

การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus heterotremus*) โดยใช้
18S small subunit และ internal transcribed spacer region ของ nuclear rDNA

ปริญญานิพนธ์
ของ
อาชว์ดาม์ กันสิทธิ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
มีนาคม 2544
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๒๐๑.๒๑๑

๐๒๒๒๐

๑๐

การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus heterotremus*) โดยใช้
18S small subunit และ internal transcribed spacer region ของ nuclear rDNA

บทคัดย่อ

ของ

อาชว์ดาม์ กันสิทธิ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

มีนาคม ๒๕๔๔

๒๐๑.๒๑๑

อาชว์ดาม์ กันสิทธิ์. (2544), การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus heterotremus*) โดยใช้ 18S small subunit และ internal transcribed spacer region ของ nuclear rDNA. ปรินูญานินพนธ์ กศ.ม (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ดร.อัคริยา รังษิรุจิ, รองศาสตราจารย์ ดร. โกสมุ จันทรศิริ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์พันธุ์สิน เกตุทัต.

Paragonimus heterotremus ก่อให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ปอด (paragonimiasis) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น คน ลิง สุนัข แมว และกระต่าย ในประเทศไทยมีรายงานพบพยาธิใบไม้ปอดชนิดนี้ในจังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน พะเยา โลก ดาก เพชรบูรณ์ สระบุรี และนครนายก การศึกษาครั้งนี้เน้นการหาลำดับเบสของ ribosomal DNA บริเวณ internal transcribed spacer 2 (ITS2) และ 18S ของ *P. heterotremus* จากตัวเต็มวัย ซึ่งได้จากการทำให้เกิดการติดเชื้อในแมว ผลการศึกษาพบว่าลำดับเบสของบริเวณ ITS2 มีความยาว 361 bp และ 18S มีความยาว 1,897 bp ต่อจากนั้นได้ทำ sequence alignment ของ ITS2 ของ *P. heterotremus* เทียบกับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆด้วยโปรแกรม ClustalW แล้วจึงสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม PHYLIP version 3.573c และจาก consensus tree ที่ได้พบว่า *P. heterotremus* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับ *P. macrorchis* (bootstrap value 49.1%) ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ปอดที่เก็บตัวอย่างจากประเทศไทย เช่นเดียวกันกับบริเวณ 18S ซึ่งได้นำมาทำ sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW เทียบกับพยาธิใบไม้จิ้งจอกต่างๆใน Subclass Digenea และ Subclass Cestoda และจึงสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม PHYLIP version 3.573c ซึ่งจาก consensus tree ที่ได้พบว่า *P. heterotremus* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับ *Dicrocoelium dendriticum* (bootstrap value 100%) ซึ่งทั้งสองจิ้งจอกจัดอยู่ใน Superfamily Plagiorchioidea

MOLECULAR STUDY OF PARAGONIMUS HETEROTREMUS BASED ON 18S SMALL
SUBUNIT AND THE INTERNAL TRANSCRIBED SPACER REGION OF NUCLEAR
rDNA

AN ABSTRACT
BY
ARDA KUNSIT

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Biology
March 2001

Arda Kunsit. (2001). *Molecular study of Paragonimus heterotremus based on 18S small subunit and the internal transcribed spacer region of nuclear rDNA*. Master Thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Achariya Rangsiruji , Assoc. Prof. Dr.Kosum Chansiri, Assist. Prof. Punsin Ketudat.

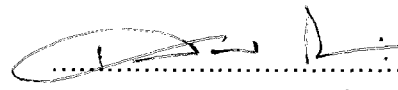
Paragonimus heterotremus is the causative lung fluke agent for paragonimiasis. In Thailand, there have been reports of paragonimiasis cases in Chiang Rai, Mae Hong Son, Phitsanulok, Tak, Petchaboon, Saraburi and Nakhon Nayok. The definitive hosts of *P. heterotremus* are mammals such as human, monkey, dog, cat and rabbit. In this study, adult parasites were isolated from two infected cats. Then DNA extraction was carried out prior to PCR amplification using specific primers for the internal transcribed spacer 2 region (ITS2) and 18S ribosomal DNA. PCR products of ITS2 (361 bp) and 18S (1,897 bp) were obtained and sequenced. The nucleotide sequences of ITS2 and 18S were aligned against those of other organisms using ClustalW program. Phylogenetic analyses were accomplished using PHYLIP version 3.573c program. The consensus tree obtained from ITS2 data revealed that *P. heterotremus* was closely related to *P. macrorchis* (bootstrap value 49.1%). In addition, based on 18S data the consensus tree showed that *P. heterotremus* was closely related to *Dicrocoelium dendritium* (bootstrap value 100%). Both *Paragonimus* and *Dicrocoelium* belong to Superfamily Plagiorchioidea.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

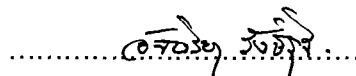
การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus heterotremus*) โดยใช้
18S small subunit และ internal transcribed spacer region ของ nuclear rDNA

ของ
นางสาวอาชว์ดาม์ กันสิทธิ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

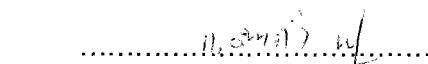
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)
วันที่ ๑ มีนาคม พ.ศ. 2544

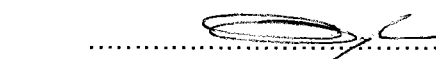
คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

..... ประธาน
(ดร. อัจฉรียา รุ่งโรจน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. โกสุม จันทรศิริ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันธุสิน เกตุทัต)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กรองแก้ว พุทธิยาสถาพร)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ และแนะนำอย่างดียิ่ง
จาก ดร.อัจฉริยา รั้งขจรจิ, รศ.ดร.โกสุม จันทร์ศิริ และผศ.พันธุ์สิน เกตุทัต ผู้วิจัยขอกราบ
ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย-
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และ
สารเคมี

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา ตลอดจนสามีและลูกที่เฝ้ากำลังใจมาโดยตลอด

อาชว์ดาม์ กันสิทธิ์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	10
ความสำคัญของการวิจัย	10
ขอบเขตของการวิจัย	10
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
3 วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	17
อุปกรณ์และสารเคมี	17
วิธีดำเนินการ	20
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	31
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	58
สรุปผลการศึกษาค้นคว้า	58
อภิปรายผล	64
ข้อเสนอแนะ	66
บรรณานุกรม	67
ประวัติย่อผู้วิจัย	73

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ขนาด (base pairs หรือ bp) ของบริเวณ ITS1, ITS2 และ 18S ของพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ.....	13
2	GenBank accession number ของ ITS2 ในพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ.....	13
3	GenBank accession number ของ COI ในพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ.....	15
4	เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	17
5	สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	18
6	วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	19
7	ส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ ITS2.....	24
8	ส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ 18S.....	27
9	ส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ ITS1.....	28
10	GenBank accession number ของ ITS2 ของพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ ที่นำมาทำ sequence alignment กับ <i>P. heterotremus</i>	29
11	GenBank accession number ของ 18S ของพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ ที่นำมาทำ sequence alignment กับ <i>P. heterotremus</i>	30
12	ผลการศึกษาเมตาเซอรัลในปลาที่เก็บตัวอย่างจากน้ำตกเจ็ดคด จังหวัดสระบุรี.....	33
13	ส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ ITS1 โดยใช้ primers คู่ใหม่	41
14	ปริมาณเบส G+C ของบริเวณ ITS2 ของพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ	58
15	Homology ของลำดับเบสบริเวณ ITS2 ของพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ <i>P. heterotremus</i>	59
16	ปริมาณเบส G+C ของบริเวณ 18S ของพยาธิตัวแบนใน Subclass Digenea	61
17	Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S ของพยาธิตัวแบนในปลาชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ <i>P. heterotremus</i>	62

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 จังหวัดในประเทศไทยที่ตรวจพบพยาธิใบไม้ปอด	3
2 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด	5
3 ภาพวาดตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด <i>P. heterotremus</i>	6
4 ไข่ของพยาธิใบไม้ปอด <i>P. heterotremus</i>	7
5 เซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด	9
6 เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด <i>P. heterotremus</i>	10
7 บริเวณ ITS ที่พบในยูคาริโอท	11
8 การจัดเรียงตัวของ nuclear ribosomal DNA ที่พบในยูคาริโอท	12
9 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ ITS2 มีการคำนวณ distance matrix โดยใช้ Kimura 2-parameter model และ phylogenetic tree นี้สร้างขึ้นโดยวิธี neighbour-joining ในโปรแกรม TREECON (Peer and Wachter. 1993) มีการทำ bootstrap 1,000 ครั้ง และพบ bootstrap value บน branch ของ phylogenetic tree ซึ่งสามารถเทียบเป็นร้อยละ (%) ได้	14
10 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ COI มีการคำนวณ distance matrix โดยใช้ Kimura 2-parameter model และ phylogenetic tree นี้สร้างขึ้นโดยวิธี neighbour-joining ในโปรแกรม TREECON (Peer and Wachter. 1993) มีการทำ bootstrap 1,000 ครั้ง และพบ bootstrap value บน branch ของ phylogenetic tree ซึ่งสามารถเทียบเป็นร้อยละ (%) ได้	16
11 ปูน้ำตก <i>L. lamaudii</i>	31
12 เมตาเซอร์คาเรียของ <i>P. heterotremus</i>	31
13 เมตาเซอร์คาเรียของ <i>Paragonimus</i> sp.	32
14 เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิชนิดอื่น	32
15 แสดงผล PCR product ของ ITS2	33
16 ตัวเต็มวัยของ <i>P. heterotremus</i> ที่พบในแมวตัวที่ 2	34
17 แสดงผล PCR product ของ 18S ที่ได้จาก primer A และ primer B	35
18 แสดงผล PCR product ของ 18S ที่ได้จาก primer A และ primer C	37
19 แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จาก primer 3 และ primer 4	38

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
20	แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จากการ elute gel โดยเลือก band ขนาดประมาณ 700 bp	39
21	แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จากการ elute gel โดยเลือก band ขนาดประมาณ 1,500 bp	40
22	แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จาก primer 5 และ primer 6	42
23	แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS2 และ phylogenetic tree ซึ่งเป็น consensus tree นี้ได้มาจากการใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.573c โดยการทำ bootstrap 100 ครั้ง (โปรแกรม Seqboot) สร้าง phylogenetic tree โดยใช้ parsimony approach (โปรแกรม DNAPars) และหา consensus tree (โปรแกรม Consense) ค่า bootstrap (bootstrap value) แสดงบน branch ของ phylogenetic tree	60
24	แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ในจิ้งหรีดต่างๆ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 18S และ phylogenetic tree ซึ่งเป็น consensus tree นี้ได้มาจากการใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.573c โดยการทำ bootstrap 100 ครั้ง (โปรแกรม Seqboot) สร้าง phylogenetic trees โดยใช้ parsimony approach (โปรแกรม DNAPars) และหา consensus tree (โปรแกรม Consense) ค่า bootstrap (bootstrap value) แสดงบน branch ของ phylogenetic tree	63
25	การจัดหมวดหมู่ของ Phylum Platyhelminthes.....	65

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคพยาธิใบไม้ปอด (paragonimiasis) เป็นโรคเขตร้อนซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งของการสาธารณสุขในประเทศไทย ซึ่งจะมีอาการไอเรื้อรัง และมักมีเลือดปนออกมากับเสมหะ มีอาการคล้ายคลึงกับวัณโรคหรือฝีในท้อง (tuberculosis) จนทำให้บางครั้งการวินิจฉัยโรคผิดพลาดไป โรคพยาธิใบไม้ปอดเป็นโรคที่เกิดจากการมีตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดอาศัยอยู่ในเนื้อปอด และพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น เสือโคร่ง เสือดำ แมว ชะมด อีเห็น สุนัข สุนัขจิ้งจอก โค หนู ลิง และคน (Vajrasthira. 1986) พยาธิใบไม้ปอดพบในทุกทวีปทั่วโลก ซึ่งจากการสำรวจและคาดคะเนพบว่ามีคนเป็นโรคพยาธิใบไม้ปอดประมาณ 22 ล้านคน (WHO. 1993) ในปัจจุบันพยาธิใบไม้ปอดที่พบมีมากกว่า 30 ชนิด ส่วนมากพบในทวีปเอเชีย เขตเอเชียตะวันออก และในประเทศไทยมีรายงานว่าพบพยาธิใบไม้ปอด 6 ชนิด คือ *Paragonimus westermani*, *P. siamensis*, *P. heterotremus*, *P. bangkokensis*, *P. macrorchis* และ *P. harinasutai* แต่มีเพียง *P. heterotremus* ชนิดเดียวเท่านั้นที่พบว่าทำให้เกิดโรคในคน (Vajrasthira. 1986)

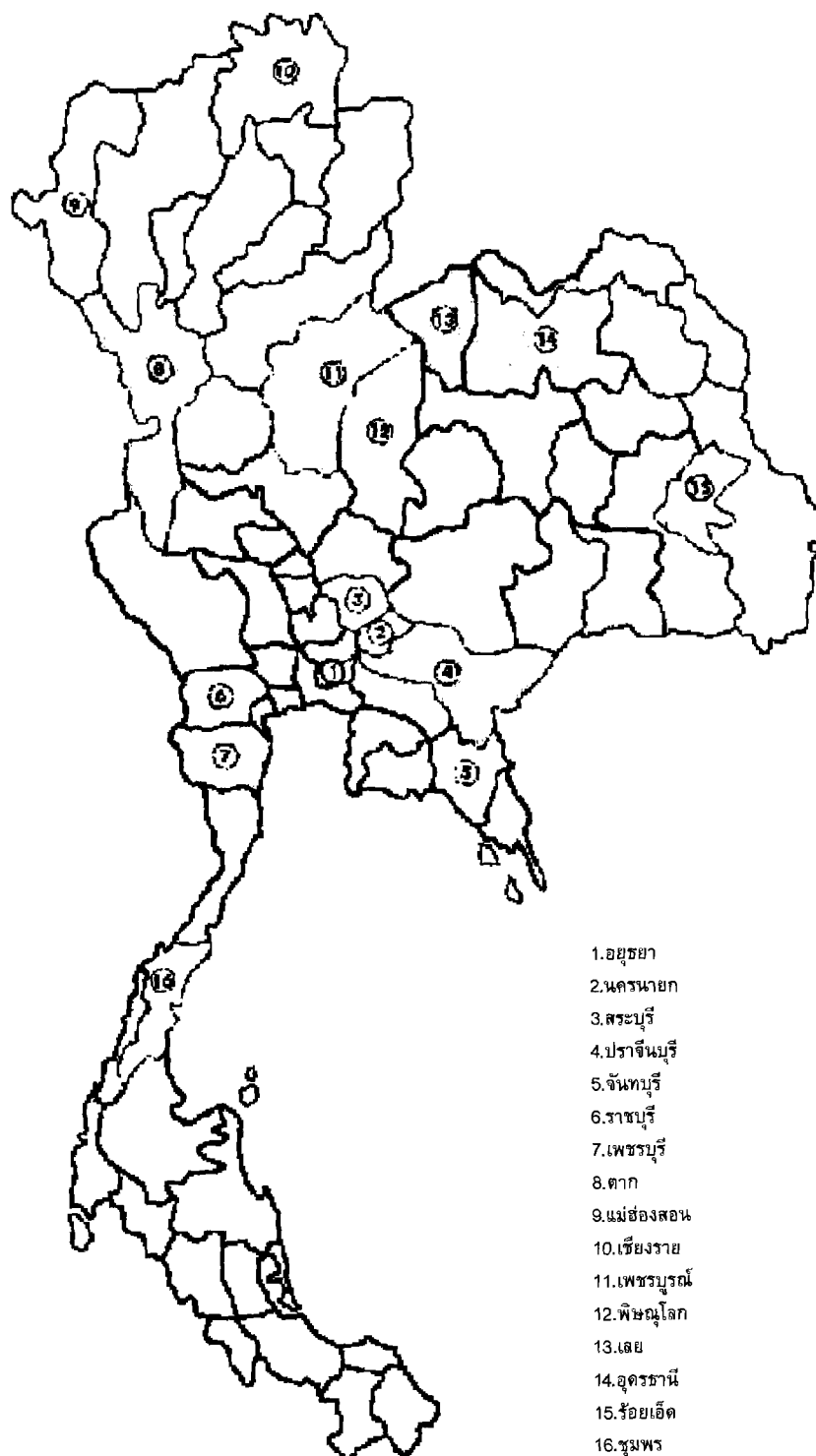
ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบพยาธิใบไม้ปอดได้ในทุกภาคของประเทศ (ภาพประกอบ 1) และพบเป็นครั้งแรก เมื่อปีพ.ศ. 2471 โดยผู้ป่วยรายแรกมาจากอำเภอลำสนัก จังหวัดเพชรบูรณ์ (Prommas. 1928) ส่วนทางภาคเหนือบริเวณที่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ปอดคือ จังหวัดเชียงราย ซึ่งมีรายงานว่าพบผู้ป่วยที่บ้านแม่ทา ตำบลท่าข้าวเปลือก อำเภอแม่จัน (Sutthipunthu, et al. 1978) และที่อำเภอมะนัง (Ratdilokpanich. 1980) ต่อมา มีรายงานว่าพบพยาธิใบไม้ปอดในผู้ป่วยชาวไทยกระเหรี่ยงที่โรงพยาบาลศรีสังวาลย์ จังหวัดแม่ฮ่องสอน (Ekarohit, et al. 1990)

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีรายงานว่าพบพยาธิใบไม้ปอดชนิด *P. siamensis* ในแมว และตรวจพบเมตาเซอร์คาเรียของ *P. siamensis* ในปูนาใน 5 จังหวัด คือ จังหวัดอุดรธานี ร้อยเอ็ด (Miyazaki and Wykoff. 1965) สกลนคร ขอนแก่น (Vajrasthira. 1969) และจังหวัดเลย (Pariyanonda, et al. 1997)

ในภาคกลางเมื่อปี พ.ศ. 2500 มีรายงานพบผู้ป่วยจากอำเภอนองแค้น จังหวัดสระบุรี (Harinasuta, T., Kratrachue, M., and Tandhanond, S. 1957) และจากการสำรวจโรคพยาธิใบไม้ปอดที่ อำเภอนองแค้น จังหวัดสระบุรี พบว่าเป็นแหล่งที่มีความชุกของโรค (Vajrasthira, S., Harinasuta, C., and Maiphoom, C. 1959) ต่อมาในปี พ.ศ. 2506 มีรายงานผู้ป่วยเพิ่มอีก 1 ราย จากจังหวัดนครนายก (Sirisumpan. 1962) และจากรายงานทั้งหมดนี้ตรวจพบเฉพาะไข่

ของพยาธิใบไม้ปอดในเสมหะผู้ป่วยเท่านั้น ไม่พบตัวพยาธิใบไม้ปอดเลย มียาซากิ และฮารินนา ชูทา ได้พบตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดจากก้อนเนื้อหน้าท้องของผู้ป่วยจากจังหวัดนครนายก ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเป็นพยาธิใบไม้ปอดชนิด *P. heterotremus* (Miyazaki and Harinasuta.1966) และในปี พ.ศ. 2524 มีรายงานพบตัวพยาธิในผู้ป่วยจากอำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก โดยในระหว่างให้ยา ผู้ป่วยไอออกมามีตัวเต็มวัย 2 ตัว เมื่อตรวจดูแล้วพบว่า เป็นพยาธิใบไม้ปอดชนิด *P. heterotremus* (Vanijanonta, et al. 1981) ต่อมาในปี พ.ศ. 2526 เตชะ ศรีสนธิ์ ได้รายงานพบผู้ป่วยจากโรงพยาบาลนครนายกซึ่งตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ปอด จากเสมหะ (Srisont. 1983) และในการสำรวจชุมชนในจังหวัดสระบุรีพบว่ามีผู้ป่วยเป็นโรค พยาธิใบไม้ปอด 66.5% จาก 315 ราย (Upatham, et al. 1995)

ทางภาคใต้มีรายงานว่าพบ *P. westermani* จากปอดเสือ (Daengsvang, S., Papasarathorn, T., and Tongkoom, B. 1963) โดยเสือนั้นถูกจับมาจากจังหวัดชุมพร นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเมตาเซอรค์าเรียของ *P. westermani* จากปูน้ำตกในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (Kawashima, K., Sugiyama, H., and Ketudat, P. 1989)



ภาพประกอบ 1 จังหวัดในประเทศไทยที่ตรวจพบพยาธิใบไม้ปอด

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าโรคพยาธิใบไม้ปอดเป็นโรคที่เป็นปัญหาหนึ่งของกระทรวงสาธารณสุขในประเทศไทย และพยาธิใบไม้ปอดที่เป็นปัญหาต่อคนไทยคือ *P. heterotremus*

การจำแนกหมวดหมู่ (classification) ของ *P. heterotremus* (Zaman. 1984)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Subclass Digenea

Order Prosostomata

Superfamily Plagiorchioidae

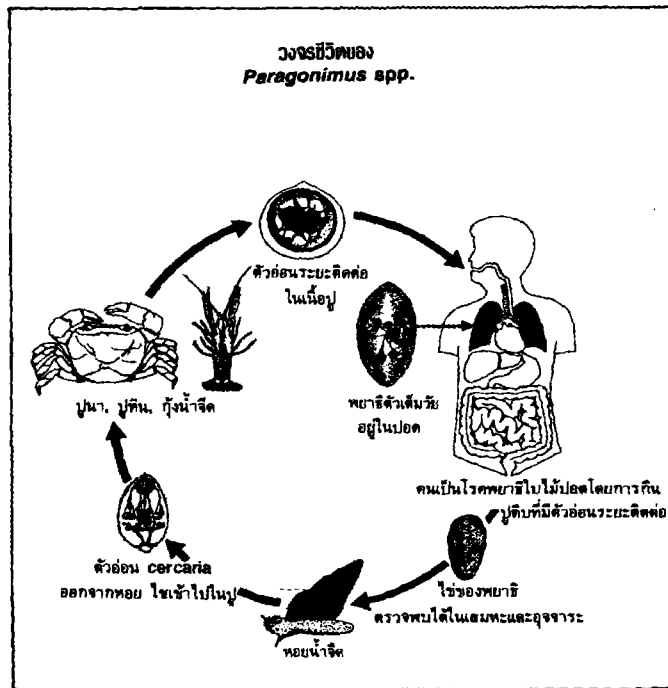
Family Troglotrematidae

Genus *Paragonimus*

Species *heterotremus*

วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด

วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด (ภาพประกอบ 2) แสดงการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลายขั้นตอนผ่านโฮสต์อย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ โฮสต์จำเพาะ (definitive host) คือ คน และสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของพยาธิตัวเต็มวัย โฮสต์กึ่งกลางชนิดที่หนึ่ง (first intermediate host) คือ หอยฝาดียวซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยและแพร่ขยายพันธุ์ของพยาธิระยะแรกๆ จนถึงระยะเซอร์คาเรีย และโฮสต์กึ่งกลางชนิดที่สอง (second intermediate host) คือ สัตว์พวกปู และกุ้งน้ำจืด ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของพยาธิระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรีย นอกจากนี้ยังมีสัตว์บางชนิดเป็นพวกพาราเทนิคโฮสต์ (paratenic host) ซึ่งเมื่อกินเมตาเซอร์คาเรียเข้าไป พยาธิจะไม่เจริญเป็นตัวเต็มวัยในปอด แต่จะเจริญเป็นตัวเจริญวัยในกล้ามเนื้อ และอวัยวะต่างๆ และเมื่อสัตว์นี้ถูกโฮสต์จำเพาะกินเป็นอาหาร พยาธิก็จะเจริญต่อไปเป็นตัวเต็มวัยในโฮสต์จำเพาะได้



