโตของไข่และสร้างเปลือกไข่

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Fish - borne zoonotic trematodes (FZT)

การติดเชื้อพยาธิผ่านการกินปลาเป็นอาหาร (Fish - borne zoonotic trematodes; FZT) ยังคงปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งพบมากในทวีปเอเชีย เป็นผลมาจากพฤติกรรมการบริโภคอาหาร ซึ่งยังมีการนิยมรับประทานอาหารดิบๆ โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Kaewkes, 2003) มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในกลุ่ม Opisthorchiidae สูง ซึ่งเป็นกลุ่มพยาธิที่ก่อโรคในคน ส่งผลให้คนที่ติดเชื้อพยาธิในกลุ่มนี้มีอัตราเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งตับ มีรายงานผู้ติดเชื้อพยาธิในกลุ่มนี้ประมาณ 45 ล้านคนทั่วโลก โดยมีพยาธิที่ก่อโรคสำคัญในคน 3 ชนิด ประกอบด้วย พยาธิ *Clonorchis sinensis* มีการติดเชื้อ 35 ล้านคน พยาธิ *Opisthorchis viverrini* มีการติดเชื้อ 10 ล้านคน และพยาธิ *Opisthorchis felinus* มีการติดเชื้อ 1.2 ล้านคน ซึ่งการติดเชื้อพยาธิในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรค hepatobiliary และการติดเชื้อเรื้อรังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) ในผู้ป่วยได้ (Sithithaworn et al., 2012) นอกจากนี้ยังส่งผลไปสู่ปัญหาทางด้านเศรษฐกิจ เฉพาะในประเทศไทย ต้องใช้งบประมาณกว่า 120 ล้านดอลลาร์สหรัฐ สำหรับการจ่ายยาและรักษาผู้ป่วยและผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* (King & Scholz, 2001) คนสามารถติดเชื้อพยาธิกลุ่มนี้ได้โดยการบริโภคปลาที่ปนเปื้อนตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) โดยไม่ปรุงให้สุก เช่น ก้อยปลา ปลาจ๋า และ ปลาต้ม เป็นต้น โดยมีปลาหลายชนิดที่พบรายงานการติดเชื้อ เช่น ปลาตะเพียน ปลาชิว ปลาสร้อย และปลาแก้มช้ำ เป็นต้น (Sithithaworn et al., 2012)

โดยพยาธิใบไม้ตับ *C. sinensis* จะพบการแพร่ระบาดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน ไทย และลาว พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จะพบการแพร่ระบาดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย ลาว พม่า เวียดนาม และกัมพูชา สำหรับพยาธิใบไม้ตับ *O. felinus* จะพบการแพร่ระบาดอยู่ในทวีปยุโรป เช่น โปแลนด์ เยอรมัน และรัสเซีย (รูปที่ 1) (Sithithaworn, 2003)

การจัดจำแนกชนิดพันธุ์พยาธิใบไม้ตับในวงศ์ Opisthorchiidae (Braun, 1901)

พยาธิใบไม้ตับจัดอยู่ใน Phylum Platyhelminthes เป็นกลุ่มพยาธิตัวแบน จัดอยู่ใน Class Trematoda ซึ่งเป็นกลุ่มของพยาธิใบไม้ และจัดอยู่ในวงศ์ Opisthorchiidae เป็นวงศ์ของพยาธิใบไม้ตับ (liver flukes) โดยมีพยาธิที่สำคัญซึ่งก่อโรคในคน 3 ชนิด ได้แก่ *O. viverrini*, *C. sinensis* และ *O. felinus* โดยทั่วไปจะมีลำตัวยาวแบนบางและมีลักษณะใส คอหอยยังไม่ค่อยพัฒนาหรืออาจไม่พบเลย อัณฑะ (testes) มี 2 ก้อนเรียงตัวตรงข้างหรือเรียงเฉียงกันอยู่ทางด้านท้ายของลำตัว รังไข่ (ovary) จะมีลักษณะเป็นก้อนเล็ก ตำแหน่งจะอยู่เหนืออัณฑะขึ้นไป vitelline follicles จะเรียงตัวอยู่ข้างลำตัว มดลูก (uterus) ขดตัวอยู่ตั้งแต่กลางลำตัวขึ้นไปยังด้านบน excretory มีลักษณะเป็นรูปตัว Y พยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในท่อน้ำดี ตับ ถุงน้ำดี ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก และคน

อนุกรมวิธานและสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (Poirier, 1886)

พยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จัดอยู่ใน Phylum Platyhelminthes (flat worm), Class Trematoda (flukes), Subclass Digenea, Order Opisthorchiformes, Family Opisthorchiidae, Genus *Opisthorchis*

1. ระยะตัวเต็มวัย (adult)

ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จะมี 2 เพศในตัวเดียวกัน (monoecious) รูปร่างคล้ายใบไม้ มีลำตัวแบนยาว ขนาดของลำตัวโดยเฉลี่ยยาว 5.5–9.55 มม. กว้าง 0.77–1.65 มม. ขณะมีชีวิตลำตัวจะบางใส oral sucker อยู่เกือบปลายสุดของส่วนหน้า (anterior) และ ventral sucker อยู่ถัดจากส่วนหน้าประมาณ 1/5 ของความยาวลำตัว คอหอยมีลักษณะเป็นมัดกล้ามเนื้อ มีหลอดอาหารสั้น ลำไส้แยกออกเป็นสองแขนงยาวไปทางด้านข้างถึงส่วนท้ายของลำตัว มีรังไข่ (ovary) 1 อัน ลักษณะเป็น lobe มดลูก (uterus) ยาวขดไปมาอยู่กลางลำตัวระหว่างรังไข่กับ ventral sucker มีอัณฑะ 2 อัน ลักษณะเป็นก้อนที่มีร่องกลีบเรียงต่อกันตามความยาวของลำตัว (รูปที่ 2)

2. ระยะไข่ (egg)

ไข่มีรูปร่างรี มีสีน้ำตาลปนเหลือง มีไหล่ (shoulder) มองเห็นชัดเจน มีฝาปิด (operculum) อยู่บนไหล่ ไข่จะมีขนาดเล็ก โดยมีความยาว 19-29 μm และความกว้าง 12-17 μm

3. ระยะเวลาอ่อนระยะไมราซิเดียม (miracidium)

ระยะเวลาอ่อนที่เจริญอยู่ในไขพยาธิ รูปร่างคล้ายกระสวย มีขนอยู่รอบตัว มี apical gland อยู่บริเวณด้านบนสุดของส่วนหน้า มี cephalic gland ยาว germinal cell ขนาดใหญ่ และมี flame cell 1 คู่ ไม่พบ eye spots และอวัยวะรับสัมผัส (Kaewkes, 2003)

4. ตัวอ่อนระยะสปอร์โรซิส (sporocyst) และเรเดีย (redia)

ตัวอ่อนระยะสปอร์โรซิสมีขนาด 1.1-0.65 มม. มีผนังลำตัวหนา ภายในบรรจุตัวอ่อนระยะเรเดียจำนวนมาก ตัวอ่อนระยะเรเดียเมื่อโตเต็มที่ จะออกมาจากสปอร์โรซิส ตัวอ่อนระยะเรเดียจะมีความยาวของลำตัว 0.18-1.1 มม. และความกว้างของลำตัว 0.08-0.28 มม. ตัวอ่อนระยะเรเดียจะมี pharynx ภายในจะมีเซอ์คาร์เรีย 15 เซอ์คาร์เรีย (Wykoff et al., 1965) (รูปที่ 3)

5. ตัวอ่อนระยะเซอ์คาร์เรีย (cercariae)

ตัวอ่อนระยะเซอ์คาร์เรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็นเซอ์คาร์เรียในกลุ่ม Parapleurolophocercous cercariae เป็นกลุ่มเซอ์คาร์เรียที่มีลักษณะเด่น คือ มี lateral finfold บริเวณหาง ลำตัวมี penetration gland และ cystogenous gland ส่วนของ ventral sucker ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ และในส่วน eye spots มี pigment ตัวอ่อนระยะเซอ์คาร์เรียของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีความยาว 490–565 μm ความกว้าง 140–180 μm ลักษณะทั่วไปลำตัว (body) จะมี spines เล็กๆ ปกคลุม มี sensory hairs 10 คู่ oral sucker มีลักษณะเป็นทรงรี ขนาด 36-37 μm ถึง 34-51 μm (Wykoff et al., 1965) มี eye spots 1 คู่ อยู่ส่วนบนของลำตัวถัดจาก oral sucker มีต่อม penetration gland 5 คู่ ventral sucker เจริญไม่ได้อยู่ตรงกลางลำตัว excretory bladder เรียงตัวด้วยเซลล์ epithelial อยู่บริเวณส่วนท้ายของลำตัว (posterior) collecting tubes 2 เส้น จะเริ่มจากบริเวณ excretory bladder ไปยังส่วนบนของลำตัวเรียกว่า anterior collecting tubes และเส้นที่ไปยังส่วนล่างของลำตัวเรียกว่า posterior collecting tube โดยพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จะมีรูปแบบของ flame cell คือ $2[(3+3)+(3+3+3)]$ ส่วนหางจะมีลักษณะยาวกว่าส่วนลำตัว โดยส่วนหางจะมี lateral finfolds ยาวเป็น $1/3$ ของความยาวหาง และมี dorsol-ventral finfold ยาวเป็น $2/3$ ของความยาวหาง โดยมีท่อ caudal excretory อยู่บริเวณกลางหางและทอดยาวตลอดความยาวหาง (รูปที่ 4) (Jiro et al., 1962; Wykoff et al., 1965)

6. ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercariae)

ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจะอยู่ภายในซีสต์ผนัง 2 ชั้น รูปร่างส่วนใหญ่มีลักษณะรูปไข่หรือกลม โดยปกติมีชั้นผนังที่บาง ซึ่งผนังชั้นนอกหนาประมาณ 3-8 μm และผนังด้านในบางมากจะสามารถสังเกตได้เฉพาะหลังจากตัวอ่อนออกจากซีสต์แล้วเท่านั้น ขนาดของซีสต์โดยเฉลี่ย 201x 167 μm ลำตัวของเมตาเซอร์คาเรียที่อยู่ในซีสต์ สามารถเคลื่อนไหวไปมา และมักจะงอพับ เห็นลักษณะเป็นรูปทรง C-shaped ผนังตัวบางใส สามารถมองเห็น bladder มีสีน้ำตาลเหลือง (brownish – yellow) excretory bladder จะเห็นเป็นรูปไข่ โดยจะเห็นเป็นแกรนูลสีดำ สามารถมองเห็น oral sucker และ ventral sucker (Vajrasthira, 1961) โดยพยาธิใบไม้ตับและพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กนั้น ระยะที่เป็นระยะติดต่อกของพยาธิคือระยะเมตาเซอร์คาเรีย สามารถพบได้ ในอวัยวะหลายส่วนของปลา แต่พบได้มากที่สุดที่บริเวณหาง และกล้ามเนื้อหาง (Sukontason et al., 2001) (รูปที่ 5)

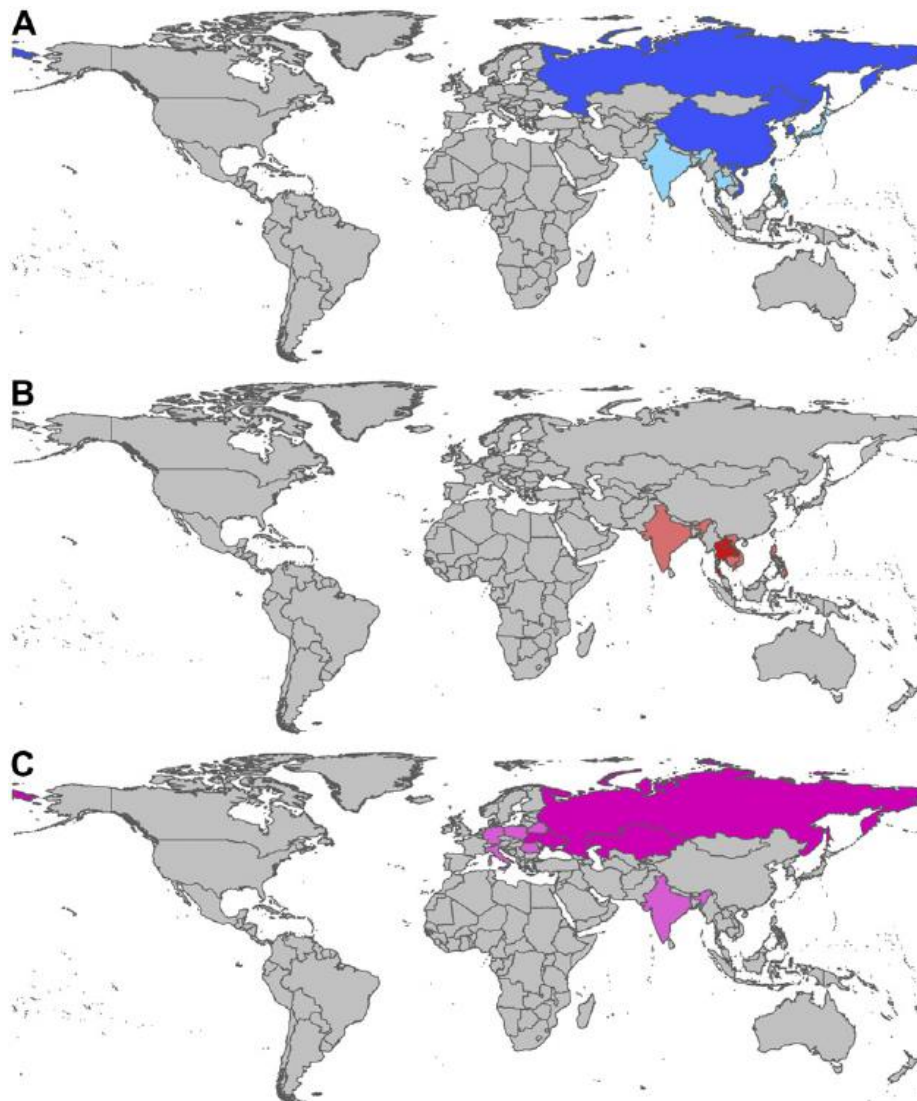
วงชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* โดยทั่วไปอาศัยอยู่ที่ท่อน้ำดี (bile duct) และถุงน้ำดีในตับของคน หรือ Reservoir host เช่น สุนัข และแมว เป็นต้น ไข่จะปนออกมาพร้อมกับน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็กและออกไปสู่ภายนอกพร้อมกับอุจจาระของโฮสต์ เมื่อไข่ตกลงน้ำจะยังไม่ฟักตัวจนกว่าจะถูกหอย *Bithynia* ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง (first intermediate host) กินเข้าไป เมื่อหอยน้ำจืดเหล่านี้กินไข่เข้าไปตัวอ่อนภายในไข่ ก็คือ miracidium จะฟักตัวออกจากเปลือกไข่ในกระเพาะของหอยแล้วเจริญเติบโตเป็น sporocyst และ redia จนเป็น cercaria ในเวลาประมาณ 6-8 สัปดาห์ ต่อจากนั้น cercaria จะไชออกจากหอยว่ายน้ำแล้วไชเข้าสู่ปลาน้ำจืดวงศ์ตะเพียน เช่น ปลาขาว ปลาขาวน้อย ปลากระสูบ ปลาตะเพียนสาย ปลาแก้มขี้ ปลาชีว ปลาสุต ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง (second intermediate host) โดยเข้าไปอยู่ในไตครีบและเนื้อปลา กลายเป็น metacercaria มี cyst หุ้ม ซึ่งเป็นระยะติดต่อก (infective stage) ในเวลาประมาณ 6 สัปดาห์ เมื่อคน หรือสัตว์ที่เป็นโฮสต์เฉพาะกินปลาเหล่านี้ที่ดิบ หรือปรุงไม่สุก เช่น ก้อยปลา ปลาร้า ปลาจ่อม และปลาต้ม เป็นต้น จะได้รับพยาธิ ซึ่งตัวอ่อนของพยาธิจะแตกออกจาก cyst บริเวณ ลำไส้เล็กส่วน duodenum หรือ jejunum เคลื่อนที่เข้าสู่ท่อน้ำดีใหญ่เข้าไปสู่ทางเดินน้ำดีในตับ และเจริญเติบโตจนเป็นตัวเต็มวัยภายในเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ ก็สามารถผสมพันธุ์และผลิตไข่ได้ พยาธิตัวแก่มีชีวิตยืนยาวอยู่ในคนบางคนได้นานถึง 20-25 ปี (Harinasuta, 1984; Kaewkes, 2003) (รูปที่ 6)

ระบาดวิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

สำหรับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็นพยาธิตัวการสำคัญที่ก่อโรคในคนและสัตว์ และเป็นปัญหาสำคัญในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศในแถบลุ่มแม่น้ำโขง ประกอบด้วยภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม ซึ่งประมาณการว่ามีผู้ป่วยเกือบ 10 ล้านคนที่ติดเชื้อ *O. viverrini* ในประเทศไทย และประเทศลาว (Sithithaworn et al., 2012) จากผลการสำรวจการแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในประเทศกัมพูชา ในปี 2006 มีรายงานอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูง ในจังหวัด Takeo (26.9%) และจังหวัด Kandal (10.7%) (Sithithaworn et al., 2012) ถัดมาอีกหกปีมีรายงานในจังหวัด Takeo พบอัตราการติดเชื้อสูงถึง 47.5% (Yong et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย ในปลาน้ำจืดกลุ่ม cyprinid ซึ่งมีอัตราการติดเชื้อสูงตั้งแต่ 2.1% ถึง 66.7% ของปลาที่สำรวจจากจังหวัด Kandal (Touch et al., 2009)

พบรายงานการตรวจพบพยาธิใบไม้ตับในคนครั้งแรกของโลกในประเทศไทยจาก จ.เชียงใหม่ โดย Leiper เมื่อปี พ.ศ. 2458 และมีรายงานการตรวจพบพยาธิชนิดนี้อีกครั้งในผู้ป่วยจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อ พ.ศ. 2470 (Sripa et al., 2012) จากรายงานการสำรวจแห่งชาติครั้งแรกในปีพ.ศ. 2523-2524 พบอัตราการติดเชื้อโดยรวมของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* 14% โดยพบมากที่สุดที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 34.6%, ภาคกลาง 6.3%, ภาคเหนือ 5.6% และภาคใต้ 0.01% ซึ่งสัมพันธ์กับผลการศึกษาในช่วงปีพ.ศ. 2533-2544 ที่พบอัตราการติดเชื้อในจังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่ 2.1% ถึง 70.8% (Sriamporn et al., 2004) จากการควบคุมโรคพยาธิใบไม้ตับของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งส่งผลให้อัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในประชากรลดลงถึง 8.7% ในปี พ.ศ. 2552 โดยที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือยังคงพบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* สูงที่สุด (16.6%) รองลงมาคือภาคเหนือ (10.0%), ภาคกลาง (1.3%) และภาคใต้ 0.01% แต่จากข้อมูลการติดเชื้อในปี พ.ศ. 2552 นี้เองก็ยังพบว่าผู้ป่วยด้วยโรค opisthorchiasis มากกว่า 6 ล้านคน หรือคิดเป็น 9.4% ของประชากรทั้งหมดในประเทศไทย ซึ่งเป็นจำนวนที่มากที่สุดในโลก (Sithithaworn et al., 2012) ยิ่งไปกว่านั้นจากผลการสำรวจเร็วๆนี้ในช่วง 5 ปีหลัง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553-2558 พบว่ามีอัตราการติดเชื้อเพิ่มขึ้นมากถึง 20% โดยภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบการติดเชื้อสูงที่สุดถึง 45.7% (Kaewpitoon et al., 2015)

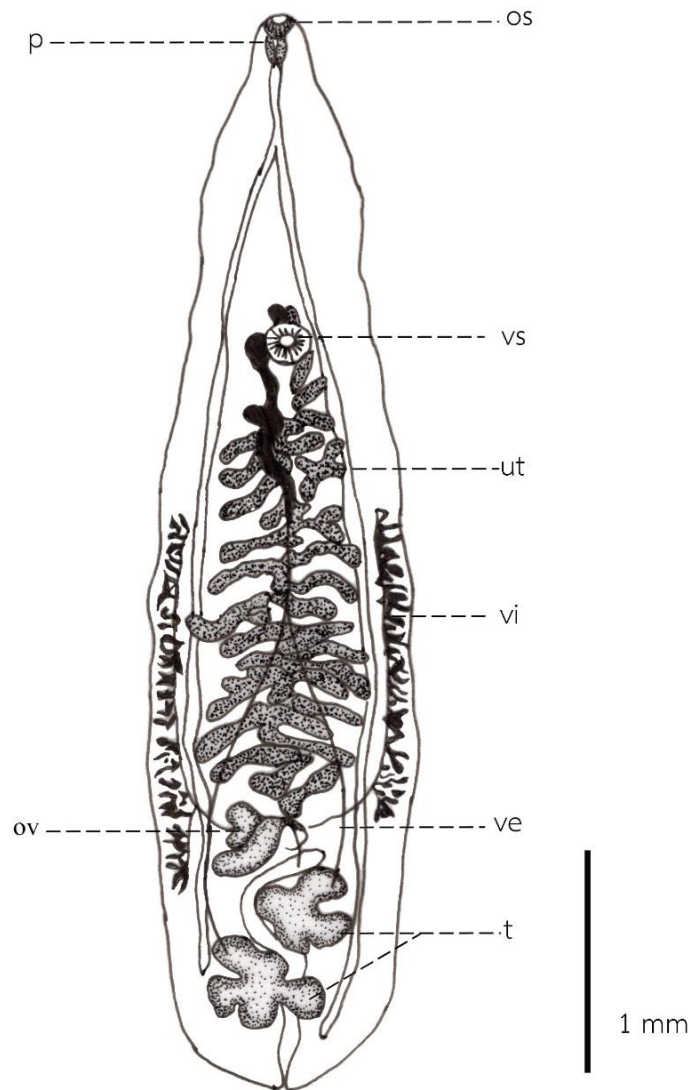


รูปที่ 1 แผนที่การแพร่กระจายพันธุ์ของพยาธิใบไม้ตับกลุ่ม *Opisthorchiidae* (Fürst et al., 2012)

A: พื้นที่การแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis*

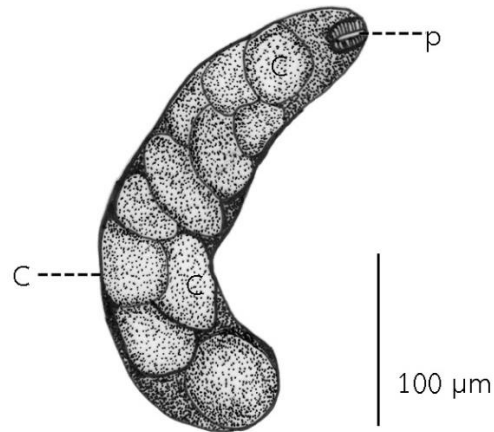
B: พื้นที่การแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

