การระบุสัณฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ *Paragonimus paishuihoensis*
จากจังหวัดจันทบุรี

ปริญญานิพนธ์
ของ
วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
สิงหาคม 2554

การระบุสัณฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ *Paragonimus paishuihoensis*
จากจังหวัดจันทบุรี

ปริญญานิพนธ์
ของ
วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
สิงหาคม 2554
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การระบุสัณฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ *Paragonimus paishuihoensis*
จากจังหวัดจันทบุรี

บทคัดย่อ
ของ
วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
สิงหาคม 2554

วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์. (2554). *การระบุสัณฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ Paragonimus paishuihoensis จากจังหวัดจันทบุรี*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ, ดร. ฮิโรมุ ซุกิยามา.

การสำรวจในภาคสนามอย่างจริงจังนำไปสู่การค้นพบพยาธิใบไม้ปอดที่มีการบันทึกครั้งใหม่ในประเทศไทย (จังหวัดจันทบุรี) ซึ่งมีลักษณะพิเศษทางสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างอย่างชัดเจนจากพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย คือ ลักษณะของ excretory bladder มีการแตกแขนงหลายแขนง ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้สอดคล้องกับพยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus paishuihoensis* ที่มีรายงานการค้นพบในสาธารณรัฐประชาชนจีน จากการทดลองทำให้ติดเชื้อ *P. paishuihoensis* ของไทยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 2 ประเภท ได้แก่ หนูและแมว ปรากฏว่าไม่พบการติดเชื้อในหนู ส่วนในแมวพบการติดเชื้อและได้พยาธิในระยะ immature จำนวน 6 ตัว ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในครั้งนี้กับ *P. paishuihoensis* ที่พบในมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่าพยาธิใบไม้ปอดทั้งสองกลุ่มมีความเหมือนกันสูงถึง 99.18% และ 97.09% ตามลำดับ ดังนั้นจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุลทำให้สามารถยืนยันการค้นพบ *P. paishuihoensis* ของไทย นอกจากนี้ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในประเทศไทยพบว่า *P. paishuihoensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้ปอดในกลุ่ม *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai*

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *PARAGONIMUS PAISHUIHOENSIS* FROM CHANTHABURI PROVINCE

AN ABSTRACT

BY

WIMONMARN SOPUNNARAT

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Education Degree in Biology

at Srinakharinwirot University

August 2011

Wimonmarn Sopunnarat. (2011). *Morphological and Molecular Characterization of Paragonimus paishuihoensis from Chanthaburi Province*. Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assist. Prof. Dr. Achariya Rangsiruji, Dr. Hiromu Sugiyama.

Extensive field surveys have led to a finding of a lung fluke species as a new record in Thailand (Chanthaburi Province). This lung fluke possesses a distinguished morphological characteristic, *i.e*. a dendritic excretory bladder which is remarkably different from other lung flukes previously reported in Thailand. This characteristic is conforming with that of *Paragonimus paishuihoensis* which occurs in China. Experimental infections of these Thai *P. paishuihoensis* specimens were carried out using two types of mammalian host which were rats and cat. The results revealed no infection in the rats but a positive infection in the cat with six immature flukes obtained. Pairwise comparison of ITS2 as well as partial COI nucleotide sequences between *Paragonimus* found in this study and *P. paishuihoensis* from Yunnan Province, China showed high similarities of 99.18% and 97.09%, respectively. Therefore, based on the nucleotide sequence data the identity of Thai *P. paishuihoensis* has been confirmed. In addition, resulting molecular phylogenies using the ITS2 and partial COI nucleotide sequences among *P. paishuihoensis* and other Thai *Paragonimus* species illustrated a close relationship between *P. paishuihoensis* and a group of *P. bangkokensis* and *P. harinasutai*.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การระบุสัณฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ *Paragonimus paishuihoensis*
จากจังหวัดจันทบุรี
ของ
วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.......เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2554

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์	คณะกรรมการสอบปากเปล่า
....ประธาน (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ)	....ประธาน (ดร. ดวงใจ บุญกุศล)
....กรรมการ (Dr. Hiromu Sugiyama)	....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ)
	....กรรมการ (Dr. Hiromu Sugiyama)
	....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ธวัช ดอนสกุล)

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์
จาก
โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความดูแลและช่วยเหลืออย่างยิ่งดีจาก ผศ.ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ เสนอแนะ รวมถึงการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา และขอขอบคุณ Dr. Hiromu Sugiyama กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ รวมถึงความช่วยเหลือในการทดลองเพื่อหาตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดในแมว ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา ความเอื้ออาทรของท่านทั้งสองและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ Dr. Masatsune Takeda จากมหาวิทยาลัย Teikyo Heisei ประเทศญี่ปุ่น ที่กรุณาช่วยเหลือในการจำแนกสปีชีส์ของปูน้ำตกที่ศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสุธีวรรณ บินชัย และคุณสิทธิพร ปานเม่น ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาด้านเทคนิคต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนความรู้ความสามารถที่ผู้วิจัยได้ซึมซับและนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณดิษฐพร แก้วมุนีโชค และครอบครัวของข้าพเจ้า รวมถึงเพื่อนร่วมรุ่น กศ.ม ชีววิทยาทุกท่าน สำหรับกำลังใจที่มีค่ายิ่ง

คุณประโยชน์จากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดามารดาผู้ให้กำเนิด และบูรพาจารย์ผู้ประสิทธิประสาทวิชา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**……………………………………………………………………………….	1
	ภูมิหลัง…………………………………………..……..……………………….…...	1
	ความมุ่งหมายของงานวิจัย……………………………….……………..……….	4
	ความสำคัญของงานวิจัย………………………………………………..……….…..	4
	ขอบเขตของงานวิจัย………………………………………………………..………….	4
	สมมติฐานการวิจัย………………………………………………………..………….	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**………………………………………............….	5
	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด……………………..………………....	5
	การจัดอนุกรมวิธานของพยาธิใบไม้ปอด…………………………………..…….....	9
	วงชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด…………………………………………………………….….	10
	การจำแนกสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา…….........	14
	พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ ที่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทย…………….....	15
	การศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล……………………………………..……..…..	22
	การศึกษาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ในพยาธิใบไม้ปอด………………………………………………………..….....	24
	งานวิจัยเกี่ยวกับ *P. paishuihoensis* ในประเทศจีน……………..………………..	25
3	**วิธีดำเนินการศึกษาวิจัย**…………………..………………..……………..…….....	29
	อุปกรณ์และสารเคมี………………………………………………………….………...….	29
	วิธีการทดลอง…………………………………………………………..………..….....	31
	การเก็บตัวอย่างปูน้ำจืด และการตรวจสอบสปีชีส์………………….........…....	31
	การตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียและการตรวจสอบสปีชีส์เบื้องต้น………..…..….	31
	การทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิ……………………......……...	32
	การศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของ *P. paishuihoensis*……………………….....….	33
	การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล……………………..…………....…....	33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง...	38
การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา..	38
การเก็บตัวอย่างปูน้ำตกและการตรวจสอบสปีชีส์...	38
เมตาเซอร์คาเรียและการตรวจสอบสปีชีส์เบื้องต้น...	39
การทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิ..	40
การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล..	41
การสกัด DNA และการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS2 และบริเวณ บางส่วนของยีน COI ด้วยเทคนิค PCR..	41
การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. paishuihoensis* ที่ตรวจพบจาก การศึกษาครั้งนี้ กับ *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน.......................	42
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับ พยาธิ ใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2..	45
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิ ใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ บางส่วนของยีน COI..	50
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..	56
บรรณานุกรม..	59
ภาคผนวก..	65
อภิธานศัพท์..	70
ประวัติย่อผู้วิจัย..	72

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง……………………………………………………….….....	30
2	Primer สำหรับทำ PCR…………………………………………………………..……	35
3	ส่วนประกอบในการทำ PCR บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI……..…...	35
4	รายละเอียดของพยาธิใบไม้ปอดและพยาธิใบไม้ตับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้…....…	37
5	Sequence characteristics ของบริเวณ ITS2………………………………….....	49
6	Sequence characteristics บริเวณบางส่วนของยีน COI…………….………….	54

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แหล่งระบาดของโรคพยาธิใบไม้ปอด………………………………..…………..…….	1
2	การแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ปอดในประเทศไทย……………………..…….	3
3	ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด…………………………………….…..………	6
4	ไข่ของพยาธิใบไม้ปอด………………………………………………….……….……	7
5	ไมราซิเดียมของพยาธิใบไม้ปอด…………………………………..……....….	7
6	เรเดียของพยาธิใบไม้ปอด…………………………………….……...….……...	8
7	เซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด……………………….…………………..….	9
8	วงชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด………………………………………...............…….	11
9	ตัวอย่างหอยน้ำจืดฝาเดียวที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่งของพยาธิใบไม้ปอด…...	12
10	ตัวอย่างปูน้ำจืดและกุ้งน้ำจืดที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของพยาธิใบไม้ปอด….	13
11	การจัดเรียงของหนามบริเวณลำตัวของพยาธิใบไม้ปอด………………………..…...	14
12	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. westermani*…………………………...….	15
13	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. macrorchis*…………………………...….	16
14	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. heterotremus*………………………...….	17
15	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. siamensis*…………………..……….…....	18
16	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. bangkokensis*………………….……….	19
17	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. harinasutai* ………………...…………..	20
18	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. pseudoheterotremus*……….…………..	21
19	การจัดเรียงตัวของ nuclear ribosomal DNA ที่พบในยูคาริโอต………………….	23
20	แผนที่จีโนมของไมโทคอนเดรียของ *P. westermani filipinus*………….……...….	24

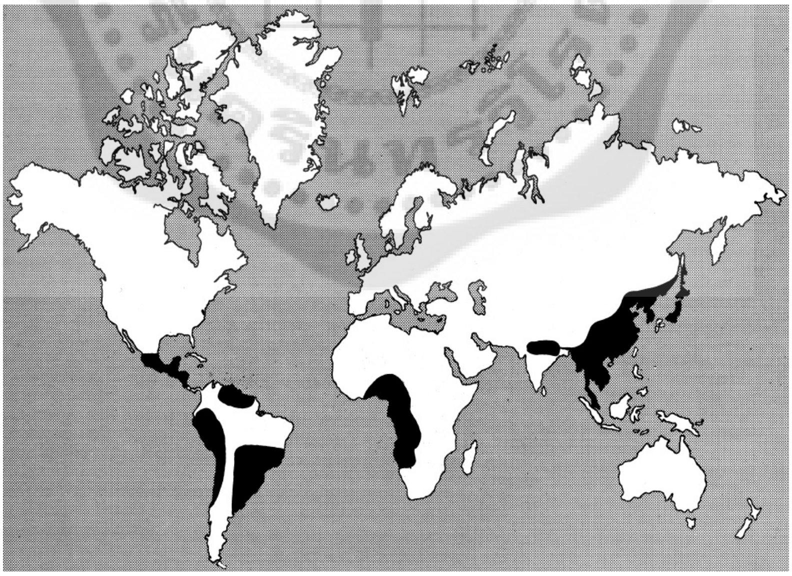
บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
21	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดในสาธารณรัฐประชาชนจีนจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2……………………….………..……	27
22	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดในสาธารณรัฐประชาชนจีนจากข้อมูลลำดับนนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI……………………..…	28
23	ปูน้ำจืด *Potamon boonyaratae* (Naiyanetr. 1987)……………………………..	38
24	เมตาเซอร์คาเรียของ *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรี………………………	39
25	ตัวอ่อนของพยาธิ *P. paishuihoensis* ที่ออกจากซีสต์…………………………….	40
26	พยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีในระยะ immature ที่ได้จากการติดเชื้อในแมว………………………………………………………….....	41
27	ขนาดของ PCR product บริเวณ ITS2 และบริเวณบางส่วนของยีน COI………....	42
28	ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่าง *P. paishuihoensis* ที่มาจากจังหวัดจันทบุรี กับ มณฑลยูนนาน………………………………….....	43
29	ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ระหว่าง *P.paishuihoensis* ที่มาจากจังหวัดจันทบุรี กับ มณฑลยูนนาน…………………	44
30	ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 9 taxa และ outgroup……………………………………………………………..….	46
31	Single most parsimonious tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *P. paishuihoensis* และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทยโดยมี *F. hepatica* เป็น outgroup……………………………………………..…	50
32	ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ของพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 9 taxa และ outgroup………………………………………………………	51
33	Strict consensus tree ซึ่งได้มาจาก 2 equally parsimonious tree (ความยาว 311 step) ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ของ *P. paishuihoensis* และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทยโดยมี *F. hepatica* เป็น outgroup…………………………………………………..…	55

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

พยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus*) เป็นปรสิตที่มีระยะตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในเนื้อปอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีบางสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ปอด (paragonimiasis) ในคนซึ่งมีอาการคล้ายกับวัณโรค (tuberculosis) คือ ไอเรื้อรังและมักมีเลือดปนออกมากับเสมหะ คนได้รับตัวอ่อนของพยาธิในระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) โดยการรับประทานอาหารที่ทำมาจากปูหรือกุ้งน้ำจืดแบบไม่สุก จากนั้นตัวอ่อนจะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยและเข้าไปอาศัยอยู่ในถุงซีสต์ (cyst) ในเนื้อปอดของคน (เดชา ศรีสนธิ์; จิตรา ไวคกุล; และ สนั่น แย้มพุฒ. 2540: 1) ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดทั่วโลกมากกว่า 40 สปีชีส์ (Blair; Xu; & Agatsuma. 1999: 113-222) ส่วนใหญ่อยู่ในทวีปเอเชีย แอฟริกาและอเมริกา (ภาพประกอบ 1) และมีประมาณ 14 สปีชีส์ที่มีรายงานติดเชื้อในคน (Bunnag; & Harinasuta. 1984: 465-470) ในทวีปเอเชียส่วนใหญ่ (ประมาณ 30 สปีชีส์) ถูกค้นพบในประเทศจีน (Li. 1999: 59-62) และมีอย่างน้อย 6 สปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์คือ *Paragonimus westermani, P. heterotremus, P. miyazakii, P. skrjabini, P. philippinensis* และ *P. hueitungensis* (Miyazaki. 1974: 101-135)



ภาพประกอบ 1 แหล่งระบาดของโรคพยาธิใบไม้ปอด

ที่มา: Philip, E.S. P. (2010). *The Imaging of Tropical Diseases*. (Online).

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาและรายงานการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดแล้ว 7 สปีชีส์ ได้แก่ *P. westermani, P. macrorchis, P. heterotremus, P. siamensis, P. bangkokensis*, *P. harinasutai* (Vajrasthira. 1969: 299-304) และสปีชีส์ที่ค้นพบล่าสุดคือ *P. pseudoheterotremus* (Waikagul. 2007: 1496-1500)

โรคพยาธิใบไม้ปอดมีรายงานการพบในผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทยโดยนายแพทย์เฉลิม พรหมมาศ ที่อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ (Prommas. 1928: 67-77) หลังจากนั้นได้มีรายงานการพบพยาธิใบไม้ปอดในอีกหลายพื้นที่ตามมา ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดในประเทศไทยรวมทั้งหมด 23 จังหวัด (Waikagul; & Yoonuan. 2005: 139-148) (ภาพประกอบ 2) โดยมีเพียงหนึ่งสปีชีส์ได้แก่ *P. heterotremus* ที่มีรายงานการระบาดในคน (Vanijanonta; Bunnag; & Harinasuta. 1984: 1186-1188)

จากการศึกษาตัวอย่างปูน้ำตกบริเวณลำธารใกล้น้ำตกตรอกนอง ในจังหวัดจันทบุรี ผู้วิจัยได้ตรวจพบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดที่มีลักษณะแตกต่างจากเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ในประเทศไทยคือ ซีสต์รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดใหญ่ และที่สำคัญส่วนของ excretory bladder มีการแตกแขนงเป็นจำนวนมาก จากการที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลพบว่า ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรียดังกล่าวมีความสอดคล้องกับพยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus paishuihoensis* ที่ได้เคยมีรายงานการค้นพบที่มณฑลเสฉวนและมณฑลยูนนานในสาธารณรัฐประชาชนจีน ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อยืนยันสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในครั้งนี้ และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ดังกล่าวกับสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในประเทศไทย

1. อยุธยา
2. สระบุรี
3. นครนายก
4. ปราจีนบุรี
5. จันทบุรี
6. เพชรบุรี
7. ราชบุรี
8. กาญจนบุรี
9. เพชรบูรณ์
10. พิษณุโลก
11. ตาก
12. แม่ฮ่องสอน
13. ลำพูน
14. เชียงราย
15. น่าน
16. เลย
17. อุดรธานี
18. หนองคาย
19. สกลนคร
20. ขอนแก่น
21. ร้อยเอ็ด
22. ชุมพร
23. สุราษฎร์ธานี

ภาพประกอบ 2 การแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ปอดในประเทศไทย

ที่มา: ดัดแปลงจาก เดชา ศรีสนธิ์; จิตรา ไวคกุล; และ สนั่น แย้มพุฒ. (2540). *พยาธิใบไม้ปอด*. หน้า 67.

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อยืนยันสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอด (*P. paishuihoensis*) ที่ตรวจพบจากปูน้ำตกในจังหวัดจันทบุรี โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI

ความสำคัญของงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* ซึ่งเป็นการรายงานการพบสปีชีส์นี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ข้อมูลเกี่ยวกับปูซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง (second intermediate host) และทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในประเทศไทยได้

ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บปูน้ำตกบริเวณลำธารใกล้น้ำตกตรอกนองในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เพื่อแยกเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด ศึกษารูปร่างลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย ทำการติดเชื้อในสัตว์ทดลองที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 2 ประเภทได้แก่ หนู (Wistar) และแมว (Japanese cat) และศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยนำเมตาเซอร์คาเรียมาสกัด DNA เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS2 และบริเวณบางส่วนของยีน COI จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ยืนยันสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอดที่พบและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

สมมติฐานการวิจัย

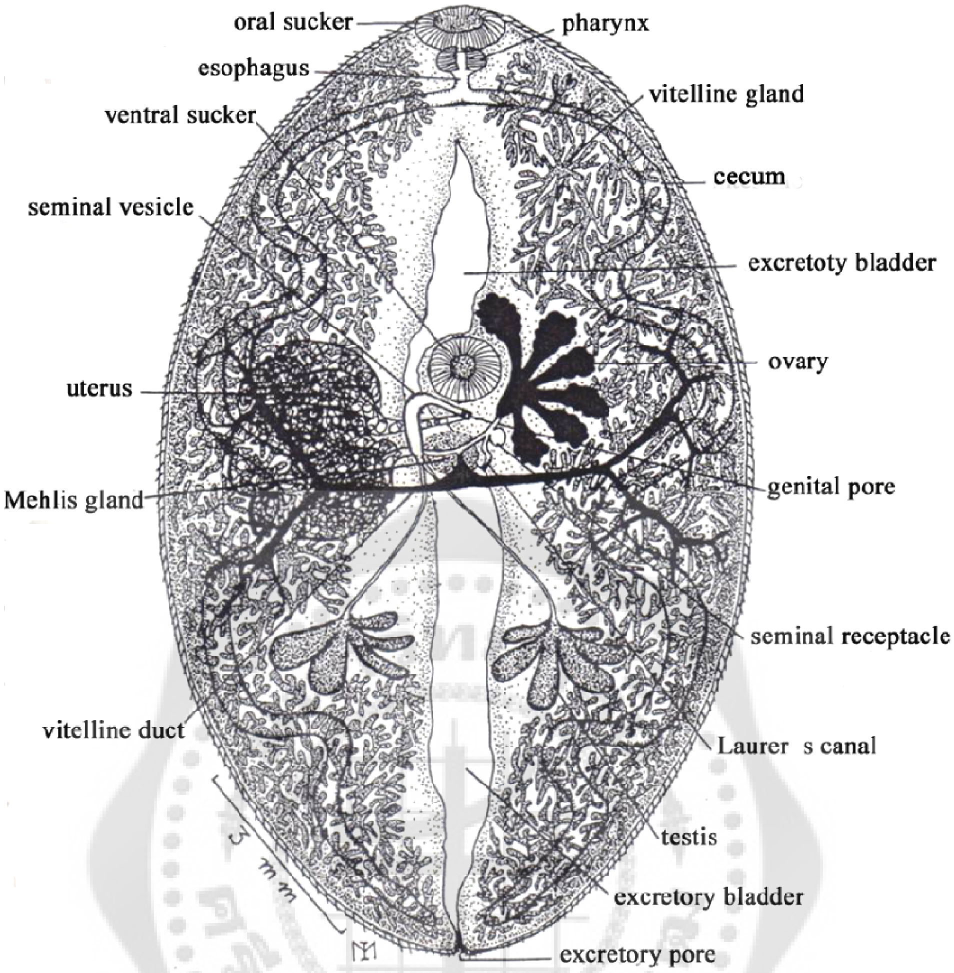
การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียและการศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยใช้บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI จะสามารถยืนยันสปีชีส์ของพยาธิที่ศึกษาในครั้งนี้ว่าเป็น *P. paishuihoensis* ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรกในประเทศไทย หลังจากที่ก่อนหน้านี้มีการรายงานการพบพยาธิสปีชีส์นี้ในสาธารณรัฐประชาชนจีนเท่านั้น