ภาพประกอบ 2 วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ปอด

ลักษณะของพยาธิใบไม้ปอดแยกตามระยะการเจริญเติบโต

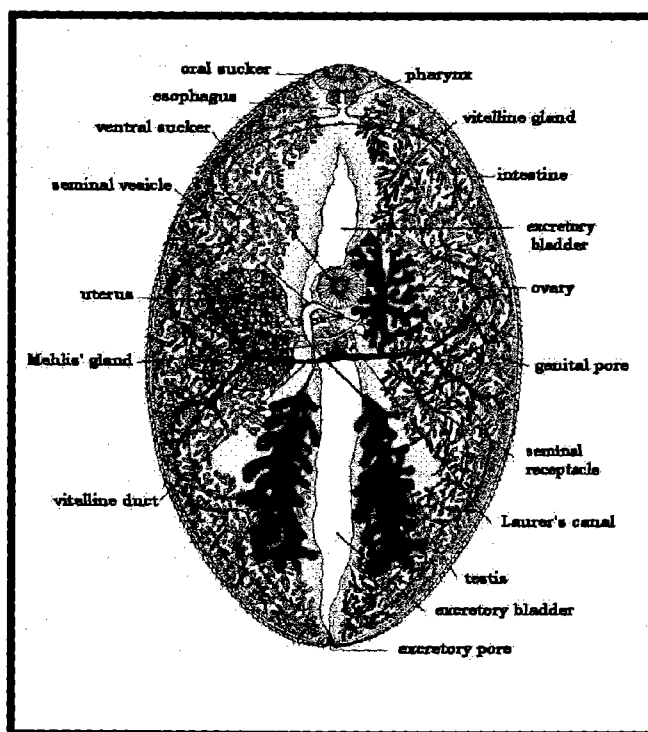
ตัวเต็มวัย (adult)

ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด (ภาพประกอบ 3) มีรูปร่างกลมรี คล้ายรูปไข่ ลำตัวปกคลุมด้วยหนามขนาดเล็ก มีเพศรวม พยาธิใบไม้ปอดมีอวัยวะสำหรับเกาะรอบปาก (oral sucker) อยู่ปลายสุดทางด้านหัว ปากเปิดเชื่อมกับ pharynx ซึ่งต่อกับหลอดอาหาร (oesophagus) ที่มีขนาดสั้น ก่อนจะแยกออกเป็นลำไส้ (caeca) สองแขนงซึ่งยาว และค่อนข้างใหญ่ ไม่เหยียดตรงแต่โค้งงอไปมาเป็นลูกคลื่นมีปลายตันสิ้นสุดที่ส่วนท้ายของลำตัวตรงบริเวณที่เปิดของเสีย (excretory pore) ที่บริเวณท้องประมาณกึ่งกลางลำตัวมีอวัยวะสำหรับเกาะ (ventral sucker) ไม่ไกลจากกันจะมีรังไข่ (ovary) ซึ่งต่อกับท่อนำไข่ที่มีขนาดสั้น และเชื่อมต่อกับถุงเก็บสะสมเชื้อเพศผู้ (seminal receptacle) มดลูก (uterus) มีลักษณะเป็นท่อนกลวงค่อนข้างสั้นอยู่บริเวณกลางลำตัว โดยส่วนต้นจะต่อกับถุงเก็บสะสมเชื้อเพศผู้ และมีช่องปล่อยไข่ออกสู่ภายนอกลำตัวตรงบริเวณใกล้กับขอบล่างของ ventral sucker ต่อมผลิตไข่แดง (vitelline glands หรือ vitellaria) มีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กมากมายกระจายอยู่สองข้างของลำตัวตั้งแต่ส่วนหัวจรดส่วนท้าย และมีท่อแขนงพุ่มขวางลำตัวเข้าหากันต่อกันเป็นท่อไข่แดง ท่อนี้เปิดเชื่อมกับส่วนต้นของท่อมดลูกซึ่งทำหน้าที่ผลิตไข่ (ootype) มีอัณฑะ (testis) สองอัน ซึ่งมีลักษณะแตกแขนงเป็นหลายแขนงอยู่ประมาณกึ่งกลางลำตัวท่อนหาง ระหว่างกระเพาะขับถ่ายของเสีย

(excretory bladder) กับลำไส้ อวัยวะแต่ละลูกจะมีท่อน้ำเชื้อเพศผู้ (sperm duct) เชื่อมต่อรวมกันตรงบริเวณรังไข่กับ ventral sucker และต่อกับท่อน้ำเชื้อเพศผู้ (ejaculatory duct) ซึ่งเปิดเชื่อมกับส่วนปลายของท่อมดลูกก่อนเปิดออกสู่ภายนอกทาง genital pore

กระเพาะขับถ่ายของเสียมีลักษณะเป็นท่อยาวมีรูเปิดออกสู่ภายนอกทางด้านปลายสุดของลำตัว อีกปลายหนึ่งของท่อขึ้นไปถึงลำตัวท่อนหัว และตรงระดับกลางลำตัวมีท่อรวมของเสียจากซีกซ้ายและซีกขวาของลำตัว ท่อแต่ละซีกจะแยกเป็นสองท่อ คือท่อหัวและท่อหาง และแต่ละท่อก็จะแตกแขนงอีกเป็นสี่แขนง ซึ่งแต่ละแขนงก็จะแยกเป็นแขนงย่อยอีกโดยแขนงย่อยสุดนี้ตรงปลายจะต่อกับแฟลเมเซลล์ (flame cell) ซึ่งรวมของเสียที่เป็นของเหลวเพื่อขับถ่ายออกนอกร่างกาย

ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อปอดของโฮสต์จำเพาะ จะอยู่ในซิสต์ (cyst) ซึ่งซิสต์หนึ่งอาจมีตั้งแต่ 1-6 ตัว แต่ส่วนมากมักจะมีซิสต์ละ 2 ตัว ตัวเต็มวัยเมื่อผสมพันธุ์แล้วจะออกไป



ภาพประกอบ 3 ภาพวาดตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด *P. heterotremus*

ไข่ (ovum)

ไข่ของพยาธิตัวแบน (ภาพประกอบ 4) มีรูปร่างรี สีเหลืองทอง เปลือกหนา ส่วนใหญ่จะมีลักษณะไม่สมคุลย์คือส่วนท้ายจะหนากว่าส่วนอื่นๆ ทางด้านฝา มีขนาดค่อนข้างกว้างกว่าด้านท้าย และมีฝาปิด (operculum) ค่อนข้างแบนกว้าง ไข่ของพยาธิตัวแบนมีขนาดยาวประมาณ 80-120 ไมครอน ขนาดกว้างประมาณ 48-60 ไมครอน ไข่จะออกมาพร้อมกับเสมหะ หรืออุจจาระของผู้ป่วย เมื่อไข่ออกจากโฮสต์จำเพาะมาสู่สิ่งแวดล้อมในตอนแรกนั้นจะยังไม่เจริญเต็มที่ จนกระทั่งเมื่อพบสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ไข่จึงจะมีการเจริญต่อไปเป็นระยะตัวอ่อนที่เรียกว่าไมราซิเดียมซึ่งจะฟักออกจากไข่ในที่สุด



ภาพประกอบ 4 ไข่ของพยาธิตัวแบน *P. heterotremus*

ไมราซิเดียม (miracidium)

การเจริญของไมราซิเดียมนี้ใช้เวลาประมาณ 15-25 วัน ที่อุณหภูมิประมาณ 25-32 °C ไมราซิเดียมจะมีขนาดประมาณ 80 x 40 ไมครอน มีขนรอบตัวสำหรับว่ายน้ำ ไมราซิเดียมสามารถว่ายน้ำอยู่ได้ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิของน้ำประมาณ 25 °C จนกว่าจะพบหอยฝาเดียวที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางชนิดที่ 1 เมื่อไมราซิเดียมว่ายน้ำไปพบหอยมันจะพยายามไชเข้าไปในช่องว่างระหว่างเปลือกหอยกับลำตัวหอย หลังจากนั้นไมราซิเดียมจะเจริญไปเป็นสปอโรซิสต์ (sporocyst) ภายใน 30-60 นาที ซึ่งบริเวณที่พบสปอโรซิสต์มากที่สุดคือบริเวณใกล้กับทางเดินอาหารของหอย

สปอโรซิสต์ (sporocyst)

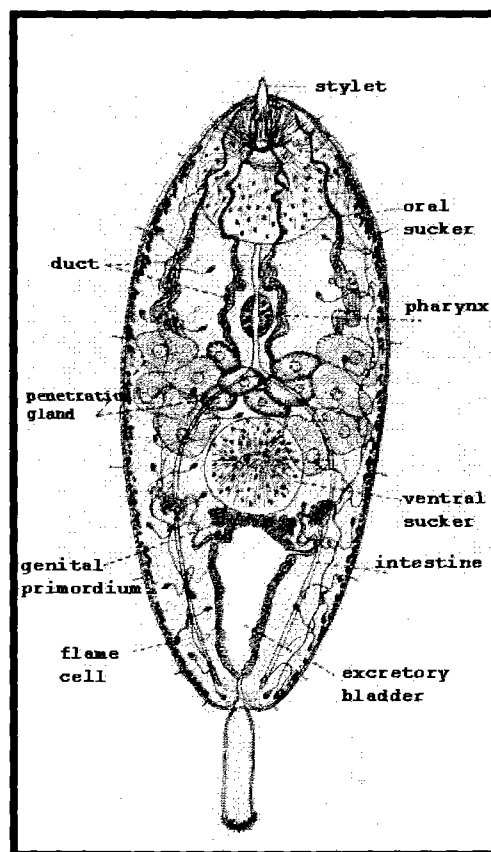
สปอโรซิสต์มีรูปร่างกลมรี ไม่มีอวัยวะ และมีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ ภายในมีเซลล์ตัวอ่อนหรือเรเดีย (redia) ซึ่งอาจมีจำนวนถึง 25 ตัว เรเดียจะเริ่มออกจาก สปอโรซิสต์เมื่อสปอโรซิสต์มีอายุได้ประมาณ 4 สัปดาห์ ขนาดของสปอโรซิสต์ (มีความยาวได้ตั้งแต่ 0.1-0.7 มม. กว้าง 0.08-0.15 มม.) ขึ้นอยู่กับอายุ จำนวน และขนาดของเรเดียที่อยู่ภายใน

เรเดีย (redia)

เรเดียมีรูปร่างทรงกระบอก ปากเปิดเข้าสู่ pharynx ซึ่งมีขนาดใหญ่ แข็งแรง และต่อกับลำไส้สั้นๆ ลักษณะเป็นถุงปลายตัน ในลำตัวเป็นช่องว่าง ภายในมีตัวอ่อนเจริญอยู่ เรเดียจะมีขนาดยาวประมาณ 0.3-0.8 มม. กว้าง 0.1-0.15 มม. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุ จำนวน และขนาดของตัวอ่อนที่เจริญอยู่ภายใน โดยทั่วไปตัวอ่อนที่เจริญภายในเรเดียคือ เซอร์คาเรีย (cercaria) แต่ในบางครั้งเรเดียบางตัวจะผลิตเรเดียด้วยตัวเอง โดยทั่วไปลักษณะของเรเดียของพยาธิใบไม้ปอดแต่ละชนิดจะคล้ายคลึงกัน ทำให้ไม่สามารถแยกชนิดได้ แต่โคบายาชิ รายงานว่า ความยาวของลำไส้ของเรเดียของพยาธิใบไม้ปอด *P. westermani* จะยาวกว่าลำไส้ของเรเดียของพยาธิใบไม้ปอดชนิดอื่นๆ (Kobayashi, 1921)

เซอร์คาเรีย (cercaria)

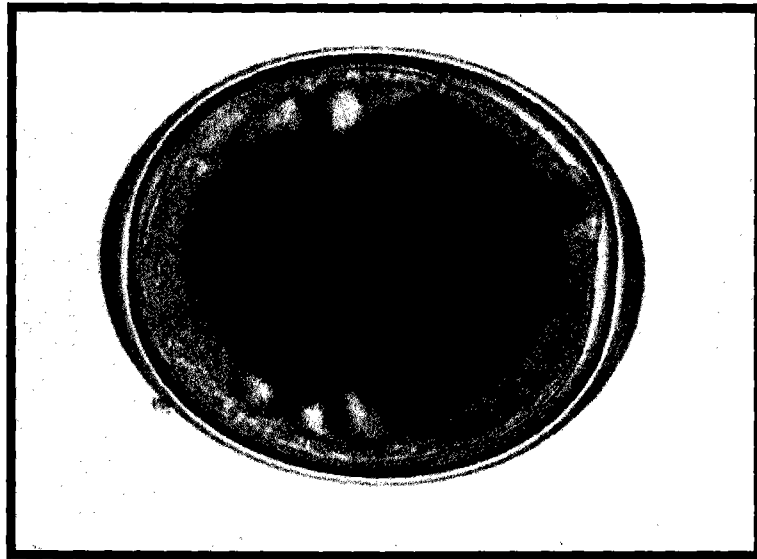
เซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด (ภาพประกอบ 5) มีลำตัวยาวรีปกคลุมด้วยหนามเล็กๆ มีหางสั้นมาก มี oral sucker และ ventral sucker บริเวณใกล้กับ ventral sucker ก่อนไปทางหัวจะมีต่อมสร้างน้ำย่อยสำหรับเจาะไช (penetration glands) จำนวน 14 ต่อม อยู่เป็นกลุ่มจำนวน 4 กลุ่ม ซึ่งจำนวนในแต่ละกลุ่มเรียงจากข้างหนึ่งไปอีกข้างหนึ่งเป็น 4-3-3-4 ต่อม เซอร์คาเรียเมื่อเติบโตเต็มที่ส่วนใหญ่ยังอาศัยอยู่ภายในหอย หรืออาจมีออกมาจากหอยเป็นจำนวนน้อย



ภาพประกอบ 5 เซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด

เมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria)

เซอร์คาเรียที่ออกจากหอยมาอยู่ตามพื้น จะไชเข้าบริเวณรอยต่อของขาป้อน้ำจืด (*Lamaudia lamaudii*, *L. beusekomae*, *Ranguna smithiana*) หรือโคนหางด้านท้อง หรือระหว่างปล้องของลำตัวกุ้งน้ำจืด (crayfish) ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 เมื่อปูกินหอยเป็นอาหาร เซอร์คาเรียจะไชออกจากผนังลำไส้ของหอยและเข้าไปในเส้นเลือดหรือกล้ามเนื้อของปู โดยหางจะหลุดออกและเริ่มมีการสร้างถุงหุ้มตัวบางๆ ขึ้น ถุงหุ้มนี้จะค่อยๆ หนาขึ้นจนในที่สุดจะมีถุงหุ้ม 2 ชั้น เซอร์คาเรียจะเจริญเติบโตและเห็นระบบทางเดินอาหารชัดเจนโดยเฉพาะกระเพาะขับถ่ายของเสีย (excretory bladder) ซึ่งมีขนาดยาวขึ้นและมีของเสียเป็นเม็ดสีขาวบรรจุอยู่ เราเรียกตัวอ่อนระยะติดต่อนี้ว่า เมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) (ภาพประกอบ 6) และเมื่อคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมกินปูเหล่านี้ดิบๆ หรือปรุงไม่สุก จะมีโอกาสได้รับเมตาเซอร์คาเรียและเป็นโรคพยาธิใบไม้ปอดได้ (เดชา ศรีสนธิ์, จิตรา ไวกกุล, และ สนั่น แยมพุด. 2540)



ภาพประกอบ 6 เมตาเชอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด *P. heterotremus*

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ของ *P. heterotremus* กับพยาธิใบไม้ปอดและพยาธิชนิดอื่นๆ โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

ความสำคัญของการวิจัย

ผลของการศึกษาค้นคว้าทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. heterotremus* กับพยาธิใบไม้ปอดและพยาธิชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธานของพยาธิใบไม้ปอดได้

ขอบเขตของการวิจัย

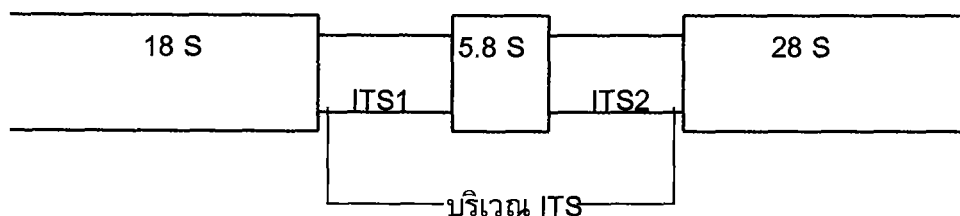
การศึกษครั้งนี้มุ่งเน้นเรื่องการเพิ่มขยายปริมาณ DNA จากเมตาเชอร์คาเรีย ของพยาธิใบไม้ปอดชนิด *P. heterotremus* ที่ได้จากปูน้ำตก บริเวณน้ำตกเจ็ดคด ตำบลชะอม อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี ซึ่งเป็นแหล่งระบาดของโรคพยาธิใบไม้ปอด และจากตัวเต็มวัย ที่ได้จากแมวของฝ่ายปรสิต สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน การเพิ่มขยายปริมาณ DNA นี้สามารถทำได้โดยวิธีลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) จากนั้นจึงนำไปหาลำดับเบส (DNA sequence) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) เป็นสาขาหนึ่งที่มีความเจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว และมีการประยุกต์ใช้กันแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง โดยการใช้เทคนิค PCR (Mullis, *et al.* 1986) เทคนิคนี้ได้มีบทบาทในการพลิกโฉมการศึกษาทางพันธุกรรมระดับยีน ไม่ว่าจะเป็นการโคลนยีน (gene cloning) การตรวจหาการกลายพันธุ์ (detection of mutation) การวิเคราะห์ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism analysis) ตลอดจนการจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตต่างๆ (molecular systematics)

ในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดในระดับโมเลกุล ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาลำดับเบสบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของ nuclear ribosomal DNA (nrDNA) และยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆ เช่น cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) ใน mitochondria (Blair, *et al.* 1997 a)

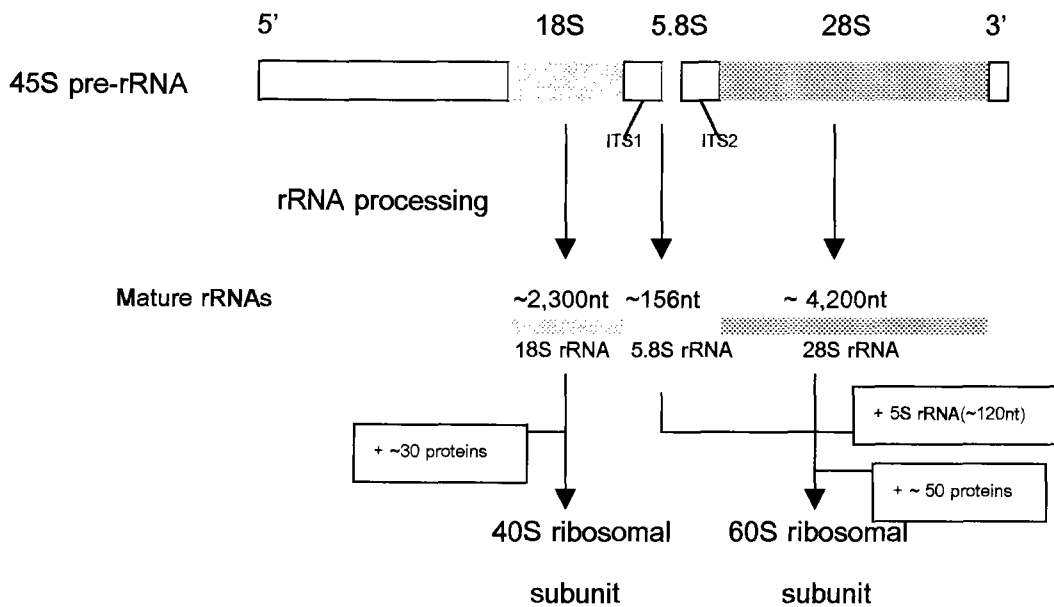


ภาพประกอบ 7 บริเวณ ITS ที่พบในยูคาริโอต

การจัดเรียงตัวของบริเวณ ITS ในยูคาริโอต (ภาพประกอบ 7) (Watson, *et al.* 1987) จะพบ ITS1 ระหว่างยีน 18S และ 5.8S และจะพบ ITS2 ระหว่างยีน 5.8S และ 28S nrDNA ที่พบในยูคาริโอต (ภาพประกอบ 8) จะมียีนเรียงตัวกันเป็นกลุ่มๆ แต่ละกลุ่มประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสร้าง 18S, 5.8S และ 28S rRNA และมี RNA polymerase I เป็นเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ถอดรหัสกลุ่มยีนข้างต้นให้ได้ pre-rRNA ขนาด 45S ต่อจากนั้นในขั้นตอน rRNA processing จะมีการตัด ITS1 และ ITS2 ออก ทำให้ได้ mature rRNAs 3 ขนาดคือ 18S (~2,300 nucleotides), 5.8S (~156 nucleotides) และ 28S (~4,200 nucleotides)

- 18S rRNA เมื่อรวมกับโปรตีนประมาณ 30 ชนิดจะได้ 40S ribosomal subunit (small subunit)
- 5.8S , 28S และ 5S rRNA เมื่อรวมกับโปรตีนประมาณ 50 ชนิด จะได้ 60S ribosomal subunit (large subunit)

- 40S และ 60S ribosomal subunits จะประกอบเป็น 80S ribosome ในที่สุด (Gerbi. 1985)



ภาพประกอบ 8 การจัดเรียงตัวของ nuclear ribosomal DNA ที่พบในยูคาริโอต
(nt หมายถึง nucleotides)

โดยทั่วไปการเกิด evolutionary divergence ของบริเวณ ITS1 และ ITS2 เป็นไปอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับยีน 18S, 5.8S และ 28S ดังนั้นนักวิจัยส่วนใหญ่จึงเชื่อว่าบริเวณ ITS1 และ ITS2 ไม่ทำหน้าที่ใดๆ (nonfunctional spacer sequences) หรืออยู่ภายใต้ low functional constraint และมีวิวัฒนาการใกล้เคียง neutral rate ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาทาง phylogenetics ของสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด (closely related species) (Schlötterer, *et al.* 1994)

อย่างไรก็ดีจากการศึกษา mutational analysis ในยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) พบว่าการเกิด deletion ที่บริเวณ ITS1 สามารถยับยั้งการสร้าง small และ large subunit ของ rRNAs (Musters, *et al.* 1990 ; Nues, *et al.* 1994) นอกจากนี้การเกิด deletion หรือ point mutation ที่บริเวณ ITS2 ยังทำให้กระบวนการสร้าง large subunit ของ rRNAs น้อยลง (Sander, *et al.* 1992)

สำหรับยีน 18S นั้น นักวิจัยส่วนใหญ่นำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในระดับที่สูงกว่าระดับสปีชีส์ เช่นในระดับจีนัส หรือแฟมิลี (Fernandez, *et al.* 1998)

ตาราง 1 ขนาด (base pairs หรือ bp) ของบริเวณ ITS1, ITS2 และ 18S ของพยาธิใบไม้สปีชีส์ต่าง ๆ

