



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ การบ่งบอกระดับอนุของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus*
Onji & Nishino, 1916

โดย ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การบ่งบอกระดับอนุของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* Onji & Nishino,
1916

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. รศ.ดร.ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 2. นายประลองยุทธ ศรีपालวิทย์ | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. Prof.Dr. Jong-Yil Chai | Department of Parasitology and Tropical
Medicine, College of Medicine,
Seoul National University |
| 4. รศ.ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความคิดเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BGJ4580020

ชื่อโครงการ : การบ่งบอกระดับบ่อนของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus*

Onji & Nishino, 1916

ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.ชโลบล วงศ์สวัสดิ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นายประลองยุทธ ศรีपालวิทย์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Prof.Dr. Jong-Yil Chai

Department of Parasitology and Tropical

Medicine, College of Medicine,

Seoul National University

รศ.ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : cwongsawd@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ 6 ชนิด (*Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchis taichui*, *Centrocestus caninus*, *Metagonimus yokogawai*, *Haplorchoides* sp. และ *Opisthorchis viverrini*) โดยเทคนิค high annealing temperature - random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD) จากการใช้ arbitrary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 20 primers เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA แบบสุ่ม ซึ่งใช้ genomic DNA ของพยาธิเป็นแท่นพิมพ์ ด้วยวิธี PCR พบว่ามี 19 primers สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งมีแบบแผนลายพิมพ์ที่แตกต่างกันระหว่างพยาธิ 6 ชนิดได้ และพบแถบดีเอ็นเอขนาด 382 คู่เบสในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก primer OPA-08 (GTGACGTAGG) ซึ่งพบเฉพาะใน *S. falcatus* จึงนำไปหาลำดับเบส จากข้อมูลที่ได้นำไปออกแบบ specific primer 1 คู่ คือ 5'-GTGACGTAGGACCTTAAACAG-3' และ 5'-GTGACGTAGGTAGCCCAGGTAGCGCGT-3' ซึ่งสามารถสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เฉพาะใน *S. falcatus*

คำหลัก : *Stellantchasmus falcatus*, heterophyidae, detection

Abstract

Project code : BGJ4580020

Project Title : Molecular identification of trematode, *Stellantchasmus falcatus*

Onji & Nishino, 1916

Investigator :

Assoc.Prof. Chalobol Wongsawad

Department of Biology, Faculty of
Science, Chaing Mai University

Mr. Pralongyut Sripalwit

Department of Biology, Faculty of
Science, Chaing Mai University

Prof.Dr. Jong-Yil Chai

Department of Parasitology and
Tropical Medicine, College of
Medicine, Seoul National University

Assoc.Prof. Somboon Anantalabhochai

Department of Biology, Faculty of
Science, Chaing Mai University

E-mail Address : cwongsawd@yahoo.com

Project Period : 1 year

Genomic DNA from four heterophyid flukes (*Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchis taichui*, *Centrocestus caninus* and *Metagonimus yokogawai*) and two other flukes (*Haplorchoides* sp. and *Opisthorchis viverrini*) were amplified by the high annealing temperature random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. Out of 20 random 10-mer oligonucleotide primers (Operon Technologies Inc.), 19 primers produced DNA polymorphism among those genomic DNA. A unique of 382-bp band generated by the OPA08 primer (GTGACGTAGG) was found in HAT-RAPD pattern of *S. falcatus*. Subsequently, this band was excised and sequenced. Based on sequence data, a pair of specific primers was designed to detect *S. falcatus*; 5'-GTGACGTAGGACCTTAAACAG-3' and 5'-GTGACGTAGGTAGCCCAGGTAGCGCGT-3'.

Keywords : *Stellantchasmus falcatus*, heterophyidae, detection

Executive summary

Stellantchasmus falcatus เป็นพยาธิใบไม้ขนาดเล็กที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถติดต่อถึงคนได้ ในประเทศไทยมีรายงานพบในคนในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การตรวจวินิจฉัยโรคของพยาธิใบไม้ *S. falcatus* ทำได้โดยการตรวจอุจจาระเพื่อหาไข่ของพยาธิโดยต้องแยกความแตกต่างจากไข่พยาธิในวงศ์เดียวกัน ซึ่งทำได้ยากเพราะไข่ของพยาธิใบไม้กลุ่มนี้มีขนาดเล็กและลักษณะคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ไข่ของพยาธิกลุ่มนี้ยังคล้ายกับไข่ของพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) ซึ่งอาจต้องใช้เวลาและเกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยได้ง่ายจึงต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ในการจัดจำแนก ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีการตรวจหาพยาธิโดยใช้ DNA primers เป็นวิธีที่แม่นยำและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ผลจากการศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ของ *S. falcatus* เมื่อเปรียบเทียบกับพยาธิชนิดใกล้เคียง ได้แก่ *Haplorchis taichui*, *Centrocestus caninus*, *Metagonimus yokogawai*, *Haplorchoides* sp. และ *O. viverrini* จากเทคนิค HAT-RAPD พบว่า 19 primers สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลักษณะเป็น polymorphism และแต่ละ primer ก็ให้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเฉพาะตัว เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,200 - 185 คู่เบส เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 203 แถบ และพบแถบดีเอ็นเอขนาด 382 คู่เบสในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก primer OPA-08 ซึ่งพบเฉพาะใน *S. falcatus* จึงนำไปหาลำดับเบส จากข้อมูลที่ได้นำไปออกแบบ specific primer 1 คู่ คือ F1 (5'-GTGACGTAGGACCTTAAACAG-3') และ R1 (5'-GTGACGTAGGTAGCCCAGGTAGCGCGT-3') ซึ่งสามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่เฉพาะใน *S. falcatus* เท่านั้น ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาการระบาดของพยาธิในประชากร ติดตามการติดเชื้อพยาธิในแต่ละฤดูและภายหลังการรักษา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิกับโฮสต์ (host-parasite interactions) ทั้งในโฮสต์ถาวร (definitive host) และโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host) อีกทั้งยังนำไปใช้ตรวจการติดเชื้อในโฮสต์กึ่งกลาง เช่น ตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ในหอยหรือระยะ metacercaria ในปลา

เนื้อหางานวิจัย

การบ่งบอกระดับอนุของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* Onji & Nishino, 1916
Molecular Identification of Trematode, *Stellantchasmus falcatus* Onji & Nishino, 1916

ก. ความเป็นมา

Stellantchasmus falcatus เป็นพยาธิใบไม้ขนาดเล็กที่พบในลำไส้ของแมว สุนัข หนู และคนในเขตบริเวณเอเชีย-แปซิฟิก ตะวันออกกลางและออสเตรเลีย (Pearson, 1964; Pearson and Ow-Yang, 1982) มีรายงานครั้งแรกในปี 1924 โดย Onji and Nishio จากลำไส้เล็กของนก แมว และสุนัข ในประเทศญี่ปุ่น (Martin, 1958) ในคนมีรายงานครั้งแรกจากประเทศฟิลิปปินส์ (Alicata and Garcia, 1935) โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 เป็นหอยฝาเดียว เช่น *Stenomelania newcombi*, *Thiara granifera* และ *Tarebia granifera muiensis* (Martin, 1958; Noda, 1959) โฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 มีรายงานทั้งปลาน้ำจืดและน้ำกร่อย เช่น *Mugil cephalus* (Noda, 1959; Chai and Sohn, 1988), *Mugil dussumieri*, *Anabas testidineus* (Vazquez-Colet and Africa, 1940), *Liza menada*, *Acanthogobius flavimanus* (Komiya and Suzuki, 1966), *Dermogenus pusillus* (Tantachamrun and Kliks, 1978) และ *Xenotodon cancilooides concilooides* (Ditrich et al., 1990)

