

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ระบาดวิทยา ชีวิตประวัติและการระบุเชิงโมเลกุลของพยาธิใบไม้
Echinostoma spp. ในจังหวัดเชียงใหม่

ผู้เขียน นายกิตติชัย จันธิมา

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ. ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	Prof. Dr. Jong Yil Chai	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ทำการระบุชนิด ศึกษาค่าความชุกและความหนาแน่นของพยาธิใบไม้กลุ่ม echinostome ในระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) ในหอยน้ำจืด จาก 10 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2554 ถึงเดือนตุลาคม 2555 จากการตรวจหอยทั้งหมด 10,692 ตัว ประกอบด้วยหอยทั้งหมด 12 ชนิด โดยพบหอย 7 ชนิด ที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้กลุ่ม echinostome ในระยะเมตาเซอร์คาเรีย ประกอบด้วย *Clea helena*, *Eyriesia eyriesi*, *Bithynia funiculata*, *B. siamensis siamensis*, *Filopaludina doliaris*, *F. sumatrensis polygramma* และ *F. martensi martensi* ทำการทดลองป้อนเมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากการสำรวจในหนูแฮมสเตอร์และไก่ และตรวจหาตัวเต็มวัย (adult) โดยตัวอย่างของพยาธิใบไม้ที่ได้สามารถจัดจำแนกและระบุชนิดเป็น *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) Looss, 1899 ซึ่งพบมีการติดเชื้อบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจของหอยทั้งหมด 41,909 เมตาเซอร์คาเรีย โดยมีค่าความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 16.2 (1.2-131.0) ต่อหอยหนึ่งตัว พบค่าความชุกสูงในหอยกลุ่ม *Filopaludina* spp. (55.7-63.1%) รองลงมาคือ *E. eyriesi* (16.4%), *B. funiculata* (6.8%), *B. siamensis siamensis* (2.6%) และ *C. helena* (1.0%) ค่าความชุกและความหนาแน่นของ *E. revolutum* ระยะเมตาเซอร์คาเรียใน 10 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ตลอด 3 ฤดูกาลในรอบ 1 ปี พบหอยจำนวน 2,586 ตัว มีการติดเชื้อ *E. revolutum* ระยะเมตาเซอร์คาเรียจากหอยทั้งหมด 10,692 ตัว โดยพบค่าความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุดในอำเภอดอยสะเก็ด (28.8 เมตาเซอร์คาเรียต่อหอยหนึ่งตัว) และค่าความชุกสูงสุดพบในอำเภอสันทรายมีค่าเท่ากับ 48.5% (633/1,304) ค่าความชุกรวมจากการ

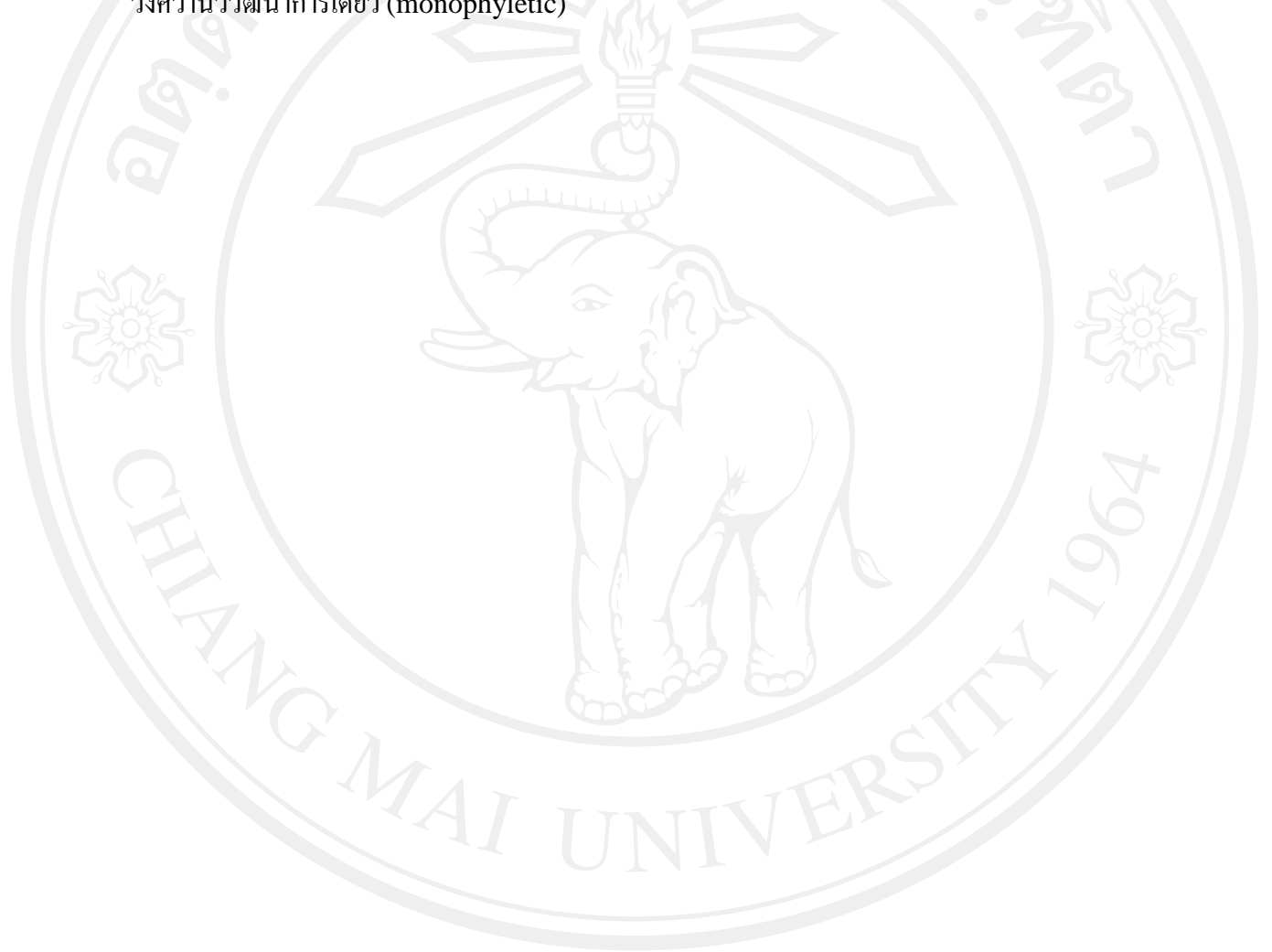
สำรวจใน 10 อำเภอ พบมีค่าสูงในฤดูฝนและฤดูร้อน มีค่าเท่ากับ 26.9% และ 26.54% ตามลำดับ และพบต่ำในฤดูแล้งด้วยค่าความชุก 19.1%