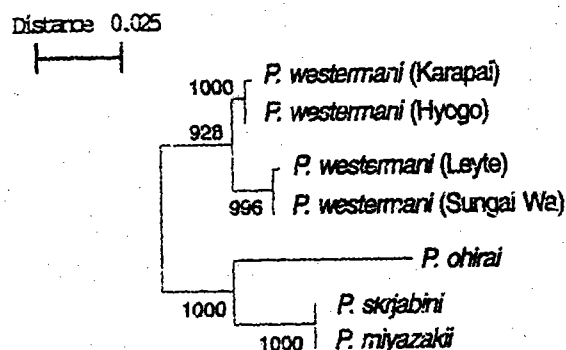
ชนิด	ITS1 ขนาด (bp)	ITS2 ขนาด (bp)	18S ขนาด (bp)
<i>Fasciola hepatica</i> (Michot, et al. 1993 ; Fernandez, et al. 1998)	433	366	1941
<i>Schistosoma mansoni</i> (Bowles, et al. 1993 ; Herwerden, L van., Blair, D., Agatsuma, T. 1998)	458	359	1989
<i>Schistosoma japonicum</i> (Bowles, et al. 1993 ; Johnston, D. A., Kane, R. A., and Rollinson, D. 1993 ; Blair, et al. 1997 b)	529	467	1648
<i>Paragonimus westermani</i> (Blair, et al. 1997 a ; Herwerden, L van., Blair, D., and Agatsuma, T. 1999)	650	363	-
<i>Paragonimus ohirai</i> (Blair, et al. 1997 a ; Herwerden, , L van., Blair, D., and Agatsuma, T. 1999)	852	363	-

ก่อนหน้านี้แบลร์ และคณะ (Blair, et al. 1997 a) ได้ศึกษาลำดับเบสของ ITS2 จากพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ และนำมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ลำดับเบสของ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดบางสปีชีส์มีตัวอย่าง GenBank accession number แสดงในตาราง 2

ตาราง 2 GenBank accession number ของ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดบางสปีชีส์

ชนิด	ถิ่นกำเนิด	GenBank accession number ของ ITS2
<i>P. westermani</i>	Hyogo, Japan	U96907
	Karapai, Taiwan	U96908
	Sungai Wa, Malaysia	U96909
	Leyte, Philippines	U96910
<i>P. ohirai</i>	Tanegashima, Japan	U96911
<i>P. miyazakii</i>	Miyazaki, Japan	U96912
<i>P. skrjabini</i>	Sichuan, China	U96913

จากการทดลองหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ จากข้อมูลลำดับเบสของ ITS2 โดยใช้ Kimura 2-parameter model และ neighbour-joining (Blair, et al. 1997 a) ได้ผลดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ ITS2 มีการคำนวณ distance matrix โดยใช้ Kimura 2-parameter model และ phylogenetic tree นี้สร้างขึ้นโดยวิธี neighbour-joining ในโปรแกรม TREECON (Peer and Wachter. 1993) มีการทำ bootstrap 1000 ครั้ง และพบ bootstrap value บน branch ของ phylogenetic tree ซึ่งสามารถเทียบเป็นร้อยละ (%) ได้

จากผลการทดลองแบลร์ และคณะ (Blair, et al. 1997 a) สามารถแบ่งพยาธิใบไม้ปอดออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ซึ่งมี bootstrap value 928 (92.8%) ประกอบด้วย

P. westermani (Karapai, Taiwan)

P. westermani (Hyogo, Japan)

P. westermani (Leyte, Philippines)

P. westermani (Sungai Wa, Malaysia)

กลุ่มที่ 2 ซึ่งมี bootstrap value 1000 (100%) ประกอบด้วย

P. ohirai (Tanegashima, Japan)

P. skrjabini (Sichuan, China)

P. miyazakii (Miyazaki, Japan)

โดยในกลุ่มแรกจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยกลุ่มแรกคือ *P. westermani* (Karapai) จากไต้หวัน และ *P. westermani* (Hyogo) จากญี่ปุ่น ซึ่งพบว่ามี bootstrap value 1000 (100%) ส่วนกลุ่มย่อยกลุ่มที่ 2 คือ *P. westermani* (Leyte) จากฟิลิปปินส์ซึ่งมีความใกล้เคียงกันกับ *P. westermani* (Sungai Wa) จากมาเลเซียและมี bootstrap value 996 (99.6%)

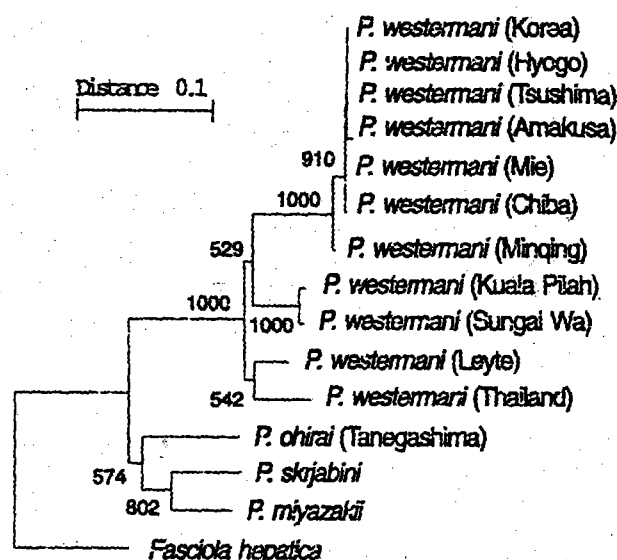
ส่วนกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งได้เป็นกลุ่ม *P. skrjabini* จากจีน และ *P. miyazakii* จากญี่ปุ่น ซึ่งมี bootstrap value 1000 (100%) และ *P. ohirai* จากญี่ปุ่นซึ่งมีความสัมพันธ์ที่ห่างออกไปจาก *P. skrjabini* และ *P. miyazakii*

นอกจากนี้แบลร์ และคณะ (Blair, et al. 1997 a) ยังทำการศึกษาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิตัวแบนไม่พอดสปีชีส์ต่าง ๆ โดยใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ซึ่งมีความยาวประมาณ 393 bp และใช้ *Fasciola hepatica* เป็น outgroup ลำดับเบสของ COI ของพยาธิตัวแบนไม่พอดบางสปีชีส์มีตัวอย่าง GenBank accession number แสดงในตาราง 3

ตาราง 3 GenBank accession number ของ COI ของพยาธิตัวแบนไม่พอดบางสปีชีส์

ชนิด	ถิ่นกำเนิด	GenBank accession number ของ COI
<i>P. westermani</i>	Hyogo, Japan	U97205
	Tsushima, Japan	U97205
	Amakusa, Japan	U97206
	Chiba, Japan	U97207
	Mie, Japan	U97208
	Minqing, Fujian, China	U97209
	Sungai Wa, Malaysia	U97210
	Kuala Pilah, Malaysia	U97211
	Thailand	U97212
	Leyte, Philippines	U97213
<i>P. ohirai</i>	Tanegashima, Japan	U97214
<i>P. miyazakii</i>	Miyazaki, Japan	U97215
<i>P. skrjabini</i>	Sichuan, China	U97216

แบลร์ และคณะ (Blair, et al. 1997 a) นำลำดับเบสที่ได้นำมาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ Kimura 2-parameter model และ neighbour-joining ซึ่งได้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของ COI มีการคำนวณ distance matrix โดยใช้ Kimura 2-parameter model และ phylogenetic tree นี้สร้างขึ้นโดยวิธี neighbour-joining ในโปรแกรม TREECON (Peer and Wachter. 1993) มีการทำ bootstrap 1000 ครั้ง และพบ bootstrap value บน branch ของ phylogenetic tree ซึ่งสามารถเทียบเป็นร้อยละ (%) ได้

ผลการทดลองนี้สนับสนุนข้อมูลที่ได้จาก phylogenetic tree ของ ITS2 (ภาพประกอบ 9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *P. westernmani* สามารถแบ่งได้อย่างน้อยเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มของทางตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งประกอบด้วย *P. westernmani* จากจีน ญี่ปุ่น เกาหลี และไต้หวัน กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มของทางใต้ ซึ่งประกอบด้วย *P. westernmani* จากมาเลเซีย, ไทย และฟิลิปปินส์ สำหรับกลุ่มที่สองนี้ *P. westernmani* จากประเทศไทยมีความใกล้ชิดกับ *P. westernmani* จากฟิลิปปินส์มากกว่าจากมาเลเซีย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1 หนูน้ำตกที่เก็บจากบริเวณน้ำตกเจ็ดคด ตำบลชะอม อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี

1.2 แมวจากฝ่ายผลิต สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง
บางเขน

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 4 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
2.1 กล้องสเตอริโอ	Olympus optical Ltd., Japan
2.2 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ	Olympus optical Ltd., Japan
2.3 เครื่องเพิ่มปริมาณสารทางพันธุกรรม (PCR)	MJ Research, Inc., U.S.A.
2.4 เครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเลต	Spectrotine, U.S.A.
2.5 เครื่องปั่นเนื้อเยื่อ	Waring, U.S.A.
2.6 ตู้เก็บสารเคมีอุณหภูมิต่ำ	Sharp, Japan
2.7 เครื่องชั่งวางน้ำหนักด้านบน	Sartorius, Germany
2.8 เครื่องดูดย้ายสารละลายปริมาตรต่ำ	Gilson Medical Electronics S.A., France
2.9 เครื่องผสมสารโดยใช้แม่เหล็ก	IKA, Germany
2.10 เครื่องนิ่งฆ่าเชื้อ	HLMC (HUXLEY), Taiwan
2.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก	Hettich, Germany
2.12 อ่างสำหรับทำน้ำร้อน	Hybaid Ltd., U.K.
2.13 ตู้เย็น -70°C	Revco, U.S.A.
2.14 ไมโครเวฟ	National, Japan

3. เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยเป็นเกรดห้องปฏิบัติการ (labolatory grade)

ตาราง 5 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัท
3.1 <i>Thermus aquaticus</i> (Taq) DNA polymerase	Gibco BRL, U.S.A.
3.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Gibco BRL, U.S.A.
3.3 PCR buffer	Gibco BRL, U.S.A.
3.4 MgCl ₂	Gibco BRL, U.S.A.
3.5 Agarose	Sigma Chemical Company, U.S.A.
3.6 Ethidium bromide	Sigma Chemical Company, U.S.A.
3.7 NaCl	Merck, Germany
3.8 Absolute ethanol	Merck, Germany
3.9 HCl	Merck, Germany
3.10 Phenol	Gibco BRL, U.S.A.
3.11 Chloroform	Merck, Germany
3.12 Ether	Merck, Germany
3.13 Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Sigma Chemical Company, U.S.A.
3.14 Proteinase K	Pharmacia Biotech, Sweden
3.15 Formalin	Merck, Germany
3.16 Lambda DNA - <i>HindIII</i> Marker	Promega, U.S.A.
3.17 100 bp DNA Ladder	Gibco BRL, U.S.A.

4. วัสดุภัณฑ์

ตาราง 6 วัสดุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุภัณฑ์	บริษัท
4.1 फिल्मขาวดำโพลาไรซ์ รุ่น T667	Eastman Kodak Company, U.S.A.
4.2 Microtube ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร	Treff Lab, Switzerland
4.3 แผ่นสไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์	
4.4 ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 1000, 2000 มิลลิลิตร	Pyrex, U.S.A.

วิธีดำเนินการ

ดำเนินการโดยภาพรวม
ในภาคสนาม

เก็บปูจากน้ำตกเจ็ดคด



ในห้องปฏิบัติการ

รวบรวมเมตาเซอรคาเรียของ *P. heterotremus*



DNA extraction

PCR

ITS2

Sequencing



ทำให้เกิดการติดเชื้อในแมง

ตัวเต็มวัยของ *P. heterotremus* ในแมง

DNA extraction

PCR

18S

ITS1

ITS2

Sequencing

Sequence alignment

Phylogenetic tree reconstruction

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำอุจจาระของแมว 3 ตัวมาตรวจหาไข่พยาธิชนิดต่างๆ โดยวิธีฟอร์มาลิน-อีเทอร์คอนเซนเตรชัน (Formalin-ether concentration) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เลี้ยงแมวที่ปราศจากไข่พยาธิด้วยน้ำและอาหารอัดเม็ด

วิธีฟอร์มาลิน-อีเทอร์คอนเซนเตรชัน

นำอุจจาระแมวมาละลายในน้ำประมาณ 3 เท่า

กรองอุจจาระด้วยผ้ากรอง 2 ชั้น

ปั่น 1,500 rpm เป็นเวลา 3 นาที

เทน้ำตอนบนทิ้ง

เติมฟอร์มาลิน 10% 5 ml

เติมอีเทอร์ 3 ml

ปิดจุกเขย่าให้เข้ากัน

นำไปปั่น 1,500 rpm เป็นเวลา 3 นาที

เทฟอร์มาลินและอีเทอร์ทิ้ง

ดูดตะกอนกันหลอดหยดบนสไลด์ และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

นำไปตรวจหาไข่พยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การเก็บปูน้ำตก

ปูน้ำตก (*L. laraudii*) ที่นำมาศึกษาครั้งนี้เก็บจากบริเวณน้ำตกเจ็ดคดในช่วงระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม 2541 โดยจับปูน้ำตกด้วยมือเปล่า ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งนำปูน้ำตกเพศผู้ประมาณ 3 ตัว ดองด้วยแอลกอฮอล์ 70%

3. เก็บรวบรวมและศึกษาชนิดของเมตาเซอ์คาร์เรียจากปูน้ำตก

3.1 นำปูน้ำตกมาฉีกกระดองออก แล้วฉีกกล้ามเนื้อส่วนนอก ท้อง ใส่ในเครื่องปั่น ครั้งละประมาณ 20 ตัว

3.2 ใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85%) ประมาณ 100 มิลลิลิตร ลงไปในเครื่องปั่น

3.3 ปั่นประมาณ 5 นาที

3.4 นำปูที่ปั่นแล้วกรองด้วยกระชอน นำน้ำที่ได้ไปตกตะกอนให้ใสโดยตั้งทิ้งไว้

- ครั้งที่แรกใช้เวลา 2 ชั่วโมง เทส่วนบนทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85%) ให้เต็ม
- ครั้งที่สองใช้เวลา 1 ชั่วโมง เทส่วนบนทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85%) ให้เต็ม
- ครั้งที่สามใช้เวลา 45 นาที เทส่วนบนทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85%) ให้เต็ม

3.5 นำตะกอนที่ได้ไปตรวจหาเมตาเซอ์คาร์เรียของ *P. heterotremus* ด้วยกล้องสเตอริโอ แล้วเก็บเมตาเซอ์คาร์เรียที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นบันทึกภาพเมตาเซอ์คาร์เรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.6 นำเมตาเซอ์คาร์เรียที่ได้มาแยกไว้สองส่วน ส่วนหนึ่งนำไปทำให้เกิดการติดเชื้อในแมวโดยให้เมตาเซอ์คาร์เรียเจริญเป็นตัวเต็มวัย และอีกส่วนหนึ่งนำมาทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ แล้วนำไปหาลำดับเบสของ *P. heterotremus* ต่อไป

4. ศึกษาการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบสของ

P. heterotremus

4.1 การสกัด DNA จากเมตาเซอ์คาร์เรีย

นำเมตาเซอ์คาร์เรียของ *P. heterotremus* มาประมาณ 200 ซีสต์ ใส่ใน microtube

เติมน้ำกลั่น 50 μ l

ปั่น 12,000 rpm นาน 10 นาที

เติม 10% SDS 20 μ l

เติม 20 mg/ml proteinase K 5 μ l

incubate ที่ 55 °C overnight

เติม phenol และ chloroform อย่างละ 200 µl

เขย่าเบาๆ นาน 10 นาที

ปั่น 12,000 rpm นาน 5 นาที

ดูดส่วนใสที่อยู่ชั้นบนออกมาใส่ใน microtube หลอดใหม่

เติม cold absolute ethanol ประมาณ 500 µl

ปั่น 12,000 rpm นาน 10 นาที

เทน้ำใสทิ้ง

เติม cold 70% ethanol 200 µl

ปั่น 12,000 rpm นาน 5 นาที

เทส่วนใสทิ้ง และคว่ำ microtube ทิ้งไว้ นาน 1 ชั่วโมง

เก็บ DNA ไว้ที่ -20 °C

4.2 การเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ ITS2 โดยใช้เทคนิค PCR

ในการทำ PCR มีส่วนประกอบที่สำคัญ 4 ส่วน คือ

- DNA template คือ DNA สายคู่ที่มาจากเมตาเซอริคาเรียของ

P. heterotremus

- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

- deoxynucleotide triphosphates ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ dATP, dCTP,

dGTP และ dTTP

- oligonucleotide primers ซึ่งเป็น DNA สายสั้นๆ ขนาดประมาณ 20-30 เบส

การออกแบบ primers

primers นี้ออกแบบมาจากลำดับเบสของ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ ในตาราง 2

Primers ที่ได้คือ : primer 1 (forward) 5' ATATTGCGGCCACGGGTTAG 3' และ
primer 2 (reverse) 5' GGTA CTCACGTCTGATCCGA 3'

ซึ่งทางสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ได้ทำการสังเคราะห์ให้

ตาราง 7 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ ITS2

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Sterile distilled water	15.2
10 X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl ₂	1.5
dNTPs (10mM)	0.5
Primer 1 (13.8 μM)	2
Primer 2 (13.5 μM)	2
DNA template	1
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.3
รวม	25

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมตั้งข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที

- นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturing step 95°C 1 นาที

Annealing step 55°C 1 นาที

Extension step 72°C 1 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้เก็บไว้ที่ -20°C

- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน
- บันทึกผลเป็นภาพด้วยกล้องโพลาไรซ์
- นำ PCR product ที่ได้ส่งไปยัง สวทช. เพื่อหาลำดับเบส

5. ศึกษาการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ปอดชนิด *P. heterotremus*

นำแมวที่เตรียมไว้ในวิธีดำเนินการข้อ 1 (การเตรียมสัตว์ทดลอง) มาให้อัดอาหารเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงให้กินอาหารที่มีเมตาเซอร์คาเรียผสมอยู่ โดยแมว 1 ตัวอาจได้รับเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด 80 ซีสต์ ตรวจสอบไข่พยาธิด้วยวิธีฟอมาลิน-อีเทอร์คอนเซนเตรชันภายหลังให้เมตาเซอร์คาเรียแล้ว 3 เดือนและทุกสัปดาห์ต่อมา เมื่อตรวจพบไข่พยาธิจึงนำแมวมามาเพื่อตรวจหาตัวเต็มวัย นำตัวเต็มวัยที่ได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA แล้วนำไปหาลำดับเบสของบริเวณ ITS และ 18S ของ *P. heterotremus* ต่อไป

5.1 สกัด DNA ของ *P. heterotremus* จากตัวเต็มวัยโดยใช้ Wizard Genomic DNA Purification Kit ของ Promega, U.S.A.

นำ 0.5 M EDTA pH 8.0 120 μ l ผสมกับ nuclei lysis solution 500 μ l (ทำโดยใช้น้ำแข็ง)

นำ EDTA/nuclei lysis solution 600 μ l ใส่ใน microtube 1.5 ml ที่มีตัวเต็มวัยของ *P. heterotremus* อยู่ 1 ตัว

เติม 10 mg/ml proteinase K 35 μ l

incubate ที่ 55°C overnight พร้อม shaking

เติม RNase solution 3 μ l เขย่าเบาๆ 25 ครั้ง

incubate ที่ 37°C นาน 15-30 นาที

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

เติม protein precipitation solution 200 μ l

ปั่นโดยใช้ high speed 20 วินาที

วาง microtube บนน้ำแข็งประมาณ 5 นาที

ปั่น 13,000 rpm นาน 4 นาที

protein จะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด ดูดน้ำใสใส่ microtube 1.5 ml อันใหม่

เติม isopropanol 600 μ l

ผสมเบาๆ จนกระทั่งเห็นสาย DNA แล้วจึงปั่น 13,000 rpm นาน 1 นาที

DNA จะอยู่ก้นหลอด ค่อยๆเท supernatant ออก

เติม 70% ethanol 600 μ l

ปั่น 12,000 rpm นาน 1 นาที

เทส่วนใสทิ้ง และคว่ำ microtube ทิ้งไว้ นาน 10-15 นาที

เติม DNA rehydration solution 100 μ l

incubate ที่ 65°C 1 ชั่วโมง

เก็บ DNA ไว้ที่ 2-8 °C

5.2 การเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ ITS2 โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ primers ที่ออกแบบมาจาก ITS2 และมีขั้นตอนต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 4.2

5.3 ทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ 18S โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ primers A, B ที่เป็น universal primer (Innis, *et al.* 1990)

Primers ที่ใช้คือ primer A (forward) 5' AACCTGGTTGATCCTGCCAGT 3' และ
primer B (reverse) 5' TGATCCTTCTGCAGGTTACACCTAC 3'

ซึ่งทาง สวทช. ได้ทำการสังเคราะห์ให้

ตาราง 8 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ 18S

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Sterile distilled water	17.9
10 X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl ₂	0.8
dNTPs (10mM)	0.5
Primer A (20 μM)	1
Primer B (20 μM)	1
DNA template	1
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.3
รวม	25

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมดังข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturing step	95°C	1 นาที
Annealing step	35°C	1 นาที
Extension step	72°C	1 นาที

 ทำซ้ำ 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้เก็บไว้ที่ -20°C
- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน
- บันทึกผลเป็นภาพด้วยกล้องโพลาไรด์
- นำ PCR product ที่ได้ส่งไปยัง สวทช. เพื่อหาลำดับเบส

5.4 ทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ ITS1 โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ primers ที่ออกแบบมาจากส่วนปลายของ 18S และบริเวณส่วนต้นของ ITS2 ของ *P.*

heterotremus

Primers ที่ได้คือ primer 3 (forward) 5' GTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCG 3' และ primer 4 (reverse) 5' CAGGCTAACCCGTGGCCGCAATAT 3'

ซึ่งทางสาขาฯ ได้ทำการสังเคราะห์ให้

ตาราง 9 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ ITS1

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Sterile distilled water	17.2
10 X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl ₂	1.5
dNTPs (10mM)	0.5
Primer 3 (12.47 μM)	1
Primer 4 (17.32 μM)	1
DNA template	1
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.3
รวม	25

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมตั้งข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที
- นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturing step	95°C	1 นาที
Annealing step	60°C	1 นาที
Extension step	72°C	1 นาที

 ทำซ้ำ 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้เก็บไว้ที่ -20°C
- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน
- บันทึกผลเป็นภาพด้วยกล้องโฟลารอยด์
- นำ PCR product ที่ได้ส่งไปยัง สาขาฯ. เพื่อหาลำดับเบส

5.5 นำลำดับเบส ของ ITS2 มาทำ sequence alignment กับลำดับเบสของ พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ซึ่งได้มาจาก GenBank accession number ดังตาราง 10 การทำ sequence alignment นั้นใช้โปรแกรม ClustalW จาก website <http://www.ebi.ac.uk/> ของ The European Molecular Biology Laboratory (EMBL,U.K.) จากนั้นจึงสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.573c (ซึ่งมาจาก website <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการของ *P. heterotremus* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ

ตาราง 10 GenBank accession number ของ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ ที่นำมาทำ sequence alignment กับ *P. heterotremus*

ชนิด	ถิ่นกำเนิด	GenBank accession number
<i>P. westermani</i>	Hyogo, Japan	U96907
	Thailand	AF159604
<i>P. ohirai</i>	Tanegashima, Japan	U96911
<i>P. miyazakii</i>	Miyazaki, Japan	U96912
<i>P. skrjabini</i>	China, Sichuan	U96913
<i>P. harinasutai</i>	Thailand	AF159609
<i>P. siamensis</i>	Thailand	AF159605
<i>P. kellicotti</i>	U.S.A.	AF159606
<i>P. mexicanus</i>	Ecuador	AF159607
<i>P. macrorchis</i>	Thailand	AF159608

(Blair, et al. 1997 a ; Blair, et al. 1999)

5.6 นำลำดับเบสของ 18S ของ *P. heterotremus* มาทำ sequence alignment กับลำดับเบสของพยาธิใบไม้จิ้งนัสต่างๆ ซึ่งได้มาจาก GenBank accession number ดังตาราง 11 และใช้ *Diphyllbothrium stemmacephalum* ซึ่งเป็นพยาธิตัวดีดเป็น outgroup (Olson and Caira. 1999) การทำ sequence alignment และการสร้าง phylogenetic tree ได้ ดำเนินการตามวิธีในข้อ 5.5

