

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ชีวประวัติ และการตรวจสอบเชิงโมเลกุลของพยาธิใบไม้ตับ  
ขนาดใหญ่ *Fasciola gigantica* ในจังหวัดเชียงใหม่

ผู้เขียน

นายอนวัทย์ ผาดี

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

(ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

รศ. ดร. ชโลบล

วงศ์สวัสดิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ดร. อานาจ

โรจนไพบูลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Prof. Dr. Jong Yil Chai

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

*Fasciola gigantica* เป็นพยาธิใบไม้ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อตับของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และคน ทำให้เกิดปัญหาต่อผลผลิตของสัตว์เลี้ยงในฟาร์ม การศึกษาครั้งนี้ได้ดำเนินการตรวจสอบชีวประวัติ ความชุกของการติดเชื้อ ทั้งในระยะตัวเต็มวัย และตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ *F. gigantica* ในท้องที่จังหวัดเชียงใหม่ การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาถูกนำมาใช้ในการพัฒนาไพรเมอร์แบบจำเพาะโดยใช้เทคนิค high-annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) เพื่อใช้ตรวจสอบชนิดของ *F. gigantica* และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *F. gigantica* ที่พบในท้องที่จังหวัดเชียงใหม่โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน internal transcribed spacer subunit 2 (ITS-2) ชีวประวัติของ *F. gigantica* อย่างสมบูรณ์ นับเป็นการศึกษาครั้งแรกในหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง และการเข้าชีสต์ ระยะเมตาเซอร์คาเรียบนต้นข้าว และศึกษาการพัฒนาระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ *F. gigantica* ในหนูแฮมสเตอร์แคระ (*Phodopus campbelli*) และหนูถีบจักรขาว (*Mus musculus*) ผลการศึกษาพบว่าไข่ของพยาธิพัฒนา

เป็นไข่ที่มีระยะไมราซิเดียมเจริญเต็มที่ และเริ่มฟักออกจากไข่ในวันที่ 11 ขณะที่วันที่ 12 ไมราซิเดียมจะฟักออกจากไข่มากที่สุด จากนั้นไมราซิเดียมจะว่ายน้ำเพื่อหาหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง และไขเข้าไปภายในลำตัวหอยอย่างรวดเร็ว หลังจากหอยติดเชื้อพบว่าไมราซิเดียมจะพัฒนาไปเป็นสปอร์โรซิสต์เรเดีย และเซอร์คาเรีย เมื่อเซอร์คาเรียพัฒนาอย่างเต็มที่แล้ว จะไขออกจากเรเดีย และหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางในวันที่ 39 ของการติดเชื้อ เซอร์คาเรียที่ออกจากหอยจะว่ายน้ำอย่างอิสระเพื่อหาดันข้าว เมื่อพบต้นข้าวจะเกาะกับต้นข้าวทันที และสร้างเปลือกมาหุ้มตัวเอง และเข้าซิสต์เป็นระยะเมตาเซอร์คาเรีย สำหรับการศึกษการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยของพยาธิภายในหนูแฮมสเตอร์แคระ และหนูถีบจักรขาว พบว่าเมตาเซอร์คาเรียจะออกจากซิสต์เป็นตัวเต็มวัย ระยะแรกในลำไส้ของสัตว์ทดลอง และในวันที่ 3 และ 6 ของการติดเชื้อพบพยาธิภายในลำไส้ของสัตว์ทดลอง ตั้งแต่วันที่ 9 ของการติดเชื้อ พบพยาธิในตับของสัตว์ทดลอง ขณะที่อุบัติการณ์ของการติดพยาธิ พบว่าทั้งในหนูแฮมสเตอร์แคระ และหนูถีบจักรขาว มีอัตราการติดเชื้อเท่ากับ 100% และอัตราการค้นพบพยาธิเฉลี่ยในหนูแฮมสเตอร์แคระ และหนูถีบจักรขาว เท่ากับ 36.00% และ 35.83% ตามลำดับ ในวันที่ 42 ของการติดเชื้อในสัตว์ทดลองพบไข่อ่อนภายในมดลูกของพยาธิ ซึ่งยืนยันได้ว่าเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *F. gigantea* ที่จากการทดลองสามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยภายในสัตว์ทดลองได้ อย่างไรก็ตามพบการตายของหนูแฮมสเตอร์แคระในวันที่ 45 ของการติดเชื้อ ขณะที่หนูถีบจักรขาวยังมีชีวิตอยู่ จนถึงวันที่ 48 ของการติดเชื้อ การศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการศึกษาชีวประวัติ การศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนภายในหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง และการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ *F. gigantea* ในสัตว์ทดลอง

ความชุก (prevalence) ของการติดพยาธิใบไม้ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัยในวัว-ควาย จากโรงฆ่าสัตว์ภายในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าอัตราการติดเชื้อรวมในควาย (*Bubalus bubalis*) และวัว (*Bos taurus*) มีค่าเท่ากับ 67.27% และ 52.94% ตามลำดับ และความชุกรวมของการติดพยาธิในอำเภอดอยสะเก็ด อำเภอเมืองเชียงใหม่ และอำเภอสันป่าตอง ในควายมีค่าเท่ากับ 81.25% , 62.50% และ 60.00% ตามลำดับ และในวัวมีค่าเท่ากับ 62.50% , 50.00% และ 47.06% ตามลำดับ สำหรับการศึกษาค้นคว้าการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรียในหอย พบทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ parapleurolophocercous cercaria pleurolophocercous cercaria, monostome cercaria, distome cercaria, xiphidio cercaria , echinostome cercaria, transversotrema cercaria และ furcocercous cercaria ความชุกรวมของการติดเชื้อระยะเซอร์คาเรียสูงที่สุดพบในอำเภอแม่แตง รองลงมาเป็นอำเภอจอมทอง และอำเภอแมริม มีค่าเท่ากับ 38.16%, 26.95% และ 23.53% ตามลำดับ ขณะที่อำเภอพร้าวมีค่าความชุกรวมต่ำที่สุด เท่ากับ 11.76% โดยพบการติดเชื้อของ parapleurolophocercous cercaria สูงที่สุด รองลงมาเป็น distome cercaria และ

monostome cercaria มีค่าเท่ากับ 8.65%, 5.88%, 5.19% ตามลำดับ ขณะที่ xiphidio cercaria และ tranversotrema cercaria มีความชุกต่ำสุด เท่ากับ 0.35% จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชอร์คาเรียที่เป็นตัวอ่อนของพยาธิ *F. gigantea* คือ gymnocephalus cercaria

การพัฒนาไพรเมอร์แบบจำเพาะด้วยเทคนิค HAT-RAPD PCR เพื่อนำมาตรวจสอบชนิดของพยาธิใบไม้ *F. gigantea* ในระยะตัวเต็มวัย และระยะตัวอ่อน ไพรเมอร์แบบจำเพาะที่ออกแบบได้ คือ FG-F (5'-TCC GTT CGT TTT CCC CTC TG-3') และ FG-R (5'-GGG TTT CGC CCA TAC AGG AT-3') ซึ่งไพรเมอร์นี้ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 235 คู่เบส ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพยาธิ *F. gigantea* และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างพยาธิชนิดอื่นๆ ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการเท่ากับ 50 พิโคกรัม แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์นี้มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบพยาธิ *F. gigantea* ทั้งในระยะไมราซีเดียม สปอร์โรซิสต์ เรเดีย เชอร์คาเรีย และเมตาเชอร์คาเรีย ขณะที่การตรวจสอบชนิดของพยาธิระยะเชอร์คาเรียในหอยจากการเก็บตัวอย่าง พบว่าไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างดีเอ็นเอของเชอร์คาเรีย แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์แบบจำเพาะที่พัฒนาขึ้นมานี้มีประโยชน์ในการตรวจสอบชนิดของพยาธิใบไม้ *F. gigantea* ทั้งในระยะตัวเต็มวัย และระยะตัวอ่อน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน ITS-2 ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) และ unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี ML และ UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มของพยาธิใบไม้ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มของพยาธิใบไม้ *F. gigantea* ทั้งหมดที่พบในจังหวัดเชียงใหม่ และฐานข้อมูล GenBank กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มของพยาธิใบไม้ *F. hepatica* ที่พบในฐานข้อมูล GenBank กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มของพยาธิใบไม้กระเพาะไส้จืดวัวควาย คือ *Orthocoelium streptocoelium*, *Fiscoederius elongatus* และ *Paramphistomum eplielitum* และกลุ่มที่ 4 คือกลุ่มของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก คือ *Haplorchis taichui*, *Stellantchasmus* sp., *Haplorchoides* sp. และพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ผลการศึกษานี้ยืนยันได้ว่าพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ที่เป็นสาเหตุของโรค fascioliasis ในเชียงใหม่เป็นพยาธิใบไม้ *F. gigantea* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน ITS-2 ได้รับ การพิสูจน์แล้วว่าเป็นส่วนที่มีประสิทธิภาพในจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ *F. gigantea*

**Thesis Title** Life History and Molecular Detection of Giant Liver Fluke, *Fasciola gigantica* in Chiang Mai Province

**Author** Mr. Anawat Phalee

**Degree** Doctor of Philosophy  
(Biodiversity and Ethnobiology)

**Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Chalobol Wongsawad	Advisor
Dr. Amnat Rojanapaibul	Co-advisor
Prof. Dr. Jong Yil Chai	Co-advisor

