

บทที่ 4

ผลการทดลอง

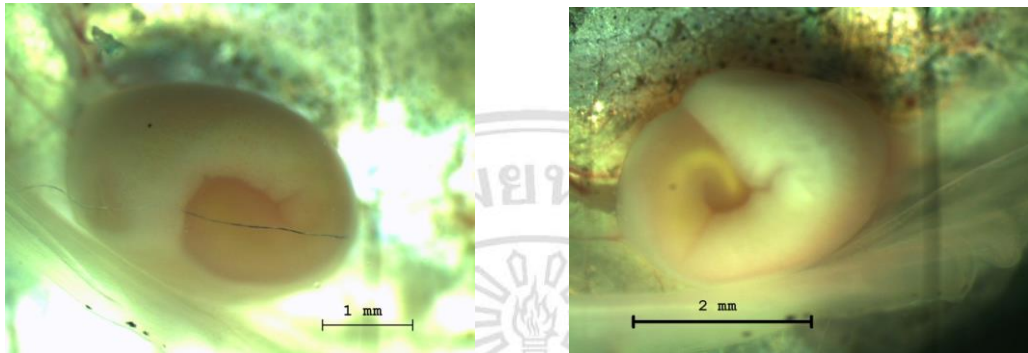
การสำรวจพยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. จากปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) และปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 โดยทำการสุ่มสำรวจปลาหมอจากชาวประมงท้องถิ่นจากแหล่งน้ำปึงสองพื้นที่คือ หมู่บ้านท่านาถ ต.หนองตอง อ.หางดง จ.เชียงใหม่ และหมู่บ้านท่าหลุก ต.สบเตี๊ยะ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่ จำนวนปลาหมอไทย 110 ตัว ปลากระดี่หม้อ 92 ตัว ผลการศึกษาพบพยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. จากปลาทั้งสองชนิดมีค่าความชุกของปลาที่ติดเชื้อหนอนพยาธิเท่ากับร้อยละ 6.36 (7/110) สำหรับปลาหมอไทย และร้อยละ 6.52 (6/92) สำหรับปลากระดี่หม้อ ค่าความหนาแน่นของปลาที่ติดเชื้อพยาธิเท่ากับ 5.4 ในปลาหมอไทย และ 4.5 ในปลากระดี่หม้อ ขนาดลำตัวของปลาที่นำมาศึกษา 5-13 เซนติเมตร

สำหรับการกระจายตัว (distribution) ของหนอนพยาธิในแต่ละส่วนของปลานั้นพบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. ระยะเมตาเซอร์คาเรีย ผังตัวอยู่ในฝาปิดเหงือก (operculum) (ภาพ 10) และบริเวณช่องท้อง (abdominal cavity) (ภาพ 11) การพบเมตาเซอร์คาเรียในครั้งแรกจะพบอยู่ในซิสต์จากบริเวณตำแหน่งทั้งสอง และเมื่อแยกเมตาเซอร์คาเรียออกมาจากตัวของโฮสต์ไม่นาน ตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียก็จะออกจากซิสต์ในทันที (ภาพ 11)

การศึกษาลักษณะวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าพยาธิจากทั้งสองโฮสต์นั้นมีลักษณะคล้ายเคียงกันในเรื่องของขนาดและตำแหน่งของอวัยวะต่างๆ (ภาพ 12-13) โดยทำการวัดขนาดพยาธิจากสไลด์ถาวรชนิดละ 10 ตัว บางตัวอาจมีความผันแปรในเรื่องของขนาด (variation) แต่เป็นส่วนน้อย อาจเนื่องมาจากการทับพยาธิให้แบน หรือการรอระยะเวลาให้พยาธิลดกิจกรรมบางอย่างก่อนที่จะทำการรักษาสภาพตัวอย่างนั่นเอง

การศึกษาลักษณะวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพ 14-21) จะแสดงลักษณะรูปร่างลำตัวของพยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. ระยะเมตาเซอร์คาเรีย โดยเมื่อดูจากรูปร่างลักษณะลำตัวโดยรวมมีลักษณะความคล้ายคลึงกัน (ภาพ 14) ในเรื่องของขนาดและรูปร่างของพยาธิ ส่วนหน้าของลำตัว (anterior part of body) แสดงให้เห็นตำแหน่งของ oral sucker และ acetabulum (ภาพ 15, 18) ซึ่งมีลักษณะการเปิดออกคล้ายเคียงกัน พบ collar like ring อยู่รอบ oral sucker (ภาพ 16) โดยลักษณะของ collar like ring จะมีสองชั้นรอบ oral sucker (ภาพ 17) พื้นผิวลำตัวของพยาธินั้นจะมีลักษณะเป็นรูเล็กๆ เรียกว่า micro pore (ภาพ 19) กระจายอยู่ทั่วลำตัวของพยาธิ มีขนาดของรูใกล้เคียง

กัน พื้นผิวลำตัวแสดงให้เห็นลักษณะของ styloconic-like sensory papilla (ภาพ 20) ซึ่งเป็นอวัยวะรับสัมผัสของพยาธิ และพบตำแหน่งของรูเปิดของระบบขับถ่ายของเสีย (excretory pore) อยู่ทางส่วนท้ายของลำตัว (ภาพ 21)



ภาพ 10 แสดงตำแหน่ง encysted metacercaria ในบริเวณฝาปิดเหงือกของโฮสต์



ภาพ 11 แสดงตำแหน่ง excysted metacercaria ในช่องท้องของโฮสต์ (ลูกครี)

ผลการศึกษาพื้นฐานวิทยาของพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

Clinostomum sp.

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Clinostomidae Luhe, 1901

Subfamily Clinostominae Luhe, 1901

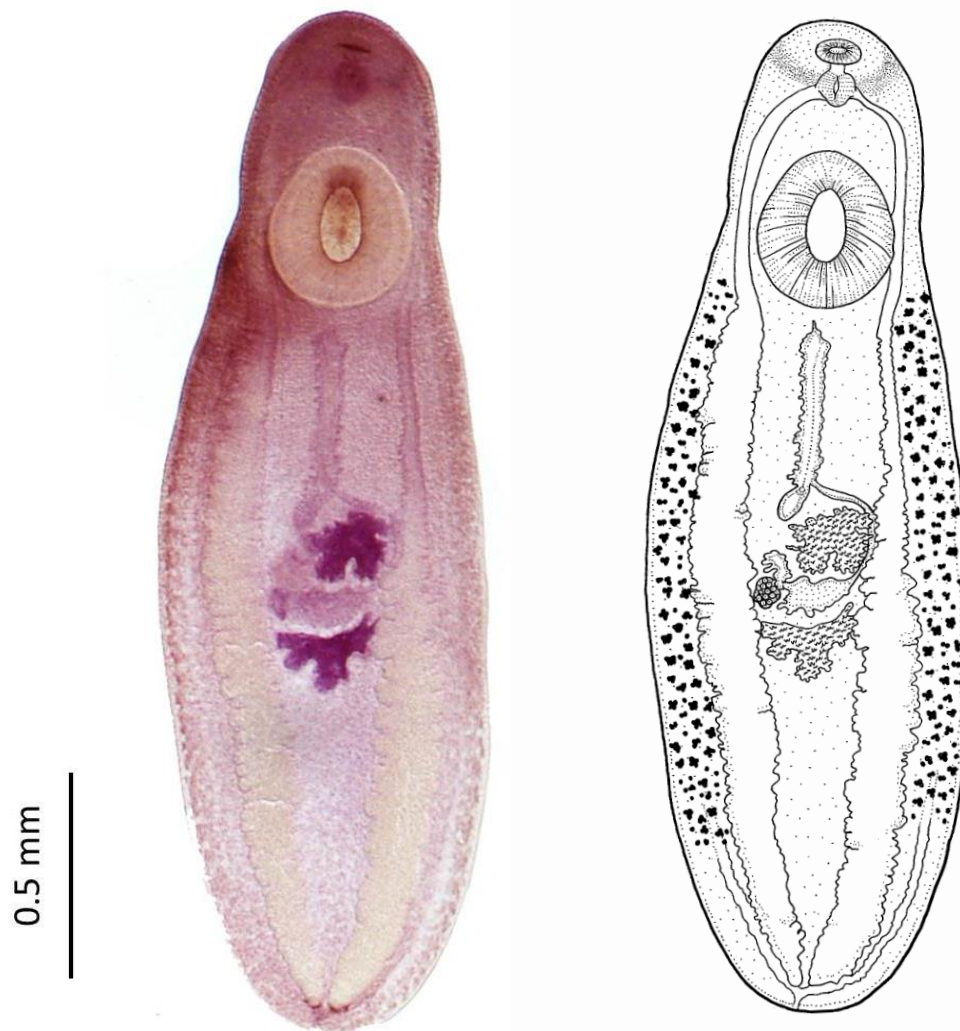
Genus *Clinostomum*

ลักษณะรูปร่าง

เป็นพยาธิใบไม้ ขนาดกลาง ลำตัวมีลักษณะรูปไข่ เรียวยาว ปลายมนทั้งสองด้าน ลำตัวมีความกว้าง 1.43-1.92 มิลลิเมตร ยาว 3.05-6.73 มิลลิเมตร มี oral sucker เป็นอวัยวะดูดเกาะ อยู่บริเวณหน้าสุด ขนาดกว้าง 0.26-0.34 มิลลิเมตร ทางเดินอาหารและ pharynx อยู่ถัดจาก oral sucker ยาว 0.15-0.24 มิลลิเมตร acetabulum มีขนาดใหญ่กว่า oral sucker ประมาณ 4 เท่า อยู่บริเวณประมาณ 2 ใน 5 ของลำตัว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.58-0.85 มิลลิเมตร แขนงลำไส้ทั้ง 2 แขนงยาวใหญ่แผ่ไปจนถึงท้ายตัว บริเวณตรงกลางของลำตัวมี testes 2 อัน อันแรกอยู่ด้านบน อันที่ 2 อยู่ด้านล่าง มีลักษณะหยักเป็นลอน มีขนาดกว้าง 0.40-0.71 มิลลิเมตร ยาว 0.26-0.58 มิลลิเมตร ovary มีลักษณะกลมรีอยู่บริเวณตรงกลางระหว่างอวัยวะทั้งสอง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.08-0.20 มิลลิเมตร มดลูกมีลักษณะคล้ายรูปตัววาย (Y-shape) หัวกลับ อยู่ระหว่าง acetabulum กับ testes อันบน ไม่พบไข่ในมดลูกเลย แสดงว่าพยาธิที่พบยังเจริญไม่เต็มวัย