ตาราง 11 GenBank accession number ของ 18S ของพยาธิใบไม้จิ้งหรีดต่างๆ ที่นำมาทำ
sequence alignment กับ *P. heterotremus*

ชนิด	GenBank accession number
<i>Fasciola hepatica</i>	AJ004969
<i>Fasciola gigantica</i>	AJ011942
<i>Schistosoma mansoni</i>	U65657
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Y11236
<i>Echinostoma caproni</i>	L06567
<i>Diphyllbothrium stemmacephalum</i>	AF124459

(Fernandez, et al. 1998)

บทที่ 4

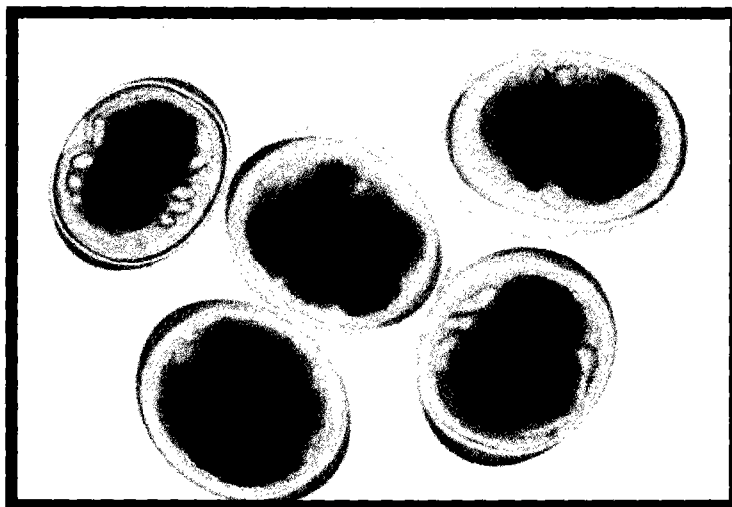
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานิตของเมตาเซอร์คาเรียจากปูน้ำตก

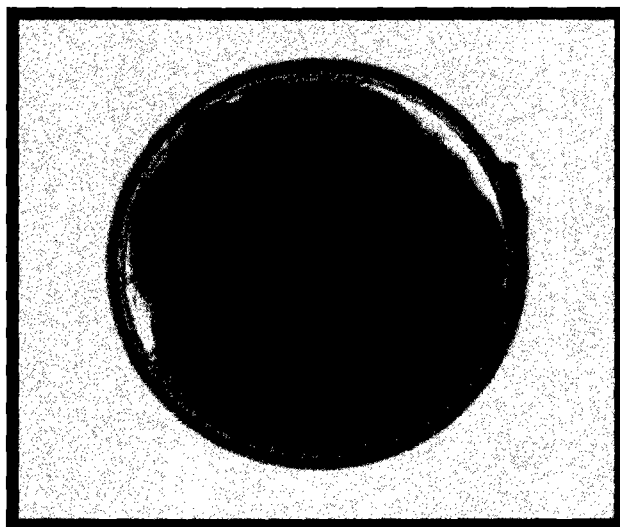
ปูน้ำตกที่เก็บตัวอย่างได้จากบริเวณน้ำตกเจ็ดคด คือ *Lamaudia lamaudii* (ภาพประกอบ 11) จากผลการศึกษาพบเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอด *P. heterotremus* (ภาพประกอบ 12) เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดที่ยังไม่ทราบชื่อ (*Paragonimus* sp.) (ภาพประกอบ 13) และเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิชนิดอื่นๆ (ภาพประกอบ 14)



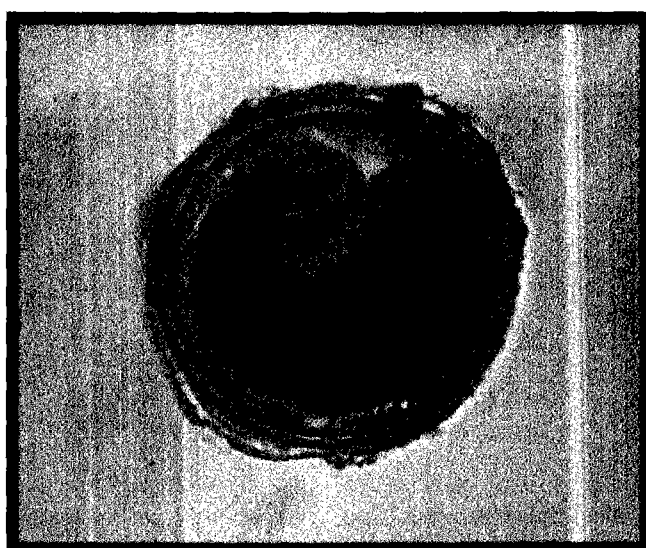
ภาพประกอบ 11 ปูน้ำตก *L. lamaudii*



ภาพประกอบ 12 เมตาเซอร์คาเรียของ *P. heterotremus*



ภาพประกอบ 13 เมตาเซอร์ทาเรียของ *Paragonimus* sp.



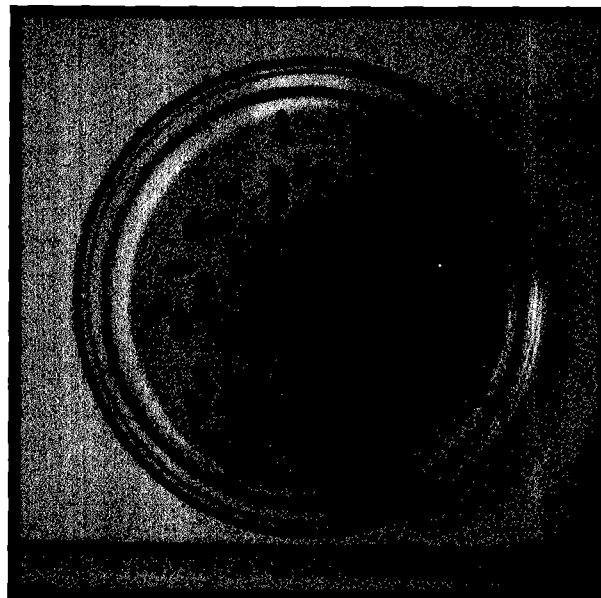
ภาพประกอบ 14 เมตาเซอร์ทาเรียของพยาธิชนิดอื่น

นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	CACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	50
51	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTGGCAGCTGGCGTGATTTTC	100
101	CCCAACGTGGCCTTGTGTCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGGCGTTTCCCTA	150
151	ACAAATCCGGGCGTATCCATGTTGTGGCTGAAAGCCTTGATGGGGATGTG	200
201	GCAACGGAGTCGTGGCTCAGTGAATGATTTATGTGCACGTTCCGCTGTCC	250
251	CGTCATCATCTATGGTTGAAGTTGCGCGTGGTGTGTCCGATGCTGACCTA	300
301	TATATGTGCCATGTGGCTCATTTTCCTGACCTCGGATCAN	

3. ศึกษาการเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ ITS2, 18S และ ITS1 ด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบสของ *P. heterotremus* ในระยะตัวเต็มวัย

หลังจากที่นำเมตาเซอร์คาเรียของ *P. heterotremus* ไปทำให้เกิดการติดเชื้อในแมว 3 ตัว เมื่อเลี้ยงแมวไปได้ 1 เดือน พบว่าแมวตัวที่ 1 ได้ตายลง ดังนั้นจึงเลี้ยงแมวที่เหลือ 2 ตัวต่อไปอีก 2 เดือน และได้ตรวจพบไข่ของพยาธิใบไม้ปอดด้วยวิธีฟอมาลิน-อีเทอร์คอนเซนเตรชัน จึงทำการผ่าแมวตัวที่ 2 ซึ่งพบ *P. heterotremus* ที่เป็นตัวเต็มวัยประมาณ 70 ตัว (ภาพประกอบ 16) ส่วนแมวตัวที่ 3 มีชีวิตอยู่อีกประมาณ 1 เดือนครึ่ง และได้ตายลง จึงทำการผ่าแมวตัวสุดท้ายซึ่งพบ *P. heterotremus* ที่เป็นตัวเต็มวัยประมาณ 15 ตัว



ภาพประกอบ 16 ตัวเต็มวัยของ *P. heterotremus* ที่พบในแมวตัวที่ 2

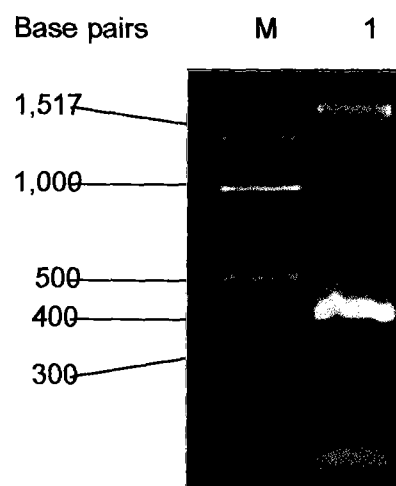
3.1 ผลการศึกษาของบริเวณ ITS2

เมื่อนำตัวเต็มวัยของ *P. heterotremus* มาสกัด DNA และทำ PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบมาจาก ITS2 นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสแล้ว ได้ผลดังนี้

1	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCT	50
51	TATAAACTATCGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTTTGGCCAGCTG	100
101	GCGTGATTTCCCCAACGTGGCCTTGTGTCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGG	150
151	CGTTTCCCTAACAAATCCGGGCGTATCCATGTTGTGGCTGAAAGCCTTGA	200
201	TGGGGATGTGGCAACGGAGTCGTGGCTCAGTGAATGATTTATGTGCACGT	250
251	TCCGCTGTCCCGTCATCATCTATGGTTGAAGTTGCGCGTGGTGTGTCCGA	300
301	TGCTGACCTATATATGTGCCATGTGGCTCATTTTCCTGACCTCGGATCAN	350
351	ACGTGAGTACC	

3.2 ผลการศึกษาของบริเวณ 18S

เมื่อนำ DNA ของ *P. heterotremus* มาทำ PCR โดยใช้ primers A, primer B ได้ผลการทดลองดังนี้



M = 100 bp DNA Ladder

1 = PCR product ของ 18S

ที่ได้จาก primer A, B

ภาพประกอบ 17 แสดงผล PCR product ที่ได้จาก primer A และ primer B

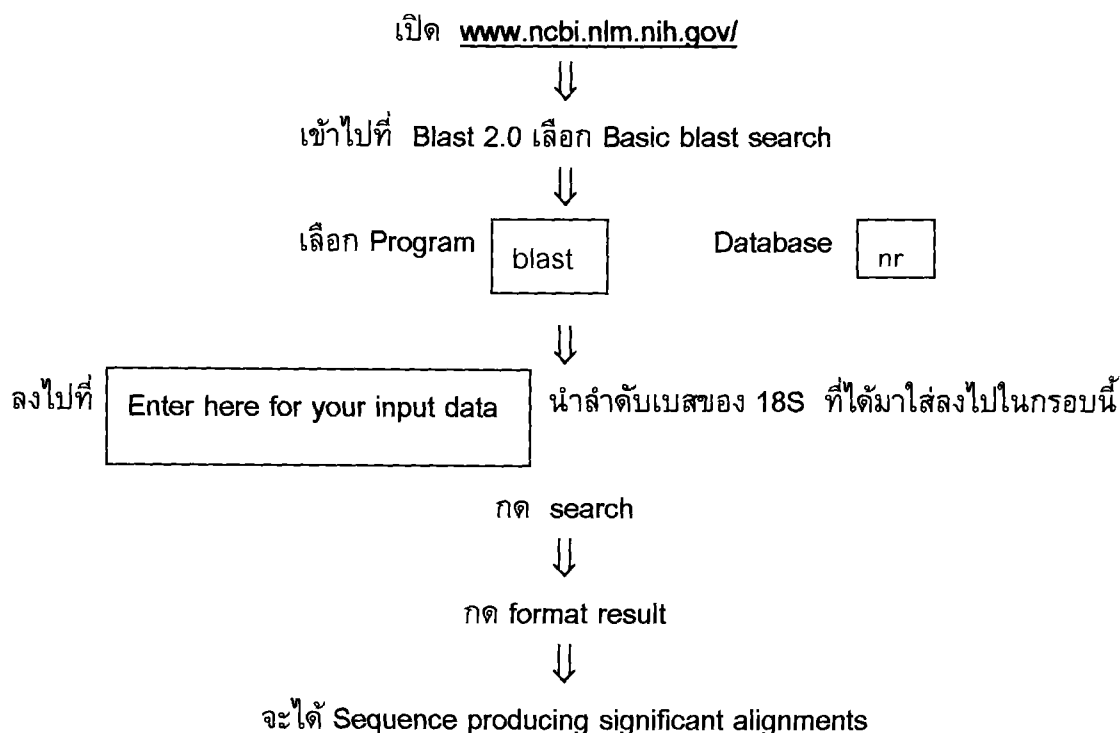
ทำการ elute gel โดยใช้ Gel extraction kit ของ QIAGEN, Germany โดยเลือก band ขนาดประมาณ 400 bp ไปหาลำดับเบส ซึ่งได้ผลเป็นลำดับเบสบางส่วนของ 18S ดังนี้

```

1   GTATTGCTTGNTAGAGATTAAGCNATGCATGTCTAAGTACATACCTCAA   50
51  AACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGCTATGGTTCCTTAGATC  100
101 GTACATACTACATGGATAACTGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCCAC  150
151 TATGCCCTGACCCGCGAGGGAACGGGTGGATTTATTAGAACAGAACCAAC  200
201 CGGTTGTGGCTTCGGCTGCTTCCGTTGTACTCTGTGATGACTCTGGATAA  250
251 CTTCACTGATCGCGTCGGCCTTGTGTGCGGCGACGGATCTTTCAAATGTCT  300
301 GCCCTATCAATTTACGATGGTAGGTGAACCTGCAGAANGATCAAA      345

```

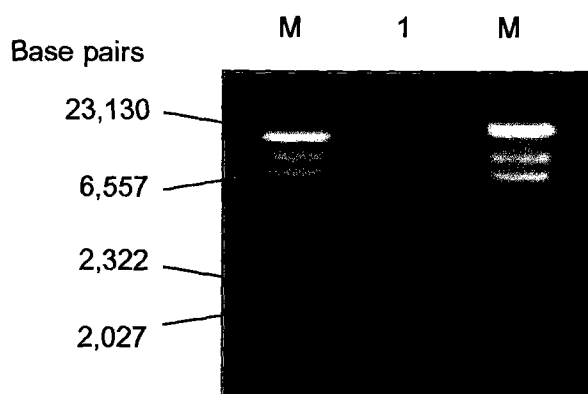
เนื่องจากลำดับเบสของ 18S ที่ได้ข้างต้นนั้นเป็นเพียงส่วนหนึ่งของ 18S ทั้งหมด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องนำลำดับเบสของ 18S ที่ได้ไปเข้า website ของ National Centre for Biotechnology Information (NCBI, U.S.A.) [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อหาความเหมือนของลำดับเบสที่ได้นี้กับลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยใช้ฐานข้อมูลจาก GenBank ซึ่งมีวิธีทำดังนี้



จากการทำตามขั้นตอนข้างต้น จะได้ลำดับเบสจากสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมือนกับ 18S ของ *P. heterotremus* นำลำดับเบสเหล่านี้มาใช้ในการออกแบบ primer ได้ดังนี้

primer C (reverse) 5' CGGAAACCTTGTTACGACTTTTAC 3'

นำ primer A และ primer C มาใช้ในการทำ PCR โดยให้มีส่วนผสมต่างๆ และความเข้มข้นเหมือนในตาราง 8 การทดลองนี้ได้ผลดังภาพประกอบ 18



M = lambda DNA-*Hind* III

1 = PCR product ของ 18S มีความ
ยาวประมาณ 2,000 bp

ภาพประกอบ 18 แสดงผล PCR product ที่ได้จาก primer A และ primer C

นำ PCR product ของ 18S ไปหาลำดับเบส ซึ่งได้ผลดังนี้

```

1   AGTATTGCTTGTCTCAGAGATTAAGCNTGCATGTCTAAGTACATACCTCA
51  AAACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGCTATGGTTCCTTAGAT
101 CGTACATACTACATGGATAACTGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCCA
151 CTATGCCCTGACCCGCGAGGGAACGGGTGGATTTATTAGAACAGAACCAA
201 CCGGTTGTGGCTTCGGCTGCTTCCGTTGTACTCTGTGATGACTCTGGATA
251 ACTTCACTGATCGCGTCGGCCTTGTGTGCGCGACGGATCTTCAAATGTC
301 TGCCCTATCAATTTACGATGGTAGGTGACCTGCCTACCATGGTGATAACG
351 GGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGC
401 TACCACTTCCAAGGAAGGCAGCANGCACGCAAATTACCCAATCCCGGCAC
451 GGGGAGGTAGTGACGAAAAATACGAATACGGGACTCAACAGAGGCTCCGT
501 AATTCGAATGAGTACAATTTAAATCCTTTAACGAGGATCAACTGGAGGGC
551 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAACCTCCAGCTCCAGAAGCGTATATTA
601 AAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTGGGTCGCATGGCTAC
651 GTGCCGTGCGCTCACTTTCTCGGTTGGCTGTTAAGGCCCTGGGTTTGGTGG
701 GTCGGTGTGCTGGTTGTGTGGTCTTTCTGCCGTGTCTGTTTTGCAGGTGC
751 TGACTAGGCCTTCGGGTTTGTGCGCATGCTTCCAGATGCCTTTAAACGGG
801 TGTCGGGGGCGGACGGCACGTTTACTTTGAACAAATTTGAGTGCTCAAAG
851 CAGGCCCTTGTGCCTGAAAAATTCTTGCATGGAATAATGGAATAGGACTTC
901 GGGTTCTATTTTGTGTTGGTTTTTCGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACA
951 GACGGGGGCATTTGTATGGCGGTGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGCCG
1001 CCAGACAAACTACAGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTATTGATCTG
1051 GAGCGAAAGTCAGAGGTTGGAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTTCTGAC
1101 CATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGGTGGTCTTTTATTGTCCCCGC
1151 GGGCAGTCCCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGCTCCGGGGGAAGTATGG
1201 TTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTG
1251 GAGCCTGCGGCTTAATTCGACTCAACACGGGAAAACCTCACCCGGCCCCGA
  
```

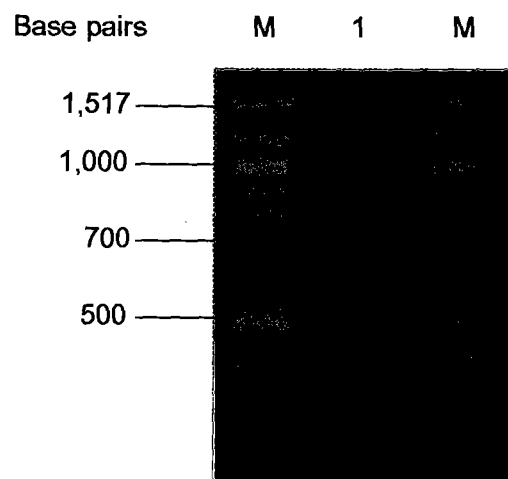
```

1301 CACTGTGAGGATTGACAGATTGAAAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGTTGGT
1351 GGTGCATGNCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGA
1401 TAACGAACGAGACTTTGGCCTGCTAAATAGTATGCCTGTCTCTGTGCTC
1451 GTGCGGGTGGCGGTGCTCGCTGCCTCTTCGGGGGTGGTGGCGTTGTTGCG
1501 CGGCGGGTGCTGCGCAGGTGTTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGGCGTGAC
1551 AGTCGCACGAAAATGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCG
1601 GGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGGTTTCAGCGAGTCTGGGAACCTGGC
1651 CCGAAAGGGTTGGGCAAACCTGAGTCATCACCGTCGTGACTGGGATCGGGG
1701 CTTGCAATTGTTCCCCGTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAAGTCATA
1751 AGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCCGTGCTAC
1801 TACCGATTGAATGGTTTAGCAAGTCTCCTCGGATTGGTGCCATTGTAGTTG
1851 TTTCGGCAGCTCGACCGGCGCTGAGAAGACGACCAAACTTGATCATT

```

3.3 ผลการศึกษาของบริเวณ ITS1

หลังจากที่นำ DNA ของ *P. heterotremus* ที่สกัดได้มาทำ PCR โดยใช้ส่วนผสมของ PCR reaction ดังตาราง 9 แล้วได้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 19

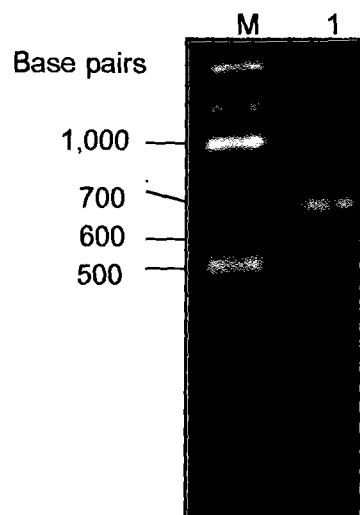


M = 100 bp ladder

1 = PCR product ของ ITS1

ภาพประกอบ 19 แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จาก primer 3 และ primer 4

ทำการ elute gel โดยใช้ Gel extraction kit ของ QIAGEN, Germany โดยเลือก band ขนาดประมาณ 700 bp ไว้ (ภาพประกอบ 20)



M = 100 bp DNA Ladder

1 = PCR product ของ ITS1 ที่ได้จากการ
elute gel โดยเลือก band ประมาณ 700 bp

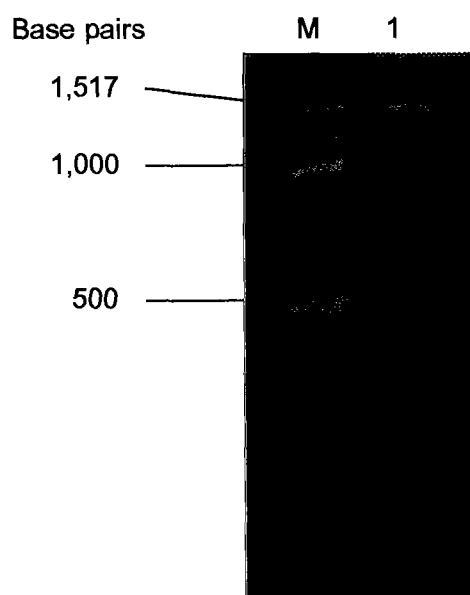
ภาพประกอบ 20 แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จากการ elute gel โดยเลือก
band ขนาดประมาณ 700 bp

นำ PCR product ของ ITS1 ขนาดประมาณ 700 bp ที่ได้จากการ elute gel ไปหา
ลำดับเบส ซึ่งได้ผลดังนี้

```

1   TNNTGTNAACCNNGGGAGAGGNCNTTGCAGAATTCCCAAAGTTGAAAATG
51  CCTCAATGANCATATGGGCANGTTTCTCCACGGGTAGTCATACTCGTTA
101 ACTGCAGCCNCGTCTGCCTCAGGTAGAGCGNTTTTNTTTTNNNTCCNTNTT
151 TTCAAANTTTTTTTATGCCNCACTCTANTGGGCCNACCTCTACCNGNTTN
201 TTGTNTANNANCGTACCGAGTCCTNCCCNCCGGGGATNGNTTTTGGCC
251 NTTNGCTTNCCTTTGTNTNTNTTTGGGGNANGNTCNNTCCNCTTTNNAT
301 CNANNCGGGGTTNNGTCNTTACCTCCTNAAAACNAGAANCNGGGNNNGNG
351 NTNTTNNNGCNTATNGGCCTNNTTGCNGCCTTTAGGCCNTNNGNTTTNGG
401 CCCNNNGNTCTTGGTTTNNNGNTNGNAAGGCCCTNCCCCANTNACNTCN
451 NGGGNACAAGTTCNGGNCCGGTCCNGGANNTANGTTTNAAGNNATTTNTC
501 NTGGNNCNTTTTCCCTGCGGNCGGGGNCCCTNGGGTTTNGAANNCCNNTN
551 TNNTGCCCTTTGGGGTCCCCCGATGATCTCACCTTNNGNNTNGNCCTTT
601 GTTTTTGGAAACCNCATGNGGTTGGGGGGGCNGGNNCCCNATTTNNN
651 AATNGCTTAGTNCTTGGNCTTTTNTTACTATCCCCNGGGGGGNNCNCNNC
701 CNTNGNTCGGGNAAAATGGCCCCTTTCCTANCTTTTTTNNNGAGGTTNA
751 NNGNGGGTTTNNCGNTTTTNGGGGNNNTTTAAANACATNTTTTCCNTNT
801 NATANANNTCCTTTNNTGNGGAANANNNGTTNTNTCTNCCCTTTNTTTCA
851 NNTCCCCCTGTTANTTCNCNNAGTCTNTCTTACNTNCTTTNTTCTNTTTA
901 TATTTNATTTTANTNCTTCTTTTCTGTTATCTNTTTTNTNCTNNTTTNT
951 TTANANTCTNATGTTTAAATNATTAAANNCNTNNTATTTNNTCNTNNATA
1001 TTTCTGACTTTCACATNTTTTANTNTTTTATATTTNTTNTTNTTCTG
1051 NTATTTTCNTNAGTNCNTTCTTCT
  
