บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

พยาธิใบไม้เรียกตามลักษณะรูปร่างที่คล้ายใบไม้ ซึ่งอาจเรียวหรือแผ่กว้าง ด้านหน้าของพยาธิใบไม้มักเรียวเล็ก มีอวัยวะช่วยในการยึดเกาะ (oral sucker) อยู่ตรงปลายล้อมรอบช่องปาก ถัดจากปลายด้านหน้าลงมาทางด้านท้องประมาณหนึ่งในสามของลำตัว มีอวัยวะช่วยในการยึดเกาะอีกอันหนึ่งคือ อวัยวะช่วยในการยึดเกาะด้านท้อง (ventral sucker) หรืออซีตาบูลัม (acetabulum) ใช้ยึดเกาะกับโฮสต์ เหนืออวัยวะช่วยในการยึดเกาะด้านท้องมีช่องสืบพันธุ์ (gonopore, genital pore) ตอนท้ายของลำตัวมีช่องขับถ่ายของเสีย (excretory pore) (บพิธ และ นันทพร, 2540)

ลักษณะโดยทั่วไปของพยาธิใบไม้ (Yamaguti, 1958; บพิธ และ นันทพร, 2540)

ผนังลำตัวของพยาธิใบไม้เรียกว่า เทกกูเมนท์ (tegument) ซึ่งเดิมเคยเข้าใจว่าเป็นชั้นของคิวติเคิล ปัจจุบันการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่า เทกกูเมนท์แบ่งเป็นสองชั้นมีเยื่อฐาน (basement membrane) กั้นระหว่างชั้นนอก (outer zone) เป็นไซโตพลาสซึมที่ไม่มีเยื่อกั้น (cytoplasmic syncytium) มีออร์แกเนลอยู่หลายอย่าง ได้แก่ ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) เอนโดพลาสมิคเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) แวคิวโอล (vacuole) และกอลจิแอปปาราตัส (golgi apparatus) ผิวนอกของชั้นนอกเป็นเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ที่มีแขนงเล็ก ๆ ยื่นออกมาคือ ไมโครวิลไล (microvilli) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมอาหาร ชั้นใน (inner zone) ประกอบด้วยกล้ามเนื้อตามเส้นรอบวงและกล้ามเนื้อตามยาว และตัวเซลล์ที่เรียกว่าไซตอน (cyton) ฝังตัวอยู่ในมีเซนไคม์ ภายในตัวเซลล์มีออร์แกเนลล์เหมือนเซลล์ปกติ และจะมีแขนงเรียกว่า cytoplasmic tubule ยื่นทะลุเนื้อฐานขึ้นไปเป็นเยื่อชั้นนอก ผนังตัวของพยาธิใบไม้ทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหาร และมีคุณสมบัติพิเศษสามารถป้องกันน้ำย่อยจากโฮสต์ได้ การกินอาหาร พยาธิใบไม้เป็นปรสิตภายในร่างกาย มีการดูดซึมอาหารจากโฮสต์ผ่านเทกกูเมนต์โดยตรง และมีระบบท่อทางเดินอาหารร่วมด้วย ทางเดินอาหารประกอบด้วยปากที่มีอวัยวะช่วยในการยึดเกาะที่เป็นวงของกล้ามเนื้อที่เจริญดีและนูนขึ้นมาเป็นรูปถ้วย เวลาเกาะกับเนื้อเยื่อของโฮสต์จะมีแรงดูดอย่างแรง คอหอย (pharynx) และหลอดอาหาร (esophagus) ทำหน้าที่เหมือนปั๊มในการกลืนเอาเซลล์ เมือกของเหลว เลือดและเนื้อเยื่อของโฮสต์ที่หลุดออกมาจากการดูดเกาะของอวัยวะช่วยในการยึดเกาะบริเวณปาก และแขนงลำไส้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(intestinal caeca) มักจะมี 2 แขนงอยู่ทางด้านข้างยาวจนไปถึงท้ายตัว เป็นถุงปิด อาจมีการแตกเป็นแขนงย่อยด้านข้าง (diverticulum) ซึ่งจะพบในพยาธิใบไม้ที่ลำตัวกว้าง

ระบบขับถ่ายประกอบด้วยท่อตามยาว 2 ท่อข้างตัว (longitudinal tubule) รับเอาของเสียจากเฟลมเซลล์ (flame cell) ท่อขับถ่ายจะรวบรวมของเสียเข้าสู่ถุงปัสสาวะ (excretory vesicle) ซึ่งพองตัวออกเป็นกระเปาะและเปิดออกที่เนฟริดิโอพอร์ (nephridiopore) พยาธิใบไม้ยังคงมีระบบขับถ่ายเนื่องจากยังต้องมีการปรับสภาวะของน้ำภายใน การหายใจเป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) ซึ่งกระบวนการนี้ให้คาร์บอนไดออกไซด์ และมีกรดอินทรีย์สะสมอยู่ในร่างกายสูง ความเข้มข้นของโมเลกุลน้ำนอกตัวสูงกว่าภายในตัวจึงมีการเคลื่อนที่ของน้ำผ่านเข้าสู่ร่างกาย ระบบขับถ่ายจึงทำหน้าที่ปรับสภาวะน้ำในร่างกายให้สมดุล

ระบบประสาทจากสมองหรือปมประสาทสมองมีเส้นประสาทตามยาว 3 คู่ คู่ทางด้านท้องเจริญดีที่สุด อาจไม่มีคู่ทางด้านหลังและด้านข้าง และมีวงแหวนประสาทจำนวนมากเชื่อมระหว่างเส้นประสาท และมีแขนงไปยังอวัยวะยึดเกาะเป็นจำนวนมาก อวัยวะรับความรู้สึกไม่เจริญ ยกเว้นบางชนิดอาจมีตาเดี่ยว 1-2 คู่

