

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของพยาธิใบไม้ <i>Haplorchis taichui</i> และ <i>H. pumilio</i> ในหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางจากภาคเหนือของประเทศไทย และการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีนไซโตโครม ซี ออกซิเดส	
ผู้เขียน	นายฐาปนา ชลธนานารถ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ รศ.ดร. ดวงเดือน ไกรลาส ผศ.ดร. สิริวิดี ชมเดช Prof. Dr. Jong Yil Chai	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียชนิด *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยหอยน้ำจืดฝาเดียวถูกเก็บจากจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 64 จุดเก็บตัวอย่าง จาก 12 จังหวัดในภาคเหนือของประเทศไทย ระหว่างเดือนเมษายน 2553 ถึงเดือนมิถุนายน 2555 ประกอบด้วย จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง พะเยา แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน สุโขทัย ตาก อุตรดิตถ์ และ พิษณุโลก และศึกษาค่าความชุกของการติดพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยฝาเดียวโดยวิธี crushing ผลการศึกษาพบว่า หอยจำนวน 4,533 ตัวถูกจัดจำแนกออกเป็น 8 วงศ์ 15 สกุล และ 21 ชนิดพันธุ์ ประกอบด้วย *Adamietta housei* 65 ตัว, *Bithynia funiculata* 179 ตัว, *B. siamensis siamensis* 561 ตัว, *Brotia costula costula* 7 ตัว, *Br. citrina* 112 ตัว, *Br. wykoffi* 7 ตัว, *Clea helena* 195 ตัว, *Eyriesia eyriesi* 38 ตัว, *Filopaludina doliaris* 168 ตัว, *F. martensi martensi* 562 ตัว, *F. sumatrensis polygramma* 102 ตัว, *F. sumatrensis speciosa* 31 ตัว, *Indoplanorbis exustus* 278 ตัว, *Lymnaea auricularia rubiginosa* 219 ตัว, *Makongia swainsoni* 4 ตัว, *Melanoides tuberculata* 1,036 ตัว, *Paludomus siamensis* 8 ตัว, *Pomacea canaliculata* 7 ตัว, *Tarebia granifera* 756 ตัว, *Thiara scabra* 189 ตัว, และ *Sinotaia mandahlbarthi* 9 ตัว โดยหอยในวงศ์ Thiaridae สามารถพบ

ได้ในทุกจังหวัด ค่าความชุกชุมของการติดพยาธิในหอยฝาดียวจำนวน 644 ตัว ในหอย 12 ชนิด เท่ากับ 14.65 % ซึ่งพบเชอร์คาเรียทั้งหมด 14 รูปแบบ ได้แก่ distome cercaria, cercariae, gymnocephalous cercaria, megalurous cercaria, monostome cercaria, ophthalmoxiphidiocercaria, parapleurolophocercous cercaria Type I, parapleurolophocercous cercaria Type II, parapleurolophocercous cercaria Type III, pleurolophocercous cercaria, furcocercous cercaria Type I, furcocercous cercaria Type II, xiphidiocercaria, และ virgulate cercaria โดยที่เชอร์คาเรีย รูปแบบ parapleurolophocercous cercaria Type I และ xiphidiocercaria มีการกระจายตัวสูง สามารถพบได้ในทุกจังหวัดและมีความจำเพาะต่อการติดเชื้อในหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางต่ำ จากการศึกษารูปการติดเชื้อของเชอร์คาเรียในหอยฝาดียวแสดงให้เห็นว่าจังหวัดเชียงใหม่เป็นจังหวัดที่มีความหลากหลายของเชอร์คาเรียสูง (13 รูปแบบ) ตามด้วย จังหวัดลำพูน แม่ฮ่องสอน และ ลำปาง (7 รูปแบบ) จังหวัดอุดรดิตถ์ (6 รูปแบบ) จังหวัดเชียงราย ตาก พะเยา และพิษณุโลก (3 รูปแบบ) จังหวัดสุโขทัย และน่าน (3 รูปแบบ) และจังหวัดแพร่ (2 รูปแบบ) ตามลำดับ โดยที่ จังหวัดเชียงใหม่มีค่าความชุกของการติดเชอร์คาเรียสูงที่สุด ตามด้วยจังหวัด ลำปาง ลำพูน พิษณุโลก อุดรดิตถ์ แม่ฮ่องสอน ตาก แพร่ น่าน เชียงราย พะเยา และ สุโขทัย ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาด้านอนุชีววิทยา ไพร์เมอร์จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ชนิด *H. taichui* และ *H. pumilio* ถูกออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไมโทคอนเดรีย ไซโตโครม ซี ออกซิเดส (mtCOI) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังต่อไปนี้ HT-F (5' GTT-TGG-TTA-TGG-GGG-TTT-AGT-TCT-T 3'), HT-R (5' AAC-CTT-TAT-ACC-TGT-GGG-GAC-T 3') สำหรับ *H. taichui* ได้ผลผลิต PCR ขนาด 160 คู่เบส มีความไวที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดคือ 0.45 ng/ μ l ส่วน HP-F (5' GGA-TGT-AAA-GAC-GGC-TGT-GTT-CTT-C 3'), และ HP-R (5' TAG-GAT-CTC-AAA-ATC-GTC-TA 3') สำหรับ *H. pumilio* ได้ผลผลิต PCR ขนาด 125 คู่เบส มีความไวที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดคือ 1.81 ng/ μ l เมื่อนำไพร์เมอร์จำเพาะทั้งสองที่ ออกแบบได้ไปทดสอบกับ ตัวอย่างพยาธิ 10 ชนิด พบว่า สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 160 คู่เบสในตัวอย่างพยาธิใบไม้ *H. taichui* และ 125 คู่เบสในตัวอย่างพยาธิใบไม้ *H. pumilio* เพียงแถบเดียว และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ เมื่อนำไพร์เมอร์จำเพาะทั้งสองคู่ไปทดสอบร่วมกันในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เดียวกัน (multiplex PCR) พบว่าสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 160 และ 125 คู่เบส ในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอทั้งสองชนิด