ศึกษาลักษณะเฉพาะทางชีววิทยาและสัณฐานวิทยาของ *E. revolutum* ภายใต้สภาวะทดลอง การศึกษาวงชีวิตของพยาธิชนิดนี้เริ่มจากป้อนตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในไก่ (*Gallus gallus domesticus*) และศึกษาการพัฒนาของระยะตัวเต็มวัย (adult) พบค่าการติดพยาธิในโฮสต์ (incidence) เท่ากับ 60.0% (36/60) และค่าเฉลี่ยของ recovery rate เท่ากับ 27.1% พยาธิสามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยที่มีไข่ (ovigerous adult) ในวันที่ 10 สามารถตรวจพบไข่ในอุจจาระของไก่ครั้งแรกในวันที่ 10 หลังการป้อนพยาธิ ไข่สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะไมราซีเดียม (miracidium) ได้สมบูรณ์ในวันที่ 10 จากนั้นจึงฟักออกจากไข่ เมื่อไมราซีเดียมฟักออกจากไข่สมบูรณ์แล้วทำการทดลองติดเชื้อกับหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 (*F. doliaris* และ *F. martensi martensi*) หลังจากการทดลอง 7 วัน ตรวจพบตัวอ่อนระยะสปอร์โรซิส (sporocyst) ในหอย โดยเจริญอยู่ในส่วน ventricle cavity ของหัวใจ จากนั้นเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะเรเดีย (redia) 2 ระยะคือ มัธเซอร์เรเดีย (mother redia) และคอตเตอร์เรเดีย (daughter redia) และระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) โดยที่ระยะมัธเซอร์เรเดีย สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 16 หลังการทดลอง และตรวจพบคอตเตอร์เรเดียในวันที่ 60 หลังการทดลอง สำหรับเซอร์คาเรียนั้นสามารถตรวจพบได้ครั้งแรกในวันที่ 60 หลังการทดลอง แต่โดยส่วนใหญ่แล้วตรวจพบจำนวนมากในช่วงวันที่ 62-65 หลังการทดลอง จากนั้นทำการทดลองติดเชื้อในหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 (*F. doliaris* และ *F. martensi martensi*) โดยทำการเลี้ยงเซอร์คาเรียร่วมกับหอย สามารถตรวจพบซิสต์เมตาเซอร์คาเรีย (encysted metacercaria) บริเวณเยื่อหุ้มหัวใจในวันที่ 2 หลังการทดลอง วงชีวิตทั้งหมดของ *E. revolutum* ใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 80-83 วัน จากระยะเมตาเซอร์คาเรียไปจนถึงระยะเมตาเซอร์คาเรียอีกครั้ง