ระบบสืบพันธุ์ พยาธิใบไม้มีเพศรวม ยกเว้นพยาธิใบไม้ในเลือด (*Shistosoma*) มีเพศแยก อวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะโครงสร้างพื้นฐานดังนี้คือ อวัยวะสืบพันธ์เพศผู้ ประกอบด้วยอัณฑะ 1 คู่ (บางชนิดมีเพียง 1 อัน หรือมีหลายอัน) อัณฑะมีลักษณะเป็นก้อน (lobe) หรือแตกแขนง (branch) ท่อจากอัณฑะแต่ละอันคือ วาส เอฟเฟอเรน (vas efferens) ท่อนี้จะรวมเป็นท่อใหญ่ขึ้นเรียกว่า วาส เดฟเฟอเรน (vas deferens) เปิดเข้าถุงเซอรัส (cirrus sac) วาสเดฟเฟอเรนในถุงซอรัสจะพองออกเป็นถุงเก็บสเปิร์ม (seminal vesicle) ต่อจากถุงเก็บสเปิร์มเป็นท่อที่มีกล้ามเนื้อหนาเรียกว่า เซอรัส (cirrus) เซอรัสนี้สามารถยื่นออกไปนอกตัวทางช่องสืบพันธุ์ได้รอบ ๆ เซอรัสจะมีต่อมพรอสเตท (prostate gland) มาเปิดเข้า ต่อมนี้จะสร้างของเหลวและส่งเข้ามาในเซอรัสทำให้ตัวสเปิร์มแข็งแรง ปลายท่อของเซอรัสปกติจะอยู่ในถุงสืบพันธุ์ (genital atrium) ซึ่งเป็นถุงที่อยู่ร่วมของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียก่อนจะเปิดออกนอกตัวทางช่องสืบพันธุ์ ซึ่งจะอยู่ทางด้านท้องค่อนไปทางด้านหน้าใกล้ๆ กับอวัยวะช่วยในการยึดเกาะด้านท้อง พยาธิใบไม้หลายชนิด เช่น พยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini, Clonorchis sinensis* ไม่มีถุงเซอรัส บางชนิดถุงเก็บสเปิร์มก็ไม่ได้อยู่ในถุงเซอรัส และบางชนิดท่อสืบพันธุ์ของเพศผู้กับท่อสืบพันธุ์ของเพศเมียไม่เปิดร่วมกันที่ถุงสืบพันธุ์ (genital atrium) แต่จะแยกเปิดออกนอกตัวทางช่องเพศผู้ (male gonopore) และช่องเพศเมีย (female gonopore)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย มีอวัยวะที่เป็นศูนย์กลางของระบบ มีลักษณะเป็นห้องเล็กๆ เรียกว่า โอโอไทพ์ (öotype) อวัยวะต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์จะมีท่อมาเปิดเข้าโอโอไทพ์คือ รังไข่ (ovary) มี 1 อัน มีท่อนำไข่ (oviduct) เป็นท่อสั้นๆ เปิดเข้าสู่โอโอไทพ์ ต่อมไข่แดง (yolk gland, vitelline gland) มีอยู่ข้างตัว ท่อจากต่อมทุกต่อมมารวมกันเป็นท่อไข่แดง (yolk duct) เปิดเข้าโอโอไทพ์ ต่อมนี้นอกจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สะสมอาหารให้ไข่แล้ว ยังสร้างสารที่จะกลายเป็นเปลือกไข่ด้วย ถุงรับสเปิร์ม (seminal receptacle) 1 ถุงมีท่อสั้นๆ เปิดเข้าโอโอไทพ์ ต่อมเมลิส (Mehlis's gland) อยู่รอบ ๆ โอโอไทพ์ และเปิดเข้าสู่โอโอไทพ์ ต่อมนี้เดิมเข้าใจว่าสร้างเปลือกไข่ แต่ปัจจุบันทราบว่าสร้างสารหล่อลื่นให้ผนังมดลูก ช่วยในการเคลื่อนที่ของไข่ในมดลูก มดลูก (uterus) เป็นท่อออกจากโอโอไทพ์ไปทางด้านหน้า ปลายท่อมีกล้ามเนื้อหนาเพื่อบีบรัดให้ไข่หลุดออกไป เรียกบริเวณนี้ว่า เมตราเทอร์ม (metraterm) ปลายท่อมดลูกจะเปิดเข้าสู่ถุงสืบพันธุ์ใกล้ ๆ กับปลายท่อเซอรัส ท่อสืบพันธุ์ของเพศเมียของพยาธิใบไม้บางชนิดจะไม่เปิดรวมกันที่ถุงสืบพันธุ์ แต่จะมีท่อเปิดออกนอกตัวโดยตรงแยกกับท่อสืบพันธุ์เพศผู้คือ ช่องมดลูก (uterine pore) แขนงลอเรอร์ (Laurer's canal) เป็นท่อสั้นๆ แยกออกจากถุงรับสเปิร์ม หรือแยกออกจากท่อนำไข่ และเปิดออกทางด้านหลังของพยาธิโดยตรง จึงเข้าใจว่าท่อนี้จำทำหน้าที่รับสเปิร์มจากตัวอื่น แต่พยาธิบางชนิดท่อนี้ก็เปิดอยู่ในตัว ไม่ทะลุออกนอกตัว จึงเชื่อว่าท่อนี้อาจเป็นท่อวาไจนาที่เสื่อมไปไม่ได้ทำหน้าที่อะไร เหมือนกับไส้ติ่งของคน การผสมพันธุ์ (copulation) พยาธิใบไม้มีการปฏิสนธิทั้งแบบภายในตัวเอง โดยเซอรัสจะโค้งงอและสอดเข้าไปในท่อมดลูกของตัวมันเอง หรือมีการปฏิสนธิแบบข้ามตัว (cross fertilization) โดยเซอรัสฉีดสเปิร์มเข้าทางมดลูกของตัวที่มาจับคู่กัน การปฏิสนธิเกิดในท่อนำไข่หรือในโอโอไทพ์ ไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกตรับเอาไข่แดงและสารหุ้มไข่ และจะค่อยๆ แข็งตัวแล้วเคลื่อนเข้าสู่มดลูก มดลูกที่มีไข่อยู่จะขยายตัวออกกินเนื้อที่ส่วนใหญ่ของลำตัว ไข่หลุดจากมดลูกโดยการบีบตัวของเมตราเทอร์มดันไข่ออกนอกตัวทางช่องสืบพันธุ์

วงจรชีวิตทั่วไปของพยาธิใบไม้

พยาธิใบไม้มีวงจรชีวิตที่ประกอบด้วยตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ซึ่งบางระยะต้องการโฮสต์สำหรับอาศัยเช่นเดียวกับตัวแก่ โฮสต์ที่พยาธิใบไม้ต้องการจึงมี 2 ประเภทคือ โฮสต์ถาวร (principle host, definite host) เป็นโฮสต์ที่ตัวแก่อาศัยอยู่และมีการสืบพันธ์ของผู้อาศัยแบบอาศัยเพศ ส่วนโฮสต์สื่อกลาง (intermediate host) เป็นโฮสต์ที่ตัวอ่อนอาศัยอยู่ โฮสต์ชนิดนี้จึงมีได้มากกว่า 1 ชนิดตามความจำเป็นของระยะตัวอ่อนในวงจรชีวิต วงจรชีวิตจะมีขั้นตอนตามวงจรใดขึ้นอยู่กับชนิดของพยาธิใบไม้ ตัวอ่อนแต่ละระยะจะมีลักษณะต่างๆ กัน คือ

ไข่ (egg) ไข่ของพยาธิใบไม้จะมีฝาปิด (operculum) ไข่ที่ปฏิสนธิแล้วจะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะแรกคือ ระยะไมราซิเดียม (miracidium) โดยตัวอ่อนชนิดนี้ยังอยู่ในเปลือกไข่ ไข่จะหลุดปนออกมากับอุจจาระของโฮสต์ออกสู่ภายนอก หากสภาวะแวดล้อมภายนอกยังไม่เหมาะสมตัวอ่อนก็จะยังไม่ฟักออกมาและจะมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นปี ๆ ถ้าไข่ตกลงสู่น้ำก็จะฟักออกเป็นตัวอ่อนระยะไมราซิเดียม (miracidium)

ตัวอ่อนระยะไมราซิเดียมของพยาธิใบไม้เป็นรูปไข่ด้านหน้ากว้างด้านท้ายแคบ มีซิเลียปกคลุมช่วยในการว่ายน้ำ ไมราซิเดียมจะว่ายน้ำอยู่ระยะหนึ่ง เมื่อพบโฮสต์ที่เป็นหอยฝาเดียวที่ต้องการก็