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิด (species – specific PCR) ได้ถูกนำมาใช้เพื่อการ ตรวจสอบการติดเชอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ของ *H. taichui* และ *H. pumilio* ผลการศึกษาพบว่า หอยฝาดียวในวงศ์ Thiaridae (*M. tuberculata*, *T. granifera* และ *Th. scabra*) เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัว

หนึ่งของพยาธิใบไม้ *H. taichui* ในขณะที่ *H. pumilio* พบในหอย *M. tuberculata* และ *T. granifera* เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า *parapleurolophocercous cercaria* Type I เท่านั้นที่ถูกตรวจสอบเป็น *H. taichui* และ *H. pumilio* โดย *H. taichui* มีการกระจายตัวสูงในภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง พะเยา แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ตาก อุตรดิตถ์ และ พิษณุโลก ส่วน *H. pumilio* พบที่จังหวัดตาก และพิษณุโลกเท่านั้น สำหรับการศึกษาการกระจายตัว พบว่าค่าความชุกพยาธิใบไม้ *H. taichui* ระยะเซอร์คาเรียมีความสูงกว่าพยาธิใบไม้ *H. pumilio*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI สามารถใช้สำหรับศึกษาความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทาง สัณฐานวิทยา และชนิดของโฮสต์กึ่งกลางตัว

ดังนั้นการศึกษาศถานะการระบาดของการติดเชื้อเซอร์เรียในหอยฝ้ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย ควรจะดำเนินการบนพื้นฐานของข้อมูลที่ได้จากการสำรวจในพื้นที่ขนาดใหญ่ นอกจากนี้การศึกษารุ่นนี้ได้้นำวิธีการทางอณูชีววิทยาเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบการกระจายตัวของพยาธิใบไม้ *H. taichui* และ *H. pumilio* ซึ่งจะให้ข้อมูลล่าสุดในด้านการกระจายตัวของ การติดเชื้อพยาธิใบไม้ *H. taichui* และ *H. pumilio* และการพัฒนาแผนการควบคุมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Thesis Title	Geographic Distribution of Trematodes, <i>Haplorchis taichui</i> and <i>H. pumilio</i> in Intermediate Host Snail from Northern Thailand and Development of Specific Primers for Cytochrome C Oxidase Gene		
Author	Mr. Thapana Chontanarith		
Degree	Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)		
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Chalobol Wongsawat	Advisor	
	Assoc. Prof. Dr. Duangduen Krailas	Co-advisor	
	Asst. Prof. Dr. Siriwadee Chomdej	Co-advisor	
	Prof. Dr. Jong Yil Chai	Co-advisor	

Abstract

This study was aimed to investigate the cercarial stage of *Haplorchis taichui* and *H. pumilio* distribution from northern Thailand. Total freshwater snails were collected from 64 sampling sites during April 2010 – June 2012 from 12 provinces of northern Thailand including, Chiang Rai, Chiang Mai, Lamphun, Lampang, Phayao, Mae Hong Son, Phrae, Nan, Sukhothai, Tak, Uttaradit, and Phitsanulok. The prevalence of cercarial infection snails was investigated using the crushing method. The results showed that, total number of 4,533 snail specimens were classified into 8 families, 15 genera and 21 species/taxa, including 65 *Adamietta housei*, 179 *Bithynia funiculata*, 561 *B. siamensis siamensis*, 7 *Brotia costula costula*, 112 *Br. citrina*, 7 *Br. wykoffi*, 195 *Clea helena*, 38 *Eyriesia eyriesi*, 168 *Filopaludina doliaris*,

562, *F. martensi martensi*, 102 *F. sumatrensis polygramma*, 31 *F. sumatrensis speciosa*, 278 *Indoplanorbis exustus*, 219 *Lymnaea auricularia rubiginosa*, 4 *Makongia swainsoni*, 1,036 *Melanooides tuberculata*, 8 *Paludomus siamensis*, 7 *Pomacea canaliculata*, 756 *Tarebia granifera*, 189 *Thiara scabra*, and 9 *Sinotaia mandahlbarthi*. The snail in family Thiariidae was represents in all provinces.

