

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การระบุชนิดเชิงโมเลกุล และการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของพยาธิ
กลุ่ม Echinostomes ที่ติดเชื่อในหอยขม *Filopaludina* spp.

ผู้เขียน นางสาวราภรณ์ น้อยโง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษา รศ.ดร.ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อ.ดร.สุภาพ แส่นเพชร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof.Dr.Jong-Yil Chai อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การติดเชื่อพยาธิใบไม้ลำไส้ในคน และสัตว์ ส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากพยาธิใบไม้วงศ์ Echinostomatidae ที่ติดเชื่อจากกระดองเมตาเซอร์คาเรีย ซึ่งเป็นระยะติดต่อที่พบในกลุ่มหอยขมน้ำจืดซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลาง ตัวที่สอง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเมตาเซอร์คาร์เรียของ echinostome ที่ติดเชื่อในหอยน้ำจืดในธรรมชาติ ด้วยเทคนิค high annealing temperature-random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD), Internal Transcribed Spacer 2 region (ITS2) and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (ND1) ยีน และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ HAT-RAPD, ITS2 และ ND1 ของเมตาเซอร์คาเรียของ echinostome ในจังหวัดลำพูน ขณะเดียวกันนี้ยังศึกษาระบาดวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียของ echinostome ที่ติดเชื่อในหอยขม *Filopaludina* spp. ที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง และตรวจสอบจุลพยาธิวิทยาของหอยขม *Filopaludina* sp. ที่ติดเชื่อเมตาเซอร์คาเรีย echinostome ด้วยวิธี Periodic Acid Schiff's (PAS), Alcian Blue, and Calcium Cobalt

การจัดจำแนกเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้กลุ่ม echinostomes ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด คือ *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma malayanum* และ *Euparyphium albuferensis* ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน ITS2 และ ND1 พบว่าเมตาเซอร์คาเรียจากอำเภอเมือง อำเภอป่าซาง อำเภอลี้ อำเภอบ้านโฮ่ง อำเภอทุ่งหัวช้าง และอำเภอเวียงหนองล่องเป็น *E. revolutum* ในขณะที่เมตาเซอร์คาเรียจากอำเภอบ้านธิเป็น *E. malayanum* และเมตาเซอร์คาเรียจากอำเภอแม่ทาเป็น *Euparyphium albuferensis* นอกจากนี้การศึกษาด้วยวิธี HAT-RAPD PCR ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกัน

การศึกษาระบาดวิทยาระยะเมตาเซอร์คาเรียของ echinostomes ที่พบในหอยขม 2 ชนิดคือ *Filopaludina dorliaris* และ *F. martensi martensi* พบว่าความชุก (prevalence) และความหนาแน่น (intensity) ของการติดเชื้อในแต่ละฤดูมีความแตกต่างกัน โดยฤดูฝนมีความชุกสูงที่สุดเท่ากับ 46.01% รองลงมาคือฤดูร้อนมีค่าเท่ากับ 37.42% และต่ำที่สุดในฤดูหนาวมีค่าเท่ากับ 35.99% สำหรับความหนาแน่นในฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว มีค่าเท่ากับ 26.49 20.63 และ 14.89 ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อของหอยขมที่ติดพยาธิใบไม้ echinostomes พบว่าเนื้อเยื่อของหอยขมที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้โดยเฉพาะเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดกับเมตาเซอร์คาเรียถูกทำลาย สังเกตได้จากการหายไปของเนื้อเยื่อ และทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ในตำแหน่งที่พบเมตาเซอร์คาเรีย การตรวจสอบไกลโคเจนในเนื้อเยื่อของหอยขมด้วยวิธี PAS พบว่าเนื้อเยื่อของหอยขมที่พบเมตาเซอร์คาเรียมีปริมาณไกลโคเจนน้อยกว่าเนื้อเยื่อของหอยขมที่ไม่ติดเชื้อ การตรวจสอบ acid mucopolysaccharide ด้วยวิธี alcian blue พบ acid mucopolysaccharide เฉพาะในเนื้อเยื่อของหอยขมทั้งในหอยที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ แต่ไม่พบในเมตาเซอร์คาเรีย และการตรวจสอบ alkaline phosphatase ด้วยวิธี calcium cobalt ในเนื้อเยื่อของหอยขมพบ alkaline phosphatase ในหอยขมทั้งสองกลุ่ม

Thesis Title Molecular Identification and Histopathological Alteration of Echinostomes Infected in *Filopaludina* spp.

Author Miss Waraporn Noikong

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Chalobol Wongsawad Advisor
Lect.Dr. Supap Saenphet Co-advisor
Prof.Dr.Jong-Yil Chai Co-advisor

ABSTRACT

The intestinal trematode infections in human and animal are partly caused by family Echinostomatidae. This infected by metacercaria which is the infective stage which can be found in freshwater snails as second intermediate host. This study aims to identify species of echinostome metacercaria infected in natural freshwater snail based on high annealing temperature-random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD), Internal Transcribed Spacer 2 region (ITS2) and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (ND1) gene sequences, and to investigate the phylogenetic relationships among echinostomes using HAT-RAPD markers, ITS2, and ND1 gene sequences of echinostome metacercaria in Lamphun Province. Furthermore, to study the epidemiology of echinostome metacercariae infected in *Filopaludina* sp. snail intermediate hosts. Moreover, to examine the histopathology in snail, *Filopaludina* sp. infected with *Echinostoma* sp. using Periodic Acid Schiff's (PAS), Alcian Blue, and Calcium Cobalt staining techniques.

The identification of echinostome metacercaria in this study based on their morphology can be divided to three species as *Echinostoma revolutum*, *E. malayanum*, and *Euparyphium albuferensis*. This showed complementarily result of the molecular technique investigation by using nucleotide sequences of ITS2 and ND1. The result indicated the metacercaria from Mueang, Pa Sang, Li, Ban Hong, Thung Hua Chang, and Wiang Nong Long district as *E. revolutum*, while metacercaria from Ban Thi district as *E. malayanum* and metacercaria from Mae Tha district as *Euparyphium albuferensis*. Moreover, the investigation by using HAT-RAPD PCR showed the same result.

The epidemiological study of echinostome metacercaria was found in two snail species; *Filopaludina dorliaris* and *F. martensi martensi*. The result showed difference between season of the prevalence and intensity. The highest prevalence presented in rainy season was 46.01%, followed the hot-dry season was 37.42% and the lowest in cool-dry season was 35.99%. The intensity in hot-dry, rainy, and cool-dry season were 26.49, 20.63, and 14.89, respectively.

The histopathological study of snail tissue infected with echinostome metacercaria was investigated. The result showed that the snail tissue infected with echinostome metacercaria especially tissue nearby the metacercaria was destroyed, observed by tissue loosed and presented the big portal space. The glycogen in snail tissue was determined by PAS technique. The result indicated the snail tissue infected with metacercaria has less glycogen than tissue of uninfected snail. The alcian blue used for detect the acid mucopolysaccharide, this presented acid mucopolysaccharide both uninfected and infected snail tissue, but not in metacercaria. The alkaline phosephatase in snail tissue was detected by calcium cobalt method, demonstrating alkaline phosphatase in both snail tissues.