Habitat: ฝาปิดเหงือก ช่องว่างภายในลำตัว

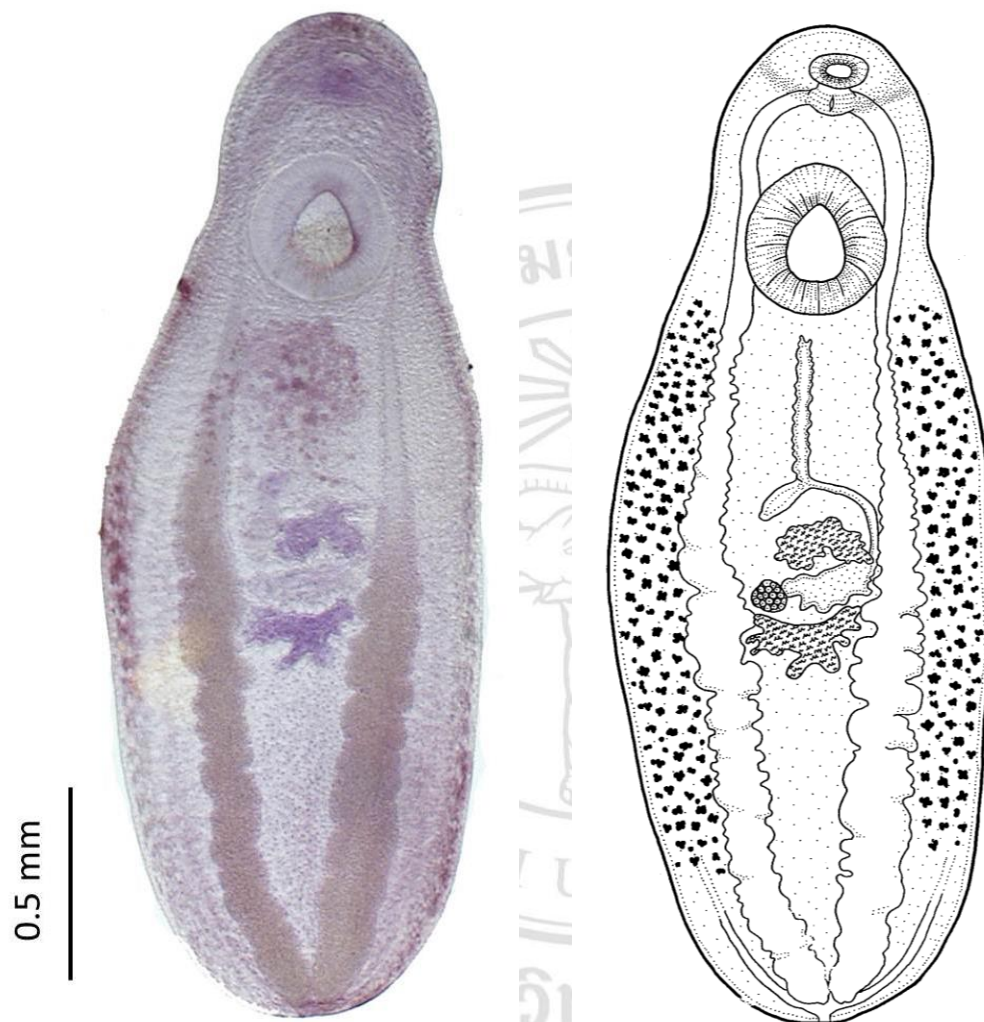
Host: *Anabas testudineus*, *Trichogaster trichopterus*



Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 12 ภาพถ่ายและภาพวาดของ *Clinostomum* sp.

จากโฮสต์ *Anabas testudineus*

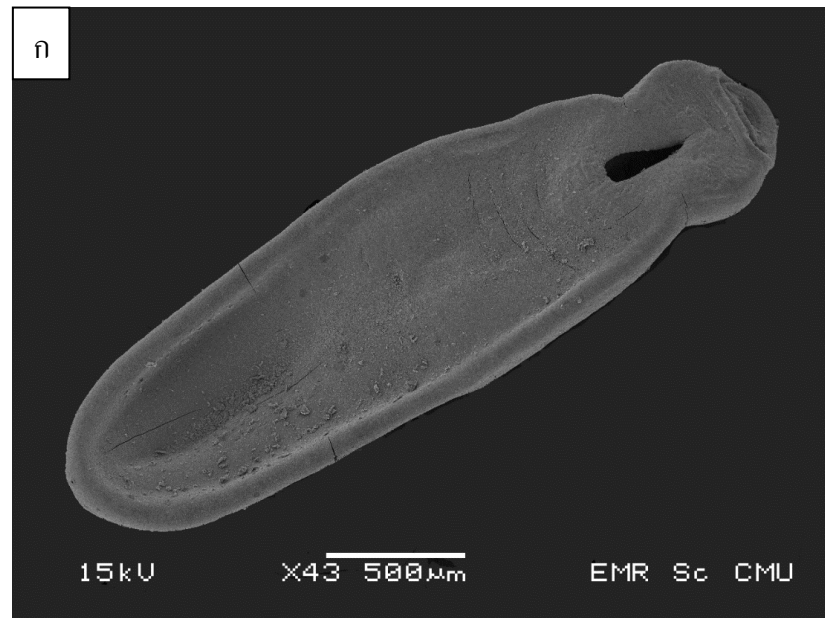


Copyright - by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 13 ภาพถ่ายและภาพวาดของ *Clinostomum* sp.

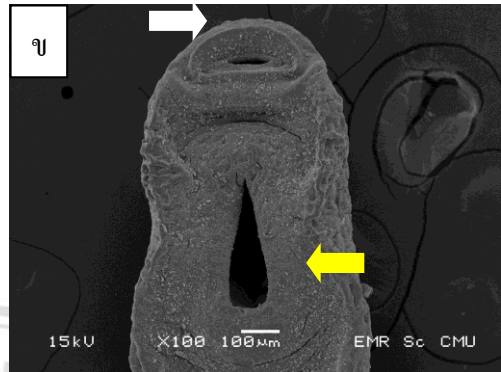
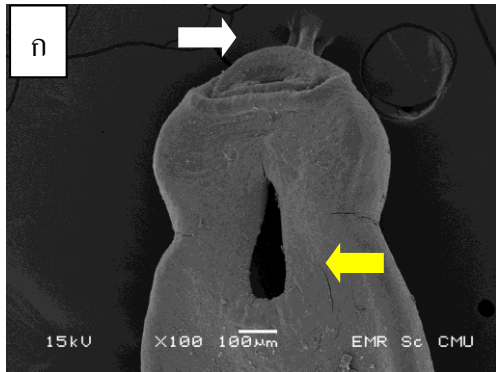
จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*

ผลการศึกษาลักษณะวิทยาของพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
เปรียบเทียบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. จากปลาสองชนิด

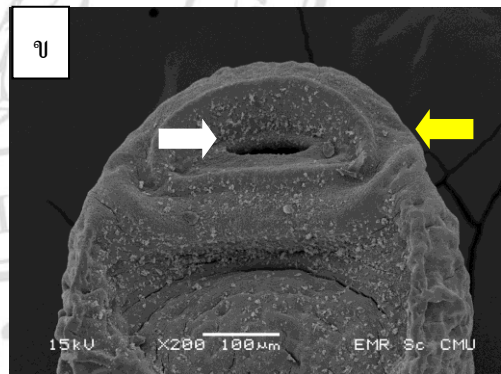
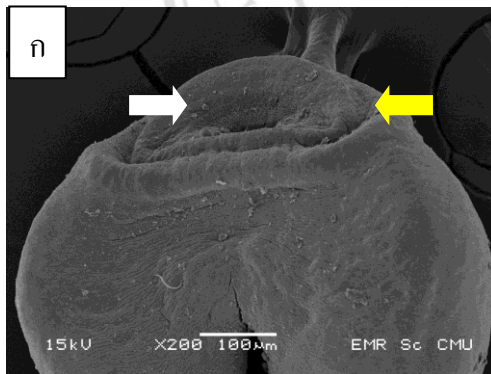


ภาพ 14 ภาพถ่ายแสดงลักษณะลำตัว

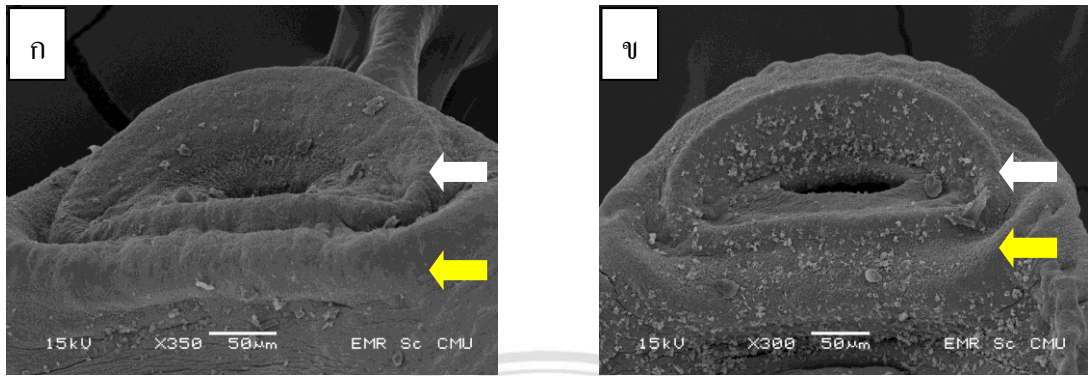
ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*



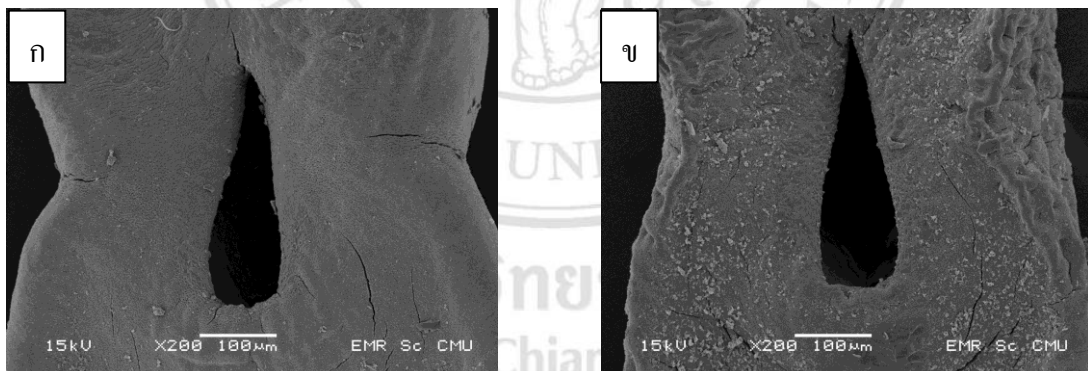
ภาพ 15 ภาพถ่ายส่วนหน้าของลำตัว (anterior part of body)
แสดงตำแหน่งของ oral sucker (ลูกครีสีขาว) และ acetabulum (ลูกครีสีเหลือง)
ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*



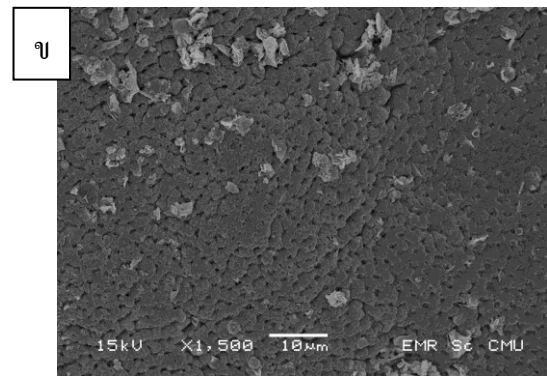
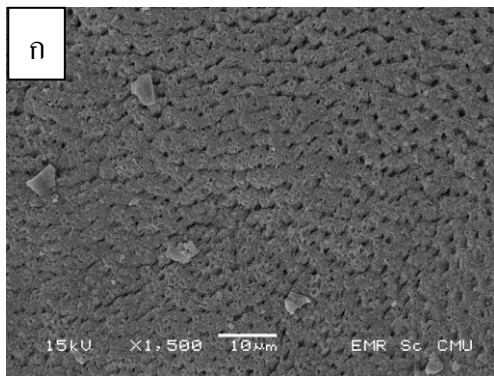
ภาพ 16 ภาพถ่ายแสดง oral sucker (ลูกครีสีขาว) และ collar like ring (ลูกครีสีเหลือง)
ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*



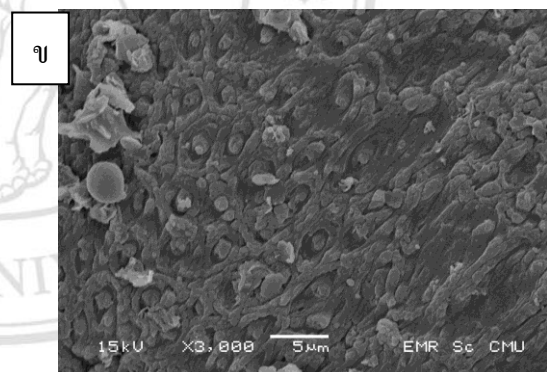
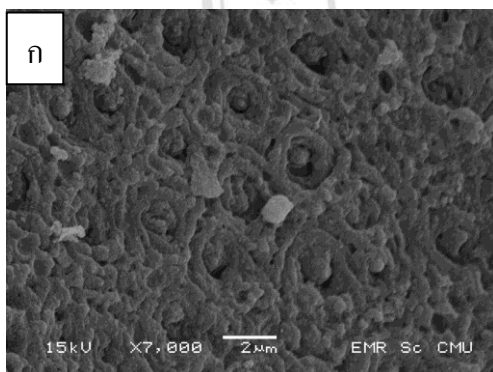
ภาพ 17 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของ collar like ring
ตำแหน่งของ inner collar like ring (ลูกศรสีขาว) และ outer collar like ring (ลูกศรสีเหลือง)
ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*



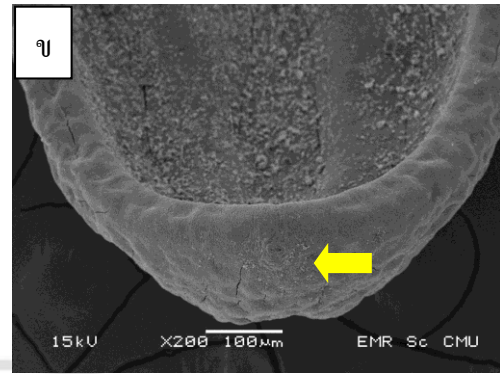
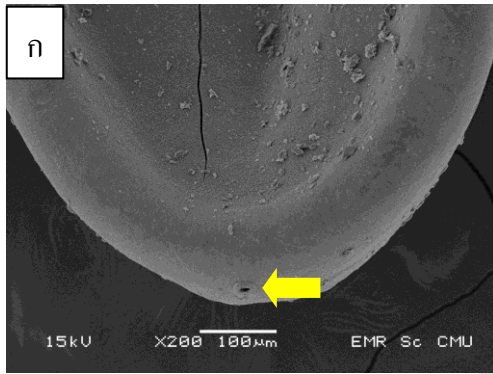
ภาพ 18 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของ acetabulum
ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*



ภาพ 19 ภาพถ่ายแสดงลักษณะพื้นผิวหนังตัวแสดงให้เห็น micro pore
 ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*



ภาพ 20 ภาพถ่ายแสดงลักษณะพื้นผิวหนังตัวแสดงให้เห็นลักษณะของ styloconic-like sensory papilla
 ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*



ภาพ 21 ภาพถ่ายแสดงส่วนท้ายของลำตัวแสดงตำแหน่งของ excretory pore (ลูกศรชี้)

ก. จากโฮสต์ *Anabas testudineus* ข. จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งไปยัง บริษัท Integrated DNA Technologies ประเทศสิงคโปร์ เมื่อได้ผลลำดับเบส ของเส้น 3S (forward) และ เส้น BD2 (reverse) นำทั้งสองเส้นมา align เข้าด้วยกัน เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำงานเพียงเส้นเดียว โดยการทำ reverse complement กับเส้น BD2 ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 แล้วตัดส่วนที่เป็นไพรเมอร์ออกไป ได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS2 ของ ที่มีขนาด 359 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

พยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. (CL1_3S)จากโฮสต์ *Anabas testudineus*

```
1   AATGTGACCT GCATACTGCT TTGAACATCG ACCTCTTGAA CGCATATTGC
51  GGCCGCAGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGG CCGAGGGTCG GCTTATAATC
101 TATCACGACG CACAATAAGT CGTGGCTTGG ATGTTGCCAG CTGGCGTGAT
151 TTCCCCTTGC TTAAAGTGGG GTGCCGGATC TATGGCTCCT TCCTAATGTG
201 CCAGCTACAC CCAAGTCCAA GGACAGGGTT GTGGTGGTGG AGAATGCTCG
251 GGTCTGTGGT TAATGAGATA AACGTTACG CCTGATGTCA TTGTCTATCA
301 TTGCACCCAT GTTCGGGCTT GCTCTGTAAC TGATGAATAT ATACAATACC
351 CTGACCTCG 359
```

พยาธิใบไม้ *Clinostomum* sp. (CL2_3S)จากโฮสต์ *Trichogaster trichopterus*

```
1   AATGTGACCT GCATACTGCT TTGAACATCG ACCTCTTGAA CGCATATTGC
51  GGCCGCAGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGG CCGAGGGTCG GCTTATAATC
101 TATCACGACG CACAATAAGT CGTGGCTTGG ATGTTGCCAG CTGGCGTGAT
151 TTCCCCTTGT TTAAAGTGGG GTGCCGGATC TATGGCTCCT TCCTAATGTG
201 CCAGCTACAC CCAAGTCCAA GGACAGGGTT GTGGTGGTGG AGAATGCTCG
251 GGTCTGTGGT TAATGAGATA AACGTTACG CCTGATGTCA TTGTCTGTCA
301 TTGCGCCCAT GTTCGGGCTG GCTCTGTAAC TGATGATTAT ATATATGACC
351 CTGACCTCG 359
```

จากนั้นทำการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์เข้ากับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) พบว่าตรงกับ ของ *Clinostomum complanatum* Accession No. FJ609420.1 ด้วยค่าความเหมือนเท่ากับ 94 % และ E value = $3e-159$ (ภาพ 22) และตรงกับของ *Clinostomum phalacrocoracis* No. FJ609422.1 ด้วยค่าความเหมือนเท่ากับ 93 % และ E value = $5e-157$ (ภาพ 23)

Clinostomum complanatum voucher 297/02 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [gb|FJ609420.1](#) Length: 4629 Number of Matches: 1

Range 1: 2565 to 2941 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
571 bits(632)	3e-159	354/377(94%)	18/377(4%)	Plus/Plus
Query 1	AATGTGACCTGCATACTGCTTTGAACATCGACCTCTTGAACGCATATTGCGGCCGCAGGA	60		
Sbjct 2565	AATGTGACCTGCATACTGCTTTGAACATCGACCTCTTGAACGCATATTGCGGCCGCAGGA	2624		
Query 61	TATCCTGTGGCCACGCCGTGGCCGAGGGTCGGCTTATAATCTATCAGACGCACAATAAGT	120		
Sbjct 2625	TATCCTGTGGCCACGCCGTGGCCGAGGGTCGGCTTATAATCTATCAGACGCACAATAAGT	2684		
Query 121	CGTGGCTTGGATGT-TGCCAGCTGGCGTGATTTCCC-CTTGCTTAAAGTGGGGTGCCGGA	178		
Sbjct 2685	CGTGGCTTGGATGTGTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCTTAAAGTGGGGTGCCGGA	2744		
Query 179	TCTATGGCTCCTTCCTAATGTG-CCAGCTACACCAAGTCCAA-----GGA	223		
Sbjct 2745	TCTATGGCTCCTTCCTAATGTGTCCAGCTACACTCAAGTCCAAAGATGATTTGATGGA	2804		
Query 224	CAGGGTTGTGGTGGTGGAGAATGCTCGGGTCGTGGCTTAATGAGATAAACGTTACGCCT	283		
Sbjct 2805	CAGGGTTGTGGTGGTGGAGAATGCTCGGGTCGTGGCTTAATGAGATAAACGTTACGCCT	2864		
Query 284	GATGTCATTGTCTATCATTGCACCCATGTTCTGGGCTTGCTCTGTAAGTATGATGAATA-TAT	342		
Sbjct 2865	GATGTCATTGTCTATCATTGCACCCATGTTCTGGGCTTGCTCTGTAAGTATGATGATAGTAT	2924		
Query 343	ACAATACCTGACCTCG	359		
Sbjct 2925	ATAATACCTGACCTCG	2941		

ภาพ 22 ข้อมูลการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ฐานข้อมูล Genbank
ตรงกับ ของ *Clinostomum complanatum*

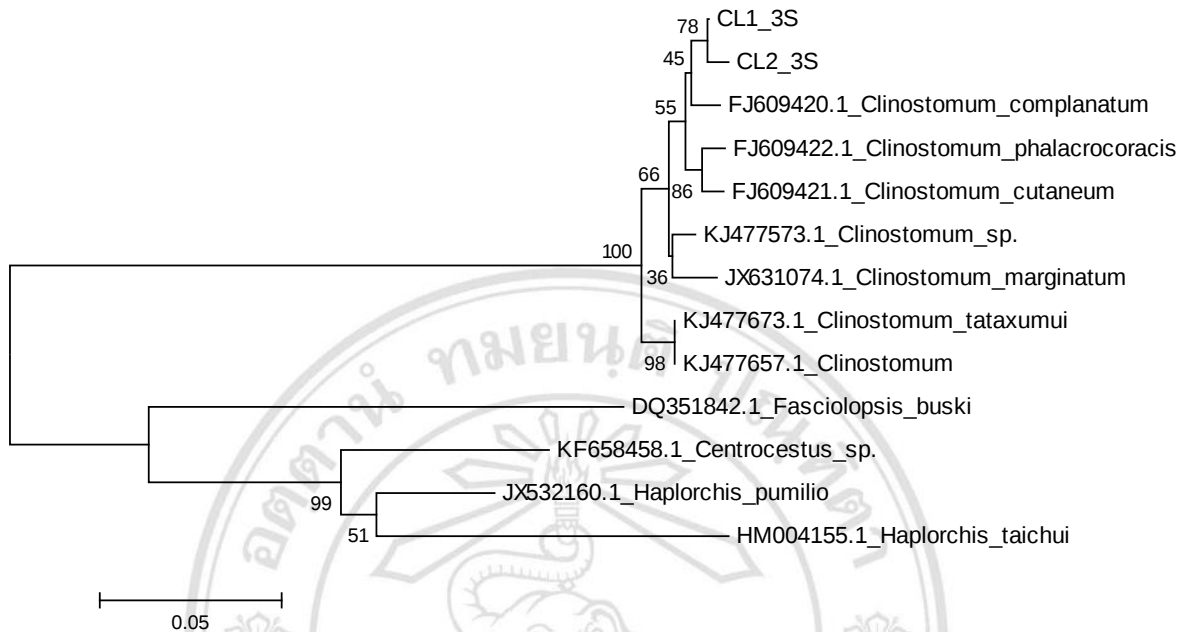
Clinostomum phalacrocoracis voucher 10/08 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [gb|FJ609422.1](#) Length: 4631 Number of Matches: 1

Range 1: 2564 to 2944 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

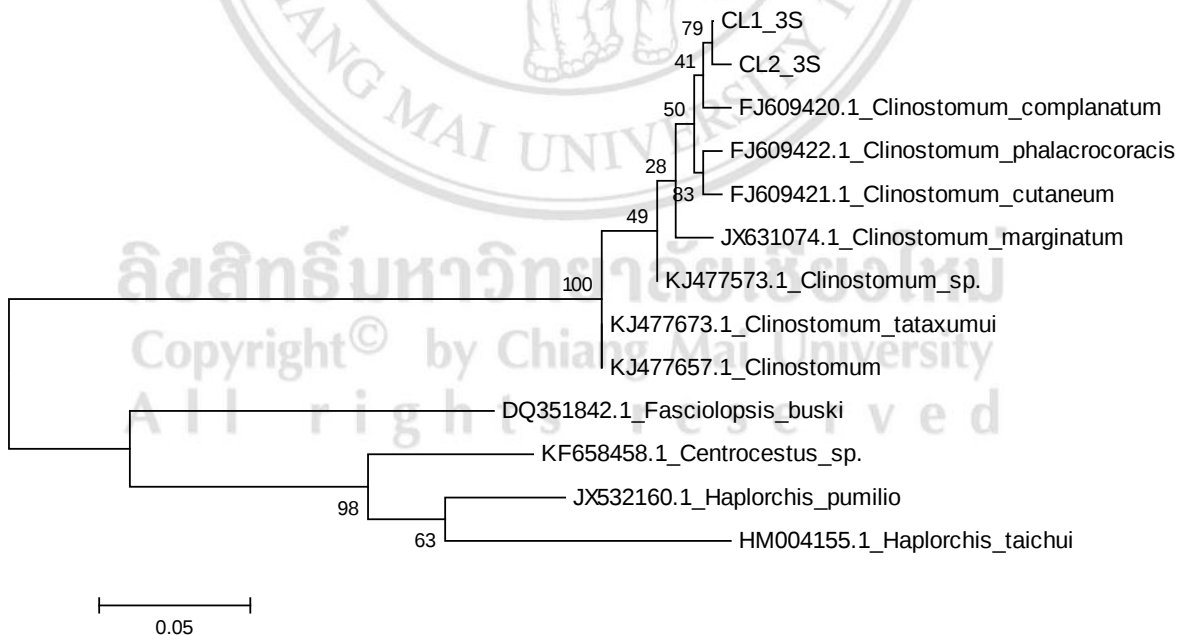
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
563 bits(624)	5e-157	354/381(93%)	22/381(5%)	Plus/Plus
Query 1	AATGTGACCTGCATACTGCTTTGAACATCGACCTCTTGAACGCATATTGCGGCCGCAGGA	60		
Sbjct 2564	AATGTGACCTGCATACTGCTTTGAACATCGACCTCTTGAACGCATATTGCGGCCGCAGGA	2623		
Query 61	TATCCTGTGGCCACGCCGTGGCCGAGGGTCGGCTTATAATCTATCAGACGCACAATAAGT	120		
Sbjct 2624	TATCCTGTGGCCACGCCGTGGCCGAGGGTCGGCTTATAATCTATCAGACGCACAATAAGT	2683		
Query 121	CGTGGCTTGGATGT-TGCCAGCTGGCGTGATTTCC-CCCTTGCTTAAAGTGGGGTGCCGGA	178		
Sbjct 2684	CGTGGCTTGGATGTGTGCCAGCTGGCGTGATTTCTCACTTGCTTAAAGTGGGGTGCCGGA	2743		
Query 179	TCTATGGCTCCTTCCTAATGTG-CCAGCTACACCAAGTCCAA-----GGAC	224		
Sbjct 2744	TCTATGGCTCCTTCCTAATGTGTCCAGCTACACCAAGTCCAAAGATGATTTGATGGAC	2803		
Query 225	AGGGTTGTGGTGGTGGAGAATGCTCGGGTCGTGGCTTAATGA-----GATAAACGTTCA	278		
Sbjct 2804	AGGGTTGTGGTGGTGGAGAATGCTCGGGTCGTGGCTTAATGAGAATGTGATAAACGTTCA	2863		
Query 279	CGCCTGATGTCATTGTCTATCATTGCACCCATGTTCTGGGCTTGCTCTGTAAGTATGAAT	338		
Sbjct 2864	CGCCTGATGTCATTGTCTATCATTGCACCCATGTTCTGGGCTTGCTCTGTAAGTATGATGAT	2923		
Query 339	ATATACAATACCTGACCTCG	359		
Sbjct 2924	ATATTAATACCTGACCTCG	2944		

