การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรียมสไลด์ถาวรจากระยะตัวอ่อน ของพยาธิใบไม้ในโฮสต์กึ่งกลางหอย *Lymnaea* spp.

Optimization and preparation of the permanent slides the larval Trematode collected from the 1st intermediate host, *Lymnaea* spp.

นางสาวช่อผกา พวงศรี ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

นางสาววาสนา เมืองวงค์ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

สังกัด คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยพะเยา

การพิจารณาโดยอาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาได้พิจารณาผลการศึกษางานวิจัยเพื่อการพิจารณางานประจำ เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรียมสไลด์ถาวรจากระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในโฮสต์กึ่งกลางหอย *Lymnaea* spp. (Optimization and preparation of the permanent slides the larval Trematode collected from the 1st intermediate host, *Lymnaea* spp.) ฉบับนี้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเพื่อการพัฒนางานประจำของมหาวิทยาลัยพะเยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอำไพ จ่าภา)

อาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณความกรุณา ผ.ศ. ดร.อรอำไพ จ่าภา อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่ให้ความช่วยเหลือทั้งกระบวนการเรียนรู้ ทั้งความคิดเห็น ข้อแนะนำและอุปกรณ์อื่น ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ กระทั่งช่วยแก้ไข้ปัญหาที่ติดขัดในขณะทำการศึกษาวิจัย ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง และให้ความทุ่มเทในการศึกษางานวิจัยแก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ธิดา ไชยวังศรี ประธานหลักสูตรจุลชีววิทยาที่คอยสนับสนุนและอนุญาตการใช้เครื่องมือและครุภัณฑ์ต่าง ๆของสาขาวิชา นอกจากนี้ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์สาขาจุลชีววิทยาทุกท่านที่สนับสนุนและคอยช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์และขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายผลการศึกษาวิจัยฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงอันจะเป็นประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากวิจัยฉบับนี้ ขอมอบแด่บุคคลที่เคารพทุกท่านที่กล่าวถึงอย่างเคารพยิ่งและหากมีข้อบกพร่องด้วยประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้ด้วย ความขอบคุณยิ่ง

ชื่อโครงการ ภาษาไทย: การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรียมสไลด์ถาวรจากระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในโฮสต์กึ่งกลางหอย *Lymnaea* spp.

ภาษาอังกฤษ: Optimization and preparation of the permanent slides the larval Trematode collected from the 1st intermediate host, *Lymnaea* spp.

หัวหน้าโครงการวิจัย (Prior Investigator)

ชื่อ-สกุล	นางสาวช่อผกา พวงศรี
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์
สังกัด (คณะ/กอง/วิทยาลัย/ศูนย์)	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
ที่อยู่	19 ม.2 คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา 56000
โทรศัพท์ภายใน	3886
E-mail address	chorpaka.phuangsri.9039@gmail.com

ผู้ร่วมวิจัย (Co-investigator)

ชื่อ-สกุล	นางสาววาสนา เมืองวงค์
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์
สังกัด (คณะ/กอง/วิทยาลัย/ศูนย์)	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
ที่อยู่	19 ม.2 คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา 56000
โทรศัพท์ภายใน	3887
E-mail address	was_koy139@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรียมสไลด์ถาวรจากระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในโฮสต์กึ่งกลางหอย *Lymnaea* spp. นอกจากนี้ตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้โดยใช้วิธี cercaria shedding โดยทำการสุ่มและเก็บหอย *Lymnaea* spp. ด้วยวิธี count per unit of time ได้ทั้งหมด 655 ตัว ณ บริเวณพื้นที่นาข้าวในหมู่บ้านสันกว๊าน หมู่ที่ 8 ตำบลบ้านตุ่น อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ผลการศึกษาพบว่าอัตราความชุกของหอยที่ติดเชื้อทั้งหมดร้อยละ 0.45 (3/655) โดยสามารถจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria เป็น 2 ชนิด คือ Gymnocepharous cercariae และ Furcocercous cercariae คิดเป็นอัตราความชุกของหอยที่ติดเชื้อร้อยละ0.15 (1/655) และ 0.31 (2/655) ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถเก็บพยาธิตัวอ่อนระยะ redia ได้อีกด้วย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสื่อสไลด์ถาวรตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ cercaria และระยะ redia พบว่าการติดสไลด์ที่ไม่ใช้ไข่ขาว ย้อมด้วยสี Ehrlich's hematoxylin (1:10) ระยะเวลา 5 นาทีและขั้นตอนการดึงน้ำด้วย 70% alcohol 80% alcohol 90% alcohol และ absolute alcohol ตามลำดับ เป็นสภาวะที่เหมาะสมการทำสื่อสไลด์ถาวร

งานวิจัยนี้สามารถผลิตสื่อสไลด์ถาวรตัวอ่อนของพยาธิใบไม้เพื่อใช้สาธิตตั้งกล้องจุลทรรศน์ในรายวิชาทางด้านปรสิตวิทยาต่อไป

คำสำคัญ: หอย *Lymnaea* spp. แบบ Gymnocepharous cercariae แบบ Furcocercous cercariae ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ cercaria ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ redia

Abstract

In this study, the permanent slide of Trematode larvae collected from the Lymnaeid snail was optimized in the preparation step. Additionally, the prevalence of the fluke cercaria in snail samples were determined by the fluke cercaria shedding method. A total of 655 snail samples were randomly collected from the rice field in San Kwan Village, Ban Tun Subdistrict, Muang District, Phayao by count per unit of time method. The overall prevalence of cercarial infection in *Lymnaea* spp was 0.45%(3/655). The infected snail was found to be infected by 2 types of cercariae including Gymnocepharous cercariae (0.15) and Furcocercous cercariae (0.31%). Besides, the redia larvae was also detected.

The optimization of the larvae permanent slide preparation was smeared without egg albumin and the larvae were stained by Ehrlich's hematoxylin (1:10) for 5 minutes. After that, they were subsequently dehydrated in 70%, 80%, 90% and absolute alcohol, respectively. In this study, the Trematodes larvae permanent slides of the cercaria and redia were prepared and could be used for demonstrating the morphology of larval trematodes in parasitology course.

Keyword: Lymnaeid *snail*, Gymnocepharous cercariae, Furcocercous cercariae, Cercaria, Redia

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 คำนิยามศัพท์	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยน้ำจืด	4
2.2 พยาธิใบไม้	5
2.3 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้	6
2.3.1. ระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้	7
2.4 การศึกษารูปร่างและลักษณะตัวอ่อนระยะ cercaria	10
2.4.1 โครงสร้างภายใน	10
2.4.2 ชนิดของตัวอ่อนระยะ cercaria	12
2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	18
3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	18
3.3 สารเคมี	20
3.4 พื้นที่ในการศึกษา	20
3.5 วิธีการเก็บตัวอย่าง	20
3.6 การตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในห้องปฏิบัติการ	21
3.7 การเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อของตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้	21

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
3.8 การทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอ่อน ระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้	21
3.8.1 สี Ehrlich's hematoxylin	21
3.8.2 สี Semichon's Acetic–carmine	22
3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ ระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	22
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล	22
4 ผลการทดลอง	**23**
4.1 การสำรวจพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp	23
4.2 การเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp	24
4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอย่างหอย	24
4.4 การตรวจหาระยะตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ โดยใช้เทคนิค cercariae shedding	25
4.5 การเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน	27
4.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวรของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้	29
4.6.1 การติดตัวอย่างบนสไลด์	29
4.6.2 ขั้นตอนการดึงน้ำ	29
4.6.3 ชนิดของสีย้อม	30
4.7 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนของกลุ่มพยาธิใบไม้	31
4.7.1 ถุงเก็บตัวอ่อน (redia)	31
4.7.2 กลุ่ม Furcocercouse cercariae	33
4.7.2.1. แบบ Brevifurcate–apharyngeate distome cercaria	33
4.7.2.2. แบบ Brevifurcate–apharyngeate monostome cercaria	33
4.7.3 กลุ่ม Gymnocepharous cercariae	34
4.8 ความชุกของการติดกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในหอย *Lymnaea* spp	35

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	36
5.1 สรุปผลการวิจัย	36
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	37
5.3 ข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	41
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	47
ประวัติผู้คณะผู้วิจัย	50

สารบัญรูปภาพ

ภาพ	หน้า
1 ภาพส่วนประกอบต่าง ๆ ของเปลือกหอยฝาเดียว	4
2 ภาพเปลือกหอย *Lymnaea* spp	5
3 ภาพรูปร่างลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้	6
4 ภาพวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ทั่วไป	7
5 ภาพตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในระยะต่าง ๆ	9
6 ภาพตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตัวอ่อนระยะ redia	10
7 ภาพลักษณะถุงขับถ่าย (excretory bladder) ของตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria	11
8 ภาพลักษณะท่อขับถ่าย (excretory tube) ของตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria	12
9 ภาพลักษณะตัวอ่อนระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้ชนิดต่าง ๆ	15
10 ภาพถ่ายทางอากาศบริเวณพื้นที่นาข้าวบ้านสันกว๊าน	23
11 ภาพบริเวณที่ศึกษาหอย *Lymnaea* spp	24
12 ภาพหอย *Lymnaea* spp. ที่นำมาทำการศึกษา	25
13 ภาพลักษณะตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ที่พบในหอย *Lymnaea* spp. ที่ติดเชื้อ	27
14 ภาพการเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน	28
15 ภาพการติดตัวอย่างบนแผ่นสไลด์	29
16 ภาพการสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนดึงน้ำ	30
17 ภาพการหาสภาวะที่เหมาะสมชนิดของสีย้อม	31
18 ภาพตัวอ่อนพยาธิระยะ redia จากตัวอย่างหอยที่ติดเชื้อ	32
19 ภาพถ่ายตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria	33
20 ภาพถ่ายตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria แบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria	34
21 ภาพถ่ายตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ของกลุ่ม Gymnocepharous cercariae	35

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
22 ภาพการเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp	47
23 ภาพการล้างตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. และการเตรียมตัวอย่างก่อนทำ cercaria shedding	47
24 ภาพวิธี cercaria shedding	48
25 ภาพการตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้	48
26 ภาพสื่อการเรียนการสอนตัวอย่างกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้	49

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

1 ตาราง 1 เปรียบเทียบหอย *Lymnaea* spp. ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ 26

2 ตาราง 2 การเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ 28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (Research rationale)

โรคปรสิตหนอนพยาธิยังคงเป็นปัญหาสำคัญของระบบสาธารณสุขของประเทศไทย ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพประชาชน โดยเฉพาะกลุ่มพยาธิใบไม้ เช่น พยาธิใบไม้ในปอด พยาธิใบไม้ลำไส้ พยาธิใบไม้ตับและพยาธิใบไม้เลือด เป็นต้น พยาธิใบไม้สามารถพบได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ซึ่งสามารถติดต่อและแพร่กระจายได้โดยพยาธิตัวเต็มวัยจะออกไข่ปนมากับอุจาระของโฮสต์นั้นก็คือมนุษย์และสัตว์ หากอุจจาระตกลงสู่แม่น้ำ ระยะตัวอ่อนพยาธิจะฟักออกจากไข่แล้วไชเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์กึ่งกลางลำดับที่ 1 นั้นก็คือ หอยน้ำจืด และสามารถพัฒนาเป็นระยะอื่นไปสู่โฮสต์กึ่งกลางลำดับที่ 2 ต่อไป ซึ่งระยะติดต่อคือ ระยะ cercaria สามารถไชผ่านผิวหนังของมนุษย์และสัตว์ได้ ดังนั้นหอยน้ำจืดจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อวงจรชีวิตที่ซับซ้อนของพยาธิใบไม้

ปัจจุบันตัวอย่างระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้หายากและไม่มีจำหน่ายทั่วไป ซึ่งรายวิชาปรสิตวิทยาและรายวิชาเทคนิคทางปรสิตวิทยามีการเรียนการสอนหัวข้อเรื่อง การตั้งแสดงตัวอย่างระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้และการผึกปฏิบัติทำสไลด์ถาวรระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ทำให้นิสิตไม่สามารถเรียนภาคปฏิบัติได้จริงในหัวข้อดังกล่าว ดังนั้นคณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าการตรวจหาระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้มีประโยชน์และมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อใช้เป็นสื่อสำหรับการเรียนการสอนทางด้านปรสิตวิทยา

นอกจากนี้สไลด์ถาวรระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้มีราคาแพงต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศและบางระยะไม่มีจำหน่าย ทำให้ไม่สามารถจัดตั้งสาธิตกล้องจุลทรรศน์ในบางระยะได้อีกทั้งสไลด์ถาวรที่มีในปัจจุบันของสาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยามีสภาพค่อนข้างชำรุดและไม่เพียงพอต่อการเรียนการสอน บางครั้งมีการเรียน-การสอนปฏิบัติการหลายห้องพร้อมกัน ทำให้การสาธิตตั้งกล้องจุลทรรศน์สไลด์ถาวรระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้มีจำนวนจำกัดและไม่เพียงพอ นิสิตบางห้องไม่สามารถศึกษาสไลด์จากตัวอย่างจริง และศึกษาลักษณะรูปร่างจากแผ่นภาพที่ติดแสดงสาธิตเท่านั้น

ทางคณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าการตรวจหาระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืดอาจจะพบระยะตัวอ่อนหลากหลายระยะเพื่อนำมาเตรียมเป็นสื่อการเรียนการสอนทางด้านปรสิตวิทยาและสามารถผลิตสื่อการสอนสไลด์ถาวรระยะตัวอ่อนพยาธิใบไม้ได้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย (Objectives)

1. เพื่อตรวจหาระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้จากหอยที่ติดเชื้อเพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอนทางด้านปรสิตวิทยา

2. เพื่อผลิตสื่อการเรียนการสอนสไลด์ถาวรระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้

1.3 ขอบเขตการวิจัย (Scope of the study)

1. ตรวจหาหอยที่ติดเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. จากแหล่งน้ำ

2. ระยะตัวอ่อนที่ปล่อยออกจากหอยที่ติดเชื้อจะใช้เป็นสื่อการเรียนการสอนทางด้านปรสิตวิทยา

1.4 นิยามศัพท์ (Terms or Definitions)

คำศัพท์	ความหมาย
Body	ส่วนลำตัวของตัวอ่อนระยะ cercaria
Cercaria	ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ ซึ่งเจริญ redia หรือ sporocyst และเป็นระยะสุดท้ายของตัวอ่อนที่เจริญในหอย
Eyespot	ส่วนตาของพยาธิใบไม้
Finfold	ครีบของพยาธิใบไม้ระยะ cercaria ที่มีลักษณะแผ่นบางใส
Fork tail	พยาธิใบไม้ของกลุ่ม Furcocercous cercariae ที่มีหาง 2 แฉก
Fluke / Trematodes	กลุ่มหนอนพยาธิใบไม้
Germinal Cells	เซลล์ที่เจริญที่พบการกระจายตัวจำนวนมากในระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้
Intermediate hosts	โฮสต์ตัวกลางที่ปรสิตเข้าไปอาศัยส่วนหนึ่งของร่างกาย แล้วปรสิตเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากระยะหนึ่งสู่ระยะหนึ่ง
Metacercaria	ตัวอ่อนระยะ cercaria เปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น cyst
Miracidium	พยาธิตัวอ่อนซึ่งมีขนรอบๆ ตัวซึ่งฟักออกจากไข่พยาธิใบไม้
Oral Sucker	อวัยวะยึดเกาะรอบปากส่วนบน
Permanent Slide	การเก็บรักษาสภาพสไลด์ตัวอย่างให้มีอายุยาวนานขึ้น

คำศัพท์	ความหมาย
Redia	ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ที่เจริญมาจาก sporocyst มีรูปร่างเป็นถุง ภายในตัวมีหลอดอาหารและส่วนที่เจริญเป็นลำไส้ มีผนังบางและกล้ามเนื้อคอหอยภายในช่องว่างลำตัว
Sporocyst	ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้โดยเปลี่ยนแปลงมาจาก miracilium ที่มีรูปร่างเป็นถุง ภายในมี germ cell
Tail	หางของตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ของระยะ cercaria
Ventral Sucker	อวัยวะยึดเกาะส่วนท้อง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สื่อการเรียนการสอนระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้เพื่อใช้ในรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับทางด้านปรสิตวิทยา

2. สื่อสไลด์ถาวรระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้เพื่อใช้ในรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับทางด้านปรสิตวิทยา

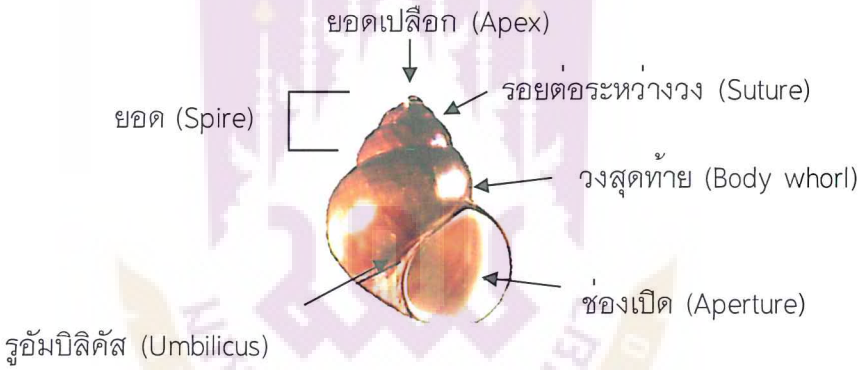
3. ประหยัดงบประมาณของมหาวิทยาลัยและคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยน้ำจืด

หอยน้ำจืดฝาเดียวเป็นโฮสต์กึ่งกลางลำดับที่ 1 ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกสามารถจัดจำแนก ได้แก่ ลักษณะรูปร่างเปลือก การขดวนของเปลือก สี ลวดลายบนผิวเปลือก ขนาดส่วนต่าง ๆ ของเปลือก และการมีฝาปิดปากเปลือก เป็นต้น ซึ่งนักสังขวิทยาได้ทำการจัดจำแนกกลุ่ม และชนิดพันธุ์ของหอยฝาเดียวจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกหอย (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)



ภาพ 1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเปลือกหอยฝาเดียว

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาหอย *Lymnaea* spp. จัดอยู่ใน family Lymnaeidae ซึ่งเป็นหอยน้ำจืดฝาเดียว เปลือกมีรูปร่างทรงกรวยยาวคล้ายเข็ม บางชนิดทรงคล้ายฝาชี เปลือกมีสีน้ำตาลและสีดำ ส่วนบริเวณปากกว้างวนเป็นเกลียวสั้น (ภาพ 2) พบทั่วไปในแหล่งน้ำจืด บ่อ สระ แม่น้ำ ลำธาร คู คลองและทะเลสาบ เป็นต้น มีขนาด 0.5–1.8 × 0.8–3.0 เซนติเมตร หอย *Lymnaea* spp. ที่จัดอยู่ใน Genus *Radix* ซึ่งในประเทศไทยพบ 3 species คือ

1. *Radix rubiginosa* เป็นโฮสตกึ่งกลางตัวที่หนึ่งของพยาธิใบไม้ตับในโคและกระบือ คือพยาธิ *Fasciola gigantica* นอกจากนี้ยังเป็นโฮสตกึ่งกลางของพยาธิใบไม้เลือดของสัตว์ด้วย เช่น *Schistosoma incognitum, Trichobilharzia maegraithi, Orientobilharzia harinasutai* ซึ่ง

ตัวอ่อนระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้เลือดของสัตว์เหล่านี้ สามารถไชผ่านผิวหนังของคนได้ แต่ไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยในคนได้ จึงก่อให้เกิด ผิวหนังอักเสบและมีอาการคัน (cercarial dermatitis) ชาวชนบทจึงเรียกหอยชนิดนี้ว่า “หอยคัน” หอยเหล่านี้พบได้ทั่วไปในประเทศไทย

2. *Radix swinhoei* เป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* และ *Echinastoma ilocanum* หอยชนิดนี้พบในภาคเหนือของประเทศไทย เช่น แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงรายและน่าน พบในประเทศเพื่อนบ้าน ได้แก่ พม่า ลาว จีนและญี่ปุ่นและ

3. *Radix luteola* พบในศรีลังกา พม่า จีนและในประเทศไทยพบมากที่ อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช (พีรพล, 2553)

ปากเปลือก เปลือกด้านหลัง

ภาพ 2 เปลือกหอย *Lymnaea* spp.

2.2 พยาธิใบไม้ (fluke or digenetic trematode)

พยาธิใบไม้ที่สำคัญทางการแพทย์จัดอยู่ใน Phylum Platyhelminthes อยู่ใน Class Trematoda Subclass Digenea มีรูปร่างทั่วไปแบน รูปรีเหมือนใบไม้ หรือยาวเรียวทางด้านหน้า (anterior) และป้านทางด้านท้าย (posterior) ลำตัวแบนจากบนลงล่าง (dorsoventrally flatten) ไม่มีช่องว่างภายในลำตัว มีอวัยวะที่ใช้ยึดเกาะเป็นกล้ามเนื้อที่แข็งแรง เรียกว่า sucker ส่วนใหญ่พบสองชนิด คือ oral sucker อยู่ปลายด้านหน้าล้อมรอบช่องปาก และ ventral sucker (acetabulum) ซึ่งอยู่ทางด้านท้อง มีอวัยวะเพศผู้และเพศเมียอยู่ในตัวเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ มีระบบประสาท ระบบขับถ่าย ระบบสืบพันธุ์พัฒนาดีและสมบูรณ์ การสืบพันธุ์ของพยาธิใบไม้มี 2 แบบ คือระยะตัวเต็มวัยมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ส่วนระยะตัวอ่อนมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ดังนั้นจึงเรียกพยาธิในกลุ่มนี้ว่า Digenea (ภาพ 3)

2.2.1 การจำแนกประเภทของพยาธิใบไม้

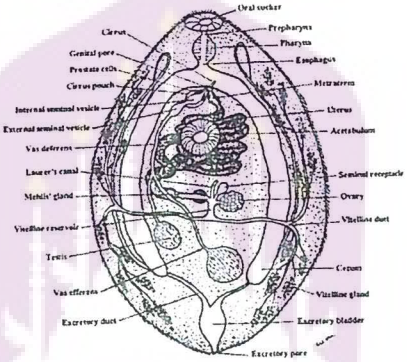
จัดจำแนกได้ตามอวัยวะที่พยาธิตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ ดังต่อไปนี้

– พยาธิใบไม้ลำไส้ (Intestinal fluke) ตัวเต็มวัยของพยาธิไปอาศัยในลำไส้ซึ่งอาจพบในลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็ก

– พยาธิใบไม้ตับ (Liver fluke) ตัวเต็มวัยของพยาธิไปอาศัยในทางเดินน้ำดีหรือท่อน้ำดีในตับ

– พยาธิใบไม้ปอด (Lung fluke) ตัวเต็มวัยของพยาธิไปอาศัยในปอด

– พยาธิใบไม้เลือด (Blood fluke) ตัวเต็มวัยของพยาธิไปอาศัยในเส้นเลือดดำ



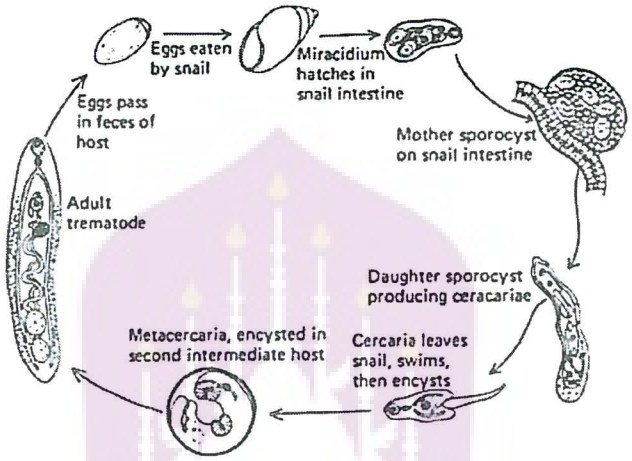
ภาพ 3 รูปร่างลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้

ที่มา: Schell, (1970). How to know the Trematode, p.12

2.3 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้

พยาธิใบไม้ตัวเต็มวัยสามารถอาศัยอยู่ในร่างกายของโฮสต์จำเพาะ (definitive host) ทั้งคนและสัตว์จะมีการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ และออกไข่บริเวณอวัยวะที่อาศัยอยู่ ไข่ออกสู่ภายนอกร่างกายโฮสต์โดยปนออกมากับอุจจาระ เสมหะ หรือปัสสาวะ เมื่อไข่ลงสู่แหล่งน้ำจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ miracidium เข้าไปอาศัยอยู่ในตัวหอย ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 (first intermediate host) แล้วเจริญเป็นระยะ sporocyst บริเวณลำไส้และระบบสืบพันธุ์ของหอย หรือเจริญไปเป็นระยะ daughter sporocyst สำหรับพยาธิใบไม้ในเลือดจะมีระยะ sporocyst 2 ระยะ แล้วแต่ชนิดของพยาธิ ส่วนพยาธิใบไม้ชนิดอื่นจะเจริญต่อไปเป็นระยะ redia และ cercaria เมื่อ cercaria เจริญเต็มที่จะไชออกจากหอยว่ายอยู่ในน้ำ เมื่อพบโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 (second intermediate host) เช่น กุ้ง หอย ปู ปลา จะไชเข้าไปและสลัดหางทิ้งแล้วสร้างถุงซีสต์

กลายเป็นตัวอ่อนระยะ metacercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อ เมื่อโฮสต์จำเพาะ (definitive host) มากินตัวอ่อนระยะติดต่อเข้าไป ตัวอ่อนพยาธิจะออกจากถุงซีสต์บริเวณส่วนบนหรือส่วนต้นของลำไส้เล็ก แล้วเดินทางต่อไปยังอวัยวะที่พยาธิใบไม้เหล่านั้นจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย (ภาพ 4) ยกเว้นตัวอ่อนระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้ในเลือดเป็นระยะติดต่อที่สามารถติดต่อเข้าสู่โฮสต์สุดท้ายได้เลยโดยไม่ต้องผ่านโฮสต์กึ่งกลางที่ 2 ด้วยวิธีไชเข้าทางผิวหนังโดยตรง



ภาพ 4 วงจรชีวิตโดยทั่วไปของพยาธิใบไม้

ที่มา: Schell, (1970). How to know the Trematode, p.7

2.3.1 ระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้

1) ระยะไข่ (egg) พยาธิใบไม้แต่ละชนิดมีรูปร่างและขนาดไข่แตกต่างกัน บางชนิดไข่ขนาดเล็ก บางชนิดไข่ขนาดใหญ่ มีฝาปิดเปลือกไข่ (operculum) หรือมีหนามยื่นจากเปลือกไข่ (spine) ไข่พยาธิบางชนิดเมื่อเจริญเต็มที่จะมีตัวอ่อนระยะ miracidium อยู่ภายในไข่เรียก embryonated egg ส่วนบางชนิดไม่มีตัวอ่อนระยะ miracidium ภายในไข่เรียกว่า unembryonated egg (ภาพ 5)

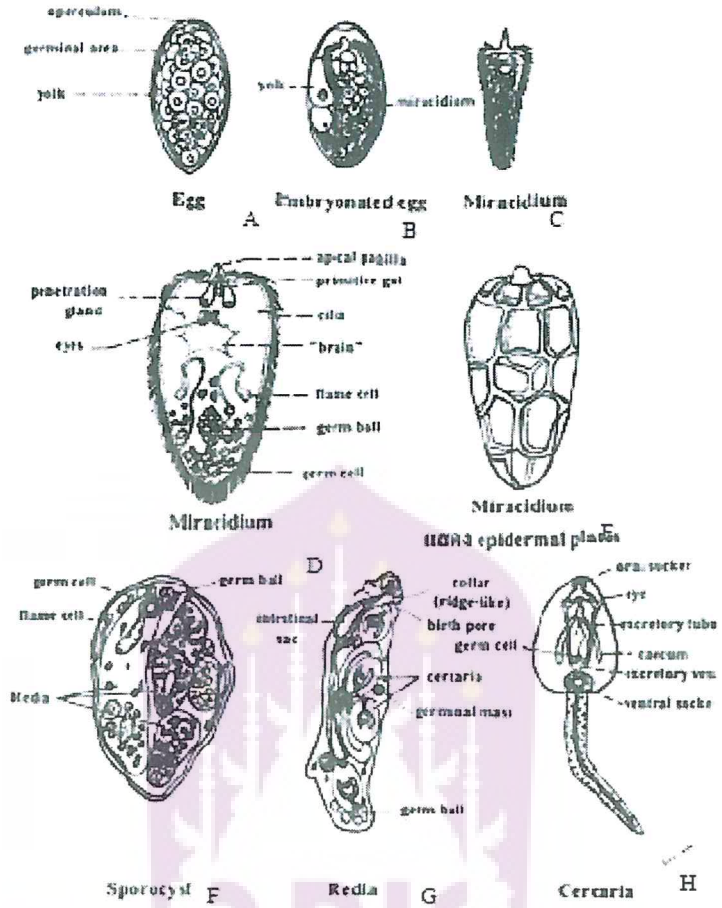
2) ตัวอ่อนระยะ miracidium มีรูปร่างคล้ายกระสวย มีขนซิเลียอยู่รอบตัวช่วยในการว่ายน้ำ (ภาพ 5) ส่วนด้านหน้ามีต่อมขับน้ำย่อย (penetration gland) ออกมา เพื่อช่วยในการไชเข้าสู่หอยซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางขณะที่ไชเข้าสู่หอยก็จะสลัดขนซิเลียรอบตัวทิ้งแล้วเดินทางเข้าสู่อวัยวะภายในของหอย และเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ sporocyst

3) ตัวอ่อนระยะ sporocyst จะเจริญในบริเวณส่วนลำไส้ของหอย มีลักษณะเป็นถุงผนังบางภายในมี germ cells ระยะ sporocyst เจริญต่อไปเป็นระยะ redia (ภาพ 5)

4) ตัวอ่อนระยะ redia มีรูปร่างเป็นถุง มีปาก คอหอยและลำไส้ ลักษณะรูปถุงเรียวยาว มี germinal cells เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตตัวอ่อนระยะ redia ในบางครั้งระยะ redia อาจผลิต daughter redia (ภาพ 5 และภาพ 6) ตัวอ่อนระยะนี้จะมีรูปร่างลักษณะเหมือนเดิม

5) ตัวอ่อนระยะ cercaria เป็นตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ที่เจริญมาจากเซลล์ระยะ redia หรือระยะ sporocyst เป็นตัวอ่อนระยะสุดท้ายที่เจริญในหอย ตัวยาวรี มีหาง รูปร่างลักษณะทั่วไปคล้ายกับตัวเต็มวัย มี oral sucker และ ventral sucker ลำไส้แยกเป็นสองแฉก เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะไชออกจากหอยว่ายไปมาในน้ำเพื่อจะหาโฮสต์ที่เหมาะสมต่อไป (ภาพ 5)

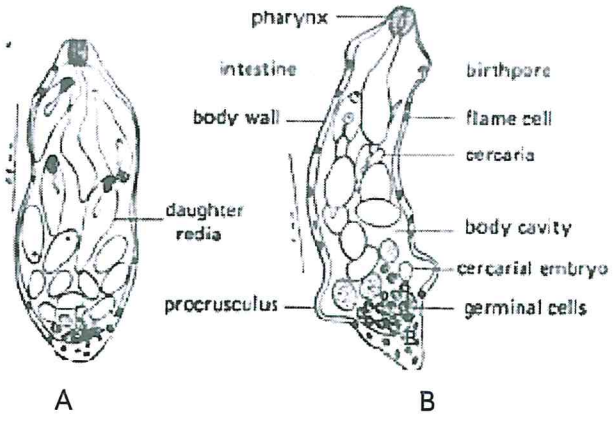
6) ตัวอ่อนระยะ metacercaria เกิดจากระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้จะเข้าไปเจริญในโฮสต์ตัวกลางตัวที่ 2 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์น้ำ เมื่อระยะ cercaria ไชเข้าสู่โฮสต์จะสลัดหางทิ้งและสร้างถุงหุ้มตัวไว้ (encystaion) มีรูปร่างกลม เปลือกหนา และมีตัวอ่อนอยู่ภายในระยะ metacercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อของโฮสต์สุดท้าย



ภาพ 5 ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในระยะต่าง ๆ

(A) ระยะ Unembryonated egg
(B) ระยะ Embryonated egg
(C) ตัวอ่อนระยะ miracidium
(D) ตัวอ่อนระยะ miracidium
(E) ตัวอ่อนระยะ miracidium
(F) ตัวอ่อนระยะ sporocyst
(G) ตัวอ่อนระยะ redia
(H) ตัวอ่อนระยะ cercaria

ที่มา: วันชัย มาลีวงษ์ ผิวพรรณ มาลีวงษ์ และนิมิต มรกต, (2544). ปรสิตทางการแพทย์: โปรโตซัวและหนอนพยาธิ, น.156



ภาพ 6 ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตัวอ่อนระยะ redia

(A) ระยะ mother redia (B) ระยะ daughter redia

ที่มา: Schell, (1970). How to know the Trematode, p.19

2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนระยะ cercaria

2.4.1 โครงสร้างภายใน

1) ส่วนบริเวณลำตัว โดยทั่วไปตัวอ่อนระยะ cercaria จะมีลำตัวใส มองเห็นลักษณะเด่นของอวัยวะภายในชัดเจนแต่ส่วนมากจะพบว่า pigment granules มาปิดบัง เช่น กลุ่ม Heterophyidae, Monostome และมี cystogenous gland มาปิดบังในบางชนิดจึงมองไม่เห็นอวัยวะภายในชัด ทำให้ลำตัวทึบ เช่น ในกลุ่มของพยาธิใบไม้ตับ

2) อวัยวะดูดเกาะ (sucker) เป็นอวัยวะสำหรับยึดเกาะ มีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อแข็งแรง รูปร่างคล้ายถ้วยมี 2 ชนิด ได้แก่ oral sucker ลักษณะคล้ายเนื้อล้อมช่องปาก ส่วนใหญ่อยู่ทางด้านบนสุดของลำตัวที่เจริญสมบูรณ์ ในตัวอ่อนระยะ cercaria บางชนิด oral sucker จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น virgular organ เช่นในกลุ่ม Xiphidiocercariae หรือบางชนิดเปลี่ยนรูปร่างคล้ายลูกแพร์ เช่น ในกลุ่ม Furcocercous cercariae มี ventral sucker, acetabulum ส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณด้านท้องกลางลำตัว ยกเว้นในกลุ่ม Amphistome cercariae ซึ่งจะอยู่ด้านท้ายสุดของลำตัว ระยะ cercaria ส่วนมากจะมี ventral sucker ยกเว้นในกลุ่ม Monostome cercariae

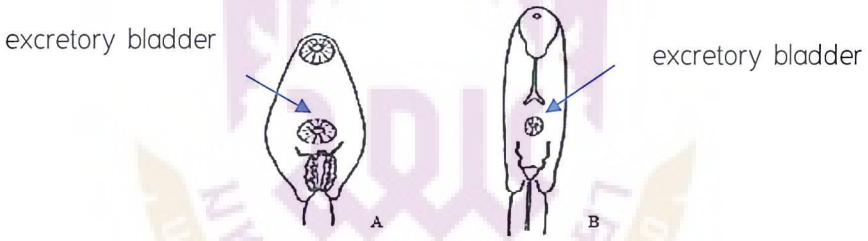
3) ช่องทางเดินอาหาร (alimentary canal) เป็นระบบทางเดินอาหารเริ่มตั้งแต่ปาก > Prepharynx > Pharynx > Esophagus > Intestine ในแต่ละอวัยวะนั้นจะต้องพิจารณาทั้งรูปร่างและขนาดและอาจพบว่าไม่มีอวัยวะบางอย่าง เช่น ในกลุ่ม Schistosomatidae ไม่พบ pharynx

4) ระบบขับถ่าย (excretory system) เป็นระบบที่เจริญสมบูรณ์ อยู่ทางส่วนท้ายของลำตัวเป็นอวัยวะที่พิจารณาได้ยากมาก ระยะ cercaria จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจหา แบ่งระบบขับถ่ายได้ 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ถุงขับถ่าย (excretory bladder) เป็นอวัยวะที่มีช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ส่วนกลางของลำตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (ภาพ 7)

- Thin walled, non-epithelial bladder เป็นถุงผนังเซลล์บาง รูปร่างเซลล์แบน (flat cells) เช่น กลุ่ม Furcocercous cercariae, Echinostome cercariae, Monostome cercariae, Amphistome cercariae

- Thick walled, epithelial bladder เป็นถุงผนังเซลล์หนา รูปร่างเซลล์แบบ cuboidal cell เช่น กลุ่ม Xiphidiocercariae, Microcercous cercariae และ Heterophyidae



ภาพ 7 ลักษณะถุงขับถ่าย (excretory bladder) ของตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria

(A) Thick walled, epithelial bladder ถุงผนังเซลล์หนา รูปร่างเซลล์แบบ cuboidal cell

(B) Thin walled, non-epithelial bladder ถุงผนังเซลล์บาง รูปร่างเซลล์แบน (flat cells)

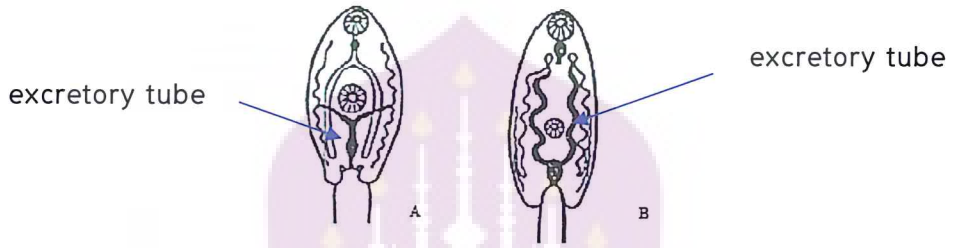
ที่มา: Schell, (1970). How to know the Trematode, p.20

ส่วนที่ 2 ท่อขับถ่าย

- Mesostomate ลักษณะมีท่อ primary excretory หลัก 1 คู่ (main excretory tube) โดยเริ่มจากถุงขับถ่ายไปทางด้านหน้าจนถึงกึ่งกลางลำตัว แล้วแยกออกไป 2 ทาง ซ้ายและขวาและแต่ละทางแยกออกไปทางด้านหน้า (anterior) และด้านหลัง (posterior) แล้ว

แตกแขนงออกเป็นท่อเล็ก ๆ (Third excretory) มี flame cell ติดอยู่ที่ปลายแขนง เช่น ในกลุ่ม Xiphidiocercariae, Gymnocepharous cercariae

– Stenostomate ท่อ primary excretory หลักมี 1 คู่ เริ่มจากถุงขับถ่ายไปทางด้านหน้าเกือบถึง oral sucker แล้วเปลี่ยนเป็นท่อเล็ก (secondary excretory) กลับมาด้านหลัง แล้วแตกเป็นท่อเล็ก ๆ (third excretory) ไปด้านหน้า (anterior) 1 ท่อ ไปทางด้านหลัง (posterior) 1 ท่อและแตกแขนงเล็ก ๆ มี flame cell ติดอยู่ที่ปลายแขนง เช่น ในกลุ่ม Echinostome cercariae, Monostome cercariae, Amphistome cercariae



ภาพ 8 ท่อระบบขับถ่าย (excretory tube)

(A) ภาพท่อระบบขับถ่ายแบบ Mesostomate: excretory tube เริ่มต้นจากด้านหน้าจนถึงกึ่งกลางลำตัวแล้วแยกสายไปด้านขวาและซ้าย

(B) ภาพท่อระบบขับถ่ายแบบ Stenostomate: excretory tube เริ่มต้นจากด้านหน้าจนเกือบถึง oral sucker

ที่มา: Schell, (1970). How to know the Trematode, p.20

2.4.2 ชนิดของตัวอ่อนระยะ cercaria

การจัดจำแนกกลุ่มของ cercaria สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะของอวัยวะต่าง ๆได้ 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 cercaria ที่มีหางยาว

1) Furcocercous cercaria เป็น cercaria ที่มีลักษณะเด่นคือ หางเป็นแฉก หรือหางส้อม (fork tail) มี oral sucker และ ventral sucker เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยจะจัดเป็นกลุ่มเดียวมีการแยกเพศผู้และเพศเมียอยู่คนละตัว เป็นพยาธิใบไม้ที่มีรูปร่างเรียวยาวคล้ายเรือ (boat shape) การเจริญเติบโตในหอยพบว่าตัวอ่อนระยะ miracedium จะไชเข้าสู่หอยที่เหมาะสมแล้วพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะ sporocyst 2 รุ่น จากนั้นจะพัฒนาต่อไปเป็นตัวอ่อนระยะ cercaria

ออกจากหอย ซึ่งเป็นระยะติดต่อที่ไชเข้าคนหรือสัตว์โดยตรงต่อไป cercaria กลุ่มนี้สามารถแยกออกได้ 2 ชนิดได้แก่

– ชนิดที่ 1 cercaria แบบมี pharynx มีลักษณะเด่นคือ หางมีปลายแฉก (furcae) ซึ่งจะยาวกว่าส่วนตัวหาง หรือได้สัดส่วนกับตัวหาง ส่วนลำตัวของ cercaria มีลักษณะกลมรี มี pharynx, ventral sucker, oral sucker, intestinal caeca สมบูรณ์ พบ penetration gland อย่างน้อย 1 ชนิด ภายในลำตัวมีถุงขับถ่าย (excretory bladder) แบบบาง (thin–epithelium) มี excretory pores เปิดใกล้ๆ กับบริเวณหางแฉกทั้งสองข้าง eye spot อาจมี pigment หรือไม่มี ระบบขับถ่ายเป็นแบบ mesostomate มีครีบ (fin fold) ที่ปลายหางแฉก

– ชนิดที่ 2 cercaria แบบไม่มี pharynx มีลักษณะที่ส่วนของปลายหางแฉกจะสั้นกว่าส่วนตัวหาง ลำตัวมีลักษณะกลมรี มี oral sucker ซึ่งได้ถูกเปลี่ยนแปลงมาจาก extensile penetration organ สามารถมองเห็น intestinal ceaca ได้เพียงเล็กน้อย ไม่มี pharynx ภายในลำตัวมี penetration gland 2 ชนิด eye spot มีระบบขับถ่าย mesostomate และ excretory bladder แบบบาง สามารถสังเกตเห็น excretory pore เปิดที่ปลายหางแฉก

2) Monostome cercaria มี oral sucker ขนาดเล็ก ไม่มี ventral sucker และ pharynx ลำตัวมีขนาดใหญ่ eye spots มี 2–3 อัน ส่วนหางมีความยาวมากกว่าส่วนของลำตัว ระบบขับถ่ายเป็นแบบ stenostomate มี excretory bladder เป็นแบบบาง มีอวัยวะเกาะติดด้านข้างท้ายของลำตัวทั้ง 2 ด้านเรียกว่า adhesive organ มี cystogenous อยู่ในลำตัว

3) Xiphidio cercaria มี stylet อยู่บริเวณ oral sucker ในบางชนิดพบ virgule organ อยู่ภายใน oral sucker ในลำตัวพบ penetration gland และ mucoid gland เจริญสมบูรณ์ ระบบขับถ่ายเป็นแบบ Mesostomate

4) Gymnocepharous cercariae ลำตัวมีลักษณะกลมรี มี oral sucker อยู่ส่วนบน และมี ventral sucker อยู่กลางลำตัว พบ cystogenous gland จำนวนมาก หางตรงไม่มีครีบ (fin fold) และ adhesive gland ที่ปลายหาง

5) Amphistome cercariae ลำตัวมีขนาดใหญ่ มี oral sucker ขนาดเล็ก และส่วนท้ายของลำตัวพบว่ามี ventral sucker ขนาดใหญ่ eye spots มี pigment และมีเลนส์ตา ส่วนตัวหางยาวและมี Caudal ขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางของหาง ระบบขับถ่ายเป็นแบบ stenostornate และมี excretory bladder แบบบาง

6) Echinostome cercariae มีลักษณะเด่นคือ มี spine collar รอบ oral sucker เรียกว่า “head collar” มี caeca ยาวหรือ สั้น ส่วนหางตรงยาวรูปทรงกระบอก มีระบบขับถ่ายเป็นแบบ

stenostomate มี excretory bladder แบบบาง (thin epithelium) มี excretory pore เปิดออกทางด้านข้างส่วนต้นของหาง

7) Megalurous cercaria บริเวณปลายหางมี adhesive gland cells ไม่มี excretory ลำตัวมีขนาดใหญ่ ผนังลำตัวหนา ventral sucker มีขนาดใหญ่กว่า oral sucker มีระบบขับถ่ายเป็นแบบ stenostomate มี excretory bladder แบบบาง (thin – epithelium)

8) Pleurolophocercous cercariae ลำตัว มีลักษณะกลมรี ภายในลำตัวพบ penetration gland และ custogenous gland พบครีบ (fin fold) ที่สันกลางลำตัวหาง แต่ไม่พบ lateral infold บริเวณด้านข้างของส่วนหาง eye spots มี pigment มีระบบขับถ่ายเป็นแบบ Mesostomate มี excretoru bladder แบบหนา (thick –epithelium)

9) Gasterostome cercariae ลำไส้มีลักษณะคล้ายกับถุง มีปากอยู่ประมาณกึ่งกลางของลำตัว หางสั้นติดกับลำตัวและแยกออกเป็น 2 แฉก มีความยาวสมมาตรกัน

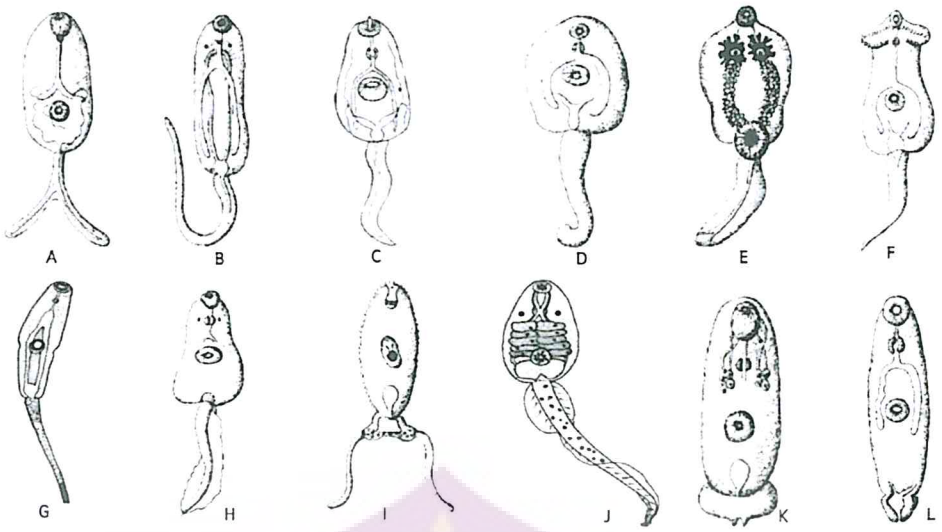
10) Parapleurolophocercous cercariae ลำตัวมีลักษณะกลมรี พบ penetration gland และ cystogenous gland ภายในลำตัว มี ventral sucker ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ พบ lateral finfold อยู่บริเวณด้านข้างของลำตัวหาง และมี dorso–ventral finfold ที่ปลายหาง eye spots มี pigment

กลุ่มที่ 2 cercaria ที่มีหางสั้น

1) Microcercous cercaria เป็น cercaria ที่มีส่วนหัวลักษณะเหมือนถ้วย (cup shape) มี ventral sucker ขนาดใหญ่กว่า oral sucker มี stylet หางสั้น และเป็นปุ่ม (knob like)

กลุ่มที่ 3 cercaria ที่ไม่มีหาง

1) Cercariaeum cercariae เป็น cercaria ที่ไม่มีหาง มีแค่ลำตัว มี oral sucker และ ventral Sucker



ภาพ 9 ลักษณะตัวอ่อนระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้ชนิดต่าง ๆ

(A) Furcocercous cercaria
(B) Monostome cercaria
(C) Xiphidiocercariae
(D) Gymnocephalus cercariae
(E) Amphistome cercariae
(F) Echinostome cercariae
(G) Megalurous cercariae
(H) Pleurolophocercous cercariae
(I) Gasterostome cercariae
(J) Parapleurolophocercouscercariae
(K) Microcercous cercaria
(L) Cercariaeum cercariae

ที่มา: Malex, (1962). Laboratory Guide and Notes for Medical Malacology, p. 111

2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ cercaria สามารถจัดจำแนกชนิดของกลุ่ม Family ได้ (Schell, 1970) เนื่องจากตัวอ่อนระยะนี้ได้เริ่มมีอวัยวะภายในร่างกายแล้ว โดยทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Body ได้แก่ oral sucker, ventral sucker, gland duct, pharynx, eyespot, esophagus เป็นต้น ส่วนหางบางชนิดจะมีครีบอยู่บริเวณต้นหางหรือปลายหาง ระยะ cercaria เป็นตัวอ่อนที่เจริญมาจากระยะ sporocyst หรือ ระยะ redia ในหอยซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางลำดับที่ 1 เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะไชออกจากหอยไปในน้ำเพื่อหาโฮสต์กึ่งกลางลำดับที่ 2 ต่อไป ซึ่งก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ เช่น โรคพยาธิใบไม้ตับ โรคพยาธิใบไม้ปอด โรคพยาธิใบไม้ในลำไส้และโรคพยาธิใบไม้เลือด ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับตัวอ่อนพยาธิในระยะ cercaria จึงมี

ความสำคัญต่อความรู้ในด้านการระบาดวิทยาของโรคปรสิต จากการรวบรวมข้อมูลจากอดีตจนถึงปัจจุบันพบการรายงานเกี่ยวกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ระยะ cercaria ในหอยน้ำจืดทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนี้

Seo และคณะ (1977) ทำการศึกษาพยาธิใบไม้ในปอด *Paragonimus iloksuenensis* โดยตรวจหาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ cercaria และระย redia จากตัวอย่างหอยบริเวณน้ำกร่อย Hadong Gun ของประเทศเกาหลี พบหอยวงศ์ Assimineidae ได้แก่ *Assiminea yoshidayukioi* และ *A. parasitological* ซึ่งชนิดพันธุ์ที่ติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในปอด *P. iloksuenensis* คือ *A. parasitological*

Krailas และคณะ (2003) ศึกษาการติดเชื้อพยาธิตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืด *P. petrosus* บริเวณน้ำตกป่าละอู จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบพยาธิใบไม้ 4 กลุ่ม คือ Xiphidiocercariae, Amphistome cercariae, Furcocercous cercariae type I และ Furcocercous cercariae type II ซึ่งก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ในเลือดในนก คนและปลาได้

Devi และ Jauhari (2007) ศึกษาความหลากหลายการกระจายพันธุ์ของระยะ cercaria จากหอยน้ำจืดทั้งหมด 9 ชนิด ณ บริเวณ Ratnagiri, Maharashtra (India) พบระยะ cercaria ทั้งหมด 3 กลุ่ม คือ schistosomes, amphistome และ liver fluke จากหอย *L. luteola* ซึ่งพื้นที่สำรวจที่พบหอยติดเชื้อมากที่สุด คือ บริเวณทุ่งนา

Ukong และคณะ (2007) ทำการศึกษาตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria จากหอยน้ำจืดฝาเดียว ณ บริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกเอราวัณ จังหวัดกาญจนบุรี พบระยะ cercaria ทั้งหมด 3 กลุ่ม คือกลุ่ม Pleurolophocercous cercariae กลุ่ม Furcocercous cercariae และกลุ่ม Xiphidio cercariae

Sri-aroon และคณะ (2010) ศึกษาหอยฝาเดียวและตรวจสอบการติดเชื้อปรสิตหลังเกิดคลื่นสึนามิ บริเวณจังหวัดพังงา โดยจำแนกหอยน้ำกร่อยได้ 7 วงศ์ 28 ชนิดพันธุ์ มีหอยน้ำกร่อย 4 ชนิดพันธุ์ ทีมีความสำคัญทางการแพทย์ได้แก่ *Cerithidea cingulate, C. djadjariensis, C. alata* และ *S. riqueti* โดยเป็นโฮสต์กึ่งกลางอันดับที่ 1 ของตัวอ่อนพยาธิใบไม้จัดจำแนกได้ 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีต่อม cystogenous gland มี eye-spot และ collar spines

กลุ่มที่ 2 ไม่มี eye-spot หรือ collar spines แต่มีต่อม cystogenous gland

กลุ่มที่ 3 มี excretory granules ในท่อแขนงของ excretory และมี collar spines

กลุ่มที่ 4 มี excretory granules ในท่อแขนงของ excretory และไม่มี collar spines หรือครีบที่หาง

กลุ่มที่ 5 มี stylet ขนาดเล็ก

กลุ่มที่ 6 มี eye-spot และมี excretory bladder ขนาดใหญ่ มี ventral sucker นอกจากนี้ยังพบตัวอ่อนระยะ redia ในหอย *C. cingulata* และ *C. djadjariensis* อีกด้วย

Baran, I.A. และคณะ (2011) ศึกษาหาความชุกของการติดเชื้อระยะ cercaria ในหอย *L. auricularia* ณ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอิหร่าน พบว่าการติดเชื้อร้อยละ 96.38 เป็นกลุ่ม Echinostome cercariae และเป็นกลุ่ม Furcocercous cercaria ร้อยละ 3.62

ทัศนีย์ มุงเมืองและคณะ (2543) ศึกษาตรวจหาระยะ cercaria โดยวิธี cercaria shedding method ในหอย *L. rubiginosa* ณ หนองน้ำในอำเภอโรจนะ จังหวัดสงขลาซึ่งพบการติดเชื้อของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* และพยาธิใบไม้ในกระเพาะรูเมนในโครอยละ 8.2 และ 3.8 ตามลำดับ

นอกจากนี้งานวิจัยได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสื่อสไลด์ถาวร เช่น ชนิดของการวางตัวอ่อนบนแผ่นไสด์ ชนิดสีย้อม ระยะเวลาในการย้อม ขั้นตอนการดึงน้ำ เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องงานวิจัยของสุภัทรตา ศรีทองแท้ (2557) และกิจจา อภิรักษ์เสนา (2557) ได้ทำการย้อมสีระยะ cercaria ด้วยสี Ehrlich's hematoxylin และสี Semichon's Acetic-carmine

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณเพื่อหาขนาดของกลุ่มตัวอย่างหาได้จากสูตรของ (Cochran, 1953)

$$n = \frac{P(1-P)Z}{e^2}$$

เมื่อ n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

P = ค่าสัดส่วนอัตราการติดเชื้อของพยาธิในหอย *Lymnaea* spp. ทั้งหมด 0.356 (Gregorio L. Martin I and Esperanza (Cabrera, 2018)

e = ระดับความคลาดเคลื่อนที่ได้จากกลุ่มตัวอย่าง 5% = 0.05

Z = ระดับความเชื่อมั่นที่ผู้วิจัยกำหนดไว้ที่มีค่าเท่ากับ 95% = 1.96

โดยสามารถคำนวณได้ ดังนี้

$$n \geq \frac{0.356(1-0.356)1.96^2}{0.05^2}$$

$$n \geq \frac{0.00192}{0.05^2}$$

$$n \geq 352$$

จากการคำนวณเพื่อหาขนาดของกลุ่มตัวอย่าง ได้ขนาดของกลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 352 ตัวอย่าง การลงพื้นที่เก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. ได้ 655 ตัวอย่าง

3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ถุงมือทางการแพทย์
2. ถ้วยพลาสติกขนาด 4 ออนซ์
3. ปากคีบ (Forceps)
4. กระชอนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร
5. ตะกร้าลอยฟ้าเล็ก เบอร์ 9805
6. รองเท้าบูท

3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

7. เครื่องมือ GPS
8. น้ำกลั่น
9. หลอดไฟ LED ขนาด 12 โวลต์
10. ชั้นวาง
11. เครื่อง Dispenser ขนาด 50 มิลลิลิตร
12. แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
13. กระดาษทิชชู
14. กล้องจุลทรรศน์ Stereomicroscope
15. กล้องจุลทรรศน์ Light microscope
16. Dropper
17. เครื่อง Centrifuge
18. เครื่อง Water bath
19. Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรและขนาด 50 มิลลิลิตร
20. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
21. บีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร
22. กระบอกตวงขนาด 500 มิลลิลิตรและขนาด 100 มิลลิลิตร
23. เครื่องชั่งสารเคมี ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
24. ช้อนตักสาร
25. เครื่องHot plate stirrer
26. Duran bottle ขนาด 500 มิลลิลิตรและขนาด 250 มิลลิลิตร
27. Auto pipette ขนาด 200-1000 ไมโครลิตร
28. Auto pipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร
29. ชุดโถย้อมสไลด์แบบแนวนอน + ฝาปิด ขนาด 80 mm x 70 mm x 40 mm
30. ตู้ดูดควันสารเคมี
31. ฟรอยด์
32. ตะแกรงใส่หลอด Centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตรและขนาด 50 มิลลิลิตร
33. ตะแกรงใส่หลอด Micro Centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
34. Tip ขนาด 200 ไมโครลิตรและขนาด 1000 ไมโครลิตร

3.3 สารเคมี

1. Ehrlich's hematoxylin (เจือจาง 1:10)
2. 70% alcohol
3. 80% alcohol
4. 90% alcohol
5. Absolute alcohol
6. xylene
7. 10% formalin
8. Semichon's Acetic-carmine (เจือจาง 1:2)
9. 0.2% Fast green
10. Acid Alcohol
11. Absolute alcohol; Xylene (1;1)
12. Permount

3.4. พื้นที่ในการศึกษา

สำรวจลักษณะทางกายภาพและบริเวณโดยรอบพื้นที่บริเวณทุ่งนา หมู่บ้านสันกว๊าน หมู่ที่ 8 ตำบลบ้านตุ่น อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา พร้อมบันทึกพิกัดของพื้นที่ที่ทำการสำรวจ ซึ่งการสำรวจและเก็บตัวอย่างอยู่ในช่วงฤดูหนาว ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2563 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2564

3.5 วิธีการเก็บตัวอย่าง

การสุ่มเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. ใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบ count per unit of time method (สุภัทรตา และคณะ, 2557) ใช้ผู้เก็บจำนวน 5 คน โดยใช้เวลาครั้งละ 10 นาที เก็บตัวอย่างทั้งหมด 655 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างโดยใช้กระชอน และทำการบันทึกพิกัดที่เก็บตัวอย่างหอย ทำความสะอาดตัวอย่างหอยเพื่อกำจัดเศษใบไม้ หญ้า โคลนต่าง ๆ ที่ติดมากับตัวหอย บันทึกข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างหอย ได้แก่ ขนาด น้ำหนัก และลักษณะผิดปกติ จัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอ้างอิงตามลักษณะสัณฐานวิทยาของ ประยงค์ และคณะ (2558) แล้วนำตัวอย่างหอยเลี้ยงไว้ในถ้วยพลาสติก จำนวน 5-10 ตัวต่อถ้วย ที่มีน้ำกลั่นปริมาตรถ้วยละ 20 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

3.6 การตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria โดยใช้วิธี cercaria shedding โดยการให้แสงด้วยหลอดไฟกำลัง 100 วัตต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นตัวอ่อนระยะ cercaria ให้เคลื่อนที่ออกมา จากนั้นตรวจหาระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และนับจำนวน cercaria ที่พบในตัวอย่างหอยแต่ละตัว ตัวอย่างของตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ที่ตรวจพบจะถูกนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อบันทึกภาพตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ที่พบในตัวอย่างหอย

3.7 การเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อของตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

นำตัวอย่างน้ำที่เลี้ยงหอยที่พบเชื้อ ใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เพื่อรักษาสภาพทั้งใน 70% alcohol และ 10% formalin พร้อมบันทึกวันที่เก็บและหมายเลขตัวอย่างที่พบตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria และระยะ redia

3.8 การทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

3.8.1 สี Ehrlich's hematoxylin

คัดเลือกตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ที่รักษาสภาพใน 70% alcohol ที่สมบูรณ์วางบนสไลด์ที่สะอาดและปราศจากไขมันที่ทาด้วยไข่ขาวและไม่ทาไข่ขาว พร้อม label เลขที่ตัวอย่างด้วยดินสอ จากนั้นปล่อยให้ตัวอ่อนระยะ cercaria หรือระยะ redia ติดสไลด์ หยดสี Ehrlich's hematoxylin (เจือจาง 1:10) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เวลา 5 นาที สังเกตการติดสีโดยส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นชะล้างสีด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ขั้นตอนต่อไปแทนที่น้ำโดยใช้สารเคมี คือ 50% alcohol, 70% alcohol, absolute alcohol เปรียบเทียบกับ 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol, absolute alcohol ขั้นตอนละ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้น absolute alcohol: xylene (1:1) จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นทำให้ใสด้วย xylene (โดยทุกขั้นตอนทำใน Staining jar) ปิดสไลด์ด้วย Permount แล้วจึงนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.8.2 สี Semichon's Acetic-carmine

คัดเลือกตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ที่รักษาสภาพใน 70% alcohol ที่สมบูรณ์วางบนสไลด์ที่สะอาดและปราศจากไขมันที่ทาด้วยไข่ขาวและไม่ทาไข่ขาว พร้อม label เลขที่ตัวอย่างด้วยดินสอ จากนั้นปล่อยให้ตัวอ่อนระยะ cercaria หรือระยะ redia ติดสไลด์ หยดสี Semichon's Acetic-carmine (เจือจาง 1:2) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที สังเกตการติดสีโดยมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นชะล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ขั้นตอนต่อไปแทนที่น้ำโดยใช้สารเคมี คือ 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol ขั้นตอนละ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที (สังเกตการติดสีชมพูอ่อน อวัยวะภายในติดสีชมพูเข้มภายใต้กล้องจุลทรรศน์) ปรับสีใน 1%acid alcohol ย้อมทับด้วย 0.2%fast green (เจือจาง 1:10) นาน 10 วินาที (สังเกตสีเขียวติดขอบลำตัว) ล้างสีออกด้วย 95 %alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แทนที่ด้วย absolute alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นแช่สไลด์ใน absolute alcohol: xylene (1:1) จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นทำให้ใสด้วย xylene (โดยทุกขั้นตอนทำใน Staining jar) 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ปิดสไลด์ด้วย Permount แล้วจึงนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ ระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำตัวอย่างสไลด์ถาวรไปส่องดูตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกเทียบเคียงกับคีย์ของ Frandsen และ Christensen (1984) แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 10x และ 40x

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ร้อยละความชุกของหอยที่ติดเชื้อตัวอ่อนระยะ cercaria คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความชุก} = \frac{\text{จำนวนหอยที่ติดเชื้อ}}{\text{จำนวนหอยทั้งหมดที่}} \times 100$$

บทที่ 4

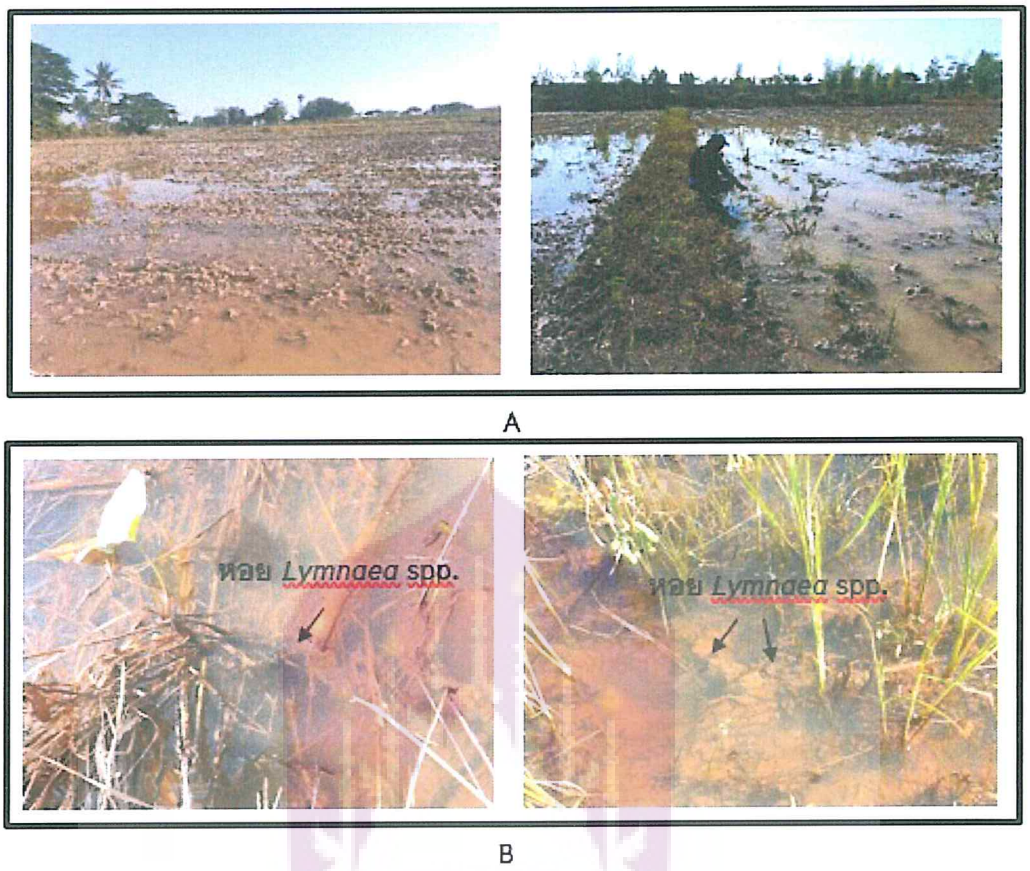
ผลการทดลอง

4.1 การสำรวจพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp.

การสำรวจพื้นที่เก็บตัวอย่างหอยตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2563 สามารถพบหอยได้ในแหล่งธรรมชาติทั่วไป น้ำจืดที่เป็นน้ำไหลไม่แรงหรือเป็นน้ำนิ่งและมีพื้นที่เป็นดินโคลนหรือดินปนทราย

จากการสำรวจพบว่าบริเวณนาข้าว บ้านสันกว๊าน หมู่ที่ 8 ตำบลบ้านตุ่น อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา บริเวณพื้นที่ศึกษามีขนาดประมาณ 1,004 ตารางเมตร ตั้งอยู่ที่ 19.15122841075266,99.86026553955848 โดยใช้เครื่องมือ GPS ในการวัดพื้นที่และหาพิกัด ซึ่งตรวจพบหอย *Lymnaea* spp. จำนวนมากบริเวณนาข้าวที่มีน้ำขัง ซึ่งหอยจะเกาะบริเวณต้นข้าว ใบหรือลำต้นผักบุ้ง พืชน้ำนานาชนิดและสามารถพบบริเวณพื้นดินโคลน นอกจากนี้ยังพบสัตว์เคี้ยวเอื้อง นกปากห่างในบริเวณใกล้ๆกับนาข้าว ซึ่งคาดว่าเป็นแหล่งที่อาจจะพบกลุ่มพยาธิใบไม้ จึงเลือกเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. จากบริเวณนี้

ภาพ 10 ภาพถ่ายทางอากาศบริเวณพื้นที่นาข้าวบ้านสันกว๊าน



ภาพ 11 แสดงบริเวณที่ศึกษาหอย *Lymnaea* spp.

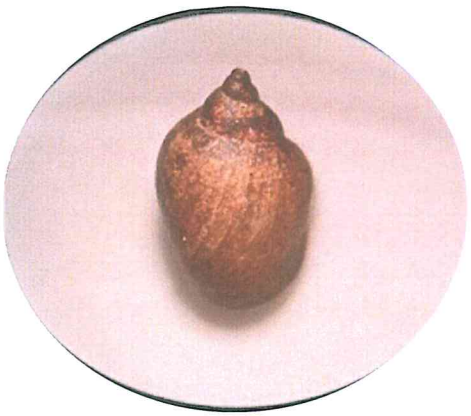
(A) ภาพบริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่าง (B) ภาพลักษณะตัวอย่างหอยที่พบ

4.2 การเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp.

การศึกษานี้ได้ทำการสุ่มและเก็บหอย *Lymnaea* spp. ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2563 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2564 จากการสำรวจทำการสุ่มและเก็บหอย *Lymnaea* spp. โดยวิธี count per unit of time method ที่พบเพื่อนำมาตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้โดยใช้วิธี cercaria shedding

4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอย่างหอย

ตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. ที่พบมีลักษณะรูปร่างรีคล้ายไข่ ส่วนใหญ่เปลือกสีน้ำตาลทองขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 0.8–1.1×1.5–2.0 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.3–0.78 กรัม



ภาพ 12 หอย *Lymnaea* spp. ที่นำมาทำการศึกษา

4.4 การตรวจหาระยะตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้โดยใช้เทคนิค cercariae shedding

การตรวจหาระยะตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. จำนวน 655 ตัวอย่าง โดยการให้แสงภายใต้หลอดไฟ ขนาด 100 วัตต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ผลการศึกษาตรวจพบตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในหอย *Lymnaea* spp. จำนวน 3 ตัวอย่าง จาก 655 ตัวอย่าง ตัวอ่อนระยะ cercaria ถูกปลดปล่อยออกมาอย่างต่อเนื่อง ในช่วง 2 วันแรกและอัตราการปล่อยเชื้อจะลดน้อยลงในวันที่ 3-6 โดยพบว่าหอย *Lymnaea* spp. ที่ติดเชื้อ มีลักษณะแตกต่างจากหอยที่ไม่ติดเชื้อ ผิวเปลือกเป็นแผลขรุขระและพบรอยด่างเป็นแถบสีขาวบนผิวเปลือก ในขณะที่หอย *Lymnaea* spp. ที่ไม่ติดเชื้อเปลือกมีผิวมันเรียบ มีสีเปลือกสม่ำเสมอ ดังตาราง 1

ตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้มี 2 กลุ่ม สามารถจัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Furcocercous cercariae พบจำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งลักษณะเด่น คือ มีหางแฉกหรือหางส้อม (fork-tail) จะลอยตัวอยู่ในระดับผิวน้ำ มีการหมุนรอบลำตัว พลิกลำตัวซ้าย-ขวาสลับไปมา พร้อมกับสะบัดหางแล้วพุ่งตัวไปข้างหน้า พักลอยตัวประมาณ 8-10 วินาที ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะตัวอ่อนระยะ cercaria ในกลุ่มนี้ได้ทั้งหมด 2 แบบ คือ

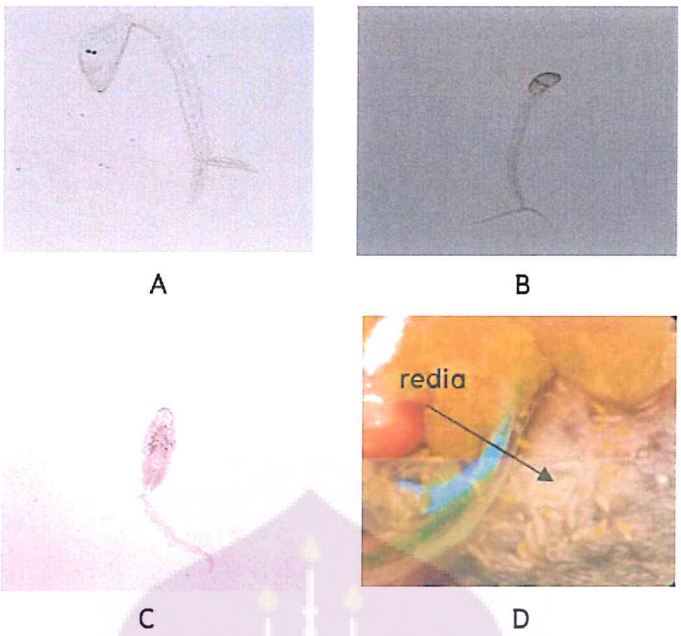
แบบที่ 1 แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria ปลายหางแฉกจะสั้นกว่าส่วนต้นหาง (ภาพ 13A) และแบบที่ 2 แบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria ปลายหางแฉกจะยาวกว่าหรือสมส่วนกับส่วนต้นหาง (ภาพ 13B)

ส่วนแบบที่ 2 Gymnocepharous cercariae ลักษณะเด่น คือ หางเดียว มี cystogenous gland จำนวนมาก ตัวขนาดใหญ่ ลำตัวสีขาว สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและหมุนตัวค่อนข้างเร็ว หากส่วนหัวยึดเกาะก้นภาชนะ ทำให้การเคลื่อนที่ช้าลงและสามารถยืดลำตัวได้ค่อนข้างยาว ทำให้เห็นโครงสร้างภายในได้ชัดเจนอีกด้วย (ภาพ 13C)

หอย *Lymnaea* spp. ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีอายุสั้น ทำให้ไม่สามารถเลี้ยงได้ยาวนาน เมื่อหอยที่ติดเชื้อตาย ได้ทำการผ่าตัดและเก็บพยาธิระยะตัวอ่อนที่อยู่ในเนื้อเยื่อหอย โดยสามารถเก็บระยะ redia (ถุงบรรจุตัวอ่อนระยะ cercaria) ซึ่งมีลักษณะเด่น คือ เป็นถุงขนาดใหญ่ และพบว่า 1 ถุงของระยะ redia สามารถบรรจุตัวอ่อนระยะ cercaria จำนวน 5–6 ตัวอีกด้วย (ภาพ 13D)

ตาราง 1 เปรียบเทียบหอย *Lymnaea* spp. ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ

หอย *Lymnaea* spp. ที่ติดเชื้อ	หอย *Lymnaea* spp. ที่ไม่ติดเชื้อ



ภาพ 13 ลักษณะตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ที่พบในหอย *Lymnaea* spp. ที่ติดเชื้อ

(A) ตัวอ่อนพยาธิกลุ่ม Furcocercous cercariae แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria

(B) ตัวอ่อนพยาธิกลุ่ม Furcocercous cercariae แบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria

(C) ตัวอ่อนพยาธิกลุ่ม Gymnocepharous cercariae

(D) ตัวอ่อนพยาธิระยะ redia

4.5 การเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน

จากการเก็บรักษาสภาพตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ของหอยที่ติดเชื้อ โดยเก็บรักษาด้วยน้ำยาสารเคมีทั้งหมด 2 ชนิด คือ 10% formalin และ 70% alcohol ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิตร (ดังภาพ 14) ได้ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 วันเพราะตัวอย่างหอยที่ติดเชื้อจะปล่อยเชื้อออกมาจำนวนมาก ซึ่งระยะ cercaria ที่เก็บได้มีจำนวน 1000-1200 ตัว/มิลลิลิตร ส่วนระยะ redia มีจำนวน 10-20 ถุงต่อมิลลิลิตร ผู้วิจัยสามารถเก็บตัวอย่าง ตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ที่เก็บจากหอย *Lymnaea* spp. ในการศึกษานี้แสดงรายละเอียดดังตาราง 2 เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน

ตาราง 2 การเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

ตัวอย่าง	สารเคมี	Furcocercous cercariae		Gymnocepharous cercariae
		แบบ Brevifurcate–apharyngeate distome cercariae	แบบ Brevifurcate–apharyngeate monostome cercariae	
ระยะ	70% Alcohol	–	2	5
redia	10% Formalin	–	2	4
	รวม	–	4	9
ระยะ	70% Alcohol	8	6	3
cercaria	10% Formalin	8	5	4
	รวม	16	11	7

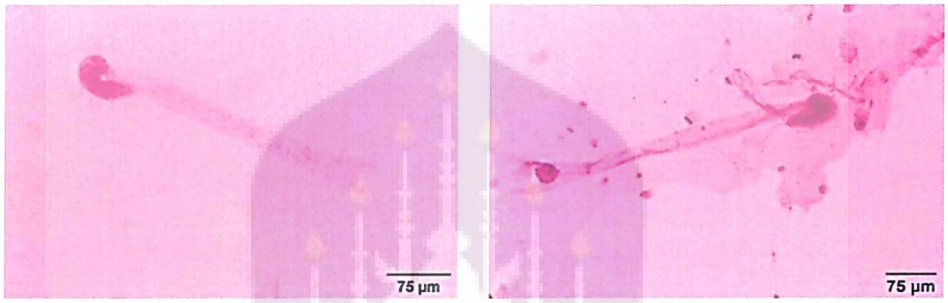
ภาพ 14 การเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน

4.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสไลด์ถาวรของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

การหาสภาวะที่เหมาะขั้นตอนในการย้อมสี โดยทำการปรับสภาวะขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

4.6.1 การติดตัวอย่างบนสไลด์

ผลการศึกษาพบว่าการเตรียมสไลด์ถาวรตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้นั้น ไม่จำเป็นต้องใช้การติดสไลด์ด้วยไข่ขาว (ภาพ 15A) ซึ่งจะทำให้สามารถย้อมสีตัวอย่างได้สวยงามสม่ำเสมอและแสดงโครงสร้างชัดเจนกว่าแบบทาไข่ขาว (ภาพ 15B) ดังนั้นการย้อมสี เลือกการติดตัวอย่างแบบไม่ใช้ไข่ขาวติดสไลด์



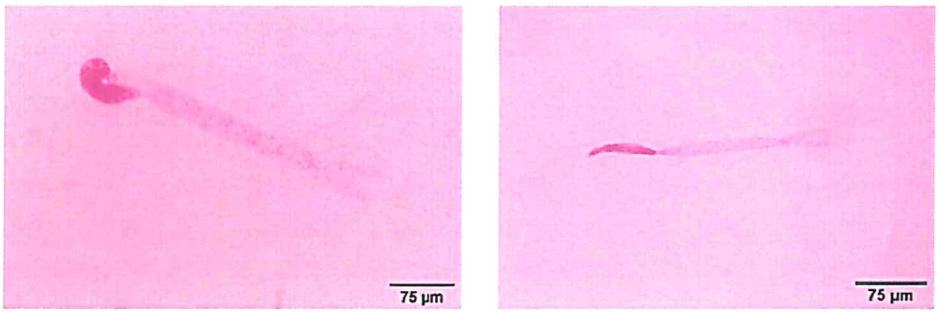
ภาพ 15 การติดตัวอย่างบนแผ่นสไลด์

(A) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin สภาวะไม่ใช้ไข่ขาวในการ ติดตัวอย่างบนแผ่นสไลด์

(B) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin สภาวะใช้ไข่ขาวในการติดตัวอย่างบนแผ่นสไลด์

4.6.2 ขั้นตอนการดึงน้ำ

ผลการศึกษาพบว่าการเตรียมสไลด์ถาวรตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในขั้นตอนการดึงน้ำมี 4 ขั้นตอนขั้นตอนละ 15 นาทีใช้สารเคมีความเข้มข้นดังนี้ 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol (ดังภาพ 16A) ทำให้ตัวอย่างไม่เหี่ยวและเห็นองค์ประกอบของโครงสร้างได้อย่างชัดเจนกว่าสารเคมีความเข้มข้น 50% alcohol, 70% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol (ภาพ 16B)



A B

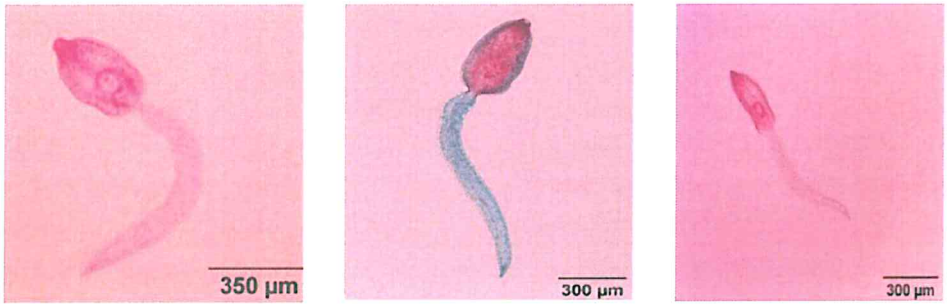
ภาพ 16 การสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนดึงน้ำ

(A) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin สภาวะขั้นตอนดึงน้ำความเข้มข้น 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol

(B) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin สภาวะขั้นตอนดึงน้ำความเข้มข้น 50% alcohol, 70% alcohol, 90% alcohol และ absolute alcohol

4.6.3 ชนิดของสีย้อม

ผลการศึกษาพบว่าการเตรียมสไลด์ถาวรตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในขั้นตอนการย้อมสี Ehrlich's hematoxylin ใช้ระยะเวลาในการย้อมสี 5 นาที ติดสีได้สวยงามสม่ำเสมอและสามารถมองเห็นโครงสร้างภายในได้ชัดเจน (ภาพ 17A) ส่วนการย้อมสี Semichon's Acetic-carmine ใช้เวลา ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที (ภาพ 17B) ติดสีได้สวยงามสม่ำเสมอและสามารถมองเห็นโครงสร้างภายในได้ชัดเจนกว่าระยะเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพ 17C)



A B C

ภาพ 17 การหาสภาวะที่เหมาะสมชนิดของสีย้อม

(A) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin ระยะเวลา 5 นาที

(B) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Semichon's Acetic-carmine ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

(C) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Semichon's Acetic-carmine ระยะเวลา 1 ชั่วโมง

4.7 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนของกลุ่มพยาธิใบไม้

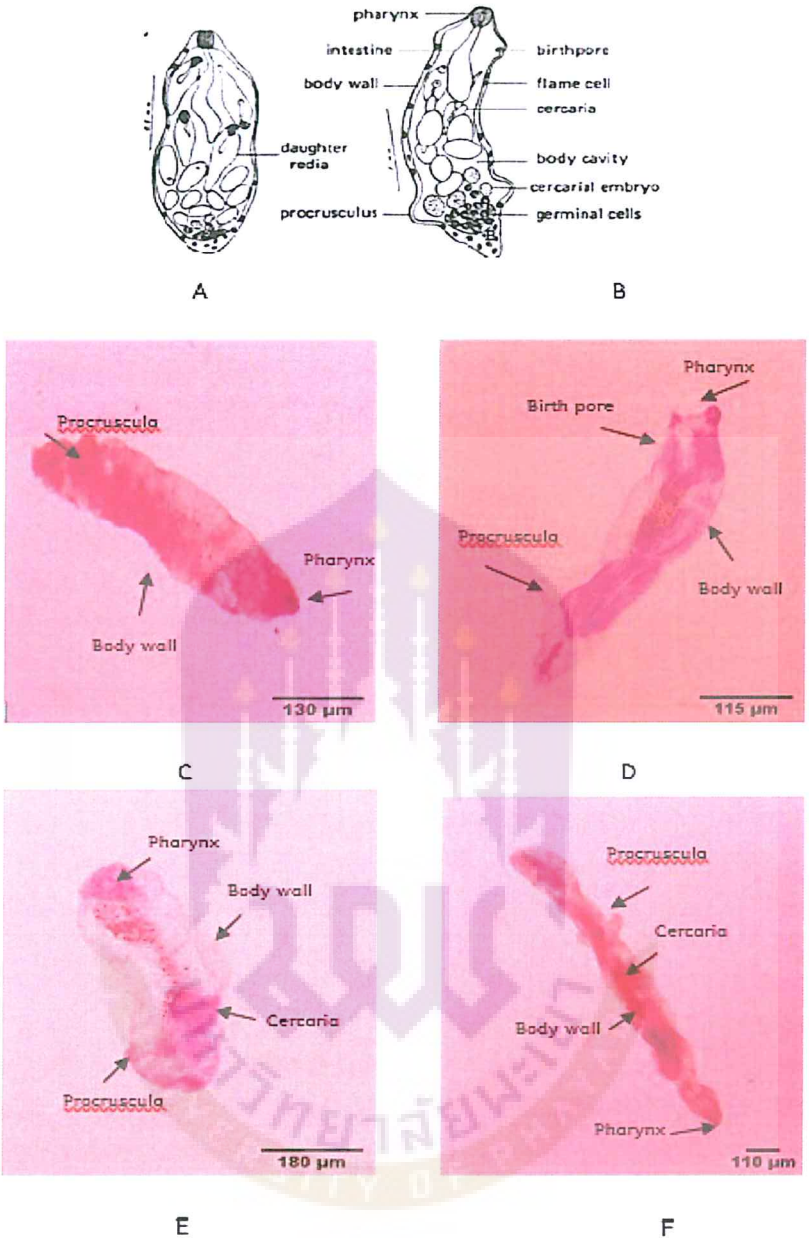
การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิระยะ redia และระยะ cercaria จากตัวอย่างหอยติดเชื้อ 3 ตัว

4.7.1 ถุงเก็บตัวอ่อน (redia)

ตัวอ่อนรีเดีย (redia) มีรูปร่างเป็นถุง ไว้สำหรับบรรจุตัวอ่อนระยะ cercaria มีลักษณะเด่นคือ มี Pharynx ขนาดใหญ่ อาจพบตัวอ่อนระยะ cercaria อยู่ด้านในอีกด้วย (ภาพ 18D และภาพ 18F)

ขนาดของตัวอ่อนระยะ redia ที่ตรวจพบ (Measurement)

Body: 110-260 µm × 550-1150 µm



ภาพ 18 ตัวอ่อนระยะ redia จากตัวอย่างหอยที่ติดเชื้อ

(A) ภาพวาดตัวอ่อนพยาธิระยะ mother redia (Malex, 1962)

(B) ภาพวาดตัวอ่อนพยาธิระยะ daughter redia (Malex, 1962)

(C) ตัวอ่อนพยาธิระยะ mother redia ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin

(D) ตัวอ่อนพยาธิระยะ mother redia ย้อมสี Semichon's Acetic-carmine

(E) ตัวอ่อนพยาธิระยะ daughter redia ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin

(F) ตัวอ่อนพยาธิระยะ daughter redia ย้อมสี Semichon's Acetic-carmine

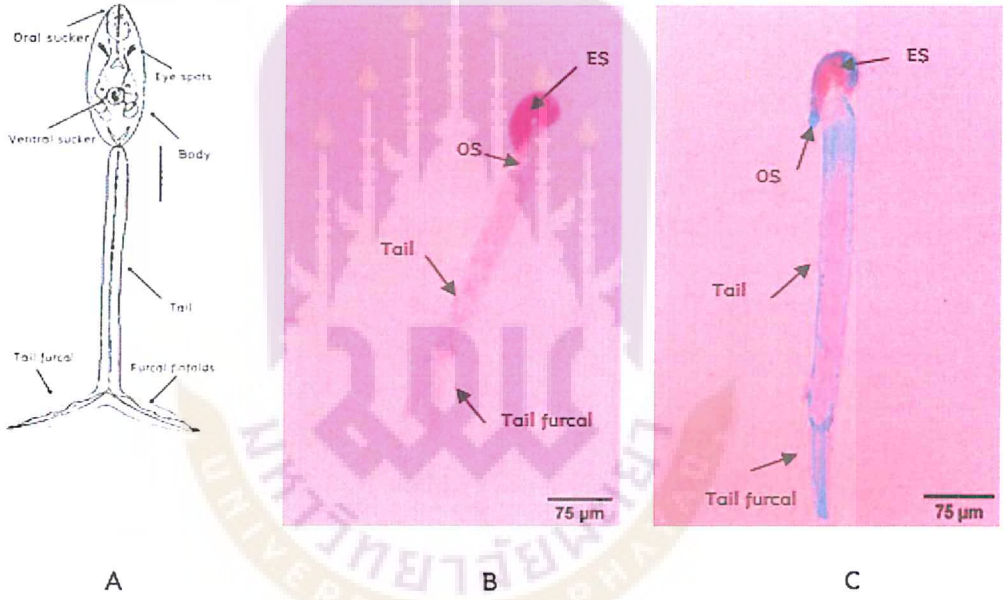
4.7.2 กลุ่ม Furcocercous cercariae

4.7.2.1) แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria ลักษณะเด่น คือ ปลายหางมีลักษณะคล้ายส้อม (fork tail) การย้อมสี Ehrlich's hematoxylin (ภาพ 19B) และสี Semichon's Acetic-carmine (ภาพ 19C) สามารถเห็นโครงสร้าง Tail furcal, Tail, oral sucker (OS) และ Eyes spot (ES) ได้ชัดเจน นอกจากนี้สามารถเห็น pigment ลำตัวได้อีกด้วย ขนาดของตัวอ่อนระยะ cercaria ที่ตรวจพบ (Measurement)

Body : 12.5–20 µm × 50–75 µm

Tail stem : 19.51–26.74 µm × 200–237.5 µm

Tail furcal : 13–15.28 µm × 62.5–67.5 µm



ภาพ 19 ตัวอ่อนระยะ cercaria แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria

(A) ภาพวาดตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria (Frandsen et al., 1984)