ทำการพัฒนา loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay ในการตรวจสอบ *E. revolutum* โดยประเมินความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายบริเวณ internal transcribed spacer subunit 2 (ITS2) ของ *E. revolutum* LAMP assay สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *E. revolutum* อย่างจำเพาะ ในขณะที่พยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ ที่ใช้เปรียบเทียบ ไม่สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ LAMP assay มีความไวสูงเมื่อเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) โดยสามารถตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเพียง 10^{-6} ng/ μ l และทำการตรวจสอบ *E. revolutum* ระยะเมตาเซอร์คาเรียจากหอยที่มีการติดเชื้อในธรรมชาติจากพื้นที่ที่มีการระบาดโดย LAMP assay

ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *E. revolutum* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 และ nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (ND1) gene ระหว่างสาย

พันธุ์ต่างๆ จากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ประกอบด้วย ไทย สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชาและเวียดนาม) ร่วมกับสายพันธุ์อื่นที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 และ ND1 ที่ได้จากสายพันธุ์ต่างๆ แสดงให้เห็นถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ จากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผังวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 และ ND1 ที่ได้จากวิธีการ neighbor joining แสดงให้เห็นถึงผังวิวัฒนาการที่คล้ายคลึงกัน โดย *E. revolutum* และ *Echinostoma* ในกลุ่ม 37-collar spined มีการจัดเรียงของผังวิวัฒนาการแบบวงศำวนวิวัฒนาการเดี่ยว (monophyletic)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Epidemiology, Life History and Molecular Identification of Trematodes, *Echinostoma* spp. in Chiang Mai Province

Author Mr. Kittichai Chantima

Degree Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)

Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Chalobol Wongsawad Advisor
Prof. Dr. Jong Yil Chai Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Somboon Anantalabhochai Co-advisor

ABSTRACT

The present study was carried out for species identification, prevalence and intensity of echinostome metacercariae in freshwater snails collected from 10 districts, Chiang Mai Province from November 2011 to October 2012. A total of 10,692 snails were identified into 12 species, 7 snail species (*Clea helena*, *Eyriesia eyriesi*, *Bithynia funiculata*, *B. siamensis siamensis*, *Filopaludina doliaris*, *F. sumatrensis polygramma*, and *F. martensi martensi*) were found infected with echinostome metacercariae. Metacercariae were experimentally fed to hamsters and domestic chicks, and adult flukes were recovered from both hosts. The specimens were identified as *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) Looss, 1899. A total of 41,909 *E. revolutum* metacercariae were found in the pericardial sac of infected snails, with a mean intensity of 16.2 (1.2-131.0) metacercaria per snail. The highest prevalence of metacercariae was observed in *Filopaludina* spp. (55.7-63.1%) followed by *E. eyriesi* (16.4%), *B. funiculata* (6.8%), *B. siamensis siamensis* (2.6%), and *C. helena* (1.0%). The prevalence and intensity of *E. revolutum* metacercariae in 10 districts of Chiang Mai Province during 3 seasons for one year-round, revealed that 2,586 of the 10,692 freshwater snails were infected with *E. revolutum* metacercariae. The highest mean intensity of *E. revolutum* metacercariae infection was in Doi Saket district (28.8 metacercaria per snail). The highest prevalence was found in San Sai district, 48.5% (633/1,304). An overall prevalence in 10 districts was