ภาพ 23 ข้อมูลการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ฐานข้อมูล Genbank
ตรงกับ ของ *Clinostomum phalacrocoracis*

ผลการศึกษา Phylogenetic tree บริเวณตำแหน่ง ITS2 ร่วมกับพยาธิอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม Mega 6.0

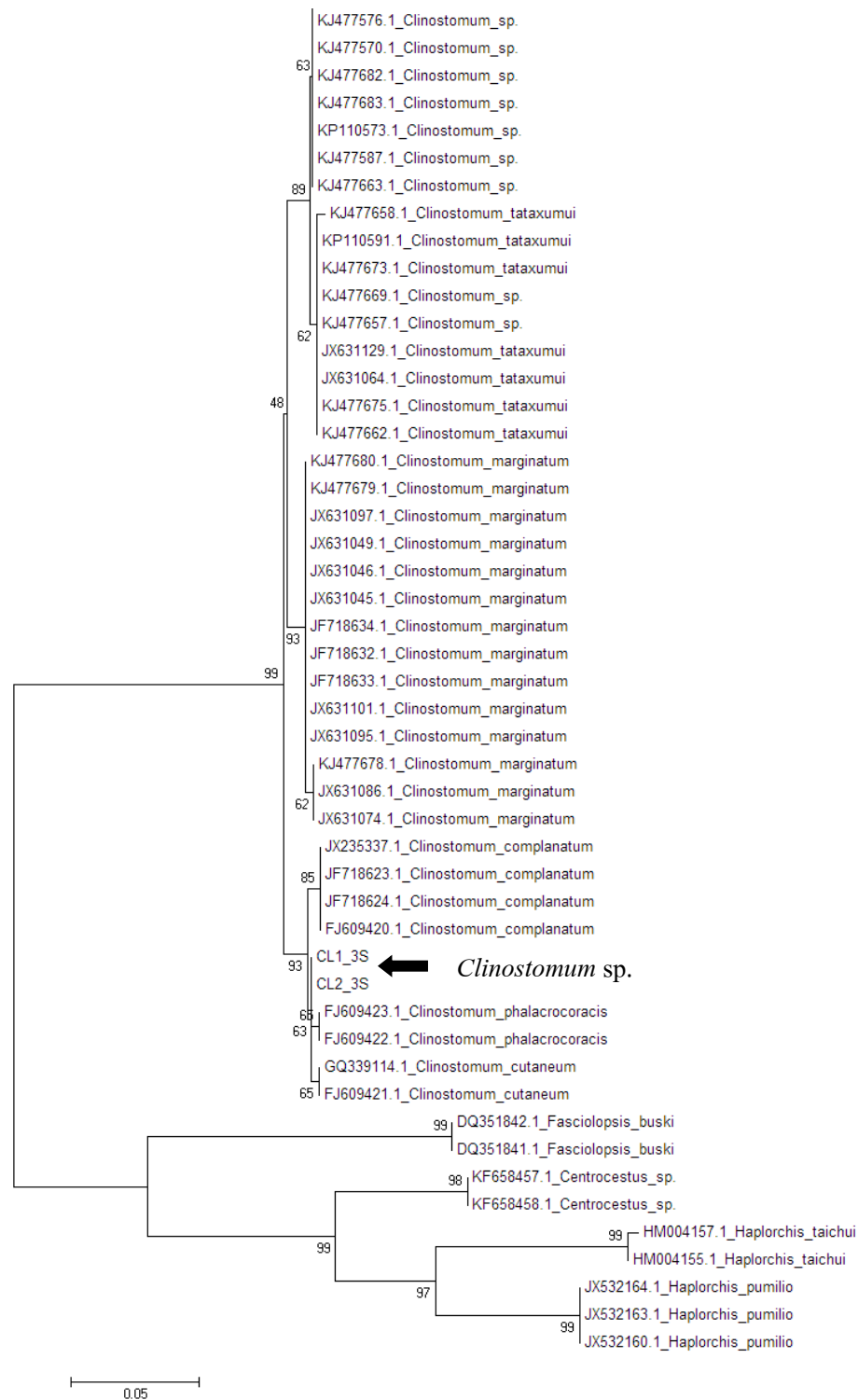


ภาพ 24 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี Neighbor Joining (NG)



ภาพ 25 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี Maximum Likelihood (ML)

ผลการศึกษา Phylogenetic tree บริเวณตำแหน่ง ITS2 ร่วมกับพยาธิอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม Phylip



ภาพ 26 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS2 ของพยาธิแต่ละชนิด โดยวิธี Maximum Likelihood (ML)