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

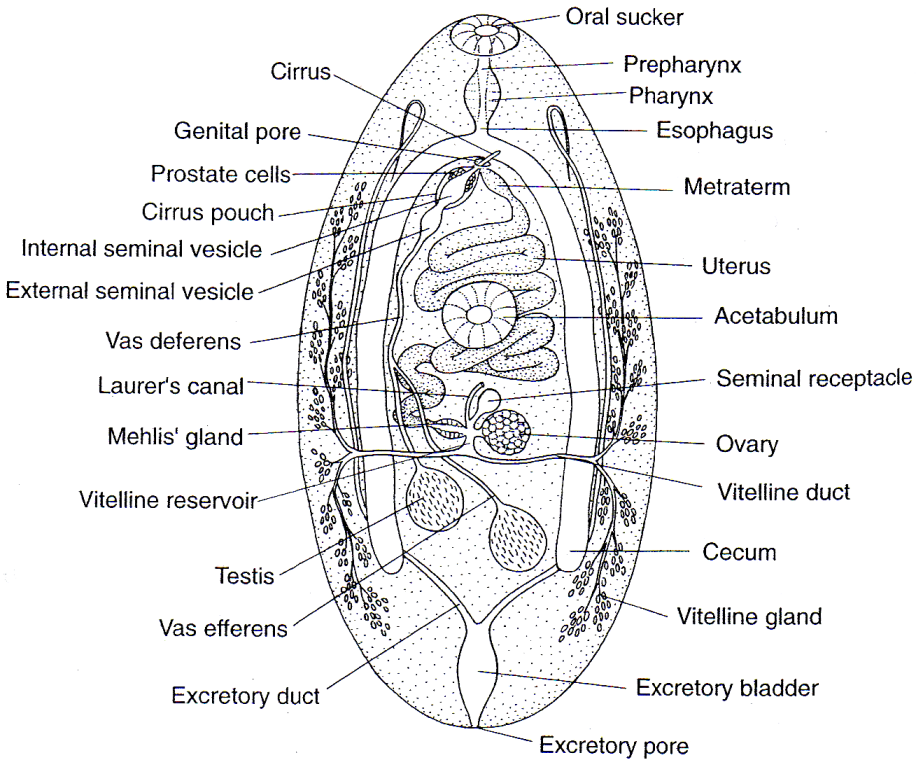
จะใช้เดือยด้านหน้า (apical papilla) ซึ่งเป็นติ่งแหลม ๆ แทงเข้าไปในตัวหอย ทั้งนี้จะมีต่อมเจาะ (penetration gland) สร้างน้ำย่อยออกมาย่อยเนื้อเยื่อบริเวณที่เจาะให้สามารถเข้าไปในตัวหอยได้ง่าย ถ้าหากไม่พบหอยชนิดที่ต้องการก็จะตายไป ในตัวไมราซิเดียมมีเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) จำนวนมาก มีตา 1 คู่ และอวัยวะในการขับถ่ายของเสีย 1 คู่ เมื่อเข้าไปในตัวหอยแล้วจะสลัดซีเลียทิ้งและจะเคลื่อนตัวไปยังทางเดินอาหาร หัวใจ หรือช่องเหงือกของหอย ในที่สุดจะไปอยู่ที่ต่อมน้ำย่อย (digestive gland) และพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะสปอโรซีสต์ (sporocyst)

ระยะสปอโรซีสต์มีลักษณะเป็นถุงกลวง เซลล์สืบพันธุ์ในถุงจะแบ่งตัวหลายครั้ง ได้กลุ่มเซลล์จำนวนมากเป็นก้อนเซลล์ (germ ball) ต่อมามีการเรียงตัวเป็นชั้นเหมือนระยะบลาสตูลาและแกสตรูลา หลังจากนั้นตัวอ่อนที่มีลักษณะคล้ายกับระยะแกสตรูลานี้จะยืดยาวออกพัฒนาเป็นระยะเรเดีย (redia) เซลล์สืบพันธุ์อาจเกิดจากเซลล์บุผนังด้านในของถุงสปอโรซีสต์ที่หลุดออกมาก็ได้ ตัวอ่อนระยะเรเดียจะมีอวัยวะที่ใช้ยึดเกาะกับโฮสต์ (sucker) รอบปากและลำไส้เป็นถุงสั้นๆ ตัวอ่อนระยะนี้ยังอยู่ในถุงสปอโรซีสต์ โดยทั่วไปสปอโรซีสต์จะมีเรเดียอยู่หลายตัว ก้อนเซลล์ในสปอโรซีสต์อาจจะพัฒนาไปเป็นสปอโรซีสต์ลูก (daughter sporocyst) ก็ได้ และสปอโรซีสต์ลูกจึงจะสร้างเรเดียขึ้นภายใน ตัวอ่อนระยะเรเดียในถุงสปอโรซีสต์จะยืดยาวออกและเซลล์สืบพันธุ์ภายในเรเดียก็จะแบ่งตัวเป็นก้อนเซลล์ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะเซอคาเรีย (cercaria) โดยวิธีเดียวกันกับการสร้างเรเดียในสปอโรซีสต์

ตัวอ่อนระยะเซอคาเรียจะมีอวัยวะช่วยในการยึดเกาะด้านหน้า และด้านท้อง มีหาง มีลำไส้แยกเป็น 2 แขนง และมีท่อขับถ่าย ตัวอ่อนระยะเซอคาเรียระยะแรกยังอยู่ในตัวอ่อนเรเดีย และจะออกจากเรเดียทางช่องเปิดของถุงเรเดียที่เรียกว่าช่องเกิด (birth pore) เซอคาเรียออกจากถุงสปอโรซีสต์และในที่สุดจะออกจากเนื้อเยื่อหอยลงไปอยู่ในน้ำ เซอคาเรียว่ายน้ำได้ดีโดยใช้ส่วนหางของมัน พยาธิใบไม้หลายชนิดที่ก้อนเซลล์ในระยะเรเดียจะพัฒนาไปเป็นเรเดียรุ่นที่ 2 และเรเดียรุ่นที่ 2 นี้จึงจะสร้างระยะเซอคาเรีย ดังนั้นจากไข่ 1 ใบ จะให้ตัวอ่อนระยะเซอคาเรียหลายร้อยตัว

ตัวอ่อนระยะเมตาเซอคาเรีย (metacercaria) เป็นระยะที่พัฒนามาจากระยะเซอคาเรีย โดยเซอคาเรียที่ออกจากตัวหอยมาอยู่ในน้ำจะว่ายน้ำหาโฮสต์สื่อกลางที่ 2 ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์น้ำในไฟลัมอาร์โทรโปดา (Arthropoda) หรือปลา เมื่อเข้าไปอยู่ในโฮสต์แล้วจะสลัดหางทิ้ง และสร้างผนังหุ้มตัวเป็นซีสต์อยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ ระยะซีสต์นี้คือระยะเมตาเซอคาเรียซึ่งจะเป็นระยะติดต่อ (infective stage) เมื่อโฮสต์ถาวรกินซีสต์นี้เข้าไป ตัวอ่อนภายในซีสต์จะออกมาจากผนังหุ้ม เคลื่อนตัวไปยังอวัยวะต่าง ๆ และเจริญเป็นตัวแก่ เมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้บางชนิดจะไม่ต้องการโฮสต์ชนิดที่สองแต่จะเกาะติดตามพืชน้ำต่าง ๆ (บพิธ และ นันทพร, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