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด (ดัดแปลงจาก เดชา ศรีสนธิ์; จิตรา ไวคกุล; และ สนั่น แย้มพุฒ. 2540)

ตัวเต็มวัย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอดตัวเต็มวัย (ภาพประกอบ 3) จะมีรูปร่างกลมรีคล้ายรูปไข่ ผิวนอกบางใสมองเห็นอวัยวะภายใน ลำตัวปกคลุมด้วยหนามขนาดเล็ก ขณะที่มีชีวิตจะมีสีแดงอมน้ำตาล ขนาดจะขึ้นกับอายุของพยาธิ ชนิดของโฮสต์ และจำนวนของพยาธิที่อยู่ในโฮสต์เดียวกัน โดยทั่วไปจะมีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร พยาธิใบไม้ปอดมีทั้งสองเพศในตัว (hermaphrodite) มีอวัยวะสำหรับเกาะรอบปาก (oral sucker) อยู่ปลายสุดด้านหัว ปากเปิดเชื่อมต่อกับหลอดอาหาร (esophagus) ที่มีขนาดสั้นก่อนจะแยกออกเป็นลำไส้ (cecum) สองแขนงซึ่งยาวและโค้งไปมาเป็นรูปคลื่น มีปลายตันสิ้นสุดที่ส่วนท้ายลำตัวตรงบริเวณช่องขับถ่ายของเสีย (excretory pore) ที่บริเวณท้องประมาณกึ่งกลางลำตัวมีอวัยวะสำหรับเกาะด้านท้อง (ventral sucker) และใกล้ ๆ บริเวณนั้นจะพบรังไข่ (ovary) ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนที่แตกเป็นแขนง รังไข่จะต่อกับท่อนำไข่ (oviduct) ที่มีขนาดสั้น และเชื่อมต่อกับถุงรับอสุจิ (seminal receptacle) มดลูก (uterus) มีลักษณะเป็นท่อกลวง โดยส่วนต้นจะต่อกับถุงรับอสุจิ ท่อมดลูกค่อนข้างสั้นขดอยู่บริเวณกลางลำตัว มีช่องปล่อยไข่ออกสู่ภายนอกลำตัวตรงบริเวณใกล้กับขอบล่างของอวัยวะสำหรับเกาะด้านท้อง ต่อมไข่แดง (vitellaria) มีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กมากมายกระจายอยู่สองข้างของลำตัว ตั้งแต่ส่วนหัวจรดส่วนท้ายและมีท่อแขนงรวบรวมเม็ดอาหาร (vitelline duct) ต่อกันเป็นท่อรวมเม็ดอาหาร (common vitelline duct) ซึ่งเปิดเชื่อมกับส่วนต้นของท่อมดลูก มีอัณฑะ (testis) สองอันที่มีลักษณะแตกออกเป็นหลายแขนงพบอยู่ระหว่างกระเพาะขับถ่ายของเสีย (excretory bladder) กับลำไส้ อัณฑะมีท่ออสุจิ (sperm duct) ที่เชื่อมต่อรวมกันตรงบริเวณระหว่างรังไข่กับอวัยวะสำหรับเกาะด้านท้องและเป็นถุงเก็บอสุจิ (seminal vesicle) ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อที่มีกล้ามเนื้อสามารถยืดหยุ่นขยายขนาดใหญ่หรือเล็กได้ตามปริมาณของอสุจิ ปลายอีกข้างหนึ่งจะต่อกับท่อขับอสุจิ (ejaculatory duct) ซึ่งเปิดเชื่อมกับส่วนปลายของท่อมดลูกก่อนเปิดออกสู่ภายนอกร่างกายทางช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (genital pore) ระบบขับถ่ายประกอบด้วยเฟลมเซลล์ (flame cell) ซึ่งทำหน้าที่ดูดซึมของเสียและส่งไปยังท่อรวบรวมของเสียที่เปิดเข้าสู่กระเพาะขับถ่ายของเสีย ของเสียจะถูกขับออกทางช่องขับถ่ายของเสีย



ภาพประกอบ 3 ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด

ที่มา: ดัดแปลงจาก Miyazaki, I. (1991). *Helminthic Zoonoses*. p. 80.

ไข่

ไข่ของพยาธิใบไม้ปอด (ภาพประกอบ 4) มีความยาวประมาณ 80-120 ไมโครเมตร และกว้างประมาณ 48-60 ไมโครเมตร มีรูปร่างรี เปลือกหนา สีเหลืองทอง โดยส่วนท้ายจะหนากว่าส่วนอื่น ๆ และด้านที่มีฝาปิด (operculum) ค่อนข้างแบนกว้าง

ภาพประกอบ 4 ไข่ของพยาธิใบไม้ปอด

ที่มา: Richard, H. (2010). *Parasitology*. (Online).

ไมราซิเดียม

ไมราซิเดียม (miracidium) (ภาพประกอบ 5) จะฟักออกจากไข่ได้ต้องมีการยืดหดตัวและกลับตัวหลาย ๆ ครั้ง เพื่อพยายามผลักฝาปิดเปลือกไข่ให้เปิดออก ไมราซิเดียมที่ฟักออกจากไข่จะมีขนาดประมาณ 80 x 40 ไมโครเมตร มีขนรอบตัวสำหรับว่ายน้ำ เพื่อหาหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง (first intermediate host) และไชเข้าไปตรงบริเวณเท้าของหอย หลังจากนั้นภายใน 30-60 วัน ไมราซิเดียมจะเจริญไปเป็นสปอโรซีสต์โดยบริเวณที่พบสปอโรซีสต์มากที่สุดอยู่ใกล้กับทางเดินอาหารของหอย

ภาพประกอบ 5 ไมราซิเดียมของพยาธิใบไม้ปอด

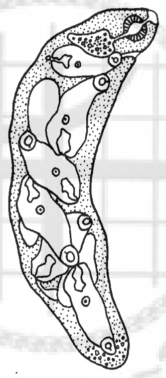
ที่มา: *Parasitology*. (2008). (Online).

สปอโรซีสต์

สปอโรซีสต์ (sporocyst) ของพยาธิใบไม้ปอดมีรูปร่างกลมรีและไม่มีอวัยวะ มีความยาวประมาณ 100-700 ไมโครเมตร กว้าง 80-150 ไมโครเมตร ภายในมีเซลล์ที่จะเจริญเป็นตัวอ่อนระยะต่อไปคือ เรเดีย (redia) เมื่อสปอโรซีสต์มีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ เรเดียจะเริ่มออกจากสปอโรซีสต์

เรเดีย

เรเดีย (redia) ของพยาธิใบไม้ปอด (ภาพประกอบ 6) มีรูปร่างทรงกระบอก ความยาวประมาณ 300-800 ไมโครเมตร และกว้างประมาณ 100-150 ไมโครเมตร เริ่มมีทางเดินอาหารและระบบขับถ่ายเจริญดี ในลำตัวจะเป็นช่องว่าง ภายในมีตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) แต่ในบางครั้งเรเดียจะสามารถผลิตตัวอ่อนเพิ่มขึ้นด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้เป็นเรเดียลูก (daughter redia)

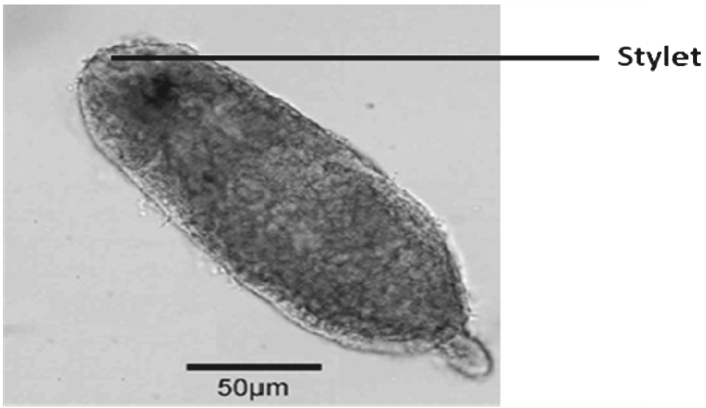


ภาพประกอบ 6 เรเดียของพยาธิใบไม้ปอด

ที่มา: Morin, A.; & Houseman, J. (2010). *Biodidac*. (Online).

เซอร์คาเรีย

เซอร์คาเรีย (cercaria) ของพยาธิใบไม้ปอด (ภาพประกอบ 7) จัดอยู่ในกลุ่ม microcercous type คือ มีหางสั้นมาก และมีโครงสร้างพิเศษที่มีลักษณะคล้ายปลายลูกศร (stylet) อยู่ตรงบริเวณ oral sucker ลักษณะโดยทั่วไปคือ มีลำตัวยาวรี ปกคลุมด้วยหนามขนาดเล็ก เซอร์คาเรียที่เติบโตเต็มที่ส่วนใหญ่ยังอาศัยอยู่ภายในตัวหอย



ภาพประกอบ 7 เซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด

ที่มา: Iwagami, M.; et al. (2009). The First Intermediate Host of *Paragonimus westermani* in Sri Lanka. *Acta Tropica*. 109: 28.

เมตาเซอร์คาเรีย

เมื่อเซอร์คาเรียออกจากตัวหอยจะไชเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองซึ่งได้แก่ ปูและกุ้งน้ำจืด โดยจะไชเข้าตรงบริเวณรอยต่อของขาปูหรือโคนหางด้านท้องหรือระหว่างปล้องลำตัวของกุ้งและจะเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียซึ่งจะอยู่ภายในซีสต์ รูปร่างของซีสต์อาจจะกลมหรือรูปไข่ มีขนาดตั้งแต่ 200-900 ไมโครเมตร เมตาเซอร์คาเรียอาจมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันในพยาธิแต่ละสปีชีส์ มีจำนวนชั้นของผนังซีสต์ (cyst wall) ประมาณ 1-2 ชั้น โดยที่ผนังชั้นนอกจะบางและขาดได้ง่าย ส่วนผนังชั้นในจะหนาและเหนียว ซึ่งความหนาของผนังชั้นในจะแตกต่างกันในพยาธิแต่ละสปีชีส์

การจัดอนุกรมวิธานของพยาธิใบไม้ปอด

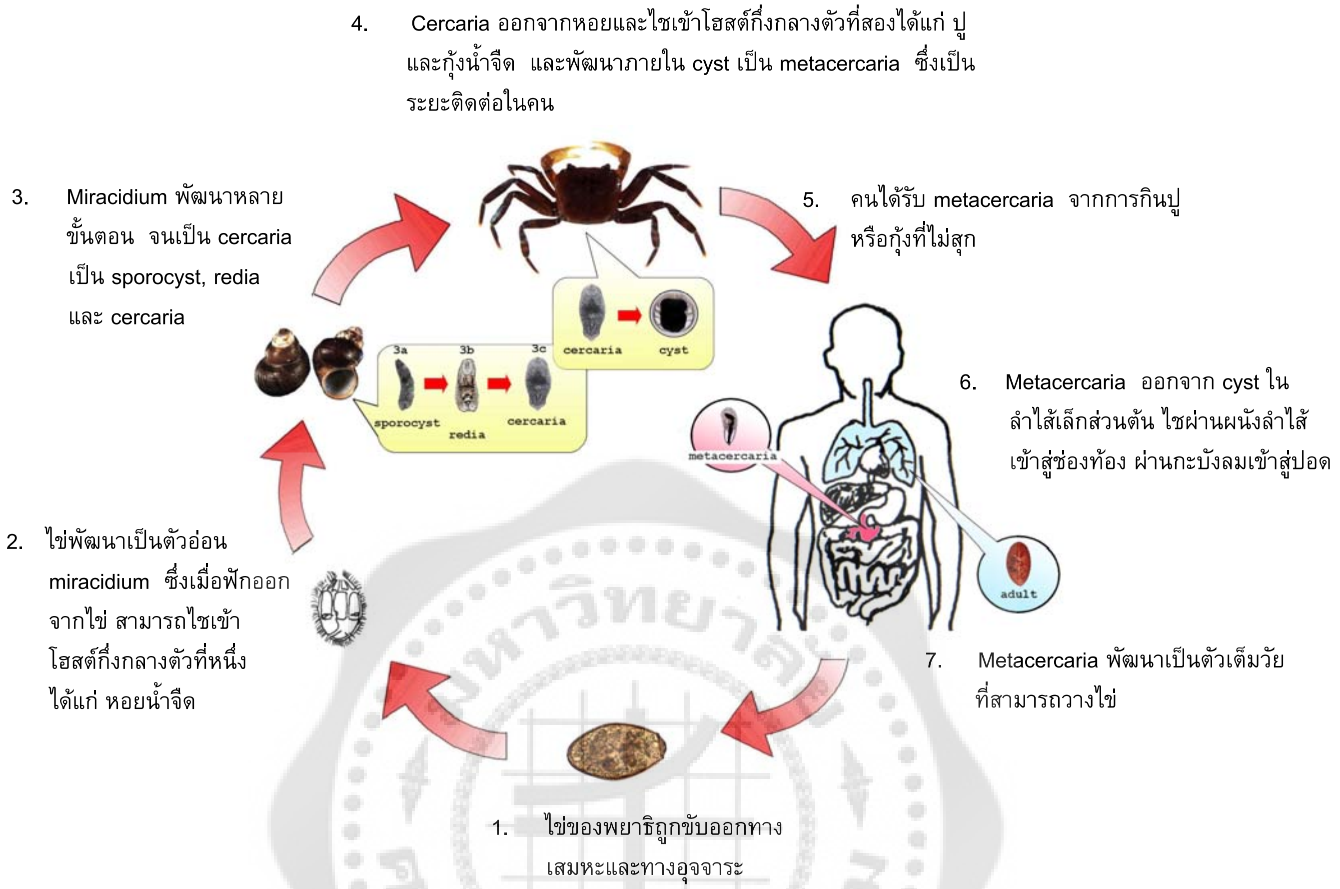
การจัดอนุกรมวิธานของพยาธิใบไม้ปอดมีดังนี้ (Zaman. 1984: 173)

Phylum	Platyhelminthes
Class	Trematoda
Subclass	Digenea
Order	Prosostomata
Superfamily	Plagiorchioidae
Family	Troglotrematidae
Genus	*Paragonimus*

วงชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด

พยาธิใบไม้ปอด มีการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลายแบบเป็นขั้นเป็นตอน (ภาพประกอบ 8) โดยผ่านโฮสต์อย่างน้อย 3 ชนิดคือ โฮสต์จำเพาะ (definitive host) ได้แก่ คนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งเป็นที่อาศัยของพยาธิในระยะตัวเต็มวัย โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง ได้แก่ หอยน้ำจืดฝาเดียว (ภาพประกอบ 9) ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยและแพร่ขยายพันธุ์ของพยาธิระยะแรกจนถึงระยะเซอร์คาเรีย และโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองคือ สัตว์จำพวกปูหรือกุ้งน้ำจืด (ภาพประกอบ 10) ซึ่งเป็นที่อาศัยของพยาธิระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรีย

ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดอยู่ในถุงซีสต์ในเนื้อปอดของโฮสต์จำเพาะ โดยแต่ละซีสต์อาจจะมีพยาธิอาศัยอยู่ตั้งแต่ 1-6 ตัว แต่ส่วนมากจะพบซีสต์ละ 2 ตัว ตัวเต็มวัยของพยาธิจะวางไข่ หลังจากนั้นไข่จะถูกขับออกมาทางเสมหะหรืออุจจาระ เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ไมราซิเดียมจะฟักตัวออกจากไข่และว่ายอยู่ในน้ำ จากนั้นจะไชเข้าไปอยู่ในหอยน้ำจืดฝาเดียวซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง และพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะสปอร์โรซีสต์ เรเดียและเซอร์คาเรีย ตามลำดับ จากนั้นจึงออกจากหอยเพื่อไชเข้าสู่โฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองได้แก่ ปูและกุ้งน้ำจืด และเจริญเป็นระยะเมตาเซอร์คาเรียซึ่งจะอยู่ภายในซีสต์ คนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินเนื้อปูหรือกุ้งน้ำจืดแบบดิบ ๆ ก็จะได้รับซีสต์ของพยาธิเข้าไปในร่างกาย ตัวอ่อนจะออกจากซีสต์บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นและไชทะลุผ่านผนังลำไส้ออกมาในช่องท้อง ผ่านกะบังลมเข้าไปฝังตัวอยู่ในเนื้อเยื่อของปอด (Bunnag; & Harinasuta. 1989: 459-477)



ภาพประกอบ 8 วงชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด

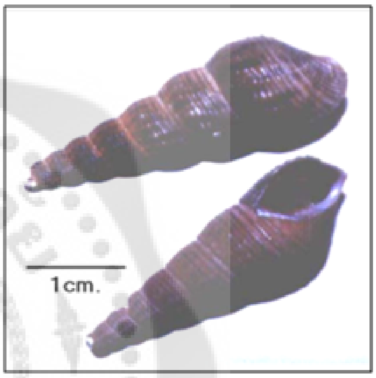
ที่มา: อัจฉริยา รังษิรุจิ.; และคนอื่น ๆ. (2547). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์*. 3(3): 198.

ก

ข

ค

ง



ภาพประกอบ 9 ตัวอย่างหอยน้ำจืดฝาเดียวที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่งของพยาธิใบไม้ปอด

ก: *Tarebia granifera* ข: *Melanoides tuberculata*

ค: *Brotia costula costula* ง: *Semisulospira libertina*

ที่มา:

ก: ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง. (2551). *ระบบฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและทรัพยากรทางทะเล ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา กลุ่มทรัพยากร: สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง : สัตว์กลุ่มหอย*. (ออนไลน์).

ข: Wikipedia. (2011). *Red-rimmed melania*. (Online).

ค, ง: สมพงษ์ สิทธิพรหม. (2544). *ภาพตัวอย่างหอยบกและหอยน้ำจืด ในเขตอุทยานแห่งชาติภูพาน*. (ออนไลน์).

ก

ข

ค

ง

ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างปูน้ำจืดและกุ้งน้ำจืดที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของพยาธิใบไม้ปอด

ก: *Geothelphusa dehaani* ข: *Varuna litterata*

ค: *Larnaudia beusekomae* ง: *Cambaroides similis*

ที่มา:

ก: Shih, H.T. (2008). *Diversity of the Freshwater Crabs from the Ryukyus and Japan.* (Online).

ข: Shih, H.T. (2006). *Diversity of the Freshwater Crabs from the Ryukyus and Japan.* (Online).

ค: ไพบูลย์ นัยเนตร. (2531). ปูน้ำจืดในประเทศไทย. ใน *อนุสรณ์งานพระราชทานเพลิงศพรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประพันธ์ จิตต์จำนงค์.* หน้า 178-200.

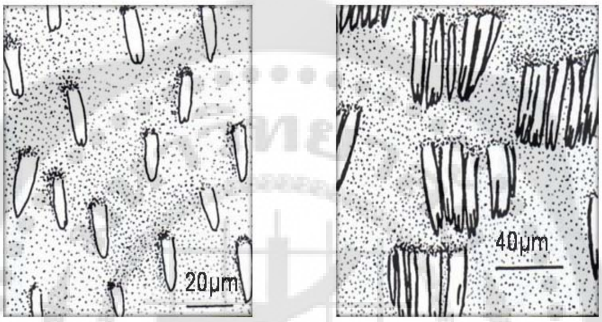
ง: Hong, S.J. (2003). *The Korean Society for Parasitology*. (Online).

การจำแนกสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอดส่วนใหญ่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิตัวเต็มวัยและเมตาเซอร์คาเรีย โดยมีเกณฑ์ดังนี้ (Miyazaki. 1991: 76-146)

พยาธิตัวเต็มวัย

- การจัดเรียงของหนามที่ลำตัว (cuticular spine) เป็นแบบเดี่ยวหรือแบบกลุ่ม (ภาพประกอบ 11)
- ลักษณะและขนาดของรังไข่และอัณฑะ
- การเปรียบเทียบอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง oral sucker และ ventral sucker



ก ข

ภาพประกอบ 11 การจัดเรียงของหนามบริเวณลำตัวของพยาธิใบไม้ปอด

ก: หนามจัดเรียงแบบเดี่ยว ข: หนามจัดเรียงตัวแบบกลุ่ม

ที่มา: Baker, J.R.; Muller, R.; & Rollinson, D. (1999). Paragonimiasis and the Genus *Paragonimus*. In *Advances in Parasitology*. p. 117.