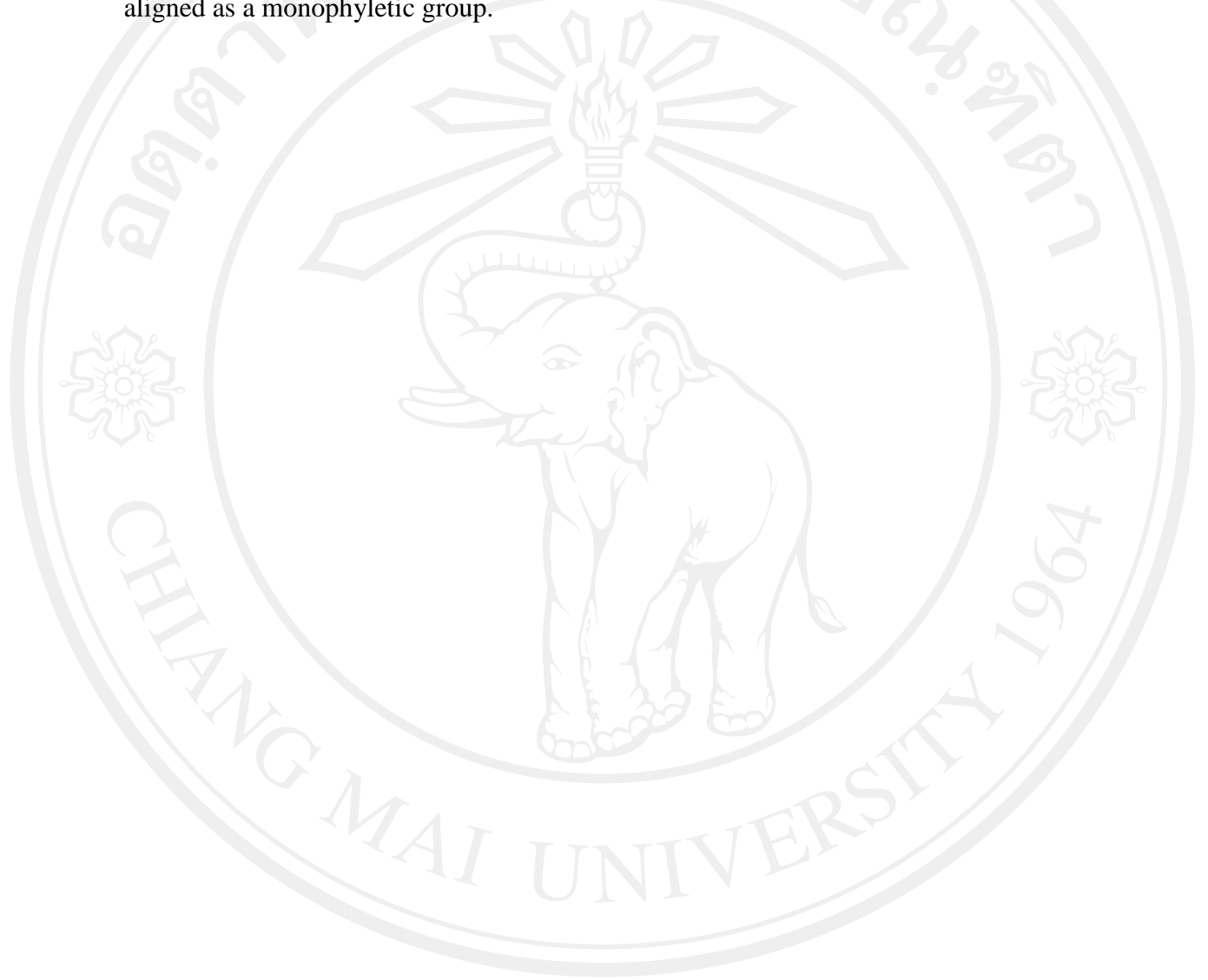
highest in the rainy and hot-dry seasons with 26.9% and 26.54%, respectively and lowest in the cool season at 19.1%.

The biological characteristics and morphology of *E. revolutum* were studied under laboratory conditions. The life cycle of this fluke was initially investigated by orally force-feeding metacercariae to domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*) and then examining for development of adult flukes. The incidence of infection in experimental chicks was 60.0% (36/60), with a recovery rate of worm were 27.1% on average. The worms became ovigerous by day 10 and produced eggs which were detected in feces as early as 10 days post-infection (PI). Eggs developed fully formed miracidia after 10 days and emerged later. Experimental infections of the first intermediate host snails (*F. doliaris* and *F. martensi martensi*) with miracidium were taken after complete hatching of the eggs. After 7 days PI, sporocysts were observed in the snails which developed in the ventricle cavity of the heart. The snails were infected with the larval stages, two generations of rediae, mother rediae, daughter rediae, and cercariae developed. The mother rediae were recorded in snails examined 16 days PI, 60 days PI for daughter rediae and cercariae may first escape from snails 60 days PI, but usually at 62-65 days. The second intermediate hosts (*F. doliaris* and *F. martensi martensi*) were infected with cercariae by keeping them together. Encysted metacercariae were found clumped together in the pericardial sac at day 2 PI. The life cycle of *E. revolutum* takes at least 80-83 days, i.e. from metacercaria to metacercaria.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was established to detect *E. revolutum*. The specificity and sensitivity of primers designed to the target of internal transcribed spacer subunit 2 (ITS2) in nuclear ribosomal DNA of *E. revolutum* was evaluated. LAMP assay specifically amplified *E. revolutum*, while no amplification products were detected with heterologous controls. LAMP assay had a high level of sensitivity comparable with conventional polymerase chain reaction and had a detection limit of 10^{-6} ng/ μ l of genomic DNA. LAMP assay for detection of *E. revolutum* metacercariae from naturally infected snails in an epidemic area was observed.

DNA sequencing of the ITS2 and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (ND1) gene was used to determine the phylogenetic relationships of *E. revolutum* between isolates from Southeast Asia (including Thailand, Lao PDR,

Cambodia, and Vietnam) with other isolates available from GenBank database. The ITS2 and ND1 sequences data of *E. revolutum* derived from different regions of Southeast Asia showed the variation among isolates. The ITS2 and ND1 gene trees obtained by neighbor joining method showed that the topology is similar among the trees obtained. The results revealed that *E. revolutum* and other *Echinostoma* species of 37-collar spined group were aligned as a monophyletic group.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved