

## เนื้อเยื่อวิทยาของผิวพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum* ตัวเต็มวัย

### Histology of the adult tegument of *Eurytrema pancreaticum*

อาตุลย์ มีพูล<sup>1</sup> อัครพล อุดคำมี<sup>1</sup> และชูลีพร เพ็งจันทร์<sup>2</sup>

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์<sup>1</sup> และศูนย์ปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน<sup>2</sup> คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

Arduol Meepool<sup>1</sup>, Akkaraporn Udcommee<sup>1</sup> and Chuleeporn Pengjun<sup>2</sup>  
Department of Medical Science<sup>1</sup>, and Electron Microscopy Center<sup>2</sup>, Faculty of Science,  
Burapha University, Chonburi, 20131

#### บทคัดย่อ

จากการศึกษาผิวของพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum* ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าผิวพยาธิสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือชั้นผิวส่วนนอก (syncytial layer) และชั้นผิวส่วนใน (tegumental cell layer) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ชั้นผิวเรียงตัวอยู่ได้ชั้นกล้ำเนื้อ และสังเขงของเซลล์ไปเชื่อมต่อกับชั้นผิวส่วนนอก โครงสร้างของชั้นผิวส่วนนอกมีลักษณะเป็นไซโตพลาซึมด้านนอกคลุมด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ ชั้นผิวส่วนนี้ปกคลุมผิวด้านนอกทั่วตัวพยาธิโดยไม่มีขอบเขตของเซลล์กัน โดยชั้นผิวส่วนนอกด้านหลังมีความหนาแน่นกว่าส่วนท้อง และความหนาแน่นจะลดลงจากส่วนหน้าไปจนถึงส่วนท้ายของลำตัว ผิวด้านนอกของชั้นนี้มีลักษณะเป็นสันสลับกับร่อง ซึ่งความสูงของสันเหล่านี้แตกต่างกันในแต่ละส่วนของตัวพยาธิ โดยส่วนท้ายของลำตัวพยาธิมีความสูงและความถี่ของสันมากที่สุด ในขณะที่ส่วนหน้ามีความกว้างกว่าส่วนหลัง นอกจากนี้ยังพบ spine ที่มีรูปร่างเป็นทรงสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ฝังตัวอยู่ในชั้นผิว ซึ่งพบกระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ของพยาธิได้ทุกส่วน

**คำสำคัญ :** *Eurytrema pancreaticum*, histology, tegument

#### Abstract

Histology of the adult tegument of a pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum*, is prepared by semithin section technique and observed under light microscope. The tegument of this fluke is divided into two layers: the outer syncytial layer and the inner cell layer. The syncytial layer is a cytoplasmic unit that covers the entire outer surface of the parasite body including the oral and ventral suckers without boundary. The dorsal surface is thicker than the ventral surface and the thickness decreases from the anterior to the posterior parts. The outer surface of the syncytial layer forms ridges and grooves, whereas the height and density of ridges in each area are different. The ridges in the posterior part are higher and denser than the other parts whereas the width of the ridges in the anterior part is wider than the other parts. Moreover, there are the cuboidal-shaped spines embedding and distributing in the syncytial layer through out the parasite body.