C: พื้นที่การแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis felineus*

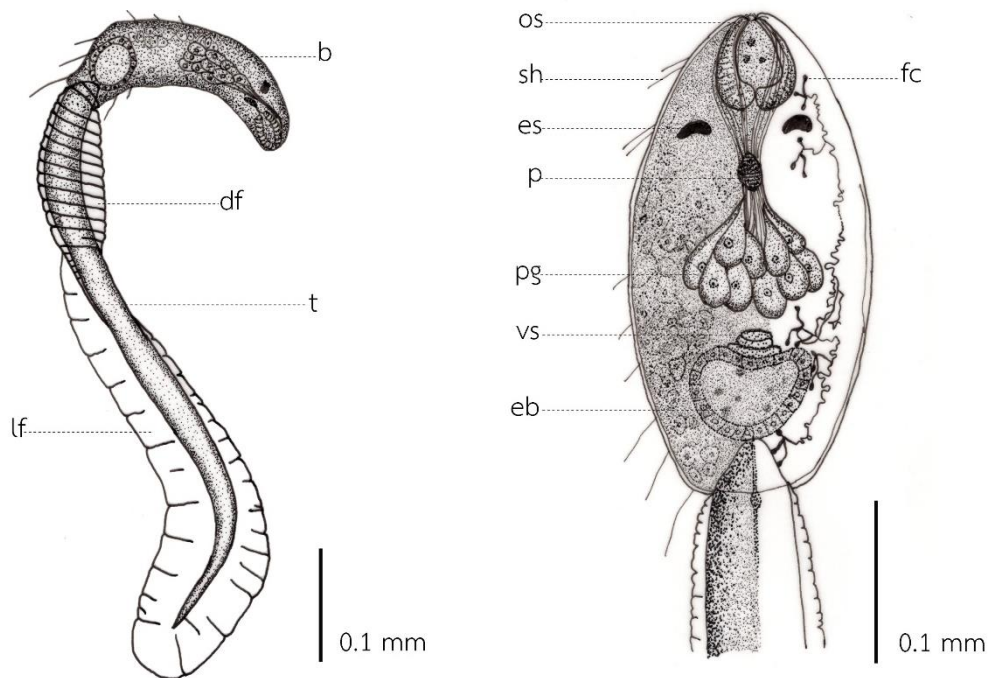


รูปที่ 2 ตัวเต็มวัย *Opisthorchis viverrini*

(os: oral sucker, p: pharynx, vs: ventral sucker, ut: uterus,
vi: vitellaria, ov: ovary, ve: vas efferens, t: testes)

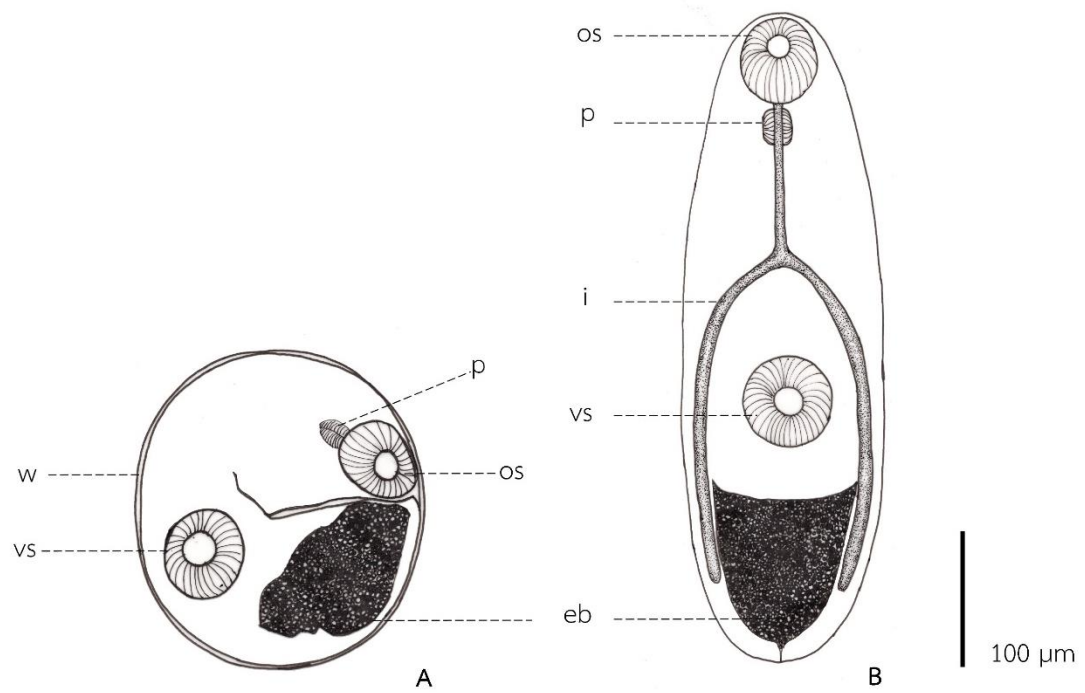


รูปที่ 3 ตัวอ่อนระยะเรเดีย *Opisthorchis viverrini*
(p: pharynx, c: cercaria)



รูปที่ 4 ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini*

(b: body, os: oral sucker, fc: flame cell, sh: sensory hair, es: eyespot,
p: pharynx, pg: penetration gland, vs: ventral sucker, eb: excretory bladder,
df: dorsal-ventral finfold, t: tail, lf: lateral finfold) (ที่มา: Wykoff, 1965)



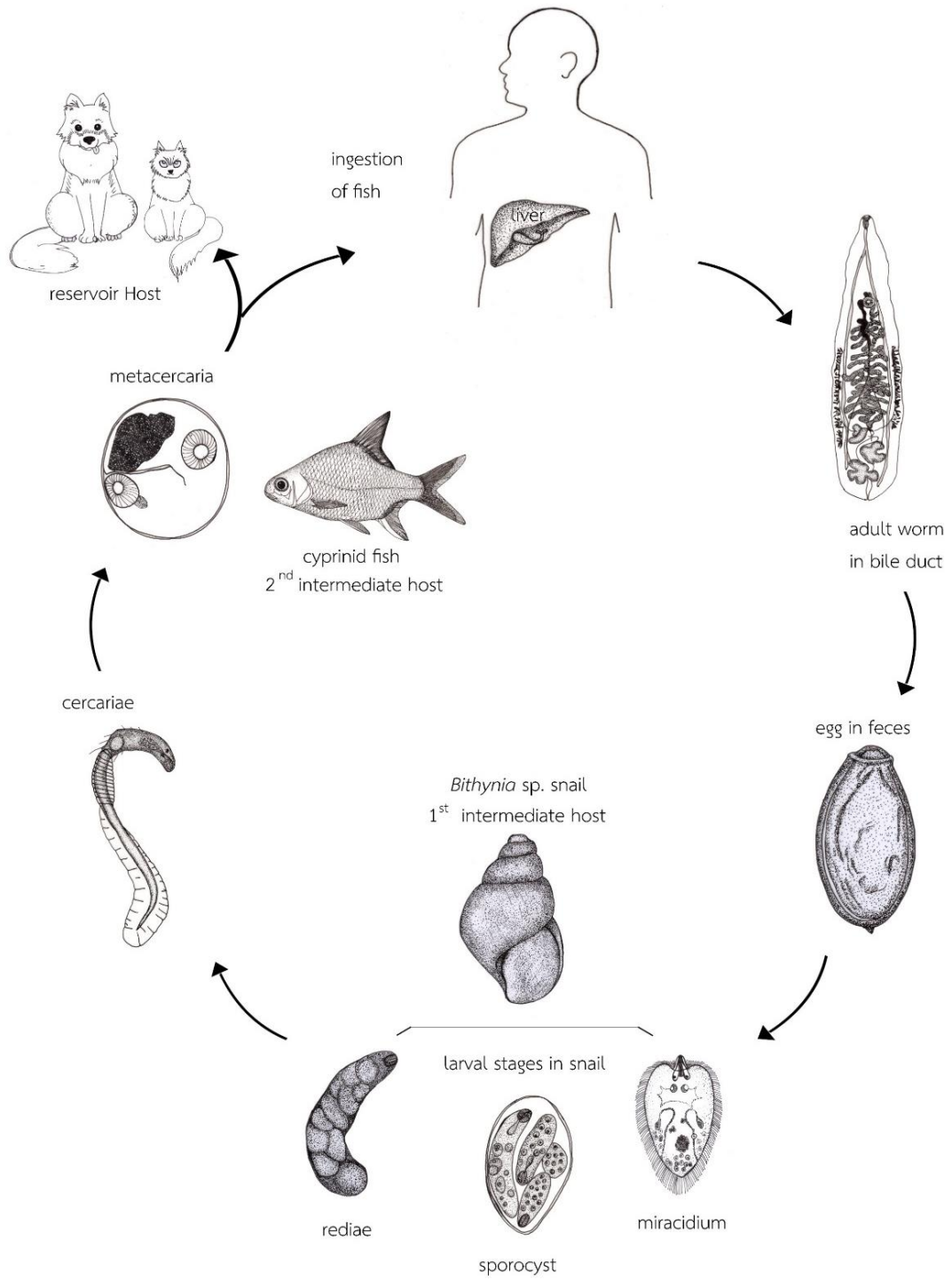
รูปที่ 5 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini*

(os: oral sucker, p: pharynx, l: intestinal caeca,
vs: ventral sucker, eb: excretory bladder, w: wall)

A: เมตาเซอร์คาเรียภายในถุงชีสต์ (encysted metacercaria)

B: เมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุงชีสต์ (excysted metacercaria)





รูปที่ 6 วงชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

ลักษณะภายนอกของปลา (external anatomy of fish)

1. การแบ่งส่วนต่างๆ ของปลา

ปลาโดยทั่วไปมีรูปร่างแบบสมมาตรซ้าย-ขวา (bilateral symmetry) ยกเว้นปลาซีกเดียว รูปร่างภายนอกของปลาจะแบ่งออกเป็นส่วนๆ ตามความยาวของลำตัวได้เป็น 3 ส่วนดังนี้ (วิมล เหมะจันทร์, 2540; สุภาพร สุกสีเหลือง, 2550)

1.1 ส่วนหัว (head)

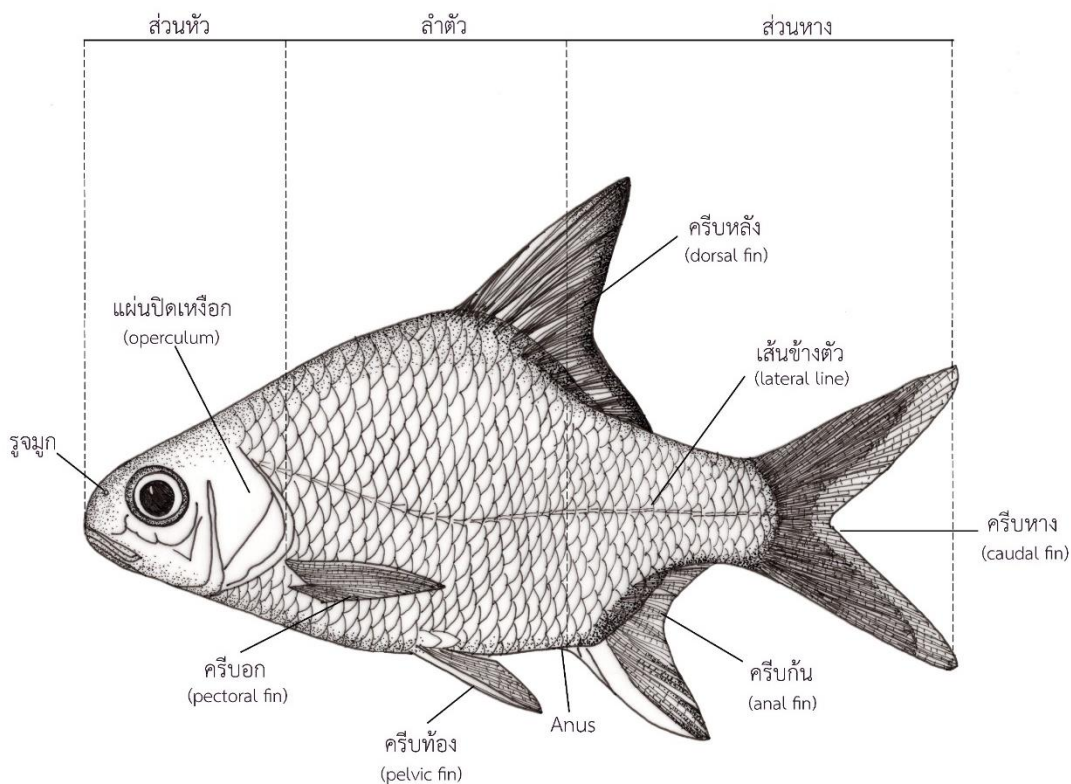
หัวเป็นส่วนที่นับตั้งแต่ปลายสุดของส่วนหน้าของลำตัว ไปจนจรดเส้นดิ่งที่ลากผ่านขอบด้านท้าย ของแผ่นปิดเหงือก (gill cover or operculum) ส่วนหัวยังแบ่งเป็นจะงอยปาก (snout) ซึ่งหมายถึงส่วนหน้าสุดของหัวไปจนถึงเส้นดิ่งที่ลากผ่านขอบของตา ส่วนหัวเป็นที่อยู่ของสมอง อวัยวะรับความรู้สึกทุกชนิด เป็นที่ตั้งของระบบหายใจ และระบบแลกเปลี่ยนก๊าซ

1.2 ส่วนลำตัว (trunk หรือ body)

เป็นส่วนที่ต่อจากหัวหรือเส้นดิ่ง ที่ลากผ่านแผ่นปิดเหงือกไปจรดเส้นดิ่งที่ลากผ่านรูกัน (anus) ส่วนของลำตัวนี้เป็นที่ตั้งของอวัยวะภายใน และครีบต่างๆ ได้แก่ ครีบอก (pectoral fins) ครีบท้อง (pelvic or ventral fin) ครีบหลัง (dorsal fin) ยกเว้นครีบกัน (anal fin) และครีบหาง (caudal fin)

1.3 ส่วนหาง (tail)

เป็นส่วนที่ต่อจากลำตัวไปจนสุดส่วนท้ายของครีบหาง เป็นที่ตั้งของครีบกัน (anal fin) และครีบหาง (caudal fin) ครีบหางทำหน้าที่บังคับทิศทาง และช่วยในการพุงตัวให้ลอยขึ้น-ลง ตามระดับที่ต้องการ



รูปที่ 7 อวัยวะภายนอกและส่วนต่างๆของปลากระดุกเข็ง

2. อวัยวะภายนอกของปลา

2.1 ปาก (mouth)

ปลาส่วนมากจะมีปากอยู่ปลายสุดของส่วนหัว (terminal mouth) ปากของปลาประกอบด้วยริมฝีปาก (lip) ทำหน้าที่ห่อหุ้มขากรรไกรบนและล่าง

2.2 ตา (eyes)

ตาของปลาจะตั้งอยู่บนส่วนหัว ทำให้ปลาสามารถมองเห็นเหยื่อ หรือหลบศัตรูผู้ล่า ตาปลาสามารถมองเห็นเป็นสามมิติ และสามารถโฟกัสวัตถุในระยะต่างๆ ได้ดี ปลามองเห็นภาพสีได้ โดยจะเห็นสีแดงและสีเหลืองได้ชัดที่สุด แต่แยกสีเขียว น้ำเงิน และดำ ออกจากกันได้ยาก

2.3 จมูก (naris)

จมูกปลา มักอยู่ทางด้านบนของจะงอยปาก ใกล้กับตา ปลาบางชนิดมีรูจมูกเปิดออกนอกตัว เพียงรูเดียว แต่ส่วนมากจะมีรูจมูก 2 รู โดยมีแผ่นเนื้อ 1-2 แผ่นกั้นกลางระหว่างช่องรูจมูก จมูกเป็นส่วนหนึ่งของระบบดมกลิ่น มีไว้เพื่อหาอาหาร หลบหนีศัตรู เสาะหาแหล่งน้ำ และเพื่อการหาคู่

2.4 แผ่นปิดเหงือก (operculum)

แผ่นปิดเหงือก ทำหน้าที่ปิดส่วนที่เป็นเหงือกอยู่ภายใน สามารถขยับเปิดอ้าให้กว้าง เพื่อปล่อยน้ำออกจากเหงือก หรือหุบปิดเวลาที่ต้องการดูน้ำเข้าทางปาก

2.5 ครีบ (fins)

ครีบของปลาแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1. ครีบเดี่ยวเป็นครีบที่อยู่ในแนวกลางลำตัวตามสันท้อง ไม่เป็นคู่ ได้แก่ ครีบหลัง ครีบกัน ครีบหาง ครีบฝอย และครีบไขมัน ครีบเดี่ยวจะช่วยปลาให้ปลาตั้งอยู่ในแนวตรงในน้ำ ไม่เอียงซ้ายหรือขวา
2. ครีบคู่ เป็นส่วนที่เทียบได้กับแขนขาของสัตว์ชั้นสูง ได้แก่ ครีบอก และครีบท้อง ครีบคู่จะช่วยในการบังคับให้หัวปัก หัวเซิด และช่วยในการหยุดอยู่กับที่

2.5.1 ครีบหลัง (dorsal fin)

อยู่ส่วนกลางของตัว โดยแบ่งเป็น 2 ตอน โดยตอนหน้าจะเป็นก้านครีบแข็ง และตอนหลังจะเป็นก้านครีบอ่อน

2.5.2 ครีบกัน (anal fin)

อยู่กึ่งกลางด้านล่างของลำตัว ระหว่างรูกันกับครีบหาง มีขนาดใหญ่เล็กต่างกันไป

2.5.3 ครีบหาง (caudal fin)

อยู่ทางท้ายสุดของลำตัว ปลากระดูกอ่อนมักมีครีบหางตั้งขึ้น แพนครีบตอนบนใหญ่กว่าตอนล่าง ปลากระดูกแข็งจะมีครีบหางแบบสมมาตร บน-ล่าง

2.5.4 ครีบอก (pectoral fin)

มักอยู่ต่อจากแผ่นปิดเหงือก ทางด้านข้างของลำตัว หรืออยู่ต่ำลงมาทางด้านท้อง มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิด หลายชนิดมีก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อน ถ้าก้านครีบแข็งมีขนาด

ใหญ่ ขอบมีลักษณะเป็นฟันเลื่อยเรามักเรียกว่า เจริง ครีบออกจัดเป็นรยางค์คู่แรกหรือคู่หน้า ทำหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำ และหยุดหรือเบรกเพื่อบังคับทิศทางการว่ายน้ำ

2.5.5 ครีบท้อง

ครีบท้องเป็นรยางค์คู่ที่ 2 ของปลา มีตำแหน่งอยู่ด้านล่างของตัวใกล้กับครีบอก ทำหน้าที่ช่วยในการทรงตัวและว่ายน้ำ

2.5.6 ครีบฝอย

เป็นส่วนของครีบหลัง หรือครีบก้นที่แยกออกมาเป็นอันเล็กๆ โดยมีก้านครีบอ่อนพุงไว้ครีบละ 1 อัน จำนวนครีบฝอยจะมีเท่ากันทั้งด้านบนและด้านล่าง ซึ่งมีประโยชน์ในการจำแนกชนิดของปลา พบในปลาทุ ปลาสิกุล ปลาอินทรี และปลาทูน่า

2.5.7 ครีบไขมัน

อยู่ทางท้ายของครีบหลัง มีเพียงอันเดียวไม่มีก้านครีบพุง อาจยาวหรือสั้นก็ได้ พบในปลาที่มีผิวหนังอ่อน เช่น ปลากด ปลาแซลมอน และปลาปากคม

2.6 หนวด (barbels)

อยู่ตอนหน้าของส่วนหัวของปลา มีลักษณะเป็นเนื้อนุ่มๆ มีโคนฝังอยู่ บางชนิดเรียบ บางชนิดขรุขระ หน้าที่ของหนวดช่วยในการรับสัมผัส บางชนิดมีตุ่มรับรส ช่วยในการรับรส บางชนิดช่วยหาอาหาร ในปลาที่ไม่มีเกล็ด หนวดจะมีลักษณะพิเศษเพื่อช่วยในการรับสัมผัสขึ้น

2.7 เส้นข้างตัว (lateral line)

เป็นส่วนของระบบรับรู้ความรู้สึก อยู่สองข้างของลำตัวในแนวกึ่งกลาง หรือค่อนข้างทางด้านใดด้านหนึ่งของลำตัว เกล็ดที่อยู่บริเวณเส้นข้างตัวจะมีรูเป็นแนวติดต่อกันตลอด เป็นช่องทางผ่านของน้ำที่ผ่านเข้าไปในเส้นข้างตัว เพื่อให้ปลาทราบถึงสภาพแวดล้อมที่อยู่รอบตัวปลา เพื่อการหาอาหาร หาคู่ หรือ เพื่อเป็นการเตือนอันตรายว่ามีศัตรูใกล้เคียง

2.8 เกล็ด (scales)

มีต้นกำเนิดอยู่ผิวหนังชั้นใน เป็นสิ่งปกคลุมตัวปลาอย่างหนึ่ง นับว่าเป็นโครงกระดูกภายนอก เนื่องจากอยู่ภายนอก และห่อหุ้มตัวปลา ลูกปลาเกิดใหม่แรกๆจะมีผิวหนังเรียบ ต่อมา เกล็ดจะเริ่มพัฒนาจากแผ่นเล็กๆ กลมๆ เป็นเกล็ดที่สมบูรณ์ขึ้นตามอายุ ปลาแต่ละชนิดจะมีเกล็ดต่างกันไป

3. การวัดขนาดและสัดส่วนต่างๆ ของปลา

การวัดขนาดของปลา แบ่งได้ดังนี้ (วิมล เหมาะะจันทร์, 2540) (รูปที่ 8)