```

ทำการ elute gel ของ ITS1 ใหม่โดยใช้ Gel extraction kit ของ QIAGEN, Germany โดยครั้งนี้เลือก band ขนาดประมาณ 1,500 bp ไว้ (ภาพประกอบ 21)



M = 100 bp ladder

1 = PCR product ของ ITS1 ที่ได้จากการ elute gel

โดยเลือก band ขนาดประมาณ 1,500 bp

ภาพประกอบ 21 แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จากการ elute gel โดยเลือก band ขนาดประมาณ 1,500 bp

นำ PCR product ของ ITS1 ขนาดประมาณ 1,500 bp ที่ได้จากการ elute gel นำไปหาลำดับเบส ซึ่งได้ผลดังนี้

```

1   ANGTGAACCCGCGGAAGGGATCATTACAGAATTCNNAATNCCANAANCAT
51  GCCTGCGCAGCATATGGGCATAGTCTNNNCNACGGGTAGNACATACTNNT
101 CAAATGCATGCCTCGNCTGNCACAGGTGGAGCGCCTCTATCNTCTGCCAT
151 TAAGATTCGACTGTGCCTGGCACACTCNGGTGCCTACGNACAGNTAGATC
201 TTTNCNGATNAGCCTTCNNGTTTGTNGGATGCANTCTCTTCTGCCTNANG
251 ATGGAGCGTNNNTNCTTTANNCATNNGANNCTACTGTGCCATGGNACACT
301 CNATNNCNTACGTACAGTTGGATTTTACTTATGAACCTTTNNNTTGT
351 NGATGCANTCTCATNGCTANANGNNGAGCGTCAGCTNTNTTGCCTTAAT
401 GATTTTNTACTGAANTCNNNNTCAANTAANANATTCTTANTAATATGTCA
451 NNTTTNTNTTTCTGATAGCTATTNTCNTTAATATNNTTTGATGAATTTCT
501 TATNTNATATTGATNNTNNTTTTNNNTTCTTNATTTTNTNTNTANTNN
551 ATATTTNNNNTANTAATANTNATTANNTTNNNNNANNAGATTTTANGTNA
601 TTCCTTNAAGATTATTATNNTAANANNTTANTTTTNTANTTAATAAGANT
651 ANTAANNANTNNNTATATNNNANNTNTNTNNTANTNNTTATANTTAAT
701 NTNNTATTNAACTTNCTTTTGNTTNTAANNNTATTAANAANAGTTTAA
  
```

751 NNANTAATTNTTNTNNAANNTTTNTTTTTTTNTNCTATTNAANNTNAC
 801 NATTTTTTTTNANTATTTAATTAATNNTTNTANTTNNTATTNTTNTTGT
 851 TTTTANTATNTATTNTTATNTGNTTNACTTTTNTTTTTTNTTANTNTTTAN
 901 CNTNATNNNTTAAANTTTATTATNCACTGNTTATNTAAGATGNTATAATN
 951 ANATCANNGATCGTTANNGAATATTTTCNAATATTTTTATCATTTAAATA
 1001 TCNTATTATNTNNANNATTATNTNTTGATATTATAANCANATCANNNTTA
 1051 ATANTCTNTATTTTTTNATNTNATANTATTNTTATNANANTTAAGATANC
 1101 TANNANAANTANCT

ดึงจะเห็นได้ว่าผลการทดลองของ ITS1 นั้นได้ผลไม่ดีเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากลำดับเบสยังคงมี N มากซึ่ง N นี้อาจจะเป็นเบส A, T, C, G ก็ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการออกแบบ primers ใหม่ โดยใช้โปรแกรม PRIMERS ซึ่งมี website ดังนี้

<http://bioinformatics.weizmann.ac.il>

Primers ที่ได้คือ primer 5 (forward) 5' TACGTCCCTGCCCTTTGTAC 3'

primer 6 (reverse) 5' ATCCAGTCACCCAGACGAAC 3'

ซึ่งทาง สวทช. ได้ทำการสังเคราะห์ให้

ตาราง 13 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction สำหรับ ITS1 โดยใช้ primers คู่มือ

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (μl)
Sterile distilled water	17.7
10 X PCR buffer	2.5
50 mM MgCl ₂	1
dNTPs (10mM)	0.5
Primer 5 (23 μM)	1
Primer 6 (23.05 μM)	1
DNA template	1
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0.3
รวม	25

- นำ microtube ที่มีส่วนผสมดังข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที

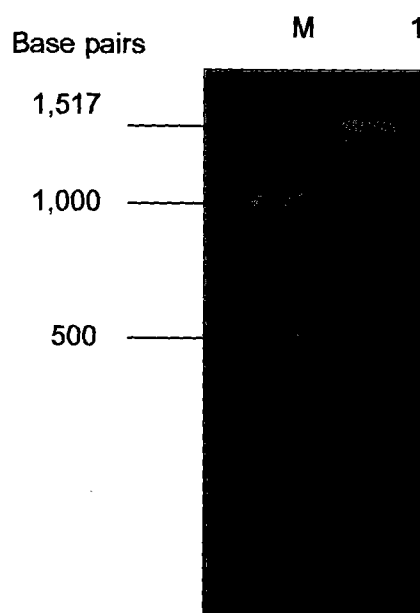
- แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturing step 95°C 1 นาที

Annealing step 57°C 1 นาที

Extension step 72°C 1 นาที

ทำซ้ำ 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ DNA มาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 22



M = 100 bp ladder

1 = PCR product ของ ITS1 ที่ได้จาก primer 5 และ primer 6 โดยมี band ขนาดประมาณ 1,500 bp

ภาพประกอบ 22 แสดงผล PCR product ของ ITS1 ที่ได้จาก primer 5 และ primer 6

นำ PCR product ที่มี band ขนาดประมาณ 1,500 bp มาหาลำดับเบสโดยใช้ทั้ง primer 5 (forward primer) และ primer 6 (reverse primer) ซึ่งได้ผลดังนี้

ลำดับเบสที่ได้จาก primer 5

```

1      CCNTTGGTAANAACCCANTGAATGNTTNANCAAANGGNCCTCCGGTATT      50
51     GGTGCCATTGTAGNNGTTTCGGCAGCTCGACCGGCGCTGAGAAGACGACC      100
101    AAACCTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACACGGTCTCCGTAGGT      150
151    GAACCTGCGGAAGGACAATTCCATGAACTAGCCAAAATTCTAACCCAGAC      200
201    GCGTCAAAGCACTTATAGGCTCAATTCANCCACGCATTNCNCCNAATCCCA      250
251    TNAACCANCCGAANTCNNNATCTANNTANGNGCAGTNCTAATTACCGCCC      300
301    GGNAN
  
```

ลำดับเบสที่ได้จาก primer 6

1	AGATATGCATGNNCAAGTGTTNGGAGCTATCCCATATGGTNGANGTGCNG	50
51	ANGGCAGCGAATTCACCTTAGTGATTTGTAAGGATAGCGCAGGGGCTTCCT	100
101	GCGTCCGCCCTGTTTTGTTTCAATTTATGCCATTTTACACTGTTCAAGTG	150
151	GTTTCAGGTCGGCCTGTCTGACTTGGTCCATTGCCCGACATGCACCCGGT	200
201	ACTGCATGTACAGTCGCCTGTCGGTGC	

4. ผลจากการทำ sequence alignment

4.1 การทำ sequence alignment ของ ITS2 ของ *P. heterotremus* เทียบกับพยาธิใบไม้
ปอดสปีชีส์อื่น ด้วยโปรแกรม ClustalW ได้ผลดังนี้

<i>P. heterotremus</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. macrorchis</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. miyazakii</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. skrjabini</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. ohirai</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. harinasutai</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. westermani</i> (Thailand)	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. westermani</i> (Japan)	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. siamensis</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. kellicotti</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30
<i>P. mexicanus</i>	ATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCA	30

<i>P. heterotremus</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. macrorchis</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. miyazakii</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. skrjabini</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. ohirai</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. harinasutai</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. westermani</i> (Thailand)	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. westermani</i> (Japan)	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. siamensis</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. kellicotti</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60
<i>P. mexicanus</i>	CGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTAT	60

*

<i>P. heterotremus</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. macrorchis</i>	CGCAACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. miyazakii</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. skrjabini</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. ohirai</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. harinasutai</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. westermani</i> (Thailand)	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. westermani</i> (Japan)	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. siamensis</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTC	90
<i>P. kellicotti</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGCTTGGGTT	90
<i>P. mexicanus</i>	CGCGACGCCCAAAAAGTCGCGGTTTGGGTT	90

*

*

*

*

<i>P. heterotremus</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCAACCTGG	120
<i>P. macrorchis</i>	CTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCAACCTGG	120
<i>P. miyazakii</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCAACCTGG	120

<i>P. skrjabini</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCAACCTGG	120
<i>P. ohirai</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCAATCTGA	120
<i>P. harinasutai</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCGGTCTGA	120
<i>P. westermani</i> (Thailand)	TTGCCAGCTGGCGTGATCTCCCCAATCTGG	120
<i>P. westermani</i> (Japan)	TTGCCAGCTGGCGTGATCTCCCCAATCTGG	120
<i>P. siamensis</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATCTCCCCAATCAGG	120
<i>P. kellicotti</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATCTCCCCAATCTAG	120
<i>P. mexicanus</i>	TTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCCAATCTGG	120
	* * *	
<i>P. heterotremus</i>	CCTTGTGTCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGG	150
<i>P. macrorchis</i>	CCTCGTGTCTGTGGGGTGCCGGATCTGTGG	150
<i>P. miyazakii</i>	CCTCGTGGCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGG	150
<i>P. skrjabini</i>	CCTCGTGGCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGG	150
<i>P. ohirai</i>	CCATGTGTGGTGGGGTGCCAGATCTATGG	150
<i>P. harinasutai</i>	CCTTGTGTCTGGTGGGGTGCCAGATCTATGG	150
<i>P. westermani</i> (Thailand)	TCTTGTGCCTGTGGGGTGCCAGATCTATGG	150
<i>P. westermani</i> (Japan)	TCTTGTGCCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGG	150
<i>P. siamensis</i>	TCTCGTGCCTGTGGGGTGTCAGATCTATGG	150
<i>P. kellicotti</i>	CTTTGTGCCAGTGGGGTGCCAGATCTATGG	150
<i>P. mexicanus</i>	TATTGTGCCAGTGGGGTGCCAGATCTATGG	150
	*** * *	
<i>P. heterotremus</i>	CGTTTCCCTAACAAATCCGGGCGTATCCAT	180
<i>P. macrorchis</i>	CGTTTCCCTAAAAAATCCGGACGTACCCGT	180
<i>P. miyazakii</i>	CGTTTCCCTAACATATCCGGGCGTACCCAT	180
<i>P. skrjabini</i>	CGTTTCCCTAACATATCCGGGCGTACCCAT	180
<i>P. ohirai</i>	CGTTTCCCTAACCTATCCGGGCGTACCCAT	180
<i>P. harinasutai</i>	CGTTTCCCTAACCTGTCCGGGCGTACCCAT	180
<i>P. westermani</i> (Thailand)	CGTTTCCCTAACATACTCGCGCGCACCCAC	180
<i>P. westermani</i> (Japan)	CGTTTCCCTAACATACTCGGGCGCACCCAC	180
<i>P. siamensis</i>	CGTTTCCCTAACATACTCGGGCGCACCCAC	180
<i>P. kellicotti</i>	CGTTTCCCTAACAAATCCGGGCGTACCCAT	180
<i>P. mexicanus</i>	CGTTTCCCTAATAAATCCGTGCGTACCCAT	180
	***** ** *	
<i>P. heterotremus</i>	GTTGTGGCTGAAAGCCTTGATGGGGATGTG	210
<i>P. macrorchis</i>	GTTGTGGCTGAAAGCCTTGATGGGGATGTG	210
<i>P. miyazakii</i>	GTTGTGGCTGAAAGCCTTGATGGGGATGTG	210
<i>P. skrjabini</i>	GTTGTGGCTGAAAGCCTTGATGGGGATGTG	210
<i>P. ohirai</i>	GTTGTGGCTGAAGGCCTTGGTGGGGATGTG	210
<i>P. harinasutai</i>	GTTGTGGCTGAAGGCCTTGGTGGGGATGTG	210
<i>P. westermani</i> (Thailand)	GTTGCGGCTGAAAGCCTTGACGGGGATGTG	210
<i>P. westermani</i> (Japan)	GTTGCGGCTGAAAGCCTTGACGGGGATGTG	210
<i>P. siamensis</i>	GTTGCGGCTGAAAGCCTTGACGGGGATGTG	210
<i>P. kellicotti</i>	GTTGTGGCTGAAAGCCTTGATGGGGATGTG	210
<i>P. mexicanus</i>	GTTGCGGCTGAAAGCCTTGATGGGGATGTG	210
	* * *	
<i>P. heterotremus</i>	GCAACGGAGTCGTGGCTCAGTGAATGATTT	240
<i>P. macrorchis</i>	GCAACGGAGTCGTGGCTCAGTGAAAAATTT	240
<i>P. miyazakii</i>	GCAACGGAATCGTGGCTCAGTGATTGATT-	239
<i>P. skrjabini</i>	GCAACGGAATCGTGGCTCAGTGATTGATT-	239
<i>P. ohirai</i>	GCAACGGAATCGTGGCTCAGTGGATTATTT	240
<i>P. harinasutai</i>	GCAACGGAATCGTGGCTCAGTGAATTATTT	240
<i>P. westermani</i> (Thailand)	GCAACGGAATCGTGGCTCAGTAAATGATTT	240
<i>P. westermani</i> (Japan)	GCAACGGAATCGTGGCTCAGTGAATGATTT	240
<i>P. siamensis</i>	GCAACGGAATCGTGGCTCAGTAGATGAATT	240

<i>P. kellicotti</i>	GCAGCGGAGTCGTGGCTCAGTGAATAATTT	240
<i>P. mexicanus</i>	GTAGCGGAGTCGTGGCTCAGTAAATAATTT	240
	* * * *****	
<i>P. heterotremus</i>	ATGTGCACGTTCCGCTGTCCCGTCATCATC	270
<i>P. macrorchis</i>	ATGTGCGCGTTCCGCTGTCTGTATCATC	270
<i>P. miyazakii</i>	-TGTGCGCGTTCCGCTATCCTATCATCGTC	268
<i>P. skrjabini</i>	-TGTGCGCGTTCCGCTATCCTATCATCGTC	268
<i>P. ohirai</i>	ATGTGCGCGTTCCGTTGTCTATCATCATC	270
<i>P. harinasutai</i>	ATGTGCGCGTTCCGTCGTCTATCATCATC	270
<i>P. westermani</i> (Thailand)	ATGTGCGCGTTTCCGCTGTCTGTCTTCATC	270
<i>P. westermani</i> (Japan)	ATGTGCGCGTTCCGCTGTCTGTCTTCATC	270
<i>P. siamensis</i>	ATGTGCGCGTTCCGTTGTCTGTCTTCATC	270
<i>P. kellicotti</i>	ATGTGCACGTTCCGCTGTCTGTCTCATC	270
<i>P. mexicanus</i>	GTGTGCACGTTCCGCTGTCTGTCTCATC	270
	* * *** ** *	
<i>P. heterotremus</i>	TATGGTTGAAGTTGCGCGTGGTGTGT--CC	298
<i>P. macrorchis</i>	TTTGGTTGATGTTGCATGTGGTGT----CC	296
<i>P. miyazakii</i>	TATGGTTGATGTTGCGCGTGGTGTGTGCCC	298
<i>P. skrjabini</i>	TATGGTTGATGTTGCGCGTGGTGTGTGCCC	298
<i>P. ohirai</i>	TATGGTTGATGCTGCGCATGGTGTGCGTCT	300
<i>P. harinasutai</i>	TATGGTTGATGCTGCGTGTGGTGTGCGTTC	300
<i>P. westermani</i> (Thailand)	TGTGGTTTCATGTTGCGCGTGGTCTGCGTTC	300
<i>P. westermani</i> (Japan)	TGTGGTTTATGTTGCGCGTGGTCTGCTTTC	300
<i>P. siamensis</i>	TGTGGTTTATGTTGCGCGTGGTCTGTGTCC	300
<i>P. kellicotti</i>	TATGGTTGATGCTGCGCGTGGTGT--ATCC	298
<i>P. mexicanus</i>	TATGGTTGACGCTGCGCGTGGTGTGCATCC	300
	* * * * *	
<i>P. heterotremus</i>	GATGCTGACCTATATATGTGCCATGTGGCT	328
<i>P. macrorchis</i>	GATGCTGACCTATGTTTGTGCCGTGCGGCT	326
<i>P. miyazakii</i>	GATGCTGACCTATGTATGTGCCATGTGGCT	328
<i>P. skrjabini</i>	GATGCTGACCTATGTATGTGCCATGTGGCT	328
<i>P. ohirai</i>	GACGCCAACCTACGTATGGGCCGTGTGGCT	330
<i>P. harinasutai</i>	GATGCTGACCTGAGTATGTGCCATGTGGCT	330
<i>P. westermani</i> (Thailand)	GATGCTGACCTACGTATGTGCCATGTGGTC	330
<i>P. westermani</i> (Japan)	GATGCTGACCTACGTATGTGCCATGTGGTT	330
<i>P. siamensis</i>	GACGTTGACCTATCTATGTGCCATATGGTT	330
<i>P. kellicotti</i>	GATGATCTATG---TATGTGCCACGTGGCT	325
<i>P. mexicanus</i>	GATGCTGACCAA--CGTGTGCCATGTGGCG	328
	* ***** *	
<i>P. heterotremus</i>	CATTTTCCTGACCTCGGATCANACGTGAGT	358
<i>P. macrorchis</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	356
<i>P. miyazakii</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGNGAGT	358
<i>P. skrjabini</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	358
<i>P. ohirai</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	360
<i>P. harinasutai</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	360
<i>P. westermani</i> (Thailand)	CATTCTTCTGACCTCGGATTAGACGTGAGT	360
<i>P. westermani</i> (Japan)	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	360
<i>P. siamensis</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	360
<i>P. kellicotti</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	355
<i>P. mexicanus</i>	CATTCTCCTGACCTCGGATCAGACGTGAGT	358
	* * * *	
<i>P. heterotremus</i>	ACC	361
<i>P. macrorchis</i>	ACC	359
<i>P. miyazakii</i>	ACC	361

<i>P. skrjabini</i>	ACC	361
<i>P. ohirai</i>	ACC	363
<i>P. harinasutai</i>	ACC	363
<i>P. westermani</i> (Thailand)	ACC	363
<i>P. westermani</i> (Japan)	ACC	363
<i>P. siamensis</i>	ACC	363
<i>P. kellicotti</i>	ACC	358
<i>P. mexicanus</i>	ACC	361

(* คือลำดับเบสที่แตกต่างกัน)

4.2 การทำ sequence alignment ของ 18S ของ *P. heterotremus* เทียบกับพยาธิใน
จิ้งหรีดอื่นๆ โดยใช้ *Diphyllbothrium stemmacephalum* เป็น outgroup ด้วยโปรแกรม
ClustalW ได้ผลดังนี้

<i>Paragonimus heterotremus</i>	AGT-AT-TGCTTGTCTCAGAGATTAAGCN-	27
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	AGTCATATGCTTGTCTCAGAGATTAAGCCA	30
<i>Fasciola hepatica</i>	---CATATGCTTGTCTCAGAGATTAAGCCA	27
<i>Fasciola gigantica</i>	AGTCATATGCTTGTCTCAGAGATTAAGCCA	30
<i>Echinostoma caproni</i>	AGTCATATGCTTGTCTCAGAGATTAAGCCA	30
<i>Schistosoma mansoni</i>	AGTCATATGCTTGTCTCAGAGATTAAGCCA	30
<i>Diphyllbothrium stemmacephalum</i>	AGTCATATGCNTGTCTCAAAGATTAAGCCA	30
	**** * * *	**
<i>P. heterotremus</i>	TGCATGTCTAAGTACATACCTCAAAACGGT	57
<i>D. dendriticum</i>	TGCATGTCTAAGTACAGACCTTCAAACGGT	60
<i>F. hepatica</i>	TGCATGTCTAAGTACATACCTTTAAACGGT	57
<i>F. gigantica</i>	TGCATGTCTAAGTACATACCTTGAAACGGT	60
<i>E. caproni</i>	TGCATGTCTAAGTACATACCTTCAAACGGT	60
<i>S. mansoni</i>	TGCATGTCTAAGTACATACCTTAAACGGT	60
<i>D. stemmacephalum</i>	TGCATGTCTAAGTGCACGCCCTTCATACGGT	60
	* ** ** *	
<i>P. heterotremus</i>	GAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTA	87
<i>D. dendriticum</i>	GAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTA	90
<i>F. hepatica</i>	GAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTA	87
<i>F. gigantica</i>	GAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTA	90
<i>E. caproni</i>	GAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTA	90
<i>S. mansoni</i>	GAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTA	90
<i>D. stemmacephalum</i>	GAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGCTA	90
<i>P. heterotremus</i>	TGGTTCCTTAGATCGTACATACTACATGGA	117
<i>D. dendriticum</i>	TGGTTCCTTAGATCGTACATACTACATGGA	120
<i>F. hepatica</i>	TGGTTCCTTGGATCGTACATACTACATGGA	117
<i>F. gigantica</i>	TGGTTCCTTGGATCGTACATACTACATGGA	120
<i>E. caproni</i>	TGGTTCCTTGGATCGTACATTGTACATGGA	120
<i>S. mansoni</i>	TGGTTCCTTAGATCGTAAACGCTACATGGA	120
<i>D. stemmacephalum</i>	TGGTTTATTGGATCATACCCGTTAAATGGA	120
	** * * ***** *	
<i>P. heterotremus</i>	TAAGTGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATG	147
<i>D. dendriticum</i>	TAAGTGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATG	150
<i>F. hepatica</i>	TAAGTGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATG	147
<i>F. gigantica</i>	TAAGTGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATG	150
<i>E. caproni</i>	TAAGTGTACTAATTCTAGAGCTAATACATG	150
<i>S. mansoni</i>	TAAGTGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATG	150