**Keywords :** *Eurytrema pancreaticum*, histology, tegument

\* Corresponding author. E-mail : ameeppool@yahoo.com

## บทนำ

พยาธิใบไม้ตับ *Eurytrema pancreaticum* เป็นพยาธิที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคน (Ishii *et al.* 1983) และสัตว์เลี้ยง (Gradydon *et al.*, 1992) การระบาดในหลายพื้นที่ของโลก (Min, 1981) และเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพและเศรษฐกิจ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ที่จะสามารถควบคุมการระบาดของพยาธิชนิดนี้ จากการศึกษาในพยาธิใบไม้เลือด (*Schistosoma sp.*) (Abath *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000) พยาธิใบไม้ตับ (*Fasciola sp.*) (Khawsuk, 2003; Chaithirayanon *et al.*, 2002; Krailas, 1999; Sobhon *et al.*, 1998) ได้พยายามที่จะพัฒนาวิธีการตรวจรักษาทางอิมมูโนวิทยา และวัคซีน จากโปรตีนคัดหลังจากพยาธิ ซึ่งชั้นผิว (tegument) ก็เป็นแหล่งผลิตสิ่งคัดหลั่งและเป้าหมายสำคัญต่อการทำลายโดยวัคซีน ดังนั้นชั้นผิวของพยาธิใบไม้ตับอ่อน ก็อาจเป็นแหล่งผลิตสิ่งคัดหลั่งที่สำคัญเช่นกัน และเป็นเป้าหมายในการทำลายพยาธิด้วยวัคซีนหรือยา (Jiraungkoorskul *et al.*, 2005) ในขณะที่ยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานด้านโครงสร้างของชั้นผิวของพยาธิชนิดนี้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ ที่จะศึกษาโครงสร้างของชั้นผิวของพยาธิชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาองค์ความรู้ในการควบคุมและป้องกันการระบาดของพยาธิชนิดนี้ต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บพยาธิใบไม้ตับอ่อน *Eurytrema pancreaticum* ตัวเต็มวัยจากบริเวณท่อนตับอ่อนของโค กระบือ ที่ถูกฆ่าที่โรงฆ่าสัตว์ และนำพยาธิมาล้างด้วย 0.9% NaCl ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากชั้นผิว หลังจากนั้นนำพยาธิมาแช่ในน้ำยาคงสภาพ 2.0% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 ที่ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างใน 0.1M PBS, pH 7.4 ที่ 4°C 2-3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 1x1 มิลลิเมตร และ post fix ด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS pH 7.4 ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วย 0.1 M PBS, pH 7.4 ที่ 4°C 2-3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นกำจัดน้ำในเนื้อเยื่อโดยการแช่ใน ethyl alcohol ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% 2 ครั้ง, 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ ตามด้วยแทนที่ ethyl alcohol ด้วย propylene oxide (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที,

PO : Araldite 502 resin อัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอัตราส่วน 2 : 1 เป็นเวลา 12-14 จากนั้นฝังเนื้อเยื่อพยาธิใน flat molds ด้วย Araldite 502 resin และกระตุ้นให้แข็งตัวเป็น resin blocks โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45°C และที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาอย่างละ 48 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ใน resin blocks ด้วยเครื่อง ultramicrotome (LEICA, ULTRACUT R) ให้มีความหนา 500-700 นาโนเมตร แล้วนำไปย้อมติดด้วยสี 1% methylene blue ในน้ำ และนำไปศึกษาด้วยกล้อง bright field light microscope (Olympus, BX51)

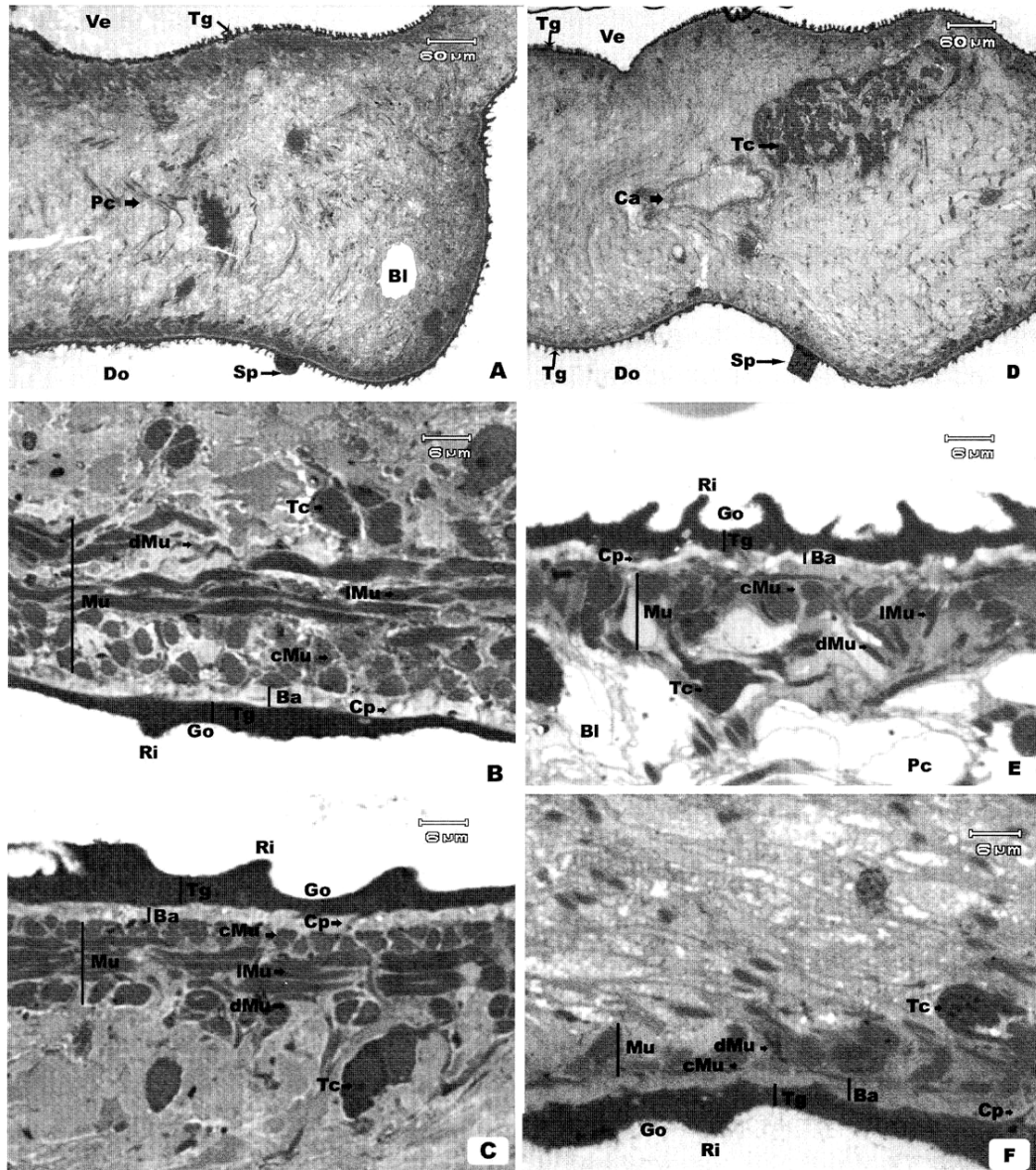
## ผลการวิจัย

จากการศึกษา ผิวของพยาธิใบไม้ตับอ่อน *E. pancreaticum* ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าผิวพยาธิสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนนอกชั้นผิว (syncytial layer) ซึ่งมีความหนา 1.42-3.63  $\mu\text{m}$  และส่วนในหรือชั้นตัวเซลล์ (tegumental cell layer) (ภาพที่ 1B, C, E, F; 2A, B) ซึ่งทั้งสองส่วนถูกกันด้วยชั้นกล้ามเนื้อและ basal lamina ระหว่างชั้นผิวและชั้นตัวเซลล์เชื่อมต่อกันด้วยแขนงของเซลล์ชั้นผิว (cytoplasmic process) ที่แทรกตัวผ่านชั้นกล้ามเนื้อซึ่งมีการจัดเรียงตัวกัน 3 ลักษณะ คือ ตามยาว (longitudinal) เป็นวงกลม (circular) และแนวเฉียง (diagonal) และ basal lamina ผิวด้านนอกของชั้นผิวมีลักษณะเป็นสัน (ridge) จำนวนมากสลับกับบริเวณที่เป็นร่อง (grooves) (ภาพที่ 1A-F; 2A-C) นอกจากนี้ยังพบ spine ที่มีรูปร่างเป็นทรงสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ฝังตัวอยู่ในชั้นผิวซึ่งกระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ของพยาธิ ได้ทุกส่วน (ภาพที่ 1A, D, 2A) ความหนาของชั้นผิวและขนาดความสูงและระยะห่างระหว่างสัน มีความแตกต่างกันในแต่ละส่วนของตัวพยาธิ (ตารางที่ 1)