The overall prevalence of the infected 664 snail specimens of 12 snail species was 14.65%, which infected with 14 separated triads of cercariae including distome cercaria, cercariae, gymnocephalous cercaria, megalurous cercaria, monostome cercaria, ophthalmoxiphidiocercaria, parapleurolophocercous cercaria Type I, parapleurolophocercous cercaria Type II, parapleurolophocercous cercaria Type III, pleurolophocercous cercaria, furcocercous cercaria Type I, furcocercous cercaria Type II, xiphidiocercaria, and virgulate cercaria. The parapleurolophocercous cercaria Type I and xiphidiocercaria are wildly distribution, which it could be found in all provinces with low specificity of infection in intermediate host snails. The cercarial infection in freshwater snails was indicated that the Chiang Mai province has many diverse of cercarial types (13 types), followed by Lamphun, Mae Hong Son and Lampang (7 types), Uttaradit (6 types), Chiang Rai Tak, Phayoa and Phitsanulok (4 types), Sukhothai and Nan (3 Types), and Phrae (2 types), respectively. Chiang Mai province showed the highest prevalence of cercarial infection than other provinces followed by Lampang, Lamphun, Phitsanulok. Uttaradit, Mae Hong Son, Tak, Phrae, Nan, Chiang Rai, Phayao, and Sukhothai, respectively.

For the molecular study, the specific primers of *H. taichui* and *H. pumilio* were designed from the sequence of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mtCOI) for accuracy identification. The sequence of both specific primers were

shown as follow; HT-F (5' GTT-TGG-TTA-TGG-GGG-TTT-AGT-TCT-T 3'), HT-R (5' AAC-CTT-TAT-ACC-TGT-GGG-GAC-T 3') for *H. taichui* (product size 160 bp), HP-F (5' GGA-TGT-AAA-GAC-GGC-TGT-GTT-CTT-C 3'), and HP-R (5' TAG-GAT-CTC-AAA-ATC-GTC-TA 3') for *H. pumilio* (product size 125 bp). For the sensitivity test, *H. taichui* specific primer could be amplify the minimum concentration of DNA template which is 0.45 ng/μl. While the *H. pumilio* specific primer could amplify the minimum DNA template concentration at 1.18 ng/μl. For specific proof, these primers were manipulated for specific amplification using all 9 trematode species which mostly found the northern of Thailand. The 160 bp PCR products was specifically generated in *H. taichui* as same as the 125 bp PCR product which was specifically found in *H. pumilio* with no cross reaction with other trematodes. These both of specific primers were confirmed the specificity through multiplex PCR reaction and which it was generated just both PCR products (160 and 125 bp) in mix DNA template.

The species –specific PCR were performed to accurate the identification of cercarial of *H. taichui* and *H. pumilio* infection in freshwater snails. The result showed that, snail Family Thiaridae (*M. tuberculata*, *T. granifera* and *Th. scabra*) are the intermediate hosts of *H. taichui*. Whilst, the *H. pumilio* were infected in two snail species including *M. tuberculata* and *T. granifera*. There was only the parapleurolophocercous cercaria Type I which was detected as *H. taichui* and *H. pumilio*. Moreover, *H. taichui* widely distribute in northern Thailand including Chiang Rai, Chiang Mai, Lamphun, Phayao, Mae Hong Son, Phrae, Nan, Tak, Uttaradit and Phitsanulok provinces. Whereas, *H. pumilio* were found only in Tak and

Phitsanulok provinces. For the distribution study, the prevalence of cercarial stage of *H. taichui* infection in snails from northern Thailand was higher than the *H. pumilio*.

The mtCOI sequences could be utilized for the study of phylogenetic relationship of heterophyid trematodes. The phylogenetic tree showed three clades of heterophyid trematodes according to systematic criteria and intermediate host species.

Hence, a study of the epidemiological situation of cercarial infection in freshwater snails in northern Thailand should be carried out based on the original data from a large scale survey of cercaria infections. Furthermore, this study has applied the molecular biology approach to determine the distribution of *H. taichui* and *H. pumilio* which is the first step to provide new information on the latest distribution of trematode infection and development of the effective control program of *H. taichui* and *H. pumilio* in northern Thailand.