<i>D. stemmacephalum</i>	TAAGTGTAAATACTCTAGAGCTAATACATG	150
	* *	
<i>P. heterotremus</i>	CCACTATGCCCTGACCCGCGAGGGAACGGG	177
<i>D. dendriticum</i>	CCACTATGCCCTGACCCGCGAGGGAACGGG	180
<i>F. hepatica</i>	CCACTATGCCCTGACCCGCGAGGGAACGGG	177
<i>F. gigantica</i>	CCACTATGCCCTGACCCGCGAGGGAACGGG	180
<i>E. caproni</i>	CCACTATGCCCTGACCCGCAAGGGAACGGG	180
<i>S. mansoni</i>	CCTTGAATCCCTGACCCGCAAGGGGACGGG	180
<i>D. stemmacephalum</i>	CCCCGAAGCCCTGACCCGCGAGGGAATGGG	180
	*** ** *	
<i>P. heterotremus</i>	TGGATTTATTAGAACAGAA-CCAACCGGTT	206
<i>D. dendriticum</i>	TGGATTTATTAGAACAGAA-CCAACCGGTT	209
<i>F. hepatica</i>	TGGATTTATTAGAACAGAA-CCAACCGGGG	206
<i>F. gigantica</i>	TGGATTTATTAGAACAGAA-CCAACCGGGG	209
<i>E. caproni</i>	TGGATTTATTAGAACAGAA-CCAACCGGGG	209
<i>S. mansoni</i>	TGCATTTATTAGAACAGAA-CCAACCGGGT	209
<i>D. stemmacephalum</i>	TGCACTTATTAGATCAGAAGCCAACCGGT	210
	* * * *	
<i>P. heterotremus</i>	G-----TGGCTTCGGCTGCT---TCC	224
<i>D. dendriticum</i>	G-----TGGCTTCGGTCACT---TCC	227
<i>F. hepatica</i>	G-----CGGCTTCGGTCGTC---CCT	224
<i>F. gigantica</i>	G-----CGGCTTCGGTCGTC---CCT	227
<i>E. caproni</i>	G-----CGGCTTCAGTCGTT---CCT	227
<i>S. mansoni</i>	G-----CGGCTTCGGCTGTG---CCT	227
<i>D. stemmacephalum</i>	AGTGTCTCTCGCTTTCGGGCGGGAGCTCC	240
	***** ** *	
<i>P. heterotremus</i>	GTTGTAATCTGT-----GATGACTCTGGA	248
<i>D. dendriticum</i>	GTTGCAATCTGT-----GATGACTCTGGA	251
<i>F. hepatica</i>	GTTGCAATCTGT-----GATGACTCTGGA	248
<i>F. gigantica</i>	GTTGCAATCTGT-----GATGACTCTGGA	251
<i>E. caproni</i>	GTTGCAATCTGT-----GATGACTCTGGA	251
<i>S. mansoni</i>	GTTACATCTGT-----GATGACTCTGGA	251
<i>D. stemmacephalum</i>	GCTGCCTGTCGTCCTTCTGGTGACTCTGGA	270
	* ***** *	
<i>P. heterotremus</i>	TAACT-TCACTGATCGC-GTCGGCCTTGTTG	276
<i>D. dendriticum</i>	TAACT-TCACTGATCGCAGTCGGCCTTGTTG	280
<i>F. hepatica</i>	TAACT-TCACTGATCGCAGTCGGCCTTGTTG	277
<i>F. gigantica</i>	TAACT-TCACTGATCGCAGTCGGCCTTGTTG	280
<i>E. caproni</i>	TAACT-TCACTGATCCGAGTCGGCCTTGTTG	280
<i>S. mansoni</i>	TAACT-TTACTGATCGCAGTCGGCCTTGTTG	280
<i>D. stemmacephalum</i>	TAATTGTTACAGATCGCAGTCGGCCTTGCG	300
	* * * * *	
<i>P. heterotremus</i>	TCGGCGACGGATCTTTCAAATGTCTGCCCT	306
<i>D. dendriticum</i>	TCGGCGACGGATCTTTCAAATGTCTGCCCT	310
<i>F. hepatica</i>	TCGGCGACGGATCTTTCAAATGTCTGCCCT	307
<i>F. gigantica</i>	TCGGCGACGGATCTTTCAAATGTCTGCCCT	310
<i>E. caproni</i>	TCGGCGACGGATCTTTCAAATGTCTGCCCT	310
<i>S. mansoni</i>	TCGGCGACGGATCTTTCAAATGTCTGCCCT	310
<i>D. stemmacephalum</i>	TCGGCGACGGGTCCTTCAAATGTCTGCCCT	330
	* *	
<i>P. heterotremus</i>	ATCAATTTACGATGGTAGGTGACCTGCCTA	336

<i>D. dendriticum</i>	ATCAATTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTA	340
<i>F. hepatica</i>	ATCAATTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTA	337
<i>F. gigantica</i>	ATCAATTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTA	340
<i>E. caproni</i>	ATCAATTTACGATGGTAGGTGACCTGCCTA	340
<i>S. mansoni</i>	ATCAATTT--GTTGGTAGGTGATTGCCTA	338
<i>D. stemmacephalum</i>	ATCAACTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTA	360
	* * * *	
<i>P. heterotremus</i>	CCATGGTGATAACGGGTAACGGGGAATCAG	366
<i>D. dendriticum</i>	CCATGGTGATAACGGGTAACGGGGAATCAG	370
<i>F. hepatica</i>	CCATGGTGCTAACGGGTAACGGGGAATCAG	367
<i>F. gigantica</i>	CCATGGTGCTAACGGGTAACGGGGAATCAG	370
<i>E. caproni</i>	CCATGGTTCTAACGGGTAACGGGGAATCAG	370
<i>S. mansoni</i>	CCATGATGATAACGGGTAACGGGGAATCAG	368
<i>D. stemmacephalum</i>	CCATGGTGATAACGGGTAACGGGGAATCAG	390
	* *	
<i>P. heterotremus</i>	GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA	396
<i>D. dendriticum</i>	GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA	400
<i>F. hepatica</i>	GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA	397
<i>F. gigantica</i>	GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA	400
<i>E. caproni</i>	GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA	400
<i>S. mansoni</i>	GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA	398
<i>D. stemmacephalum</i>	GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAA	420
<i>P. heterotremus</i>	CGGCTACCACTTCCAAGGAAGGCAGCANGC	426
<i>D. dendriticum</i>	CGGCTACCACTTCCAAGGAAGGCAGCAGGC	430
<i>F. hepatica</i>	CGGCTACCACTTCCAAGGAAGGCAGCAGGC	427
<i>F. gigantica</i>	CGGCTACCACTTCCAAGGAAGGCAGCAGGC	430
<i>E. caproni</i>	CGGCTACCACTTCCAAGGAAGGCAGCAGGC	429
<i>S. mansoni</i>	TGGCTACCACATCCAAGGACGGCAGCAGGC	428
<i>D. stemmacephalum</i>	CGGCTACCACTTCCAAGGGAGGCAGCAGGC	450
	* * * *	
<i>P. heterotremus</i>	ACGCAAATTACCCAATCCCGGCACGGGGAG	456
<i>D. dendriticum</i>	GCGCAAATTACCCAATCCCGGCACGGGGAG	460
<i>F. hepatica</i>	ACGCAAATTACCCAATCCCGGCACGGGGAG	457
<i>F. gigantica</i>	ACGCAAATTACCCAATCCCGGCACGGGGAG	460
<i>E. caproni</i>	ACGCAAATTACCCAATCCCGGCACGGG-AG	459
<i>S. mansoni</i>	GCGAAAATTACCCACTCCCGGCACGGGGAG	458
<i>D. stemmacephalum</i>	GCGCAAATTACTCACTCCCAGTACGGGGAG	480
	* * * * *	
<i>P. heterotremus</i>	GTAGTGACGAAAAATACGAATACGGGACTC	486
<i>D. dendriticum</i>	GTAGTGACGAAAAATACGGATACGGGACTC	490
<i>F. hepatica</i>	GTAGTGACGAAAAATACGGATACGGGACTC	487
<i>F. gigantica</i>	GTAGTGACGAAAAATACGGATACGGGACTC	490
<i>E. caproni</i>	GTAGTGACGAAAAATACGGATACGGGACTC	489
<i>S. mansoni</i>	GTAGTGACGAAAAATACGTATACGGGACTC	488
<i>D. stemmacephalum</i>	GTGGTGACGAAAAATACCGATGCGGGACTC	510
	* * * *	
<i>P. heterotremus</i>	A-ACAGAGGCTCCGTAATTCGAATGAGTAC	515
<i>D. dendriticum</i>	A-TCAGAGGCTCCGTAATTCGAATGAGTAC	519
<i>F. hepatica</i>	A-CTAGAGGCTCCGTAATTCGAATGAGTAC	516
<i>F. gigantica</i>	A-CTAGAGGCTCCGTAATTCGAATGAGTAC	519
<i>E. caproni</i>	A-ATAGAGGCTCCGTAATTCGAATGAGTAC	518

<i>S. mansoni</i>	A-ATTGAGGCTCCGTAATTCGAATGATTAC	517
<i>D. stammacephalum</i>	TTATTGAGGCTCCGTAATTCGGAATGAGTGA	540
	***** ** * **	
<i>P. heterotremus</i>	AATTTAAATCCTTTAACGAGGATCAACTGG	545
<i>D. dendriticum</i>	ACTTTAAATCCTTGTACGAGGATCAACTGG	549
<i>F. hepatica</i>	AATTTAAATCCTTTAACGAGGATCAACTGG	546
<i>F. gigantica</i>	AATTTAAATCCTTTAACGAGGATCAACTGG	549
<i>E. caproni</i>	AATTTAAATCCTTTAACGAGGATCAACTGG	548
<i>S. mansoni</i>	AATTTAAATCCTTTAACGAGGACCAATTGG	547
<i>D. stammacephalum</i>	ACTCTAAATCCTTTACGAGGATCAATTGG	570
	* * ** * *	
<i>P. heterotremus</i>	AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA	575
<i>D. dendriticum</i>	AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA	579
<i>F. hepatica</i>	AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA	576
<i>F. gigantica</i>	AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA	579
<i>E. caproni</i>	AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA	578
<i>S. mansoni</i>	AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA	577
<i>D. stammacephalum</i>	AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA	600
<i>P. heterotremus</i>	ACTCCAGCTCCAGAAGCGTATATTAAAGTT	605
<i>D. dendriticum</i>	ACTCCAGCTCCAGAAGCGTATATTAAAGTT	609
<i>F. hepatica</i>	ACTCCAGCTCCAGAAGCGTATATTAAAGTT	606
<i>F. gigantica</i>	ACTCCAGCTCCAGAAGCGTATATTAAAGTT	609
<i>E. caproni</i>	ACTCCAGCTCCAGAAGCGTATATTAAAGTT	608
<i>S. mansoni</i>	ACTCCAGCTCCAAAAGCGTATATTAAAGTT	607
<i>D. stammacephalum</i>	ACTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTT	630
	**	
<i>P. heterotremus</i>	GTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCT	635
<i>D. dendriticum</i>	GTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCT	639
<i>F. hepatica</i>	GTTGCAGTTCAAAAGCTCGTAGTTGGATCT	636
<i>F. gigantica</i>	GTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCT	639
<i>E. caproni</i>	GTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCT	638
<i>S. mansoni</i>	GCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATCT	637
<i>D. stammacephalum</i>	GCTGCAGTTAAAAAGCTNGTAGTTGGATCT	660
	* * * *	
<i>P. heterotremus</i>	GGGTCGCATGGCTACGTGCCGTCGCTCA-C	664
<i>D. dendriticum</i>	GGGTCGCATGGCTACATGCTG-CGCTCG-T	668
<i>F. hepatica</i>	GGGTCGCATGGCTACATGCCGTCGCTCG-T	665
<i>F. gigantica</i>	GGGTCGCATGGCTACATGCCGTCGCTCG-T	668
<i>E. caproni</i>	GGGTCGCATGGCTACATGCCGTCGCTCG-T	667
<i>S. mansoni</i>	GGGTCGTCGGTCGCATGCCGTTGCTTG-T	666
<i>D. stammacephalum</i>	CGGTATCACTGTCGCCTGCCAGTCCCTCGGC	690
	* ***** ** * ***** *	
<i>P. heterotremus</i>	TTTCTCGGT-TGGCTGTTAAGGCCCTGG-G	692
<i>D. dendriticum</i>	ATTTCCAATCTGGTTACGACTGGAGCGG-A	696
<i>F. hepatica</i>	GGGTCTGGCCTGGTTACTGCCGGGTTGA-G	694
<i>F. gigantica</i>	GGGTCTGGCCTGGTTACTGCCGGGTTGA-G	697
<i>E. caproni</i>	TGGTGTGATCTGGTTACGACCGGATCAA-G	696
<i>S. mansoni</i>	TCACG-GTTTTGGTTACGATCAGGACCA-G	694
<i>D. stammacephalum</i>	TGATTATGTCTGTGTGCAGGTGGGACCGTG	720
	***** ** *****	

<i>P. heterotremus</i>	TTTGG-----	697
<i>D. dendriticum</i>	TTTG-----	700
<i>F. hepatica</i>	CTTG-----	698
<i>F. gigantica</i>	CTTG-----	701
<i>E. caproni</i>	CCTG-----	700
<i>S. mansoni</i>	TGTT-----	698
<i>D. stemmacephalum</i>	CCTCGCGCGGCACCCCTCGCTCAGGCGCA	750

<i>P. heterotremus</i>	-----TGGGTCGGTGTCTGTTGTGT	719
<i>D. dendriticum</i>	-----TGAGTCAGTGTCTGTTGTGC	722
<i>F. hepatica</i>	-----CGAGTCGGTCTCTGTTGTGC	720
<i>F. gigantica</i>	-----CGAGTCGGTCTCTGTTGTGC	723
<i>E. caproni</i>	-----CGAGTCGGTCTAGTGGTGTGC	722
<i>S. mansoni</i>	-----CAGCTCGGTGTAGTGGCTGTGC	720
<i>D. stemmacephalum</i>	GTCATGCTCGAGTTGGCGTGGTGGTGGTGT	780
	***** ** * *	
<i>P. heterotremus</i>	GGTCTTTCTGCCGTGTCTGTTTGTG-----	743
<i>D. dendriticum</i>	AGCCTTTCTGCCGTGTCTGGTTTC-----	746
<i>F. hepatica</i>	TTCTTTCTGCTGTGTCTG-TTTA-----	743
<i>F. gigantica</i>	TTCTTTCTGCTGTGTCTG-TTTA-----	746
<i>E. caproni</i>	TTCTTTCTGCTGTGTCTG-TTTA-----	745
<i>S. mansoni</i>	AGCCTTTTCAGCCGTGTCTGTGTTAA-----	746
<i>D. stemmacephalum</i>	CACCTTTTCAGCCATGTCTGTGGTGAAATAC	810
	*** * ** *	
<i>P. heterotremus</i>	---CAGGTGCTGACT-----A-----	756
<i>D. dendriticum</i>	---CAGGTGCTGGCT-----ATCAGTG-	765
<i>F. hepatica</i>	---CAGGTGTCAGCGTG-----ACTGGTG-	764
<i>F. gigantica</i>	---CAGGTGTCAGCGTG-----ACTGGTG-	767
<i>E. caproni</i>	---CAGGTGTCAGCGTG-----ACTGGTG-	766
<i>S. mansoni</i>	---CGGGTGCTGGTG-G-----GTTGACR-	766
<i>D. stemmacephalum</i>	CCGCAGGTGTAGGCGAGTGTGAGGCGGTGC	840
	*** * *****	
<i>P. heterotremus</i>	-----GGCCTTCGGGTTTGTCTG	773
<i>D. dendriticum</i>	-----GGTTTCGTCTCGCTGTTTAGTTG	787
<i>F. hepatica</i>	-----GGCTTGCCTGCTAGTCTTGTTG	786
<i>F. gigantica</i>	-----GGCTTGCCTGCTAGTCT-GTTG	788
<i>E. caproni</i>	-----GGCTTGCCTGCTGGTCT-GTTG	787
<i>S. mansoni</i>	-----AGTTTCGTCTTGTTGACCTGTCTG	788
<i>D. stemmacephalum</i>	TCTGCGACAGTAGGGTCCGTCGGCTCGTTT	870
	***** ***** **	
<i>P. heterotremus</i>	GCATGCTTCCAGATGCCTTTAAACGGGTGT	803
<i>D. dendriticum</i>	GCATGCTTCTCGATGCCTTTCAACGGGTGT	817
<i>F. hepatica</i>	GCATGCTTCTTGGTGCCTTTAATCGGGTGT	816
<i>F. gigantica</i>	GCATGCTTCTTGGTGCCTTTAATCGGGTGT	818
<i>E. caproni</i>	GCATGCTTCTTGGTGCCTTTAAACGGGTGT	817
<i>S. mansoni</i>	GCATGCTTCCGGATGCCTTTAAACGGGTGT	818
<i>D. stemmacephalum</i>	GCATGCCTCTGGATGCCCTTCAAAGGTGT	900
	* ** *	
<i>P. heterotremus</i>	CGG-GGGCGGACGGCACGTTTACTTTGAAC	832
<i>D. dendriticum</i>	CGG-ATGCGGACGGCACGTTTACTTTGAAC	846
<i>F. hepatica</i>	CGG-AGGCGGACAGCACGTTTACTTTGAAC	845
<i>F. gigantica</i>	CGG-AGGCGGACAGCACGTTTACTTTGAAC	847

<i>E. caproni</i>	CGG-AGGCGGACAGCACGTTTACTTTGAAC	846
<i>S. mansoni</i>	CGG-GAGCGGACGGCATCTTTACTTTGAAC	847
<i>D. stammacephalum</i>	CTATGGGCGGATGGCACGTTTACTTTGAAC	930
	***** ** **	
<i>P. heterotremus</i>	AAATTTGAGTGCTCAAAGCAGGCCCTTGT-	861
<i>D. dendriticum</i>	AAATTTGAGTGCTCAAAGCAGGCCACAGA-	875
<i>F. hepatica</i>	AAATTTGAGTGCTCAAAGCAGGCCCTTGT-	874
<i>F. gigantica</i>	AAATTTGAGTGCTCAAAGCAGGCCCTTGT-	876
<i>E. caproni</i>	AAATTTGAGTGCTCAAAGCAGGCCCTTGT-	875
<i>S. mansoni</i>	AAATTTGAGTGCTCAAAGCAGGCCCTTGT-	876
<i>D. stammacephalum</i>	AAATTTGAGTGCTCAAACCAGGCCGATGTT	960
	* **** **	
<i>P. heterotremus</i>	GCCTGAAAATTCTTGCATGGAATAATGGAA	891
<i>D. dendriticum</i>	GCCTGAAAATTCTTGCATGGAATAATGAAA	905
<i>F. hepatica</i>	GCCTGAAAATTCTTGCATGGAATAATGGAA	904
<i>F. gigantica</i>	GCCTGAAAATTCTTGCATGGAATAATGGAA	906
<i>E. caproni</i>	GCCTGAAAATTCTTGCATGGAATAATGGAA	905
<i>S. mansoni</i>	GCCTGAAAATTCTTGCATGGAATAATGAAA	906
<i>D. stammacephalum</i>	GCCTGAAAAGTTTTGCATGGAATAATGGAA	990
	* * *	
<i>P. heterotremus</i>	TAGGACTTCGGGTTCTATTTTGTGGTTTT	921
<i>D. dendriticum</i>	TAGGACTTCGG-TTCTATTTTGTGGTTTT	934
<i>F. hepatica</i>	TAGGACTTCGG-TTCTATTTTGTGGTTTT	933
<i>F. gigantica</i>	TAGGACTTCGG-TTCTATTTTGTGGTTTT	935
<i>E. caproni</i>	TAGGACTTCGG-TTCTATTTTGTGGTTTT	934
<i>S. mansoni</i>	TAGGACTTCGG-TTCTATTTTGTGGTTTT	935
<i>D. stammacephalum</i>	TAGGACTTCGG-TTCTATTTTCGTTGGTTTT	1019
	* *	
<i>P. heterotremus</i>	CGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACAG	951
<i>D. dendriticum</i>	CGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACAG	964
<i>F. hepatica</i>	CGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACAG	963
<i>F. gigantica</i>	CGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACAG	965
<i>E. caproni</i>	CGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACAG	964
<i>S. mansoni</i>	CGGATCCGAAGTAATGGTTAAGAGGGACAG	965
<i>D. stammacephalum</i>	CGGATCCGAAGTAATGATCAAAGAGACAG	1049
	* * * *	
<i>P. heterotremus</i>	ACGGGGGCATTTGTATGGCGGTGTTAGAGG	981
<i>D. dendriticum</i>	ACGGGGGCATTTGTATGGCGGTGTTAGAGG	994
<i>F. hepatica</i>	ACGGGGGCATTTGTATGGCGGTGTTAGAGG	993
<i>F. gigantica</i>	ACGGGGGCATTTGTATGGCGGTGTTAGAGG	995
<i>E. caproni</i>	ACGGGGGCATTTGTATGGCGGTGTTAGAGG	994
<i>S. mansoni</i>	ACGGGGGCATTTGTATGGCGGTGTTAGAGG	995
<i>D. stammacephalum</i>	GCGGGGACGTTTGTATGGTTGCGCTAGAGG	1079
	* * * ** *	
<i>P. heterotremus</i>	TGAAATTCTTGGATCGCCGCCAGACAAACT	1011
<i>D. dendriticum</i>	TGAAATTCTTGGATCGCCGCCAGACAAACT	1024
<i>F. hepatica</i>	TGAAATTCTTGGATCGCCGCCAGACAAACT	1023
<i>F. gigantica</i>	TGAAATTCTTGGATCGCCGCCAGACAAACT	1025
<i>E. caproni</i>	TGAAATTCTTGGATCGCCGCCAGACAAACT	1024
<i>S. mansoni</i>	TGAAATTCTGGGATCGCCGCCAGACAAACT	1025
<i>D. stammacephalum</i>	TGAAATTCTATGGACCGTAACCAGACAAACT	1109
	** * ***	

<i>P. heterotremus</i>	ACAGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTC	1041
<i>D. dendriticum</i>	ACAGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTC	1054
<i>F. hepatica</i>	ACAGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTC	1053
<i>F. gigantica</i>	ACAGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTC	1055
<i>E. caproni</i>	ACAGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTC	1054
<i>S. mansoni</i>	ACAGCGAAAGCATTGCGCAAGAATGTTTTTC	1055
<i>D. stemmacephalum</i>	AAAGCGAAAGCATTTCGTCAAGCATGTTTTTC	1139
	* * *	
<i>P. heterotremus</i>	ATTGATCTGGAGCGAAAGTCAGAGGTTCTGA	1071
<i>D. dendriticum</i>	ATTGATCTGGAGCGAAAGTCAGAGGTTCTGA	1084
<i>F. hepatica</i>	ATTGATCTTGAGCGAAAGTCAGAGGTTCTGA	1083
<i>F. gigantica</i>	ATTGATCTTGAGCGAAAGTCAGAGGTTCTGA	1085
<i>E. caproni</i>	ATTGATCTTGAGCGAAAGTCAGAGGTTCTGA	1084
<i>S. mansoni</i>	ATTGATCAGGAGCGAAAGTCAGAGTTTCTGA	1085
<i>D. stemmacephalum</i>	ATTGGCCATGAGCGAAAGTCAGAGGCTCTGA	1169
	** ** *	
<i>P. heterotremus</i>	AGACGATCAGATACCGTCCTAGTTCTGACC	1101
<i>D. dendriticum</i>	AGACGATCAGATACCGTCCTAGTTCTGACC	1114
<i>F. hepatica</i>	AGACGATCAGATACCGTCCTAGTTCTGACC	1113
<i>F. gigantica</i>	AGACGATCAGATACCGTCCTAGTTCTGACC	1115
<i>E. caproni</i>	AGACGATCAGATACCGTCCTAGTTCTGACC	1114
<i>S. mansoni</i>	AGACGATCAGATACCGTCGTAGTTCTGACC	1115
<i>D. stemmacephalum</i>	AGACGATCAGATACCGTCCTAGTTCTGACC	1199
	*	
<i>P. heterotremus</i>	ATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGGTG	1131
<i>D. dendriticum</i>	ATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGGTG	1144
<i>F. hepatica</i>	ATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGGTG	1143
<i>F. gigantica</i>	ATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGGTG	1145
<i>E. caproni</i>	ATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGGTG	1144
<i>S. mansoni</i>	ATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGTTG	1145
<i>D. stemmacephalum</i>	ATAAACGATGCCAACTGACGATCCGCGGTG	1229
	* **	
<i>P. heterotremus</i>	GTT---CTTTTATTGTCCCCGCGGGCAGTC	1158
<i>D. dendriticum</i>	GTT---CTTTTATTGTCCCCGCGGGCAGTC	1171
<i>F. hepatica</i>	GTT---CTTTATGTGTCCCCACGGGCAGTC	1170
<i>F. gigantica</i>	GTT---CTTTATGTGTCCCCACGGGCAGTC	1172
<i>E. caproni</i>	GTT---CTTTATGTGTCCCCACGGGCAGTC	1171
<i>S. mansoni</i>	GTT---CTATAATTGACATCGCGGGCAGTC	1172
<i>D. stemmacephalum</i>	GTAGTATTTTAACCATCCCCACGGGCAGTC	1259
	***** * ***** ** *	
<i>P. heterotremus</i>	CCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGCTCCG	1188
<i>D. dendriticum</i>	CCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGCTCCG	1201
<i>F. hepatica</i>	CCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGCTCCG	1200
<i>F. gigantica</i>	CCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGCTCCG	1202
<i>E. caproni</i>	CCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGCTCCG	1201
<i>S. mansoni</i>	CCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGCTCCG	1202
<i>D. stemmacephalum</i>	CCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGTTCCG	1289
	* *	
<i>P. heterotremus</i>	GGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTA	1218
<i>D. dendriticum</i>	GGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTA	1231
<i>F. hepatica</i>	GGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTA	1230