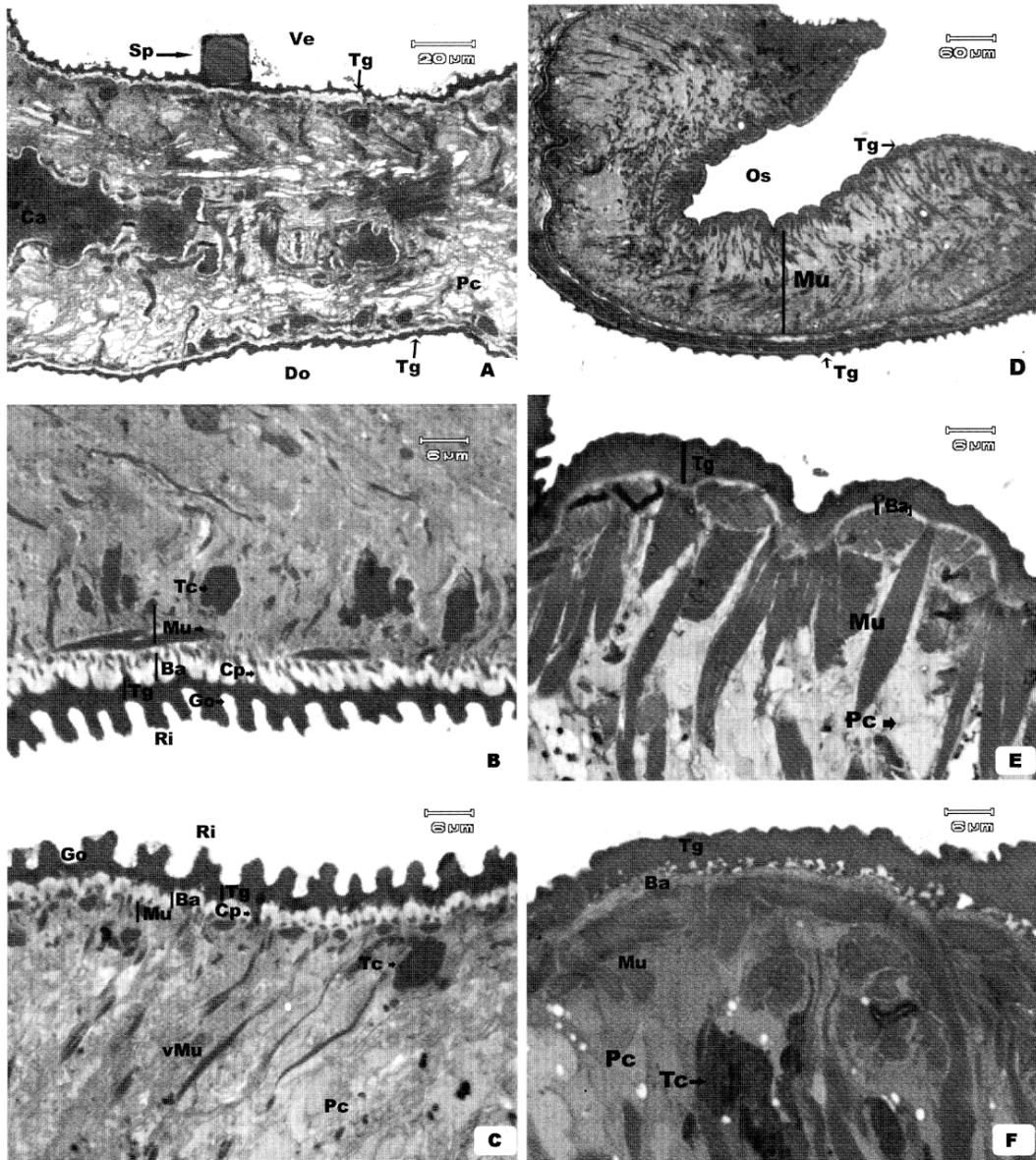
### ชั้นผิวด้านท้อง (Ventral surface)

ชั้นผิวด้านท้องของพยาธิชนิดนี้มีความหนาน้อยกว่าชั้นผิวด้านหลังและในแต่ละส่วนต่างๆ ของ ventral surface ก็ยังมีความหนาและความแตกต่างกันออกไป ดังนี้

**ส่วนหน้า (Anterior region)** ชั้นผิวบริเวณนี้มีความหนาประมาณ 2.8  $\mu\text{m}$  ผิวด้านนอกมีการยื่นเป็นสัน (ridge) สูงประมาณ 2.0  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 4.0  $\mu\text{m}$  ระยะห่างระหว่างสันประมาณ 10.0  $\mu\text{m}$  ผิวด้านล่างติดกับ basal lamina ที่มีความหนาประมาณ 2.7  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 1B)



**รูปที่ 1** A ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำบริเวณส่วนหน้า (anterior region) ของพยาธิตัวเต็มวัยแสดง ชั้นผิว (tegument, Tg) ด้านท้อง (ventral surface, Ve) และด้านหลัง (dorsal surface, Do) และ spine (Sp)  
 B, C ภาพถ่ายกำลังขยายสูงบริเวณส่วนหน้าของชั้นผิว (Tg) ด้านท้อง (B) และด้านหลัง (C) แสดงผิวหนังของชั้นผิวที่ยื่นขึ้นมาเป็นสัน (ridge, Ri) สลับกับร่อง (groove, Go) ผิวด้านในอยู่ติดกับ basal membrane (Ba) ซึ่งมีแขนง (cytoplasmic process, Cp) ของเซลล์ชั้นผิว (tegumental cell, Tc) แทรกอยู่ระหว่างชั้นกล้ามเนื้อ (Mu)  
 D ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของพยาธิในส่วนกลาง (middle region) แสดงลักษณะของชั้นผิว (tegument, Tg) ด้านท้อง (ventral surface, Ve) และด้านหลัง (dorsal surface, Do) และ spine (Sp)  
 E, F ภาพถ่ายกำลังขยายสูงบริเวณส่วนกลางของชั้นผิว (Tg) ด้านท้อง (E) และด้านหลัง (F) แสดงผิวหนังของชั้นผิวที่ยื่นขึ้นมาเป็นสัน (ridge, Ri) สลับกับร่อง (groove, Go) ผิวด้านในอยู่ติดกับ basal membrane (Ba) ซึ่งมีแขนง (cytoplasmic process, Cp) ของเซลล์ชั้นผิว (tegumental cell, Tc) แทรกอยู่ระหว่างชั้นกล้ามเนื้อ (Mu)  
 Bl - ท่อขับถ่าย, Ca - ลำไส้, cMu - กล้ามเนื้ออวงกลม, IMu - กล้ามเนื้อตามยาว, dMu - กล้ามเนื้อแนวเฉียง, Pc - parenchyma



**รูปที่ 2** A ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำบริเวณส่วนท้าย (posterior region) ของพยาธิตัวเต็มวัยแสดง ชั้นผิว (tegument, Tg) ด้านท้อง (ventral surface, Ve) และด้านหลัง (dorsal surface, Do) และ spine (Sp)  
 B, C ภาพถ่ายกำลังขยายสูงบริเวณส่วนท้ายของชั้นผิว (Tg) ด้านท้อง (B) และด้านหลัง (C) แสดงผิวนอกของชั้นผิวที่ยื่นขึ้นมาเป็นสัน (ridge, Ri) สลับกับร่อง (groove, Go) ผิวด้านในอยู่ติดกับ basal membrane (Ba) ซึ่งมีแขนง (cytoplasmic process, Cp) ของเซลล์ชั้นผิว (tegumental cell, Tc) แทรกอยู่ระหว่างชั้นกล้ามเนื้อ (Mu)  
 D, E ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (D) กำลังขยายสูงบริเวณผิวด้านใน (C) ของ oral sucker แสดงลักษณะของ tegument (Tg) ที่คลุมผิวด้านนอก และด้านใน และการจัดเรียงตัวของกล้ามเนื้อ (Mu) ที่แทรกอยู่ระหว่าง parenchymal cells (Pc)  
 F ภาพถ่ายกำลังขยายสูงบริเวณผิวด้านในของ ventral sucker แสดงลักษณะของชั้นผิว (tegument, Tg) เซลล์ชั้นผิว (tegumental cell, Tc) ที่แทรกตัวอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อ (Mu) และ parenchymal cells (Pc)  
 cMu - กล้ามเนื้อวงกลม, IMu - กล้ามเนื้อตามยาว, dMu - กล้ามเนื้อแนวเฉียง, vMu - กล้ามเนื้อแนวตั้ง,  
 Pc - parenchyma

**ส่วนกลาง (Middle region)** ชั้นผิวหนังบริเวณนี้ มีความหนาประมาณ 2.4  $\mu\text{m}$  ผิวด้านนอกมีการยื่นเป็นสันสูง ประมาณ 4.5  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 2.5  $\mu\text{m}$  และมีระยะห่างระหว่างสันประมาณ 7.0  $\mu\text{m}$  และผิวหนังล่างของชั้นนี้อยู่ติดกับชั้น basal lamina ที่มีความหนาประมาณ 2.6  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 1E)

**ส่วนท้าย (Posterior region)** ชั้นผิวหนังบริเวณนี้ มีความหนาประมาณ 1.7  $\mu\text{m}$  และมีสันสูงประมาณ 4.4  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 2.3  $\mu\text{m}$  โดยมีระยะห่างระหว่างสันประมาณ 2.9  $\mu\text{m}$  และ basal lamina บริเวณนี้หนาประมาณ 2.7  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 2B)

**ชั้นผิวด้านหลัง (dorsal surface)**

ชั้นผิวด้านหลังมีความหนามากกว่าชั้นผิวด้านท้อง (ventral surface) และในแต่ละส่วนต่างๆ ของผิวด้านหลัง ก็ยังมีความหนาและความแตกต่างกันออกไป ดังนี้

**ส่วนหน้า (Anterior region)** ชั้นผิวหนังบริเวณนี้ มีความหนาประมาณ 3.6  $\mu\text{m}$  ผิวด้านนอกประกอบด้วยสันสูงประมาณ 3.7  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 2  $\mu\text{m}$  และระยะห่างระหว่างสันประมาณ 16.5  $\mu\text{m}$  และ basal lamina หนาประมาณ 2.3  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 1C)

**ส่วนกลาง (Middle region)** ชั้นผิวหนังบริเวณนี้ มีความหนาประมาณ 3.6  $\mu\text{m}$  ผิวด้านนอกประกอบด้วยสันสูงประมาณ 3.6  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 3.8  $\mu\text{m}$  และระยะห่างระหว่างสันประมาณ 13.3  $\mu\text{m}$  และ basal lamina หนาประมาณ 2.0  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 1F)

**ส่วนท้าย (Posterior region)** ชั้นผิวหนังบริเวณนี้ มีความหนาประมาณ 1.7  $\mu\text{m}$  ผิวด้านนอกประกอบด้วยสันสูงประมาณ 3.7  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 2.7  $\mu\text{m}$  และระยะห่างระหว่างสันประมาณ 3.3  $\mu\text{m}$  และ basal lamina หนาประมาณ 1.8  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 2C)

**Oral sucker** ถูกปกคลุมด้วยชั้นผิวที่มีความหนาประมาณ 4.3  $\mu\text{m}$  ผิวทั้งด้านนอกและในประกอบด้วยสันสูงประมาณ 1.2  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 1.8  $\mu\text{m}$  และระยะห่างระหว่างสันประมาณ 2.3  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 2 D, E)

**Ventral sucker** ถูกปกคลุมด้วยชั้นผิวที่มีความหนาประมาณ 2.8  $\mu\text{m}$  ผิวทั้งด้านนอกและในประกอบด้วยสันสูงประมาณ 1.2  $\mu\text{m}$  กว้างประมาณ 1.6  $\mu\text{m}$  และมีระยะห่างระหว่างสันประมาณ 1.9  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 2F)

**ตารางที่ 1** ตารางเปรียบเทียบความหนาของชั้นผิว ความสูงและความกว้างของสัน และระยะห่างระหว่างสันของชั้นผิวด้านนอกของพยาธิใบไม้ตับอ่อน *E. pancreaticum*

ลำตัวพยาธิ	ความหนาของชั้นผิว (ไมโครเมตร)	ความสูงของสัน (ไมโครเมตร)	ความกว้างของสัน (ไมโครเมตร)	ระยะห่างระหว่างสัน (ไมโครเมตร)
<b>ด้านท้อง</b>				
ส่วนหน้า	2.8	2.0	4.0	10
ส่วนกลาง	2.4	4.5	2.5	7.0
ส่วนท้าย	1.7	4.4	2.3	2.9
<b>ด้านหลัง</b>				
ส่วนหน้า	3.6	3.7	2	16.5
ส่วนกลาง	3.6	3.6	3.8	13.3
ส่วนท้าย	1.7	3.7	2.7	3.3

**อภิปรายและสรุปผลการวิจัย**

พยาธิใบไม้ตับอ่อน *E. pancreaticum* มีลักษณะลำตัวแบน tegument มีลักษณะพื้นผิวมีลักษณะขย่นซึ่งเกิดจากการสลับกันระหว่างสัน (ridge) และร่อง (groove) ด้วยโครงสร้างลักษณะเช่นนี้เป็นลักษณะของการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึม (absorption) หรือแลกเปลี่ยน (exchange) สารต่างๆ กับสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยในพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* (Sobhon et al., 2000; Dangprasert et al., 2001; Isseroff and Read, 1969) และ *Opisthorchis viverrini* (Apinhasamit et al., 1993) และอาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ของพยาธิซึ่งจะต้องมีการยึดลำตัวออกไปซึ่ง ridge จะเตี้ยลงและ groove จะกว้างขึ้น และเมื่อหดตัวสันลง ridge ก็จะมีสันขึ้น groove ก็จะแคบ อย่างไรก็ตามชั้นผิวด้านหลังมีลักษณะที่มีสันนูนที่ถี่และสูงกว่าและยังมีความหนามากกว่าด้านท้อง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพยาธิชนิดนี้มีลักษณะลำตัวแบนและกว้างซึ่งต้องอาศัยอยู่ในท่อของตับอ่อนที่มีขนาดเล็กกว่าความกว้างของตัวพยาธิ ทำให้พยาธิจะต้องมีการหดตัวเพื่อให้สามารถอยู่ในท่อที่แคบได้ โดยการหดตัวของพยาธิชนิดนี้ จะม้วนด้านหน้าเข้าด้านในและด้านหลังไว้ด้านนอกทำให้ต้องมีชั้นผิวด้านหลังหนากว่าด้านหน้า ประกอบกับเมื่อพยาธิมีการหดตัวผิวด้านนอกก็จะมีการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่นแร่ธาตุ สารอาหาร ภูมิคุ้มกัน

ของโฮสต์ มากกว่าด้านในพยาธิจึงต้องสร้างพื้นผิวให้มีความซับซ้อนและหนามากขึ้นตามไปด้วยเพื่อช่วยในการแลกเปลี่ยนสารและป้องกันอันตรายต่างๆ จากโฮสต์ ทั้งนี้ส่วนหน้ามีความหนาของชั้นผิวมากที่สุด รองลงมาคือส่วนกลางและส่วนท้ายตามลำดับนั้นอาจเกิดจากการที่พยาธิมีการเคลื่อนที่ของส่วนหน้าและส่วนกลางมากกว่าส่วนท้ายโดยเฉพาะพื้นที่ที่อยู่ระหว่าง oral และ ventral suckers มีการเคลื่อนไหวมากกว่าส่วนอื่นๆ ของลำตัว อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้น ของโครงสร้างของชั้นผิวพยาธิชนิดนี้ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาโครงสร้างละเอียด และการกระจายตัวของแอนติเจนที่สร้างและคัดหลังจากชั้นผิวซึ่งเป็นข้อมูลที่จะสามารถนำไปประยุกต์ ในการพัฒนาองค์ความรู้ในการควบคุมและป้องกันการระบาดของพยาธิชนิดต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ. ชลบุรี ปี 2549

### เอกสารอ้างอิง

- Abath F.G., Xavier E.M., Allen R., Gomes Y.M., Lucena-Silva N., Baliza M., Simpson A.J. 2000. Characterization of Sm13, a tegumental antigen of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 86:745-52.
- Apinhasamit, W., Sobhon, P., Saitongdee, P., Menayotin, S. and Upatham, E.S. 1993. *Opisthorchis viverrini*. Ultrastructure of the tegument of the first-week juveniles and adult flukes. *International Journal for Parasitology*, 23, 829-839.
- Chaithirayanon, K., Wanichanon, C., Vichasri-Grams, S., Ardseungneon, P., Rudi Grams, Viyanant, V., Upatham, E.S., and Sobhon P., 2002. Production and characterization of a monoclonal antibody against 28.5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*, 84: 1-8.
- Dangprasert T., Khawsuk W., Meepool A., Wanichanon C., Viyanant V., Upatham E.S., Wongratana-cheevin S. and Sobhon P. 2001. *Fasciola gigantica* : Surface topography of the adult tegument. *Helminthol.* 75, 43-50.
- Graydon R.J., Carmichael, I.H., Sanchez K.L. 1992. Mortalities and wasting in Indonesian sheep associated with the trematode *Eurytrema pancreaticum*. *Vet Parasitol*; 7:433-437.
- Ishii Y., Koga M., Hiigo T. 1983. Human infection with the pancreas fluke, *Eurytrema pancreaticum*. *American Journal of Tropical Medicine*; 32:1019-1022.
- Isseroff H. and Read C.P. 1969. Studies on membrane transport. VI. Absorption of amino acids by Fasciolid trematodes. *Comp Biochem Physiol.* 15; 30(6) : 1153-9.
- Jiraungkoorskul W., Sahaphong S., Tansatit T., Kangwanrangsan N., Pipatshukiat S. 2005. *Eurytrema pancreaticum*: The in vitro effect of praziquantel and triclabendazole on the adult fluke. *Exp. Parasitol*; 111:172-177.
- Khawsuk W. 2003. Development of *Fasciola gigantica* tegument, identification and localization of associated antigens. *A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy (anatomy)*. Mahidol university.
- Krailas, D., Viyanant, V., Ardseungneon, P., Sobhon, P., Upatham, E.S., Keawjam, R. 1999. Identification of circulating antibodies in fasciolosis and localization of 66 kDa antigenic target using monoclonal antibodies. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 17: 53-58.
- Li Y., Auliff A., Jones M.K., Yi X., McManus D.P. 2000. Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol.* 22: 415-24.

- Min H.K. 1981. An epidemiological study on Zoonoses in Korea. *Kisaengchunghak chapchi*. 19.1, 60-75.
- Sobhon P., Dangprasert T., Chuanchaiyakul S., Meepool A., Khawsuk W., Wanichanon C., et al. 2000. *Fasciola gigantica*: ultrastructure of the adult tegument. *Sci Asia*; 26: 137-148.
- Sobhon , P., Anatavara, S., Dangprasert, T., Viyanant, V., Krailas, D., Upatham, E.S., et al. 1998. *Fasciola gigantica*: studies of the tegument as a basis for the development of immunodiagnosis and vaccine. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 29: 387-400.