พยาธิระยะเมตาเซอร์คาเรีย

- รูปร่างและลักษณะของซีสต์
- จำนวนชั้นและความหนาของผนังซีสต์
- สี รูปร่าง และขนาดของตัวอ่อนในซีสต์
- การเปรียบเทียบอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง oral sucker และ ventral sucker
- ความยาวของกระเพาะขับถ่ายของเสีย

พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ ที่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทย (ดัดแปลงจาก เดชา ศรีสนธิ์; จิตรา ไวคกุล; และ สนั่น แย้มพุฒ. 2540)

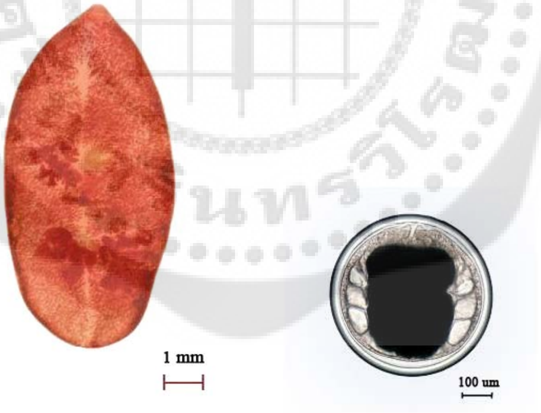
1. *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899

ลักษณะของตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยของ *P. westermani* (ภาพประกอบ 12ก) มีรูปร่างกลมรีคล้ายลูกรักบี้ มีขนาดลำตัวประมาณ 6-9 x 4-5 มิลลิเมตร ผิวลำตัวมีหนามปกคลุมเป็นหนามเดี่ยว มี oral sucker ใหญ่กว่า ventral sucker เล็กน้อย อัณฑะแยกออกเป็น 5-6 แขนงทอดขนานกับส่วนท้ายของลำตัว ส่วนรังไข่แตกแขนงย่อยเป็น 6 แขนงอยู่ทางด้านบนของอัณฑะตรงกันข้ามกับมดลูก

ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย

เมตาเซอร์คาเรียของ *P. westermani* (ภาพประกอบ 12ข) มีรูปร่างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 430-450 ไมโครเมตร มีผนังซีสต์ 2 ชั้น โดยที่ชั้นนอกบาง ส่วนชั้นในหนา ระหว่างเปลือกหุ้มกับตัวอ่อนของพยาธิไม่พบช่องว่าง ที่ลำตัวของพยาธิมองเห็นลำไส้เป็นท่อยาวใสขดไปมาอยู่สองข้างของ excretory bladder ภายในบรรจุของเสียซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ด granules สี ขาว แต่จากรูปถ่ายจะมองเห็นเม็ด granules เป็นสีดำ



ก ข

ภาพประกอบ 12 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. westermani*

ก: ตัวเต็มวัย ข: เมตาเซอร์คาเรีย

2. *Paragonimus macrorchis* (Chen, 1962)

ลักษณะของตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยของ *P. macrorchis* (ภาพประกอบ 13ก) มีขนาดลำตัวยาว 15-19 มิลลิเมตร และกว้าง 6-10 มิลลิเมตร oral sucker มีขนาดเท่ากับ ventral sucker ผิวลำตัวปกคลุมด้วยหนามเดี่ยวกระจายกันอยู่ห่างๆ รังไข่แตกแขนงโดยละเอียด ส่วนอัณฑะมีขนาดใหญ่กว่ารังไข่และแตกแขนงย่อยมากเช่นเดียวกัน

ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย

เมตาเซอร์คาเรียของ *P. macrorchis* (ภาพประกอบ 13ข) มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 440–500 ไมโครเมตร มีผนังซีสต์ 2 ชั้น แต่ทั้งชั้นนอกและชั้นในจะบางและขาดง่าย ลำตัวเหยียดไม่เต็มช่องว่างภายในเปลือกหุ้ม ventral sucker มีขนาดใหญ่กว่า oral sucker

ก **ข**

ภาพประกอบ 13 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. macrorchis*
ก: ตัวเต็มวัย ข: เมตาเซอร์คาเรีย

ที่มา: เดชา ศรีสนธิ์; จิตรา ไวคกุล; และ สนั่น แย้มพุฒ. (2540). *พยาธิใบไม้ปอด.* หน้า 74.

3. *Paragonimus heterotremus* (Chen and Hsia, 1964)

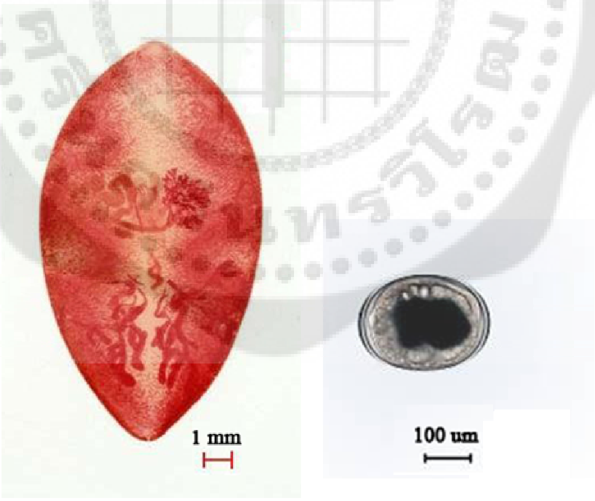
พยาธิใบไม้ปอด *P. heterotremus* มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดในประเทศไทย เนื่องจากเป็นสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ปอดในคน โดยมีการตรวจพบพยาธิตัวเต็มวัยจากผู้ป่วย *P. heterotremus* สามารถพบได้ในจังหวัดนครนายก สระบุรี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และตาก

ลักษณะของตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยของ *P. heterotremus* (ภาพประกอบ 14ก) มีขนาดลำตัวยาว 14-16 มิลลิเมตร และกว้าง 6-8 มิลลิเมตร มี oral sucker ใหญ่เป็นสองเท่าของ ventral sucker หนามปกคลุมลำตัวเป็นหนามเดี่ยว รังไข่แตกแขนงย่อยมาก ส่วนอัณฑะมีขนาดใหญ่ และแตกแขนงย่อยจำนวนมากเช่นเดียวกัน นอกจากพบในคนแล้ว *P. heterotremus* ยังสามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ในสุนัข แมว ลิง กระต่าย และหนู

ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย

เมตาเซอร์คาเรียของ *P. heterotremus* (ภาพประกอบ 14ข) มีรูปร่างรี มีขนาดเล็กประมาณ 270-320 ไมโครเมตร และกว้าง 220-250 ไมโครเมตร ผนังซีสต์มี 2 ชั้น ผนังซีสต์ชั้นในหนาประมาณ 292 x 237 ไมโครเมตร ลำตัวไม่งอ เหยียดอยู่เต็มภายในเปลือกหุ้มแต่อาจมีช่องว่างเล็กน้อย



ก ข

ภาพประกอบ 14 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. heterotremus*

ก: ตัวเต็มวัย ข: เมตาเซอร์คาเรีย

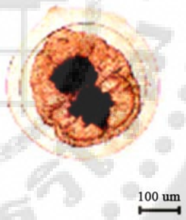
4. *Paragonimus siamensis* (Miyazaki and Wykoff, 1965)

ลักษณะของตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยของ *P. siamensis* (ภาพประกอบ 15ก) มีขนาดลำตัวยาว 7-10 มิลลิเมตร และกว้าง 4-5 มิลลิเมตร รังไข่แตกเป็น 6 แขนง ส่วนอัณฑะแตกเป็น 5-6 แขนง หนามที่ผิวลำตัวเรียงเป็นกลุ่ม โดยมีหนามเล็ก ๆ 3-5 อันต่อกลุ่ม พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้มีลักษณะของตัวเต็มวัยคล้ายคลึงกับพยาธิใบไม้ปอด *P. westermani* แต่แตกต่างกันตรงหนามที่บริเวณผิวลำตัว

ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย

เมตาเซอร์คาเรียของ *P. siamensis* (ภาพประกอบ 15ข) มีรูปร่างกลมรีคล้ายรูปไข่ มีผนังซีสต์ 2 ชั้น โดยชั้นนอกจะบางและขาดได้ง่าย ในขณะที่ชั้นในจะแข็งแรงและยืดหยุ่นกว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของผนังซีสต์ด้านในคือ 480 x 340 ไมโครเมตร ลำตัวไม่งอ และมีช่องว่างภายในเปลือกหุ้ม



ก ข

ภาพประกอบ 15 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. siamensis*

ก: ตัวเต็มวัย ข: เมตาเซอร์คาเรีย

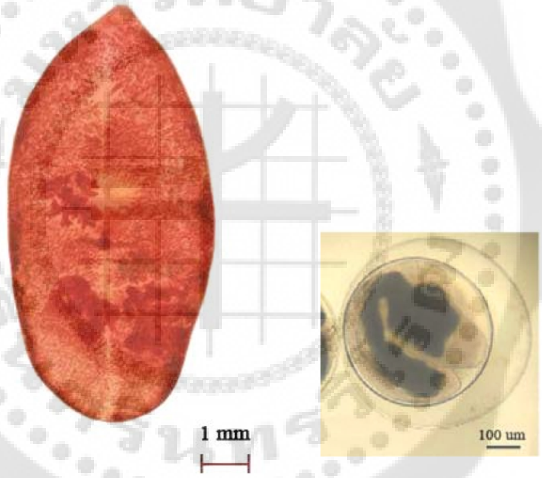
5. *Paragonimus bangkokensis* (Miyazaki and Vajrasthira, 1967)

ลักษณะของตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยของ *P. bangkokensis* (ภาพประกอบ 16ก) มีขนาดลำตัวประมาณ 6-13 x 3-5 มิลลิเมตร ขนาดของ oral sucker เล็กกว่า ventral sucker เล็กน้อย รังไข่แตกแขนงย่อยมากมาย อัณฑะแตกแขนงสั้น ๆ จำนวน 5-6 แขนงและมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของรังไข่ บริเวณผนังลำตัวปกคลุมด้วยกลุ่มของหนามเล็ก ๆ กลุ่มละ 3-5 อัน

ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย

เมตาเซอร์คาเรียของ *P. bangkokensis* (ภาพประกอบ 16ข) มีลักษณะกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 350-475 ไมโครเมตร มีผนังซีสต์ 2 ชั้น โดยที่ผนังซีสต์ชั้นนอกบางและเปราะง่ายกว่าผนังชั้นใน เส้นผ่านศูนย์กลางของผนังซีสต์ชั้นในเฉลี่ย 435 x 398 ไมโครเมตร ลำตัวงอคล้ายรูปตัวซี (C) มีจุดสีแดงชมพูกระจายอยู่ทั่วลำตัวและพบช่องว่างภายในซีสต์



ก ข

ภาพประกอบ 16 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. bangkokensis*

ก: ตัวเต็มวัย ข: เมตาเซอร์คาเรีย

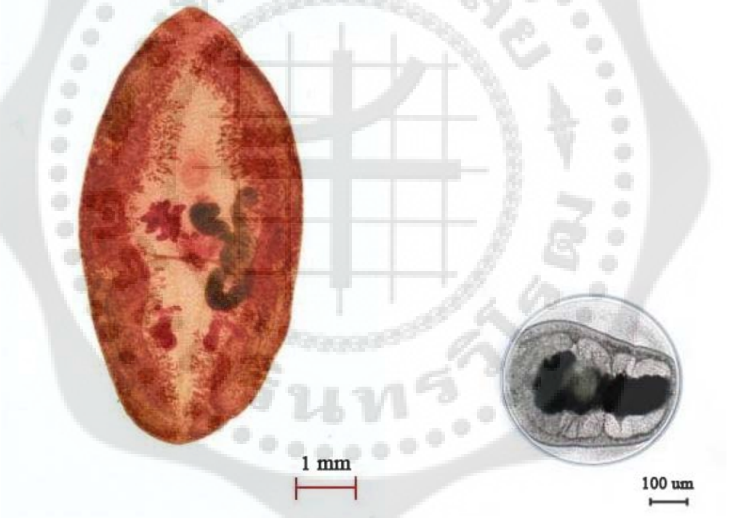
6. ***Paragonimus harinasutai* (Miyazaki and Vajrasthira, 1968)**

ลักษณะของตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยของ *P. harinasutai* (ภาพประกอบ 17ก) มีขนาดลำตัวยาวประมาณ 7-9 มิลลิเมตร และกว้าง 3-4 มิลลิเมตร ventral sucker มีขนาดใหญ่กว่า oral sucker เพียงเล็กน้อย รังไข่แตกเป็นแขนงย่อย แต่มองเห็นแขนงไม่ชัดเจนเนื่องจากแต่ละแขนงจะสั้น ส่วนอัณฑะแตกเป็นแขนงกลม ๆ จำนวน 5-6 แขนงและมีขนาดใกล้เคียงกับรังไข่ ลำตัวปกคลุมด้วยหนามเดี่ยว

ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย

เมตาเซอร์คาเรียของ *P. harinasutai* (ภาพประกอบ 17ข) มีรูปร่างกลมใหญ่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 500-650 ไมโครเมตร ผนังซีสต์มี 2 ชั้น โดยชั้นนอกจะเปราะขาดง่ายกว่าชั้นใน เส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของผนังซีสต์ชั้นในคือ 601 x 579 ไมโครเมตร มีช่องว่างภายในเปลือกหุ้มเล็กน้อย ตัวพยาธิจะไม่งอและมีสีแดงอมชมพู



ก ข

ภาพประกอบ 17 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. harinasutai*

ก: ตัวเต็มวัย ข: เมตาเซอร์คาเรีย

7. *Paragonimus pseudoheterotremus* (Waikagul, 2007)

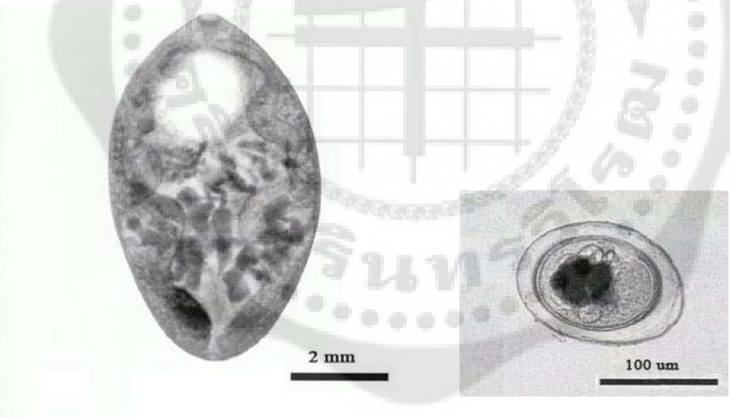
พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้เพิ่งถูกค้นพบในปี ค.ศ. 2007 โดย Waikakul พบตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรียในปู *Larnaudia larnaudii* ในจังหวัดกาญจนบุรี และได้ตัวเต็มวัยจากการทำให้พยาธิติดเชื้อในแมว

ลักษณะของตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยของ *P. pseudoheterotremus* (ภาพประกอบ 18ก) มีลักษณะรูปร่างคล้ายกับ *P. heterotremus* แต่มีขนาดเล็กกว่า ลำตัวแบน มีขนาดประมาณ 10.3 x 5.6 มิลลิเมตร oral sucker มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 570 ไมโครเมตร ส่วน ventral sucker มีขนาดเล็กกว่าคือมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 480 ไมโครเมตร อัณฑะแตกแขนง 5 แขนงโดยจะแตกแขนงละเอียดน้อยกว่ารังไข่ ผิวลำตัวถูกปกคลุมด้วยหนามแบบเดี่ยวซึ่งจะคล้ายกับลักษณะหนามของ *P. heterotremus* แต่ขนาดของหนามจะใหญ่กว่า

ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย

เมตาเซอร์คาเรียของ *P. pseudoheterotremus* (ภาพประกอบ 18ข) มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 180-204 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่าขนาดของเมตาเซอร์คาเรียของ *P. heterotremus* มีผนังซีสต์สองชั้น ผนังชั้นในหนากว่าผนังชั้นนอก



ก ข

ภาพประกอบ 18 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ปอด *P. pseudoheterotremus*

ก: ตัวเต็มวัย ข: เมตาเซอร์คาเรีย

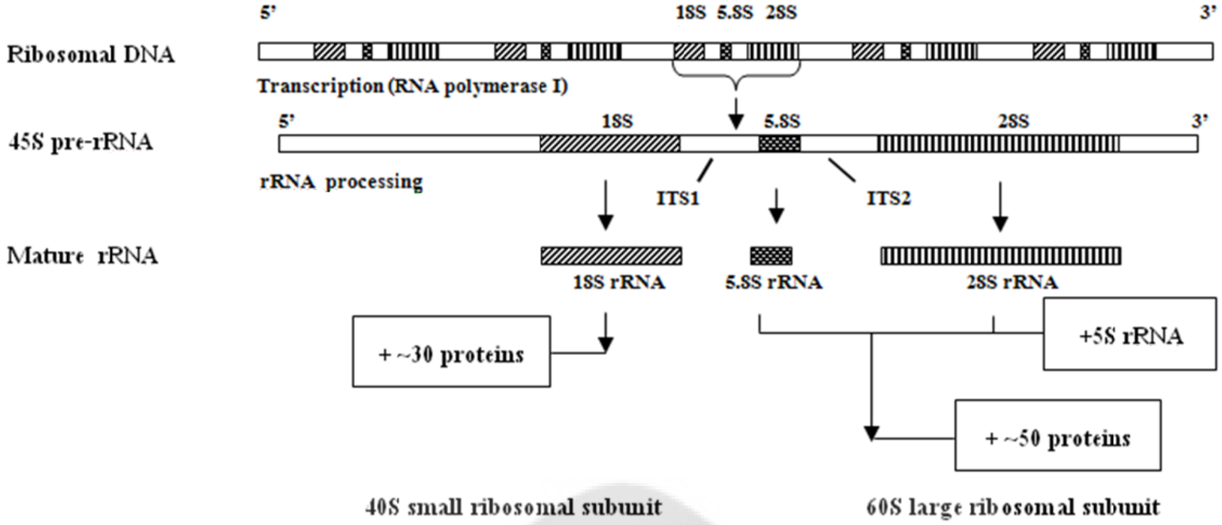
ที่มา: Waikagul, J. (2007). A New Species of *Paragonimus* (Trematoda: Troglotrematidae) from a Cat Infected with Metacercariae from Mountain Crabs *Larnaudia larnaudii*. *Journal of Parasitology*. 93(6): 1497.

การศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

การระบุความแตกต่างและการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกหนอนตัวแบน (tremotode) การใช้วิธีการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจให้ผลที่ไม่แม่นยำ ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะภายนอกที่เห็นเด่นชัดอาจมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นในปัจจุบันจึงนำวิธีการศึกษาในระดับโมเลกุลมาช่วยยืนยันการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

การศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้าอย่างมากและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างแพร่หลาย ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ของพยาธิใบไม้ปอดนั้น นิยมใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณที่ต้องการให้มีจำนวนมากขึ้นหลายเท่าในหลอดทดลองร่วมกับเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของ PCR product ในปัจจุบันการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดในระดับโมเลกุลโดยส่วนใหญ่อาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear ribosomal DNA (nrDNA) บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนต่าง ๆ เช่น cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) ในไมโทคอนเดรีย

Nuclear ribosomal DNA คือบริเวณที่จะถอดรหัสไปเป็น rRNA และเป็นบริเวณที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ nrDNA ที่พบในยูคาริโอต (ภาพประกอบ 19) ประกอบด้วยยีนที่มีหน่วยซ้ำประมาณ 5,000 ซ้ำ โดยแต่ละหน่วยซ้ำมีส่วนที่เป็นยีน (coding region) ได้แก่ 18S, 5.8S และ 28S rDNA และส่วนที่ไม่ได้เป็นยีน (non-coding region) ได้แก่บริเวณ ITS1 ซึ่งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S rDNA และบริเวณ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่างยีน 5.8S และ 28S rDNA โดยจะมีเอนไซม์ RNA polymerase I ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสกลุ่มยีนข้างต้นให้ได้ pre-rRNA ขนาด 45S ต่อจากนั้นในขั้นตอน rRNA processing จะมีการตัดบริเวณ ITS1 และ ITS2 ออก ทำให้ได้ mature rRNA 3 ขนาด คือ 18S, 5.8S และ 28S โดยที่ 18S rRNA จะรวมกับโปรตีนประมาณ 30 ชนิดกลายเป็น 40S (small ribosomal subunit) ส่วน 5.8S, 28S และ 5S rRNA เมื่อรวมกับโปรตีนประมาณ 50 ชนิด จะได้ 60S (large ribosomal subunit) ในที่สุด 40S และ 60S ribosomal subunit จะประกอบเป็น 80S ribosome (Gerbi. 1985)



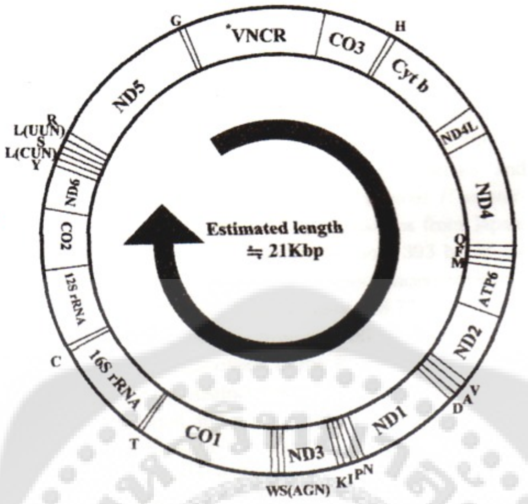
ภาพประกอบ 19 การจัดเรียงตัวของ nuclear ribosomal DNA ที่พบในยูคาริโอต

ที่มา: อัจฉริยา รังษิรุจิ; และคนอื่น ๆ. (2547). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์.* 3(3): 199.

โดยทั่วไปบริเวณ ITS1 และ ITS2 เป็นบริเวณที่มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูงกว่าเมื่อเทียบกับส่วนที่เป็น coding region ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ (conserved region) การเกิดมิวเทชัน (mutation) ที่บริเวณ ITS1 และ ITS2 จะไม่แสดงผลกระทบที่รุนแรงต่อสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ แต่ในทางกลับกัน การเกิดมิวเทชันที่บริเวณ coding region อาจส่งผลให้มีการสร้างไรโบโซมที่ไม่สมบูรณ์เกิดขึ้น และจะเกิดความผิดปกติในการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นบริเวณ ITS1 และ ITS2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันสูงกว่าบริเวณ coding region และพบได้ในยูคาริโอตทุกชนิด จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับจีนัสและสปีชีส์ (Schlotterer; et al. 1994: 513-522)

นอกจากนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดยังนิยมใช้ยีนในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากภายในเซลล์มีจำนวนชุดของไมโทคอนเดรียค่อนข้างสูงและ DNA ในไมโทคอนเดรียของสัตว์มักจะไม่เกิด genetic recombination ซาโต้ และคนอื่น ๆ (Sato; et al. 2003 :1-3) ได้ทำการศึกษาจีโนมที่สมบูรณ์ของไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ *P. westermani filipinus* พบว่ามีความยาวประมาณ $21x10^3$ คู่เบส (21 Kbp) ประกอบด้วย 35 ยีน โดยมี 2 ยีนสำหรับการสร้าง rRNA 12 ยีนสำหรับการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และ 21 ยีนสำหรับการสร้าง tRNA (ภาพประกอบ 20) โดยยีนหนึ่งที่นิยมนำมาใช้

ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอด คือ COI ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์ cytochrome *c* oxidase subunit I



ภาพประกอบ 20 แผนที่จีโนมของไมโทคอนเดรียของ *P. westermani filipinus*

ที่มา: Sato, Y.; et al. (2003). Phylogenetic Status of a Lung Fluke in the Philippines Based on Mitochondrial Genome. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 31: 2.

การศึกษาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ในพยาธิใบไม้ปอด

แบลร์ และคนอื่น ๆ (Blair; et al. 1997: 411-417) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ และนำมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล โดยผลการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งพยาธิใบไม้ปอดเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วย *P. westermani* ที่มาจากไต้หวัน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และมาเลเซีย และกลุ่มที่สองประกอบด้วย *P. skrjabini* จากสาธารณรัฐประชาชนจีน *P. ohirai* และ *P. miyazakii* ซึ่งมาจากประเทศญี่ปุ่น โดยในกลุ่มแรกได้แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อยคือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *P. westermani* ที่มาจากประเทศไต้หวันและประเทศญี่ปุ่น ส่วนกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย *P. westermani* จากประเทศฟิลิปปินส์และมาเลเซีย นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI และผลการทดลองที่ได้ก็สนับสนุนข้อมูลของ ITS2 ด้วย

แบลร์ และคนอื่นๆ (Blair; et al. 1998: 643-647) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในประเทศไทยและที่อื่น ๆ พบว่า phylogenetic tree ที่ได้แสดงให้เห็นว่าพยาธิใบไม้ปอดมีการแยกออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย *P. westermani* และ *P. siamensis* ส่วนกลุ่มที่สอง ประกอบด้วยพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในทวีปเอเชียและทวีปอเมริกา

นอกจากนี้ยังมีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI เพื่อใช้ศึกษาการจัดกลุ่มและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ ซึ่งมีการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน เช่น การศึกษาตัวอย่างจากภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย (อัจฉริยา รังษิรุจิ; และคนอื่น ๆ. 2547: 195-206) จากประเทศอินเดีย (Tandon; et al. 2007: 21-28) และจากประเทศเวียดนาม (Doanh; et al. 2009a: 1149-1155) เป็นต้น ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของแบลร์ และคนอื่น ๆ (Blair, et al. 1998: 643-647) ที่มีรายงานก่อนหน้านี้

ในปี ค.ศ. 2008 เทียนคำ และ ไวคกุล (Thaenkham; & Waikagul. 2008: 217-221) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI เพื่อยืนยันการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ใหม่ คือ *P. pseudoheterotremus* ในประเทศไทยซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. heterotremus* แต่จากการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยใช้ยีนบริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *P. pseudoheterotremus* นั้นเป็นเพียง sister species ของ *P. heterotremus*

ในปี ค.ศ. 2009 โดแอน และคนอื่น ๆ (Doanh; et al. 2009b: 429-439) ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* ที่พบในประเทศเวียดนาม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI และสามารถสรุปได้ว่า พยาธิใบไม้ปอดทั้งสองสปีชีส์จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งล่าสุดนาวะ และ โดแอน (Nawa; & Doanh. 2009: 87-96) ได้ใช้ข้อมูลในระดับโมเลกุลพิสูจน์แล้วว่า *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* จัดเป็น species complex

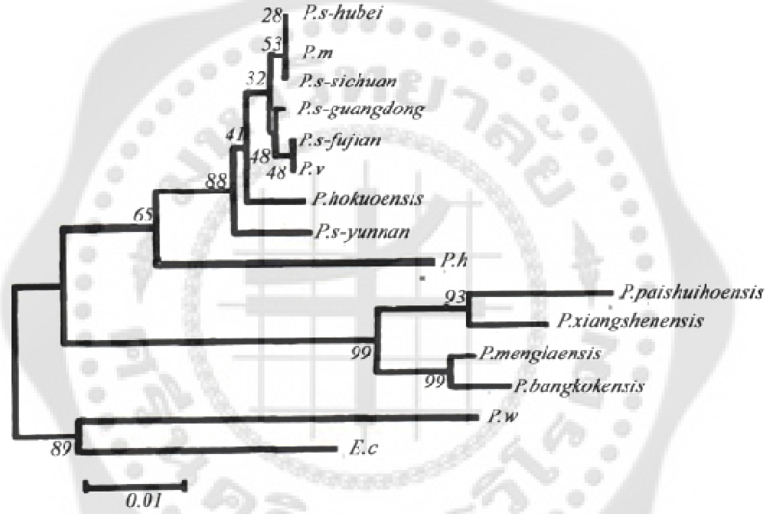
งานวิจัยเกี่ยวกับ *P. paishuihoensis* ในประเทศจีน

ในปี ค.ศ. 1965 ฉาว และ ชุง (Ts' ao.; & Chung. 1965: 252-255) ได้รายงานการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดคือ *P. paishuihoensis* เป็นครั้งแรกที่เมือง Pengxian ในมณฑลเสฉวน สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยเก็บรวบรวมเมตาเซอร์คาเรียได้จากปูหิน *Potamon denticulatus* และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของซีสต์ในระยะเมตาเซอร์คาเรีย ลักษณะของตัวอ่อนที่ออกมาจากซีสต์ และลักษณะของตัวเต็มวัย ผลการศึกษาพอสรุปได้ดังนี้ ลักษณะของพยาธิในระยะเมตาเซอร์คาเรีย ซีสต์มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลมรี มีขนาดประมาณ 617.0 x 552.8 ไมโครเมตร มีผนังซีสต์ 2 ชั้น ผนังซีสต์ชั้นนอกมีความหนาไม่สม่ำเสมอเฉลี่ยประมาณ 9.6 ไมโครเมตร และมัก

หลุดขาดได้ง่าย ส่วนผนังซีสต์ชั้นในจะบางกว่าคือหนาประมาณ 4.2 ไมโครเมตร มีลักษณะใสและเหนียว มีช่องว่างระหว่างผนังซีสต์ชั้นในกับตัวอ่อนของพยาธิ นอกจากนี้ตัวอ่อนของพยาธิที่อยู่ในซีสต์มี excretory bladder ที่แตกแขนงเป็นจำนวนมาก (มากกว่า 10 แขนง) เรียกรูปร่างของ excretory bladder ที่แตกแขนงแบบนี้ว่า dendritic shape ซึ่งเป็นแขนงสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะดังกล่าวถือเป็นลักษณะพิเศษที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้ได้ ลักษณะของพยาธิในระยะเมตาเซอร์คาเรียที่ออกจากซีสต์ (excysted metacercaria) วัดขนาดได้ประมาณ 1212.4 x 462.3 ไมโครเมตร ภายในลำตัวจะเห็น dendritic excretory bladder ได้ชัดเจน ผิวลำตัวถูกปกคลุมด้วยหนามแบบเดี่ยว oral sucker มีขนาดประมาณ 122.3 x 117.4 ไมโครเมตร ventral sucker มีขนาดประมาณ 163.0 x 157.2 ไมโครเมตร ในการศึกษาระยะตัวเต็มวัยของพยาธิสปีชีส์นี้ ผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยทำให้เกิดการติดเชื้อพยาธิในแมวโดยวิธีการกินเมตาเซอร์คาเรีย แมวตัวแรกตายหลังจากการทดลองได้ 62 วัน และเมื่อผ่าพิสูจน์แมวตัวดังกล่าวได้พบพยาธิระยะ immature 1 ตัว มีขนาด 10.5 x 3.0 มิลลิเมตร ส่วนแมวตัวที่เหลือได้ตรวจหาไข่พยาธิแต่ไม่พบ เมื่อผ่าพิสูจน์ก็ไม่พบพยาธิในระยะตัวเต็มวัยพบเพียงพยาธิระยะ immature จำนวน 1 ตัว สำหรับการศึกษาวงชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ผู้วิจัยได้สรุปว่า โฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่งคาดว่าน่าจะเป็นหอย *Tricula* ส่วนโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองคือ ปูหิน *Potamon denticulatus* และสรุปว่าแมวอาจจะเป็นโฮสต์ที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเป็นตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้

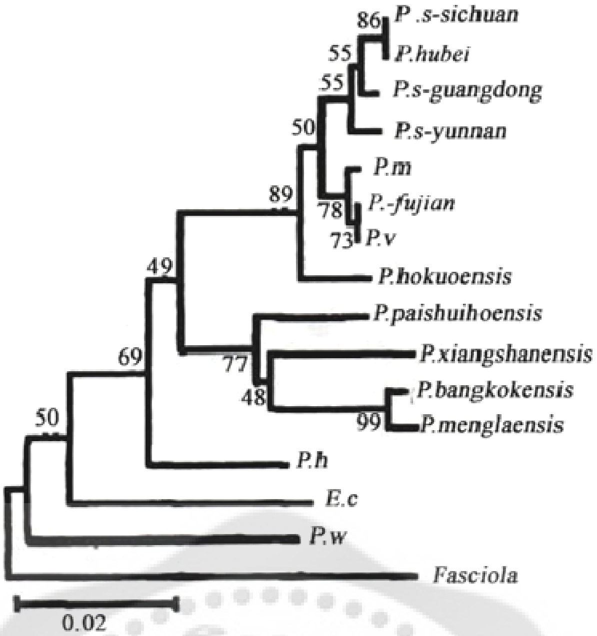
ในปี ค.ศ. 2002 หวาง และคนอื่น ๆ (Wang; et al. 2002: 62-64) ได้รายงานการค้นพบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* จากปูน้ำจืด *Potamon chinghungense* ซึ่งเก็บได้จากเมือง Mengla ในมณฑลยูนนาน จากการศึกษาพบว่า นอกจากปูสปีชีส์ดังกล่าวนี้จะพบเมตาเซอร์คาเรียของ *P. paishuihoensis* แล้ว ยังตรวจพบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดอีกสปีชีส์หนึ่งคือ *P. macrorchis* และจากการเปรียบเทียบลักษณะเมตาเซอร์คาเรียของทั้งสองสปีชีส์ พบว่ามีความคล้ายกันหลายประการ เช่น ขนาดของเมตาเซอร์คาเรีย จำนวนของผนังซีสต์ การมีช่องว่างระหว่างผนังซีสต์ชั้นนอกกับผนังซีสต์ชั้นในกว้าง ความหนาของผนังซีสต์ชั้นนอกและผนังซีสต์ชั้นใน แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีความแตกต่างที่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกสองสปีชีส์นี้ได้คือ *P. paishuihoensis* มี excretory bladder ที่แตกแขนงเป็นจำนวนมากอยู่ภายในลำตัว ในขณะที่ *P. macrorchis* ไม่มีลักษณะดังกล่าว และจากการเปรียบเทียบลักษณะเมตาเซอร์คาเรียของ *P. paishuihoensis* ที่มาจากมณฑลเสฉวนกับที่มาจากมณฑลยูนนาน พบว่ามีลักษณะดังต่อไปนี้เหมือนกัน ขนาดและรูปร่างของซีสต์ จำนวนชั้นของผนังซีสต์ ลักษณะ dendritic excretory bladder แต่ก็มีความแตกต่างของความหนาของผนังซีสต์ชั้นในคือ ตัวอย่างพยาธิ *P. paishuihoensis* ที่นำมาจากมณฑลยูนนานมีความหนาของผนังซีสต์ชั้นในประมาณ 12.5 ไมโครเมตร ส่วนตัวอย่างที่มาจากมณฑลเสฉวนมีความหนาของผนังซีสต์ชั้นในประมาณ 4.2 ไมโครเมตร แต่อย่างไรก็ตามยังคงถือว่าตัวอย่างที่เก็บได้มาจากทั้งสองบริเวณยังคงเป็นสปีชีส์เดียวกัน

ในปี ค.ศ. 2003 ซุย และคนอื่น ๆ (Cui; et al. 2003: 27-30) ได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอด 5 สปีชีส์คือ *P. paishuihoensis*, *P. menglaensis*, *P. hokuoensis* *P. bangkokensis* และ *P. xiangshanensis* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ผลการศึกษาพบว่าชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS2 และ COI ของพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 5 สปีชีส์มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree พบว่า *P. paishuihoensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. xiangshanensis* และพบว่าพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 4 สปีชีส์คือ *P. paishuihoensis*, *P. menglaensis*, *P. bangkokensis* และ *P. xiangshanensis* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วน *P. hokuoensis* จะอยู่นอกกลุ่ม ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกันทั้งที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS2 และ COI (ภาพประกอบ 21 และ 22)



ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดในสาธารณรัฐประชาชนจีน จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2

ที่มา: Cui, A.L.; et al. 2003. Taxonomic Status in DNA Sequences of Five Species of Genus *Paragonimus*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*. 2(21): 29.



ภาพประกอบ 22 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดในสาธารณรัฐประชาชนจีน จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI

ที่มา: Cui, A.L.; et al. 2003. Taxonomic Status in DNA Sequences of Five Species of Genus *Paragonimus*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*. 2(21): 29.

บทที่ 3
วิธีดำเนินการศึกษาวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA
- เครื่องบดเนื้อ
- เครื่องผสมสารโดยใช้แม่เหล็กไฟฟ้า
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- เครื่องชั่งสาร
- กล้องสเตอริโอ
- กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
- ตู้เย็น 4°C และ -20°C
- เข็มเขี่ย
- กระจก (ขนาด 8 x 10 มิลลิเมตร)
- บีกเกอร์
- กระชอนสำหรับกรอง
- กรงสำหรับเลี้ยงหนู
- หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- หลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- แผ่นสไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์
- ชุดอุปกรณ์การทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส
- อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ
- ไมโครปิเปต
- เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต

2. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	**บริษัท**
2-Log DNA Ladder	BioLabs
6x Gel loading dye	Bioline
10x *z-Taq* buffer	Takara
Absolute ethanol	Merck
Agarose	GibcoBRL
Boric acid	Promega
Canada balsam	Merck
Carmine	Fluka
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen
dNTP mixture	Takara
Ethanol	Merck
Ether	J.T. Baker
Ethidium bromide	BIO-RAD
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Promega
Formalin	Carlo Erba
Hydrochloric acid (HCl) (concentrated)	Merck
Nuclease-free water	GibcoBRL
Pepsin	Nacalai tesque
Proteinase K	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
RNase A	Qiagen
Sodium acetate	Carlo Erba
Sodium chloride (NaCl)	Univar

ตาราง 1 (ต่อ)

สารเคมี	บริษัท
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Promega
Sodium tetraborate	Carlo Erba
Tris base	Promega
z-taq DNA polymerase	Takara

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างปูน้ำจืดและการตรวจสอบสปีชีส์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างปูน้ำตกจากบริเวณลำธารใกล้น้ำตกตรอกนอง อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างคือเดือนมิถุนายนและธันวาคม พ.ศ. 2553 สปีชีส์ของปูจะได้รับการตรวจสอบและยืนยันโดย Dr. Masatsune Takeda ผู้เชี่ยวชาญจากมหาวิทยาลัย Teikyo Heisei ประเทศญี่ปุ่น

2. การตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียและการตรวจสอบสปีชีส์เบื้องต้น

การตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียทำได้ 2 วิธีคือ

2.1 วิธีใช้กระจก 2 แผ่นกด (ตรวจอวัยวะภายในและเหงือก)

2.1.1. นำปูที่จะทำการตรวจมาวัดขนาดและแยกเพศผู้กับเพศเมีย

2.1.2. ฉีกกระดองปูออกแล้วนำส่วนของอวัยวะภายในทั้งหมดวางบนแผ่นกระจกใช้ปากคีบเขี่ยให้กระจายออก หยด 0.9% NaCl แล้วนำกระจกอีกแผ่นกดทับ

2.1.3. วางส่วนที่เป็นเหงือก (gill) ลงบนแผ่นกระจก หยด 0.9% NaCl แล้วปิดทับด้วยกระจกอีกหนึ่งแผ่น

2.1.4. นำส่วนของอวัยวะภายในทั้งหมดและเหงือกที่เตรียมได้จากขั้นตอนข้างต้นไปตรวจด้วยกล้องสเตอริโอโดยใช้กำลังขยาย 8 เท่า

2.1.5. เก็บรวบรวมและล้างเมตาเซอร์คาเรียด้วย 0.9% NaCl ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2.2 วิธีปั่นและตกตะกอน (ตรวจกล้ามเนื้อ)

2.2.1. นำปูที่ต้องการตรวจมาฉีกกระดองออกแล้วนำส่วนกล้ามเนื้อใส่เครื่องบดและบดให้ละเอียด

2.2.2. เติมเอนไซม์ pepsin (pepsin 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 0.1 N HCl) จากนั้นนำไปคนโดยตั้งบนเครื่องผสมสารโดยใช้แม่เหล็กไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

2.2.3. นำส่วนผสมดังกล่าวมากรองผ่านกระชอนเพื่อแยกส่วนกระดองปูออก จากนั้นจึงนำส่วนที่ผ่านการกรองแล้วมากรองอีกครั้งด้วยกระชอนที่มีความกว้างของช่องตะแกรง 500, 300 และ 150 ไมโครเมตรตามลำดับ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทน้ำด้านบนทิ้งและเติม 0.9% NaCl ลงไปใหม่ ทำซ้ำประมาณ 5-6 ครั้ง หรือจนกว่าของเหลวที่อยู่ด้านบนจะใส

2.2.4. เทของเหลวด้านบนทิ้งและนำตะกอนที่เหลือมาตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียภายใต้กล้องสเตอริโอ และถ่ายรูปเมตาเซอร์คาเรียก่อนจะเก็บรวบรวมไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. การทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิ

3.1 การทำให้สัตว์ทดลองติดเชื้อพยาธิ *P. paishuihoensis*

เนื่องจากในวงชีวิตของพยาธิใบไม้ปอดมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นโฮสต์จำเพาะ และ เพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดจึงมีการทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิโดยวิธีการดังนี้ นำเมตาเซอร์คาเรียที่ได้มาฉีดให้กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ปราศจากเชื้อจำเพาะ (specific pathogen free) 2 ประเภทได้แก่ หนู (Wistar rat) เพศเมียอายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว และแมว (Japanese cat) เพศเมีย อายุ 2 ปี จำนวน 1 ตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้องประมาณตัวละ 20 ซีสต์ เลี้ยงหนูและแมวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดแล้วจึงนำอุจจาระมาตรวจหาไข่ของพยาธิและทำการผ่าพิสูจน์เพื่อตรวจหาตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด นำพยาธิใบไม้ปอดที่ได้มาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการทดลองนี้การเลี้ยงหนูได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ส่วนการเลี้ยงแมวที่ประเทศญี่ปุ่นได้รับการอนุญาตจาก National Institute of Infectious Diseases

3.2 วิธีการตรวจหาไข่พยาธิจากอุจจาระ

3.2.1. เก็บรวบรวมอุจจาระของสัตว์ทดลองนำมาแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน

3.2.2. เติม 10% formalin ให้ท่วม จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง

3.2.3. นำส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้นดูดของเหลวส่วนบนทิ้งและเติม 10% formalin ลงไป 4/5 ส่วนของหลอด เติม ether ลงไป 1/5 ส่วน เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงโดยการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 1,545 x*g* เป็นเวลา 15 นาที

3.2.4. เทน้ำและตะกอนที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป เหลือไว้เฉพาะตะกอนที่อยู่บริเวณก้นหลอด จากนั้นจึงนำตะกอนดังกล่าวมาตรวจหาไข่ของพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3 วิธีการตรวจหาตัวเต็มวัยของ *P. paishuihoensis*

3.3.1. ผ่าหนูเพื่อตรวจหาพยาธิใบไม้ปอด โดยจะทำการตรวจอวัยวะภายในได้แก่ ปอดและตับ บริเวณโพรงเยื่อบุปอด (pleural cavity) กะบังลม (diaphragm) และกล้ามเนื้อ โดยตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดมักจะพบจับคู่อยู่ด้วยกันในถุงหุ้มภายในเนื้อปอด ส่วนอวัยวะอื่น ๆ หรือบริเวณกล้ามเนื้อมักจะพบพยาธิในระยะ larva หรือ immature

3.3.2. เมื่อนำพยาธิออกจากถุงหุ้มแล้ว จะนำมาทำความสะอาดด้วย 0.9% NaCl ก่อนจะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4. การศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของ *P. paishuihoensis*

โครงสร้างต่าง ๆ และอวัยวะภายในของพยาธิศึกษาได้โดยการทำ whole mount ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1 ขั้นตอนการ fixation

ล้างทำความสะอาดพยาธิโดยใช้ 0.9% NaCl จากนั้นวางบนสไลด์ และนำสไลด์อีกแผ่นมาวางทับลงไป โดยใช้แผ่นกระดาษมาวางสอดไว้ระหว่างแผ่นสไลด์ทั้งสอง นำเส้นยางวงมารัดแผ่นสไลด์ทั้งสองให้ติดกัน ก่อนนำไปแช่ใน 70% ethanol ทิ้งไว้ 1 คืน

4.2 ขั้นตอน staining และ mounting

หลังจากแช่พยาธิไว้ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 คืน แกะพยาธิออกจากแผ่นสไลด์และนำไปแช่ใน Borax Carmine (2% carmine (w/v), 4% sodium tetraborate (w/v)) ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นจึงล้างสีส่วนเกินออกโดยใช้ acid alcohol (1% conc. HCl ใน 70% ethanol) จนกระทั่งสังเกตเห็นตัวของพยาธิมีสีชมพูอ่อน จึงนำมาล้างใน 70% ethanol เพื่อเอากรดออก และดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ตัวอย่างพยาธิใน 80% ethanol, 90% ethanol, absolute ethanol และ xylene ตามลำดับ โดยแต่ละขั้นตอนจะแช่ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง และใช้ Canada balsam เพื่อยึดตรึงตัวพยาธิไว้ให้อยู่กับที่

5. การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

5.1 การสกัด DNA

การสกัด DNA จากตัวอย่างเมตาเซอร์คาเรียและตัวเต็มวัยของพยาธิมีรายละเอียดตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.1.1 การสกัด DNA จากเมตาเซอร์คาเรีย

5.1.1.1. นำเมตาเซอร์คาเรียซีสต์เดี่ยวๆ จำนวน 3 ซีสต์ แยกใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.1.1.2. เติม extraction buffer (SDS : Proteinase K ในอัตราส่วน 99 : 1) 70 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,800 x*g* เป็นเวลา 30 วินาที

5.1.1.3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง

5.1.1.4. เติม RNase A (10 mg/ml) 5 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที

5.1.1.5. ตกตะกอน DNA โดยการเติม sodium acetate (3M) 10 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 20 ไมโครลิตร

5.1.1.6. จากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,800 x*g* โดยแบ่งออกเป็น 3 รอบคือ รอบที่ 1 ใช้เวลา 15 นาที รอบที่ 2 ใช้เวลา 2 นาที และรอบสุดท้ายใช้เวลา 2 นาที เสร็จแล้วดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป

5.1.1.7. ล้างตะกอน DNA โดยเติม 70% ethanol 100 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,800 x*g* 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที แล้วดูด ethanol ทิ้งไปให้เหลือเฉพาะตะกอน

5.1.1.8. นำ DNA pellet ที่ได้ไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 1 mM EDTA) และนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 °C

5.1.2 การสกัด DNA จากพยาธิระยะ immature

ในการสกัด DNA จากพยาธิระยะ immature ใช้ชุด DNeasy® Tissue Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

5.1.2.1. นำพยาธิใส่ลงไปในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ และบดพยาธิให้ละเอียด

5.1.2.2. เติม ATL buffer 180 ไมโครลิตร ตามด้วยการเติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร

5.1.2.3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.1.2.4. เติม AL buffer 200 ไมโครลิตร

5.1.2.5 เติม absolute ethanol 200 ไมโครลิตร และผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน

5.1.2.6 ดูดสารผสมดังกล่าวใส่ลงใน DNeasy mini column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,220 x*g* เป็นเวลา 1 นาที ย้าย column มาใส่ใน collection tube อันใหม่

5.1.2.7 ล้าง column ครั้งแรกด้วยการเติม AW1 buffer 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,220 x*g* เป็นเวลา 1 นาที

5.1.2.8 ล้าง column ครั้งที่สองด้วยการเติม AW2 buffer 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,800 x*g* เป็นเวลา 3 นาที

5.1.2.9 ย้าย column มาใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์อันใหม่ จากนั้นเติม nuclease-free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงไปใน column และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา

1 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,220 x*g* เป็นเวลา 1 นาที เสร็จแล้วจึงเก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20^{o}C

5.2 การเพิ่ม DNA บริเวณ ITS2 และ บางส่วนของยีน COI โดยวิธี PCR

Primer ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สังเคราะห์จากบริษัท aitbiotech Pte. Ltd. โดย primer 3S และ A28 ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS2 และ primer JB3 และ JB4.5 ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณบางส่วนของยีน COI (ตาราง 2)

ตาราง 2 Primer สำหรับทำ PCR

Primer	**ลำดับนิวคลีโอไทด์**	**ทิศทาง**	**แหล่งอ้างอิง**
3S	5´- GGT-ACC-GGT-GGA-TCA-CTC-GGC-TCG-TG - 3´	forward	Bowles; et al. 1993.
A28	5´- GGG ATC CTG GTT AGT TTC TTT TCC TCC GC - 3´	reverse	Blair; Agatsuma; & Watanobe. 1997.
JB3	5´ - TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT - 3´	forward	Bowles; Blair; & McManus. 1995.
JB4.5	5´- TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG - 3´	reverse	Bowles; Blair; & McManus. 1995.

ส่วนประกอบในการทำ PCR บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI สำหรับ PCR reaction ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ส่วนประกอบในการทำ PCR บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI

ส่วนประกอบ	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
10x PCR buffer	1x
dNTP mixture (10 mM)	0.2 mM (แต่ละชนิด)
Forward primer (20 μM)	0.5 μM
Reverse primer (20 μM)	0.5 μM
DNA template	2 ng/μL
Taq DNA polymerase	0.05U/μL

นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

Denaturing	98°C	5	วินาที	30 รอบ
Annealing	55°C	10	วินาที	
Extension	72°C	10	วินาที	
Final extension	72°C	2	นาที	

5.3 การหาขนาดของ PCR product

นำ PCR product มาตรวจหาขนาดโดยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose (w/v) ใน 1x TBE buffer (เจือจางจาก 10x TBE stock: 89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้คือ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดของ PCR product กับ DNA มาตรฐานคือ 2-Log DNA Ladder

5.4 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick™ PCR Purification Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

5.4.1 นำ PCR product ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด1.5 มิลลิลิตร เติม PB buffer ปริมาตร 5 เท่าของ PCR product ผสมให้เข้ากัน

5.4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,220 x*g* นาน 1 นาที

5.4.3 ดูดสารผสมที่ได้ใส่ใน spin column และตั้งทิ้งไว้ 1 นาที

5.4.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,800 x*g* นาน 1 นาที

5.4.5 เทส่วนที่ผ่าน filter ทิ้งไป

5.4.6 เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

5.4.7 นำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที ที่ความเร็ว 13,800 x*g* และเทส่วนที่ผ่าน filter ทิ้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,800 x*g* เป็นเวลา 1 นาที

5.4.8 ย้าย column มาวางในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.4.9 เติม nuclease-free water 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

5.4.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,800 x*g* นาน 1 นาที แล้วจึงเก็บ PCR product ที่บริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

5.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งตัวอย่าง PCR product ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปยังบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้เพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ primer ในตาราง 2

5.6 การวิเคราะห์ข้อมูลและสร้าง phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ของพยาธิใบไม้ปอดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จากเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 3 ซีสต์ แต่ละบริเวณมาเทียบเคียงกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX (Jeanmougin. 1998: 403-405) และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอกฉันท์ (consensus sequence) ของบริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI มาเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. paishuihoensis* ที่พบในมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน (Dr. David Blair, pers. comm.) และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในประเทศไทยดังรายละเอียดในตาราง 4 สร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b (Swofford. 1998) ด้วยวิธี parsimony (branch-and-bound search) โดยใช้พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola hepatica* (ตารางที่ 4) เป็น outgroup และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นในความสัมพันธ์ของกลุ่มพยาธิใบไม้ปอดที่ศึกษาโดย bootstrap analysis (Felsenstein. 1985: 783-791)

ตาราง 4 รายละเอียดของพยาธิใบไม้ปอดและพยาธิใบไม้ตับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

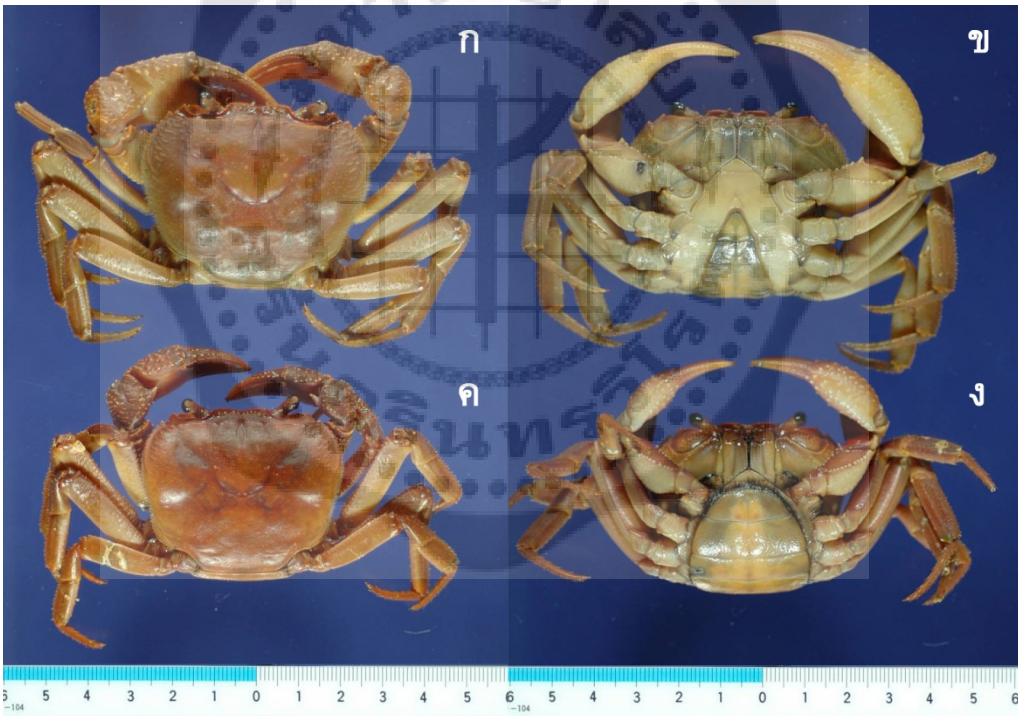
สปีชีส์	แหล่งที่มา	GenBank accession number	
		ITS2	COI
P. bangkokensis	สระบุรี	Unpublished data	AB354228
P. harinasutai	สระบุรี	AB354219	AB354226
P. heterotremus	สระบุรี	AF159603	AB354230
P. macrorchis	จันทบุรี	AF159608	AF159598
P. paishuihoensis	มณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน	Pers. comm.	Pers. comm.
P. pseudoheterotremus	กาญจนบุรี	EF014340	EF446317
P. siamensis	ปราจีนบุรี	AB354222	AB354231
P. westermani	สระบุรี	AB354214	AB354223
Fasciola hepatica	ประเทศออสเตรเลีย	AB207148	AF216697

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา

การเก็บตัวอย่างปูน้ำตกและการตรวจสอบสปีชีส์

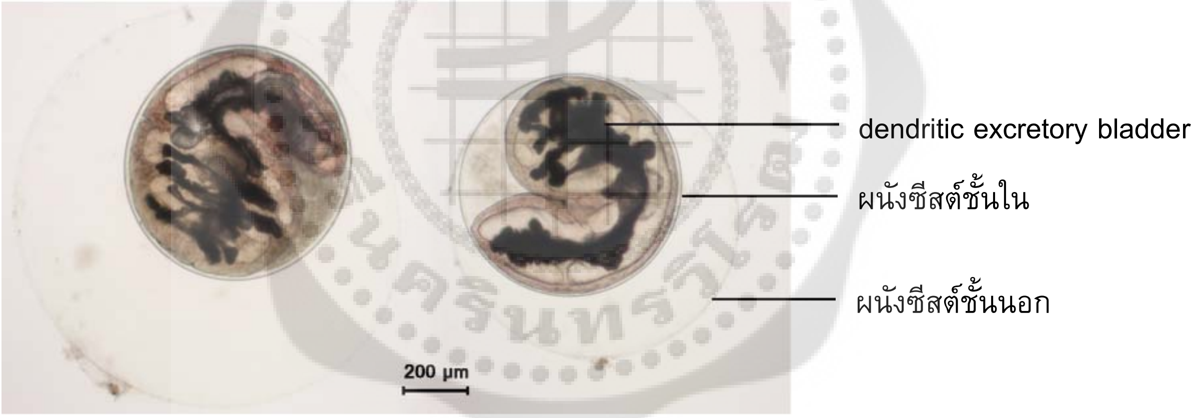
จากการเก็บตัวอย่างปูน้ำตกบริเวณลำธารใกล้น้ำตกตรอกนองในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรีในช่วงเดือนมิถุนายนและธันวาคม พ.ศ. 2553 ได้ตัวอย่างปูน้ำตกจำนวนทั้งหมด 212 ตัว และผลการศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยาของปูโดย Dr. Masatsune Takeda ผู้เชี่ยวชาญจากมหาวิทยาลัย Teikyo Heisei ประเทศญี่ปุ่น สามารถยืนยันได้ว่าสปีชีส์ของปูดังกล่าวคือ *Potamon boonyaratae* (Naiyanetr. 1987) (ภาพประกอบ 23)



ภาพประกอบ 23 ปูน้ำตก *Potamon boonyaratae* (Naiyanetr. 1987)
เพศผู้ (ก และ ข) และเพศเมีย (ค และ ง)

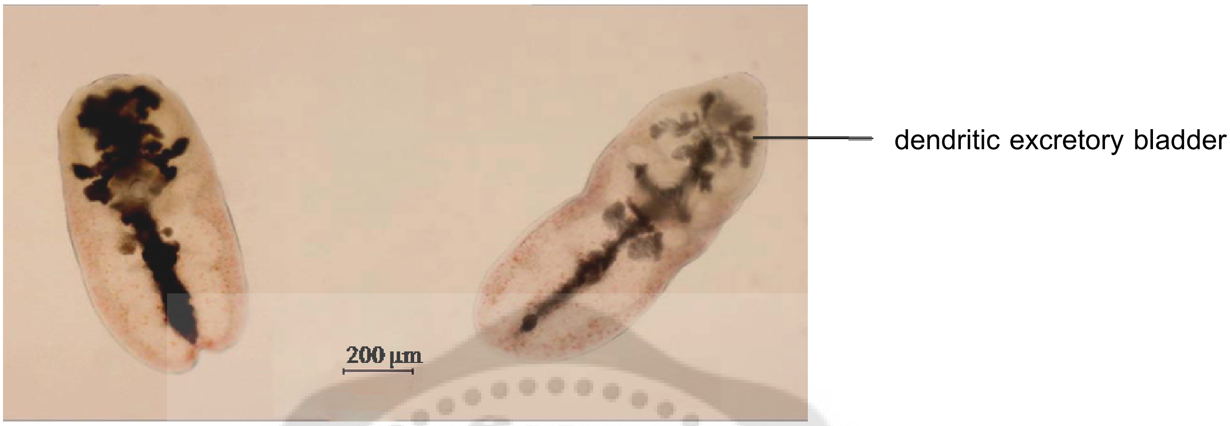
เมตาเซอร์คาเรียและการตรวจสอบสปีชีส์เบื้องต้น

จากตัวอย่างปูน้ำตกที่เก็บได้ทั้งหมด 212 ตัว สามารถตรวจพบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดทั้งหมด 133 ซีสต์ ซึ่งมีลักษณะดังภาพประกอบ 24 ซีสต์มีรูปร่างค่อนข้างกลมและเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 624.45 x 647.00 ไมโครเมตร มีผนังซีสต์ 2 ชั้นประกอบด้วยผนังซีสต์ชั้นในที่มีลักษณะค่อนข้างบางใสและเหนียว ความหนาเฉลี่ย 4.60 ไมโครเมตร ส่วนผนังซีสต์ชั้นนอกมีความหนาไม่สม่ำเสมอเฉลี่ย 3.37 ไมโครเมตรและถูกทำลายหรือหลุดขาดได้ง่าย ตัวอ่อนของพยาธิอยู่ติดกับผนังซีสต์ชั้นในและมีลักษณะของ excretory bladder แตกแขนงหลายแขนง (dendritic shape) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานในประเทศไทย และสอดคล้องกับลักษณะที่พบในพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* ที่มีรายงานการค้นพบในสาธารณรัฐประชาชนจีน ดังนั้นผลการตรวจสอบสปีชีส์เบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียซึ่งมีลักษณะของ excretory bladder ที่มีการแตกแขนงหลายแขนง สามารถบ่งชี้ได้ว่าพยาธิใบไม้ปอดที่พบในการศึกษาครั้งนี้คือ *P. paishuihoensis*



ภาพประกอบ 24 เมตาเซอร์คาเรียของ *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีซึ่งมีลักษณะพิเศษของ dendritic excretory bladder

นอกจากนี้ในระหว่างทำการทดลองยังพบตัวอ่อนของพยาธิที่ออกจากซีสต์ (excyst) ซึ่งมีรูปร่างยาวรี มีขนาดเฉลี่ย 478.10 x 870.01 ไมโครเมตร และมีลักษณะของ excretory bladder แตกแขนงหลายแขนง (ภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 25 ตัวอ่อนของพยาธิ *P. paishuihoensis* ที่ออกจากซีสต์และมีลักษณะพิเศษของ dendritic excretory bladder

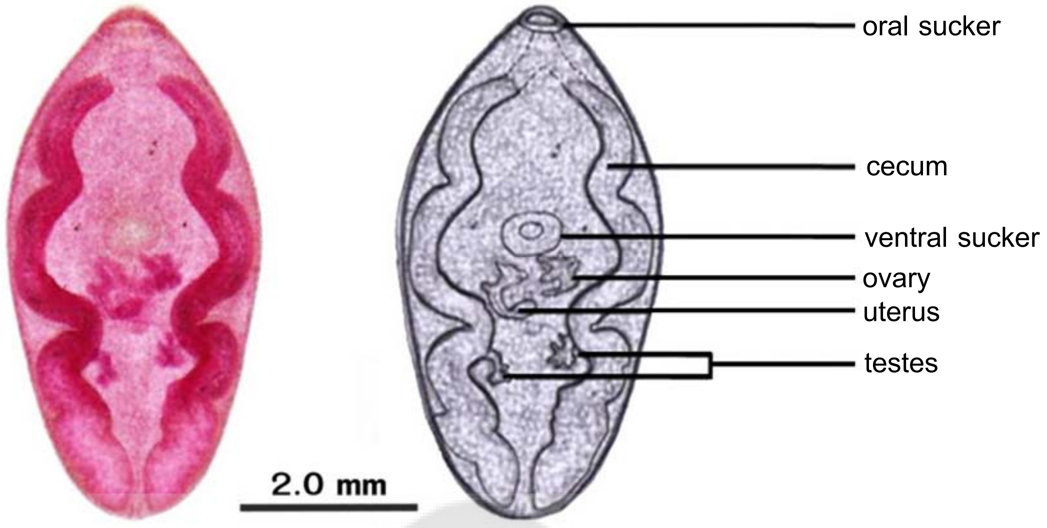
การทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิ

การติดเชื้อในหนู

การตรวจสอบผลการทดลองการติดพยาธิใบไม้ปอดจากจังหวัดจันทบุรีในหนู 2 ตัว หลังจาก 8 สัปดาห์ ปรากฏว่าไม่พบไข่ของพยาธิใบไม้ปอดในอุจจาระ และเมื่อผ่าพิสูจน์หนูทั้ง 2 ตัว ผลปรากฏว่าไม่พบตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด

การติดเชื้อในแมว

8 สัปดาห์ภายหลังจากการทดลองทำให้แมวติดพยาธิใบไม้ปอดจากจังหวัดจันทบุรี ผลการตรวจสอบปรากฏว่าไม่พบไข่ของพยาธิใบไม้ปอดในอุจจาระ และเมื่อผ่าพิสูจน์แมวปรากฏว่าไม่พบตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด แต่พบพยาธิในระยะ immature จำนวน 6 ตัว ที่บริเวณกล้ามเนื้อของแมว โดยมีขนาดของลำตัวเฉลี่ย 2.72 x 5.43 มิลลิเมตร (ภาพประกอบ 26) อย่างไรก็ดีพยาธิในระยะ immature เหล่านี้ยังแสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ (รังไข่และอัณฑะ) ที่ไม่ชัดเจน

