

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

พยาธิวิทยาของหนู (*Rattus norvegicus*) ที่ติดเชื้พยาธิ
ใบไม้วงศ์ Heterophyidae

ผู้เขียน

นายสุภาพ แสนเพชร

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ชโลบล

วงศ์สวัสดิ์

ประธานกรรมการ

Prof. Dr. Jong-Yil Chai

กรรมการ

ดร. อานาจ

โรจนไพบูลย์

กรรมการ

รศ. ดร. ปราโมทย์

วณิชธนาคม

กรรมการ

บทคัดย่อ

อัตราการติดเชื้พยาธิใบไม้ในลำไส้ในวงศ์ Heterophyidae ในปลาแม่น้ำสูงชัน ซึ่งพยาธิใบไม้ในวงศ์นี้บางชนิดมีบทบาทสำคัญในด้านสาธารณสุข ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าได้สำรวจหาตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในลำไส้ในตัวอย่างปลาน้ำจืด และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางด้านโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน รวมทั้งพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในหนูที่ได้รับการป้อนตัวอ่อนระยะ เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในวงศ์นี้ที่มีรายงานการติดต่อมาถึงมนุษย์ การสำรวจหาตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในตัวอย่างปลาน้ำจืดที่จับได้ในพื้นที่ 10 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่อำเภอแมริม แม่แตง สันทราย ดอยสะเก็ด สันกำแพง สารภี เมืองหางดง สันป่าตอง และจอมทอง โดยทำการสำรวจฤดูละ 1 ครั้งเป็นระยะเวลา 1 ปีโดยเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2544 ถึงเดือนตุลาคม 2545 จากการสำรวจปลาเกล็ดขาวทั้งหมด 18 ชนิด จำนวน 833 ตัว พบปลาเกล็ดขาวจำนวน 767 ตัวที่ตรวจพบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในลำไส้จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Stellantchasmus falcatus* *Haplorchoides* sp. *Haplorchis taichui* และ *Centrocestus caninus* ตามลำดับ โดยในฤดูหนาวมีค่าความชุกเฉลี่ย (mean prevalence) เท่ากับ 94.90% และมีค่าความหนาแน่นเฉลี่ย (mean intensity) เท่ากับ 414.75 ± 24.19 ส่วนในฤดูร้อนมีค่าความชุกเฉลี่ยเท่ากับ 90.00% และมีค่าความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 651.28 ± 40.39 สำหรับในฤดูฝนมีค่าความชุกเฉลี่ยเท่ากับ 91.37% และมีค่าความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 787.48 ± 42.23 ตลอดระยะเวลา 1 ปีของการสำรวจพบว่า *S. falcatus*

และ *Haplorchoides* sp. มีค่าความชุกค่อนข้างสูง ในขณะที่ *C. caninus* นั้นมีค่าความชุกต่ำที่สุด นอกจากนี้พบว่า *S. falcatus* จะมีค่าความชุกสูงสุดในฤดูฝนและในฤดูหนาว ขณะที่ *C. caninus* จะมีค่าความชุกสูงสุดในฤดูฝน ในส่วนของ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. จะมีค่าความชุกสูงสุดในฤดูร้อน ในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *S. falcatus* นั้นจะพบได้จากปลาเข็ม (*Dermogenus pusillus*) ซึ่งเป็นปลาเกล็ดขาวเพียงชนิดเดียวที่ตรวจพบพยาธิใบไม้ชนิดนี้ ส่วนการติดเชื้อพยาธิใบไม้ชนิดอื่นอีก 3 ชนิดนั้นจะพบได้จากปลาเกล็ดขาวมากกว่า 1 ชนิด อย่างไรก็ตามพบว่า *H. taichui* *Haplorchoides* sp. และ *C. caninus* มีค่าความหนาแน่นสูงสุดในปลาสร้อยขาว (*Henicorhynchus siamensis*) ในปลาหนามหลัง (*Mystacoleucus marginatus*) และในปลาชิวทวยแถบดำ (*Rasbora parviei*) ตามลำดับ นอกจากนี้ในปลาที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้จะตรวจพบตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ชนิด *S. falcatus* และ *H. taichui* ได้สูงสุดในกล้ามเนื้อ ส่วน *C. caninus* พบได้สูงสุดที่เหงือก ในขณะที่ *Haplorchoides* sp. พบได้สูงสุดที่เกล็ด

เมื่อทำการป้อนตัวอ่อนพยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 300 ตัวของพยาธิใบไม้ชนิด *S. falcatus* *H. taichui* และ *C. caninus* ให้กับหนูขาว (*Rattus norvegicus*) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้จากลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม (duodenum) เจจูนัม (jejunum) และอิลีอัม (ileum) ของหนูขาว เมื่อป้อนพยาธิใบไม้ให้แก่หนูขาวไปแล้วเป็นเวลา 3 วัน 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 28 วัน ตามลำดับ ภายใต้กล้อง stereomicroscope พบตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ชนิด *S. falcatus* และ *H. taichui* จากลำไส้เล็กส่วน ileum และมีค่าเฉลี่ยการตรวจพบพยาธิ (mean worm recovery rate) เท่ากับ 20.22% และ 7.07% ตามลำดับ ในขณะที่ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ชนิด *C. caninus* นั้นส่วนใหญ่จะตรวจพบที่ลำไส้เล็กส่วน duodenum และ jejunum และมีค่าเฉลี่ยการตรวจพบพยาธิเท่ากับ 23.56% การตรวจพบพยาธิใบไม้ทั้ง 3 ชนิดนั้นจะตรวจพบตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ได้สูงสุดในวันที่ 3 แล้วจะพบได้น้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาและการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของหนู แสดงให้เห็นว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยรวม (total WBC count) ของหนูที่ได้รับการป้อนตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอสิโนฟิล (eosinophils) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยพบภาวะ eosinophilia ตั้งแต่วันที่ 3 PI และยังคงมีค่าสูงจนถึงวันที่ 14 และ 21 PI หลังจากนั้นจำนวน eosinophils จะค่อยๆลดต่ำลงสู่ระดับปกติ พร้อมกับการลดลงของจำนวนพยาธิ ในส่วนของระดับ serum Immunoglobulin E (IgE) ก็แสดงผลคล้ายๆกับผลของ eosinophils โดยพบว่า serum IgE concentration มีค่าสูงขึ้นตั้งแต่

วันที่ 3 PI และมีค่าสูงสุดในวันที่ 14 และ 21 หลังจากป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ หลังจากนั้นจึงค่อยๆ ลดต่ำลงพร้อมกับจำนวนพยาธิที่ลดลง

การศึกษาพยาธิวิทยาของลำไส้ของหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ทั้ง 3 ชนิดโดยการป้อนตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 300 ตัวเพียงครั้งเดียว พบพยาธิสภาพเกิดขึ้นในลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วน ลักษณะของพยาธิสภาพที่ตรวจพบได้แก่ villous atrophy crypt hyperplasia และตรวจพบ lymphocytes plasma cells และ eosinophils สะสมในชั้น lamina propria โดยจัดอยู่ในระดับการอักเสบแบบติดเชื้อปานกลาง (mild degree of inflammation) โดยที่ *S. falcatius* และ *H. taichui* สามารถพบพยาธิสภาพได้ชัดเจนบริเวณ ileum ในขณะที่การติดเชื้อพยาธิใบไม้ชนิด *C. caninus* ส่วนใหญ่จะตรวจพบพยาธิสภาพที่ลำไส้เล็กส่วน duodenum และ jejunum ซึ่งพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นนี้มีความสัมพันธ์กับจำนวนพยาธิใบไม้ที่ตรวจพบในลำไส้ด้วย สำหรับการตรวจหาระดับ alkaline phosphatase activity ในลำไส้เล็กส่วนต่างๆของหนูขาว พบว่ามีระดับของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase activity ลดลงในลำไส้เล็กส่วน ileum ในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ชนิด *S. falcatius* และ *H. taichui* ในขณะที่พบการลดลงของเอ็นไซม์ที่ลำไส้เล็กส่วน duodenum และ jejunum ในหนูที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ชนิด *C. caninus* โดยที่ระดับการลดลงของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase activity จะแปรตามตามการลดลงของพยาธิใบไม้ที่พบในลำไส้ อย่างไรก็ตามพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นและการลดลงของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase activity มีแนวโน้มที่จะกลับคืนสู่สภาพปกติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

จากอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ในปลาเกล็ดขาวที่พบสูงมากจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปลาชนิดอื่นย่อมมีโอกาสได้รับเชื้อพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae เช่นกัน ดังนั้นหากเหตุการณ์นี้เกิดขึ้นในปลาซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนให้กับมนุษย์ หรือในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ปลาที่ส่งออกไปขายยังต่างประเทศ หรือ การส่งออกปลาสวยงาม ก็อาจก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และก่อให้เกิดความเสียหายระดับประเทศในเรื่องของความปลอดภัยของอาหารส่งออก นอกจากนี้พยาธิสภาพในลำไส้ของหนูที่ติดเชื้อของพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ที่ได้ในการศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในด้านอื่นๆได้ต่อไปในอนาคต เช่นการศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิแบบซ้ำๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายคลึงกับการติดเชื้อที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ หรือการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในวงศ์ Heterophyidae ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติ

Thesis Title	Pathology of Rats (<i>Rattus norvegicus</i>) Infected with Heterophyid Trematodes		
Author	Mr. Supap Saenphet		
Degree	Doctor of Science (Biology) <i>Philosophy</i>		
Thesis Advisory Committee	Assoc.Prof.Dr.Chalobol Wongsawad		Chairperson
	Prof. Dr. Jong-Yil Chai		Member
	Dr.Amnat Rojanapaibul		Member
	Assoc.Prof.Dr.Pramote Vanittanakom		Member

ABSTARCT

The occurrence of heterophyid flukes in fish has been increased, and some of them play a great role in public health. Therefore, this research surveyed the heterophyid metacercarial infections in freshwater fish and investigated the hematological change and immune response as well as the histopathology of the rats infected with three heterophyid flukes which their infections are reported in human. A seasonal year-round survey of heterophyid metacercarial infections in freshwater fish captured from 10 districts of Chiangmai province i.e. Mae Rim, Mae Taeng, San Sai, Doi Saket, San Kamphaeng, Saraphi, Mueang, Hang Dong, San Pa Tong and Chom Thong were conducted from November 2001 to October 2002. A total 833 cyprinoid fish of 18 species were examined and 767 cyprinoid fish were found infected with 4 heterophyid metacercariae, namely; *Stellantchasmus falcatus*; *Haplorchoides* sp.; *Haplorchis taichui* and *Centrocestus caninus*, respectively. The mean prevalences of heterophyid fluke were 94.90% with the mean intensity of 414.75 ± 24.19 in winter,

90.00% with the mean intensity of 651.28 ± 40.39 in summer, and 91.37% with the mean intensity of 787.48 ± 42.23 in rainy season. Throughout the course of the survey, the prevalences of *S. falcatus* and *Haplorchoides* sp. were found relative high, whereas *C. caninus* revealed the lowest prevalence. Additionally, the highest prevalence of *S. falcatus* was found in rainy and winter seasons, whereas the highest prevalence of *C. caninus* was recorded in rainy seasons. The highest prevalences of *H. taichui* and *Haplorchoides* sp. metacercariae were observed in summer and winter seasons. A half-beak fish was the only one cyprinoid fish which *S. falcatus* metacercariae were obtained. The other three heterophyid flukes were found infected in several species of the cyprinoid fish. However, the highest intensities of *H. taichui*, *Haplorchoides* sp. and *C. caninus* metacercariae were recorded from *Henicorhynchus siamensis*; *Mystacoleucus marginatus* and *Rasbora parviei*, respectively. Also, it was found that the highest intensities of *S. falcatus* and *H. taichui* metacercariae were observed in the muscles and the highest intensities of *C. caninus* metacercariae was recognized from the gills, whereas the highest intensities of *Haplorchoides* sp. was recorded on the scales.

A single inoculation of 300 metacercariae of *S. falcatus*, *H. taichui* and *C. caninus* were performed into rats (*Rattus norvegicus*) for 4 weeks. At days 3, 7, 14, 21 and 28 post-infection (PI), the adult worms were recovered from the duodenum, jejunum and ileum of infected rats under a stereomicroscope. The adult worms *S. falcatus* and *H. taichui* were mainly collected from the ileum with the mean worm recovery rates of 20.22% and 7.07%, respectively; *C. caninus* adult worms were chiefly recovered from the duodenum and jejunum with the mean worm recovery rate of 23.56%. The highest numbers of adult worm recovery from those

three flukes were observed on days 3 PI, after that they were decreased when the experimental time elapsed.

The study on the hematological change and immune responses revealed that the total white blood cell numbers of rats infected with three investigated flukes were not different from the controls. Meanwhile the eosinophil numbers was higher than the controls. Eosinophilia were observed on days 3 PI and remained high on days 14 and days 21 PI. They were decreased along with the declining of the worm recovery rates. The serum Immunoglobulin E (IgE) concentrations in infected rats revealed the same pattern as eosinophil counts; they found increased on days 3 PI and reached a peak level on days 14 and days 21 PI after that they found to be gradually decreased along with the decline of worm recovery.

The pathological alterations were observed in three segments of the small intestines of rats infected with *S. falcatius*, *H. taichui* and *C. caninus* by a single inoculation of 300 metacercariae. The pathological findings such as villous atrophy, crypt hyperplasia and lymphocytes, plasma cells and eosinophil accumulations in lamina propria of villi were recognized in the mild degree of inflammation. The pathological findings of *S. falcatius* and *H. taichui* infections were obviously observed in ileum. In the case of *C. caninus* infection, the pathology was mostly observed in duodenum and jejunum. The degree of inflammation was related to the numbers of worm recovery. In the study of alkaline phosphatase (AP) activity in the small intestines of infected rats, the enzyme activities were found decreased in the ileum of rats infected with *S. falcatius* and *H. taichui*. Meanwhile, the AP activity was found to be reduced in duodenum and jejunum of rats infected with *C. caninus*. However,

the pathological findings and the AP activity had a tendency to restore to the normal conditions at the end of the experiment.

The high infection rates of the heterophyid trematode in cyprinoid fish found in this study indicated the possible occurrence of these flukes in other fish species. Thus, the heterophyid infections in fish which serve as protein-food sources or in commercial fish such as exported ornamental fish will consequently result in the reduction in fisheries yields and extreme economical losses, particularly the food safety control. Moreover, this is the first report on the pathology of the rats infected with a single inoculation of the three heterophyid trematodes in Thailand. The data obtained from this study will be useful for the further study, i.e. the pathological observations in human repetitively infected with heterophyid flukes which is mimicry with the natural infection. Also, the possible heterophyid fluke infections in patients under immunocompromised conditions are essentially recommended.