

THE VIABILITY OF *OPISTHORCHIS VIVERRINI* METACERCARIAE IN  
KOI-PLA AND ITS VARIOUS INGREDIENTS

II. INCUBATION PERIOD AND INFECTION RATES IN EXPERIMENTAL  
HAMSTER

การคงรอดชีวิตของเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในตับ  
ในก้อยปลาและส่วนผสมเครื่องปรุง

2. ระยะเวลาฟักตัวและอัตราการติดเชื้อในสัตว์ทดลองแฮมสเตอร์

Angoon Keittivuti *	Boonyiam Keittivuti *	Panawadee Tantisirinth **
อังนุ เกียรติวุฒิ	บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ	พรรณวดี ตันติสิรินทร์

\* Department of Parasitology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Bangkok  
Metropolis 10400

ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กน. 10400

\*\* Faculty of Nursing, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาถึงระยะฟักตัวของพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) ในสัตว์ทดลองแฮมสเตอร์ที่ได้รับการติดเชื้อ ผลปรากฏว่าระยะเวลาฟักตัวของกลุ่มทดลองและเปรียบเทียบ (control) ทั้ง 3 การทดลองอยู่ในระยะไม่เกิน 56 วัน หรือเฉลี่ยประมาณ 35.6 วัน การทดลองในกลุ่มเปรียบเทียบ กลุ่มที่จับปลามาในเดือนมกราคมพบว่าระยะฟักตัวจะสั้นกว่ากลุ่มเปรียบเทียบที่จับปลาในเดือนกรกฎาคม และพฤศจิกายน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลา

เมตาเซอร์คาเรียที่นำมาทดลองในเดือนมกราคม อาจมีการเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่ทำให้การติดเชื้อได้เร็ว และสูงกว่าเดือนกรกฎาคม และพฤศจิกายน

### Abstract

The objective of this study is to determine the incubation period of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. The results indicated that the incubation periods obtained from all experimental and control groups were not longer than 56 days (average 35.6 days). The incubation period of metacercariae from infected fish in January was shorter than those from infected fish in July and November. It is probably due to the metacercariae being used in January were fully mature and infective than those in July and November.

### Introduction

Since the mean of entry of *Opisthorchis viverrini* into a definitive host is via the ingestion of infective metacercariae, it is believed that the excystment of metacercariae is triggered probably by a specific set of physico-chemical conditions of the host incorporated with the larval activities. The excysted larvae then undergo a considerable migration through the host tissues and finally developed into the adult stages at the usual location of the host. The period commencing from the time the parasite entered the host and developed into a mature is referred to as the incubation period. This period of development of the parasite is rather quite varied. According to Waikakul (1974), the 12-week old metacercariae of *O. viverrini* showed the highest percentage of recovery of the adult worms in hamsters with a wide range of incubation period (31-81 days) while Wykoff *et al.* (1966) demonstrated that the incubation period was about 31 days.

Therefore, in order to find out how long the incubation period takes, the present study was then observed. The incubation period of *O. viverrini* in this experiment is based on the observation obtained from the findings of previous studies as described in Part I of the viability of *O. viverrini* metacercariae in Koi-Pla and its various ingredients in experimental hamsters (Keittivuti *et al.*, 1983.)

### Materials and methods

Source of infected fish, experimental procedure and experimental animals were previously described in Part I: infection rate and infectivity in experimental hamster of the viability of *O. viverrini* metacercariae in Koi-Pla (Keittivuti *et al.*, 1983).

### Results

The results obtained from this study indicate that the incubation periods of *O. viverrini* in control 1 (without ingredient), moderate taste (A-1 form) and concentrated taste (B-1 form) of experiment 1 are between 28-39 days (mean 37.3 days), 35-49 days (mean 36 days) and 28-42 days (mean 32 days), respectively, as illustrated in Table 1 and Figure 1. Figure 1 indicated that the mean of the incubation period of all infected hamsters is 35 days. It appeared that the ingredient of A-1 form did not affect the viability of metacercariae compare to control 1. However, increasing the ingredients as in B-1 form seem to facilitate the parasites to become into the adult faster. The time of the parasites in A-1 form and control 1 develop into the adults longer than those in B-1 form.

Table 1. The incubation periods of *O. viverrini* in experimental hamsters after feeding with metacercariae from various form of Koi-Pla of experiment I (Control 1, A-1 form, B-1 form) in 60 experimental hamsters (July 1982).