(B) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin

(C) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Semichon's Acetic Acid

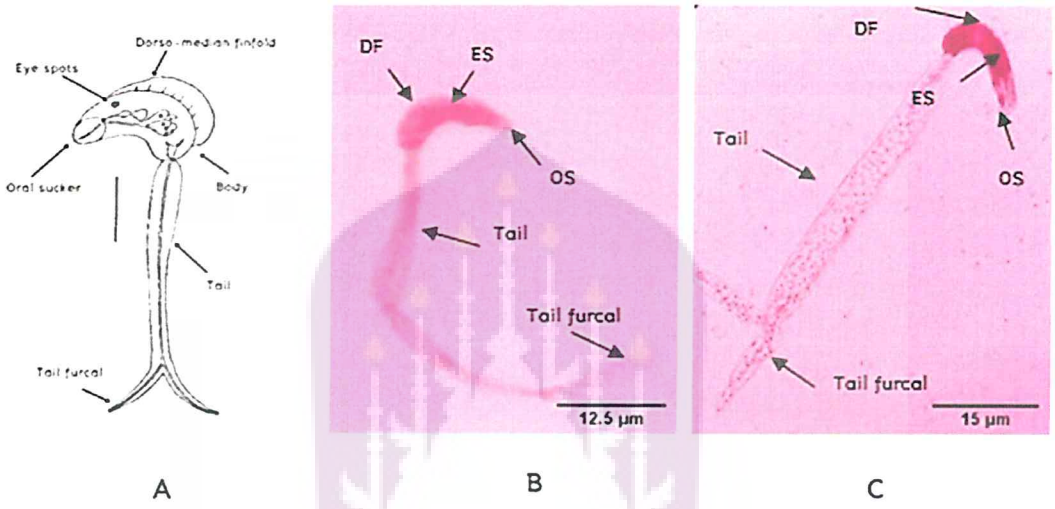
4.7.2.2) แบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria ลักษณะเด่น คือ พบ dorso-median finfold ที่บริเวณสันกลางหลังของลำตัวและมีปลายหางมีลักษณะคล้ายส้อม (fork tail) การย้อมสี Ehrlich's hematoxylin (ภาพ 20B) และสี Semichon's Acetic-carmine

(ภาพ 20C) สามารถเห็นโครงสร้าง Tail furcal, Tail, oral sucker (OS), Eyes spot (ES) และ dorso-median finfold (DF) ขนาดของตัวอ่อนระยะ cercaria ที่ตรวจพบ (Measurement)

Body : 12.5–20 µm × 45–67.5 µm

Tail stem : 12.5–25 µm × 170–275 µm

Tail furcal : 7.5–12.5 µm × 50–87.5 µm



ภาพ 20 ภาพถ่ายตัวอ่อนระยะ cercaria แบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria

(A) ภาพวาดตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria (Frandsen et al., 1984)

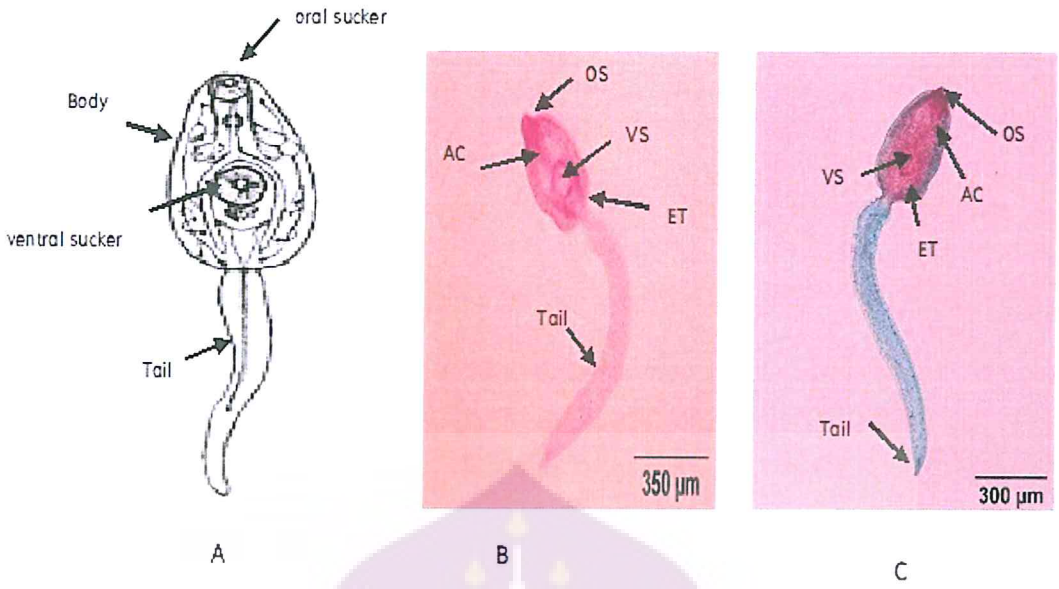
(B) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin

(C) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Semichon's Acetic-carmine

4.7.3 กลุ่ม Gymnocepharous cercariae ลักษณะเด่น คือ มีหางตรงไม่มีครีบและ cystogenous gland จำนวนมาก การย้อมสี Ehrlich's hematoxylin (ภาพ 21B) และสี Semichon's Acetic-carmine (ภาพ 21C) สามารถเห็นโครงสร้าง Tail, oral sucker (OS), Ventral sucker (VS), Excretory tube (ET) และ Alimentary canal (AC) ขนาดของตัวอ่อนระยะ cercaria ที่ตรวจพบ (Measurement)

Body : 112.5–175 µm × 125–350 µm

Tail : 62.5–75 µm × 525–712.5 µm



ภาพ 21 ภาพถ่ายตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่ม Gymnocepharous cercariae

(A) ภาพวาดตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria (Malex, 1962)

(B) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Ehrlich's hematoxylin

(C) ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ย้อมสี Semichon's Acetic-carmine

4.8 ความชุกของการติดเชื้อของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในหอย *Lymnaea* spp.

การตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ในตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. จำนวน 655 ตัวอย่าง ตรวจพบหอย *Lymnaea* spp. จำนวน 3 ตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ ซึ่งคิดเป็นความชุกเฉลี่ยร้อยละ 0.46 (3/655) โดยตัวอ่อนระยะ cercaria ที่พบมีลักษณะใกล้เคียง 3 แบบ ได้แก่ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria และแบบ Brevifurcate- apharyngeate distome พบในหอยที่ติดเชื้อจำนวน 2 ตัวอย่าง อัตราการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ 0.31 (2/655) ส่วนกลุ่ม Gymnocepharous cercariae พบในหอยที่ติดเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง อัตราการติดเชื้อคิดเป็นร้อยละ 0.15 (1/655)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาการติดเชื้อระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในหอย *Lymnaea* spp. ตรวจหาโดยวิธี cercaria shedding ที่เก็บระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2563 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2564 บริเวณพื้นที่นาข้าวในหมู่บ้านสันกว๊าน หมู่ที่ 8 ตำบลบ้านตุ่น อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา พบหอย *Lymnaea* spp. พบความชุกทั้งหมดของหอยติดเชื้อร้อยละ 0.45 (3/655)

2. ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ที่พบสามารถจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม Furcocercous cercariae พบจำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งมีลักษณะ 2 แบบ คือ แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria และแบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria อัตราการติดเชื้อร้อยละ 0.31 (2/655) และกลุ่ม Gymnocepharous cercariae พบจำนวน 1 ตัวอย่าง อัตราการติดเชื้อร้อยละ 0.15 (1/655)

3. หอย *Lymnaea* spp. ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีอายุสั้น ทำให้ไม่สามารถเลี้ยงได้ยาวนาน เมื่อหอยที่ติดเชื้อตาย ได้ทำการผ่าตัดและเก็บพยาธิระยะตัวอ่อนที่อยู่ในเนื้อเยื่อหอย โดยสามารถเก็บระยะ redia (ถุงบรรจุตัวอ่อนระยะ cercaria)

4. การเก็บรักษาสภาพตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria และระยะ redia ด้วยสารเคมี 2 ชนิด คือ 10% formalin และ 70% alcohol เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอนรายวิชาทางด้านปรสิตวิทยา ดังนี้

4.1 ตัวอ่อนพยาธิกลุ่ม Furcocercous cercariae แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria และแบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria

4.2 ตัวอ่อนพยาธิกลุ่ม Gymnocepharous cercariae

4.3 ตัวอ่อนพยาธิระยะ redia

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมสีเพื่อผลิตสื่อสไลด์ถาวร มีดังนี้

5.1 การติดวางตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria และระยะ redia ไม่จำเป็นต้องทาด้วยไข่ขาวก็สามารถทำให้ตัวอ่อนพยาธิติดแผ่นสไลด์ได้และเห็นโครงสร้างชัดเจนกว่าแบบติดตัวอ่อนพยาธิบนสไลด์ด้วยไข่ขาว

5.2 สี Ehrlich's hematoxylin ระยะเวลาในการย้อมสี ใช้เวลา 5 นาที สามารถทำให้ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria และระยะ redia ติดสีได้สวยงามและเห็นโครงสร้างได้ชัดเจน

5.3 สี Semichon's Acetic-carmine ระยะเวลาในการย้อมสี ใช้เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

5.4 การย้อมสี Ehrlich's hematoxylin ให้ผลการจำแนกลักษณะโครงสร้างได้ชัดเจนกว่าสี Semichon's Acetic-carmine

6. สามารถผลิตสื่อสไลด์ถาวรตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ได้เพื่อใช้เป็นสื่อการเรียนการสอน แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ cercaria และระยะ redia ดังนี้

6.1 ตัวอ่อนพยาธิกลุ่ม Furcocercous cercariae แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria และแบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria

6.2 ตัวอ่อนพยาธิกลุ่ม Gymnocepharous cercariae

6.3 ตัวอ่อนพยาธิระยะ redia

5.2 การอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เลือกหอย *Lymnaea* spp. มาทำการศึกษาเนื่องจากเป็นหอยน้ำจืด intermediate host ของพยาธิใบไม้ที่สำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ ได้แก่ โรคพยาธิใบไม้ในกระเพาะรูเมน พยาธิใบไม้ในตับ พยาธิใบไม้ในเลือด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของทัศนีย์ มุงเมืองและคณะศึกษาตรวจหาระยะ cercaria โดยวิธี cercaria shedding ในหอย *L. rubiginosa* ณ หนองน้ำในอำเภอโรจนะ จังหวัดสงขลา ซึ่งพบการติดเชื้อของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ในตับ *F. gigantica* และพยาธิใบไม้ในกระเพาะรูเมน *Paramphitomum* spp. ในโครัอยละ 8.2 และ 3.8 ตามลำดับ (ทัศนีย์ มุงเมืองและคณะ, 2543)

พื้นที่แหล่งศึกษา คือ บริเวณนาข้าวที่มีน้ำขัง ณ บ้านสันกว๊านมีลักษณะเป็นดินเหนียวค่อนไปทางดินโคลนและมีซากวัชพืช น้ำมีลักษณะขุ่น ซึ่งเป็นบริเวณที่พบหอย *Lymnaea* spp. จำนวนมาก คาดว่าจะพบหอยที่ติดเชื้อในบริเวณทุ่งนาซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Devi และ Jauhari (2007) ศึกษาตรวจหาระยะ cercaria จากจากหอย *L. luteola* ณ บริเวณ Ratnagiri, Maharashtra (India) พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ cercaria จำนวน 3 กลุ่ม คือ Shistosome, Amphistome และ liver fluke ซึ่งพบหอยที่ติดเชื้อบริเวณทุ่งนามากกว่าบริเวณอื่น

จากการศึกษาพบหอย *Lymnaea* spp. ลอยบริเวณผิวน้ำหรือเกาะบริเวณผักบุ้ง พืชน้ำ และซากต้นข้าวในนาซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รุจิรา จำปาปน (2558) ที่พบหอย *Lymnaea* spp. ลอยผิวน้ำและเกาะพืชน้ำในพื้นที่คลองเขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร

งานวิจัยทำการตรวจหาระยะตัวอ่อนของกลุ่มพยาธิใบไม้โดยวิธี cercaria shedding บริเวณทุ่งนา ณ บ้านสันกว๊าน จังหวัดพะเยา พบอัตราการติดเชื้อร้อยละ 0.45 (3/655) ซึ่งโดยทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติส่วนใหญ่พบการติดเชื้อไม่มากนัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชตพรรษ ชวนประสิทธิ์ (2556) ที่พบการติดเชื้อหอย *L. rubiginosa* ทั้งหมดจำนวน 7 ตัว จากพื้นที่สำรวจ 3 จุด ณ บ้านมะกอกหวาน 2 ต. มะกอกหวาน อ. ชัยบาดาล จ. ลพบุรี เช่นเดียวกับ Ukong และคณะ (2007) ตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ในตัวอย่างหอยน้ำจืดที่อุทยานแห่งชาติน้ำตกเอราวัณ จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้วิธี cercaria shedding มีอัตราการติดเชื้อเพียงร้อยละ 5

หอย *Lymnaea* spp. ที่ศึกษาจะพบการติดเชื้อน้อยแต่ตัวอ่อนพยาธิใบไม้จะถูกปลดปล่อยออกมาจากตัวหอยที่ติดเชื้อเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jubury, A. และคณะ (2020) ศึกษาแสงและอุณหภูมิที่มีผลต่อตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ของ *Trichobilharzia szidati* จากหอย *L. stagnalis* พบว่าหอยปลดปล่อยระยะ cercaria จำนวน 40,000 ตัวภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงและนานถึง 10 วัน ทำให้สามารถเก็บรักษาสภาพตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria เพื่อใช้ในการเรียนการสอนด้านทางปรสิตวิทยา

จากการศึกษาพบตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria 2 กลุ่ม คือ Furcocercous cercariae ซึ่งสามารถจำแนกตามลักษณะของอวัยวะที่พบ เช่น หางมีลักษณะเป็นแฉก หรือหางส้อม ลำตัวกลมรี มองเห็น oral sucker และ ventral sucker มี eye spots บางชนิดมี finfold ที่ลำตัว และ focal finfolds ที่หาง โดยเทียบเคียงกับคีย์ของ Frandsen และ Christensen (1984) พบว่าสามารถจัดกลุ่มเป็นใกล้เคียง 2 แบบ คือ แบบ Brevifurcate-apharyngeate distome cercaria โดยพบในหอยที่ติดเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งน่าจะมีโอกาสเป็นตัวอ่อนของพยาธิที่ก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้เลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังพบการเกิดโรคในประชากรของประเทศสหรัฐอเมริกา (Cort, 1928) และแบบ Brevifurcate-apharyngeate monostome cercaria พบในหอยที่ติดเชื้อจำนวน 1 ตัวอย่าง น่าจะเป็นตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในปากและหลอดอาหารของนกและก่อให้เกิดโรค Clinostomiasis ในประเทศเกาหลีใต้จากการรับประทานปลาดิบที่ติดเชื้อเข้าไป (Park et al., 2009) ส่วนกลุ่ม Gymnocepharous cercariae สามารถก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ในลำไส้นก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและอาจเกิดโรคในคนได้ เช่น พวก *Fasciola* spp. (นางสาวชตพรรษ ชวนประสิทธิ์, 2556)

การศึกษานี้ใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria ที่พบหอย *Lymnaea* spp. ในกรณีที่มีการติดเชื้อพยาธิมากกว่าหนึ่งชนิด การจำแนกด้วยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria อาจยังไม่

เพียงพอสำหรับการจัดจำแนกในระดับ genus และ species ของพยาธิที่พบได้ ดังนั้น ในการศึกษาต่อไปควรใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาร่วมด้วยเพื่อที่จะสามารถระบุชนิดของพยาธิได้แม่นยำยิ่งขึ้น

นอกจากนี้หอย *Lymnaea* spp. ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีอายุสั้น ทำให้ไม่สามารถเลี้ยงได้ยาวนาน เมื่อหอยที่ติดเชื้อตาย ได้ทำการผ่าตัดและเก็บพยาธิระยะตัวอ่อนพยาธิที่อยู่ในเนื้อเยื่อหอยโดยสามารถเก็บระยะ redia (ถุงบรรจุตัวอ่อนระยะ cercaria) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Seo และคณะ (1977) ทำการศึกษาพยาธิใบไม้ในปอด *P. iloksuenensis* โดยตรวจหาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะ cercaria และระย redia จากตัวอย่างหอยบริเวณน้ำกร่อย Hadong Gun ของประเทศเกาหลี

ตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria และระยะ redia ไม่สามารถหาซื้อตัวอย่างดองตามท้องตลาดทั่วไปและไม่มีสื่อสไลด์ถาวรของตัวอ่อนพยาธิระยะ redia จำหน่ายอีกด้วย งานวิจัยนี้สามารถหาตัวอ่อนพยาธิจากหอยที่ติดเชื้อได้ 2 ระยะ ซึ่งเกินความคาดหมายของผู้วิจัยในการวิจัยหาระยะตัวอ่อนของพยาธิใบไม้

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมสีตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้ เช่น การวางตัวอย่างตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ ชนิดของสีย้อม ระยะเวลาในการย้อมสีและขั้นตอนการดึงน้ำ พบว่าการวางตัวอ่อนพยาธิระยะ cercaria และระยะ redia ไม่จำเป็นต้องทาด้วยไข่ขาวก็สามารถทำให้ตัวอ่อนพยาธิติดแผ่นสไลด์ได้และเห็นโครงสร้างชัดเจนกว่าแบบติดตัวอ่อนพยาธิบนสไลด์ด้วยไข่ขาว

การย้อมสี Ehrlich's hematoxylin ให้ผลการจำแนกลักษณะโครงสร้างได้ชัดเจนกว่าสี Semichon's Acetic-carmine ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสุลักษณ์ อยู่คง ที่พบว่าการย้อมตัวพยาธิด้วยสี Ehrlich's hematoxylin ช่วยให้นิวเคลียสติดสีม่วงน้ำเงินทำให้มองเห็น penetration gland ได้อย่างชัดเจน ส่วนไซโทพลาสซึมไม่ติดสีและใช้เวลาในการย้อมที่สั้นกว่าสี Semichon's Acetic-carmine ซึ่งติดสีชมพูออกแดงบริเวณนิวเคลียส สามารถเห็นภายในเซลล์อย่างชัดเจน ส่วนสี Fast green จะติดย้อมสีเขียว บริเวณไซโทพลาสซึมที่กระจายอยู่ทั่ว ๆ ไปภายในเซลล์ (สุลักษณ์ อยู่คง, 2547)

ขั้นตอนดึงน้ำใช้สารเคมีความเข้มข้นดังนี้ 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol และ Absolute alcohol ทำให้ตัวอย่างไม่เหี่ยวและเห็นองค์ประกอบของโครงสร้างได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กฤษฎา ขำพูล (2557) ศึกษาการปรับปรุงวิธีการย้อมสีพยาธิใบไม้ตับอ่อนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง พบว่าการดึงน้ำจากตัวพยาธิใช้ alcohol ความเข้มข้นน้อยไปมาก คือ 70% alcohol, 85% alcohol, 95% alcohol และ Absolute alcohol ตามลำดับ

สื่อสไลด์ถาวรของสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา มีเพียงตัวอ่อนระยะ cercaria เท่านั้นและไม่มีระยะอื่น งานวิจัยนี้สามารถผลิตสื่อสไลด์ถาวรตัวอย่างตัวอ่อนระยะ cercaria และระยะ redia ของกลุ่มพยาธิใบไม้มาใช้ในการเรียนการสอนเพิ่มเติมได้ ทำให้นิสิตสามารถดูลักษณะตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มพยาธิใบไม้ที่หลากหลายรูปร่างได้และมีสื่อสไลด์ถาวรเพียงพอต่อการจัดปฏิบัติการแต่ละครั้งอีกด้วย

5.3 ข้อเสนอแนะ

การตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ในหอย *Lymnaea* spp. ครั้งนี้เป็นการศึกษาเฉพาะพื้นที่นาข้าวในหมู่บ้านสันกว๊าน หากตัวอย่างดองที่เก็บรักษาสภาพด้วยน้ำยาเคมีด้วย 10% formalin และ 70% alcohol ไม่เพียงพอต่อการเรียนการสอน ต้องทำการศึกษาพื้นที่โดยรอบหรือพื้นที่อื่นร่วมด้วยเพื่อให้ได้ตัวอย่างหอยติดเชื้อมากขึ้นกว่าเดิม และควรใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ที่มีความจำเพาะในการระบุ Genus และ Species ของตัวอ่อนระยะ cercaria

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กฤษฎา ขำพูล. (2557). ศึกษาการปรับปรุงวิธีการย้อมสีพยาธิใบไม้ตับอ่อนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง. **สัตวแพทย์มหานครสาร**. เล่มที่ 9 ฉบับที่ 2. หน้า 103-111

ชฎาภรณ์ ดั่งหั่งซิ้น และฐาปนา ชลธนานารถ. (2561). **ค่าความชุกของการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดจากพื้นที่ทำการเกษตรจังหวัดสระบุรีของประเทศไทย. แก่นเกษตร 46.** ฉบับพิเศษ 1

ชตพรรษ ชวนประสิทธิ์. (2556). **การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยน้ำจืดบริเวณเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม. สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2564, จาก http://sure. su.ac.th/xmlui/handle/123456789/10176?attempt=2&

ดวงเดือน ไกรลาส. (2561). **หอยฝาเดียววงศ์ไทอาริดี (Family Thiaridae) ในประเทศไทย การแพร่กระจายพันธุ์และการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร: ทริปเพิ้ล เอ็ดดูเคชั่น.

ทัศนีย์ มุงเมือง และคณะ. (2543). หอยลิมเนีย รูบิจิโนซาและหอยอินโดพลานอร์บิท เอกซัสตัสที่ติดพยาธิใบไม้ของโค ตามธรรมชาติในหนองน้ำที่อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์และสาขาสัตวแพทยศาสตร์**. หน้า 370-378

พีรพล รัตนไทย. 2553. **การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรีย ในหอยน้ำจืดวงศ์ Thiaridae ในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม. สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2564, จาก http://www.sure.su.ac.th/xmlui/handle/123456789/10164?attempt=3&&attempt=2

ภัทรตา ศรีทองแท้. (2557). **ความหลากหลายชนิดพันธุ์และการติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยฝาเดียวและหอยสองฝาบริเวณอ่าวไทยของประเทศไทย**. มหาวิทยาลัยศิลปากร. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2564. จาก http://www.thapra.lib.su.ac.th/thesis/showthesis_th.asp?id=0000011984

รุจิรา จำปาปน, ชนวัฒน์ ตันติวรานุรักษ์ และพงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา. (2556). ความหลากชนิดของหอยน้ำจืดในพื้นที่เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**, เล่มที่ 8 ฉบับที่ 2, หน้า 124-131

บรรณานุกรม(ต่อ)

วิวิชชุตา เดชรักษา. (2549). **การติดเชื้อตัวออนพยาธิใบไมระยะเซอรคาเรียของหอยน้ำจืดวงศ Thiaridae ในภาคเหนือของประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม. สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2564, จาก https://dric.nrct.go.th/index.php?/Search/SearchDetail/188062

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตาชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณ์ จัณทเตมีย์. (2538). **สังขวิทยา**. กรุงเทพฯ :โรงพิมพ์ศักดิโสภาการพิมพ์.

สุลักษณ์ อยู่คง และคณะ. (2546). **การศึกษารูปร่างลักษณะตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ที่ได้จากหอยน้ำจืด บริเวณน้ำตกเอราวัณ อุทยานแห่งชาติเอราวัณ**. มหาวิทยาลัยศิลปากร. สืบค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2564, จาก https://doi.nrct.go.th/ListDoi/listDetail?Resolve_DOI=10.14457/SU.res.2003.5

Jubury, A., Kania, P., Bygum A. and Buchmann, K. (2020). Temperature and light effects on *Trichobilharzia szidati* cercariae with implications for a risk analysis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 54

Baran, I.A., Yakhchali M., Viayeh R. and Farhangpajuh, F. (2011). Prevalence of Cercariae Infection in *Lymnaea auricularia* (Linnaeus, 1758) in NorthWest of Iran. **Veterinary Research Forum**, 2, 121–127.

Park, C., Kim, S.J, Joo, H.S, and Kim, J. (2009). A Human Case of *Clinostomum complanatum* Infection in Korea. **Korean J Parasitol**, 47(4). 401–404

Malek, E and Tadros, E. (1962). **Laboratory Guide and Notes for Medical Malacology**. Burgess publishing company. New Orlean

Frandsen, F. and Christensen, N.Q. (1984). An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance. **Acta Tropica**. 181–202

Frank, G. H. (1966). The Effect of Temperature on the Rate of Development and Emergence of Schistosome Cercariae. **zoologica Africana**, 2 (2), 211–221

Seo, H.B., Cho, Y.S., Kang, Y.S, Lee, H.S. and Song, Y.C. (1977). Studies on lungfluke, *Paragonimus iloktsuenensis* VII. The first intermediate host, cercaria and redia of *P. iloktsuenensis*. **The Seoul Journal of Medicine**, 18(1), 44–50

บรรณานุกรม(ต่อ)

Devi, N.P. and Jauhari, R.K. (2008). Diversity and cercarial shedding of malaco fauna collected from water bodies of Ratnagiri district, Maharashtra. **Acta Tropica**, 105(3)

Schell, S.C. (1970). **How to know the Trematode**.

Ukong, S. Krailas, D. Dangprasert, T. and Channgarm, P. (2007). Studies on the morphology of cercariae obtained from freshwater snails at Erawan Waterfall, Erawan National Park, Thailand. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**. 38(2)

Cochran, W.G. (1953). **Sampling Techniques**. Statistics Emeritus Harvard University. New York

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

1. การเตรียมสี Semichon's Acetic-carmine ประกอบด้วย

- Glacial acetic acid 100 ml
- น้ำกลั่น 100 ml
- สี Carmine 1.5 กรัม

ผสมน้ำและ Glacial acetic acid (สารละลายA) ให้เข้ากัน จากนั้นเติมสี carmine ลงไปในสารละลาย A ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรอกสีด้วยกระดาษกรอง No. 1 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้ย้อมสี (การย้อมสีใช้ความเข้มข้น 1:2 ทำการเจือจางด้วย 70% alcohol)

2. การเตรียม 70%Alcohol, 80%Alcohol, 90%Alcohol

เช่น ต้องการเตรียมแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% ปริมาตร 1000 ml โดยเตรียมจากแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% ดังนี้

ความเข้มข้น	ปริมาตรแอลกอฮอล์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำ (มิลลิลิตร)
70%Alcohol	736.84	263.16
80%Alcohol	842.11	157.89
90%Alcohol	947.37	52.63

3. การเตรียม Acid alcohol ประกอบด้วย

- Glacial acetic acid 1 ml
- น้ำกลั่น 99 ml

เตรียมน้ำกลั่น 99 ml จากนั้นเติม Glacial acetic acid 1 ml ผสมให้เข้ากัน

4. การเตรียม 0.2%fast green

ชั่งสี Fast green 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 ml คนให้เข้ากันจนสีละลาย จากนั้นจากนั้นกรอกสีด้วยกระดาษกรอง No. 1

ภาคผนวก ข.

1. การเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp.

รูป 22 การเก็บตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp.

2. การเตรียมทำความสะอาดตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp.

ล้างตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. ให้สะอาด ปราศจากเศษใบไม้ ใบหญ้าหรือโคลน จากนั้นแบ่งใส่ถ้วยที่มีน้ำกลั่นปริมตาร 20 ml ถ้วยละ 5–10 ตัว เพื่อไปทำ cercaria shedding

รูป 23 การล้างตัวอย่างหอย *Lymnaea* spp. และการเตรียมตัวอย่างก่อนทำ cercaria shedding

3. การทำ cercaria shedding

รูป 24 วิธี cercaria shedding

3. วิธีการตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

หลังจากทำ cercaria shedding นำถ้วยตัวอย่างมาตรวจหาระยะ cercaria ภายใต้กล้องสเตอริโอ หากพบการติดเชื้อ ทำการแยกตัวอย่างถ้วยละ 1 ตัว เพื่อแยกหอยที่ติดเชื้อ

รูป 25 การตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

9. ตัวอย่างสื่อการเรียนการสอนที่ได้จากงานวิจัย

A B

รูป 26 สื่อการเรียนการสอนตัวอย่างกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

(A) การเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

(B) สื่อสไลด์ถาวรของตัวอย่างตัวอ่อนของกลุ่มหนอนพยาธิใบไม้

ประวัติคณะผู้วิจัย (Biography)

ประวัติคณะผู้วิจัย (Biography)

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

ชื่อ นามสกุล นางสาวช่อผกา พวงศรี

วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 14 เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2533

ที่อยู่ปัจจุบัน 87/1 ม.7 ต.ยกกระบัตร อ.สามเงา จ.ตาก 63130

ที่ทำงานปัจจุบัน สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์/โทรสาร 054-466666 ต่อ 3886

Email address chorpaka.phuangsri.9039@gmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วมบ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2554	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลงานตีพิมพ์

1. Sirikarn Sanpa, S., Komsak Pintha, K., Suttajit, M., Sanpa, S., Auputinan, P. and Phuangsri, C. (2019). Screening of antioxidant and antibacterial activities of perilla seed meal extract. **Phayao Resherch Conference**. 82-91
2. Phuangsri, C., Nuntawong, N., Niamsup, H. (2017). Investigation of the Essential Oil from *Zanthoxylum piperitum* Seeds for Its Potential Use as Antifungal Agent against *Aspergillus flavus*. **Chiang Mai J. Sci.**. 44(2). 584-594
3. Phuangsri, C., Nuntawong, N., Niamsup, H. (2014). Antifungal Activity of Essential oils from Some Spices Against *Aspergillus flavus*. **Burapha University International Conference**

ประวัติคณะผู้วิจัย (Biography) (ต่อ)

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ นามสกุล นางสาววาสนา เมืองวงค์

วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 2 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2528

ที่อยู่ปัจจุบัน 107/1 ม.6 ต.บ้านต๋อม อ.เมือง จ.พะเยา 56000

ที่ทำงานปัจจุบัน สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์/โทรสาร 054-466666 ต่อ 3887

Email address wasana_koi139@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2552 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลงานตีพิมพ์

1. Suwancharoen, J., Jaloen-ngam, T., Muangwong, W. (2018). Prevalence of Intestinal Parasitic Diseases among HIV Positive Patients using Antiretroviral Treatment in Phayao Province, Northern Thailand. Thai **Journal of Public Health**. 48(2)