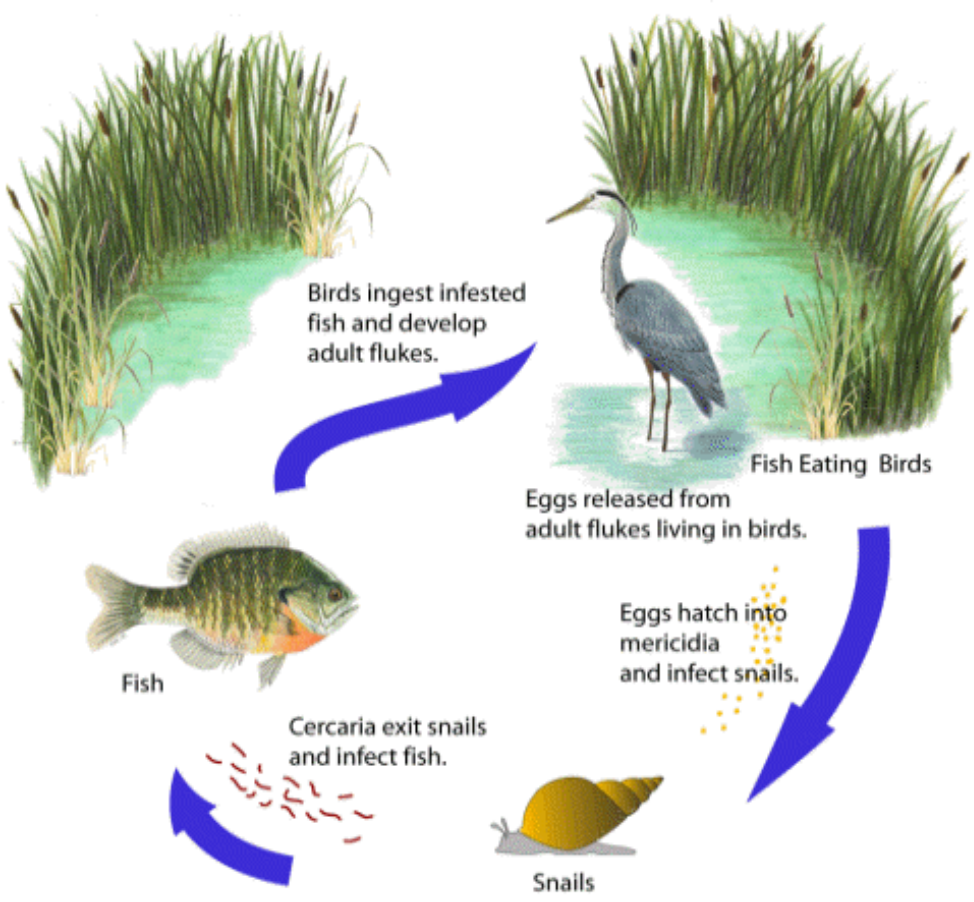
ภาพ 1 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้ (Digenea) (Schmidt and Roberts, 2010)

พยาธิใบไม้ *Clinostomum* spp. พบรายงานครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา (Rudolphi, 1809) โดยพบพยาธิ *C. heterostomum* ในหลอดอาหารของนกกระสา (*Ardea purpurea*) ซึ่งเป็นนกกินปลา แมลง สัตว์น้ำขนาดเล็ก และหอย มีพฤติกรรม หากินตามชายน้ำและทุ่งนา (Arbor, 1920) ในประเทศฟิลิปปินส์มีรายงานพบ *C. philippinensis* ครั้งแรกในปลาช่อน (*Ophiocephalus striatus*) โดยพบหนอนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียบริเวณผนังลำตัว เบ้าตา และซี่เหงือก นอกจากนี้มีรายงานพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิชนิดนี้ในปลา กบ ซาลาแมนเดอร์ และหอยบก (Yamaguti, 1958; Valasquez, 1975) พยาธิใบไม้ชนิดนี้ก่อให้เกิดโรค yello grub ในปลาน้ำจืดหลายชนิด โดยจะฝังตัวอยู่ในชั้นผิวหนัง กล้ามเนื้อ

พยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. เป็นพยาธิใบไม้ขนาดใหญ่ มีสองเพศในตัวเดียว มี oral sucker ที่ไม่มี tentacle หรือ spines ขนาดของ acetabulum ใหญ่กว่า oral sucker ประมาณ 4 เท่า และอยู่ประมาณ 2 ใน 5 ของลำตัว มีช่องสืบพันธุ์ (genital pore) เปิดออกที่ acetabulum ลำไส้แยกออกเป็นสองปาง บริเวณตรงกลางของลำตัวมี testes 2 อันเรียงกันอยู่ มีลักษณะหยักเป็นลอน ovary มีลักษณะกลมรีอยู่บริเวณตรงกลางระหว่าง testes ทั้งสอง มดลูกมีลักษณะคล้ายรูปตัววาย (Y-shaped) หัวกลับอยู่ระหว่าง acetabulum กับ testes อันบน วงชีวิตของพยาธิคือ ตัวอ่อนระยะ miracidium ออกจากไข่ที่อยู่ในน้ำเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 (1st intermediated host) เช่น หอยในจีนัส *Helisoma* ซึ่ง miracidium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะสลัด cilia ออกเพื่อเข้าสู่ระยะ sporocyst จากนั้นพัฒนาไปเป็นระยะ redia และ cercaria ในตัวหอย ซึ่งรูปแบบของ cercaria มีลักษณะเป็น forked tails จะไชออกจากหอยเข้าสู่ปลาซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 (2nd intermediated host) cercaria จะสร้าง cysts ล้อมรอบตัวอ่อนเป็นระยะ metacercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อโดยมีลักษณะเป็นก้อนสีขาวขุ่น หรือสีเหลืองเรียกว่า yellow grub แทรกตามเนื้อเยื่อและช่องว่างลำตัวของปลา เมื่อปลาถูกกินโดยโฮสต์เฉพาะ (definitive host) ซึ่งเป็นสัตว์พวกนก cysts ของ metacercariae จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารของนก และจะเคลื่อนที่ไปอยู่ในส่วนของหลอดอาหารส่วนต้น และ buccal cavity และพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัย ภายในระยะเวลา 4-6 ชั่วโมง ซึ่งไข่ของพยาธิระยะตัวเต็มวัยจะหลุดออกไปสู่สิ่งแวดล้อมในขณะที่นกกินน้ำและอาหาร ทำให้วงจรชีวิตของพยาธิชนิดนี้ครบสมบูรณ์ (Klaas, 1963)



ภาพ 2 วงชีวิต *Clinostomum marginatum* (Cable, 1977)