ในประเทศไทยมีรายงานพบ *S. falcatus* ในคนจากการผ่าตัดที่จังหวัดเชียงใหม่โดย Kliks and Tantachamrun (1974) ถัดมาในปี 1978 Tantachamrun and Kliks รายงานพบอีก 3 ราย จาก อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา และจังหวัดน่าน จากการผ่าตัด ต่อมา Radomyos et al. (1990) รายงานเพิ่มอีก 2 รายจากจังหวัดสกลนครและยโสธร โดยการถ่ายพยาธิผู้ป่วยด้วยยา praziquantel การติดต่อของพยาธิชนิดนี้เป็นผลมาจากพฤติกรรมการกินของคนเป็นสำคัญโดยการกินปลาปรุงไม่สุก เช่น ก้อยปลา ลาบปลา โดยในปลาเหล่านี้มีตัวอ่อนระยะ metacercaria ซึ่งเป็นระยะติดต่อของพยาธิอยู่ จึงทำให้พยาธิสามารถติดต่อเข้าสู่คนและเจริญเป็นตัวเต็มวัยอยู่ในลำไส้เล็ก คนที่ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ พยาธิสภาพเกิดบริเวณที่พยาธิเกาะซึ่งอาจทำให้เกิดการอักเสบเล็กน้อย ทำให้มีอาการเสียดท้อง (colicky pain) ท้องร่วงบ่อยๆ แบบมีมูกปนเลือด หากพยาธิฝังลึกในผนังลำไส้ ไข่อาจพลัดเข้าไปในกระแสโลหิต ไปอวัยวะสำคัญต่างๆ เช่น สมอง ไชสันหลัง หัวใจ และลิ้นหัวใจ ทำให้อักเสบและอาจถึงตายได้ (Africa et al., 1940)

การตรวจวินิจฉัยโรคทำได้โดยการตรวจอุจจารดเพื่อหาไข่พยาธิ ซึ่งต้องแยกความแตกต่างจากไข่พยาธิ heterophyids ตัวอื่น จึงทำได้ยากเพราะไข่ของพยาธิใบไม้กลุ่มนี้มีขนาดเล็กและลักษณะคล้ายคลึงกันซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยได้ ดังนั้นวิธีการตรวจที่จำเพาะเจาะจงและแม่นยำเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อความรวดเร็วในการรักษาและเฝ้าระวังการ

ติดเชื้อจากพยาธิต่อไป ในปัจจุบันมีหลายๆ วิธีที่ได้นำมาใช้ในการตรวจหาพยาธิเช่น การใช้ antigen หรือ antibody เป็นตัวติดตามเพื่อที่จะตรวจหา antibody หรือ antigen ตามลำดับ DNA probes/primers ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหา genomic DNA ของพยาธิไม่ว่าจะเป็นการตรวจในผู้ป่วย จากอาหารกระป๋องหรืออาหารแช่แข็ง ที่นำเข้ามาในประเทศ DNA probes/primers ที่ใช้ในปัจจุบันสามารถตรวจหาพยาธิได้ในหลายๆ ชนิดเช่น *Plasmodium falciparum* (Delves et al., 1989), *Schistosoma mansoni* (Walker et al., 1989), *Onchocerca volvulus* (Harnett et al., 1989), *Theileria parva* (Allsopp et al., 1989) และ *Ophisthorchis viverrini* (Wongratanacheewin et al., 2001) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พยายามหา DNA probes/primers ที่จำเพาะเจาะจงต่อพยาธิชนิดนี้ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์เป็นอย่างมาก

ข. วัตถุประสงค์/เป้าหมายของการวิจัย

1. สร้างแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *S. falcatus* เปรียบเทียบกับพยาธิชนิดใกล้เคียง ด้วยเทคนิค High Annealing Temperature - Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD)
2. สร้าง DNA probes/primers ที่จำเพาะสำหรับ *S. falcatus*

ค. แนวทางและแผนการดำเนินการวิจัย

วิธีการวิจัย

1. Parasite collection

1.1 รวบรวม metacercariae ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิ *Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchis taichui* และ *Centrocestus caninus* จากปลาเข็ม (*Dermogenus pusillus*) ปลาสวายขาว (*Henicorhynchus siamensis*) และปลาทอง (*Carassius auratus*) ตามลำดับ จากจังหวัดเชียงใหม่และกรุงเทพฯ จากนั้นป้อน metacercaria ให้กับไก่หรือหนูซึ่งใช้เป็น definitive host แล้วทำการผ่า host เพื่อเก็บรวบรวมตัวเต็มวัยของพยาธิเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20°C

1.2 ตัวเต็มวัยของพยาธิ *Metagonimus yokogawai* ได้รับจาก Prof. Jong-Yil Chai, Department of Parasitology and Tropical Medicine, College of Medicine, Seoul Nation University, Korea

1.3 ตัวเต็มวัยของพยาธิ *Haplorchoides* sp. เก็บรวบรวมจากลำไส้ของปลากดเหลือง (*Hemibagrus filamentus*) จากทะเลสาบดอยเต่า อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่