<i>F. gigantea</i>	GGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTA	1232
<i>E. caproni</i>	GGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTA	1231
<i>S. mansoni</i>	GGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTA	1232
<i>D. stemmacephalum</i>	GGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTA	1319

*

<i>P. heterotremus</i>	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG	1248
<i>D. dendriticum</i>	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG	1261
<i>F. hepatica</i>	AAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG	1260
<i>F. gigantea</i>	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG	1262
<i>E. caproni</i>	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG	1261
<i>S. mansoni</i>	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG	1262
<i>D. stemmacephalum</i>	AAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAG	1349

*

<i>P. heterotremus</i>	TGGAGCCTGCGGCTTAATTCGACTCAACAC	1278
<i>D. dendriticum</i>	TGGAGCCTGCGGCTTAATTCGACTCAACAC	1291
<i>F. hepatica</i>	TGGAGCCTGCGGCTTAATTCGACTCAACAC	1290
<i>F. gigantea</i>	TGGAGCCTGCGGCTTAATTCGACTCAACAC	1292
<i>E. caproni</i>	TGGAGCCTGCGGCTTAATTCGACTCAACAC	1291
<i>S. mansoni</i>	TGGAGCCTGCGGCTTAATTCGACTCAACAC	1292
<i>D. stemmacephalum</i>	TGGAGCCTGCGGCTTAATTT-ACTCAACAC	1378

*

*

<i>P. heterotremus</i>	GGGAAACTCACCCGGCCCGGACACTGTGA	1308
<i>D. dendriticum</i>	GGGAAATCTCACCCGGCCCGGACACCGTGA	1321
<i>F. hepatica</i>	GGGAAACTCACCCGGCCCGGACACTGTGA	1320
<i>F. gigantea</i>	GGGAAACTCACCCGGCCCGGACACTGTGA	1322
<i>E. caproni</i>	GGGAAACTCACCCGGCCCGGACACTGTGA	1321
<i>S. mansoni</i>	GGGAAACTCACCCGGCCCGGACACTGTGA	1322
<i>D. stemmacephalum</i>	G----AACTA--CC--GGCCCGGACACTGTGA	1402

**** * ** *

*

<i>P. heterotremus</i>	GGATTGACAGATTGAAAGCTCTTTCTTGAT	1338
<i>D. dendriticum</i>	GGATTGACAGATTGAAAGCTCTTTCTTGAT	1351
<i>F. hepatica</i>	GGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGAT	1350
<i>F. gigantea</i>	GGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGAT	1352
<i>E. caproni</i>	GGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGAT	1351
<i>S. mansoni</i>	GGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGAT	1352
<i>D. stemmacephalum</i>	GGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGAT	1432

*

<i>P. heterotremus</i>	TCGGTGGTTGGTGGTGCATGNCCGTTCTTA	1368
<i>D. dendriticum</i>	TCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA	1381
<i>F. hepatica</i>	TCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA	1380
<i>F. gigantea</i>	TCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA	1382
<i>E. caproni</i>	TCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA	1381
<i>S. mansoni</i>	TCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA	1382
<i>D. stemmacephalum</i>	TTGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA	1462

*

*

*

<i>P. heterotremus</i>	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCC	1398
<i>D. dendriticum</i>	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCC	1411
<i>F. hepatica</i>	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCC	1410
<i>F. gigantea</i>	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCC	1412
<i>E. caproni</i>	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCC	1411
<i>S. mansoni</i>	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCC	1412
<i>D. stemmacephalum</i>	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCC	1492

<i>P. heterotremus</i>	GATAACGAACGAGACTTTGGCCTGCTAAAT	1428
<i>D. dendriticum</i>	GATAACGAACGAGACTTTGGCCTGCTAAAT	1441
<i>F. hepatica</i>	GATAACGAACGAGACTCTGGCCTGCTAAAT	1440
<i>F. gigantica</i>	GATAACGAACGAGACTCTGGCCTGCTAAAT	1442
<i>E. caproni</i>	GATAACGAACGAGACTTTGGCCTGCTAAAT	1441
<i>S. mansoni</i>	GATAACGAACGAGACTTTAACCTGCTAAAT	1442
<i>D. stemmacephalum</i>	GATAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAATT	1522
	* * *	
<i>P. heterotremus</i>	AGTATGCCTGTCCTCTGTGCTCGTGCGGGT	1458
<i>D. dendriticum</i>	AGTAAGCCTGTCCTGTGTGCTCGTGCGGGT	1471
<i>F. hepatica</i>	AGTATGCCTGTCCTCTGTGCTCGTGCGGGT	1470
<i>F. gigantica</i>	AGTATGCCTGTCCTCTGTGCTCGTGCGGGT	1472
<i>E. caproni</i>	AGTATGCCTGTCCTCTGTGCTCGTGCGGGT	1471
<i>S. mansoni</i>	AGTAGACTGGTCCTCTGTGCTCGTTTAGGG	1472
<i>D. stemmacephalum</i>	AGTACGCCTGTCCTCTGTTCTGTGCTGGC	1552
	* * * * *	
<i>P. heterotremus</i>	GGCGGTGC-----	1466
<i>D. dendriticum</i>	GACGGCGC-----	1479
<i>F. hepatica</i>	TGCGTTGT-----	1478
<i>F. gigantica</i>	TGCGTTGT-----	1480
<i>E. caproni</i>	TACGTTGT-----	1479
<i>S. mansoni</i>	CGCGGCTT-----	1480
<i>D. stemmacephalum</i>	GGCGCTTTGGTGAACTGCTCACGTAAGCC	1582
	** *****	
<i>P. heterotremus</i>	-----TCGCTG-----	1472
<i>D. dendriticum</i>	-----TCATTG-----	1485
<i>F. hepatica</i>	-----CCATTG-----	1484
<i>F. gigantica</i>	-----CCATTG-----	1486
<i>E. caproni</i>	-----CCATTG-----	1485
<i>S. mansoni</i>	-----CTATTG-----	1486
<i>D. stemmacephalum</i>	GACTACTATTGGGACGTGTTCTTGCGTGTG	1612
	***** *****	
<i>P. heterotremus</i>	-----CCTCTTCG-G-GGGTGGTG----	1489
<i>D. dendriticum</i>	-----CCCTTC---G-AGGCGGTG----	1500
<i>F. hepatica</i>	-----CCTCCTCGTG-GGGTAGTG----	1501
<i>F. gigantica</i>	-----CCTCCTCGTG-GGGTAGTG----	1503
<i>E. caproni</i>	-----CCTCCTCGTG-GGGTAGTG----	1502
<i>S. mansoni</i>	-----CTTCTTTATG-GAGTAGTG----	1503
<i>D. stemmacephalum</i>	CTGCGAGCTCCTTCGGGCGAGTGGTGCGCG	1642
	***** ***** * * *	
<i>P. heterotremus</i>	--GCGTTGTTGCGCCGG-----	1503
<i>D. dendriticum</i>	--GTGTCGTTGCGCCGG-----	1514
<i>F. hepatica</i>	--GTTACGTTGACCGG-----	1516
<i>F. gigantica</i>	--GTTACGTTGACCGG-----	1518
<i>E. caproni</i>	--GTTGCGTTGACCGG-----	1517
<i>S. mansoni</i>	--TGGTCGTGATCCGG-----	1518
<i>D. stemmacephalum</i>	TGGGGACGTGAAGTGTGGTGAAGGTGTGT	1672
	***** * * *	
<i>P. heterotremus</i>	-----CGGGTGC	1510

<i>D. dendriticum</i>	-----CGGGTGC	1521
<i>F. hepatica</i>	-----CGGGTGC	1523
<i>F. gigantica</i>	-----CGGGTGC	1525
<i>E. caproni</i>	-----CGGGTGC	1524
<i>S. mansoni</i>	-----CGGGTGC	1525
<i>D. stammacephalum</i>	GCGGTGGGTCCGGTGCTTGCTCCGGGTAC	1702
	*****	*
<i>P. heterotremus</i>	TGCGCAGGTGT--TTACTTCTTAGAGGGAC	1538
<i>D. dendriticum</i>	TGCGCAGGTGT--TTACTTCTTAGAGGGAC	1549
<i>F. hepatica</i>	GGCGCAGGTAC--TTACTTCTTAGAGGGAC	1551
<i>F. gigantica</i>	GGCGCAGGTAC--TTACTTCTTAGAGGGAC	1553
<i>E. caproni</i>	GGCGCAGGTAC--TTACTTCTTAGAGGGAC	1552
<i>S. mansoni</i>	GGTGCCAGTTT--TTACTTCTTAGAGGGAC	1553
<i>D. stammacephalum</i>	GGCGCAGGTGTGTCTACTTCTTAGAGGGAC	1732
	* * * * *	
<i>P. heterotremus</i>	AAGCGGCGTGAC--AGTCGCACGAAAATGA	1566
<i>D. dendriticum</i>	AAGCGGCGAGAC--AGTCGCACGAAAATGA	1577
<i>F. hepatica</i>	AAGCGGTATT-C--AGTCGCACGAAATTGA	1578
<i>F. gigantica</i>	AAGCGGTATT-C--AGTCGCACGAAATTGA	1580
<i>E. caproni</i>	AAGCGAC-TC-C--AGTCGCACGAAATTGA	1578
<i>S. mansoni</i>	AAGCGGCACACTTAAGTCGCACGAAATTGA	1583
<i>D. stammacephalum</i>	AAGCATACG---AATGTGTACGAAATTGA	1759
	***** * * *	*
<i>P. heterotremus</i>	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG	1596
<i>D. dendriticum</i>	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG	1607
<i>F. hepatica</i>	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG	1608
<i>F. gigantica</i>	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG	1610
<i>E. caproni</i>	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG	1608
<i>S. mansoni</i>	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG	1613
<i>D. stammacephalum</i>	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG	1789
<i>P. heterotremus</i>	TCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGG	1626
<i>D. dendriticum</i>	TCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGG	1637
<i>F. hepatica</i>	TCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGG	1638
<i>F. gigantica</i>	TCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGG	1640
<i>E. caproni</i>	TCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGG	1638
<i>S. mansoni</i>	TCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGG	1643
<i>D. stammacephalum</i>	TCCGGGGCCGCACGCGCGCTACAATGACGG	1819
	* *	
<i>P. heterotremus</i>	TTTCAGCGAGTCTGGGAACCTGGCCCGAAA	1656
<i>D. dendriticum</i>	TTTCAGCGAGTTTGGGAACCTGGCCTGAGA	1667
<i>F. hepatica</i>	TTTCAGCGAGTTTGGGAATCCTGGCCTGAGC	1668
<i>F. gigantica</i>	TTTCAGCGAGTTTGGGAATCCTGGCCTGAGC	1670
<i>E. caproni</i>	TTTCAGCGAGTTTGGGAATCCTGGCCTGAGC	1668
<i>S. mansoni</i>	TGCCAGCGAGTCTGGGAACCTGGCCCGAAA	1673
<i>D. stammacephalum</i>	TGCCAACGAGTCTGACCTTCTGGCCCGAAA	1849
	** * * * *	* **
<i>P. heterotremus</i>	GGGTTGGGCAAACCTGAGTCATCACCGTCGT	1686
<i>D. dendriticum</i>	GGGTTGGGCAAACCTGAATCATCACCGTCGT	1697
<i>F. hepatica</i>	AGGTTGGGCAAACCTGTATCATAACCGTCGT	1698
<i>F. gigantica</i>	AGGTTGGGTAAACCTGTATCATAACCGTCGT	1700
<i>E. caproni</i>	AGGTTGGGTAAACCTGAATCATAACCGTCGT	1698

<i>S. mansoni</i>	GGGTTGGGCAAACCTGTTTCATCACCGTCGT	1703
<i>D. stemmacephalum</i>	GGGTTGGGCAAACCTGGTCAATCACCGTCAT	1879
	* * **** *	
<i>P. heterotremus</i>	GACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCC	1716
<i>D. dendriticum</i>	GACTGGGATCGGGGCTTGCAATTATTCCCC	1727
<i>F. hepatica</i>	GACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCC	1728
<i>F. gigantica</i>	GACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCC	1730
<i>E. caproni</i>	GACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCC	1728
<i>S. mansoni</i>	GACTGGGATCGGGGCTTGCAATTATTCCCC	1733
<i>D. stemmacephalum</i>	GACAGGATCGGGGCTTGAATTGTTCCCC	1909
	* * *	
<i>P. heterotremus</i>	GTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAAGT	1746
<i>D. dendriticum</i>	GTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAAGT	1757
<i>F. hepatica</i>	GTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAAGT	1758
<i>F. gigantica</i>	GTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAAGT	1760
<i>E. caproni</i>	GTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAAGT	1758
<i>S. mansoni</i>	GTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAAGT	1763
<i>D. stemmacephalum</i>	GTGAACGAGGAATTCCTAGTAAGTGCAAGT	1939
	*	
<i>P. heterotremus</i>	CATAAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCC	1776
<i>D. dendriticum</i>	CATAAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCC	1787
<i>F. hepatica</i>	CATAAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCC	1788
<i>F. gigantica</i>	CATAAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCC	1790
<i>E. caproni</i>	CATAAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCC	1788
<i>S. mansoni</i>	CATAAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCC	1793
<i>D. stemmacephalum</i>	CATAAGCTTGCGCTGATTACGTGCCTGCCC	1969
	*	
<i>P. heterotremus</i>	TTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGA	1806
<i>D. dendriticum</i>	TTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGA	1817
<i>F. hepatica</i>	TTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGA	1818
<i>F. gigantica</i>	TTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGA	1820
<i>E. caproni</i>	TTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGA	1818
<i>S. mansoni</i>	TTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGA	1823
<i>D. stemmacephalum</i>	TTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGA	1999
<i>P. heterotremus</i>	TTGAATGGTTTAGCAAGGTCCTCGGATTGG	1836
<i>D. dendriticum</i>	TTGAATGGTTTAGCAAGGTCCTCGGATTGG	1847
<i>F. hepatica</i>	TTGAATGGTTTAGCAAGGTCCTCGGATTGG	1848
<i>F. gigantica</i>	TTGAATGGTTTAGCAAGGTCCTCGGATTGG	1850
<i>E. caproni</i>	TTGAATGGTTTAGCAAGGTCCTCGGATTGG	1848
<i>S. mansoni</i>	TTGAATGGTTTAGTGAGGTCGTTGGATTGG	1853
<i>D. stemmacephalum</i>	TTGAATGGTTTAGTAAGGTCCTCGGATTGG	2029
	** * *	
<i>P. heterotremus</i>	TGCCATTGTAGTTGTTTCGGC-----A	1858
<i>D. dendriticum</i>	TGCCATTGTAGTTGCTTCGGC-----G	1869
<i>F. hepatica</i>	TGCCATTGTAGTGGCTTCGGC-----C	1870
<i>F. gigantica</i>	TGCCATTGCAGTGGCTTCGGC-----C	1872
<i>E. caproni</i>	TGCCATTGTAGTGGCTTCGGC-----C	1870
<i>S. mansoni</i>	CGTCGTTGTAGTGGCTTTG-C-----C	1874
<i>D. stemmacephalum</i>	CGCCATTGCAGTGTGAGCCGCAAGGTTGGT	2059
	*** * * *****	

<i>P. heterotremus</i>	GCTCGACCGGCGCTGAGAAGACGACCAAAC	1888
<i>D. dendriticum</i>	ACTCGACCGGTGCTGAGAAGACGACCAAAC	1899
<i>F. hepatica</i>	GCTCGACCGGTGCTGAGAAGACGACCAAAC	1900
<i>F. gigantica</i>	GCTCGACCGGTGCTGAGAAGACGACCAAAC	1902
<i>E. caproni</i>	GCTCGACCGGCGCTGAGAAGACGACCAAAC	1900
<i>S. mansoni</i>	GCTCGACTGATGCTGAGAAGATGACCTAAT	1904
<i>D. stammacephalum</i>	GCTCGACAGGTGCCGAGAAGACGACCAAAC	2089

* * * * * * *

<i>P. heterotremus</i>	TTGATCATT	1897
<i>D. dendriticum</i>	TTGATCATT	1908
<i>F. hepatica</i>	TTGATCATT	1909
<i>F. gigantica</i>	TTGATCATT	1911
<i>E. caproni</i>	TTGTTCATT	1909
<i>S. mansoni</i>	TTGACTATT	1913
<i>D. stammacephalum</i>	TTGATCATT	2098

(* คือลำดับเบสที่แตกต่างกัน)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลจากการศึกษา

1. การศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS2

จากผลการทดลองในการหาลำดับเบสของบริเวณ ITS2 ของ *P. heterotremus* ใน 2 ระยะของวงจรชีวิต คือในระยะเมตาเซอรคาร์เรีย และตัวเต็มวัย พบว่าลำดับเบสที่ได้เหมือนกันทุกประการ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันความถูกต้องทั้งของลำดับเบส และของตัวอย่าง *P. heterotremus*

เมื่อนำลำดับเบสของ ITS2 ของ *P. heterotremus* และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ มาหาปริมาณเบส G+C โดยใช้โปรแกรม DNASIS (DNA and protein sequence analysis system) version 2.5 (Wichware. 1997) ได้ผลดังตาราง 14

ตาราง 14 ปริมาณเบส G+C ของบริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ

ชนิด	ปริมาณเบส G+C
<i>P. heterotremus</i>	54.56%
<i>P. miyazakii</i>	56.23%
<i>P. skrjabini</i>	56.23%
<i>P. kellicotti</i>	55.01%
<i>P. westermani</i> (Japan)	56.19%
<i>P. mexicanus</i>	55.11%
<i>P. macrorchis</i>	55.42%
<i>P. harinasutai</i>	56.18%
<i>P. ohirai</i>	56.19%
<i>P. westermani</i> (Thailand)	55.92%
<i>P. siamensis</i>	55.37%

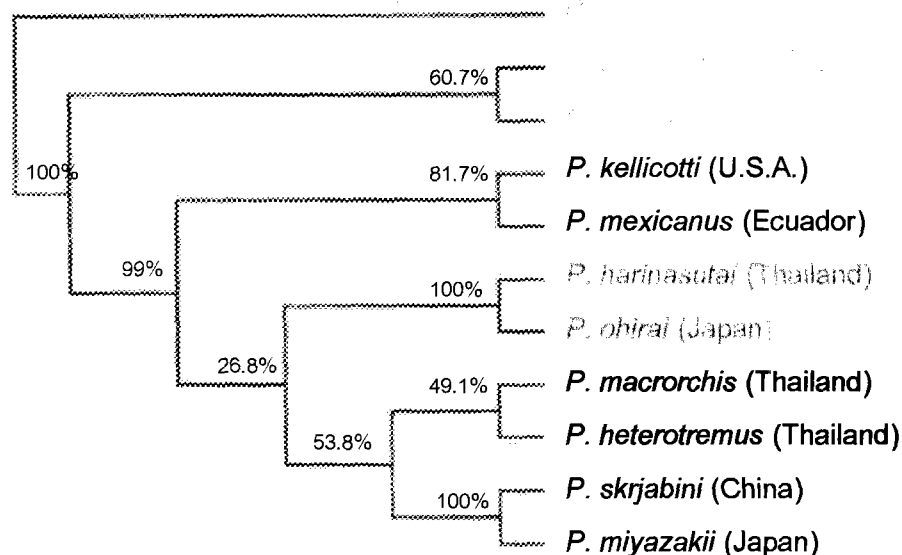
จากการทำ sequence alignment บริเวณ ITS2 ของ *P. heterotremus* เปรียบเทียบกับ พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ โดยใช้โปรแกรม DNASIS version 2.5 (Wichware. 1997) พบ homology ของลำดับเบสบริเวณ ITS2 ดังตาราง 15

ตาราง 15 Homology ของลำดับเบสบริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบกับ *P. heterotremus*

ชนิด	Homology ของลำดับเบสบริเวณ ITS2 ของ พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ <i>P. heterotremus</i>
<i>P. miyazakii</i>	94%
<i>P. skrjabini</i>	94%
<i>P. kellicotti</i>	93%
<i>P. westermani</i> (Japan)	92%
<i>P. mexicanus</i>	92%
<i>P. macrorchis</i>	92%
<i>P. harinasutai</i>	91%
<i>P. ohirai</i>	90%
<i>P. westermani</i> (Thailand)	89%
<i>P. siamensis</i>	89%

เมื่อนำ sequence alignment บริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่างๆ และ *P. heterotremus* มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP version 3.573c ผลที่ได้ปรากฏดังภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS2 และ phylogenetic tree ซึ่งเป็น consensus tree นี้ได้มาจากการใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.573c โดยการทำ bootstrap 100 ครั้ง (โปรแกรม Seqboot) สร้าง phylogenetic trees โดยใช้ parsimony approach (โปรแกรม DNAPars) และหา consensus tree (โปรแกรม Consense) ค่า bootstrap (bootstrap value) แสดงบน branch ของ phylogenetic tree

จากผลของการทำ phylogenetic tree ของบริเวณ ITS2 ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม DNAPars พบว่าได้ most equally parsimonious trees ทั้งหมด 284 trees และจาก consensus tree ที่ได้พบว่า *P. heterotremus* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับ *P. macrorchis* ซึ่งได้ตัวอย่างจากประเทศไทย แต่อย่างไรก็ดี bootstrap value ที่ได้ (49.1%) ยังคงมีค่าค่อนข้างต่ำ

สำหรับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆที่พบในประเทศไทย เช่น *P. harinasutai* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *P. ohirai* จากญี่ปุ่น (bootstrap value 100%) นอกจากนี้ยังพบว่า *P. westermani* จากประเทศไทยนั้นมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *P. siamensis* (bootstrap value 60.7%) มากกว่า *P. westermani* จากญี่ปุ่น

2. การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 18S

เนื่องจากบริเวณ 18S นั้นเป็น coding region ลำดับเบสจึง conserved มากกว่าบริเวณ ITS2 ดังนั้นการศึกษความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. heterotremus* โดยใช้ 18S จึงมุ่งเน้นไปที่ taxonomic level ที่สูงกว่า species level

เมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 18S ของ *P. heterotremus* ของพยาธิตัวแบนใน Subclass Digenea มาหาปริมาณ G+C โดยใช้โปรแกรม DNASIS version 2.5 (Wichware. 1997) ได้ผลดังตาราง 16