การจัดจำแนกพยาธิใบไม้ที่เราศึกษาตาม Gibson *et al.* (2011) นั้นได้จัดให้อยู่ใน Family Clinostomidae (Luhe,1901) โดยมีลักษณะพิเศษประจำ Family นี้คือ การมี uterus อยู่ทางด้านหน้าหรือทางส่วนท้ายท้ายของอวัยวะสืบพันธ์ (genitalia) และพบตัวเต็มวัยของพยาธิชนิดนี้เกาะอยู่บริเวณหลอดอาหาร (oesophagus) ของนกหรือสัตว์เลื้อยคลาน จัดอยู่ใน Subfamily Clinostominae (Luhe, 1901) อธิบายว่าพบตัวเต็มวัยในช่องปาก (buccal cavity) หรือหลอดอาหารของนก การมีลำไส้เป็นแบบง่ายๆ คือเป็นท่อตรงไม่มีการแตกแขนง ลักษณะของพยาธิจะมีรูปแบบค่อนข้างอ้วน (body stout) มีความยาว 5-30 มิลลิเมตร การจัดพยาธิให้อยู่ใน genus ที่เราทำการศึกษาในครั้งนี้ คือการมี genital pore และ cirrus-sac อยู่ในตำแหน่งก่อน หรือระหว่างอัณฑะทั้งสอง (intertesticular) หรืออยู่ในตำแหน่งด้านข้างของอัณฑะอันแรก การมี vitelline ลักษณะกลมกระจายอยู่ทั่วลำตัว สามารถจัดอยู่ใน Genus *Clinostomum* (Leidy, 1856)

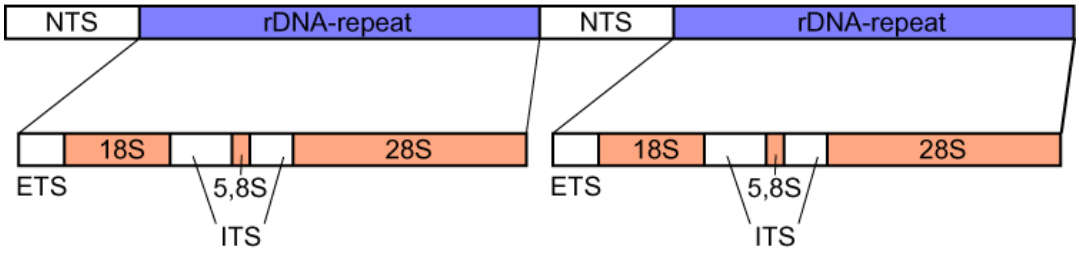
การศึกษาลักษณะโครงสร้างของพยาธิโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคเพียงวิธีการเดียว อาจไม่เพียงพอในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ชัดเจน อีกทั้งไม่สามารถแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความคล้ายคลึงกันมากๆ ออกจากกันได้ จึงควรต้องมีการศึกษาวิธีอย่างอื่นร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยในการยืนยันให้ชัดเจน อีกทั้งยังมีวิธีการสมัยใหม่อีกหลายวิธีเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง มีการนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้เป็นที่ยอมรับของสากล ดังนั้นจึงต้องอาศัยการศึกษาในด้านอื่นประกอบด้วย เช่น การศึกษาพื้นผิวของพยาธิใบไม้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) เป็นการศึกษาทางด้านชีววิทยาอีกรูปแบบหนึ่ง ภาพที่ได้จะเป็นแบบสามมิติ ช่วยให้สามารถเห็นรายละเอียดพื้นผิวของสิ่งมีชีวิตที่เราศึกษา และช่วยในการแยกหรือจัดจำแนกชนิดของพยาธิได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากลักษณะบางอย่างไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การศึกษาวิธีนี้จะช่วยให้เราเห็นรายละเอียดชัดเจนกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาซึ่งจะช่วยเราในการจัดจำแนกพยาธิใบไม้ชนิดนี้ได้ดีขึ้น

ในปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิดของพยาธิซึ่งเป็นวิธีการศึกษาที่มีความแม่นยำค่อนข้างสูง (ชโลบล, 2555) โดยมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตซึ่งพบว่าในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีลักษณะแตกต่างกัน เทคนิคที่ศึกษามีหลายวิธี เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เทคนิค Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ conserved genes เช่น Internal Transcripted Spacer (ITS) จาก ribosomal gene complex และ cytochrome C oxidase ใน mitochondrial gene เป็นต้น

ตำแหน่ง Internal Transcripted Spacer (ITS) เป็นส่วนหนึ่งของ Ribosomal DNA ซึ่งยีนส์ในบริเวณนี้จะแปลรหัส (Transcription) ไปเป็นไรโบโซม ส่วนบริเวณ 18S, 5.8S และ 28S จะมีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปสร้างเป็นส่วนของไรโบโซม ส่วนบริเวณตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 เป็นส่วนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนส์ที่จะไม่ถูกแปลรหัสเรียกว่า intron ซึ่งจะถูกกระบวนการ RNA splicing ตัดออกไปก่อนที่จะถึงขั้นตอนที่กลายเป็น Mature RNA ซึ่งลำดับเบสในตำแหน่ง ITS2 นี้มีความจำเพาะเจาะจงในแต่ละสปีชีส์สูง สิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์จะมีลำดับเบสในตำแหน่งนี้ไม่เท่ากัน และลำดับเบสในตำแหน่งก็มีการจัดเรียงตัวแตกต่างกัน นอกจากนี้ถึงแม้จะเป็นในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันยังมีความผันแปร (variation) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการกลายพันธุ์ที่เกิดในระดับโมเลกุลหรือยีนส์ (point mutation) การขาดหายไป (deletion) การเพิ่มขึ้น (insertion) ซึ่งเกิดจากการผันแปลของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว อาจเป็นผลกระทบจากการแบ่งเซลล์ การผันแปรจากสภาวะต่างๆ ที่กระตุ้นให้ดีเอ็นเอมีความผิดปกติไป ทำให้ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS2 นี้มีความผันแปร ความหลากหลาย โดยปกติการศึกษา ITS2 จะใช้ไพรเมอร์ที่เรียกว่า Standard Primers ซึ่งมีด้วยกันหลายรูปแบบ แต่สิ่งที่ทุกไพรเมอร์ทำเหมือนกันคือ จะจับบริเวณตำแหน่งเหนือและใต้ ITS2 จากนั้นเมื่อไพรเมอร์ทำงานจะทำการการเพิ่มปริมาณ (Amplification) ชิ้นส่วนที่เรียกว่า ITS2 ขึ้นมา เมื่อทำการแยกและวิเคราะห์โดยใช้ Gel electrophoresis จากผลิตภัณฑ์ PCR จะทำให้ได้ชิ้นส่วนของ ITS2 ในสิ่งมีชีวิตที่เราทำการศึกษา (ชัยเรศน์, 2550)



ภาพ 3 แสดงตำแหน่ง ITS2 จากบริเวณ Ribosomal DNA
(ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Ribosomal_DNA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไพรเมอร์ (Primers) จัดเป็นองค์ประกอบสำคัญของความสำเร็จในการทำ PCR โดยเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีการ PCR คือ สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้งสี่ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์พอลีเมอเรส พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงไปในปฏิกิริยา เอนไซน์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นต้นแบบ เมื่อ

ปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้น สำหรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1-0.6 μM (ยกเว้นในบางกรณี อาจใช้ความเข้มข้นถึง 1 μM) การใช้ primers ในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้โอกาสการเกิด mispriming, primer-dimer และ non-specific amplified product เพิ่มสูงขึ้นในทางกลับกัน การใช้ primers ในปริมาณที่น้อยเกินไป จะทำให้ primers ถูกใช้หมดก่อนปฏิกิริยาสิ้นสุดลง เป็นผลให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลง (สุรินทร์, 2552)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำ PCR คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรสซ้ำ (*Taq* polymerase)กันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย จึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย และมีปลาย 3’ ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้น ข้อกำหนดในการทำ PCR คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ บริเวณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5’ ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5’ ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน (วีรพงศ์ และนิภาภรณ์, 2551; สุรินทร์, 2552)

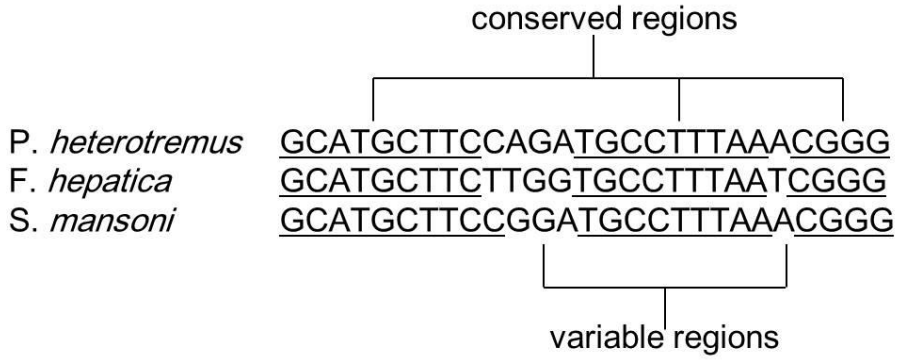
วิธีการแยกและการวิเคราะห์ชีวโมเลกุล โดยใช้ Gel electrophoresis อาศัยหลักการที่ว่าชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน และจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม การแยกโดย electrophoresis จะมีตัวกลางเป็นตัวรองรับให้สารชีวโมเลกุลเคลื่อนที่ผ่านไป ซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีคุณสมบัติเฉื่อย ได้แก่ agarose และ polyacrylamind เนื่องจากกรดนิวคลีอิกมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยเฉพาะดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลางคือ gel โดยที่ agaroe gel ที่มีความเข้มข้นต่ำจะมีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 คู่เบส (bp) ในขณะที่ agarose gel มีความเข้มข้นสูงและ polyacrylamind gel ส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส (อัจฉรี, 2546)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำ Multiple sequence alignment เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อประกอบเป็นเครื่องมือในการจัดจำแนก และวิเคราะห์ความถูกต้องของตำแหน่งยีนโดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่เก็บรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ทั้งพืช สัตว์ จุลินทรีย์ ข้อมูลที่จัดเก็บมีทั้งที่เป็นรหัสพันธุกรรมของ DNA และ mRNA ที่อยู่ในรูป nucleotide sequence และข้อมูลของ amino acid sequence ของยีนต่างๆ ข้อมูลทั้งหมดถูกจัดเก็บอย่างเป็นระบบอยู่ในสื่ออิเลคทรอนิค เพื่อสะดวกต่อการค้นหาและการนำไปใช้งาน ฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) มีความเร็วสูงในการรับส่งข้อมูล จึงได้รับความนิยมกว่าฐานข้อมูลอื่น

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล (molecular phylogenetics) มีความสัมพันธ์กันในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) ไม่ชัดเจน ทำให้ยากต่อการค้นหาลักษณะที่มีการพัฒนาขึ้นร่วมกัน (synapomorphy) ดังนั้นในการศึกษาจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการที่มีความละเอียดและซับซ้อนขึ้น โดยอาศัยเครื่องมือที่ทันสมัยและการวิเคราะห์ผลที่รวดเร็วและแม่นยำโดยใช้คอมพิวเตอร์ วิธีการเหล่านี้เน้นการศึกษาในระดับโมเลกุล ซึ่งแบ่งเป็น การศึกษาในระดับโปรตีน และการศึกษาในระดับดีเอ็นเอ

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (comparison of nucleotide sequence) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต อาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้กันมากกว่า ตัวอย่างเช่น การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของของบริเวณ 18s rRNA ของพยาธิใบไม้ต่างๆ ได้แก่ พยาธิใบไม้ในปอด (*Paragonimus heterotremus*) พยาธิใบไม้ในตับ (*Fasciola hepatica*) และพยาธิใบไม้ในเลือด (*Schisrosoma mansoni*) พบบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อนุรักษ์ (conserved regions) และนอกจากนี้ยังพบบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (variable regions) ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั้งสามสปีชีส์อีกด้วย



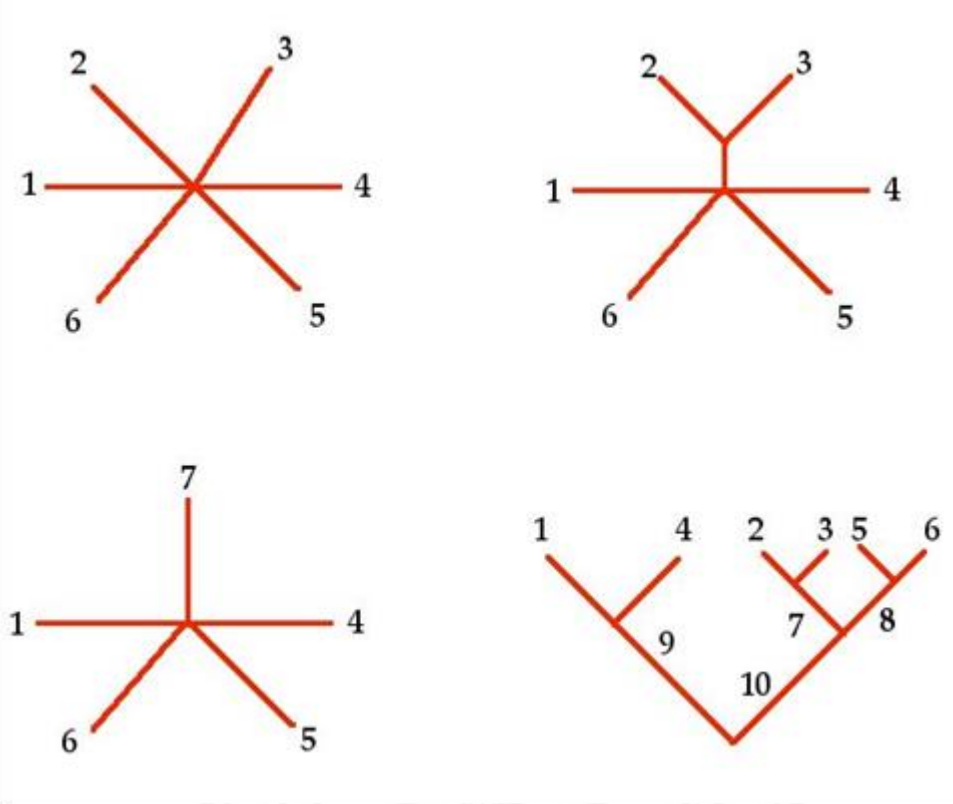
ภาพ 4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S ribosomal DNA ของพยาธิใบไม้ 3 ชนิด (ดัดแปลงจากอัจฉริยา, 2555)