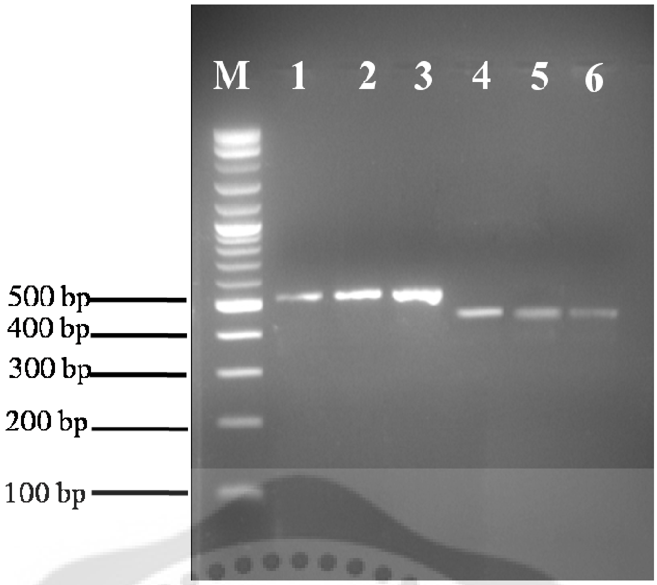


ภาพประกอบ 26 พยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีในระยะ immature ที่ได้จากการติดเชื้อในแมว

การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

การสกัด DNA และการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS2 และบริเวณบางส่วนของยีน COI ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรี จำนวน 3 ซีสต์ และพยาธิในระยะ immature จำนวน 1 ตัว ซึ่งได้มาจากแมว มาสกัด DNA จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ primer สำหรับบริเวณ ITS2 (3S และ A28) และบริเวณบางส่วนของยีน COI (JB3 และ JB 4.5) ผลการตรวจสอบขนาดของ PCR product พบว่าบริเวณ ITS2 มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส ส่วนบริเวณบางส่วนของยีน COI มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส (ภาพประกอบ 27)



ภาพประกอบ 27 ขนาดของ PCR product โดย M คือ 2-Log DNA Ladder หมายเลข 1-3 คือบริเวณ ITS2 และ หมายเลข 4-6 คือบริเวณบางส่วนของยีน COI

การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. paishuihoensis* ที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้กับ *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเมตาเซอร์คาเรียกับพยาธิในระยะ immature ที่ได้จากแมว พบว่ามีความเหมือนกันทุกประการ (identical sequences) ทั้งบริเวณ ITS2 และบริเวณบางส่วนของยีน COI

การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ระหว่างตัวอย่าง *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน (Dr. David Blair, pers. comm.) กับตัวอย่างพยาธิใบไม้ปอดที่ได้จากจังหวัดจันทบุรี แสดงให้เห็นว่า *P. paishuihoensis* จากทั้งสองแหล่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันสูงถึง 99.18% สำหรับบริเวณ ITS2 (ภาพประกอบ 28) และ 97.09% สำหรับบริเวณบางส่วนของยีน COI (ภาพประกอบ 29)

Taxon

```
                                 10        20        30        40        50
P. paishuihoensis (CH)  ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. paishuihoensis (YN)  ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
                        **************************************************

                                 60        70        80        90       100
P. paishuihoensis (CH)  TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. paishuihoensis (YN)  TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
                        **************************************************

                                110       120       130       140       150
P. paishuihoensis (CH)  GCGTGATTTCCCCGATCTGACCTTGCGTCGGTGGGGTGCCAGATCTATGG
P. paishuihoensis (YN)  GCGTGATTTCCCCGATCTGACCTTGCGTCGGTGGGGTGCCAGATCTATGG
                        **************************************************

                                160       170       180       190       200
P. paishuihoensis (CH)  CGTTTCCCTAACCTATCCGGGCGTACCCATGTTGTGGCTGAAGGCCTTGG
P. paishuihoensis (YN)  CGTTTCCCTAACCTATCCGGGCGTACCCATGTTGTGGCTGAAGGCCTTGG
                        **************************************************

                                210       220       230       240       250
P. paishuihoensis (CH)  TGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGGCTCAGTGAGTTATTTATGTGCGCGT
P. paishuihoensis (YN)  TGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGGCTCAGT--GTTATTTATGTGCGCGT
                        *******************************  *****************

                                260       270       280       290       300
P. paishuihoensis (CH)  TCCGTCGTTTTATCATCGTCATCTATGGTTGATGCTGCGTATGGTGTGCG
P. paishuihoensis (YN)  TCCGTCGTTTTATCATCGTCATCTATGGTTGATGCTGCGTATGGTGTGCG
                        **************************************************

                                310       320       330       340       350
P. paishuihoensis (CH)  TGCGATGCTGACCTACGTGTGTGCCATGTGGCTCATTCTCCTGACCTCGG
P. paishuihoensis (YN)  TGCGATGCTGACCTACGTGTGTGCCATATGGCTCATTCTCCTGACCTCGG
                        *************************** **********************

                                360
P. paishuihoensis (CH)  ATCAGACGTGAGTACC [366]
P. paishuihoensis (YN)  ATCAGACGTGAGTACC [364]
                        ****************
```

ภาพประกอบ 28 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ระหว่าง *P. paishuihoensis* (CH) จากจังหวัดจันทบุรีกับ *P. paishuihoensis* (YN) จากมณฑลยูนนาน เครื่องหมาย* แสดงตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

Taxon

```
                                 10        20        30        40        50
P. paishuihoensis (CH)   CCGGGGTTTGGGATTGTGAGGCATATTTGCATGACTTTAACTAATAAAGA
P. paishuihoensis (YN)   CCTGGGTTTGGGATTGTGAGGCATATCTGCATGACTTTGACCAATAAAGA
                         ** *********************** *********** ** ********

                                 60        70        80        90       100
P. paishuihoensis (CH)   TTCCCTGTTTGGTTATTATGGGTTGGTGTTTGCCATGGGGGCTATCGTGT
P. paishuihoensis (YN)   TTCCCTGTTTGGTTACTATGGGTTGGTGTTTGCCATGGGGGCTATCGTGT
                         *************** **********************************

                                110       120       130       140       150
P. paishuihoensis (CH)   GTTTGGGAAGTGTTGTTTGGGCTCATCACATGTTTATGGTTGGTCTGGAT
P. paishuihoensis (YN)   GTTTGGGAAGTGTTGTTTGAGCTCATCACATGTTCATGGTTGGTCTGGAT
                         ******************* ************** ***************

                                160       170       180       190       200
P. paishuihoensis (CH)   GTTAAGACTGCGGTGTTTTTCAGGTCTGTTACAGGAGTAATAGGTATCCC
P. paishuihoensis (YN)   GTTAAGACTGCGGTGTTTTTCAGGTCTGTTACAGGAGTAATAGGTATCCC
                         **************************************************

                                210       220       230       240       250
P. paishuihoensis (CH)   GACAGGGATTAAGGTTTTTTCCTGGTTATTCATGTTGGGTGGGACTCGTT
P. paishuihoensis (YN)   GACAGGGATTAAGGTTTTTTCCTGGTTATTCATGTTGGGTGGGACTCGTT
                         **************************************************

                                260       270       280       290       300
P. paishuihoensis (CH)   TACGGTTCTGAGATCCTGTGGTGTGATGAATTCTGGGGTTTATATTCTTG
P. paishuihoensis (YN)   TACGGTTTTGAGATCCTGTGGTGTGGTGAATTCTGGGGTTTATCTTCTTG
                         ******* ***************** ***************** ******

                                310       320       330       340       350
P. paishuihoensis (CH)   TTCACCATAGGGGGTGTGACTGGGATTATTCTTTCCTCTTCCATTTTGGA
P. paishuihoensis (YN)   TTCACCATAGGGGGTGTGACTGGGATTATTCTTTCCTCTTCCATTTTGGA
                         **************************************************

                                360       370
P. paishuihoensis (CH)   TAGCTTGTTGCATGACACCTGATTTGTT [378]
P. paishuihoensis (YN)   TAGCTTGTTGCATGACACCTGATTCGTT [378]
                         ************************ ***
```

ภาพประกอบ 29 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI ระหว่าง *P. paishuihoensis* (CH) จากจังหวัดจันทบุรีกับ *P. paishuihoensis* (YN) จากมณฑลยูนนาน เครื่องหมาย* แสดงตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ของไทยโดยใช้พยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* เป็น outgroup พบว่ามีความยาวเท่ากับ 445 คู่เบส มี indel (insertion และ deletion) ทั้งหมด 17 ตำแหน่ง (a-q) (ภาพประกอบ 30) จากผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 สามารถสรุปได้ดังตาราง 5 โดยพบว่ามีตำแหน่งของ constant site = 332 (74.61%) จำนวน uninformative character = 57 (12.81%) จำนวน informative character = 56 (12.58%) sequence divergence ของ ingroup กับ outgroup ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ pairwise distance อยู่ระหว่าง 22.5-26.1% G+C content มีค่าเฉลี่ย = 55.1% และมีอัตราส่วนของ transition/transversion = 3.50

การสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PAUP* version 4.0b โดยอาศัยหลักการ parsimony (branch-and-bound search) ผลคือได้ 1 most parsimonious tree (ภาพประกอบ 31) ที่มีความยาว 153 step มีค่า consistency index (CI) = 0.856, homoplasy index (HI) = 0.144, retention index (RI) = 0.788 และ rescaled consistency index (RC) = 0.675 โดยผลการทำ phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจัดกลุ่มที่สำคัญ 3 clade คือ clade I (BS = 94%) แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันระหว่าง *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีกับ *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน (BS = 100%) และยังพบว่า *P. paishuihoensis* จากทั้งสองแหล่งมีความใกล้ชิดกับ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* อีกด้วย ส่วน clade II (BS = 89%) ประกอบด้วย *P. heterotremus*, *P. pseudoheterotremus* และ *P. macrorchis* ซึ่ง *P. heterotremus* และ *P. pseudoheterotremus* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า (BS = 100%) และ clade III (BS = 86%) ประกอบด้วย *P. westermani* และ *P. siamensis*

Taxon

```
                                 10        20        30        40        50
P. paishuihoensis (CH)   ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. paishuihoensis (YN)   ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. bangkokensis          ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. harinasutai           ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. heterotremus          ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. pseudoheterotremus    ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. macrorchis            ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. westermani            ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
P. siamensis             ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT
Fasciola hepatica        ATATTGCGGCCATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT


                                 60        70        80        90       100
P. paishuihoensis (CH)   TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. paishuihoensis (YN)   TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. bangkokensis          TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. harinasutai           TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. heterotremus          TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. pseudoheterotremus    TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. macrorchis            TATAAACTATCGCAACGCCCAAAAAGTTGCGGCTTGGGTTCTGCCAGCTG
P. westermani            TATAAACCATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG
P. siamensis             TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTCTTGCCAGCTG
Fasciola hepatica        TATAAACTATCACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTTTTGCCAGCTG


                                110       120       130       140       150
P. paishuihoensis (CH)   GCGTGATTTCCCCGATCTGACCTTGCGTCGGTGGGGTGCCAGATCTATGG
P. paishuihoensis (YN)   GCGTGATTTCCCCGATCTGACCTTGCGTCGGTGGGGTGCCAGATCTATGG
P. bangkokensis          GCGTGATTTCCCCGATCTGACCTTGTGTCGGTGGGGTGCCAGATCTATGG
P. harinasutai           GCGTGATTTCCCCGGTCTGACCTTGTGTCGGTGGGGTGCCAGATCTATGG
P. heterotremus          GCGTGATTTCCCCAACGTGGCCTTGTGTCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGG
P. pseudoheterotremus    GCGTGATTTCCCCAACGTGGCCTTGTGTCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGG
P. macrorchis            GCGTGATTTCCCCAACCTGGCCTCGTGTCTGTGGGGTGCCGGATCTGTGG
P. westermani            GCGTGATCTCCCCAATCTGGTCTTGTGCCTGTGGGGTGCCAGATCTATGG
P. siamensis             GCGTGATCTCCCCAATCAGGTCTCGTGCCTGTGGGGTGTCAGATCTATGG
Fasciola hepatica        GCGTGATCTCCTCTATGAGTAATCATG----TGAGGTGCCAGATCTATGG
                                                    |a |
```

ภาพประกอบ 30 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 9 taxa และ outgroup โดยเครื่องหมาย – แสดงตำแหน่งที่เกิด indel (a-q) ตัวเลขในวงเล็บที่อยู่ปลายสุดของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ คือความยาวที่แท้จริงของแต่ละ taxon

Taxon

```
                               160       170       180       190       200
P. paishuihoensis (CH)  CGTTTCCCTAACCTATCCGGGCGTACCCATGTTGTGGCTGAAGGCCTTGG
P. paishuihoensis (YN)  CGTTTCCCTAACCTATCCGGGCGTACCCATGTTGTGGCTGAAGGCCTTGG
P. bangkokensis         CGTTTCCCTAACCTGTCCGGGCGTACCCATGTTGTGGCTGAAGGCCTTGG
P. harinasutai          CGTTTCCCTAACCTGTCCGGGCGTACCCATGTTGTGGCTGAAGGCCTTGG
P. heterotremus         CGTTTCCCTAACAAATCCGGGCGTATCCATGTTGTGGCTGAAAGCCTTGA
P. pseudoheterotremus   CGTTTCCCTAACAAATCCGGGCGTATCCATGTTGTGGCTGAAAGCCTTGA
P. macrorchis           CGTTTCCCTAAAAAATCCGGACGTACCCGTGTTGTGGCTGAAAGCCTTGA
P. westermani           CGTTTCCCTAACATACTCGCGCGCACCCACGTTGCGGCTGAAAGCCTTGA
P. siamensis            CGTTTCCCTAACATACTCGGGCGCACCCACGTTGCGGCTGAAAGCCTTGA
Fasciola hepatica       CGTTTCCCTAATGTATCCGGATGCACCCTTGTCTTGGCAGAAAGCCGTGG


                               210       220       230       240       250
P. paishuihoensis (CH)  TGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGG-------------------CTCAGT
P. paishuihoensis (YN)  TGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGG-------------------CTCAGT
P. bangkokensis         TGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGG-------------------CTCAGT
P. harinasutai          TGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGG-------------------CTCAGT
P. heterotremus         TGGGGATGTGGCAACGGAGTCGTGG-------------------CTCAGT
P. pseudoheterotremus   TGGGGATGTGGCAACGGAGTCGTGG-------------------CTCAGT
P. macrorchis           TGGGGATGTGGCAACGGAGTCGTGG-------------------CTCAGT
P. westermani           CGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGG-------------------CTCAGT
P. siamensis            CGGGGATGTGGCAACGGAATCGTGG-------------------CTCAGT
Fasciola hepatica       TGAGG-TGCAGTGGCGGAATCGTGGTTTAATAATCGGGTTGGTACTCAGT
                             b                  |        c          |

                               260       270       280       290       300
P. paishuihoensis (CH)  GA-----------------------------------GTTATTTATGTGC
P. paishuihoensis (YN)  -------------------------------------GTTATTTATGTGC
P. bangkokensis         GA-----------------------------------ATTATTTATGTGC
P. harinasutai          GA-----------------------------------ATTATTTATGTGC
P. heterotremus         GA-----------------------------------ATGATTTATGTGC
P. pseudoheterotremus   GA-----------------------------------ATGATTTATGTGC
P. macrorchis           GA-----------------------------------AAAATTTATGTGC
P. westermani           AA-----------------------------------ATGATTTATGTGC
P. siamensis            AG-----------------------------------ATGAATTATGTGC
Fasciola hepatica       TGTCAGTGTGTTTGGCGATCCCCTAGTCGGCACACTTATGATTTCTGGGA
                        |d|               e                  |

                               310       320       330       340       350
P. paishuihoensis (CH)  GCGTTCCGT--------CGTTTTATCATCGTCA-----TCTATGGTT-GA
P. paishuihoensis (YN)  GCGTTCCGT--------CGTTTTATCATCGTCA-----TCTATGGTT-GA
P. bangkokensis         GCGTTCCGT--------CGTCCTATCA---TCA-----TCTATGGTT-GA
P. harinasutai          GCGTTCCGT--------CGTCCTATCA---TCA-----TCTATGGTT-GA
P. heterotremus         ACGTTCCGC--------TGTCCCGTCA---TCA-----TCTATGGTT-GA
P. pseudoheterotremus   ACGTTCCGC--------TGTCCCGTCA---TCA-----TCTATGGTT-GA
P. macrorchis           GCGTTCCGC--------TGTCCTGTCA---TCA-----TCTTTGGTT-GA
P. westermani           GCGTTTCGC--------TGTCCTGTCT---TCA-----TCTGTGGTT-CA
P. siamensis            GCGTTCCGT--------TGTCCTGTCT---TCA-----TCTGTGGTT-TA
Fasciola hepatica       TAATTCCATACCAGGCACGTTCCGTCACTGTCACTTTGTCATTGGTTTGA
                                 |    f  |        | g |  | h  |        i
```

ภาพประกอบ 30 (ต่อ)

Taxon

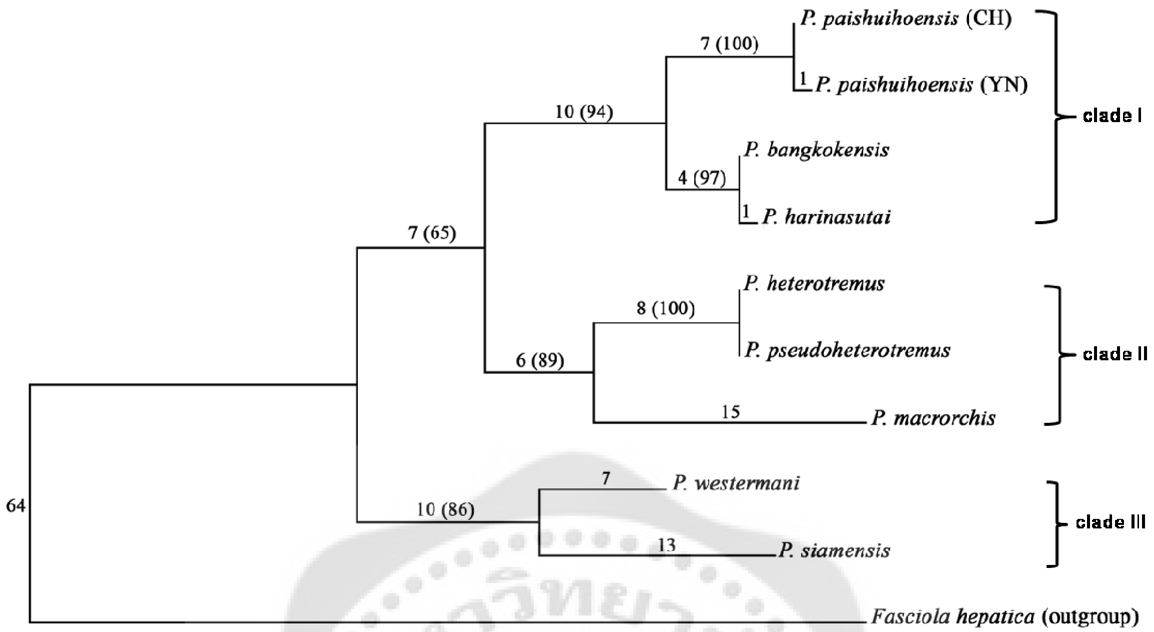
```
                                360       370       380       390      400
P. paishuihoensis (CH)  TGCTGCGTATGGTG-TGCGTGCGATGCTGACCTACGTGT-------GTGC
P. paishuihoensis (YN)  TGCTGCGTATGGTG-TGCGTGCGATGCTGACCTACGTGT-------GTGC
P. bangkokensis         TGCTGCGTGTGGTG-TGCGTCTGATGCTGACCTGAGTAT-------GTGC
P. harinasutai          TGCTGCGTGTGGTG-TGCGTCTGATGCTGACCTGAGTAT-------GTGC
P. heterotremus         AGTTGCGCGTGGTG-T--GTCCGATGCTGACCTATATAT-------GTGC
P. pseudoheterotremus   AGTTGCGCGTGGTG-T--GTCCGATGCTGACCTATATAT-------GTGC
P. macrorchis           TGTTGCATGTGGTG-----TCCGATGCTGACCTATGTTT-------GTGC
P. westermani           TGTTGCGCGTGGTC-TGCGTTCGATGCTGACCTACGTAT-------GTGC
P. siamensis            TGTTGCGCGTGGTC-TGTGTTCGACGTTGACCTATCTAT-------GTGC
Fasciola hepatica       TGCTGAACTTGGTCATGTGTCTGATGCT-ATTTTCATATAGCGACGGTAC
                                      J klm         n         |    o   |

                                 410      420        430       440
P. paishuihoensis (CH)  CAT--GTGGCTCATTCTCCTGACCTCGGATCAGA-CGTGAGTACC  [366]
P. paishuihoensis (YN)  CAT--ATGGCTCATTCTCCTGACCTCGGATCAGA-CGTGAGTACC  [364]
P. bangkokensis         CAT--GTGGCTCATTCTCCTGACCTCGGATCAGA-CGTGAGTACC  [363]
P. harinasutai          CAT--GTGGCTCATTCTCCTGACCTCGGATCAGA-CGTGAGTACC  [363]
P. heterotremus         CAT--GTGGCTCATTTTCCTGACCTCGGATCAGA-CGTGAGTACC  [361]
P. pseudoheterotremus   CAT--GTGGCTCATTTTCCTGACCTCGGATCAGATCGTGAGTACC  [362]
P. macrorchis           CGT--GCGGCTCATTCTCCTGACCTCGGATCAGA-CGTGAGTACC  [359]
P. westermani           CAT--GTGGTCCATTCTTCTGACCTCGGATTAGA-CGTGAGTACC  [363]
P. siamensis            CAT--ATGGTTCATTCTCCTGACCTCGGATCAGA-CGTGAGTACC  [363]
Fasciola hepatica       CCTTCGTGGTCTGTCTTCCTGACCTCGGTTCAGA-CGTGATTACC  [438]
                           |p|                            q
```

ภาพประกอบ 30 (ต่อ)

ตาราง 5 Sequence characteristics ของบริเวณ ITS2

Sequence characteristics	ITS2
Length range (total) (bp)	359-438
Length mean (total) (bp)	370.2
Length range (ingroup) (bp)	359-366
Length (outgroup) (bp)	438
Aligned length (bp)	445
G+C content range (%)	50.5-56.2
G+C content mean (%)	55.1
Sequence divergence range (ingroup) (%)	0-13.9
Sequence divergence range (total) (%)	22.5-26.1
Number of indels (total)	17
Size of indels (total) (bp)	1-35
Number of constant sites (%)	332 (74.61%)
Number of variable sites (%)	113 (25.39%)
Number of informative sites (%)	56 (12.58%)
Number of uninformative sites (%)	57 (12.81%)
Transition/transversion ratio (ts/tv ratio)	3.50



ภาพประกอบ 31 Single most parsimonious tree (ความยาว 153 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *P. paishuihoensis* และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทยโดยมี *F. hepatica* เป็น outgroup และใช้วิธี parsimony (branch-and-bound search) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้: CI = 0.856, RI = 0.788 และ RC = 0.675 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงความยาวของกิ่ง (branch length) และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap support (%BS) จาก 1,000 ซ้ำ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ของไทยโดยใช้พยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* เป็น outgroup พบว่ามีความยาวเท่ากับ 381 คู่เบส และมี indel เพียง 1 ตำแหน่ง (a) (ภาพประกอบ 32)

จากผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI สามารถสรุปได้ดังตาราง 6 โดยพบว่ามีตำแหน่งของ constant site = 242 (63.5%) จำนวน uninformative character = 47 (12.3%) จำนวน informative character = 92 (24.2%) sequence divergence ของ ingroup กับ outgroup ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ pairwise distance อยู่ระหว่าง = 22.8-30.5% G+C content มีค่าเฉลี่ย = 41.2% และมีอัตราส่วนของ transition/transversion = 3.96

ในการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PAUP* version 4.0b และใช้หลักการ parsimony (branch-and-bound search) ผลที่ได้คือ 2 equally parsimonious tree (ภาพประกอบ 33) ที่มีความยาว 311 step มีค่า consistency index (CI) = 0.646, homoplasy index (HI) = 0.354, retention index (RI) = 0.447 และ rescaled consistency index (RC) = 0.289 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจัดกลุ่มของ *P. paishuihoensis* ที่สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้บริเวณ ITS2 คือ *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีมีความใกล้ชิดกับ *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน (BS = 100%) และ *P. paishuihoensis* จากทั้งสองแหล่งมีความใกล้ชิดกับ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* (BS = 55%)

Taxon

Taxon	10 20 30 40 50
P. paishuihoensis (CH)	CCGGGGTTTGGGATTGTGAGGCATATTTGCATGACTTTAACTAATAAAGA
P. paishuihoensis (YN)	CCTGGGTTTGGGATTGTGAGGCATATCTGCATGACTTTGACCAATAAAGA
P. bangkokensis	CCGGGATTTGGGGTTGTGAGCCATATTTGCATGACTTTAACTAATAATGA
P. harinasutai	CCGGGATTTGGAGTTGTAAGCCATATTTGCATGACTTTGACTAATAAAGA
P. westermani	CCGGGGTTTGGTATTGTGAGTCACATCTGCATGACTTTGACTAACAATGA
P. siamensis	CCTGGTTTTGGGATTGTGAGACATATTTGTATGACTTTGACGAATAATGA
P. heterotremus	CCTGGATTTGGTGTTGTGAGACATATCTGCATGACTTTGACTAATAAAGA
P. pseudoheterotremus	CCCGGGTTTGGTGTTGTGAGACATATTTGCATGACTCTAACTAACAAAGA
P. macrorchis	CCAGGGTTTGGTGTTGTGAGACATATTTGTATGACGTTAACTAATAACGA
Fasciola hepatica	CCCGGGTTTGGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTTTAACTAATAATGA

Taxon	60 70 80 90 100
P. paishuihoensis (CH)	TTCCCTGTTTGGTTATTATGGGTTGGTGTTTGCCATGGGGGCTATCGTGT
P. paishuihoensis (YN)	TTCCCTGTTTGGTTACTATGGGTTGGTGTTTGCCATGGGGGCTATCGTGT
P. bangkokensis	TTCGCTGTTTGGTTATTATGGGTTGGTGTTCGCCATGGGGGCGATTGTTT
P. harinasutai	TTCGCTGTTTGGTTACTATGGGTTGGTGTTCGCTATGGGGGCGATTGTTT
P. westermani	TTCCTTGTTTGGGTATTACGGGTTAGTGTTTGCGATGGGGGCCATCGTGT
P. siamensis	TTCTCTGTTTGGTTATTATGGGTTAGTGTTTGCGATGGGAGCTATTGTGT
P. heterotremus	TTCTTTGTTTGGTTATTATGGCTTGGTTTTTGCCATGGGGGCTATTGTGT
P. pseudoheterotremus	TTCTCTGTTTGGGTATTATGGCTTGGTTTTTGCTATGGGGGCTATTGTGT
P. macrorchis	CTCTTTGTTTGGTTATTATGGTTTAGTTTTTGCCATGGGGGCTATTGTTT
Fasciola hepatica	TTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTTAGCTATGGCTGCTATAGTAT

ภาพประกอบ 32 ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ของพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 9 taxa และ outgroup โดยเครื่องหมาย – แสดงตำแหน่งที่เกิด indel (a) ตัวเลขในวงเล็บที่อยู่ปลายสุดของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ คือความยาวที่แท้จริงของแต่ละ taxon

Taxon

```
                               110       120       130       140       150
P. paishuihoensis (CH)  GTTTGGGAAGTGTTGTTTGGGCTCATCACATGTTTATGGTTGGTCTGGAT
P. paishuihoensis (YN)  GTTTGGGAAGTGTTGTTTGAGCTCATCACATGTTCATGGTTGGTCTGGAT
P. bangkokensis         GTTTGGGCAGTGTTGTATGGGCTCATCACATGTTTATGGTTGGTCTGGAT
P. harinasutai          GTTTGGGTAGTGTTGTGTGAGCCCATCATATGTTTATGGTTGGTTTAGAT
P. westermani           GCTTGGGCAGTGTTGTGTGGGCGCACCACATGTTTATGGTTGGTTTGGAT
P. siamensis            GTTTGGGAAGTGTTGTGTGGGCGCATCATATGTTTATGGTTGGTTTGGAT
P. heterotremus         GTTTGGGAAGGGTTGTTTGAGCGCACCATATGTTTATGGTTGGTTTAGAT
P. pseudoheterotremus   GTTTGGGGAGGGTTGTTTGAGCGCATCATATGTTTATGGTTGGTTTAGAT
P. macrorchis           GTTTGGGGAGTGTGGTTTGGGCGCATCATATGTTTATGGTTGGTCTTGAT
Fasciola hepatica       GTTTAGGTAGTGTTGTTTGGGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGAT


                               160       170       180       190       200
P. paishuihoensis (CH)  GTTAAGACTGCGGTGTTTTTCAGGTCTGTTACAGGAGTAATAGGTATCCC
P. paishuihoensis (YN)  GTTAAGACTGCGGTGTTTTTCAGGTCTGTTACAGGAGTAATAGGTATCCC
P. bangkokensis         GTTAAGACCGCGGTGTTTTTTAGATCTGTTACTGGGGTGATAGGTATCCC
P. harinasutai          GTTAAGACCGCGGTGTTTTTTAGATCTGTTACTGGGGTGATAGGTATCCC
P. westermani           GTTAAGACTGCTGTCTTTTTTAGCTCTGTCACTGGGGTGATTGGGATACC
P. siamensis            GTTAAGACTGCTGTGTTTTTTAGTTCTGTCACCGGGGTTATTGGGATACC
P. heterotremus         GTTAAGACTGCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACTGGGGTGATTGGGATTCC
P. pseudoheterotremus   GTTAAGACTGCTGTCTTTTTTAGCTCTGTTACTGGTGTGATTGGTATTCC
P. macrorchis           GTTAAGACTGCTGTTTTTTTTAGCTCTGTTACGGGGGTGATTGGTATTCC
Fasciola hepatica       GTGCATACTGCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACTATGGTTATTGGTATTCC


                               210       220       230       240       250
P. paishuihoensis (CH)  GACAGGGATTAAGGTTTTTTCCTGGTTATTCATGTTGGGTGGGACTCGTT
P. paishuihoensis (YN)  GACAGGGATTAAGGTTTTTTCCTGGTTATTCATGTTGGGTGGGACTCGTT
P. bangkokensis         GACAGGGATTAAGGTTTTTTCTTGGTTGTTTATGTTGGGGGGCACTCGTT
P. harinasutai          GACAGGGATTAAGGTTTTTTCCTGGTTGTTTATGTTGGGTGGCACTCGTT
P. westermani           TACGGGGATTAAGGTCTTCTCTTGGTTGTTCATGTTGGGTGGGTCTCGTT
P. siamensis            TACGGGTATTAAGGTTTTTTCTTGATTATTCATGTTAGGTGGGGCTCGTT
P. heterotremus         CACAGGGATTAAGGTTTTTTCTTGGTTGTTTATGTTGGGGGGCACTCGTT
P. pseudoheterotremus   TACGGGGATTAAGGTTTCTTCTTGATTGTTTATGTTGGGAGGAACTCGTT
P. macrorchis           TACGGGTATTAAGGTTTTTTCTTGGTTGTTTATGCTAGGGGGAACTCGCT
Fasciola hepatica       TACAGGTATTAAGGTCTTTTCCTGGTTGATAATGTTGGGGGGGGGTAGTT


                               260       270       280       290       300
P. paishuihoensis (CH)  ---TACGGTTCTGAGATCCTGTGGTGTGATGAATTCTGGGGTTTATATTC
P. paishuihoensis (YN)  ---TACGGTTTTGAGATCCTGTGGTGTGGTGAATTCTGGGGTTTATCTTC
P. bangkokensis         ---TACGGTTTTGAGATCCTGTAATATGGTGAATTTTGGGGTTTATCTTT
P. harinasutai          ---TGCGGTTTTGAGATCCTGTAATATGGTGAATTTTGGGGTTTATTTTT
P. westermani           ---TACGATTTTGAGATCCTGTTTTGTGGTGGATCCTTGGGTTCATTTTT
P. siamensis            ---TGCGTCTTTGGGATCCTGTCTTGTGGTGGATTCTTGGTTTCATTTTC
P. heterotremus         ---TACGGTTTTGAGATCCGGTGGTTTGGTGAATTTTAGGCTTTATTTTT
P. pseudoheterotremus   ---TACGATTTTGAGATCCGGTGGTTTGATGGATTTTGGGCTTTATCTTT
P. macrorchis           ---TACGGTTTTGGGATCCCGTAATTTGATGAATTTTGGGATTTATTTTT
Fasciola hepatica       CTGTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTT
                        |a|
```

ภาพประกอบ 32 (ต่อ)

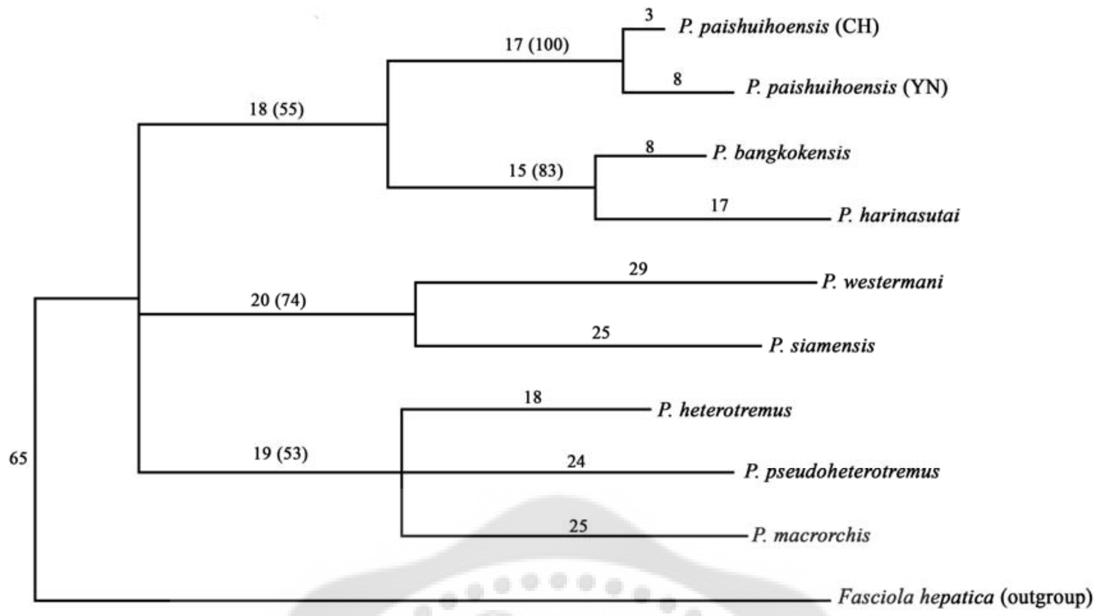
Taxon	
	310 320 330 340 350
P. paishuihoensis (CH)	TTGTTCACCATAGGGGGTGTGACTGGGATTATTCTTTCCTCTTCCATTTT
P. paishuihoensis (YN)	TTGTTCACCATAGGGGGTGTGACTGGGATTATTCTTTCCTCTTCCATTTT
P. bangkokensis	CTGTTTACCATTGGGGGTGTAACTGGGATTATCTTGTCTTCTTCTATCTT
P. harinasutai	CTGTTTACTATTGGGGGTGTGACTGGAATTATTTTGTCTTCTTCTATTTT
P. westermani	CTGTTCACCATAGGGGGTGTGACTGGCATCATTTTGTCTTCTTCCATCCT
P. siamensis	TTGTTTACTATAGGTGGTGTGACCGGTATTGTTTTGTCCTCTTCAATATT
P. heterotremus	CTTTTTACTATTGGTGGTGTAACTGGGATTATTTTGTCTTCTTCTATTTT
P. pseudoheterotremus	TTGTTTACTATCGGTGGTGTTACTGGAATTATTTTGTCTTCCTCTATTTT
P. macrorchis	CTTTTTACTATAGGTGGGGTGACGGGGATTATTTTGTCTTCTTCTATTTT
Fasciola hepatica	TTATTTACTATTGGTGGGGTTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTCTTTT

	360 370 380	
P. paishuihoensis (CH)	GGATAGCTTGTTGCATGACACCTGATTTGTT	[378]
P. paishuihoensis (YN)	GGATAGCTTGTTGCATGACACCTGATTCGTT	[378]
P. bangkokensis	GGACAGTTTGTTGCATGACACTTGATTTGTT	[378]
P. harinasutai	GGATAGTTTGTTGCATGATACCTGATTTGTT	[378]
P. westermani	GGATAGTCTGTTGCATGACACGTGGTTTGTT	[378]
P. siamensis	GGATAGTTTGTTGCATGATACGTGGTTTGTG	[378]
P. heterotremus	GGATAGTCTGTTACATGATACCTGGTTTGTT	[378]
P. pseudoheterotremus	GGATAGTTTGCTGCATGACCCTTGGTTCGTT	[378]
P. macrorchis	AGATAGTTTGTTGCATGATACTTGGTTTGTT	[378]
Fasciola hepatica	GGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTG	[381]

ภาพประกอบ 32 (ต่อ)

ตาราง 6 Sequence characteristics บริเวณบางส่วนของยีน COI

Sequence characteristics	Partial COI region
Length range (total) (bp)	378-381
Length mean (total) (bp)	378.3
Length range (ingroup) (bp)	378
Length (outgroup) (bp)	381
Aligned length (bp)	381
G+C content range (%)	36.8-46.6
G+C content mean (%)	41.2
Sequence divergence range (ingroup) (%)	3.0-23.7
Sequence divergence range (total) (%)	22.8-30.5
Number of indels (total)	1
Size of indels (total) (bp)	3
Number of constant sites (%)	242 (63.5%)
Number of variable sites (%)	139 (36.5%)
Number of informative sites (%)	92 (24.2%)
Number of uninformative sites (%)	47 (12.3%)
Transition/transversion ratio (ts/tv ratio)	3.96



ภาพประกอบ 33 Strict consensus tree ซึ่งได้มาจาก 2 equally parsimonious tree (ความยาว 311 step) ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ของ *P. paishuihoensis* และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทยโดยมี *F. hepatica* เป็น outgroup และใช้วิธี parsimony (branch-and-bound) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้ CI = 0.646, RI = 0.447 และ RC = 0.289 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงความยาวของกิ่ง (branch length) และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap support (%BS) จาก 1,000 ซ้ำ

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ค้นพบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus* sp.) ที่มีรูปร่างของซีสต์ค่อนข้างกลม มีขนาดใหญ่และมีลักษณะพิเศษที่สำคัญซึ่งแตกต่างไปจากเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่เคยค้นพบในประเทศไทยคือ มีลักษณะของ excretory bladder แตกแขนงหลายแขนง (dendritic shape) ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะที่พบในพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* ซึ่งมีรายงานการค้นพบในมณฑลเสฉวน (Ts' ao; & Chung. 1965: 252-255) และในมณฑลยูนนาน (Wang; et al. 2002: 62-64) สาธารณรัฐประชาชนจีน ดังนั้นจากผลการตรวจสอบสปีชีส์เบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรีย สามารถบ่งชี้ได้ว่าพยาธิใบไม้ปอดที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้คือ *P. paishuihoensis* และงานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ *P. paishuihoensis* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย

จากการเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของเมตาเซอร์คาเรีย (รูปร่าง ขนาด จำนวนชั้นของผนังซีสต์) ระหว่าง *P. paishuihoensis* ที่พบในจังหวัดจันทบุรีกับในมณฑลเสฉวนและมณฑลยูนนานสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากโดยเฉพาะการมี excretory bladder ที่มีลักษณะแตกแขนงหลายแขนง แต่อย่างไรก็ดียังมีลักษณะบางประการที่แตกต่างกัน เช่น ความหนาของผนังซีสต์ชั้นนอกของ *P. paishuihoensis* ที่พบในมณฑลเสฉวนมีความหนาโดยเฉลี่ย 9.6 ไมโครเมตร ส่วนที่พบในมณฑลยูนนานและจังหวัดจันทบุรีมีความหนาโดยเฉลี่ย 4.8 และ 4.6 ไมโครเมตร ตามลำดับ และความหนาของผนังซีสต์ชั้นในพบว่า *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนานมีความหนาเฉลี่ยมากที่สุดคือ 12.5 ไมโครเมตร ส่วนที่พบในมณฑลเสฉวนกับจันทบุรีจะมีความหนาที่ใกล้เคียงกันคือ 4.2 และ 3.37 ไมโครเมตร ตามลำดับ

จากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสปีชีส์ของปูน้ำตกที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของ *P. paishuihoensis* ที่พบในประเทศไทยคือ *Potamon boonyaratae* ส่วนสปีชีส์ของปูน้ำตกที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของ *P. paishuihoensis* ที่พบในมณฑลเสฉวนและยูนนานคือ *Potamon denticulatus* และ *Potamon chinghungense* ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปูน้ำตกที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของ *P. paishuihoensis* จากทั้ง 3 บริเวณนั้นอยู่ในจีนัสเดียวกัน

จากการทดลองเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยของ *P. paishuihoensis* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลปรากฏว่าไม่พบการติดพยาธิ *P. paishuihoensis* ในหนู ส่วนในแมวมีการตรวจพบเฉพาะพยาธิระยะ immature เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ในสาธารณรัฐประชาชนจีน (Ts' ao; & Chung. 1965: 252-255) และเป็นไปได้ว่าหนูและแมวอาจจะไม่ใช่โฮสต์สุดท้ายที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้

ในการอธิบายความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตภายในสปีชีส์ (intraspecific variation) และระหว่างสปีชีส์ (interspecific variation) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบริเวณบางส่วนของยีน COI จะพิจารณาจากจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน กล่าวคือถ้าเป็นความแตกต่างในระดับ intraspecific variation จะมีความต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1-10 ตำแหน่ง (สำหรับบริเวณ ITS2) และ 1-46 ตำแหน่ง (สำหรับบริเวณบางส่วนของยีน COI) แต่ถ้าสิ่งมีชีวิตนั้นมีความแตกต่างในระดับ interspecific variation จะมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันอยู่ในช่วง 6-48 ตำแหน่ง (สำหรับบริเวณ ITS2) และ 30-81 ตำแหน่ง (สำหรับบริเวณบางส่วนของยีน COI) (Iwagami; et al. 2003: 239-245; Park; Im; & Yong. 2003: 47-55; Sugiyama; et al. 2002: 229-234) จากผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีกับมณฑลยูนนานพบว่ามีจำนวนนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 3 ตำแหน่ง (0.82%) ส่วนในบริเวณบางส่วนของยีน COI มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 11 ตำแหน่ง (2.91%) ซึ่งค่าความต่างที่ได้นี้อยู่ในช่วงที่ถือว่าเป็นความต่างในระดับ intraspecific variation ดังนั้นหากพิจารณาจากเกณฑ์ข้างต้นที่กล่าวมาแล้วจึงสามารถสรุปได้ว่าพยาธิใบไม้ปอดที่พบจากจังหวัดจันทบุรีกับมณฑลยูนนานเป็นสปีชีส์เดียวกัน

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI พบว่า *P. paishuihoensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cui และคนอื่น ๆ ในปี ค.ศ. 2003 (Cui; et al. 2003: 27-30) อย่างไรก็ดีจากผลการศึกษาครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่า phylogenetic tree ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบริเวณบางส่วนของยีน COI นั้น มีค่าของข้อมูลบางอย่างแตกต่างกัน เช่น บริเวณบางส่วนของยีน COI ถึงแม้ว่าจะมีค่า informative character (24.2%) สูงกว่าประมาณสองเท่าของบริเวณ ITS2 (12.58%) แต่ก็มีค่า homoplasy index (HI= 0.354) สูงกว่า ITS2 (HI= 0.144) ด้วย ซึ่งระดับการเกิด homoplasy ที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานในพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma* (Bowles; Blair; & McManus. 1995: 103-109) ส่งผลให้ phylogenetic tree ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือมากกว่า นอกจากนี้ยังพบค่าเฉลี่ยของ G+C content ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 (55.1%) สูงกว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากบางส่วนของยีน COI (41.2%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน *P. westermani, P. miyazakii* และ *P. ohirai* โดยพบว่าพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 3 สปีชีส์มีค่าเฉลี่ยของ G+C content ที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 เท่ากับ 54.5% ส่วน ค่าเฉลี่ยของ G+C content ที่ได้จากบางส่วนของยีน COI เท่ากับ 49% (Iwagami; et al. 2000: 315-322) นอกจากนี้ถ้าพิจารณารูปแบบการเกิดมิวเทชันจะพบว่าในบริเวณ ITS2 มีการเกิด indel (17 indel) สูงกว่าบริเวณบางส่วนของยีน COI (1 indel) ซึ่งตรงกันข้ามกับอัตราการเกิดtransition/transversion ที่แสดงว่าบริเวณบางส่วนของยีน COI (3.96) เกิดขึ้นสูงกว่าบริเวณ ITS2 (3.50)

ข้อเสนอแนะ

การค้นพบพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* ในจังหวัดจันทบุรีนับว่าเป็นการบันทึกครั้งใหม่ (new record) ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ที่ 8 ในประเทศไทย รายละเอียดเกี่ยวกับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้ยังมีรายงานค่อนข้างน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของพยาธิตัวเต็มวัย สัตว์ที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง และโฮสต์จำเพาะ รวมถึงข้อมูลที่เกี่ยวกับการก่อโรคในมนุษย์ด้วย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

เดชา ศรีสนธิ์; จิตรา ไวคกุล; และ สนั่น แย้มพุฒ. (2540). *พยาธิใบไม้ปอด*. กรุงเทพฯ: ลิฟวิ่ง ทรานส์ มีเดีย.

ไพบูลย์ นัยเนตร. (2531). ปูน้ำจืดในประเทศไทย. ใน *อนุสรณ์งานพระราชทานเพลิงศพรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประพันธ์ จิตต์จำนงค์*. หน้า 178-200.

ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง. (2551). *ระบบฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและทรัพยากรทางทะเล ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา กลุ่มทรัพยากร : สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง: สัตว์กลุ่มหอย*. สืบค้นเมื่อ 15 มกราคม 2554, จาก http://www.smcrrc.go.th/songkhlalake_ShellGroup.html

สมพงษ์ สิทธิพรหม. (2544). *ภาพตัวอย่างหอยบกและหอยน้ำจืดในเขตอุทยานแห่งชาติภูพาน.* สืบค้นเมื่อ 15 มกราคม 2554, จาก http://www.champa.kku.ac.th/somphong/snail.htm

อัจฉริยา รังษิรุจิ; และคนอื่น ๆ . (2547). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์.* 3(3): 195-206.

Baker, J.R.; Muller, R.; & Rollinson, D. (1999). Paragonimiasis and the Genus *Paragonimus*. In *Advances in Parasitology*. p. 117.

Blair, D.; et al. (1997). Geographical Genetic Structure within the Human Lung Fluke, *Paragonimus westermani*, Detected from DNA Sequences. *Parasitology*. 115: 411-417.

Blair, D.; Agatsuma, T.; & Watanobe, T. (1997). Molecular Evidence for the Synonymy of Three Species of *Paragonimus*, *P. ohirai* Miyazaki, 1939, *P. iloktsuenensis* Chen, 1940 and *P. sadoensis* Miyazaki et al., 1968. *Journal of Helminthology*. 71: 305-310.

Blair, D.; et al. (1998). Phylogenetic relationships among the Thai species of *Paragonimus* inferred from DNA sequences. In *IX International Congress of Parasitology* (*ICOPA IX*). pp. 643-647. Japan: Makuhan Messe Chiba.

Blair, D.; Xu, ZB.; & Agatsuma, T. (1999). Paragonimiasis and the Genus *Paragonimus*. In *Advances in Parasitology*, V. 42. J.R. Baker, R. Muller and D. Rollinson, (eds). pp. 113-222. London: Academic Press.

Bowles, J.; et al. (1993). Nuclear and Mitochondrial Genetic Marker Highly Conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma Japonicum*. *Acta Tropica*. 55: 217-229.

Bowles, J.; Blair, D.; & McManus, D.P. (1995). A Molecular Phylogeny of the Human Schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 4: 103-109.

Bunnag, D.; & Harinasuta, J. (1984). Opisthorchiasis and Paragonimiasis. In *Tropical and Geographical Medicine*. K.S. Werren and A.A.F. Mahmoud, (eds). pp. 465-470. NewYork: Mcgraw-Hill.

Bunnag, D.; & Harinasuta, J. (1989). Liver, Lung and Intestinal Trematode Diseases. In *Tropical Medicine and Parasitology*. R. Goldsmith and D. Heyneman, (eds). pp. 459-477. East Norwalk, CT: Appleton and Lange.

Cui, A.L.; et al. (2003). Taxonomic Status in DNA Sequences of Five Species of Genus *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases.* 2(21): 27-30. [Chinese with English abstract]

Doanh, P.N.; et al. (2009a). Discovery of *Paragonimus westermani* in Vietnam and Its Molecular Phylogenetic Status in *P. westermani* complex. *Parasitology Research.* 104: 1149-1155.

Doanh, P.N.; et al. (2009b). Morphological Differences and Molecular Similarities between *Paragonimus bangkokensis* and *P. harinasutai*. *Parasitology Research*. 105: 429-439.

Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.

Gerbi, J.A. (1985). Evolution of ribosomal DNA. In *Molecular Evolutionary Genetics*. R.J. MacIntyre, (ed). New York: Plenum.

Hong, S.J. (2003). *The Korean Society for Parasitology*. Retrieved January 20, 2011, from http://atlas.or.kr/atlas/include/viewImg.html?uid=469

Iwagami, M.; et al. (2000). Molecular Phylogeographic Studies on *Paragonimus westermani* in Asia. *Journal of Helminthology*. 74: 315-322.

Iwagami, M.; et al. (2003). Identities of Two *Paragonimus* Species from Sri Lanka Inferred from Molecular Sequences. *Journal of Helminthology*. 77: 239-245.

Iwagami, M.; et al. (2009). The First Intermediate Host of *Paragonimus westermani* in Sri Lanka. *Acta Tropica*. 109: 28.

Jeanmougin, F.; et al. (1998). Multiple Sequence Aligment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences*. 23: 403-405.

Li, Y.S. (1999). Species Index Table for the Adult and Metacercaria of Chinese *Paragonimus*. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology*. 7: 59-62. [Chinese with English abstract]

Miyazaki, I. (1974). Lung Flukes in the World: Morphology and Life History. In *Proceedings of a Symposium on Epidemiology of Parasitic Diseases*. M. Sasa., H. Tanaka and T. Kurihara., (eds). pp. 101-135. Tokyo: Parasitic Diseases, International Medical Foundation of Japan.

Miyazaki, I. (1991). Paragonimiasis. In an Illustrated Book of *Helminthic Zoonoses*. I. Miyazaki, (ed). pp. 76-146. Tokyo, Japan: International Medical Foundation of Japan.

Morin, A.; & Houseman, J. (2010). *Biodidac*. Retrieved November 10, 2010, from http:// biodidac.bio.uottawa.ca/Thumbnails/showimage.cfm?File_name=Trem010b&File_type=gif

Nawa, Y.; & Doanh, P.N. (2009). *Paragonimus bangkokensis* and *P. harinasutai*: Reappraisal of Phylogenetic Status. *Tropical* Medicine and *Parasitology*. 32: 87-96.

Park, G.M.; Im, K.I.; Yong, T.S. (2003). Phylogenetic Relationship of Ribosomal ITS2 and Mitochondrial COI among Diploid and Triploid *Paragonimus westermani* Isolates. *Korean Journal of Parasitology*. 41(1): 47-55.

Parasitology. (2008). Retrieved November 10, 2010, from http:// picasaweb.google.com/lh/ photo/T7c0iUTU_uuDOWzdisiIcg

Philip, E.S. P. (2010). *The Imaging of Tropical Diseases*. Retrieved October 22, 2010, from www.isradiology.org/tropical_deseases/tmcr/chapter22/geographical.htm

Prommas, G. (1928). Paragonimiasis, Opistorchiasis and Madura Foot. *Medical Association of Thailand*. 11: 67-77.

Richard, H. (2010). *Parasitology*. Retrieved November 10, 2010, from http: //pathmicro. med.sc.edu/parasitology/papa1-pd.jpg

Sato, Y.; et al. (2003). Phylogenetic Status of a Lung Fluke in the Philippines Based on Mitochondrial Genome. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 31(1): 1-3.

Schlotterer, C.; et al. (1994). Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in *Drosophila*. *Molecular Biology*. 11(3): 513-522.

Shih, H.T. (2006). *Diversity of the Freshwater Crabs from the Ryukyus and Japan.* Retrieved January 20, 2011, from http://web.nchu.edu.tw/~htshih/crab/list_cb/ Varuna_litterata.htm

Shih, H.T. (2008). *Diversity of the Freshwater Crabs from the Ryukyus and Japan.* Retrieved January 20, 2011, from http://web.nchu.edu.tw/~htshih/crab_fw/list_fwc /Geothelphusa_dehaani.htm

Sugiyama, H.; et al. (2002). Polymerase Chain Reaction (PCR)-based Molecular Discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the Metacercarial Stage. *Molecular and Cellular Probes*. 16(3): 229-234.

Swofford, D.L. (1998). *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods)*. Version 4. Sunderland, Massachusettes: Sinauer Associates.

Tandon, V.; et al. (2007). Surface Fine Topography and PCR-based Determination of Metacercaria of *Paragonimus* sp. from Edible Crabs in Arunachal Pradesh, Northeast India. *Parasitology Research*. 102: 21-28.

Thaenkham, U.; & Waikagul, J. (2008). Molecular Phylogenetic Relationship of *Paragonimus pseudoheterotremus*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 39: 217-221.

Ts' ao, W.C.; & Chung, H.L. (1965). Preliminary Observations on Metacercaria Cysts, Excysted Metacercariae and Adoleslescent Worm of a New Species of Lung Fluke *Paragonimus paishuihoensis* sp. nov. Discovered in P'enghsien in Szechuan Province. *Acta Parasitological Sinica*. 2(3): 252-255. [Chinese with English abstract]

Vajrasthira, S. (1969). Paragonimiasis in Thailand. In *Proceedings of the Fourth Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine, Schistosomiasis and other snail-transmitted helminthiasis.* C. Harinasuta, (ed). pp. 299-304. Bangkok: Watana Panich.

Vanijanonta, S.; Bunnag, D.; & Harinasuta, T. (1984). *Paragonimus heterotremus* and Other *Paragonimus* spp. in Thailand: Pathogenesis, Clinic and Treatment. *Arzneimittelfors-chung*. 34(9): 1186-1188.

Waikagul, J.; & Yoonuan, T. (2005). *Paragonimus* and Paragonimiasis in Thailand. In *Asian Parasitology*. N. Arizono.; et al., (eds). pp.139-148. China: FAB Journal Ltd.

Waikagul, J. (2007). A new Species of *Paragonimus* (Trematoda: Troglotrematidae) from a Cat Infected with Metacercariae from Mountain Crabs *Larnaudia larnaudii*. *Journal of Parasitology*. 93(6): 1496-1500.

Wang, W.L.; et al. (2002). Investigation and Observation on *Paragonimus paishuihoensis* in Mengla County, Yunnan Province. *Endemic Diseases Bulletin*. 17(2): 62-64. [Chinese with English abstract]

Wikipedia. (2011). *Red-rimmed melania*. Retrieved January 15, 2011, from http://en.wikipedia.org/wiki/Red-rimmed_melania

Zaman, V. (1984). *Atlas of Medical Parasitology*. 2nd ed. Singapore. PG Publish Pte.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก 1 Sequence divergence matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2

Species	**origin**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 *P. paishuihoensis*	Thailand (Chanthaburi)	-									
2 *P. paishuihoensis*	China (Yunnan)	0.00276	-								
3 *P. bangkokensis*	Thailand	0.03111	0.03428	-							
4 *P. harinasutai*	Thailand	0.03402	0.03724	0.00276	-						
5 *P. heterotremus*	Thailand	0.09281	0.09683	0.07978	0.08302	-					
6 *P. pseudoheterotremus*	Thailand	0.09276	0.09677	0.07974	0.08296	0.00000	-				
7 *P. macrorchis*	Thailand	0.10947	0.11378	0.09941	0.10279	0.06761	0.06760	-			
8 *P. westermani*	Thailand	0.12241	0.12306	0.11545	0.11890	0.10277	0.10286	0.13034	-		
9 *P. siamensis*	Thailand	0.13934	0.12935	0.12867	0.13220	0.11222	0.11235	0.13671	0.05789	-	
10 *Fasciola hepatica*	Australia	0.24334	0.24090	0.22461	0.22883	0.23055	0.23046	0.26111	0.25420	0.24550	-

ตารางภาคผนวก 2 Pairwise differences ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2

Species	origin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 *P. paishuihoensis*	Thailand (Chanthaburi)	-	1	11	12	31	31	36	40	45	73
2 *P. paishuihoensis*	China (Yunnan)	1/0	-	12	13	32	32	37	40	42	72
3 *P. bangkokensis*	Thailand	9/2	10/2	-	1	27	27	33	38	42	68
4 *P. harinasutai*	Thailand	10/2	11/2	1/0	-	28	28	34	39	43	69
5 *P. heterotremus*	Thailand	24/7	25/7	20/7	21/7	-	0	23	34	37	69
6 *P. pseudoheterotremus*	Thailand	24/7	25/7	20/7	21/7	0/0	-	23	34	37	69
7 *P. macrorchis*	Thailand	27/9	28/9	24/9	25/9	17/6	17/6	-	42	44	76
8 *P. westermani*	Thailand	32/8	32/8	30/8	31/8	27/7	27/7	33/9	-	20	75
9 *P. siamensis*	Thailand	35/10	32/10	32/10	33/10	28/9	28/9	33/11	16/4	-	73
10 *Fasciola hepatica*	Australia	45/28	45/27	40/28	41/28	43/26	43/26	48/28	48/27	46/27	-

หมายเหตุ ตัวเลขเหนือแนวทแยงมุมแสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน ตัวเลขใต้แนวทแยงมุม แสดงอัตราการเกิด transition/transversion

ตารางภาคผนวก 3 Sequence divergence matrix ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI

Species	origin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 *P. paishuihoensis*	Thailand (Chanthaburi)	-									
2 *P. paishuihoensis*	China (Yunnan)	0.02995	-								
3 *P. bangkokensis*	Thailand	0.12701	0.14430	-							
4 *P. harinasutai*	Thailand	0.14930	0.14908	0.07173	-						
5 *P. heterotremus*	Thailand	0.18483	0.17794	0.14152	0.12491	-					
6 *P. pseudoheterotremus*	Thailand	0.19545	0.20406	0.17580	0.16521	0.11650	-				
7 *P. macrorchis*	Thailand	0.20848	0.23729	0.16199	0.17247	0.12710	0.14678	-			
8 *P. westermani*	Thailand	0.18329	0.19061	0.18787	0.20376	0.18384	0.20216	0.22630	-		
9 *P. siamensis*	Thailand	0.18613	0.19042	0.21614	0.19710	0.18767	0.20913	0.18620	0.16508	-	
10 *Fasciola hepatica*	Australia	0.26512	0.29083	0.26210	0.25395	0.22791	0.25946	0.23570	0.30447	0.24338	-

ตารางภาคผนวก 4 Pairwise differences ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI

Species	origin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 *P. paishuihoensis*	Thailand (Chanthaburi)	-	11	43	49	60	63	66	60	61	83
2 *P. paishuihoensis*	China (Yunnan)	9/2	-	48	49	58	65	73	62	62	89
3 *P. bangkokensis*	Thailand	30/13	35/13	-	25	48	58	54	61	69	82
4 *P. harinasutai*	Thailand	38/11	38/11	23/2	-	43	55	57	65	64	80
5 *P. heterotremus*	Thailand	37/23	37/21	24/24	19/24	-	39	43	60	61	73
6 *P. pseudoheterotremus*	Thailand	39/24	43/22	31/27	28/27	32/7	-	49	65	67	81
7 *P. macrorchis*	Thailand	43/23	50/23	28/26	29/28	27/16	30/19	-	71	61	75
8 *P. westermani*	Thailand	36/24	38/24	38/23	42/23	35/25	39/26	44/27	-	54	92
9 *P. siamensis*	Thailand	32/29	35/27	37/32	32/32	33/28	36/31	29/32	37/17	-	77
10 *Fasciola hepatica*	Australia	33/50	41/48	33/49	29/51	26/47	35/46	28/47	44/48	30/47	-

หมายเหตุ ตัวเลขเหนือแนวทแยงมุมแสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน ตัวเลขใต้แนวทแยงมุม แสดงอัตราการเกิด transition/transversion

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

Alignment

การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ชุดหรือมากกว่า พร้อมทั้งตรวจหาความเหมือนและความต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น ๆ

Bootstrap

วิธีการที่ใช้ตรวจสอบความสอดคล้องกันระหว่างชุดข้อมูลกับแบบจำลองที่ได้ เช่น การตรวจสอบความถูกต้องของ phylogenetic tree ที่พยากรณ์ไว้โดยการสุ่มตัวอย่างคอลัมน์ของลักษณะในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาเพื่อสร้างข้อมูลใหม่และนำตัวอย่างคอลัมน์เหล่านั้นกลับไว้ที่ชุดข้อมูลเดิม (sampling with replacement) และสร้าง phylogenetic tree จากชุดข้อมูลที่ได้ใหม่นี้ การทำ bootstrap นิยมสุ่มตัวอย่างคอลัมน์เพื่อสร้างชุดข้อมูลใหม่จำนวน 1,000 ชุด จากนั้นทำการตรวจสอบความเชื่อมั่นของกิ่ง (branch) ที่ปรากฏใน phylogenetic tree ใหม่ที่ได้ในแต่ละครั้ง

Cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene

ยีนหนึ่งที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์ cytochrome *c* oxidase ซึ่งพบที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และทำหน้าที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอน

DNA sequencing

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA โดยอาศัยหลักการของ Sanger

Internal transcribed spacer 2 (ITS2)

DNA บริเวณ non-coding ที่อยู่ระหว่าง 5.8S rDNA และ 28S rDNA

Parsimony

วิธีการสร้าง phylogenetic tree ตามหลักเกณฑ์ของคลาดิสติกส์ (cladistics) ซึ่งอาศัยหลักการของการลดจำนวนของเหตุการณ์ที่จำเป็นในการสร้าง phylogenetic tree ดังนั้น phylogenetic tree ที่ดีที่สุดจึงมีจำนวนการเปลี่ยนแปลงของสถานะของลักษณะน้อยที่สุด เช่น การเกิดมิวเทชัน (mutation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาน้อยที่สุด

Phylogenetic tree

ต้นไม้แห่งวิวัฒนาการที่แสดงการจัดกลุ่มและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต

Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA โดยให้ oligonucleotide primer ไปจับที่ตำแหน่งใกล้กับบริเวณ DNA ที่สนใจ เทคนิคนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ denaturation, annealing และ extension

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาววิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์
วันเดือนปีเกิด	4 ธันวาคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	281/4 หมู่ 7 ตำบลร่อนพิบูลย์ อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80130
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ครู ค.ศ.1
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนภูเก็ตวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2545	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช
พ.ศ.2549	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
พ.ศ.2550	ประกาศนียบัตรบัณฑิต จาก มหาวิทยาลัยทักษิณ
พ.ศ.2554	การศึกษามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