ตาราง 16 ปริมาณเบส G+C ของบริเวณ 18S ของพยาธิตัวแบนใน Subclass Digenea

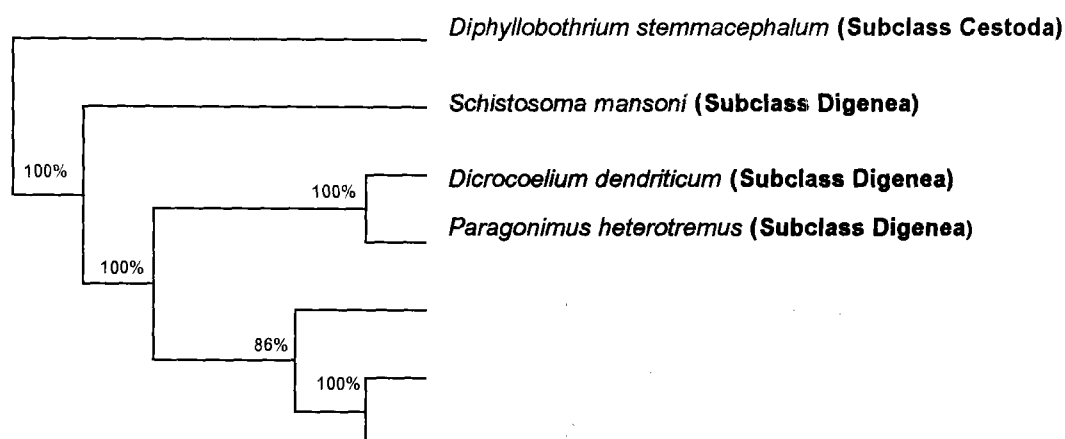
ชนิด	ปริมาณเบส G+C
<i>Paragonimus heterotremus</i>	51.31%
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	50.76%
<i>Fasciola hepatica</i>	50.79%
<i>Fasciola gigantica</i>	50.89%
<i>Echinostoma caproni</i>	50.57%
<i>Schistosoma mansoni</i>	49.26%

จากการทำ sequence alignment บริเวณ 18S ของ *P. heterotremus* เปรียบเทียบกับพยาธิตัวแบนใน Subclass Digenea โดยใช้โปรแกรม DNASIS version 2.5 (Wichware. 1997) พบ homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S ดังตาราง 17

ตาราง 17 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S ของพยาธิใบไม้ในจิ้งนัสต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ *P. heterotremus*

ชนิด	Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S ของพยาธิใบไม้ในจิ้งนัสต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ <i>P. heterotremus</i>
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	94%
<i>Fasciola hepatica</i>	93%
<i>Fasciola gigantica</i>	93%
<i>Echinostoma caproni</i>	91%
<i>Schistosoma mansoni</i>	87%
<i>Diphyllbothrium stemmacephalum</i>	79%

เมื่อนำ sequence alignment บริเวณ 18S ของ *P. heterotremus* และพยาธิใบไม้ในจิ้งนัสต่างๆ ใน Subclass Cestoda และ Subclass Digenea มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP version 3.573c ผลที่ได้ปรากฏดังในภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ในจิ้งหรีดต่าง ๆ

โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 18S และ phylogenetic tree ซึ่งเป็น consensus tree นี้ได้มาจากการใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.573c โดยการทำ bootstrap 100 ครั้ง (โปรแกรม Seqboot) สร้าง phylogenetic trees โดยใช้ parsimony approach (โปรแกรม DNAPars) และหา consensus tree (โปรแกรม Consense) ค่า bootstrap (bootstrap value) แสดงบน branch ของ phylogenetic tree

จากผลของการทำ phylogenetic tree ของ 18S ของ *P. heterotremus* และพยาธิใบไม้ในจิ้งหรีดต่าง ๆ ใน Subclass Cestoda และ Subclass Digenea โดยใช้โปรแกรม DNAPars พบว่าได้ most equally parsimonious trees ทั้งหมด 102 trees และจาก consensus tree ที่ได้พบว่า *P. heterotremus* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดกับ *D. dendriticum* (bootstrap value 100%)

นอกจากนี้ยังพบว่าใน Subclass Digenea นี้ *P. heterotremus* และ *D. dendriticum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *E. caproni*, *F. hepatica* และ *F. gigantica* (bootstrap value 100%) มากกว่า *S. mansoni*

3. การศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS1

ลำดับเบสที่ได้จากบริเวณ ITS1 ไม่สามารถนำมาทำ sequence alignment และศึกษา phylogenetic tree ได้ เพราะมี N (A/T/G/C) อยู่มาก และถึงแม้ว่าจะมีการทดลองซ้ำโดยใช้ primers คู่ใหม่ ผลที่ได้ก็ยังคงไม่ดีขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการมี variation เกิดขึ้นในแต่ละ copy ของ ITS1

อภิปรายผล

1. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. heterotremus* จากลำดับเบสบริเวณ ITS2

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. heterotremus* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ จากบริเวณ ITS2 พบว่า *P. heterotremus* มีความใกล้ชิดกับ *P. macrorchis* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอดทั้งสองชนิด มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยตัวเต็มวัยของ *P. heterotremus* มีลำตัวยาว 14-16 มิลลิเมตร กว้าง 6-8 มิลลิเมตร มีหนามปกคลุมลำตัวเป็นหนามเดี่ยว ที่ปลายของหนามจะแยกเป็นแฉกประมาณ 5-6 แฉก รังไข่แตกแขนงย่อยมากมาย ส่วนอวัยวะมีขนาดใหญ่ 2 อัน และแตกแขนงเช่นเดียวกัน มี oral sucker ใหญ่เป็น 2 เท่าของ ventral sucker (Pariyanonda, et al. 1991) และตัวเต็มวัยของ *P. macrorchis* จะมีลำตัวยาว 15-19 มิลลิเมตร กว้าง 6-10 มิลลิเมตร มีหนามปกคลุมลำตัวเป็นหนามเดี่ยวกระจายกันอยู่ห่างๆ รังไข่แตกแขนงย่อยมากมาย อวัยวะมีขนาดใหญ่ 2 อัน และมีลักษณะแตกแขนงเช่นเดียวกับรังไข่ มี oral sucker ขนาดเท่าๆกันกับ ventral sucker (Miyazaki and Vajrasthira. 1967)

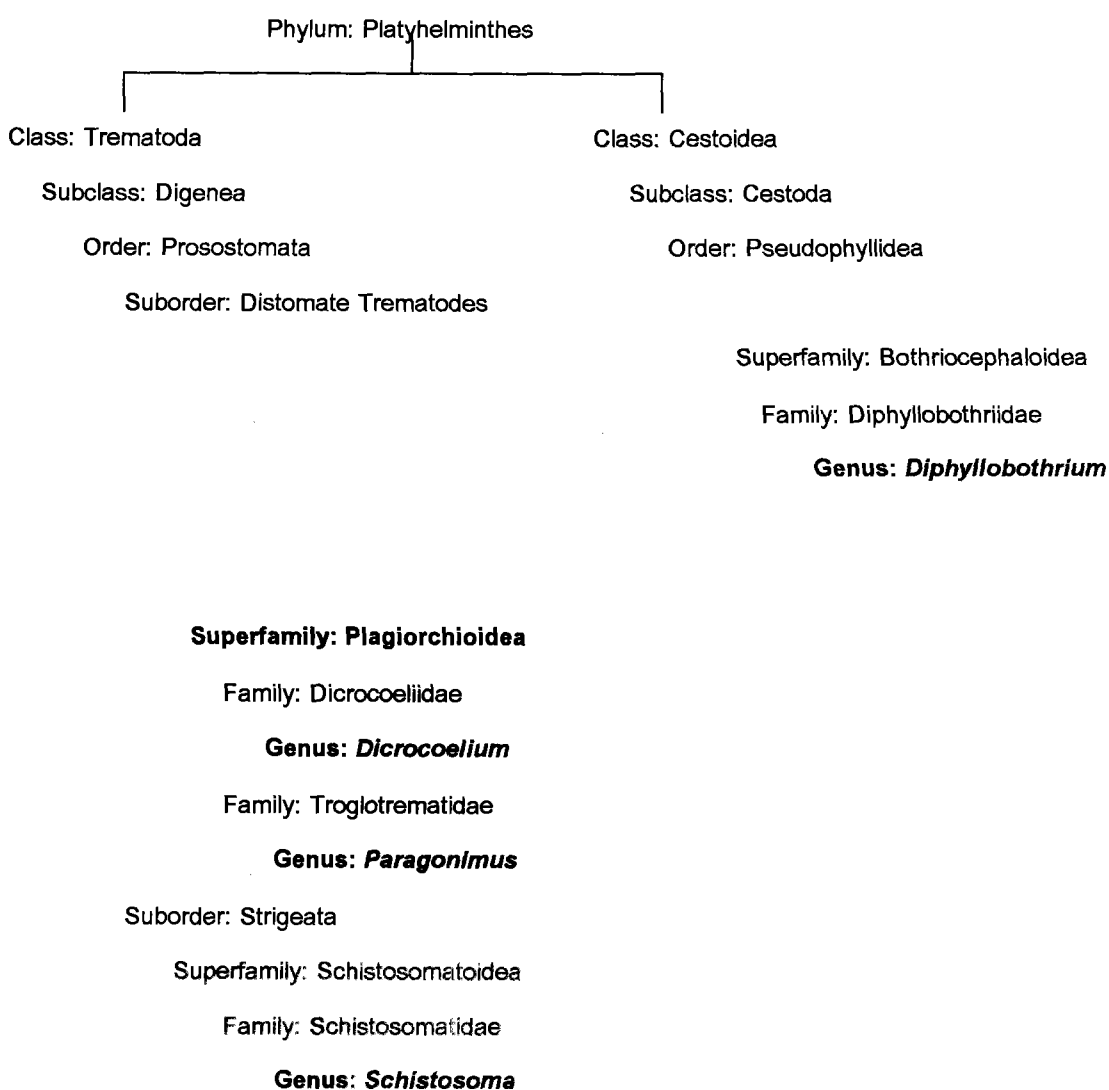
สำหรับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆที่พบในประเทศไทย เช่น

- *P. harinasutai* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *P. ohirai* จากญี่ปุ่น (bootstrap value 100%) อาจเนื่องมาจากตัวเต็มวัยของ *P. harinasutai* มีลักษณะใกล้เคียงกับ *P. ohirai* โดยพบว่าตัวเต็มวัยของทั้ง 2 สปีชีส์จะมีรังไข่แตกแขนง ส่วนอวัยวะแยกออกเป็น จำนวน 5-6 กลีบ (Miyazaki and Vajrasthira. 1968) แต่ทั้ง 2 สปีชีส์แตกต่างกันที่หนามที่ปกคลุมลำตัวโดย *P. harinasutai* จะมีหนามที่ปกคลุมลำตัวเป็นหนามเดี่ยว แต่ *P. ohirai* จะมีหนามที่ปกคลุมลำตัวเป็นหนามกลุ่ม (Cabrera and Vajrasthira. 1973)

- *P. westermanni* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. siamensis* (bootstrap value 60.7%) อาจเนื่องมาจากตัวเต็มวัยของทั้ง 2 สปีชีส์มีความคล้ายคลึงทางด้านสัณฐานวิทยา (เดชาศรีสนธิ์, จิตรา ไวกุล, และ สนั่น แยมพุม. 2540) โดยตัวเต็มวัยของทั้ง 2 สปีชีส์จะมีรังไข่แยกออกเป็น 6 กลีบ และอวัยวะแยกออกเป็น 5-6 กลีบเช่นเดียวกัน (Miyazaki and Wyhoff. 1965. ; Daengsvang, S., Papasarathorn, T., and Tongkoom, B. 1963. ; Yaemput, S., Dekumjoy, P., and Visiassuk, K. 1994) แต่ต่างกันที่หนามปกคลุมลำตัวของทั้ง 2 สปีชีส์ไม่เหมือนกัน คือ *P. westermanni* จะมีหนามเดี่ยว ส่วน *P. siamensis* จะมีหนามกลุ่ม (Cabrera and Vajrasthira. 1973)

2. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. heterotremus* จากลำดับเบสบริเวณ 18S

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. heterotremus* กับพยาธิใบไม้ในจิ้งหรีดต่างๆ จากบริเวณ 18S พบว่า *P. heterotremus* มีความใกล้เคียงกับ *Dicrocoelium dendriticum* ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกหมวดหมู่ของ Phylum Platyhelminthes ที่มี *P. heterotremus* อยู่ใน Superfamily เดียวกันกับ *D. dendriticum* ดังภาพประกอบ 25 (Miyazaki. 1991)



ภาพประกอบ 25 การจัดหมวดหมู่ของ Phylum Platyhelminthes

นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าใน Subclass Digenea นี้ *P. heterotremus* และ *D. dentricum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *E. caproni*, *F. hepatica* และ *F. gigantica* (bootstrap value 100%) มากกว่า *S. mansoni* ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกหมวดหมู่ เพราะ *P. heterotremus*, *D. dentricum*, *E. caproni*, *F. hepatica* และ *F. gigantica* ล้วนแล้วแต่อยู่ใน Suborder Distomate Trematodes ส่วน *S. mansoni* อยู่ใน Suborder Strigeata

ข้อเสนอแนะ

1. ควรจะมีการศึกษาลำดับเบสของบริเวณ ITS1 ของ *P. heterotremus* โดยใช้วิธีการโคลน ITS1 PCR products
2. ควรเก็บตัวอย่างของปูที่มีพยาธิใบไม้ปอดที่มีรายงานพบในประเทศไทย (ทั้งหมด 6 สปีชีส์) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ยีนหรือบริเวณอื่นของ DNA ที่น่าสนใจ ข้อมูลที่ได้จะช่วยยืนยันว่า *P. heterotremus* นั้นมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้ปอดชนิดใดบ้าง เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาแนวโน้ม (trend) ของการติดเชื้อ
3. ควรสร้าง genetic profile โดยนำ total genomic DNA ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ต่าง ๆ มาศึกษาโดยใช้เทคนิค RFLP, RAPD, minisatellite และ microsatellite
4. การศึกษาครั้งนี้ได้ลำดับเบสของ 18S ของ *P. heterotremus* ซึ่งเป็น complete sequence และยังไม่มียารายงานการศึกษาเช่นเดียวกันนี้ในพยาธิใบไม้ปอดชนิดใด ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วางแผนว่าจะ submit ข้อมูลลำดับเบสนี้เข้าไปใน database (ฐานข้อมูล) ของ GenBank ต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เดชา ศรีสนธิ์, จิตรา ไวกกุล, และ สนั่น แยมพูน. (2540). *พยาธิใบไม้ปอด*. กรุงเทพฯ : ลิฟวิ้งทรานส์มีเดีย.
- Belding, D. L. (1965). *Textbook of Parasitology*. 3rd ed. New York : Meredith Publish Company.
- Blair, D. *et al.* (1997 a, October). "Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences," *Parasitology*. 115(Pt4) : 411 - 417.
- Blair, D. *et al.* (1997 b, April). "Relationships between *Schistosoma malayensis* and other Asian schistosomes deduced from DNA sequences," *Mol. Biochem. Parasitol.* 85(2) : 259 – 263.
- Blair, D. *et al.* (1999, December). "A molecular perspective on the genera *Paragonimus* Braun, *Euparagonimus* Chen and *Paragonimus* Chen," *J. Helminthol.* 73(4) : 295 - 299.
- Bowles, J. *et al.* (1993, December). "Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*," *Acta. Trop.* 55(4) : 217 – 229.
- Cabrera, D. B., and Vajrasthira, S. (1973, December). "Endemicity of *Paragonimus siamensis* Miyazaki and Wykoff 1965, the second species of lung fluke found in the republic of the Philippines," *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub.Hlth.* 4(4) : 509 – 518.
- Daengsvang, S., Papasarathorn, T., and Tongkoom, B. (1963, September). "*Paragonimus westermani* (kerbert 1878) in Thai leopards," *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 58(3) : 304 - 306.
- Ekarohit, D. *et al.* (1990) "*Paragonimus* in Mae Hong Son Province Northern Thailand : Case report," *Proceedings of the 33rd SEAMEO Trop Med Regional Seminar, Chiang Mai Thailand.* 340 – 341.
- Fernandez, M. *et al.* (1998, October). "Phylogenetic relationships of the Family Campulide

- (trematoda) based on 18S rRNA sequences," *Parasitology*. 1170(Pt4) : 383 - 391.
- Gerbi, S.A. (1985). "Evolution of ribosomal DNA," *Molecular evolutionary genetics*. New York : In MacIntyre, R.J. (ed) Plenum.
- Harinasuta, T., Kratrachue, M., and Tandhanond, S. (1957). "A case of Paragonimiasis in Thailand," *J. Med. Assoc. Thai*. 40 : 227 - 234 .
- Herwerden, L van., Blair, D., and Agatsuma, T. (1998, April). "Intra-and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex," *Parasitology*. 116(Pt4) : 311 - 317.
- Herwerden, L van., Blair, D., and Agatsuma, T. (1999, June). "Intra-and interindividual variation in ITS of *Paragonimus westermani* (Trematoda : digenae) and related species : implications for phylogenetic studies," *Mol. Phylogenet. Evol.* 12(1) : 67 - 73.
- Innis, M.A. *et al.* (1990). *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. California : Academic Press, Inc.
- Johnston, D.A., Kane, R.A., and Rollinson, D. (1993, August). "Small subunit (18S) RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*," *Parasitology*. 107 (Pt2) : 147 - 156.
- Kawashima, K., Sugiyama H., and Ketudat, P. (1989). "*Paragonimus* infection in crabs in Thailand," *Paragonimus in Asia Biology, Genetic Variation and Speciation*. Fukuoka : Shunposha Photographic Printing.
- Kobayashi, H., (1921). "Studies on the lung- fluke in Korea. III. Development in the first intermediate host and prophylactic measures against fluke disease. *Mitt Med Hoch Keijo*. 4 : 5 - 16.
- Michot, B. *et al.* (1993, February). "Conserved secondary structures in the ITS2 of trematoda pre-rRNA," *FEBS Lett.* 316(3) : 247 - 252.
- Miyazaki, I. (1991). *An Illustrated Book of Helminthic Zoonoses*. Tokyo : Shukasha Printing.
- Miyazaki, I., and Harinasuta, T. (1966, December). "The first case of human

- paragonimiasis caused by *Paragonimus heterotremus* Chen and Asia," *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 60(4) : 509 - 514.
- Miyazaki, I. and Vajrasthira, S. (1967, August). "Occurrence of the Lung Fluke, *Paragonimus macrorchis* Chen, 1962 in Thailand," *J. Parasitol.* 53(4) : 894 – 893.
- Miyazaki, I. and Vajrasthira, S. (1968, March). "On a new Lung fluke found in Thailand, *Paragonimus harinasutai* sp. nov (Trematoda, Troglotremitidae)," *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 60(1) : 81 – 87.
- Miyazaki, I., and Wykoff, D.E. (1965, April). "On a new lung fluke *Paragonimus siamensis* found in Thailand (Trematoda : Troglotremitidae)," *Jpn. J. Parasitol.* 14(3) : 251 – 254.
- Mullis, K. *et al.* (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymerase chain reaction," *Biology*. England : Cold Spring Harbor Symp. Quant.
- Musters, W. *et al.* (1990, December). "Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA," *EMBO*. 9(2) : 3989 – 3996.
- Nues, R.W.van., *et al.* (1994, March). "Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA," *Nucl. Acids Res.* 22(6) : 912 – 919.
- Olson, P.D., and Caira, J.N. (1999, December). "Evolution of the major lineages of tapeworms (Platyhelminthes Cestoidea) inferred from 18S ribosomal DNA and elongation factor- α ," *J. Parasitol.* 85(6) : 1134 – 1159.
- Pariyanonda, S. *et al.* (1991, March). "Scanning Electron Microscopy of cuticular surface of the adult *Paragonimus heterotremus* in Phitsanulok, Thailand," *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Hlth.* 22(1) : 99 – 101.
- Pariyanonda, S. *et al.* (1997). "The edible crabs intermediate host of lung flukes *Paragonimus* spp. In Loei and Phitsanulok province," *An abstract ; presented at the annual meeting of Thailand Association for Parasitology and Tropical Medicine.*
- Peer van de, Y., and Wachter de, R., (1993, April). "TREECON : a Software package for the construction and drawing of evolutionary trees." *Computer Applications in the BioSciences.* 9(2) : 177 – 182.

- Prommas, C. (1928). "Paragonimiasis, Opisthorchiasis and Madura foot," *J. Med. Assoc. Thai.* 11(4) : 67 – 77.
- Ratdilokpanich, K. (1980). "Pulmonary Paragonimiasis : a case report," *Chiangmai Med. Bull.* 19 : 147 – 151.
- Rodriguez, R.L., and Tait, R.C. (1983). *Recombinant DNA techniques : an introduction*. New York : Addison-Wasley Publishing..
- Sander, C.A.F.M. van der. *et al.* (1992, February). "Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA," *J. Mol. Biol.* 223(4) : 899 – 910.
- Schlötterer, C. *et al.* (1994, May). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions In *Drosophila*," *Mol. Biol. Evol.* 11(3) : 513 – 522.
- Sirisumpan, P. (1962). " A case of pulmonary paragonimiasis occuring in a new area in Thailand," *J. Med. Assoc. Thai.* 46 : 201 – 211.
- Srisont, D. (1983). "Paragonimiasis in Nakornnayok Hospital," *Bull.Med.Serv.* 8 : 573 - 578.
- Sutthipunthu, P. *et al.* (1978, July). "Paragonimiasis : a case report from Chiang Rai Province Northern Thailand," *J. Med. Assoc. Thai.* 61(7) : 427 – 433.
- Upatham, E.S. *et al.* (1995). "*Paragonimus heterotremus* infection in a community in Saraburi Province, central Thailand," *J. Sc. Soc. Thai.* 21 : 1 - 9.
- Vajrasthira, S. (1969). "Paragonimiasis in Thiland," *Proceedings of the fourth Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine, Schistosomiasis and other snail – transmitted helminthiasis*, Manila. Bangkok : Watana Panich.
- Vajrasthira, S. (1986). "Paragonimiasis," *The 25th Anniversary of the Faculty of Tropical Medicine*. Bangkok : Krung Siam Press.
- Vajrasthira, S., Harinasuta, C., and Maiphoom, C. (1959). "Study on helminthic infections in Thailand. The incidence of paragonimiasis in the first recognized endemic area," *Jpn. J. Exp. Med.* 29 : 159 – 166.
- Vanijanonta, S. *et al.* (1981). "Pulmonary paragonimiasis with expectoration of Worm : A case report," *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Hlth.* 12(1) : 104 –

106.

- Watson, D. *et al.* (1987). *Molecular Biology of the Gene*. New York : The Benjaming / Cumming Publishing Company, Inc.
- WHO. (1993). Report of the WHO study group on the control of food-borne trematode infection Conference held in Manila, 18 to 26 October.
- Wickware, P. (1997). *DNASIS for windows*. San Francisco : Hitachi Software Engineering Co., Ltd.
- Yaemput, S., Dekumjoy, P., and Visiassuk, K. (1994, June). "The Natural first intermediate host of *Paragonimus siamensis* (Miyazaki and Wykoff, 1965) in Thailand," *Southeast Asian J. Trop. Med. Public, Hlth.* 25(2) : 284 – 290.
- Zaman, V. (1984). "*Atlas of Medical Parasitology*," 2nd ed. Singapore : PG Publish Pte.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวอาชว์ดาม์ กันสิทธิ์
วันเดือนปีเกิด	9 กุมภาพันธ์ 2512
สถานที่เกิด	อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	3 หมู่ 4 ตำบลสำโรง อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ 10130
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์ระดับ 6
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2527	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนวิสุทธิกษัตริ์
พ.ศ. 2532	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยรามคำแหง
พ.ศ. 2544	กศ.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