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล นิยมใช้ข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence data) เป็นส่วนใหญ่ จากนั้นนำข้อมูลเหล่านี้จากสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ต่างๆ มาเทียบเคียง (aligned sequences) จะทำให้สามารถสร้างแผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการได้ โดยเลือกวิธีที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (distance-based approach) หรือวิธีที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สถานะของลักษณะที่เป็นลำดับกรดอะมิโน หรือลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (character-based approach) จากนั้นจึงทำการทดสอบความเชื่อมั่นของเคลดต่างๆ ในแผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการโดยอาศัยกระบวนการทางสถิติ เช่น การวิเคราะห์บูทสแตรป (bootstrap analysis) เป็นต้น

ตัวอย่างวิธีที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สถานะของลักษณะที่เป็นลำดับกรดอะมิโนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (character-based approach) เช่น วิธีแมกซิมัม ไลค์ลิฮูด (Maximum likelihood หรือ ML) ทำโดยคำนวณความน่าจะเป็น (probability หรือ likelihood) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (หรือลำดับกรดอะมิโน) ที่แสดงสถานะของลักษณะที่ปรากฏ โดยสมมติให้ข้อมูลมีการวิวัฒนาการภายใต้แบบจำลองวิวัฒนาการที่กำหนด แผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ML ที่มีค่าความน่าจะเป็นสูงสุด จัดว่าเป็นแผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการที่ดีที่สุดและจะถูกเลือกให้เป็นสมมติฐานที่เกี่ยวกับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา

เมื่อได้แผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการแล้ว ต้องมีการทดสอบความเชื่อมั่นของแต่ละเคลดโดยอาศัยกระบวนการทางสถิติ เรียกว่า การวิเคราะห์บูทสแตรป (Bootstrap analysis) โดยการสุ่มเลือกลักษณะแล้วนำกลับเข้าที่เดิม (sampling with replacement) เพื่อสร้างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ชุดใหม่ที่มีจำนวนสปีชีส์และลักษณะเท่ากับข้อมูลเดิม การสร้างแผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการจากข้อมูลใหม่นี้ เรียกว่า ต้นไม้จากการวิเคราะห์บูทสแตรป 1 (bootstrap tree 1) จากนั้นจึงมีการสุ่มลักษณะเพื่อสร้างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ชุดใหม่ๆ เพิ่มขึ้น พร้อมทั้งมีการสร้างแผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการจากข้อมูลใหม่แต่ละชุด (bootstrap tree 2 – bootstrap tree 100) และสรุปผลโดยการสร้างแผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการที่สอดคล้อง ซึ่งประกอบด้วยการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เหมือนกันมากกว่า 50% ของแผนภาพต้นไม้แห่งวิวัฒนาการทั้งหมด ค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของบูทสแตรป (bootstrap support หรือ bootstrap value) จะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ข้อมูลใหม่ 100 ชุด พบการจัดกลุ่มของสปีชีส์ A และ B ในเคลดเดียวกัน 100 ครั้ง แต่พบการจัดกลุ่มของสปีชีส์ C และ D ในเคลดเดียวกันเพียง 75 ครั้ง ดังนั้นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นบูทสแตรปจึงเป็น 100% และ 75% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 แสดงขั้นตอนรูปแบบการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Maximum likelihood

(ที่มา : http://www./bio.slu.edu)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายงานการศึกษา

รายงานการศึกษาพยาธิใบไม้ *Clinostomum* spp. มีรายงานการศึกษาเรื่อยมา โดยระยะแรกมีการพบพยาธิชนิดนี้ในระยะตัวเต็มวัยในนกหลายชนิดที่กินปลา เช่น *Ardea purpurea*, *A. cinera*, *A. cocoa, A. coerulea, Mysteria americana, Tantalus loculator, Pomotis vulgaris* และ *Perca flavescens* (Arbor, 1920) ต่อมาในปี ค.ศ. 1948 มีการศึกษาของ Hollis ได้สำรวจพยาธิใบไม้ในสกุล *Clinostomum* ที่มีการติดเชื้อในปลา Shad (*Alosa sapidissima*) พบการติดเชื้อมากถึง 22.4% จากปลาที่สำรวจเป็นจำนวนทั้งหมด 16 ตัว โดยพบการติดเชื้อระยะเมตาเซอร์คาเรียในปลาชนิดนี้จำนวน 2-3

ซิสต์ด้วยกัน ในรายงานระบุว่าไม่พบการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียมากกว่า 3 ซิสต์ในปลาหนึ่งตัวที่มีการตรวจพบพยาธิ รายงานการสำรวจของ Aohagi *et al*. ในปี 1992 ได้สำรวจปลาน้ำจืดในเมืองทอตโตริจากประเทศญี่ปุ่น จำนวน 14 ชนิด พบการติดเชื้อ *C. complanatum* ในปลามากถึง 6 ชนิดด้วยกัน (*Carassius gibelio langsdorfi*, *C. cuvieri*, *Cyprinus carpio*, *Pseudorasbora parva*, *Rhodeus ocellatus*, *R. lanceolatus*) ต่อมา Dary *et al*., 2002 สำรวจการกระจายตัวของ *C. marginatum* ที่ก่อให้เกิดโรค yello grub ในปลา Smallmouth Bass ในตอนเหนือรัฐอาร์คันซอ ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีค่าความชุกมากถึง 91% ของปลาที่สำรวจ ในปี 2005 มีการศึกษาของ Silva and Ludwig สำรวจปลาในประเทสบราซิล มากถึง 1,582 ตัว เป็นจำนวน 36 ชนิด โดยพบปลาที่ติดพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียของ *C. complanatum* มากสุดคือปลา *Gymnotus carapo* มีค่าความชุกมากคือ 8% ของปลาที่ทำการสำรวจทั้งหมด ในปี 2011 การสำรวจของ Gholami *et al*. พบการติดเชื้อ *C. complanatum* เป็นครั้งแรกในปลา *Aphanius dispar* ในประเทศอิหร่าน มีค่าความชุกคือ 4.12% ต่อมา Kuar *et al*. ทำการสำรวจในปี 2012 มีการสำรวจปลาช่อน (*Channa punctatus*) จากประเทศอินเดีย พบการติดเชื้อของ C. *complanatum* มีค่าความชุก 20% และมีรายงานการสำรวจของ Abiodum ในปี 2012 โดยสำรวจปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบการติดเชื้อ C. *tilapiae* มากถึง 10% จากปลาที่สำรวจ 540 ตัวจากฟาร์มเลี้ยงปลาสิบแห่งในประเทศไนจีเรีย โดยพบตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ *C. tilapiae* บริเวณช่องว่างลำตัว (body cavity) และบริเวณกระบอกตาของปลา (eye socket)

การติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในสกุล *Clinostomum* นี้ส่งผลให้ปลาเกิดโรค yello grub ซึ่งความรุนแรงของโรคที่เกิดจากหนอนพยาธิขึ้นกับตำแหน่งที่เข้าไปอาศัยอยู่ในปลาที่เป็นโฮสต์และทางผ่านเข้าสู่ร่างกาย โดยหนอนพยาธิจะเข้าสู่ร่างกายและอยู่ในอวัยวะเป้าหมาย บางกรณีหนอนพยาธิก็อาจเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้เช่นกัน ส่วนใหญ่การติดเชื้อหนอนพยาธิในลำไส้มักไม่ทำให้เกิดโรค แต่หากเกิดร่วมกับการติดเชื้อปรสิตขนาดเล็กหรือมีความเครียดจากสิ่งแวดล้อมมักก่อให้เกิดพยาธิสภาพขึ้นกับตัวปลาได้ เนื่องจากการติดหนอนพยาธิสามารถจะเป็นช่องทางให้มีการติดเชื้อของปริสิตขนาดเล็กและกระตุ้นกระบวนการทางเคมีและรบกวนกระบวนการทางกายภาพ ทำให้ปลาอ่อนแอ รบกวนสมดุลต่างๆ ในร่างกาย และทำให้ปลามีการติดเชื้อเพิ่มขึ้น (นันทริกา, 2553) การติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในกลุ่มนี้มีรายงานมานานโดย Klass (1963) ได้อธิบายเกี่ยวกับปลาในสถานะที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของพยาธิใบไม้ *C. marginatum* ว่า การติดเชื้อจะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตช้า ทำให้ปลาตาย หรือบางครั้งหากมีการติดเชื้อมากขึ้นผู้ล่าก็ไม่เลือกที่จะกินปลาตัวที่มีการติดเชื้อ รายงานของ Kalantan (1986) วิจัยเกี่ยวกับพยาธิสภาพของปลาที่ติดเชื้อระยะเมตาเซอร์คาเรียของ *C. complanatum* พบว่าผนังเซลล์ด้านนอกของเมตาเซอร์คาเรียเป็น Basic protein หากเกิดการติดเชื้อกับโฮสต์จะส่งผลให้เนื้อเยื่อของโฮสต์ก่อให้เกิดเป็นรูและมีการนูนบวมของเนื้อเยื่อ ต่อมาในปี 2013 มีงานวิจัยของ Pinky *et al*. ได้ทดสอบผลเกี่ยวกับพยาธิสภาพของปลาหมอช้างเหยียบ (*Nandus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

nandus) ได้รายงานว่าการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ *C. complanatum* ระยะเมตาเซอร์คาเรีย จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบเลือดและตับของโฮสต์ ก่อให้เกิดการตายของเซลล์เกิดขึ้น

การศึกษาพื้นผิวของพยาธิใบไม้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้นยังมีอยู่น้อย โดย Marwan and Mohammed (2003) ศึกษาพื้นผิวของพยาธิใบไม้สกุล *Clinostomum* โดยไม่ระบุชื่อสปีชีส์ที่ชัดเจนของพยาธิใบไม้ในสกุลนี้ แต่ได้อธิบายรายละเอียดของพื้นผิวพยาธิไว้อย่างชัดเจน และได้มีข้อถกเถียงในขณะนั้นว่าหน้าที่ของแต่ละส่วนยังไม่สามารถระบุได้ และมีการรายงานการศึกษาพื้นผิวของ *C. cutaneum* โดย Gustinelli *et al*. (2010) เพื่อช่วยในการจัดจำแนกพยาธิใบไม้ชนิดนี้ที่พบทั้งในระยะเมตาเซอร์คาเรียและระยะตัวเต็มวัยว่าเป็นชนิดเดียวกัน

สำหรับการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาของพยาธิในกลุ่มนี้ ได้มีการศึกษาโดย Caffara *et al*. (2011) ได้ตรวจสอบความแตกต่างของพยาธิใบไม้ *C. complanatum* และ *C. marginatum* ในระยะตัวเต็มวัย และระยะเมตาเซอร์คาเรีย พบว่าพยาธิทั้งสองชนิดมีสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน ได้แก่ ความกว้างของลำตัว ระยะห่างระหว่าง oral sucker และ acetabulum และได้ทำการตรวจสอบความแตกต่างทางด้านอณูชีววิทยา โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ Cytochrome C Oxidase I ผลที่ได้ยืนยันความแตกต่างอย่างชัดเจนของพยาธิทั้งสองชนิด นอกจากนี้ Sereno *et al.* (2013) ได้ตรวจสอบชนิดของพยาธิสกุล *Clinostomum* จากนกกินปลาและปลาในแหล่งน้ำจืดของประเทศเม็กซิโก โดยดูจากสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบพยาธิ 4 ชนิด ได้แก่ *C. cutaneum, C. complanatum, C. phalacrocorasis* และ *C. marginatum* ขณะเดียวกันยังพบว่าพยาธิบางส่วนไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ จึงใช้วิธีทางด้านอณูชีววิทยามาตรวจสอบ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไมโตคอนเดรีย (*cox1*) ทำให้ยืนยันได้ว่าเป็นพยาธิใบไม้ชนิด *Clinostomum tataxumui* ซึ่งเป็นพยาธิชนิดใหม่

ในประเทศไทยมีรายงานการวิจัยศึกษาเกี่ยวกับพยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. น้อยมาก Yooyen *et al.* (2006) ได้รายงานการพบ *C. philippinensis* ระยะเมตาเซอร์คาเรียในเหงือกของปลากระดี่นางฟ้า (*Trichogaster microlepis*) จากบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ต่อจากนั้นในปี 2012 มีรายงานการศึกษาพื้นผิวของพยาธิอีกชนิดคือ *C. complanatum* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Ngamniyom *et al*., 2012) ซึ่งพบพยาธิชนิดนี้ในปลาซิวข้าวสาร (*Oryzias minutillus*) เป็นครั้งแรกที่จังหวัดปทุมธานี โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 10.7% ผลการศึกษาทั้งสองครั้งนี้เป็นพยาธิคนละชนิดที่อยู่ในสกุลเดียวกันคือ *Clinostomum* ที่พบในปลาที่ต่างชนิดกันในประเทศไทย การศึกษาเกี่ยวกับพยาธิในสกุลนี้ยังมีน้อยมาก และเป็นเพียงการจัดจำแนกพยาธิโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น ซึ่งต้องใช้ความเชี่ยวชาญอย่างมากในการจัดจำแนก เพราะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก การศึกษาครั้งนี้จะทำการสำรวจในปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) และปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) โดยทำการเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาแบบดั้งเดิม กระบวนการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทางอณูชีววิทยาร่วมด้วย และศึกษาการระบาดของพยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. ในจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อบ่งบอกถึงชนิดที่มีการระบาดอย่างถูกต้องเพื่อช่วยในการควบคุม ป้องกัน และศึกษาด้านปรสิตวิทยาในระดับสูงต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved