# การตรวจหาและจำแนกพยาธิตัวกลมอะนิซาคิสโดยเทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอส

# (Detection and Identification of *Anisakis* Nematodes by PCR – Restriction Endonuclease Technique)

**จันทิพย์ สิงห์ตุ้ย[*] นภาพร แก้วดวงดี[*]**
**ประภาทิพย์ เอี่ยมโสภณา[**]**

*สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ซอยอิสรภาพ 15 ถนนอิสรภาพ เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

**ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 2 ถนนพรานนก แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

## บทคัดย่อ

พยาธิตัวกลมอะนิซาคิสก่อให้เกิดโรคอะนิซาคิเอซิส (Anisakiasis) ในคน มีสาเหตุมาจากการบริโภคปลาดิบที่มาจากเขตหนาว ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการ ปวดท้อง มีไข้ อาเจียนปนเลือด บางรายมีอาการไอร่วมด้วย และอาจมีอาการรุนแรงจนถึงลำไส้ทะลุได้ ในการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์พยาธิตัวกลมอะนิซาคิสที่พบในปลาตาหวานจากทะเลฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามันโดยเทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอส (PCR-Restriction Endonuclease) พบว่า พยาธิอะนิซาคิสที่พบในปลาตาหวานทั้งสองฝั่งทะเล เกิดแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 550 bp และ 430 bp หลังจากตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ *Hha*I เมื่อเทียบเคียงกับแถบมาตรฐาน (molecular key) ที่ใช้ในการจำแนกชนิดพยาธิอะนิซาคิส พบว่าพยาธิ อะนิซาคิส ที่ได้จากปลาตาหวานทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามันอาจเป็นชนิด *Anisakis typica*

**คำสำคัญ:** การตรวจหาและจำแนก/ อะนิซาคิส/ เทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอส

**Abstract**

Anisakid nematodes caused anisakiasis. Humans can be infected with *Anisakis* nematode by consuming raw fish especially from temperate zone. Patients with *Anisakis* infection develop abdominal pain, fever, nausea, vomiting, and perforate bowel. In the detection and identification, *Anisakis* nematodes were isolated from *Priacanthus tayenus* caught from the Gulf of Thailand and Andaman Sea. *Anisakis* DNA were analyzed by PCR–restriction endonuclease technique with the restriction enzyme *Hha*I. The products were subjected to agarose gel electrophoresis and showed two bands of approximately 550 bp and 430 bp. Based on a previously study, species of *Anisakis* from this study was *Anisakis typica*.

**Keywords**: Detection and Identification/ *Anisakis*/ PCR – Restriction Endonuclease Technique

## บทนำ

ปัจจุบันกระแสความนิยมอาหารญี่ปุ่นพบแพร่หลายทั่วไปแทบทุกสถานที่รวมทั้งในประเทศไทย เห็นได้จากเมนูปลาดิบในร้านค้าที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะปลาดิบที่มาจากเขตหนาวจะมีการพบการติดเชื้อพยาธิชนิดหนึ่ง คือ พยาธิอะนิซาคิส (*Anisakis simplex*) ซึ่งก่อให้เกิดโรค Anisakiasis พยาธิชนิดนี้เป็นพยาธิตัวกลม มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า พบในปลาทะเลที่วางขายในประเทศไทย โดยตรวจพบตัวอ่อนของพยาธิชนิดนี้ในปลาหลายชนิด เช่น ปลาดาบเงิน ปลาตาหวาน ปลาสีกุน ปลาทูแขก ปลากุเลกล้วย ปลาลัง เป็นต้น ส่วนในต่างประเทศจะพบในปลาจำพวก ปลาคอด ปลาแซลมอน ปลาเฮอริ่ง เป็นต้น *A. simplex* เป็นพยาธิตัวกลม มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ตัวโตเต็มวัยมีความยาวประมาณ 2-5 เซ็นติเมตร ในธรรมชาติพยาธิอะนิซาคิสอาศัยอยู่ในกระเพาะของสัตว์ทะเล เช่น ปลาโลมา ปลาวาฬ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในทะเลชนิดอื่นๆ ไข่ของพยาธิจะปนออกมากับอุจจาระเจริญเป็นตัวอ่อนอยู่ในทะเล และเป็นอาหารของกุ้งและไรทะเล เมื่อปลากินกุ้งและไรทะเลที่มีตัวอ่อนของพยาธิเข้าไป พยาธิก็จะไปฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อของปลาเหล่านั้น คนที่รับประทานปลาดิบที่มีพยาธินี้อยู่ก็จะติดโรคพยาธิได้ พยาธิจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเนื้อปลาที่รับประทานเข้าไป โดยน้ำย่อยในกระเพาะอาหารหรืออาจจะถูกขับออกมาจากกระเพาะอาหารเสียก่อนโดยการอาเจียน ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่ในกรณีที่พยาธิไม่ถูกขับออกไป พยาธิอาจจะชอนไชไปตามทางเดินอาหาร แล้วอยู่ในลำไส้ หรืออยู่นอกลำไส้ภายในช่องท้องได้ (จตุรงค์ ประเทืองเดชกุล, 2554) ในประเทศไทยตรวจพบตัวอ่อนของพยาธิชนิดนี้ในปลามากกว่า 20 ชนิดจากอ่าว

ไทย (มนูญ ไพบูลย์, 2550) ส่วนในต่างประเทศจะพบในปลาจำพวก ปลาคอด ปลาแซลมอน ปลาเฮอริ่ง ระยะตัวอ่อนที่ติดต่อสู่คนจะอยู่ในอวัยวะภายในช่องท้องของปลาทะเล มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ขนาดยาวประมาณ 1-2 เซ็นติเมตร กว้างประมาณ 0.3-0.5 มิลลิเมตร ลักษณะบริเวณปากจะมีหนามขนาดเล็ก บริเวณปลายหางจะมีส่วนแหลมยื่นออกมา พยาธิชนิดนี้จะใช้หนามขนาดเล็กและใช้ปลายหางแหลมในการไชผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ

ปัจจุบันมีผู้นิยมรับประทานอาหารญี่ปุ่นกันมากขึ้นโดยเฉพาะในเมืองใหญ่ ทำให้อาหารญี่ปุ่น เช่น ปลาดิบกลายมาเป็นเมนูหลักในชีวิตประจำวัน และนิยมบริโภคกันมากขึ้นในทุกภูมิภาคของโลก เนื่องจากปลาดิบเป็นที่อยู่อาศัยของตัวอ่อนพยาธิจึงทำให้พบผู้ป่วยจากการติดเชื้อพยาธิที่อยู่ในปลาดิบเพิ่มขึ้นอีกด้วย โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานประมาณ 2,000 รายใน ปี พ.ศ. 2538 สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อพยาธิอะนิ-ซาคิสครั้งแรกในลำไส้ของชาวประมงทางภาคใต้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธินี้จะมีอาการแพ้ชนิดเฉียบพลันร่วมด้วย ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญสำหรับทุกประเทศที่มีผู้คนนิยมรับประทาน ปลาดิบ (ประเสริฐ ทองเจริญ, 2550)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจและจำแนกชนิดของพยาธิตัวกลมอะนิซาคิสในปลาทะเลที่จับได้จากทะเลฝั่งอ่าวไทย และฝั่งทะเลอันดามัน ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอน-โดนิวคลีเอส (PCR-Restriction Endonuclease)

## วิธีการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างปลาตาหวานจากสถานที่ต่างๆ และนำมาผ่าเก็บตัวอย่างของพยาธิจากบริเวณกระเพาะและลำไส้ของปลาที่เก็บมาจากสะพานปลาจังหวัดสมุทรสาคร ตลาดทะเลไทย และสะพานปลาจังหวัดตรัง

2. นำพยาธิที่ได้มาล้างด้วยน้ำเกลือ ร้อยละ 0.85 ให้สะอาดและตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริ-โอว่าเป็นพยาธิอะนิซาคิส โดยอาศัยขนาดและรูปร่างลักษณะเฉพาะของหลอดอาหาร การพบบอริงทูธ (boring tooth) บนริมฝีปากและตรวจพบมิวครอน (mucron) ที่ปลายหาง

3. นับจำนวนตัวอย่างที่ได้ แล้วนำไปใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 เพื่อรักษาสภาพ DNA

4. การสกัด DNA

4.1 นำตัวพยาธิที่ได้มา 1 ตัว แล้วใส่ในโกร่งบดให้ละเอียด

4.2 เติมน้ำเกลือฟอสเฟตบัพเฟอร์ (Phosphate Buffered Saline, PBS) ค่าความเป็นกรดเบส (pH) เท่ากับ 7.4 ครั้งละ 20 ไมโครลิตร ให้ครบ 100 ไมโครลิตร

4.3 นำตะกอนละเอียดที่ได้มากระจาย (Smear) ลงในกระดาษเอฟทีเอ (FTA Classic Card) แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง ประมาณ 2-3 ชั่วโมง

5. เจาะกระดาษเอฟทีเอ บริเวณที่มี DNA ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentri-fuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.1 ล้างแผ่นดิสก์ (disc) ด้วยน้ำยาเอฟทีเอ (FTA Purification Reagent) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที พร้อมเขย่า

5.2 ล้างแผ่นดิสก์ด้วยน้ำยาล้างทีบี-บัฟเฟอร์ (TB-Buffer) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที พร้อมเขย่า

5.3 ทิ้งไว้ให้แห้ง

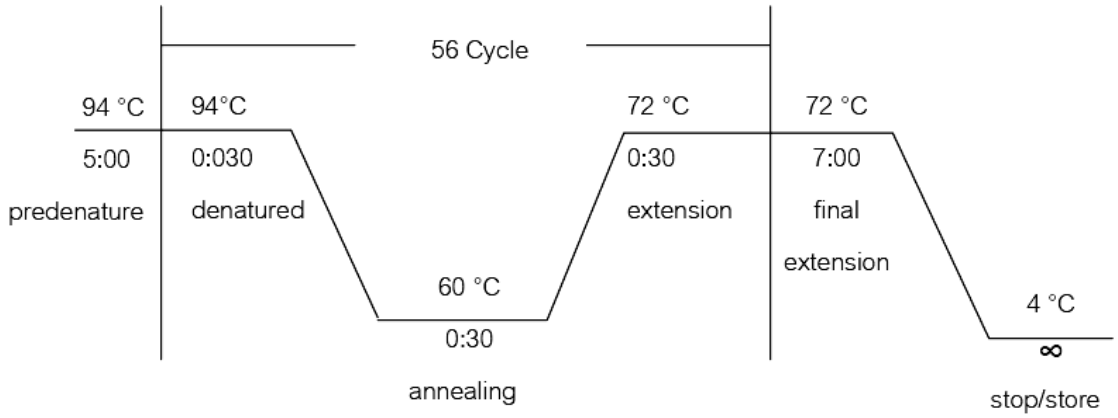
6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

6.1 วางแผ่นดิสก์ลงในหลอด PCR

6.2 เติมพีซีอาร์มาสเตอร์มิกซ์ (PCR master mix)

6.3 นำหลอดตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR

6.4 ขั้นตอนที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อศึกษาตัวอย่างของพยาธิ *A. simplex* ทั้งหมด 56 ไซเคิล (cycle) ดังต่อไปนี้




**ภาพที่ 1** แสดงขั้นตอนการกำหนดสภาวะในการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์

6.5 เตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel) เพื่อใช้ในขั้นตอนอิเลกโตรโฟลิซิส (electrophoresis)

6.6 นำ DNA ออกจากเครื่อง PCR ผสมกับ loading dye โดยใช้ loading dye 1 ไมโครลิตร และ DNA ปริมาณ 5 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงในช่องของอะกาโรสเจลให้ครบตามจำนวนที่กำหนด

6.7 วิเคราะห์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟ-ริซิส

6.8 ตรวจเช็คด้วยเครื่องอุลตราไวโอ-เลต (UV Transilluminator)

6.9 นำผลิตภัณฑ์ PCR ของแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

6.10 ตรวจดูแถบ DNA ที่ได้หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส

6.11 นำไปถ่ายภาพแถบของ DNA โดยเครื่องถ่ายเจล (Gel Documentation System)

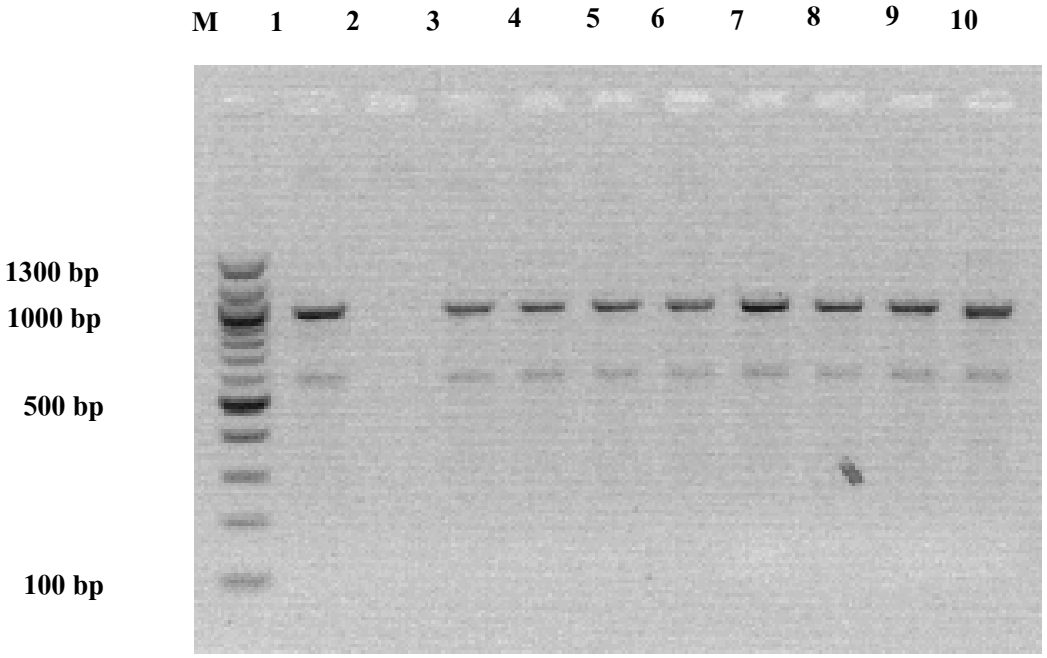
6.12 การวิเคราะห์นำดีเอ็นเอที่ได้ผลผลิตจากขั้นตอนการทำพีซีอาร์ของแต่ละตัวอย่าง มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 0.7 % อะกาโรส (agarose) โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (Gel Electrophoresis)

## ผลการวิจัย

จากการตรวจหาและจำแนกพยาธิตัวกลมอะนิซาคิส โดยเทคนิคพอลิเมอเรสเชนรีแอกชัน-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอส (Polymerase Chain Reaction-Restriction Endonuclease) ได้ผลดังนี้

**การเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิควิธี PCR ของพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอ่าวไทย**

เมื่อทำการแยกพยาธิอะนิซาคิสจากปลาตาหวานฝั่งอ่าวไทย เพื่อนำมาสกัด DNA และเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR หลังจากทำตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีเจลอิเล็กโตร-โฟลิซิส พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของตัวอย่างพยาธิอะนิซาคิส 9 ตัวอย่าง มีขนาด 1000 bp (ภาพที่ 2) ซึ่งตัวอย่างที่ 2 ไม่ปรากฏแถบผลผลิต PCR อาจเนื่องมาจากมีปริมาณผลผลิตน้อยเกินไป



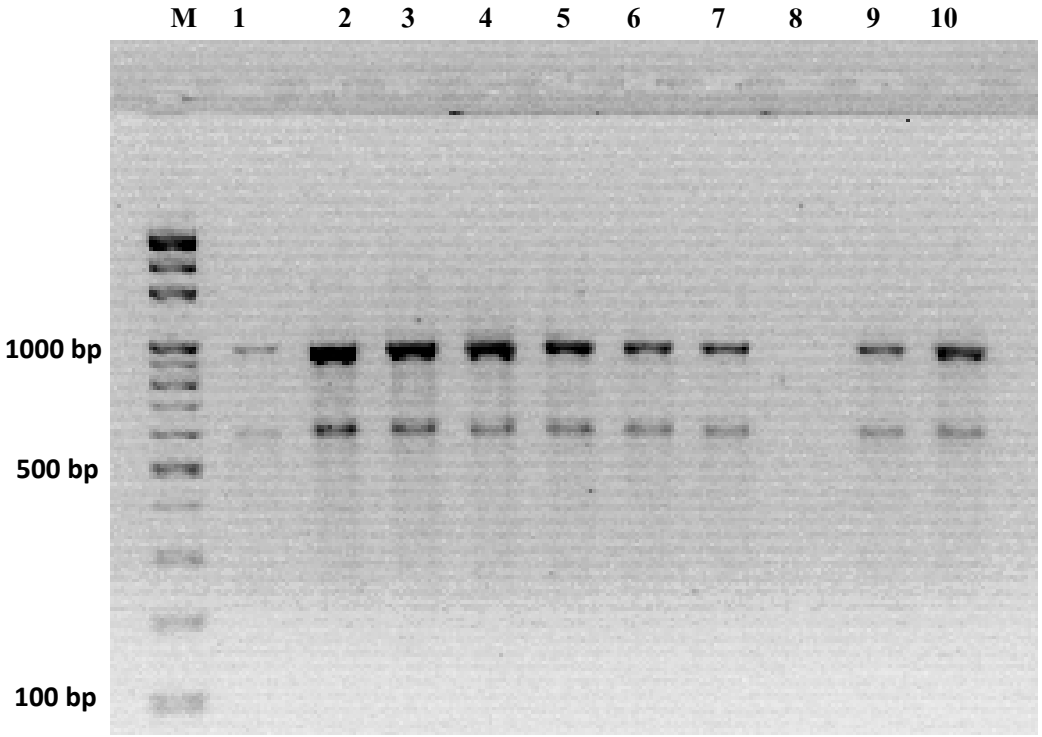

**ภาพที่ 2** แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอ่าวไทย 10 ตัวอย่าง

M = DNA ladder (100 bp)

1-10 = แถบ DNA ของพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอ่าวไทย

**การเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิควิธี PCR ของพยาธิ อะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอันดามัน**

เมื่อทำการแยกพยาธิอะนิซาคิสจากปลาตาหวานฝั่งอันดามัน และนำมาสกัด DNA แล้วเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR หลังจากทำตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของตัวอย่างพยาธิอะนิซาคิส 9 ตัวอย่าง มีขนาด 1000 bp โดยตัวอย่างที่ 8 ไม่ปรากฏแถบผลผลิต PCR อาจเนื่องจากมีปริมาณน้อยเกินไป (ภาพที่ 2)




**ภาพที่ 3** แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอันดามัน 10 ตัวอย่าง

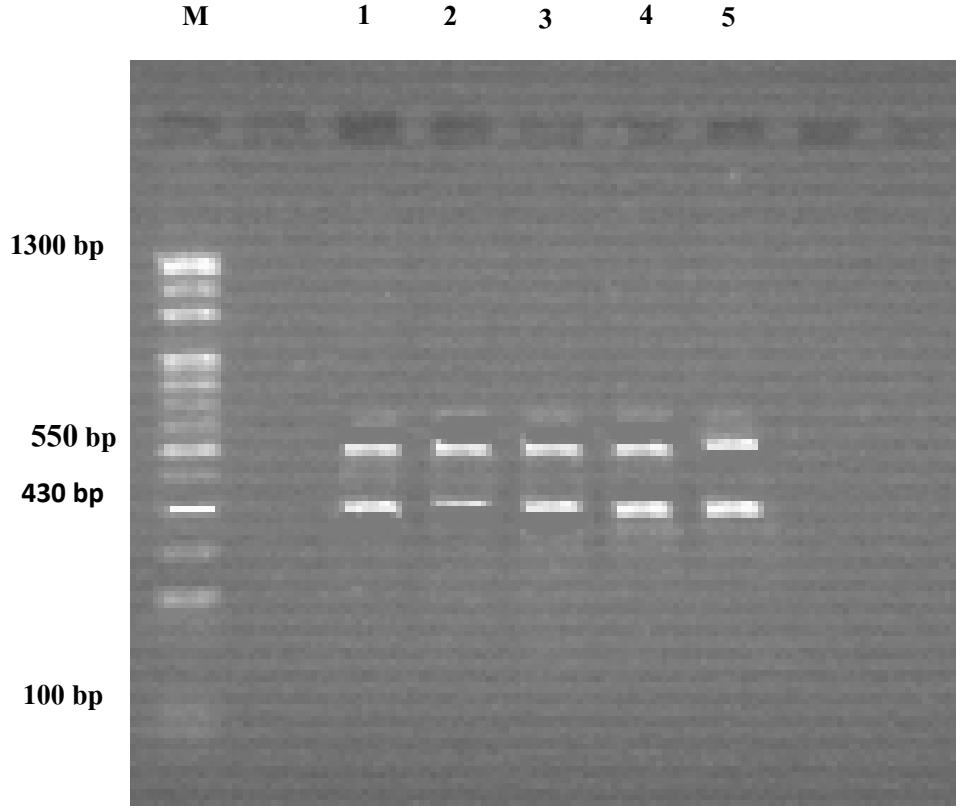
M = DNA ladder (100 bp)

1-10 = แถบ DNA ของพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอันดามัน

**การทำ PCR-Restriction Endonuclease จากการใช้เอนไซม์ *Hha*I**

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคทาง PCR จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I และตรวจสอบขนาด DNA ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโตรโฟลิซิส (agarose gel electrophoresis) พบว่า ตัวอย่างพยาธิอะนิซาคิส 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่างจากทะเลฝั่งอันดามัน 2 ตัวอย่างและตัวอย่างจากทะเลฝั่งอ่าวไทย 3

ตัวอย่าง) ปรากฏแถบ DNA ขนาด 550 bp และ 430 bp ดังนั้นพยาธิอะนิซาคิสจากปลาตาหวานฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน มีจำนวนเบสและการเรียงตัวของลำดับเบสเป็นชนิดเดียวกันกับ *Anisakis typica* ดังภาพที่ 4




**ภาพที่ 4** แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอันดามันและฝั่งอ่าวไทย

M = DNA ladder (100 bp)

1-2 = แถบ DNA ที่ได้จากพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอันดามัน

3-5 = แถบ DNA ที่ได้จากพยาธิอะนิซาคิส จากปลาตาหวานฝั่งอ่าวไทย

## อภิปรายผล

จากการศึกษาวิจัยโดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอสในการตรวจหาและจำแนกพยาธิตัวกลมอะนิซาคิสในเขตน่านน้ำประเทศไทยครั้งนี้พบว่าตัวอ่อนพยาธิอะนิซาคิส ที่นำมาสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำมาจำแนกต่อด้วยการใช้เอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสที่ตัดลำดับจำเพาะบนสายดีเอ็นเอ (restriction endonuclease) สามารถจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของพยาธิอะนิซาคิส ได้โดยพบว่าพยาธิอะนิซาคิส ที่พบในปลาตาหวานฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามันเป็นชนิดเดียวกัน คือ *Anisakis typica*

พยาธิ *Anisakis typica* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอนิซาคิเอซิสในคน ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานผลการวิจัยของ ศาสตราจารย์นายแพทย์มนูญ ไพบูลย์ ในปี พ.ศ. 2524 ที่พบว่าตัวอ่อนพยาธิอะนิซาคิส ที่พบในปลาฝั่งอ่าวไทยหลายชนิดเป็น *Anisakis typica* และยังสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Lee *et al.*, (2009) ได้ทำการศึกษาจีโนไทป์สายพันธ์พยาธิอะนิซาคิส จากปลาทะเล *Scomber japonicus, Trichiurus lepturus* และ *Todarodes pacificus* ของเกาหลีโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ศึกษาบริเวณ ITS-I, ITS-2 และหน่วยย่อย (subunit) ขนาด 5.8S ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I และ *Hha*I ซึ่งทำให้สามารถจำแนกชนิดของพยาธิอะนิซาคิสได้ 3 ชนิด คือ *A. pegrettii, A. typical* และ *A. simplex* complex โรคระบาดจากอาหารที่แพร่หลายที่เป็นสาเหตุของกระเพาะและลำไส้อักเสบในมนุษย์ จากการศึกษาการระบุยีนในระดับโมเลกุลของพยาธิอะนิซาคิสพบในปลาทะเลเกาหลี และปลาหมึก และจากการเก็บตัวอย่าง DNA 60 ตัวอย่าง ที่ได้จากตัวอ่อนระยะที่สามของ *Anisakis* spp. ที่เก็บรวบรวมจาก *Scomber japonicus Trichiurus lepturus* และ *Todarodes pacificus* โดยผลการวิจัยของ Jun *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิอะนิซาคิสในมนุษย์และความสัมพันธ์ระหว่างภูมิศาสตร์ของ *Scomber japonicus* และพยาธิตัวกลมอะนิซาคิส จากการศึกษาพบว่าตัวอ่อนที่พบในปลาจากฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิก (มหาสมุทรแปซิฟิกชายฝั่งของประเทศญี่ปุ่น) และจากทะเลตะวันออกของจีนและทะเลญี่ปุ่น (Warm Tsushima) เป็นพยาธิชนิด *A. simplex* sensu stricto และ *A. pegreffii* ตามลำดับ นอกจากนี้ในประเทศญี่ปุ่นยังตรวจพบ *Anisakis simplex Anisakis typica* และ *Anisakis ziphidarum* ในปลาจากทะเลฝั่งแปซิฟิกโดยพบ *A. pegreffii* และ *A. simplex* (sensu stricto) ในปลาคิดเป็นร้อยละ 47 และร้อยละ 6 ตามลำดับ

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบว่าการจัดจำแนกสายพันธุ์พยาธิ *Anisakis typica* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอส เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของพยาธิ *Anisakis typica* ได้ในประเทศไทย

## สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจหาและจำแนกพยาธิตัวกลมอะนิซาคิส ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอสโดยใช้เอนไซม์ *Hha*I พบว่าตัวอ่อนพยาธิอะนิซาคิส ที่พบในปลาตาหวาน ที่จับได้จากทะเลฝั่งอ่าวไทยและทะเลฝั่งอันดามัน เป็นพยาธิชนิดเดียวกันคือ พยาธิ *Anisakis typica*

จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I โดยเทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอส จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 550 bp และ 430 bp โดยการเทียบเคียงกับขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (molecular key) ที่ได้จากรายงานของ D'Amelio *et al.* (2010) และ

ขณะเดียวกันมีการใช้ในการจำแนกชนิดของพยาธิอะนิซาคิส นี้ได้ทั่วโลก โดยพบว่าพยาธิอะนิซาคิสที่พบในปลาตาหวานจากทะเลฝั่งอ่าวไทยมีขนาดประมาณ 550 bp และ 430 bp ซึ่งเป็นพยาธิ *Anisakis typica* ส่วนพยาธิอะนิซาคิส ที่พบในปลาตาหวานจากทะเลฝั่งอันดามันก็มีขนาดเท่ากันและเป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีจำนวนเบสและการเรียงตัวของลำดับเบสไม่แตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่าพยาธิ อะนิ-ซาคิส จากปลาตาหวานทั้ง 2 ฝั่งไม่มีความแตกต่างกันทั้งชนิดและสายพันธุ์

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัย-มหิดล ที่ได้ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือ ตลอดจนสารเคมีในการทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

จตุรงค์ ประเทืองเดชกุล และคณะ. (2554). **ปลาดิบไม่มีพยาธิ(จริงหรือ).** สืบค้นเมื่อวันที่ 25 เมษายน 2554, จาก http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/thai/knowledgeinfo.php?id=62

ประเสริฐ ทองเจริญ. (2550). **โรคเกิดจากเชื้อปรสิต.** สืบค้นเมื่อวันที่ 2 เมษายน 2554 จาก http://guru.sanook.com/search/knowledge_search.php?q

มนูญ ไพบูลย์ และคณะ. (2550). **ปรสิตหนอนพยาธิทางการแพทย์**. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์.

มนูญ ไพบูลย์. (2524). Ascaridoid nematode larvae in marine fishes from the Gulf of Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health,** 12: 590-594.

D'Amelio, *et al.* (2010). Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico and Caribbean Sea. **Parasitol. Res.** 108: 781-792.

Jun, *et al.*, (2009). Risk factors for human Anisakis infection and association between the geographic origins of Scomber japonicus and anisakid nematode. **International Journal of Food Microbiology**, 137: 88-93.

Karl, *et al.*, (2011). Distribution of Anisakis species larvae from fishes of the Japanese waters. **Parasitology International**, 60: 223-226.

Setyobudi, *et al.* (2011). Occurrence and identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) isolated from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. **Parasitol. Res.** 108: 585–592.