Incubation period (days)	Accumulated number and % of hamsters with positive adult <i>O. viverrini</i>							
	Control 1		A-1 form		B-1 form		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	N <sup>o</sup> .	%
28	1	5.6	0	0	4	25	5	9.5
35	7	38.9	8	44.4	11	68.8	26	50
42	13	72.2	14	78.8	16	100	43	82.7
49	18	100	18	100	16	100	52	100
56	18	100	18	100	16	100	52	100
Total positive hamsters	18	100	18	100	16	100	52	100
No. of inoculated hamsters	20		20		20		60	
Percentage of infection rate	90		90		80		86.6	

\* The incubation periods of *O. viverrini* was determined by the first appearance of *O. viverrini* eggs passed in the stool.

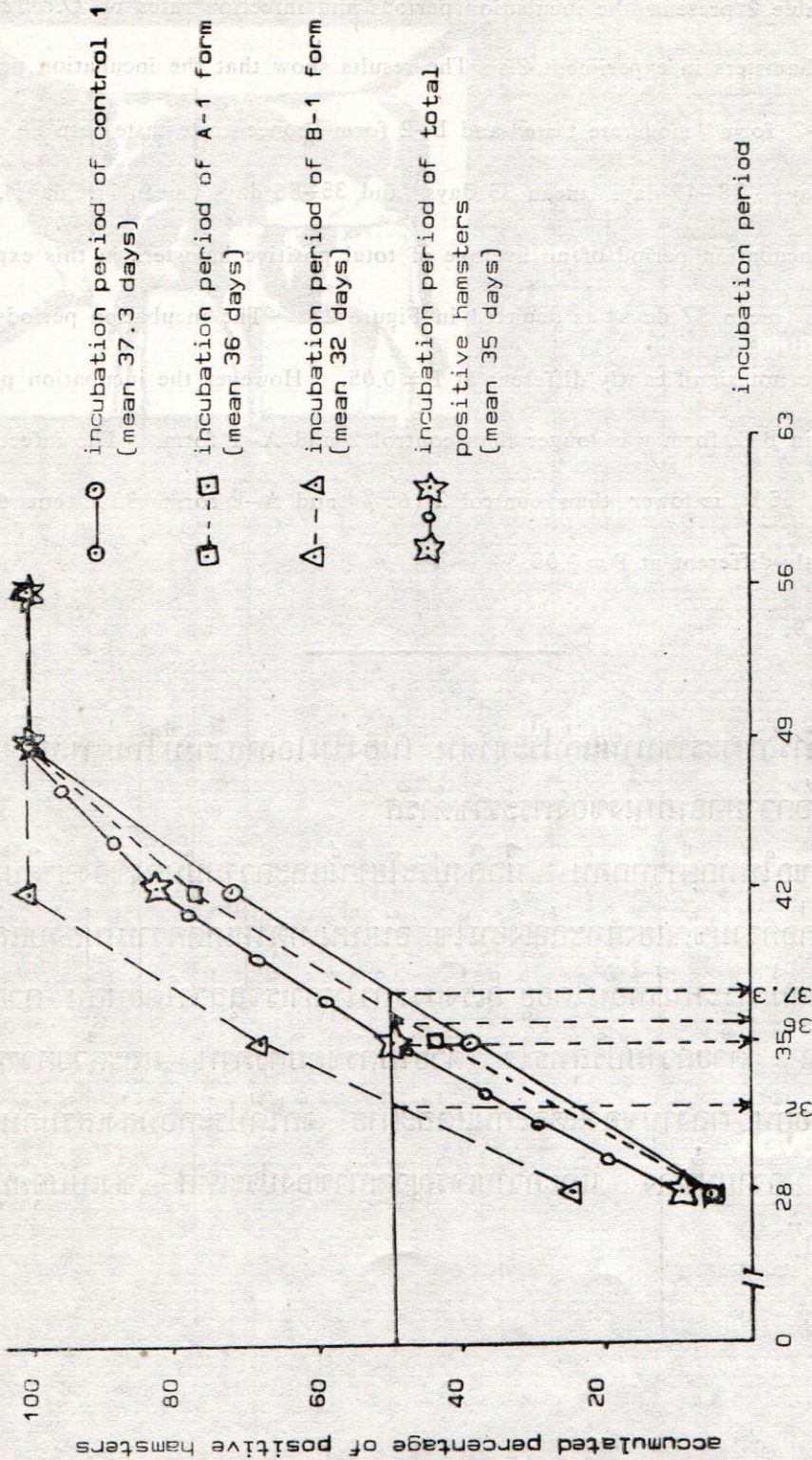


Figure 1. The correlation between accumulated percentage of positive hamsters and incubation period of *Q. viverrini* metacercariae in experiment I.

Table 2 presents the incubation periods and infection rates of *O. viverrini* in experimental hamsters in experiment 2. The results show that the incubation periods in control 2, A-2 form (moderate taste) and B-2 form (concentrate taste) are 28-56 days (mean 35.6 days), 28-49 days (mean 35 days) and 35-56 days (mean 41.6 days), respectively. The incubation period of an average of total positive hamsters in this experiment is 35-56 days (mean 37 days) as depicted in Figure 2. The incubation periods in this experiment are not significantly different at  $P = 0.05$ . However the incubation period of the parasites in B-2 form was longer than control 2 and A-2 form. The infection rate of B-2 form (55%) is lower than control 2 (65%) and A-2 form (80%) but they are not significantly different at  $P = 0.05$ .

### พระราชดำรัสพระราชทานแก่ประชาชน เนื่องในโอกาสขึ้นปีใหม่ พ.ศ. 2527

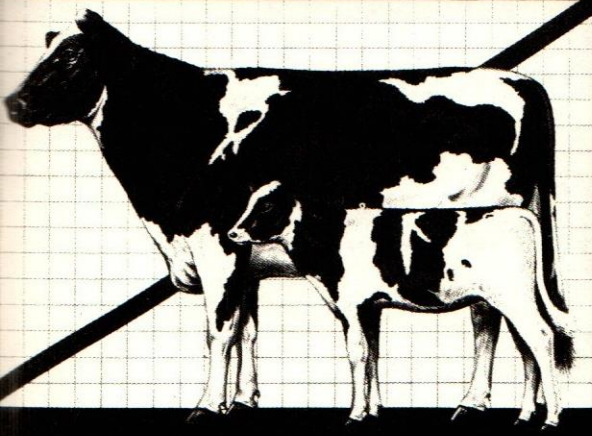
ข้อความตอนหนึ่งของพระราชดำรัส

“ขอให้ทุกฝ่ายทุกคน นึกถึงประโยชน์และความมั่นคงของชาติบ้านเมืองให้มาก อย่าก่อความขัดแย้งและก่อเงื่อนไข อันเป็นเหตุให้เกิดความไม่สงบและความแตกแยก ผู้ใดมีภาระหน้าที่อันใดอยู่ ก็เร่งกระทำให้สำเร็จลุล่วงโดยพลัน ด้วยความรู้ความสามารถ ด้วยความบริสุทธิ์ใจ ด้วยไมตรีจิตมิตรภาพ และด้วยความเมตตาปรารถนาดีต่อกัน ผลงานของแต่ละคนแต่ละฝ่าย จักได้ประกอบส่งเสริมกันขึ้นเป็นความสำเร็จ ความมั่นคง และความเจริญวัฒนาของประเทศ ซึ่งเป็นจุดมุ่งหมายสูงสุดของเรา”

เพิ่มผลผลิตน้ำนมด้วย

"สารเพิ่มน้ำนม"

## โทเบนโซล\*



จากการทดลองตรวจสอบมานานกว่าสิบปีในหลายแห่งทั่วโลก พิสูจน์แล้วว่า เมื่อถ่ายพยาธิโคด้วย "โทเบนโซล" ในวันคลอดลูก จะได้น้ำนมเพิ่มมากขึ้นถึง 398 กิโลกรัมต่อตัว

### เนเธอร์แลนด์

ทดลองในฟาร์ม 28 แห่ง มีจำนวนโค 542 ตัว โค 276 ตัว ได้รับยาถ่ายพยาธิ "โทเบนโซล" ให้น้ำนมมากกว่าโคที่ไม่ได้รับยาถ่ายพยาธิถึง 229 กิโลกรัม/ตัว/ระยะเวลาให้นม

### สหรัฐอเมริกา

ทดลองในฟาร์ม 12 แห่ง โคที่ถ่ายพยาธิด้วย "โทเบนโซล" ให้น้ำนมเพิ่มขึ้น 192 กิโลกรัม/ตัว/ระยะเวลาให้นม

### เบลเยียม

ทดลองในโค 190 ตัว (ฟาร์ม 12 แห่ง) โคที่ถ่ายพยาธิด้วย "โทเบนโซล" ผลิตน้ำนมได้มากกว่าโคที่ไม่ได้รับยาถ่ายพยาธิถึง 398 กิโลกรัม/ตัว/ระยะเวลาให้นม

ท่านจะไม่คงพิสูจน์ดูบ้างหรือ ?

สอบถามรายละเอียดได้ที่

**MSD AGVET** 

บริษัท เมอร์ค อี.แอนด์ โค. จำกัด (ประเทศไทย) จำกัด

126 ถ. สุขุมวิท กม. 23 อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 10270

โทร. 3941421-2

ผู้แทนจำหน่าย

บริษัท บี. เอ็ล. เอ็ช. เทรดดิ้ง จำกัด

27/2 - 3 ถ. วิทย์ กรุงเทพฯ 10500

\* เครื่องหมายการค้า

# Penomycin\*

(เพ็นโนมัยซิน\*)

ยาปฏิชีวนะ

สำหรับสัตว์

ประกอบด้วยยา

**PROCAINE PENICILLIN**

และ **STREPTOMYCIN SULFATE**

ตามมาตรฐานของ

**บริษัท เมอร์ด ชาร์พ แอนด์ โดห์ม**

**แห่งสหรัฐอเมริกา**



บริษัท เมอร์ด ชาร์พ แอนด์ โดห์ม (ประเทศไทย) จำกัด

126 ถ. สุขุมวิท กม. 23 อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 10270

โทร. 3941421-2

ผู้แทนจำหน่าย

บริษัท บี. เอ็ล. เอ็ช. เทรดิง จำกัด

27/2 - 3 ถ. วิทย์ กรุงเทพฯ 10500

\* เครื่องหมายการค้า



Table 2. The effects of Koi-Pla recipes on the percentage of infection rate of *O. viverrini* metacercariae and incubation period from experiment II (control 2, A-2 form and B-2 from) in 60 experimental hamsters (November 1982).

Incubation period (days)	Accumulated number and % of hamsters with positive adult <i>O. viverrini</i>							
	Control 2		A-2 form		B-2 form		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
28	2	15.4	1	6.3	0	0	3	7.5
35	6	46.2	8	50.4	2	18.2	16	40
42	10	77	14	88.2	6	54.6	30	75
49	12	92.4	16	100	9	81.9	37	92.5
56	13	100	16	100	11	100	40	100
Total positive hamsters	13	100	16	100	11	100	40	100
No. of inoculated hamsters	20		20		20		60	
Percentage of infection rate	65		80		55		66.6	

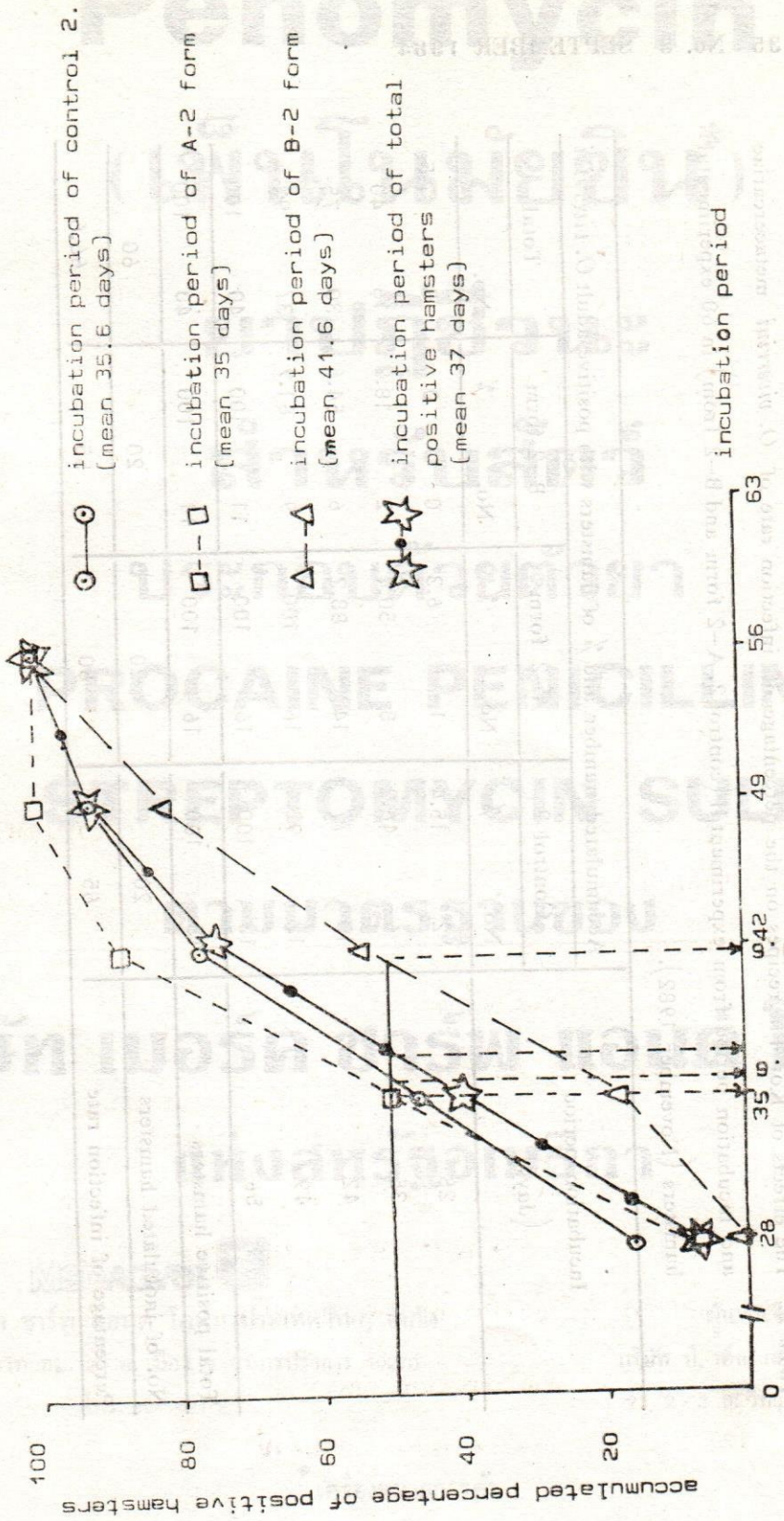


Figure 2. The correlation between accumulated percentage of positive hamsters and incubation period of *O. viverrini metacercariae* in experiment II.

The incubation periods obtained from experiment 3 were shorter than those previously mentioned. The majority of the experimental hamsters in this experiment are positive with *O. viverrini* eggs at 28-42 days while only 4 hamsters are negative with *O. viverrini* at 42 days (Table 3). Figure 3 demonstrated that the incubation periods of the parasites exposed to chilli and lime juice are almost the same as in control 3 (mean 32.6 days, 31 days and 33.6 days, respectively). But the incubation period of parasites exposed to fish sauce ingredient appears slightly lower than in the control. The infection rate of the parasites being exposed to 4 ingredients in this experiment was 100% after 42 days of observation.

ผลแห่งทาน

ผู้บริจาคทานเป็นนิตย์ นอกจากกำจัดความโลภและความตระหนกใจได้แล้ว ยังได้ผลด้อย่างนอก คือ

1. ทำให้เป็นพรกนบถของกนทวไป
2. ทำให้เป็นทหน้าคบหาของกนด
3. ทำให้มเกยรต มยศ มชอเสยงด
4. ทำให้เป็นผู้กล้าหาญ ไม่เก้อเงินในทชุมนุมน
5. ทำให้ได้สวรรคตสมบัติเมื่อลวงลับไปแล้ว

บุคคลให้ทานไม่ได้ด้วยเหตุ 2 ประการคือ ความตระหนก 1 ความประมาท 1 บัณฑิตเมื่อต้องการบุญ จึงให้ทานด้วยความเต็มใจ

จากใบอนุโมทนาบัตร  
วัดพระธรรมกาย ปทุมธานี

Table 3. The incubation periods of *O. viverrini* in experimental hamsters after feeding with metacercariae in Control 3, and various ingredients (Experiment III) in 60 experimental hamsters (January 1983).

Incubation interval (days)	Accumulated number and % of hamsters with positive adult <i>O. viverrini</i>										Total No. %
	Control 3		Chilli powder		Fish sauce		Lime juice				
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
28	5	29.4	6	30	12	60	8	40	31	40.3	
35	9	52.9	12	60	15	75	8	40	44	57.2	
42	17	100	18	90	20	100	18	90	73	49.9	
49	17	100	20	100	20	100	20	100	77	100	
56	17	100	20	100	20	100	20	100	77	100	
Total positive hamsters	17		20		20		20		77		
No. of inoculated hamsters	17		20		20		20		77		
Percentage of infection rate	100		100		100		100		100		

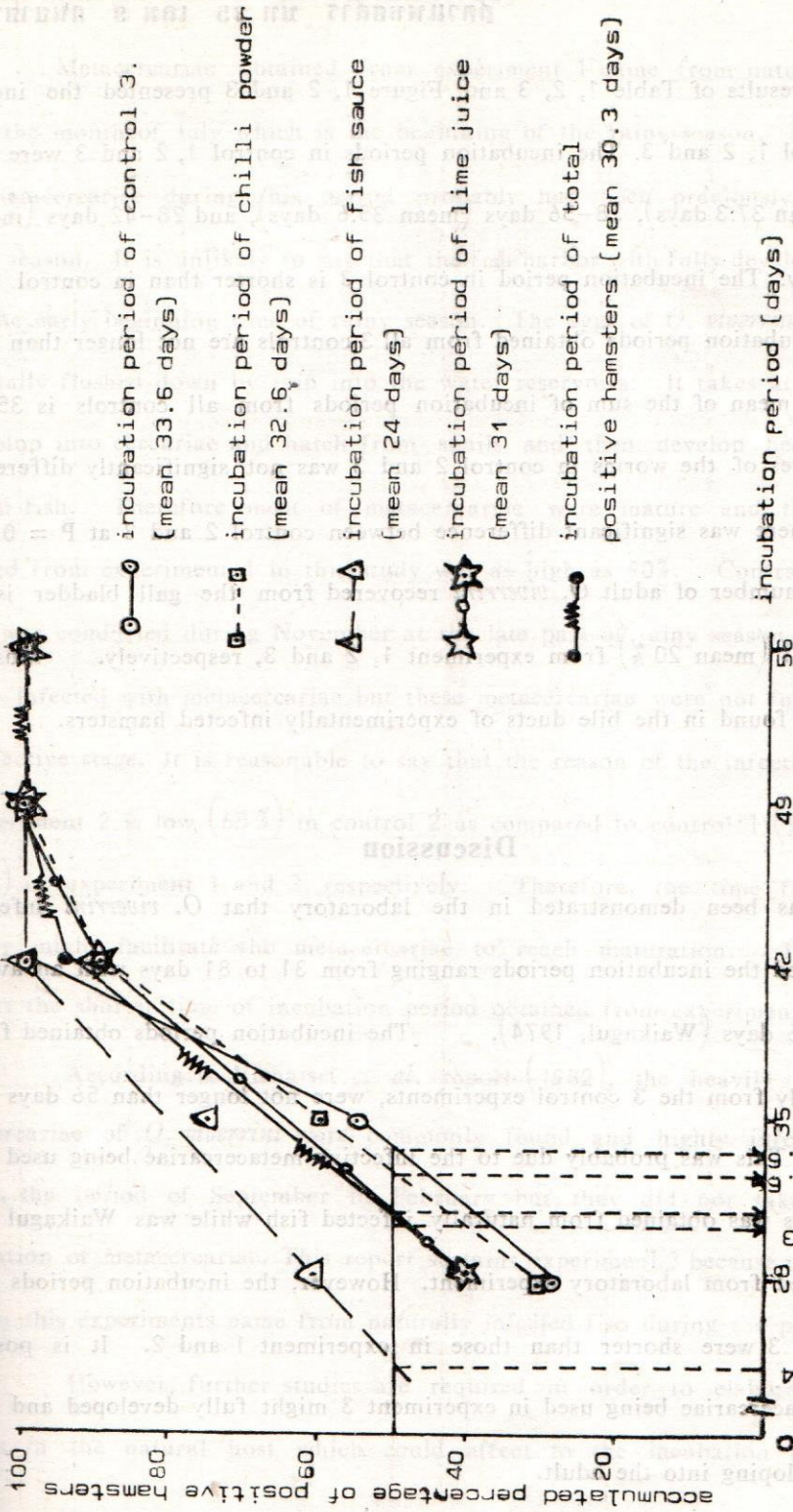


Figure 3. The correlation between accumulated percentage of positive hamsters and incubation period of *O. viverrini* metacercariae in experiment III.

The results of Table 1, 2, 3 and Figure 1, 2 and 3 presented the incubation periods of control 1, 2 and 3. The incubation periods in control 1, 2 and 3 were between 28-49 days (mean 37.3 days), 28-56 days (mean 35.6 days), and 28-42 days (mean 33.6 days) respectively. The incubation period in control 3 is shorter than in control 1 and 2. However, the incubation periods obtained from all 3 controls are not longer than 8 weeks (56 days). The mean of the sum of incubation periods from all controls is 35.6 days. The infection rates of the worms in control 2 and 3 was not significantly different from control 1, but there was significant difference between control 2 and 3 at  $P = 0.05$ .

The number of adult *O. viverrini* recovered from the gall bladder is 18.7%, 12.6% and 21.9% (mean 20%) from experiment 1, 2 and 3, respectively. Most of the adult worms are found in the bile ducts of experimentally infected hamsters.

### Discussion

It has been demonstrated in the laboratory that *O. viverrini* infection in hamsters exhibited the incubation periods ranging from 31 to 81 days with an average of approximately 56 days (Waikagul, 1974). The incubation periods obtained from this study, particularly from the 3 control experiments, were not longer than 56 days (average 35.6 days). This was probably due to the infective metacercariae being used in these three experiments was obtained from naturally infected fish while was Waikagul's metacercariae obtained from laboratory experiment. However, the incubation periods obtained from experiment 3 were shorter than those in experiment 1 and 2. It is possible to assume that metacercariae being used in experiment 3 might fully developed and infective in the host developing into the adult.

Metacercariae obtained from experiment 1 came from naturally infected fish during the month of July which is the beginning of the rainy season. The fish harbored with metacercariae during this period probably had been previously infected from the former season. It is unlikely to say that the fish harbor with fully developed metacercariae since the early beginning time of rainy season. The eggs of *O. viverrini* in fecal material are usually flushed down by rain into the water reservoirs. It takes at least 1-2 months to develop into cercariae and hatch from snails and then develop becoming metacercarial stage in fish. Therefore most of metacercariae were mature and the infection rates obtained from experiment 1 in this study was as high as 90%. Contrastly experiment 2, which was conducted during November at the late part of rainy season, the fish might be heavily infected with metacercariae but these metacercariae were not fully developed into the infective stage. It is reasonable to say that the reason of the infection rate illustrated in experiment 2 is low (65%) in control 2 as compared to control 1 (90%) and control 3 (100%) in experiment 1 and 3, respectively. Therefore, the time from November to January might facilitate the metacercariae to reach maturation. This probably also sustains the shorter time of incubation period obtained from experiments 3.

According to Vichaisri *et al.* report (1982), the heavily infected fish with metacercariae of *O. viverrini* were commonly found and highly infective to the hosts during the period of September to February but they did not take into account the maturation of metacercariae. This report sustains experiment 3 because metacercariae being used in this experiments came from naturally infected fish during the period of January.

However, further studies are required in order to elaborate upon the other factors in the natural host which could affect to the incubation period. This study

concludes that most of the adult worms were recovered from the bile duct as Riganti mentioned (1977).

### Acknowledgement

The authors would like to express their sincere appreciation to Professor M.R., P. Varavudhi, Department of Zoology, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University for supporting the experimental animals. Grateful acknowledgement is also extended to all concerned and rendered the successful and completeness of this work.

### References

- Keittivuti, A., Keittivuti, B. and Tantisirinth, P. (1983). The Viability of *Opisthorchis viverrini* Metacercaria in Koi-Pla and Its Various Ingredients I. Infection Rate and Infectivity in Experimental Hamster. J. Thai Vet. Med. Ass. 34 : 209-225.
- Riganti, M. (1977). Pathology of *Opisthorchis viverrini* (abst.). Seminar on Trematode Infection in Man in Thailand. Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand. June 23-24, 1977, P. 17.
- Vichasiri, S., Viyanant, V. and Upathum, E.S. (1982). *Opisthorchis viverrini* : Intensity and Rates of Infection in Cyprinoid Fish from an Endemic Focus in Northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. and Pub. Hlth 13 : 138-141.
- Waikakul, J. (1974). The Study on the infectivity of *Opisthorchis viverrini* metacercaria, A thesis : Master of Sciences (Trop. Med.), Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University. : 1-38.