## ABSTRACT

*F. gigantica* is medically important trematodes which cause severely damages to the liver of ruminant hosts and human. It is a mainly problem on product of animal farms. This study was conducted to investigate the life history, prevalence of infection in adult and larval stages of *F. gigantica* from Chiang Mai province. While, the molecular biological study was used to develop a specific primer based on high-annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique for *F. gigantica* detection and the phylogenetic relationship of *F. gigantica* in Chiang Mai province and other related trematodes based on internal transcribed spacer subunit 2 (ITS-2) sequences was determined. The life history of *F. gigantica* has completely reported the first time in snail intermediate host and rice plants, while dwarf hamster (*Phodopus campbelli*) and albino mice (*Mus musculus*) were used as experimental definitive host for the maturation study. The results revealed that eggs were allowed to fully develop to become miracidium eggs and then began to hatch on day 11, while most had hatched on day 12 of post-incubation, free living miracidium searched and

penetrated in snail hosts rapidly and developed to become sporocyst, redia and cercaria. Fully-developed cercariae were separated from redia and shed from snails on day 39 of post-infection (PI). Free-swimming cercariae were immediately allowed to adhere to rice plants and capsules were constructed to protect metacercaria on the rice plants. A study of maturation stage of adult worms in dwarf hamster and albino mice revealed that metacercariae were excysted to young adult worms and recovered in intestine on days 3 and 6 PI, until day 9 PI when they could be found in liver of both hosts. The incidences of parasitic invasion of both hosts were 100% and average worm recovery rates were 36.00% and 35.83% in dwarf hamster and albino mice, respectively. In day 42 PI was found immature eggs in uterus of both hosts, indicated that the *F. gigantica* was maturely. Therefore, this confirmed that *F. gigantica* metacercariae that were derived from encystment experiment could infect host and develop to maturity. However, the dwarf hamsters were died on day 45 PI, while albino mice still alive in day 48 PI. The present study has successfully reported on the life history and developmental process of larval stages and adult worms in the experimental host.

The prevalence of *F. gigantica* adult worm infection in domestic cattle from slaughterhouses of Chiang Mai province was examined. The total prevalence of infection in *Bubalus bubalis* and *Bos taurus* were 67.27% and 52.94%, respectively. The respective prevalence in both *B. bubalis* and *Bos taurus* were acquired from Doi Saket, Mueang, and San Pa Tong districts, with 81.25%, 62.50% and 60.00% for *B. bubalis* and 62.50%, 50.00% and 47.06% for *Bos taurus*, respectively. The infection of larval stages of *F. gigantica* in snail intermediate hosts revealed that the 8 types of cercariae as parapleurolophocercous cercaria, pleurolophocercous cercaria, monostome cercaria, distome cercaria, xiphidiocercaria, echinostome cercaria, transversotremacercaria and furcocercous cercaria were recorded. The highest total prevalence of cercarial infection in sampling sites were recorded in Mae Taeng district with 38.16%, followed by the Chom Thong and Mae Rim districts with 26.95%, and 23.53%, respectively. The lowest total prevalence was recorded in Phrao district, with 11.76%. The prevalence of infection were also high recorded in parapleurolophocercous cercaria (8.65%), followed by distome cercaria (5.88%) and monostome cercaria (5.19%), respectively. The

xiphidiocercaria was shown lowest prevalence, with 0.35%, which was not found the type of *F. gigantica* cercariae as gymnocephalus cercariae.

The development of a specific primer from HAT-RAPD marker that can be used to detection the adult and larval stages of *F. gigantica*. The specific primer was designed as: FG-F (5'-TCC GTT CGT TTT CCC CTC TG-3') and FG-R (5'-GGG TTT CGC CCA TAC AGG AT-3') with yielding a product size of 235 bp. This primer pair had been approved to detect the larval stages of *F. gigantica*, and no cross-reaction with other related trematodes. The minimum concentration of DNA template is needed at 50 pg. This primer showed a high effective to detect *F. gigantica* DNA in all developmental stages such as miracidium, sporocyst, redia, cercaria and metacercaria. Whereas, the determination of *F. gigantica* cercarial infection in field-collected snails showed negative result by there were no any of the specific fragment, 235 bp that was amplified in all tested cercariae samples. The specific primer pair developed in this study provides beneficial values for the detection of both adult and larval stage of *F. gigantica*.

The phylogenetic analysis by using nucleotide sequence of ITS-2 region was performed by maximum likelihood (ML) and UPGMA methods. By basing on ML and UPGMA methods can generated 4 groups of trematodes; first *F. gigantica* group including specimen in Chiang Mai and GenBank database, second 2 samples of *F. hepatica* in GenBank database, third group of 3 rumen flukes; *Orthocoelium streptocoelium*, *Fischoederius elongatus* and *Paramphistomum epliclitum* and fourth group of 3 minute intestinal flukes; *Haplorchis taichui*, *Stellantchasmus* sp., *Haplorchoides* sp. and liver fluke; *Opisthorchis viverrini*. These results can be confirmed the giant liver fluke which mainly caused fascioliasis in Chiang Mai was identified as *F. gigantica* and nucleotide sequence of ITS-2 region has been proven as effective diagnostic tool for the identification of *F. gigantica*.