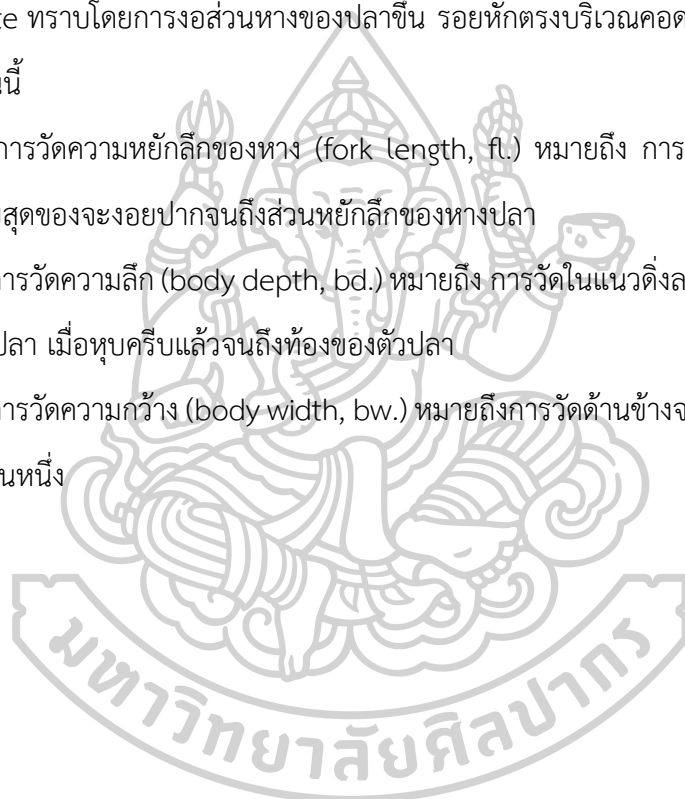
3.1 การวัดความยาวทั้งสิ้นหรือความยาวเหยียด (total length, tl.) หมายถึง การวัดความยาวเป็นเส้นตรงจากส่วนปลายสุดของจะงอยปากจนถึงปลายสุดของครีบหาง

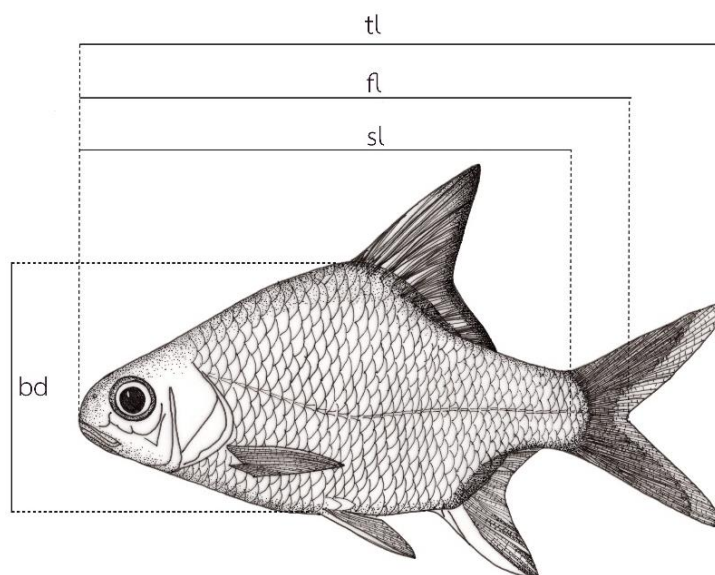
3.2 การวัดความยาวมาตรฐาน (standard length, sl.) หมายถึง การวัดความยาวเป็นเส้นตรงจากส่วนปลายสุดของจะงอยปากจนถึงฐานของครีบหางซึ่งเป็นส่วนสุดท้ายของกระดูก hypural plate ทราบโดยการงอส่วนหางของปลาขึ้น รอยหักตรงบริเวณคอดหาง ถือเป็นส่วนสุดท้ายของกระดูกชิ้นนี้

3.3 การวัดความหยักลึกของหาง (fork length, fl.) หมายถึง การวัดความยาวเป็นเส้นตรงจากส่วนปลายสุดของจะงอยปากจนถึงส่วนหยักลึกของหางปลา

3.4 การวัดความลึก (body depth, bd.) หมายถึง การวัดในแนวตั้งลงไปเป็นเส้นตรงจากส่วนบนสุดของตัวปลา เมื่อหุบครีบแล้วจนถึงท้องของตัวปลา

3.5 การวัดความกว้าง (body width, bw.) หมายถึง การวัดด้านข้างจากด้านใดด้านหนึ่งจนถึงด้านข้างอีกด้านหนึ่ง





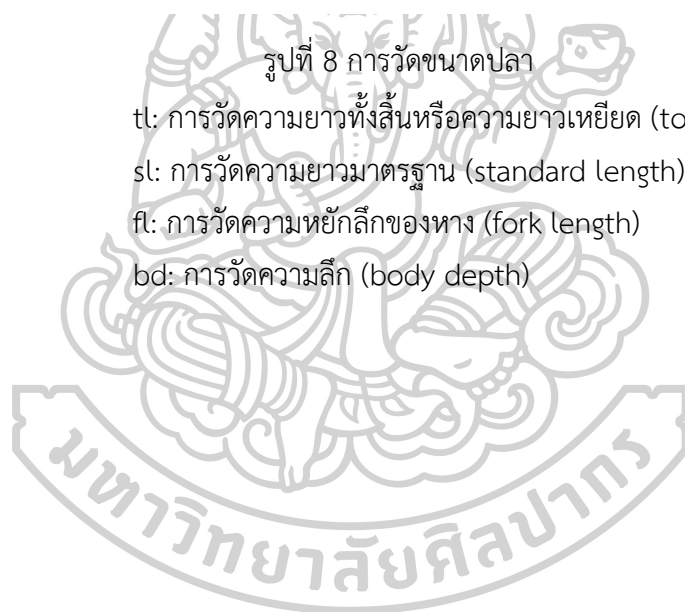
รูปที่ 8 การวัดขนาดปลา

tl: การวัดความยาวทั้งสิ้นหรือความยาวเหยียด (total length)

sl: การวัดความยาวมาตรฐาน (standard length)

fl: การวัดความหยักลึกของหาง (fork length)

bd: การวัดความลึก (body depth)



ปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850)

ปลาตะเพียนขาวเป็นปลาพื้นเมืองที่คนไทยทั่วทุกภาคต่างรู้จักดี และนิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางทั้งในเมืองและชนบท อีกทั้งยังเป็นที่นิยมมาตั้งแต่โบราณ ซึ่งมีปรากฏหลักฐานความนิยมบริโภคปลาชนิดนี้มาตั้งแต่สมัยอยุธยา เพราะเป็นปลาที่หาได้ง่าย และมีโปรตีนสูง

การจัดจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Actinopterygii

Order: Cypriniformes

Family: Cyprinidae

Genus: *Barbonymus*

Species: *B. gonionotus*

ปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus* จัดอยู่ใน Subdivision Euteleostei Order Cypriniformes อยู่ใน Family Cyprinidae เป็นวงศ์ปลาตะเพียน (carps) ส่วนมากเป็นปลาน้ำจืดสามารถพบได้ทั่วไป ลักษณะสำคัญคือ มีฟันที่หอคอยเรียง 1-3 แถว แถวละไม่เกิน 8 ซี่ บางชนิดมีปากแบบดูด ขากรรไกรมักยึดหดได้

ลักษณะสัณฐานวิทยาของ ปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus*

ปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* มีชื่อเรียกว่า Sliver barb มีลักษณะลำตัวแบนข้าง ขอบหลังโค้งยกสูงขึ้น หัวเล็ก ปากเล็ก ริมฝีปากบาง จงอยปากแหลม มีหนวดสั้นเล็กๆ 2 คู่ มีเกล็ดตามเส้นข้างตัว 26-31 เกล็ด ลำตัวมีสีเงิน บริเวณส่วนหลังมีสีคล้ำ ส่วนท้องเป็นสีขาวนวล มีครีบหลัง (dorsal fin) 1 ครีบ ครีบหาง (caudal fin) 1 ครีบลักษณะเป็นหางแฉก ครีบหลังและครีบหาง มีสีเทาหรือสีเทาเหลือง ครีบท้อง (pelvic fin) มี 1 คู่ และครีบก้น (anal fin) มี 1 ครีบ ครีบท้องและครีบก้นมีสีส้ม ส่วนปลายครีบจะมีสีแดง ปลาตะเพียนขาวที่มีขนาดโตเต็มที่แล้วจะมีลำตัวยาวที่สุดเกือบ 41.7 เซนติเมตร (วัดความยาวแบบ sl.) (Cheng et al., 2004; FAO, 2017) (รูปที่ 9)

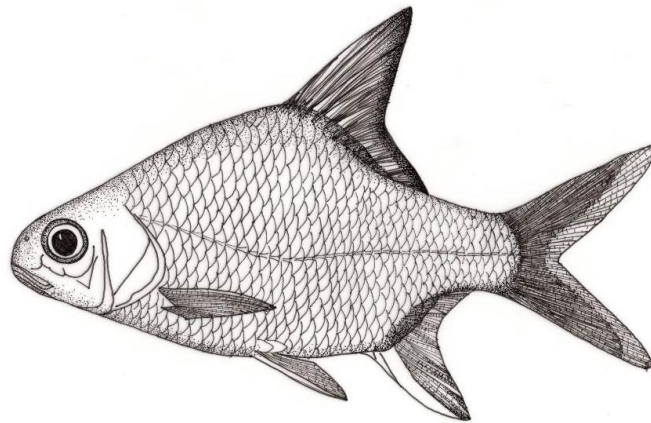
การแพร่กระจายพันธุ์ของปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus*

พบการแพร่กระจายพันธุ์ของปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* อยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บริเวณลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา และบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงในประเทศไทย, ประเทศลาว, ประเทศกัมพูชา, เกาะ Malay Peninsula ประเทศมาเลเซีย, เกาะสุมาตรา (Sumatra) และเกาะชวา (Java) ประเทศอินโดนีเซีย (FAO, 2017) (รูปที่ 10) สำหรับประเทศไทยนั้นพบอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ แม่น้ำ ห้วย หนอง คลอง บึงต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศ

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

คนที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* นั้น ส่วนใหญ่จะติดเชื้อพยาธิจากการรับประทานอาหารที่ทำมาจากปลาที่ไม่ถูกสุกสุกสุก เช่น ก้อยปลา ลาบปลา เป็นต้น อาจติดเชื้อพยาธิตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียเข้าไปสู่ร่างกายได้ โดยปลาที่พบการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ส่วนใหญ่จะพบปลาใน Family Cyprinidae ซึ่งเป็นปลากลุ่มปลาตะเพียน





รูปที่ 9 ปลาดตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus*



รูปที่ 10 การแพร่กระจายของปลาดตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus* (FAO, 2017)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือส่วนหนึ่งของ DNA ในจีโนมที่แสดงแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจากรหัสพันธุกรรม (Murgia et al., 2006) เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้กับงานวิจัยหลากหลายวัตถุประสงค์ เช่น การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร การเปรียบเทียบของประชากรกลุ่มที่อาศัยในที่แตกต่างกัน และการศึกษาวิวัฒนาการของประชากร เป็นต้น (Chauhan & Rajiv, 2010) โดยทั่วไปบริเวณของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (phylogenetic relationship) โดยสามารถศึกษาได้ทั้งรหัสพันธุกรรมของยีนและ/หรือบริเวณที่ไม่ใช่ยีนในนิวเคลียส (nuclear DNA gene) และรหัสพันธุกรรมของยีนในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA gene)

การจำแนกพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันการจำแนกชนิดพันธุ์ของพยาธิใบไม้ตับในวงศ์ Opisthorchiidae โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณหรือยีน nuclear ribosomal DNA ประกอบด้วยบริเวณ Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2), 18S rDNA และ 28S rDNA และบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในจีโนม mitochondria ประกอบด้วย บริเวณยีน cytochrome b (*cob*) บริเวณยีน nicotinamide dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) และ บริเวณยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ ถูกนำมาใช้สำหรับงานวิจัยด้านการระบาดวิทยา และศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (Dao et al., 2017; Sahu et al., 2016) จากการศึกษาของ Ando et al. (2001) ได้ทำการจำแนกชนิดพันธุ์ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จากจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย โดยใช้บริเวณ *cox1* และ ITS2 พบว่าบริเวณ *cox1* (417 bp) สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* เป็น 5 haplotyp และบริเวณ ITS2 (296 bp) สามารถแยกพยาธิ *O. viverrini* ออกจาก *C. sinensis*, *H. taichui*, *H. pumilio*, *Fasciola gigantica*, *Echinostoma malayanum* และ *Centrocestus* sp. อีกด้วย จากการศึกษาของ Thaenkham et al. (2007) ได้รายงานผลการศึกษาการจำแนกชนิดพันธุ์ของ *O. viverrini*

ออกจาก *H. taichui* ในแต่ละระยะของพยาธิ ด้วยบริเวณ *cox1* ด้วยเทคนิค PCR ที่มีความไวสูง โดยใช้สามารถใช้ genomic DNA เพียง 10^{-4} นาโนกรัม อีกทั้งรายงานผลการการจำแนกชนิดพันธุ์ *O. viverrini*, *C. sinensis* และ *H. taichui* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัย การติดเชื่อร่วมกันของพยาธิในกลุ่มนี้ และการศึกษาของ Saijuntha et al. (2008) ทำการศึกษาการ แปรผันทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* จาก 14 geographical isolates จากประเทศไทยและลาว ด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณยีน *nad1* และ *cox1* พบความแปรผันทางพันธุกรรมในยีน *nad1* โดยแบ่งออกเป็นเป็น 4 haplotype และมีระยะห่างทางพันธุกรรมประมาณ 0 - 0.3 % ในขณะที่ยีน *cox1* สามารถแบ่งออกเป็น 2 haplotype และมีระยะห่างทางพันธุกรรมประมาณ 0 - 0.5 %

ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไรโบโซม (Ribosomal DNA; rDNA)

รหัสพันธุกรรมของไรโบโซมได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับเปรียบเทียบ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็น ผลมาจากการอนุรักษ์ที่มีความแตกต่างกันในส่วนของยีน รวมทั้งความแปรปรวนของยีนและบริเวณที่ ไม่ใช่ยีนที่สร้างสำเนา rDNA unit (Mukha et al., 2002) ยีน rDNA คือส่วนที่จะถูกลอกรหัสเป็น rRNA ในเซลล์ยูคาริโอตจะมี Ribosomal DNA เรียงต่อกันหลายๆซ้ำมากถึง 5,000 สำเนา ซึ่งแต่ละยูนิตจะประกอบด้วยยีน small subunit (SSU หรือ 18s) large subunit (LSU หรือ 28S) และ 5.8S rDNAs โดยแต่ละยีนถูกคั่นด้วย spacer ในส่วนของ SSU และ LSU rDNAs ถูกคั่นด้วย 2 external transcribed spacers (ETS) และ non-transcribed spacer (NTS) โดยทั้ง ETS และ NTS ถูกเรียกรวมกันว่า intergenic spacer (IGS) สำหรับยีน 5.8s rDNA จะอยู่ภายในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) 2 บริเวณคือ ITS1 และ ITS2 ที่เรียงตัวอยู่ที่ตำแหน่งทั้งสองข้างของยีน 5.8s rDNA (Hwang & Kim, 1999; Subbotin & Moens, 2006) ยีน 18S และ 28S ซึ่งมีความแปรผันทางพันธุกรรมในอัตราต่ำจะมักถูกใช้งานอนุมานถึงลำดับวิวัฒนาการระดับสูง ในขณะที่บริเวณ ITS1 และ ITS2 ซึ่งไม่ใช่ยีนจึงมีอัตราความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าและมักนิยมใช้สำหรับการบ่ง ชนิดของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับพยาธิตัวแบนตระกูล Opisthorchiidae และ Heterophyidae (Thaenkham et al., 2012)

ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA; mtDNA)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือจีโนมที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์เพื่อทำหน้าที่หายใจระดับเซลล์ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีอัตราการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการค่อนข้างเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีนและบริเวณ ITS1 และ ITS2 ของ rDNA ดังนั้นไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงกลายเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในการ สำหรับอนุกรมวิธานและพันธุศาสตร์ของประชากร (Lee et al., 2013) รวมถึงถูกใช้สำหรับงานทาง molecular systematics ซึ่งไม่ใช่เพียงการใช้งานในระดับสายพันธุ์ (species) แต่ยังคงถูกใช้ในระดับภายในสายพันธุ์ (intraspecific) อีกด้วย (Le et al., 2000) ในปัจจุบันมีข้อมูลยีนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของสิ่งมีชีวิตจำนวนมากได้ถูกเก็บไว้ทั้งในฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับการตีพิมพ์ รวมถึงไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปรสิทหนองพยาธิ

ยีนบริเวณ cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1)

บริเวณ *cox1* เป็นยีนในไมโทคอนเดรียที่มีความสำคัญอยู่ในกระบวนการหายใจ (aerobic metabolism) เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ แทรกอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย มีหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนและเปลี่ยนโมเลกุลของออกซิเจนให้เป็นน้ำ (สกล สุนันทราภรณ์, 2557) บริเวณ *cox1* มีข้อดีกว่าบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรีย คือมีขนาดประมาณ 1551 คู่เบส สามารถเพิ่มปริมาณด้วย universal primer ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Siripiyasing & Chaveerach, 2011; Dao et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนช้า แต่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอภายในสปีชีส์สูง จึงทำให้มีบริเวณ *cox1* มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับภายในสปีชีส์ (intraspecific species) และมีความแตกต่างระหว่างสปีชีส์สูง (interspecific species) (Hebert et al., 2003b) บริเวณ *cox1* จึงเป็นบริเวณที่นิยมนำมาใช้เป็นมาตรฐานเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อจัดจำแนกและระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีรูปร่างภายนอกที่มีลักษณะคล้ายกันที่ยังคงมีความคลุมเครือ (species complex) ออกจากกันได้ อย่างชัดเจน (Hebert et al., 2003a) ดังนั้นบริเวณ *cox1* จึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นักวิจัยมักนำมาใช้ในการการวินิจฉัยโรค การจำแนกชนิดและการวิเคราะห์วิวัฒนาการของสายพันธุ์ต่างๆ รวมถึงใช้ศึกษาในกลุ่มพยาธิใบไม้ (Ando et al., 2001; Saijuntha et al., 2008; Buathong et al., 2015)

การศึกษา Phylogenetic

Phylogenetic เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยนำข้อมูลทางพันธุกรรม เช่นลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีน มาแปลงเป็นค่าตัวเลขที่เป็นข้อมูลทางคณิตศาสตร์ตามหลักการ (algorithm) หรือแบบจำลอง (model) และคำนวณความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (evolutionary relationships) เพื่อสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ซึ่งมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ขึ้นหลายแบบ ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกันและการวิเคราะห์วิวัฒนาการสอดคล้องกับความเป็นจริงมากที่สุด โดยการเลือกใช้เครื่องมือที่ดีเอ็นเอที่เหมาะสม (Xiong, 2006,) แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีลักษณะคล้ายต้นไม้ซึ่งประกอบด้วยกิ่งก้านหรือแขนง (branch) ตำแหน่งที่กิ่งแตกออกเป็นกิ่งย่อยเรียกว่า โหนด (Node) โดยที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเรียกว่าแทกซอน (taxon) โดยกลุ่มของแทกซอนที่เกิดจากบรรพบุรุษเดียวกันเรียกว่า เคลด (clade) การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม นอกจากจะใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแล้วยังมีประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่นการศึกษาด้านระบาดวิทยาการควบคุมโรคติดต่อได้อีกด้วย (Salemi et al., 2003)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

1. ตัวอย่างตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรีย

ทำการ shedding หอย *Bithynia siamensis goniomphalos* ที่สุ่มจับจากจังหวัดกำแพง (Kampong Cham) ประเทศกัมพูชา ในเดือน ธันวาคม 2556 เพื่อตรวจสอบตัวอ่อนพยาธิระยะ เซอร์คาเรีย

2. การทดลองการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ในปลาตะเพียนขาว

2.1 กลุ่มปลาที่ทำการศึกษา

ใช้ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ซื้อมาจากตลาดปลาสด อําเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยคัดเลือกปลาที่มีขนาดความยาว 7-10 ซม. และขนาดความกว้าง 2-4 ซม. แบ่งปลา ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว ตามจำนวนเซอร์คาเรียที่ใช้ในการติดเชื้อ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 ติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย ตัวต่อปลา 1 ตัว

กลุ่มที่ 3 ติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย ตัวต่อปลา 1 ตัว

กลุ่มที่ 4 ติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย ตัวต่อปลา 1 ตัว

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.2 การติดเชื้อ

2.2.1 นำปลาใส่ในขวดแก้วที่มีขนาด 8 x 6.5 ซม. เติมน้ำ 40 มล. ใช้ dropper ดูดตัว อ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียจำนวนตามกลุ่มทดลอง

2.2.2 นำขวดแก้วที่ใส่ปลาและตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียไปไว้ในห้องมืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.2.3 หลังการติดเชื้อพยาธิ นำปลาแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในตู้ปลาขนาด 30 x 60 x 40 ซม. ปริมาณน้ำที่ใช้ 30 ลิตร ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง ปริมาณ 1 กรัม และมีการเปลี่ยนน้ำทุกๆ 3 วัน

2.2.4 สุ่มจับปลา 5 ตัว ในแต่ละกลุ่ม โดยจะสุ่มจับวันที่ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 หลังการติดเชื้อ นำปลาไปตรวจหาตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย

3. ตรวจหาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ในปลาตะเพียนขาว

3.1 วัดขนาดความกว้าง ความยาวของปลา และชั่งน้ำหนัก

นำปลาตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งแบบละเอียด วัดขนาดความกว้างและความยาวของตัวปลาโดยใช้ไม้บรรทัด ขนาด 12 นิ้ว หรือ เวอเนียคาลิเปอร์ วัดความยาวลำตัว (total length) โดยวัดจากปากไปจนถึงปลายหาง และความกว้าง (body depth) โดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัวปลาจากขอบลำตัวด้านหนึ่งไปยังขอบลำตัวอีกด้านหนึ่ง ทำการจดบันทึกน้ำหนัก ขนาด

3.2 ตรวจหาการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลา ด้วยวิธี compression method

3.2.1 ผ่าตัดกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ คือ กล้ามเนื้อใต้ครีบหลัง กล้ามเนื้อใต้ครีบท้อง กล้ามเนื้อใต้ครีบอก กล้ามเนื้อใต้ครีบหาง เกล็ด และเหงือก

3.2.2 นำส่วนของปลาวางลงบนแผ่นกระจก ขนาด 4 x 6 นิ้ว หยดน้ำเกลือลงบนเนื้อเยื่อ 1-3 หยด เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง เพราะอาจทำให้ตัวอ่อนของพยาธิตายได้ จากนั้นใช้กระจกอีกแผ่นปิดทับลงไป กดให้แบนแล้วนำส่วนต่างๆ ของปลาไปตรวจหาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย ภายใต้กล้อง stereomicroscope

3.2.3 จดบันทึกผล อวัยวะส่วนที่พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย

3.2.4 บันทึกภาพตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอร์คาเรีย ที่พบในแต่ละส่วนภายในตัวปลา ด้วยกล้องถ่ายภาพ ภายใต้กล้อง stereomicroscope

3.3 การจัดจำแนกชนิดตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

3.3.1 วัดขนาดตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย

1. นำน้ำที่มีตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ผสมกับ 10 % formalin อัตราส่วน 1:1
2. หยดน้ำที่มีตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียลงบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
3. นำมาวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.2 ศึกษารูปร่างลักษณะ และอวัยวะภายในตัวอ่อนระยะเมตาเซอ์คาเรียด้วยวิธีการย้อมสีแบบชั่วคราว

1. นำตัวอ่อนระยะเมตาเซอ์คาเรีย วางบนสไลด์และหยดน้ำเกลือ 1 หยดบนตัวอ่อน ปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์ ผ่น้ำหุ้มตัวอ่อนบางจะแตกออกเอง และถ้าผ่น้ำหุ้มตัวอ่อนหนา ต้องใช้เข็มเย็บให้ผ่น้ำหุ้มแตก ตัวอ่อนจะเคลื่อนไหวออก

2. ย้อมสี 0.5 % neutral red ด้วยวิธี irrigate คือ หยดสีข้างแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่ขอบด้านหนึ่งแล้วใช้กระดาษซับน้ำออกอีกด้านหนึ่ง เพื่อให้สีที่หยดลงไปไหลเข้าไปแทนที่น้ำเดิม ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที

3. นำมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ และวาดภาพรูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ *camera lucida*

3.4 การจัดทำแนกชนิดตัวอ่อนระยะเมตาเซอ์คาเรียโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเมตาเซอ์คาเรีย (genomic DNA extraction) ด้วย Genomic DNA Mini kit (Tissue) (Geneaid, Taiwan)

1. นำเมตาเซอ์คาเรียจำนวน 1 เมตาเซอ์คาเรีย ที่เก็บไว้ใน 95% ethanol นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว รอบ 10,000 rpm 10 นาที เพื่อปั่นตกเมตาเซอ์คาเรีย และ air dry เป็นเวลา 5 นาที

2. เติม GT buffer 200 μ l ลงใน microcentrifuge tube

3. เติม 20 μ l Proteinase K นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

4. เติม GBT buffer 200 μ l นำไป vortex นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที

5. เติม absolute ethanol 200 μ l นำไป vortex 10 วินาที

5. ดูดสารละลายจาก microcentrifuge tube ใส่ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายใน collection tube ที่ผ่าน column ที่

5. เติม W1 buffer 400 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายใน collection tube ที่ผ่าน column ที่

6. เติม Wash buffer 600 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายใน collection tube ที่ผ่าน column ที่

7. เปลี่ยนย้าย column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube และเติม buffer AE 100 μl ทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm 3 นาที เพื่อให้ genomic DNA ผ่าน column ลงมายัง microcentrifuge tube

8. นำ microcentrifuge tube ที่บรรจุ genomic DNA ที่ได้จากการสกัดผ่าน column เก็บรักษา ในอุณหภูมิต่ำ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.4.2 การทำปฏิกิริยาสายลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

1. ทำปฏิกิริยาปริมาณรวม 50 μl

- genomic DNA	2	μl
- Top taq	25	μl
- Forward primer	0.5	μl
- Reverse primer	0.5	μl
- ddH ₂ O	22	μl

โดย primer ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ

cox1 primer

N_Ov_COI-F: 5'-GGA TTC GGT ATG ATT AGT CAT-3'

N_Ov_COI-R: 5'-TCT AAA GGA TCC TAA TGA CAG-3'

การทำปฏิกิริยาสายลูกโซ่ที่อุณหภูมิต่อไปนี้

Preheat Temperature	94°C	3 นาที
Denaturing Temperature	94°C	30 วินาที
Annealing Temperature	50°C	30 วินาที
Extension Temperature	72°C	45 วินาที
Final Extension	72°C	8 นาที

จำนวน 30 รอบ ด้วยเครื่อง Thermal cycler (T100 thermal cycler, Bio-Rad, USA)

3.4.3 วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gels electrophoresis

1. เตรียมอุปกรณ์สำหรับทำ 1% agarose gels electrophoresis
2. ชั่ง agarose 1 กรัม ใส่ลงใน 1X TBE buffer 100 ml
3. นำไปอุ่นจน agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ 2% ethidiumbromide 2 μ l ผสมใน agarose gel แล้วเทลงในถาดเตรียมเจล
4. เสียบ comb ลงบน agarose gel ทิ้งไว้ 15-30 นาที แล้วดึงออก
5. นำ agarose gel ที่แข็งตัววางลงใน tank electrophoresis และเท 1X TBE buffer ลงให้ท่วม agarose gel
6. load sample PCR product ลงในช่องเปรียบเทียบกับ standard marker (1 Kb PlusDNA Ladder) run ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

3.4.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำ Electrophoresis

1. นำ loading dye 1 μ l ผสมกับ standard marker 2.5 μ l บนแผ่น parafilm แล้วหยดลงในช่องของ agarose gel
2. นำ loading dye 1 μ l ผสมกับ sample PCR product 5 μ l บนแผ่น parafilm แล้วหยดลงในช่องของ agarose gel

3.4.5 วิเคราะห์ผลแถบ DNA บนแผ่น 1 % agarose gel โดยใช้ UV transilluminator (VILBER LOURMAT, Ecx-15.M) และ gel documentation (Fujifilm, Thermal Imaging system FTI-500)

3.4.6 นำ gnomonic DNA ส่ง sequences ที่ บริษัท แปซิฟิคไซเอนซ์ จำกัด วิเคราะห์โดยใช้ ABI 3730xl DNA sequencers

3.4.7 การวิเคราะห์ DNA sequences

การวิเคราะห์ DNA sequences ในการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับข้อมูล DNA sequences ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*, *O. lobatus* และ *C. sinensis* ใน GenBank (ตารางที่ 1) โดยใช้โปรแกรม

1. Clustal X ver.1.8 (Thompson et al., 1997) เป็นโปรแกรมที่จัดเรียงตามลำดับความใกล้เคียงของการเปลี่ยนแปลงโดยลำดับนิวคลีโอไทด์
2. BioEdit (Hall, 1990) เป็นโปรแกรมแก้ไขการเปรียบเทียบลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์

3. MEGA ver. 5.0 (Tamura et al., 2011) เป็นโปรแกรมที่ใช้สร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Likelihood method วิเคราะห์โดยใช้โมเดล GTR + G + I เพื่อศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

ตารางที่ 1 ข้อมูล DNA sequences ยีน *cox1* ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*, *O. lobatus* และ *C. sinensis* ใน GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Phylogenetic tree

ชนิด	ประเทศ	Accession no.	อ้างอิง
<i>O. viverrini</i>	ไทย	HQ328542	Thaenkham et al. (2011)
		EU022363	Saijuntha et al. (2008)
		EU022362	Saijuntha et al. (2008)
	ลาว	HQ328544	Thaenkham et al. (2011)
	เวียดนาม	KF577573	Dao et al. (2013)
<i>O. lobatus</i>	ลาว	HQ328539	Thaenkham et al. (2011)
		HQ328541	Thaenkham et al. (2011)
		HQ328540	Thaenkham et al. (2011)
<i>C. sinensis</i>	จีน	JN936216	Liu et al. (2012)
		FJ965392	Li (2016)
	ญี่ปุ่น	EF688130	Katokhin et al. (2008)

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini*

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและอวัยวะภายในตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini* ที่ได้จากหอยน้ำจืด *Bithynia siamensis goniomphalos* (รูปที่ 11) จากจังหวัดกำปงจาม (Kampong Cham) ประเทศกัมพูชา ในเดือน ธันวาคม 2556 ใช้การอ้างอิงลักษณะต่างๆตามการอธิบายของ Wykoff et al. (1965) และ Scholz et al. (1990) (ตารางที่ 2)

ลักษณะรูปร่างของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (รูปที่ 12)

ส่วนลำตัว (body): ลักษณะลำตัวกลมรี สีเหลืองน้ำตาลอ่อน บริเวณผิวลำตัวมีหนามขนาดเล็กละเอียดอยู่เป็นแถวๆ ปกคลุมรอบลำตัวและมีเส้นประสาทรับความรู้สึก (sensory hair) ตามลำตัวเพียงเล็กน้อย ภายในลำตัวพบแกรนูลหลายสีน้ำตาลกระจายทั่วลำตัว บริเวณ oral sucker พบว่ามี oral spines อยู่ภายใน มี eye spots 1 คู่ ประกอบด้วย pigment หยาบเรียงตัวเป็นรูปสี่เหลี่ยม มี pharynx รูปร่างกลมขนาดเล็กอยู่ตรงกลาง มีต่อม penetration gland 5 คู่ ventral sucker เจริญไม่ได้อยู่ตรงกลางลำตัว excretory bladder เรียงตัวด้วยเซลล์ epithelial อยู่บริเวณส่วนท้ายของลำตัว (posterior)

ส่วนหาง (tail): ติดส่วนท้ายของลำตัว ส่วนของหางมีขนาดยาวกว่าลำตัว ลักษณะตรงทรงกระบอก ปลายหางแหลม ด้านข้างของหางส่วนต้นมี lateral finfold ยาวประมาณ 1/3 ของส่วนหาง ด้านข้างของหางส่วนต้นมี dorso-ventral finfold อยู่บริเวณส่วนกลางด้านหลังหาง ประมาณ 2/3 ของส่วนหาง

ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียเจริญอยู่ภายในเรเดียจำนวนมาก (รูปที่ 13) และอาศัยอยู่ในหอย *Bithynia siamensis goniomphalos* (ไฮสต์กึ่งกลางที่ 1) ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตัว *O. viverrini* โดยทั่วไปอาศัยอยู่ที่ท่อน้ำดี (bile duct) และถุงน้ำดีในตับของคนหรือ reservoir host เช่น สุนัข และ แมว เป็นต้น

พฤติกรรมเคลื่อนไหว

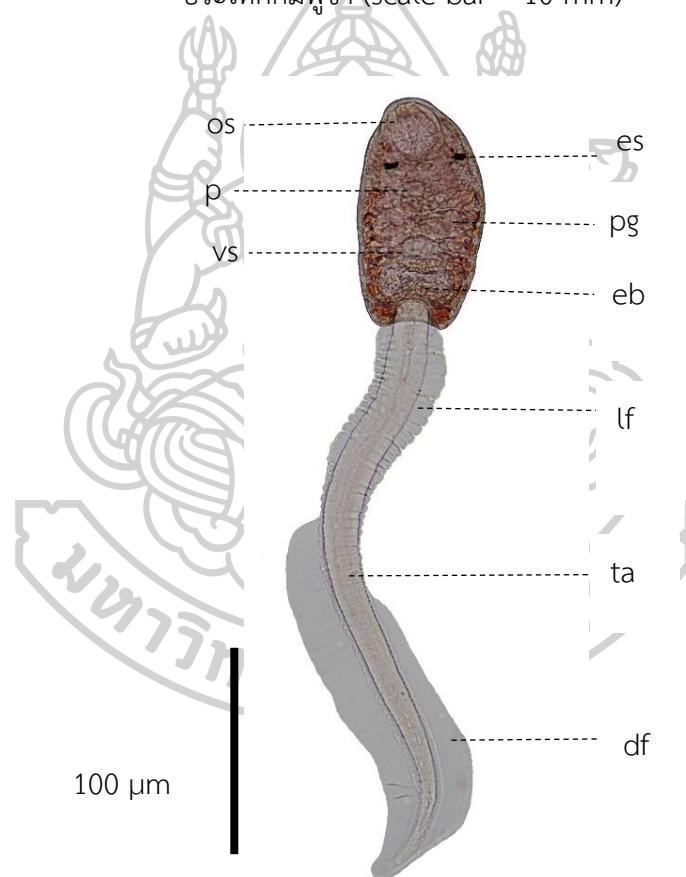
การลอยตัวอยู่ในระดับผิวน้ำหรือกลางน้ำ การเคลื่อนไหวย่นตัวไปมาอย่างรวดเร็วบนผิวน้ำ ประมาณ 4-8 วินาที แล้วหยุดพักนาน 10-15 วินาที สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำได้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบขนาดของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย

Organ	งานวิจัยนี้	Wykoff et al., 1965	Scholz et al., 1990
body:	75-100 μm (av. 88 μm) x 125-153 μm (av.142 μm)	61-96 μm (av. 75 μm) x 140-183 μm (av. 154 μm)	33-68 μm x 100-250 μm
tail:	23-30 μm (av. 26 μm) x 213-400 μm (av. 327 μm)	26 μm x 350-437 μm (av. 392 μm)	16-29 μm x 360-475 μm
eye spot:	10-15 μm (av. 12 μm) x 8-10 μm (av. 9 μm)	-	-
oral sucker:	20-32 μm (av. 27 μm) x 23-35 μm (av. 28 μm)	36-37 μm (av. 36 μm) x 34-51 μm (av. 43 μm)	-
ventral sucker:	20-30 μm (av. 26 μm) x 15-32 μm (av. 24 μm)	-	-
pharynx:	12-20 μm (av. 16 μm) x 10-18 μm (av. 13 μm)	-	-
excretory bladder:	35-45 μm (av. 39 μm) x 25-40 μm (av. 31 μm)	-	-



รูปที่ 11 หอยน้ำจืด *Bithynia siamensis goniomphalos* ที่พบบริเวณจังหวัดกำแพงจาม
ประเทศกัมพูชา (scale bar = 10 mm)



รูปที่ 12 ลักษณะตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini*

ย้อมสี ด้วย 0.5% neutral red (scale bar = 100 μ m)

(os: oral sucker, es: eye spots, p: pharynx, pg: penetration gland,
vs: ventral sucker, eb: excretory bladder, lf: lateral finfold, ta: tail,
df: dorso-ventral fin fold)



รูปที่ 13 ลักษณะตัวอ่อนระยะเรเดียของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini*
ย้อมสีด้วย 0.5% neutral red (scale bar = 100 μm)
(p: pharynx, re: redia, c: cercaria)

2. การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini*

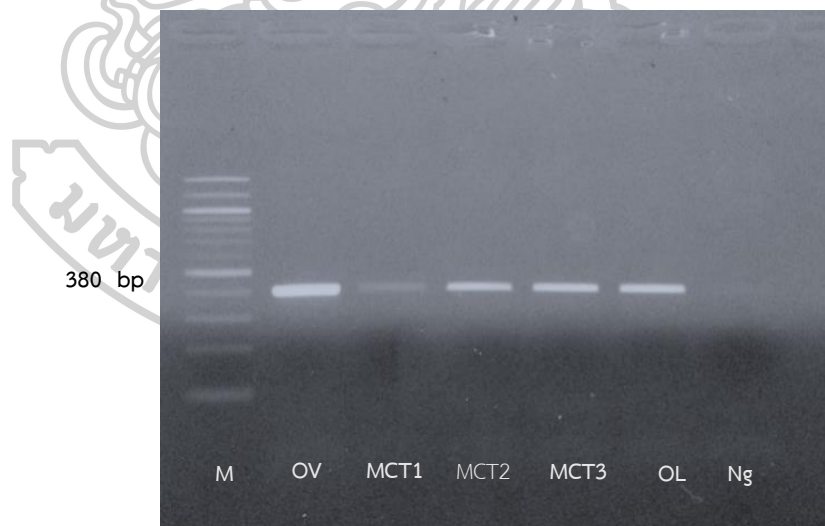
2.1 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจะอยู่ภายในซิสต์ผนัง 2 ชั้น รูปร่างมีลักษณะรูปไข่หรือกลม โดยมีผนังชั้นนอกบางและผนังด้านในบางมาก ลำตัวของเมตาเซอร์คาเรียที่อยู่ในซิสต์ สามารถเคลื่อนไหวไปมาและมักจะจอบีบ เห็นลักษณะเป็นรูปทรง c-shaped ผนังตัวบางใส สามารถมองเห็น excretory bladder สีน้ำตาลเหลืองและมีลักษณะเป็นรูปไข่ โดยจะเห็นเป็นแกรนูลสีดำ เห็น Oral sucker และ ventral sucker

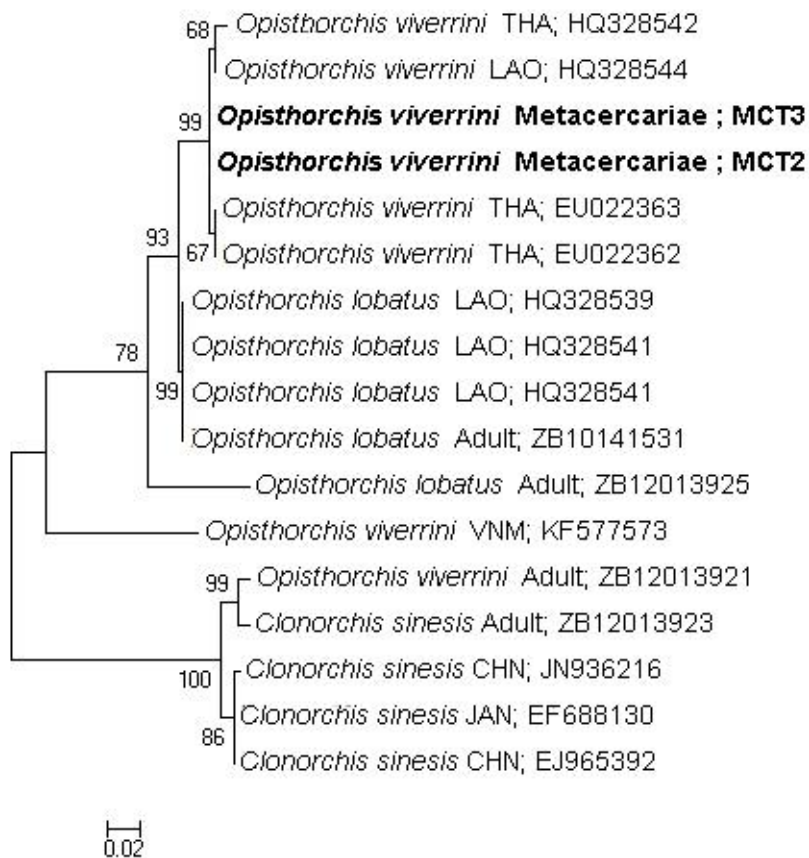
2. ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากซิสต์ มีลักษณะลำตัวแบน ยาว ไม่มีหาง ภายในมีแกรนูลสีน้ำตาลอ่อนกระจายทั่วตัว ส่วนบนมี oral sucker เห็น pharynx ชัดเจน ventral sucker อยู่ประมาณกลางลำตัว มี excretory bladder อยู่ด้านท้ายลำตัว (รูปที่ 19-24)

2.2 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* ด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุล

การตรวจสอบชนิดพันธุ์ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียพยาธิใบไม้ตับโดยกล้องจุลทรรศน์นั้น จำเป็นจะต้องอาศัยทักษะและความชำนาญอย่างมาก เนื่องจากตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในกลุ่มพยาธิใบไม้ตับมีลักษณะคล้ายกัน จึงต้องอาศัยการตรวจสอบชนิดพันธุ์ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากการทดลองทางชีวโมเลกุล ด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่งยีนบริเวณ *cox1* พบว่า PCR product ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย เมื่อเทียบกับพยาธิใบไม้ตัวเต็มวัยของ *O. viverrini* ปรากฏ PCR product อยู่ในตำแหน่งเดียวกันที่ขนาดประมาณ 380 bp (รูปที่ 14) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากการทดลองมาทำวิเคราะห์ Phylogenetic เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ *O. viverrini*, *O. lobatus* และ *C. sinensis* จากฐานข้อมูลใน NCBI GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากการทดลอง คือ MCT1, MCT2 และ MCT3 อยู่ในกลุ่ม เดียวกันกับข้อมูลของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* (รูปที่ 15)



รูปที่ 14 การจำแนกชนิดพันธุ์ของตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้ยีนบริเวณ *cox1* จัดจำแนก แถว M: 1 Kb DNA marker, OV: ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini*, MCT1 MCT2 MCT3: ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากการทดลอง, OL: ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis lobatus*, Ng: negative control



รูปที่ 15 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนบริเวณ *cox1* ของเมตาเซอร์คาเรียพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* กับข้อมูล *O. viverrini*, *O. lobatus* และ *C. sinensis* ใน GenBank จากโปรแกรม MEGA version 5.0 ด้วยวิธี Maximum Likelihood method วิเคราะห์โดยใช้ nucleotide substitution model GTR + G + I

THA: ตัวอย่างจากประเทศไทย

LAO: ตัวอย่างจากประเทศลาว

VNM: ตัวอย่างจากประเทศเวียดนาม

CHN: ตัวอย่างจากประเทศจีน

JAN: ตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่น

3. อัตราการติดเชื้อเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *Opisthorchis viverrini* ในปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus*

ในการวิจัยครั้งนี้ ดำเนินการทดลองการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* ในปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* ในห้องปฏิบัติการโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ไม่มีการติดเชื้อเซอร์คาเรีย กลุ่มที่ 2 ติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย/ปลา 1 ตัว กลุ่มที่ 3 ติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย/ปลา 1 ตัว และกลุ่มที่ 4 ติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย/ปลา 1 ตัว ในปลาตะเพียนทั้งหมด 241 ตัว หลังการติดเชื้อตรวจหาอัตราการติดเชื้อ และตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลาตามระยะเวลา ดังนี้ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ตรวจหาตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในอวัยวะต่างๆของปลาด้วยวิธี compression method พบว่ากลุ่มควบคุมไม่มีการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลา และไม่มีการตายเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาในการทดลอง และในปลาตะเพียนขาวกลุ่มที่มีการติดเชื้อเซอร์คาเรียพบปลาตะเพียนขาวติดเชื้อทั้งหมด 200 ตัว คิดเป็น 82.99% (200/241) จากการทดลอง 3 ซ้ำ ครั้งที่ 1 กลุ่มที่ติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 22 ตัว จาก 30 ตัว คิดเป็น 73.33% (22/30) กลุ่มติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 26 ตัว จาก 29 ตัว คิดเป็น 89.66% (26/29) กลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 27 ตัว จาก 28 ตัว คิดเป็น 96.43% (27/28) การทดลองครั้งที่ 2 กลุ่มที่ติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 66.67% (20/30) กลุ่มติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 70.37% (19/27) กลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 93.33% (28/30) และการทดลองครั้งที่ 3 กลุ่มที่ติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 76.67% (27/30) กลุ่มติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 93.33% (28/30) กลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย พบปลาติดเชื้อ 100% (7/7) เมื่อรวมทั้ง 3 การทดลอง พบจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในปลาที่ติดเชื้อทั้งหมด 1,979 เมตาเซอร์คาเรีย (ค่าเฉลี่ย 10.076 ± 9.268 เมตาเซอร์คาเรีย/ปลาที่ติดเชื้อ 1 ตัว) (ตาราง 3) ซึ่งผลการศึกษาจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่า กลุ่มที่มีการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุด คือกลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย พบว่ามีอัตราการติดเชื้อของการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 เป็น 96.43% 93.33% และ 100% ตามลำดับ เมื่อนำอัตราการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way Anova) และทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี Post Hoc Tests เพื่อทดสอบความสามารถในการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรีย โดยใช้ปัจจัยจากจำนวนเซอร์คาเรีย (100, 200 และ 400) พบว่า การทดลองครั้งที่ 1 กลุ่มติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย มีความสามารถในการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกับกลุ่มติดเชื้อ 200 และ 400 เซอร์คาเรีย อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 ($P=0.000$) และกลุ่มติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย และ 400 เซอร์คาเรีย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.164$) ในการทดลองครั้งที่ 2 กลุ่มติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย และ 200 เซอร์คาเรีย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.198$) ส่วนในกลุ่มติดเชื้อ 400 กับ 100 เซอร์คาเรีย และกลุ่มติดเชื้อ 400 กับ 200 เซอร์คาเรีย มีความสามารถในการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.000$) และการทดลองครั้งที่ 3 กลุ่มติดเชื้อ 100 และ 200 เซอร์คาเรีย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.111$) ส่วนในกลุ่มติดเชื้อ 400 กับ 100 เซอร์คาเรีย และกลุ่มติดเชื้อ 400 กับ 200 เซอร์คาเรีย มีความสามารถในการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.000$) เมื่อวิเคราะห์อัตราการติดเชื้อทั้ง 3 ซ้ำการทดลองรวมกัน พบว่ากลุ่มติดเชื้อ 3 กลุ่ม (100, 200 และ 400 เซอร์คาเรีย) มีความสามารถในการติดเชื้อตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.000$)

จำนวนปลาที่ติดเชื้อในอวัยวะต่างๆที่ตรวจจสอบ ได้แก่ เหงือก, ครีบอก (เนื้อใต้ครีบอก), ครีบท้อง (เนื้อใต้ครีบท้อง), ครีบหลัง (เนื้อใต้ครีบหลัง), ครีบหาง, เกส็ด และเนื้อกลางตัว จากปลาที่ติดเชื้อ 200 ตัว พบว่าบริเวณครีบหางติดเชื้อมากที่สุด 183 ตัว (91.50%) ตามด้วยบริเวณครีบหลัง 140 ตัว (70.00%) ครีบท้อง 88 ตัว (44.00%) และครีบอก 49 ตัว (24.50%) และพบว่าบริเวณเนื้อใต้ครีบอกน้อยที่สุดเพียง 9 ตัว (4.50%) (ตารางที่ 4, รูปที่ 16)



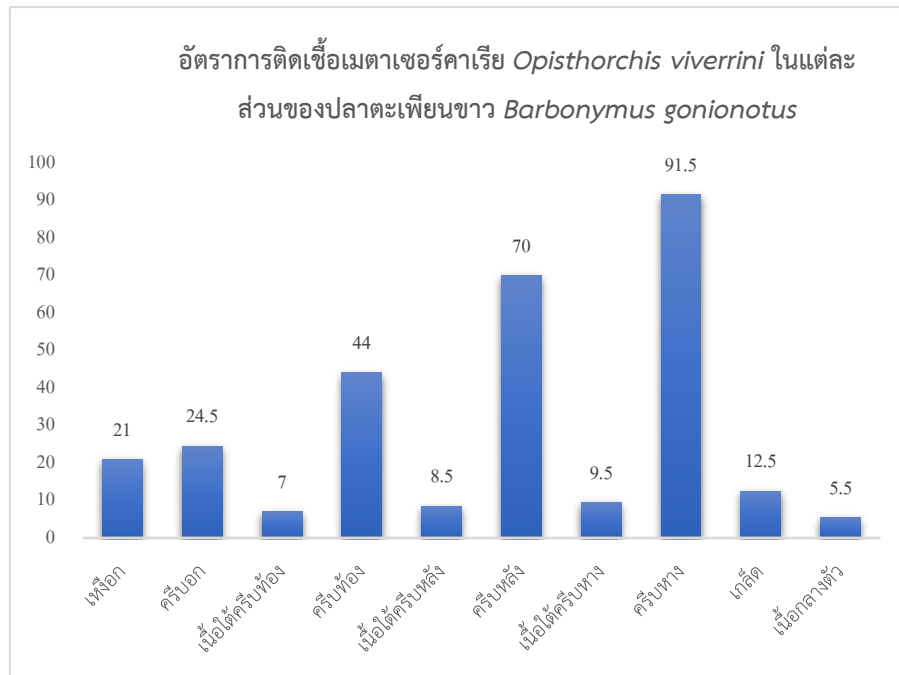
ตารางที่ 3 อัตราการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ในปลาตะเพียนขาว

กลุ่มการทดลอง	จำนวนเซอร์คาเรีย	No. fish	จำนวนปลาที่ติดเชื้อ (%)	No. mc ($\bar{X} \pm S.D.$)	range	จำนวนปลาที่ติดเชื้อในอวัยวะต่างๆ (%)										เนื้อกลางตัว
						เพื่อก	เนื้อใต้ครีบอก	ครีบอก	เนื้อใต้ครีบท้อง	ครีบท้อง	เนื้อใต้ครีบหลัง	ครีบหลัง	เนื้อใต้ครีบหาง	ครีบหาง	เกล็ด	
1	100	30	22 (73.33)	89 (4.05±2.80)	0-10	2 (9.09)	1 (4.55)	2 (9.09)	0	8 (36.36)	3 (13.64)	8 (36.36)	3 (13.64)	19 (86.36)	0	0
	200	29	26 (89.66)	443(17.27±13.79)	0-53	10 (38.46)	2 (7.69)	14 (53.85)	4 (15.38)	18 (69.23)	5 (19.23)	20 (76.92)	8 (30.76)	25 (96.15)	2 (7.69)	2 (7.69)
	400	28	27 (96.43)	452 (16.97±10.57)	0-33	9 (33.33)	2 (7.41)	10 (37.04)	2 (7.41)	16 (59.26)	2 (7.41)	19 (70.37)	3 (11.11)	25 (92.59)	7(25.93)	1(3.70)
2	100	30	20 (66.67)	59 (2.95±1.32)	0-6	1 (5.00)	0	1 (5.00)	0	3 (15.00)	0	10 (50.00)	0	16 (80.00)	0	0
	200	27	19 (70.37)	107 (5.63±4.56)	0-16	2 (10.53)	2(10.53)	0	0	5 (26.32)	0	13 (88.42)	0	17 (89.47)	1 (5.26)	0
	400	30	28 (93.33)	365 (13.18±8.30)	0-32	13 (46.43)	1 (3.57)	10 (35.71)	2 (7.14)	18 (64.29)	2 (7.14)	22 (78.57)	1 (3.57)	26 (92.86)	11 (39.29)	4(14.29)
3	100	30	23 (76.67)	151 (6.86±4.40)	0-11	0	0	5 (21.74)	1 (4.35)	6 (26.09)	0	17 (73.91)	0	21 (91.30)	2 (8.70)	0
	200	30	28 (93.33)	208 (7.50±3.83)	0-14	2 (7.14)	0	7 (25.00)	2 (7.14)	12 (42.86)	2 (7.14)	24 (85.71)	1 (3.57)	27 (96.43)	2 (7.14)	2 (7.14)
	400	7	7 (100)	105 (15±6.22)	0-26	3 (42.86)	1(14.29)	0	3 (42.86)	2 (28.57)	3 (42.86)	7 (100)	3 (42.86)	7 (100)	0	2(28.57)
Total		241	200 (82.99)	1,979 (10.08±9.27)	0-53	42 (21.00)	9 (4.50)	49(24.50)	14 (7.00)	88 (44.00)	17 (8.50)	140 (70.00)	19 (9.50)	183(91.5)	25 (12.50)	11(5.50)

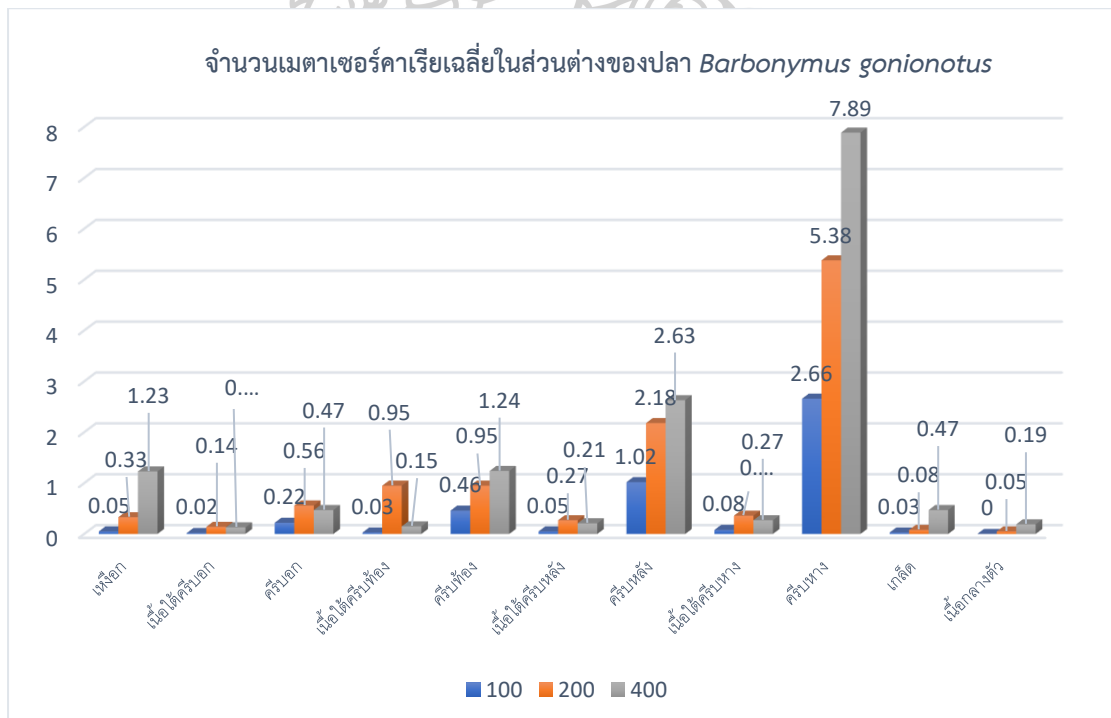
mc: metacercariae

ตารางที่ 4 จำนวนตัวอ่อนระยะเมตาเซอ์คาร์คเรีย *Opisthorchis viverrini* ที่พบในอวัยวะต่างๆ

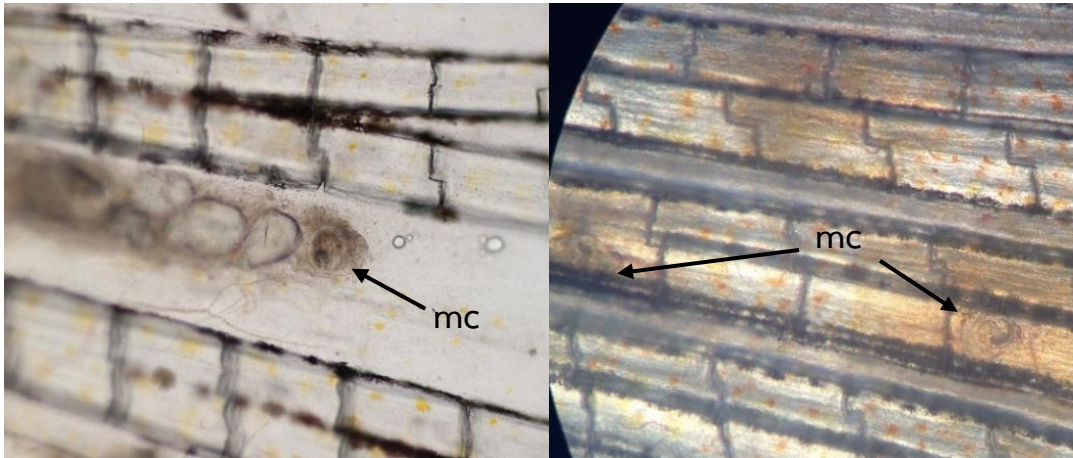
จำนวนเซอ์คาร์คเรีย	จำนวนตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอ์คาร์คเรีย ($\bar{X} \pm S.D.$)													หมายเหตุ
	เหงือก	เนื้อใต้ครีบอก	ครีบอก	เนื้อใต้ครีบอกท้อง	เนื้อใต้ครีบอกหลัง	ครีบอกหลัง	เนื้อใต้ครีบอกหาง	ครีบอกหาง	เกล็ด	เนื้อกกลางตัว				
100	3 (0.05± 0.21)	1 (0.05± 0.21)	14 (0.5± 1.11)	2 (0.09± 0.42)	3 (0.05± 0.36)	66 (1.03± 1.41)	5 (0.08± 0.37)	173 (2.703± 2.098)	2 (0.03± 0.18)	0			N=65	
200	24 (0.33± 0.83)	10 (0.14± 0.75)	41 (0.56± 1.35)	12 (0.16± 0.65)	20 (0.27± 1.1)	159 (2.18± 2.28)	26 (0.36± 1.25)	393 (5.384± 4.569)	6 (0.08± 0.32)	6 (0.08± 0.4)			N=73	
400	76 (1.22± 2.31)	8 (0.13± 0.59)	29 (0.47± 0.84)	9 (0.15± 0.44)	13 (0.21± 0.77)	163 (2.63± 2.38)	17 (0.27± 0.87)	492 (7.935± 5.677)	29 (0.47 ±0.88)	12 (0.19± 0.74)			N=62	
Total	103 (0.52± 1.47)	19 (0.09± 0.57)	84 (0.42± 1.05)	23 (0.12± 0.48)	36 (0.18± 0.82)	388 (1.94± 2.17)	48 (0.24± 0.93)	1,058(5.32± 4.83)	37 (0.19 ±0.57)	18 (0.11± 0.54)			N=200	



รูปที่ 16 อัตราการติดเชื้อตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ในแต่ละส่วนของปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus*



รูปที่ 17 จำนวนเมตาเซอร์คาเรียเฉลี่ยในส่วนต่างๆของปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus*



รูปที่ 18 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอ์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ที่พบในทางปลาตะเพียนขาว
Barbonymus gonionotus
(mc: metacercaria)



4. การเจริญพัฒนารูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในอวัยวะต่างๆของปลาในแต่ละสัปดาห์

ผลการเจริญของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ตรวจสอบจากจำนวนตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียและรูปร่างของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่เปลี่ยนแปลงไป โดยดูจากขนาดและการพัฒนาอวัยวะภายในของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย (ตารางที่ 5-6)

ผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 1 (7 วัน) เมตาเซอร์คาเรียใน cyst มีขนาดประมาณ $169.2 \times 138.2 \mu\text{m}$ ผนังหนา $1.93 \mu\text{m}$ และเมตาเซอร์คาเรียที่ออกมาจาก cyst ขนาด $322.7 \times 87.8 \mu\text{m}$ ($n=10$) เมื่อสังเกตอวัยวะภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่ายังสามารถมองเห็น eye spots ที่พบในระยะเซอร์คาเรีย พบว่าเมตาเซอร์คาเรียจะมีเนื้อเยื่อของปลาหุ้มอยู่ค่อนข้างหนา เริ่มเห็นอวัยวะภายในต่างๆ oral sucker มีขนาด $31.9 \times 28.1 \mu\text{m}$ ventral sucker มีขนาด $35.3 \times 31.5 \mu\text{m}$ excretory bladder มีขนาด $73.3 \times 53.9 \mu\text{m}$ และ intestine แต่ยังไม่เห็นอวัยวะไม่ชัดเจน แสดงว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 1 ยังเจริญพัฒนาไม่ดี (รูปที่ 19)

ผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 2 (14 วัน) เมตาเซอร์คาเรียใน cyst มีขนาดประมาณ $186.4 \times 153.2 \mu\text{m}$ ผนังหนา $2.01 \mu\text{m}$ และเมตาเซอร์คาเรียที่ออกมาจาก cyst มีขนาด $417.7 \times 115.6 \mu\text{m}$ ($n=10$) เมื่อสังเกตอวัยวะภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมตาเซอร์คาเรียยังสามารถมองเห็น eye spots บ้าง และเมตาเซอร์คาเรียยังคงมีเนื้อเยื่อของปลาหุ้มอยู่ เห็นอวัยวะภายในต่างๆ ค่อนข้างชัดเจน คือ oral sucker มีขนาด $49.1 \times 45.1 \mu\text{m}$ ventral sucker มีขนาด $53.3 \times 49.1 \mu\text{m}$ excretory bladder มีขนาด $90 \times 64.9 \mu\text{m}$ และ intestine ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 2 สามารถเห็นอวัยวะต่างๆ ได้ชัดเจน ตัวอ่อนภายใน cyst มีการเคลื่อนไหวไปมา แสดงว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 2 เจริญพัฒนาค่อนข้างดี (รูปที่ 20)

ผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 3 (21 วัน) เมตาเซอร์คาเรียใน cyst มีขนาดประมาณ $192.4 \times 164 \mu\text{m}$ ผนังหนา $2.04 \mu\text{m}$ และเมตาเซอร์คาเรียที่ออกมาจาก cyst มีขนาด $426.5 \times 118.3 \mu\text{m}$ ($n=10$) เมื่อสังเกตอวัยวะภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมตาเซอร์คาเรียยังสามารถมองเห็น eye spots บ้างแต่น้อย และเมตาเซอร์คาเรียยังคงมีเนื้อเยื่อของปลาหุ้มอยู่ เห็นอวัยวะภายในต่างๆ ชัดเจน คือ oral sucker มีขนาด $55.5 \times 51.1 \mu\text{m}$ ventral sucker มีขนาด $57.1 \times 53.6 \mu\text{m}$ excretory bladder มีขนาด $100 \times 70.1 \mu\text{m}$ และ intestine ตัวอ่อนภายใน cyst มีการเคลื่อนไหวไปมา แสดงว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 3 มีการเจริญพัฒนาค่อนข้างดี (รูปที่ 21)

ผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 (28) เมตาเซอร์คาเรียใน cyst มีขนาดประมาณ $207 \times 173.7 \mu\text{m}$ ผนังหนา $2.09 \mu\text{m}$ และเมตาเซอร์คาเรียที่ออกมาจาก cyst มีขนาด $428.8 \times 120.6 \mu\text{m}$ ($n=10$) เมื่อสังเกตอวัยวะภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ เมตาเซอร์คาเรียจะไม่พบ eye spots เมตาเซอร์คาเรียยังคงมีเนื้อเยื่อของปลาหุ้มอยู่เล็กน้อย เห็นอวัยวะภายในต่างๆ ชัดเจน คือ oral sucker มีขนาด $53.3 \times 49.6 \mu\text{m}$ ventral sucker มีขนาด $57.6 \times 53.8 \mu\text{m}$ excretory bladder มีขนาด $104.2 \times 75.6 \mu\text{m}$ และ intestine ตัวอ่อนภายใน cyst มีการเคลื่อนไหวไปมา แสดงว่า ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 4 มีการเจริญพัฒนาค่อนข้างดี (รูปที่ 22)

ผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 5 (35 วัน) เมตาเซอร์คาเรียใน cyst มีขนาดประมาณ $227.5 \times 184.3 \mu\text{m}$ ผนังหนา $2.11 \mu\text{m}$ และเมตาเซอร์คาเรียที่ออกมาจาก cyst มีขนาด $459 \times 127.8 \mu\text{m}$ ($n=10$) เมื่อสังเกตอวัยวะภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ เมตาเซอร์คาเรียจะไม่พบ eye spots เมตาเซอร์คาเรียยังคงมีเนื้อเยื่อของปลาหุ้มอยู่เล็กน้อย เห็นอวัยวะภายในต่างๆ ชัดเจน คือ oral sucker มีขนาด $57.6 \times 52.8 \mu\text{m}$ ventral sucker มีขนาด $60.2 \times 56.5 \mu\text{m}$ excretory bladder มีขนาด $105.4 \times 72.8 \mu\text{m}$ และ intestine ตัวอ่อนภายใน cyst มีการเคลื่อนไหวไปมา แสดงว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 5 มีการเจริญพัฒนาค่อนข้างดี (รูปที่ 23)

ผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 (42 วัน) เมตาเซอร์คาเรียใน cyst มีขนาดประมาณ $238.6 \times 216.1 \mu\text{m}$ ผนังหนา $2.12 \mu\text{m}$ และเมตาเซอร์คาเรียที่ออกมาจาก cyst มีขนาด $488.7 \times 137.5 \mu\text{m}$ ($n=10$) เมื่อสังเกตอวัยวะภายในผ่านกล้องจุลทรรศน์ เมตาเซอร์คาเรียจะไม่พบ eye spots เมตาเซอร์คาเรียยังคงมีเนื้อเยื่อของปลาหุ้มอยู่เล็กน้อย เห็นอวัยวะภายในต่างๆ ชัดเจน คือ oral sucker มีขนาด $60.8 \times 56.3 \mu\text{m}$ ventral sucker มีขนาด $70.3 \times 63.6 \mu\text{m}$ excretory bladder มีขนาด $127.7 \times 82.6 \mu\text{m}$ และ intestine ตัวอ่อนภายใน cyst มีการเคลื่อนไหวไปมา แสดงว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 6 มีการเจริญพัฒนาค่อนข้างดี (รูปที่ 24)

เมื่อนำขนาดตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst ในแต่ละสัปดาห์ ไปคำนวณทางสถิติโดยใช้ค่าสั่ง Past Hop Test ใน One-Way Anova พบว่าขนาดความยาวของตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียสัปดาห์ที่ 1 มีค่าทางสถิติที่ระดับ $P < 0.000$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ขนาดความยาวในสัปดาห์ที่ 1 มีความแตกต่างกับทุกสัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากกราฟค่า mean ขนาดความยาวของตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst ในแต่ละสัปดาห์ พบว่าสัปดาห์ที่ 1 มีค่า mean น้อยที่สุด

ตารางที่ 5 ขนาดความกว้าง ความยาว และความหนาของผนังของเมตาเซอรัคคาเรียในแต่ละสัปดาห์
(หน่วย μm , ค่าเฉลี่ยจำนวน 10 ตัว)

สัปดาห์	กว้าง cyst ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)	ยาว cyst ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)	กว้าง body ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)	ยาว body ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)	ผนัง cyst ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)
1	120 - 176 (138.7 \pm 15.78)	150 - 195 (169.2 \pm 15.58)	77 - 105 (87.8 \pm 7.80)	260 - 365 (322.7 \pm 33.48)	1.5 - 2.2 (1.93 \pm 0.25)
2	130 - 180 (153.2 \pm 17.06)	145 - 200 (186.4 \pm 16.95)	100 - 128 (115.6 \pm 10.41)	360 - 455 (417.7 \pm 27.28)	1.8 - 2.2 (2.01 \pm 0.15)
3	150 - 180 (164 \pm 12.43)	170 - 210 (192.4 \pm 13.50)	105 - 130 (118.3 \pm 6.24)	365 - 465 (426.5 \pm 35.67)	1.85 - 2.5 (2.04 \pm 0.18)
4	150 - 200 (173.7 \pm 18.74)	180 - 225 (207 \pm 13.58)	110 - 138 (120.6 \pm 7.57)	360 - 485 (428.8 \pm 45.30)	1.8 - 2.5 (2.09 \pm 0.22)
5	151 - 220 (184.3 \pm 22.85)	190 - 250 (227.5 \pm 13.58)	110 - 160 (127.8 \pm 14.51)	390 - 505 (459 \pm 34.95)	1.9 - 2.5 (2.11 \pm 0.22)
6	210 - 236 (216.1 \pm 15.34)	210 - 270 (238.6 \pm 22.92)	115 - 175 (137.5 \pm 19.90)	430 - 525 (488.7 \pm 29.24)	1.5 - 2.5 (2.12 \pm 0.23)

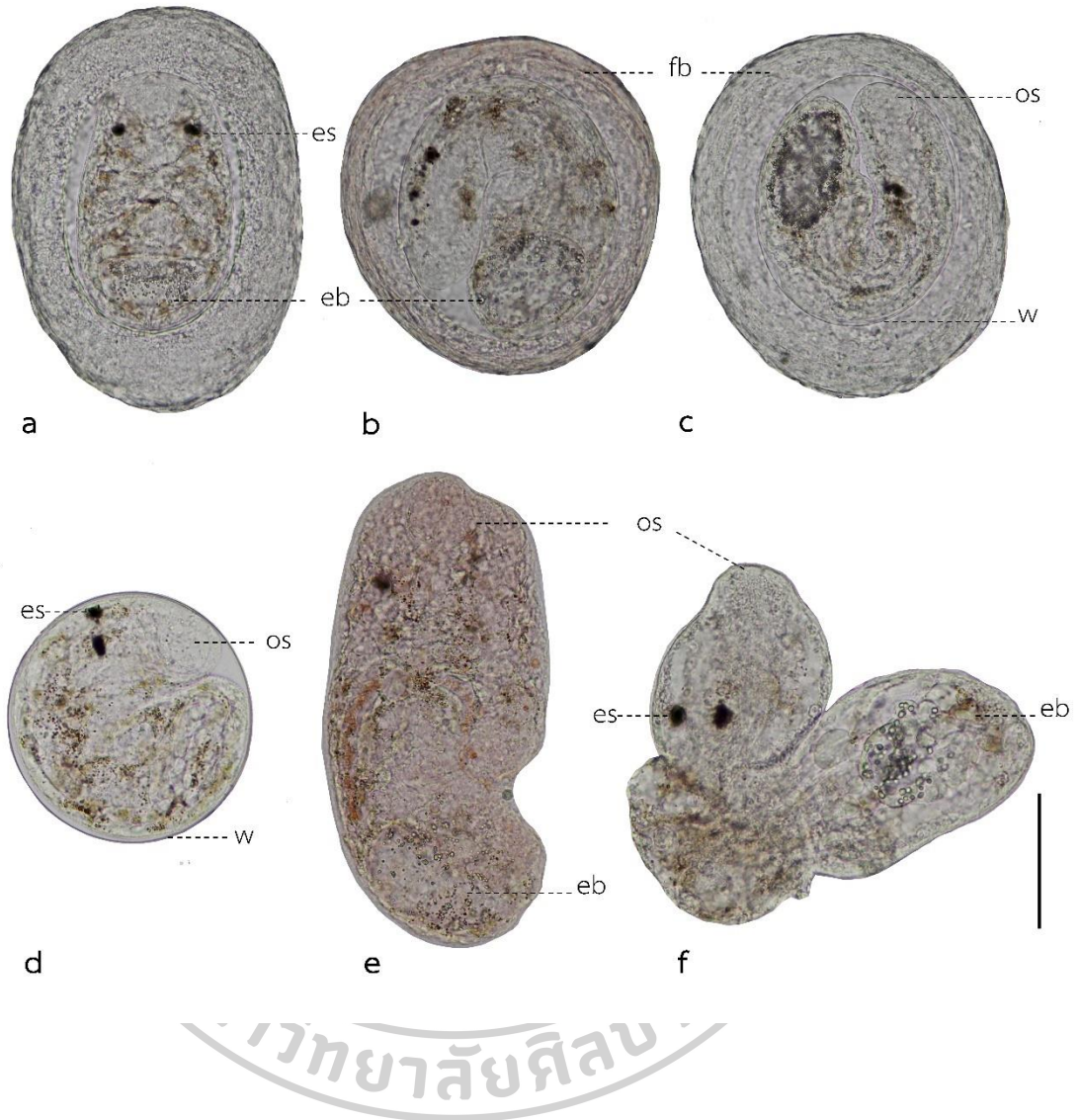


ตารางที่ 6 ขนาดตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst และ อวัยวะต่างๆในแต่ละสัปดาห์
(หน่วย μm , ค่าเฉลี่ย จำนวน 10 ตัว)

สัปดาห์	ค่าเฉลี่ยของขนาดเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst และ อวัยวะต่างๆ ($\bar{x} \pm \text{S.D}$) (μm)							
	ยาว b	กว้าง b	ยาว os	กว้าง os	ยาว vs	กว้าง vs	ยาว eb	กว้าง eb
1	322.7 ± 33.477	87.8 ± 7.800	31.9 ± 3.143	28.1 ± 2.424	35.3 ± 0.949	31.5 ± 1.509	73.3 ± 8.028	53.9 ± 9.036
2	417.7 ± 27.277	115.6 ± 10.405	49.1 ± 6.887	45.1 ± 6.855	53.3 ± 7.364	49.1 ± 8.399	90 ± 10.635	64.9 ± 10.492
3	426.5 ± 35.672	118.3 ± 6.237	52.3 ± 3.020	47.3 ± 4.473	57.1 ± 2.330	53.6 ± 3.718	100 ± 13.283	70.1 ± 10.397
4	428.8 ± 45.300	120.6 ± 7.575	53.3 ± 4.191	49.6 ± 6.275	57.6 ± 4.006	53.8 ± 4.442	104.2 ± 9.682	75.6 ± 12.712
5	459 ± 34.944	127.8 ± 14.513	57.6 ± 5.168	52.8 ± 6.427	60.2 ± 5.613	56.5 ± 5.562	105.4 ± 14.238	72.8 ± 12.408
6	488.7 ± 29.235	137.5 ± 19.896	60.8 ± 2.486	56.3 ± 3.653	70.3 ± 3.887	63.6 ± 4.169	127.7 ± 17.017	82.6 ± 15.493

(b: body, os: oral sucker, vs: ventral sucker, eb: excretory bladder)



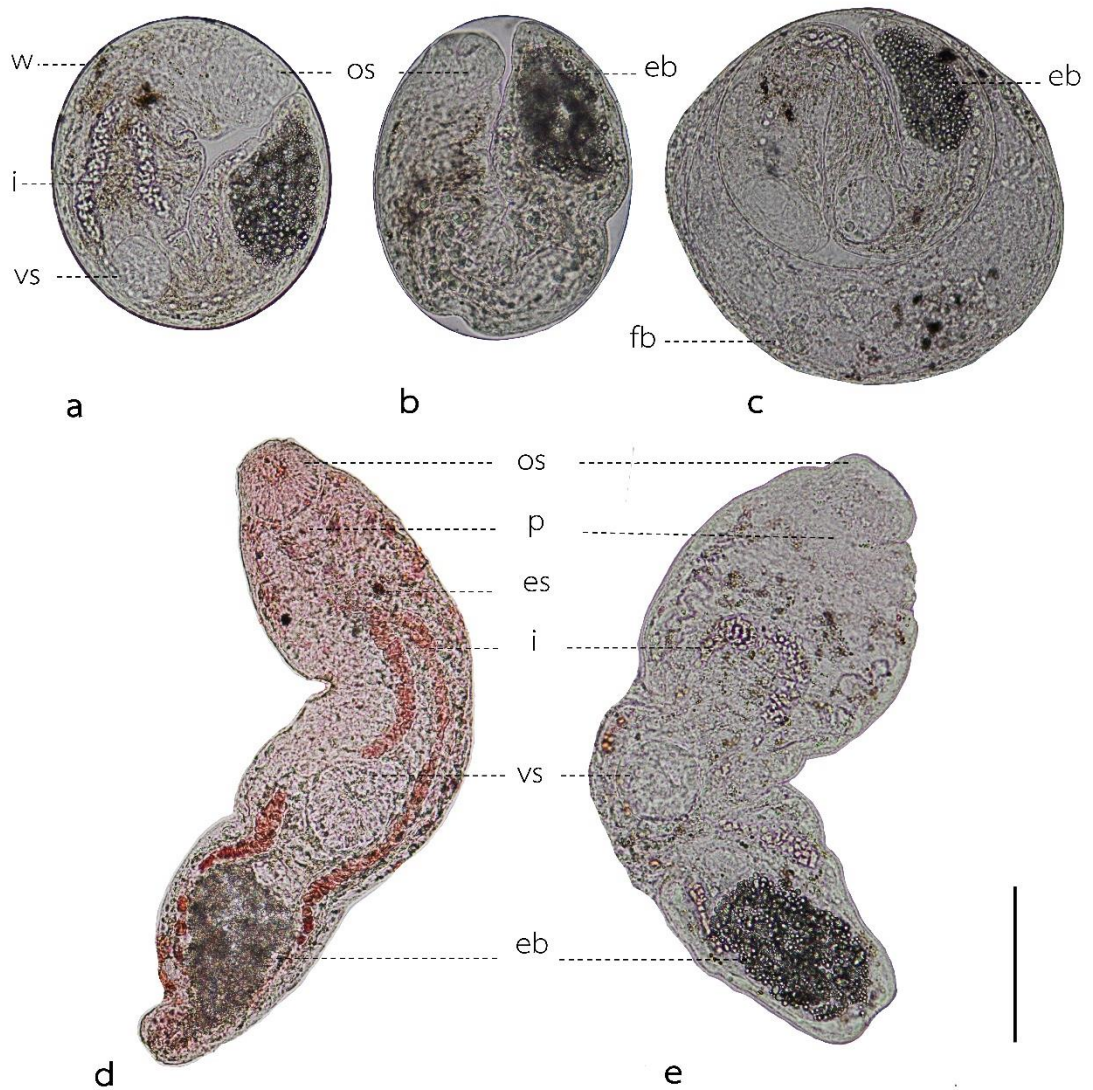


รูปที่ 19 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 1 สัปดาห์ (scale =100 μ m) (w: cyst wall, es: eye spots, os: oral sucker, vs: ventral sucker, i: intestine, eb: excretory bladder, fb: fish fiber)

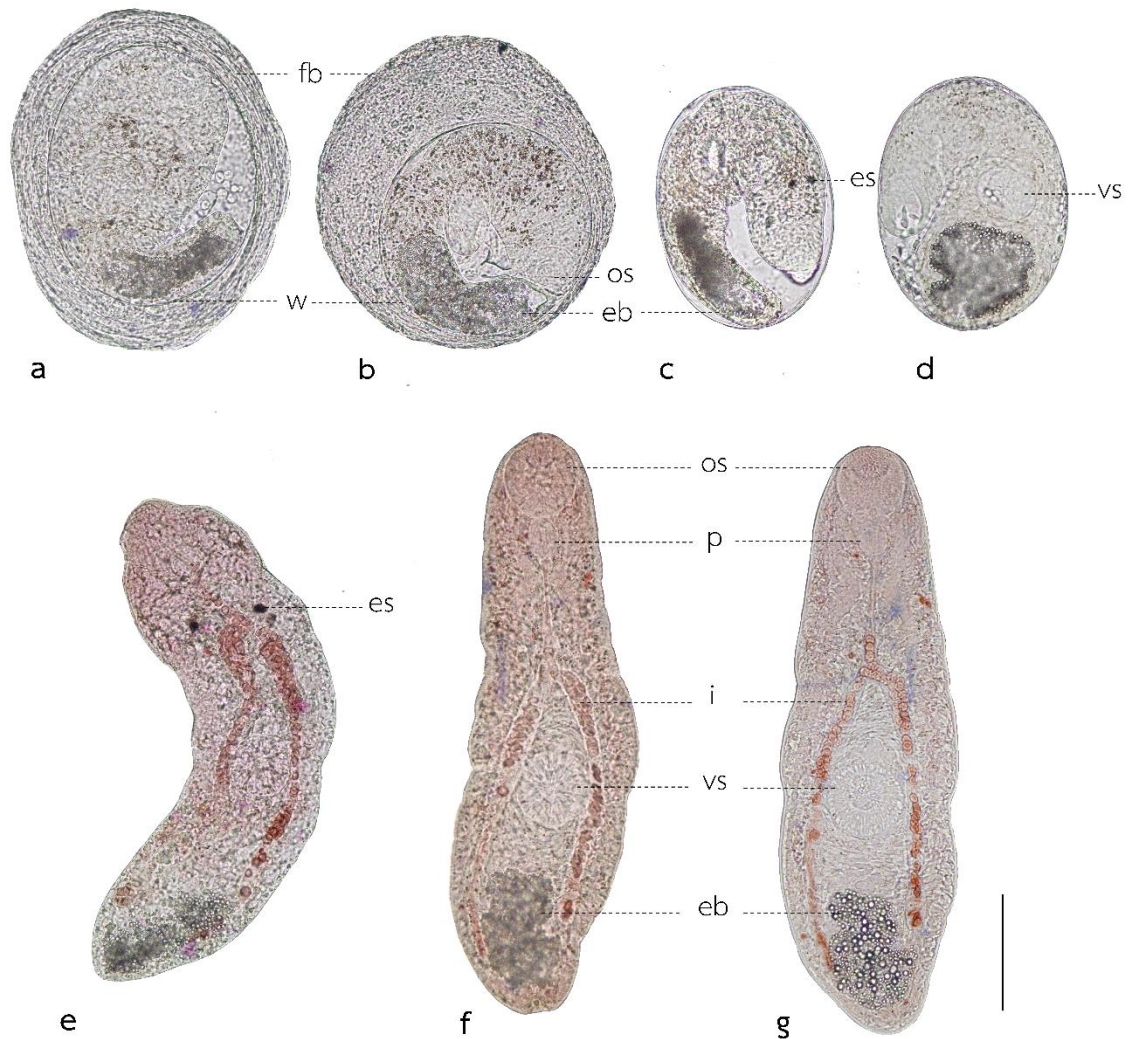
a, b, c, d: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในถุง cyst

e: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst และย้อมสี 0.5% neutral red

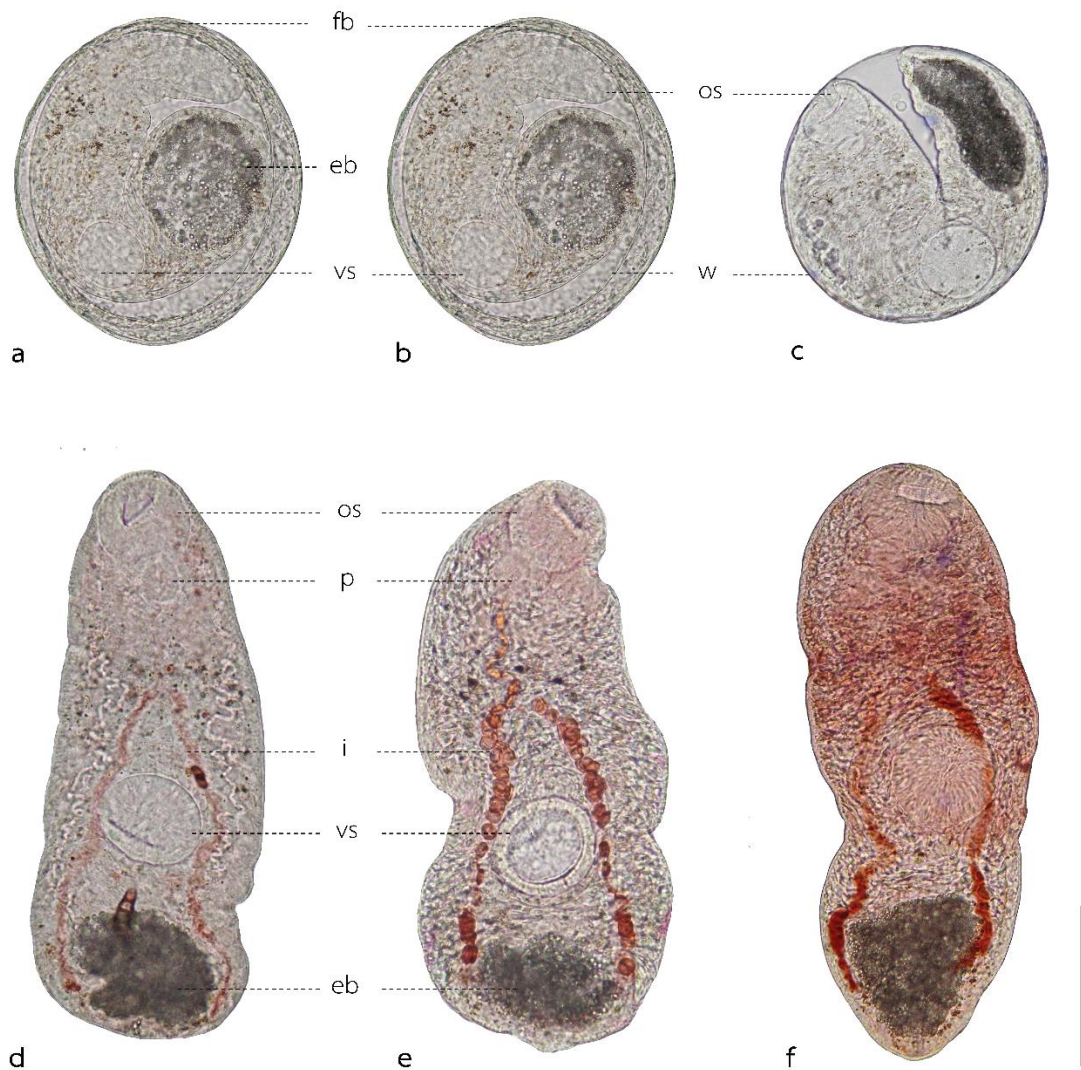
f: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst



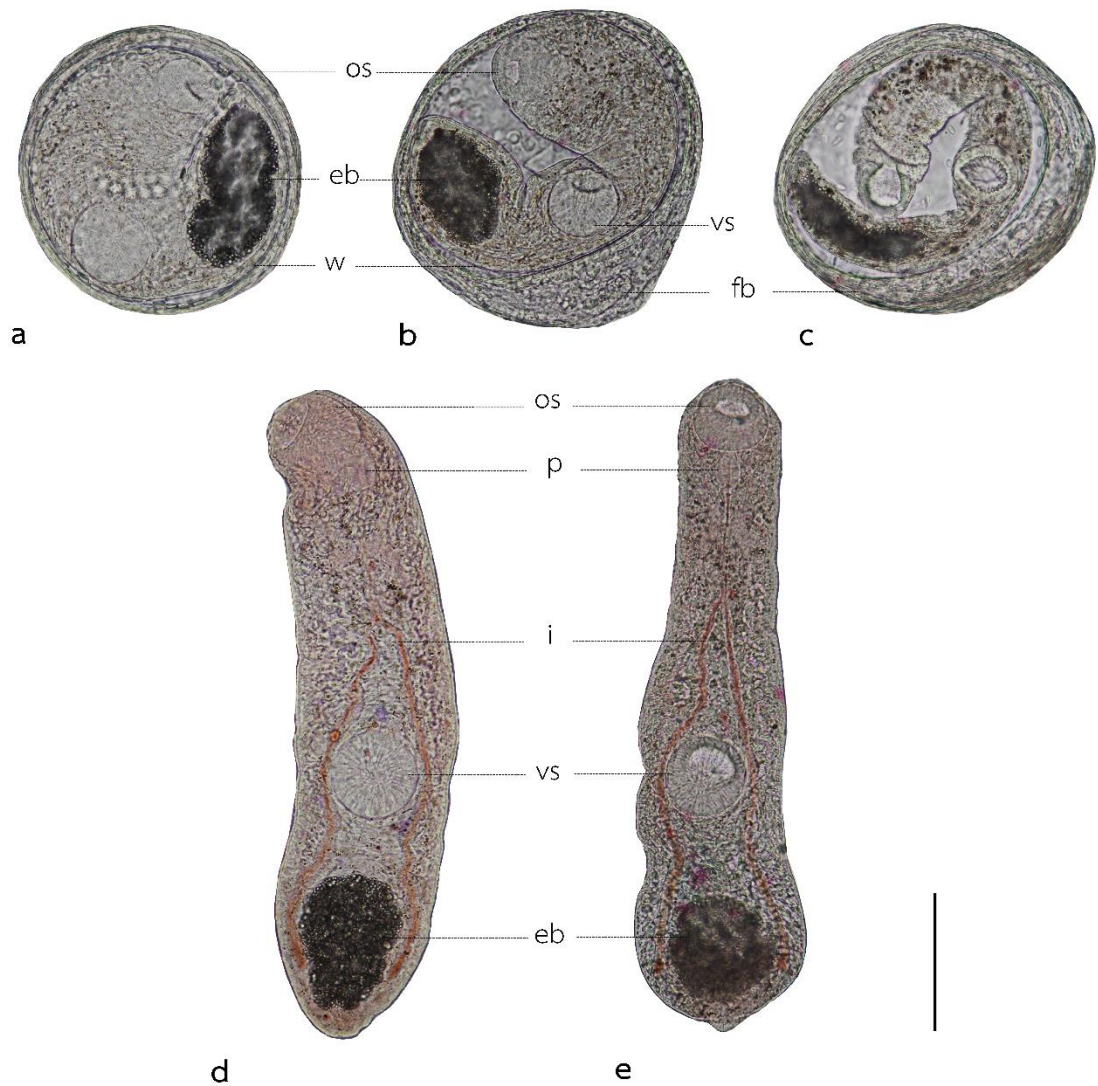
รูปที่ 20 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 2 สัปดาห์ (scale = 100 μ m) (w: cyst wall, es: eye spots, os: oral sucker, vs: ventral sucker, p: pharynx, i: intestine, eb: excretory bladder, fb: fish fiber)
 a, b, c: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในถุง cyst
 d: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst และย้อมสี 0.5% neutral red
 e: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst



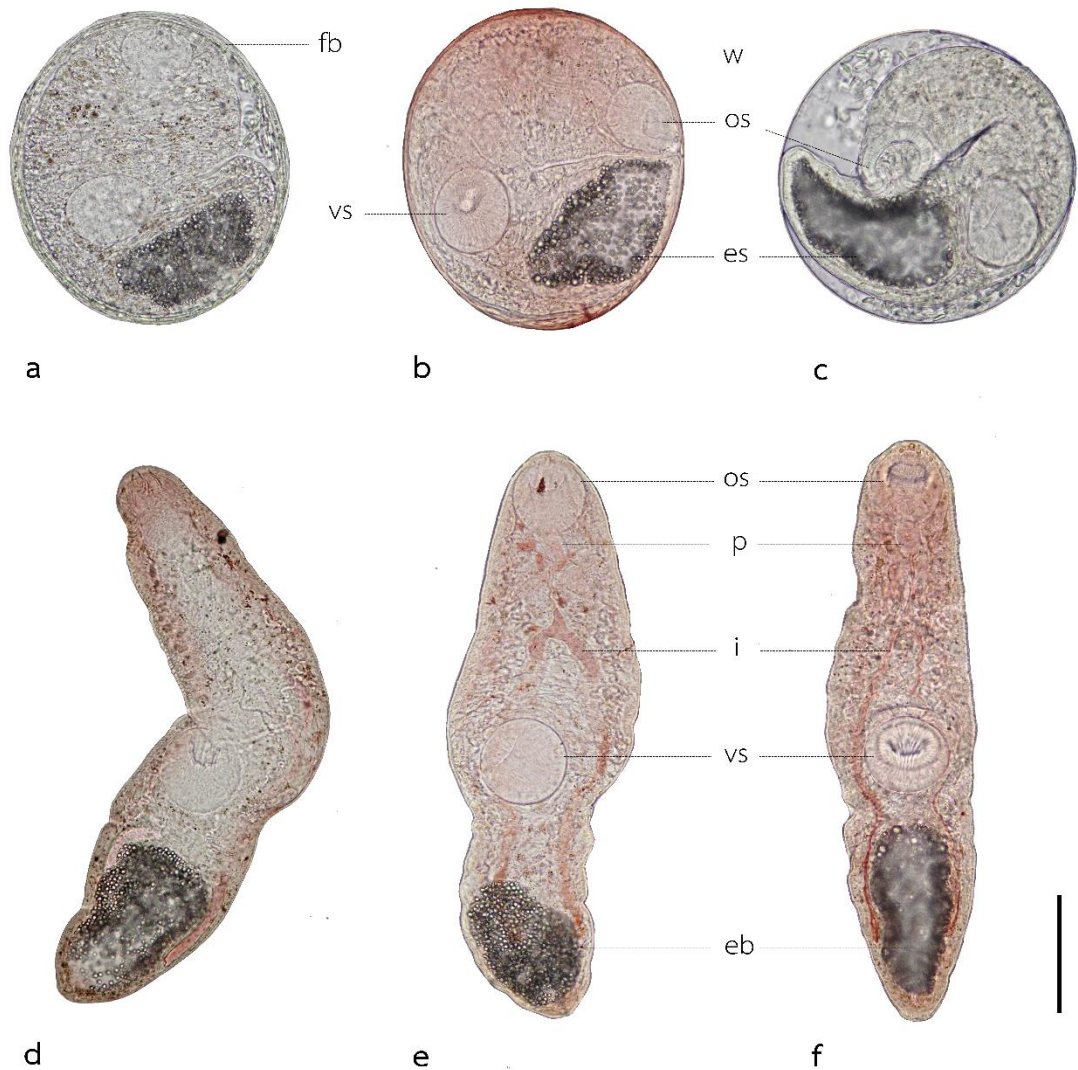
รูปที่ 21 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 3 สัปดาห์ (scale = 100 μ m) (w: cyst wall, es: eye spots, os: oral sucker, vs: ventral sucker, p: pharynx, i: intestine, eb: excretory bladder, fb: fish fiber)
 a, b, c, d: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในถุง cyst
 e, f, g: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst และย้อมสี 0.5% neutral red



รูปที่ 22 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอรัคคาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 4 สัปดาห์ (scale = 100 μ m) (w: cyst wall, es: eye spots, os: oral sucker, vs: ventral sucker, p: pharynx, i: intestine, eb: excretory bladder, fb: fish fiber)
 a, b, c: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอรัคคาเรียใน cyst
 d, e, f: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอรัคคาเรียที่ออกจาก cyst และย้อมสี 0.5% neutral red



รูปที่ 23 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 5 สัปดาห์ (scale = 100 μ m) (w: cyst wall, es: eye spots, os: oral sucker, vs: ventral sucker, p: pharynx, i: intestine, eb: excretory bladder, fb: fish fiber)
 a, b, c: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียถุง cyst
 d, f: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst และย้อมสี 0.5% neutral red



รูปที่ 24 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* จากการทดลอง อายุ 6 สัปดาห์ (scale = 100 μ m) (w: cyst wall, es: eye spots, os: oral sucker, vs: ventral sucker, p: pharynx, i: intestine, eb: excretory bladder, fb: fish fiber)
 a, c: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในถุง cyst
 b: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในถุง cyst ย้อมสี 0.5% neutral red
 d, e, f: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst ย้อมสี 0.5% neutral red

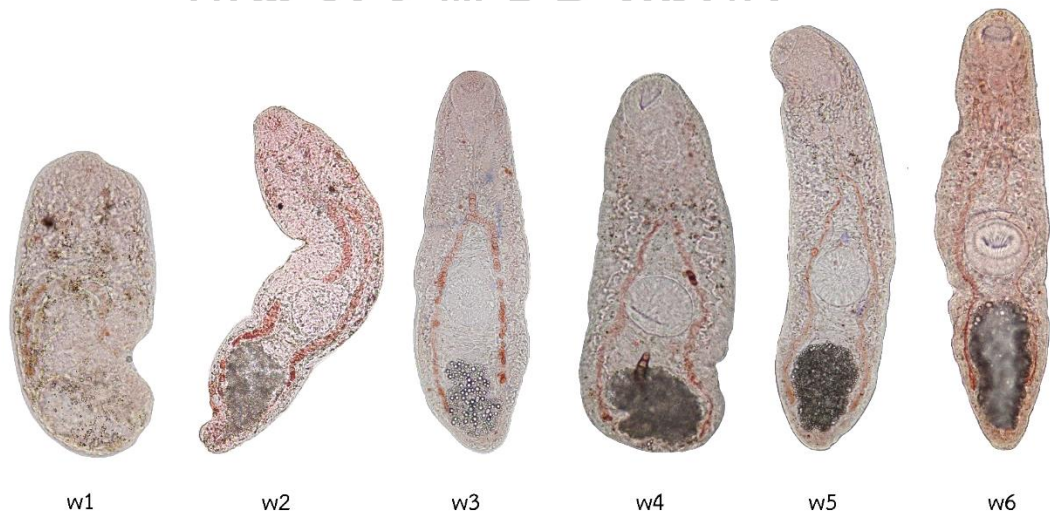


รูปที่ 25 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ภายในถุง cyst 1 - 6 สัปดาห์ (scale = 100 μ m)

w1: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 1 สัปดาห์, w2: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 2 สัปดาห์

w3: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 3 สัปดาห์, w4: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 4 สัปดาห์

w5: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 5 สัปดาห์, w6: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 6 สัปดาห์



รูปที่ 26 ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *Opisthorchis viverrini* ออกจากถุง cyst 1- 6 สัปดาห์ (scale = 100 μ m)

w1: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 1 สัปดาห์, w2: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 2 สัปดาห์

w3: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 3 สัปดาห์, w4: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 4 สัปดาห์

w5: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 5 สัปดาห์, w6: ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย อายุ 6 สัปดาห์

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการศึกษาและสรุปผลการศึกษา

1. การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ในปลาตะเพียนขาว

การทดลองการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางอันดับสองของปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคในคนหรือสัตว์ ทำให้ทราบถึงความสามารถของปรสิตที่จะเข้าติดเชื่อในตัวปลา ความหนาแน่นของเมตาเซอร์คาเรีย และบริเวณที่เชื้อเข้าฝังตัวมากที่สุด โดยใช้ปัจจัยเป็นปริมาณเซอร์คาเรีย และดูการเจริญพัฒนารูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในตัวปลาในแต่ละสัปดาห์ เพื่อนำไปใช้ในการคาดคะเนผลของการติดเชื้อและหาแนวทางในการป้องกันความเสี่ยงในการเกิดโรค ซึ่งพยาธิ *O. viverrini* ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขในหลายประเทศในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในกลุ่ม Opisthorchiidae สูง ซึ่งการติดเชื้อพยาธิในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรค hepatobiliary และการติดเชื้อเรื้อรังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) ในผู้ป่วยได้คนสามารถติดเชื้อพยาธิกลุ่มนี้ได้โดยบริโภคปลาดิบ หรือปลาที่มีปนเปื้อนตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียโดยไม่ปรุงให้สุก เช่น ก้อยปลา ปลาจ๋า และ ปลาส้ม เป็นต้น (Kaewkes, 2003; Sithithaworn et al., 2012)

การวิจัยครั้งนี้ ศึกษาอัตราการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* โดยใช้ปัจจัยเป็นปริมาณเซอร์คาเรีย (กลุ่ม 100, 200 และ 400 เซอร์คาเรีย) พบปลาตะเพียนขาวติดเชื้อทั้งหมด 200 ตัว จาก 241 ตัว คิดเป็น 82.99% และค่าเฉลี่ย 10.076 ± 9.268 เมตาเซอร์คาเรีย/ปลาที่ติดเชื้อ 1 ตัว โดยแต่ละการทดลองทั้ง 3 ซ้ำจะพบการติดเชื้อสูงสุดในกลุ่มการติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย คือ 96.43%, 93.33% และ 100% ในการทดลองครั้งที่ 1, การทดลองครั้งที่ 2 และ การทดลองครั้งที่ 3 ตามลำดับ ผลการศึกษ้อัตราการติดเชื้อนี้สามารถวิเคราะห์ได้ว่าจำนวนของเซอร์คาเรียมีผลต่อความสามารถในการติดเชื้อ เช่นเดียวกับการวิจัยของ Donthaisong et al., (2014) ที่ได้ทำการทดลองใช้ปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* เพื่อศึกษาผลกระทบจากปริมาณเซอร์คาเรีย (25-200 เซอร์คาเรีย) ที่เกี่ยวข้องับความสามารถในการเข้าติดเชื่อของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* จากการทดลอง พบจำนวนเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุดในกลุ่ม 200 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณ

เซอร์คาเรีย มีผลต่อความสำเร็จในการเข้าติดเชื้อของพยาธิภายในตัวปลา ซึ่งการใส่จำนวนเซอร์คาเรีย มากก็จะมีโอกาสพบเชื้อเมตาเซอร์คาเรียในตัวปลามากกว่าการใส่เซอร์คาเรียน้อย และมีโอกาสก่อโรค มากขึ้นตามไปด้วย เมื่อตรวจสอบจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในตัวปลา พบค่าเฉลี่ยจำนวนเมตาเซอร์ คาเรียในปลาที่ติดเชื้อมากที่สุดในกลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย ($av.=16.74\pm 10.54$, $av.=13.18\pm 8.3$ และ $av.=15\pm 6.22$ ในการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) และน้อยที่สุดในกลุ่มติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย ($av.= 4.05\pm 2.74$, $av.= 2.95\pm 1.32$ และ $av.= 6.86\pm 4.4$ ในการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sohn et al. (2012) ซึ่งได้ทำการศึกษากการแพร่กระจาย ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในคนและปลา ในจังหวัด Kratie ประเทศกัมพูชา จากผลการศึกษา พบว่า มีปลาติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* 19 ตัว จากปลาทั้งหมด 85 ตัว และได้จำนวน เมตาเซอร์คาเรีย 367 เมตาเซอร์คาเรีย คิดเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในปลาที่ติดเชื้อ คือ 19 เมตาเซอร์คาเรียต่อปลา 1 ตัว และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pintaor et al. (2013) ซึ่งได้ ทำการศึกษาการแพร่กระจายพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ ใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปลา cyprinid บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในปลาที่ติดเชื้อ คือ 0.01-6.5 เมตาเซอร์คาเรีย

จากปลาที่ติดเชื้อ 200 ตัว พบจำนวนเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุดบริเวณครีบหาง โดยคิดเป็น 91.5 % (183 ตัว) รองลงมาเป็นครีบหลังและครีบท้อง คิดเป็น 70% (140 ตัว) และ 44.00% (88 ตัว) และพบน้อยที่บริเวณเนื้อได้ครีบอก 4.5% (9 ตัว) การพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุด บริเวณครีบหาง อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการทดลอง ได้นำปลาไปทำการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์ คาเรียไว้ในที่มืด ปลาอาจมีการเคลื่อนที่น้อย ทำให้เซอร์คาเรียสามารถไชเข้าไปฝังตัวในบริเวณครีบ หางได้ง่ายกว่าบริเวณอื่น เนื่องจากครีบหาง (caudal fin) เป็นส่วนที่มีเนื้อเยื่อบางและมีขนาดพื้นที่ ค่อนข้างใหญ่กว่าส่วนอื่น ทำให้เซอร์คาเรียสามารถไชเข้าไปฝังตัวได้ง่ายกว่าส่วนอื่นๆของปลา เช่นเดียวกับการรายงานของ kaewkes (2003) พบว่าที่ครีบหางมีการติดเชื้อหนาแน่นมากที่สุด โดย พบมากที่สุดที่บริเวณช่องว่างของเส้นหาง (fin ray) และเยื่อหุ้มระหว่างเส้นหาง จากงานวิจัยของ Donthaisong et al. (2016) ได้ศึกษาการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียเรีย *O. viverrini* ใน ลูกปลา *B. gonionotus* อายุ 1 ถึง 64 วัน พบอัตราการติดเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามขนาดและอายุของปลา พบว่ามีการติดเชื้อที่บริเวณลำตัวมากที่สุด เนื่องจากเป็นบริเวณที่ใหญ่ที่สุดของปลาที่ตัวอ่อนระยะ เซอร์คาเรียไชเข้าไปฝังตัวมากกว่าส่วนอื่น และพบการติดเชื้อได้น้อยที่บริเวณครีบ เนื่องจากเนื้อเยื่อ

ของลูกปลาบางมาก ทำให้เซอร์คาเรียที่ไชเข้าที่บริเวณครีบจะทะลุผ่านเนื้อเยื่อของครีบ จึงเป็นผลให้เซอร์คาเรียไม่สามารถเกาะติดและฝังตัวอยู่ที่บริเวณครีบปลาได้ งานวิจัยของ Scholz et al. (1990) ศึกษาการติดเชื้อพยาธิใบไม้ ในจังหวัด Vientian ของลาว พบว่า 36% ของจำนวนตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* ได้จากเนื้อปลา และ 13% พบในกล้ามเนื้อครีบอก และจากงานวิจัยของ Manivong et al. (2009) ได้ศึกษาการติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* ในปลา cyprinoid fish จาก 3 แม่น้ำในจังหวัด Khammoune ประเทศลาว พบว่าปลาที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* จะพบใน กล้ามเนื้อ 58%, ครีบ 28%, หัว 13% และอวัยวะภายใน 2%

2. การเจริญพัฒนาของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในอวัยวะต่างๆของปลา

การเจริญพัฒนารูปร่างลักษณะของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่พบในอวัยวะต่างๆของปลาในแต่ละสัปดาห์ แสดงการพัฒนาขนาดรูปร่างของระยะเมตาเซอร์คาเรียที่มีขนาดความกว้าง x ความยาว และความหนาของผนังที่มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของพยาธิภายในตัวปลา และความสามารถที่จะเข้าติดเชื้อในคนต่อไปได้ จากการทดลองพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* เริ่มมีการพัฒนาอวัยวะภายในของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 แต่อวัยวะต่างๆ ยังเจริญพัฒนาไม่ดี และพบการพัฒนาอวัยวะภายในของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในสัปดาห์ที่ 2 - 6 อวัยวะแต่ละส่วนมีการเจริญพัฒนาดี จะสังเกตเห็นอวัยวะต่างๆ ได้ อย่างชัดเจน ซึ่งส่งผลต่อความสำเร็จในการเข้าฝังในตัวปลา ความแข็งแรงในการอยู่รอด และการก่อโรคในคน ทั้งนี้อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตในการนำตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียไปทดลองในหนูทดลองเพื่อดูความสำเร็จในการเข้าฝังตัวของตัวอ่อนพยาธิในแต่ละสัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dennis (1973) และ Donthaisong et al. (2016) พบว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตัว *O. viverrini* มีการเจริญพัฒนาตั้งแต่วันแรกไปจนถึงวันที่ 9 และวันที่ 11 หลังการติดเชื้อในโฮสต์ ตามลำดับ แต่ยังไม่พัฒนาเป็นเมตาเซอร์คาเรียระยะติดต่อ อย่างไรก็ตามหลังการติดเชื้อ 11 วัน ยังเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียทุกวันเช่น การยืด หด บิดตัว ไปจนกว่าจะเข้าสู่เมตาเซอร์คาเรียระยะติดต่อ จากรายงานของ Kaewkes (2003) ได้รายงานไว้ว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ตัว *O. viverrini* จะใช้เวลา 21 วัน ตัวอ่อนถึงจะอยู่ในระยะติดต่อ (infective stage) ที่จะสามารถติดต่อสู่คนและสัตว์ได้ ซึ่งจากผลการทดลองของงานวิจัยนี้พบว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงขนาดรูปร่างตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนถึง

สัปดาห์ที่ 6 ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Donthaisong et al. (2016) ซึ่งได้ศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากการทดลองในปลาตะเพียนขาวตั้งแต่เกิดการติดเชื้อไปจนถึงวันที่ 61 หลังการติดเชื้อ โดยสามารถแบ่งการพัฒนาของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ได้ 4 ระยะ คือ (1) ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียมีลักษณะคล้ายหัวของตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย พบใน 1 วัน (2) ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียมีเม็ดสีน้ำตาล มีผนังหนา และสามารถเห็น ventral sucker พบใน 3-15 วัน (3) ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียเห็น oral sucker และ ventral sucker เป็นกล้ามเนื้อหนาขึ้น มี excretory bladder สีเข้ม ตัวอ่อนมีการเคลื่อนไหว ตัวอ่อนมีการเคลื่อนไหว พบใน 20-50 วัน (4) ระยะติดต่อ เห็น oral sucker และ ventral sucker ได้ชัด สามารถเห็น excretory bladder ไม่มี eye spots ตัวอ่อนมีการเคลื่อนไหวมาก พบใน 55 วัน

และจากการทดลองยังพบ fibrous tissue ซึ่งเกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลา เกิดแคปซูลสีขาวขนาดเล็กพอร่มตัวล้อมรอบเมตาเมตาเซอร์คาเรีย โดยจากการสังเกตพบว่า fibrous tissue ในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 จะมีความหนามาก และเมื่อเมตาเมตาเซอร์คาเรียมีอายุเพิ่มขึ้นสังเกตได้ว่า fibrous tissue บางลงกว่าสัปดาห์ที่ 1 และ 2 โดยงานวิจัยก่อนหน้าของ Donthaisong et al. (2016) พบว่า fibrous tissue มีความหนาเพิ่มขึ้นตามอายุของเมตาเมตาเซอร์คาเรีย และหยุดการเพิ่มขนาดของ fibrous tissue ในวันที่ 9 หลังการติดเชื้อ ผลจากความแตกต่างของ fibrous tissue นี้แสดงให้เห็นว่าควรมีการศึกษาถึงการสร้าง fibrous tissue ต่อไปในอนาคต

3. จำแนกชนิดพันธุ์ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุล

จากการตรวจสอบชนิดพันธุ์ของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ที่ตำแหน่งยีน *cox1* พบว่าตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ที่ได้จากการตรวจจากปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* ในการทดลอง PCR product มีขนาดประมาณ 380 bp เช่นเดียวกับพยาธิระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และเมื่อนำ DNA sequences จากตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย ไปวิเคราะห์ Phylogenetic กับข้อมูล *O. viverrini*, *O. lobatus* และ *C. sinensis* ใน GenBank ด้วย พบว่า DNA sequences ของเมตาเซอร์คาเรีย อยู่ใน clade เดียวกับ ข้อมูล *O. viverrini* จึงกล่าวได้ว่างานวิจัยนี้เป็นการศึกษาตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* เนื่องจากมีการศึกษาของ Thaenkhom et al. (2011) ได้รายงานการพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis lobatus* ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ในกลุ่ม Opisthorchiasis ในปลา *Channa limbata* ในจังหวัด Vientiane ประเทศลาว พบว่าลักษณะของตัวอ่อนระยะเมตา

เซอร์คาเรียและตัวเต็มวัยของ *O. lobatus* คล้ายกับ *O. viverrini* และจากลำดับใน Sequences DNA ที่ได้จากยีน COI ของ *O. lobatus* และ *O. viverrini* ต่างกันเพียง 3.03%

สรุปผลการศึกษา

1. พบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ *O. viverrini* ในปลาตะเพียนขาว *B. gonionotus* โดยใช้ปัจจัยเป็นปริมาณเซอร์คาเรีย (กลุ่มติดเชื้อ 100, 200 และ 400 เซอร์คาเรีย) พบปลาตะเพียนขาวติดเชื้อทั้งหมด 200 ตัว จาก 241 ตัว คิดเป็น 82.99% และจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในปลาที่ติดเชื้อ คือ 10 เมตาเซอร์คาเรียต่อปลา 1 ตัว โดยแต่ละกลุ่มการทดลองจะพบการติดเชื้อสูงสุดในกลุ่ม 400 เซอร์คาเรีย คือ 96.43%, 93.33% และ 100% ในทดลองครั้งที่ 1, การทดลองครั้งที่ 2 และ การทดลองครั้งที่ 3 ตามลำดับ พบค่าเฉลี่ยจำนวนเมตาเซอร์คาเรียในปลาที่ติดเชื้อมากที่สุดในกลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย ($av.=16.74\pm 10.54$, $av.=13.18\pm 8.3$ และ $av.=15\pm 6.22$ ในการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) และน้อยที่สุดในกลุ่มติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย ($av.= 4.05\pm 2.74$, $av.= 2.95\pm 1.32$ และ $av.= 6.86\pm 4.4$ ในการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ)

2. การติดเชื้อมากที่สุดบริเวณครีบหาง โดยคิดเป็น 91.5 % (183 ตัว) รองลงมาเป็น ครีบหลังและครีบท้อง คิดเป็น 70% (140 ตัว) และ 44.00% (88 ตัว) และพบน้อยที่บริเวณเนื้อใต้ครีบออก 4.5% (9 ตัว)

3. จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยจำนวนเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุดในกลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย ตามมาด้วย กลุ่มติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย และ กลุ่มติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรีย ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเซอร์คาเรียมีผลต่อความสำเร็จในการเข้าติดเชื้อในตัวปลา

4. พบจำนวนเมตาเซอร์คาเรียมากที่สุดที่บริเวณ ครีบหาง ($av.=5.32\pm 4.83$) ตามด้วย ครีบออก ($av.=1.94\pm 2.17$) และครีบท้อง ($av.= 0.89\pm 1.36$) น้อยที่สุดคือ เนื้อกลางตัว ($av.=0.11\pm 0.54$)

5. ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* เริ่มมีการพัฒนาอวัยวะในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งส่งผลต่อความสำเร็จในการเข้าฝังในตัวปลา ความแข็งแรงในการมีชีวิตรอด และการก่อโรคในคนและสัตว์

รายการอ้างอิง

- Ando, K., Sithithaworn, P., Nuchjungreed, C., Tesana, S., Srisawangwong, T., Limviroj, W., & Chinzei, Y. (2001). Nucleotide sequence of mitochondrial CO I and ribosomal ITS II genes of *Opisthorchis viverrini* in northeast Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 32(2), 17-22.
- Buathong, S., Leelayoova, S., Mungthin, M., Naaglor, T., Taamasri, P., Suwannahitatorn, P., & Tan-Ariya P. (2015). Development and evaluation of PCR methods based on cytochrome c oxidase subunit one (cox1) and NADH dehydrogenase subunit one gene (nad1) to detect *Opisthorchis viverrini* in human fecal samples. *Parasitology research*, 114(9), 3547-3549.
- Chauhan, T., & Rajiv, K. (2010). Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1, 281-291.
- Cheng, P., Touch, B. T., Eric, B., & Leng, S. V. (2004). Biological reviews of important Cambodian fish species, based on fishbase 2004. *The World Fish Center*, 1-127.
- Dao, T. H., Nguyen, T. G., Victor, B., Gabriël, S., & Dorny, P. (2013). *Opisthorchis viverrini* - like liver fluke in birds from Vietnam : morphological variability and rDNA/mtDNA sequence confirmation. *Journal of Helminthology*, 1-6.
- Dao, T. H., Nguyen, T. G., Gabriël, S., Bul, K. L., Dorny, P., & Le, T. H. (2017). Updated molecular phylogenetic data for *Opisthorchis* spp. (Trematoda: Opisthorchioidea) from ducks in Vietnam. *Parasites & Vectors*, 10, 575-584.
- Dennis, E. A. (1973). Development of the metacercaria and adhesive organ of *Mesostephanus yedea* Dennis and Penner, 1971 (Trematode: Cyathocotylidae), and their effects on host tissue. *Journal of Helminthology*, 47, 61-71.
- Donthaisong, C., Arunsan, P., Suwannatrai, K., Prasopdee, S., Kulsantiwong, J., Wongmaneeprateep, S., Apiporn, S., & Tesana, S. (2014). Experimental infection of *Opisthorchis viverrini* cercariae to the cyprinid fish, *Barbonymus gonionotus*. *Acta Tropica*, 141, 253-257.
- Donthaisong, C., Arunsan, P., Suwannatrai, K., Prasopdee, S., Kulsantiwong, J., Wongmaneeprateep, S., Apiporn, S., & Tesana, S. (2016). Infectivity and

- development of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in immunosuppressed *Barbonymus gonionotus* fingerlings (Cyprinidae). *Acta Tropica*, 162, 107-113.
- FAO. (2017). FAO aquatic species distribution map of *Puntius gonionotus* (GeoLayer). . from Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fürst, T., Keiser, J., & Utzinger, J. (2012). Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(3), 210-221.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Harinasuta, C., & Harinasuta, T. (1984). *Opisthorchis viverrini*: life cycle, intermediate hosts, transmission to man and geographical distribution in Thailand. *Arzneimittelforschung*, 34, 1164-1167.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & Waard, J. R. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 207, 313-322.
- Herbert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society*, 270, 96-99.
- Hwang, U. W., & Kim, W. Y. (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean journal of parasitology*, 37(4), 215-228.
- Ito, J. (1962). Studies on cercariae from fresh water snails in Thailand. *Jap. J. M. Sc. & Biol.*(15), 249-270.
- Kaewkes, S. (2003). Taxonomy and biology of liver flukes. *Acta Tropica*, 88(3), 177-186.
- Kaewpitoon, S. J., Kaewpitoon, N., Rujirakul, R., Ueng, A. N., Matrakool, L., & Tongtawee, T. (2015). The Carcinogenic Liver Fluke *Opisthorchis viverrini* among Rural community people in northeast thailand: a crosssectional descriptive study using multistage sampling technique. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 7803-7807.

- Katokhin, A. V., Shekhovtsov, S. V., Konkow, S., Yurlova, N. I., Serbina, E. A., Vodianitskai, S. N., Fedorov, K. P., Loktev, V. B., Muratov, I. V., Ohyama, F., Makhnev, T. V., Peltek, S. E., & Mordvinov, V. A. (2008). Assessment of the genetic distinctions of *Opisthorchis felineus* from *O. viverrini* and *Clonorchis sinensis* by ITS2 and CO1 sequences. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 421.
- King, S., & Scholz, T. (2001). Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. *Korean Journal of Parasitology*, 39(3), 209-221.
- Le, T. H., Blair, D., Agatsuma, T., Humair P. F., Campbell, N. J. H., Iwagami, M., Littlewood, D. T. J., Peacock, B., Johnston, D. A., Bartley, J., Rollinson, D., Herniou, E. A., Zarlenga, D. S., & McManus, D. P. (2000). Phylogenies Inferred from Mitochondrial Gene Orders-A Cautionary Tale from the Parasitic Flatworms. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7), 1123-1125.
- Lee, D., Choe, S., Park, H., Jeon, H. K., Chai, J. Y., Sohn, W. M., Yong, T. S., Min, D. Y., Rim H. J., & Eom, K. S. (2013). Complete Mitochondrial Genome of *Haplorchis taichui* and Comparative Analysis with Other Trematodes. *Korean Journal of Parasitology*, 51(6), 719-726.
- Li, B. (2016). *Genetic variability among Clonorchis sinensis isolates from different endemic regions in China revealed by sequences of four mitochondrial DNA genes.*
- Liu, G. H., Li, B., Li, J. Y., Song, H. Q., Lin, R. Q., Cai, X. Q., Zou, F. C., Yan, H. K., Yuan, Z. G., Zhou, D. H., & Zhu, X. Q. (2012). Genetic variation among *Clonorchis sinensis* isolates from different geographic regions in China revealed by sequence analyses of four mitochondrial genes. *Journal of Helminthology*, 86(4), 479-484.
- Manivong, K., Komalamisra, C., Waikagul, J., & Radomyos, P. (2009). *Opisthorchis viverrini* Metacercariae in Cyprinoid Fish from Three Rivers in Khammouane Province, Lao PDR Khemphavanh. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 32, 23-29.
- Mukha, D., Wiegmann, B. M., & Schal, C. (2002). Evolution and phylogenetic information content of the ribosomal DNA repeat unit in the Blattodea (Insecta). *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(9), 951-960.

- Murgia, C., Prichard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A., & Weiss, R. A. (2006). Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer. *Cell*, *126*, 477-487.
- Pinlaor, S., Onsurathum, S., Boonmars, T., Pinlaor, P., Chaidee, N. H., Chaidee, A., Haonon, O., Limviroj, W., Tesana, S., & Kaewkes, S. (2013). Distribution and abundance of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in cyprinid fish in Northeastern Thailand. *Korean Journal of Parasitology*, *51*(6), 703–710.
- Sahu, R., Biswal, D. K., Roy, B., & Tandon, V. (2016). Molecular characterization of *Opisthorchis noverca* (Digenea: Opisthorchiidae) based on nuclear ribosomal ITS2 and mitochondrial COI genes. *Journal of Helminthology*, *90*, 607–614.
- Saijuntha, W., Sithithaworn, P., Wongkham, S., Laha, T., Chilton, N. B., Petney, T. N., Barton, M., & Andrews, R. H. (2008). Mitochondrial DNA sequence variation among geographical isolates of *Opisthorchis viverrini* in Thailand and Lao PDR, and phylogenetic relationships with other trematodes. *Parasitology*, *132*(12), 1479–1486.
- Salemi, M., & Vandamme, A. M. (2003). *The Phylogenetics Handbook – A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Scholz, T., Ditrich, O., & Giboda, M. (1990). Larval stages of medically important flukes (Trematoda) from Vientiane province, Laos. Part I. Metaercariae. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, *65*(5-6), 238–243.
- Siripiyasing, P., & Chaveerach, A. (2011). DNA Barcode for Identification of Living Species: Case Studies of Cytochrome c Oxidase I (COI) in Animals. *Rajabhat Maha Sarakham University Journal*, *5*(2), 205-210.
- Sithithaworn, P., & Elkins, M. H. (2003). Epidemiology of *Opisthorchis viverrini*. *Acta Tropica*, *88*, 187-194.
- Sithithaworn, P., Andrews, R. H., Van, D. N., Wongsaroj, T., Sinuon, M., Odermatt, P., & Sripa, B. (2012). The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. *Parasitology International*, *61*(1), 10–16.
- Sohn, W. M., Yong, T. S., Eom, K. S., Pyo, K. H., Lee, M. Y., Lim, H., Choe, S., Jeong, H. G., Sinuon, M., Socheat, D., & Chai, J. Y. (2012). Prevalence of *Opisthorchis viverrini*

- infection in humans and fish in Kratie Province, Cambodia. *Acta Tropica*, 124, 215-220. .
- Sriamporn, S., Pisani, P., Pipitgool, V., Suwanrungruang, K., Kamsaard, S., & Parkin, D. H. (2004). Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Tropical Medicine and International Health*, 9(5), 588-594.
- Subbotin, S. A., & Moens, M. (2006). *Molecular taxonomy and phylogeny*. In: Perry, R.N. and Moens, M. (eds) *Plant Nematology*. CAB International: Wallingford UK.
- Sripa, B., Brindley, P.J., Mulvenna, J., Laha, T., Smout, M.J., Mairiang, E., Bethony, J. M. & Loukas, A. (2012). The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* – multiple pathways to cancer. *Trends in Parasitology*(28), 395-407.
- Sukontason, K. L., Sukontason, K., Boonsriwong, N., Chaithong, U., & Piangjai S. (2001). Intensity of trematode metacercariae in cyprinoid fish in Chiang Mai Province, northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 32(2), 214-217.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Thaenkham, U., Blair, D., Nawa, Y., & Waikagul, J. (2012). Families Opisthorchiidae and Heterophyidae: are they distinct? *Parasitology International*, 61(1), 90-93.
- Thaenkham, U., Nuamtanong, S., Vonghachack, Y., Yoonuan, T., Sanguankiat, S., Dekumyoy, P., Bounlay, P., Jun, K., & Waikagul, J. (2011). Discovery of *Opisthorchis lobatus* (Trematoda: Opisthorchiidae): A New Record of Small Liver Flukes In the Greater Mekong Sub-Region. *Journal of Parasitology*, 97(6), 1152–1158.
- Thaenkham, U., Visetsuk, K., Dung, D. T., & Waikagul, J. (2007). Discrimination of *Opisthorchis viverrini* from *Haplorchis taichui* using COI sequence marker. *Acta Tropica*, 103(1), 26-32.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

- alignment aided by quality analysis tools. *nucleic acids research*, 25(24), 4876-4882.
- Touch, S., Komalamisra, C., Radomyos, P., & Waikagul, J. (2009). Discovery of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in freshwater fish in southern Cambodia. *Acta Tropica*, 111(2), 108-113.
- Upatham, E. S., & Viyanant, V. (2003). *Opisthorchis viverrini* and opisthorchiasis: A historical review and future perspective. *Acta Tropica*, 88(3), 171-176.
- Vajrasthira, S., Harinasuta, C., & Komiya, Y. (1961). The morphology of the metacercaria of *Opisthorchis viverrini* with special reference to the excretory system. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 55, 413-418.
- Wattanayingcharoenchai, S., Nithikathkul, C., Wongsaroj, T., Royal, L., & Reungsang, P. (2011). Geographic information system of *Opisthorchis viverrini* in northeast Thailand. *Asian Biomedicine*, 5(5), 687-691.
- Wykoff, D. E., Harinasuta, C., Juttijudata, P., & Winn, M. M. (1965). *Opisthorchis viverrini* in Thailand—the life cycle and comparison with *O. felinus*. *Journal of Parasitology*, 51, 207-214.
- Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press: New York.
- Yong, T. S., Shin, E. H., & Chai, J. Y. (2012). High prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection in a Riparian population in Takeo Province, Cambodia. *Korean Journal of Parasitology*, 50, 173-176.
- เหมะจันทร์, ว. (2540). ชีววิทยาของปลา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภูรีวิโรจน์กุล, ว. (2544). การสำรวจชนิดปลาที่ติดพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอ์คาเรียจากบางท้องที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. *วิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 5(2), 75-86.
- วิทยานนท์, ช. (2547). ปลาน้ำจืดไทย. กรุงเทพฯ: นานมีบุ๊คส์พับลิเคชั่นส์.
- สุกสีเหลือง, ส. (2526). หนังสือธรรมชาติปลา. กรุงเทพฯ: มาร์เก็ตติ้งมีเดีย.
- สุนันทราภรณ์, ส. (2557). การวิเคราะห์ความผันแปรของยีน *Cytochrome C Oxidase subunit I* ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ในประเทศไทย. (มหาบัณฑิต), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



ผลวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองครั้งที่ 1 วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400 เซอร์คาเรีย

ANOVA

Metacercaria Ex1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4328.337	2	2164.169	19.215	.000
Within Groups	9461.065	84	112.632		
Total	13789.402	86			

เมื่อนำอัตราการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400 เซอร์คาเรียมาทดสอบความแตกต่างด้วยวิธี One way ANOVA พบว่าทั้ง 3 กลุ่ม มีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ($P < 0.05$)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: meta

	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	100	200	-12.51609*	2.76374	.000	-18.0121	-7.0201
		400	-16.46190*	2.78872	.000	-22.0076	-10.9162
	200	100	12.51609*	2.76374	.000	7.0201	18.0121
		400	-3.94581	2.81183	.164	-9.5375	1.6458
	400	100	16.46190*	2.78872	.000	10.9162	22.0076
		200	3.94581	2.81183	.164	-1.6458	9.5375

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี Post Hoc Tests พบว่า การทดลองครั้งที่ 1 กลุ่มติดเชื้อ 100 เซอร์คาเรียมีความสามารถในการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกับกลุ่มติดเชื้อ 200 เซอร์คาเรีย และกลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.000$) และกลุ่มที่ใส่ 200 กับ 400 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.164$)

ผลวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองครั้งที่ 2 วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการใช้ตัวอ่อน
พยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400 เซอร์คาเรีย

ANOVA

meta

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1788.828	2	894.414	26.565	.000
Within Groups	2828.230	84	33.669		
Total	4617.057	86			

เมื่อนำอัตราการใช้ตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400
เซอร์คาเรีย มาทดสอบความแตกต่างด้วยวิธี One way ANOVA พบว่าทั้ง 3 กลุ่ม มีอย่างน้อย 1 คู่ที่
มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ($P=0.05$)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: meta

	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	100	200	-1.99630	1.53926	.198	-5.0573	1.0647
		400	-10.33333*	1.49821	.000	-13.3127	-7.3540
	200	100	1.99630	1.53926	.198	-1.0647	5.0573
		400	-8.33704*	1.53926	.000	-11.3980	-5.2760
	400	100	10.33333*	1.49821	.000	7.3540	13.3127
		200	8.33704*	1.53926	.000	5.2760	11.3980

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี Post Hoc Tests พบว่า การทดลองครั้งที่ 2 กลุ่มติดเชื้อ 100
เซอร์คาเรีย และ 200 เซอร์คาเรีย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.198$) ส่วน
ในกลุ่มที่กลุ่มติดเชื้อ 400 เซอร์คาเรีย กับ 100 เซอร์คาเรีย และกลุ่มติดเชื้อ 400 กับ 200 เซอร์คา
เรีย มีความสามารถในการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05
($P=0.000$)

ผลวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองครั้งที่ 3 วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการติดเชื้อตัวอ่อน พยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400 เซอร์คาเรีย

ANOVA

meta

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	563.899	2	281.950	12.681	.000
Within Groups	1422.967	64	22.234		
Total	1986.866	66			

เมื่อนำอัตราการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400 เซอร์คาเรีย มาทดสอบความแตกต่างด้วยวิธี One way ANOVA พบว่าทั้ง 3 กลุ่ม มีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ($P=0.05$)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: meta

	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	100	200	-1.96667	1.21748	.111	-4.3989	.4655
		400	-9.96667*	1.97924	.000	-13.9207	-6.0127
	200	100	1.96667	1.21748	.111	-.4655	4.3989
		400	-8.00000*	1.97924	.000	-11.9540	-4.0460
	400	100	9.96667*	1.97924	.000	6.0127	13.9207
		200	8.00000*	1.97924	.000	4.0460	11.9540

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี Post Hoc Tests พบว่า การทดลองครั้งที่ 3 กลุ่มที่ติดเชื้อ 100 และ 200 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.111$) ส่วนในกลุ่มที่ใส่เซอร์คาเรีย 400 กับ 100 เซอร์คาเรีย และกลุ่มติดเชื้อ 400 กับ 200 เซอร์คาเรีย มีความสามารถในการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.000$)

ผลวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองรวม 3 วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิ ระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400 เซอร์คาเรีย

ANOVA

meta

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5755.846	2	2877.923	41.209	.000
Within Groups	16621.465	238	69.838		
Total	22377.311	240			

เมื่อนำอัตราการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของกลุ่มติดเชื้อ 100 200 และ 400 เซอร์คาเรีย มาทดสอบความแตกต่างด้วยวิธี One way ANOVA พบว่าทั้ง 3 กลุ่ม มีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ($P=0.05$)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: meta

	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	100	200	-5.58475*	1.26018	.000	-8.0673	-3.1022
		400	-12.33932*	1.36030	.000	-15.0191	-9.6596
	200	100	5.58475*	1.26018	.000	3.1022	8.0673
		400	-6.75456*	1.37350	.000	-9.4603	-4.0488
	400	100	12.33932*	1.36030	.000	9.6596	15.0191
		200	6.75456*	1.37350	.000	4.0488	9.4603

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี Post Hoc Tests พบว่า กลุ่มติดเชื้อเซอร์คาเรียทั้ง 3 กลุ่ม (100, 200 และ 400 เซอร์คาเรีย) มีความสามารถในการติดเชื้อตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P=0.000$)

ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดความยาวของตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst ในแต่ละสัปดาห์ โดยใช้ One-Way ANOVA

ANOVA

Body Hight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	161513.533	5	32302.707	27.592	.000
Within Groups	63218.800	54	1170.719		
Total	224732.333	59			

พบว่า ความยาวของตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากถุง cyst ในแต่ละสัปดาห์ มีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ($P=0.05$)



Multiple Comparisons

Dependent Variable: BH

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	(I) week	(J) week				Lower Bound	Upper Bound
LSD	week 1	week 2	-95.000*	15.302	.000	-125.68	-64.32
		week 3	-122.900*	15.302	.000	-153.58	-92.22
		week 4	-100.600*	15.302	.000	-131.28	-69.92
		week 5	-136.300*	15.302	.000	-166.98	-105.62
		week 6	-166.000*	15.302	.000	-196.68	-135.32
	week 2	week 1	95.000*	15.302	.000	64.32	125.68
		week 3	-27.900	15.302	.074	-58.58	2.78
		week 4	-5.600	15.302	.716	-36.28	25.08
		week 5	-41.300*	15.302	.009	-71.98	-10.62
		week 6	-71.000*	15.302	.000	-101.68	-40.32
	week 3	week 1	122.900*	15.302	.000	92.22	153.58
		week 2	27.900	15.302	.074	-2.78	58.58
		week 4	22.300	15.302	.151	-8.38	52.98
		week 5	-13.400	15.302	.385	-44.08	17.28
		week 6	-43.100*	15.302	.007	-73.78	-12.42
	week 4	week 1	100.600*	15.302	.000	69.92	131.28
		week 2	5.600	15.302	.716	-25.08	36.28
		week 3	-22.300	15.302	.151	-52.98	8.38
		week 5	-35.700*	15.302	.023	-66.38	-5.02
		week 6	-65.400*	15.302	.000	-96.08	-34.72
	week 5	week 1	136.300*	15.302	.000	105.62	166.98
		week 2	41.300*	15.302	.009	10.62	71.98
		week 3	13.400	15.302	.385	-17.28	44.08
		week 4	35.700*	15.302	.023	5.02	66.38
		week 6	-29.700	15.302	.057	-60.38	.98
	week 6	week 1	166.000*	15.302	.000	135.32	196.68
		week 2	71.000*	15.302	.000	40.32	101.68
		week 3	43.100*	15.302	.007	12.42	73.78
		week 4	65.400*	15.302	.000	34.72	96.08
		week 5	29.700	15.302	.057	-9.98	60.38

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี Post Hoc Tests พบว่า

- ความยาวของเมตาเซอรัคคาเรีย สัปดาห์ 1 มีความแตกต่างกับทุกสัปดาห์ (สัปดาห์ 2, 3, 4, 5 และ 6) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P < 0.000$)
- ความยาวของเมตาเซอรัคคาเรีย สัปดาห์ 2 มีความแตกต่างกับสัปดาห์ที่ 1 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P < 0.000$) และสัปดาห์ที่ 3, 4 และ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ
- ความยาวของเมตาเซอรัคคาเรีย สัปดาห์ 3 มีความแตกต่างกับสัปดาห์ที่ 1 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P < 0.000$) และสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ
- ความยาวของเมตาเซอรัคคาเรีย สัปดาห์ 4 มีความแตกต่างกับสัปดาห์ที่ 1 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P < 0.000$) และสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 5 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ
- ความยาวของเมตาเซอรัคคาเรีย สัปดาห์ 5 มีความแตกต่างกับสัปดาห์ที่ 1, 4 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P < 0.000$) และสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ
- ความยาวของเมตาเซอรัคคาเรีย สัปดาห์ 6 มีความแตกต่างกับทุกสัปดาห์ (สัปดาห์ 1, 2, 3, 4 และ 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($P < 0.000$)



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางภาพร ภูติปิยสวัสดิ์
วัน เดือน ปี เกิด	3 สิงหาคม 2533
สถานที่เกิด	ลำปาง
วุฒิการศึกษา	พ. ศ. 2543 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนวัดเทวราชกุญชร จังหวัดกรุงเทพฯ พ. ศ. 2551 ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนมัธยมวัดนายโรง จังหวัดกรุงเทพฯ พ. ศ. 2555 ระดับปริญญาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	131/26 หมู่ที่ 19 แขวงศาลาธรรมสพน์ เขตทวีวัฒนา จังหวัด กรุงเทพฯ 10170