1.4 ตัวเต็มวัยของพยาธิ *Opisthorchis viverrini* ได้รับจาก รศ.ดร.ไพบุลย์ สิทธิถาวร ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. DNA extraction

ในการวิจัยครั้งนี้สกัดดีเอ็นเอโดยชุด DNeasy Tissue Kit ของบริษัท QIAGEN จากนั้นดีเอ็นเอที่ได้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3. HAT-RAPD technique

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำตามวิธีการของ Anantalabhochai *et al.* (2000) ดังนี้

3.1 การเลือกใช้ primers

primers ใช้ในการวิจัยเป็น arbitrary primers ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ชุด Kit A ของบริษัท Operon Technology, USA จำนวน 20 primers (OPA-01 – OPA-20)

3.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

ใส่สารละลายปริมาตร 20 μl ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งสารละลายประกอบด้วย Tag PCR Master mix Kit (QIAGEN), primer, น้ำ และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10-25 ng

3.3 เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	:	94	:	94	48	72	:	72
เวลา (นาที)	:	2	:	0.45	0.45	1	:	7
จำนวนรอบ (รอบ)	:	1	:		30		:	1

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ไปทำ agarose gel electrophoresis ต่อไป

4. Sequencing

เลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากข้อ 3 แยกออกจาก agarose gel โดยใช้ MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้ใส่เข้าไปใน pGEM-T easy vector (Promega) แล้วส่งไปหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

5. Primer design

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4 ไปหาลำดับเบสตามวิธีของ Harnett *et al.* (1989) จากข้อมูลที่ได้นำไปออกแบบและสังเคราะห์ primers พร้อมทั้งตรวจสอบ primers ที่ได้

6. Data analysis

ตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิด ซึ่งการบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือ การปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้สัญลักษณ์เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอในแต่ละ primer ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b10

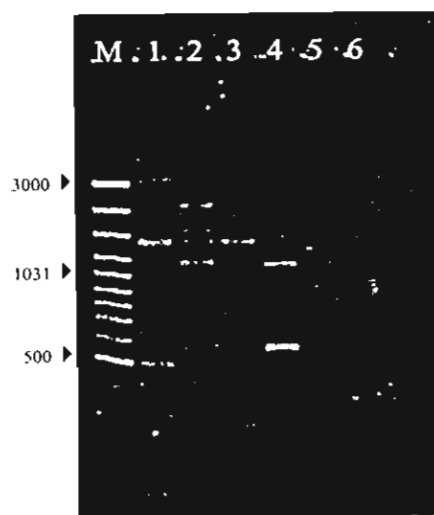
ง. ผลการทดลอง

HAT-RAPD technique

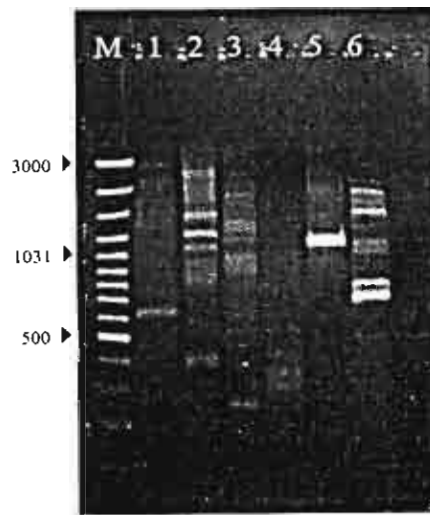
จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของพยาธิโดยเตรียมดีเอ็นเอจากพยาธิใบไม้ 6 ชนิดคือ *Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchis taichui*, *Centrocestus caninus*, *Metagonimus yokogawai*, *Haplorchoides* sp. และ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) แล้วนำไปเพิ่มขยายปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary primer จำนวน 20 primers (OPA-01-20) พบว่า OPA-05 ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาได้ ส่วนอีก 19 primers สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้และยังพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) ในระหว่างชนิดพยาธิอีกด้วย การศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 19 primers พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,200 - 185 bp. และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 203 แถบ ซึ่งใช้บอกความแตกต่างระหว่างชนิดพยาธิได้

ตาราง 1 แสดงลำดับเบสของ primer และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค HAT-RAPD จากพยาธิ 6 ชนิด

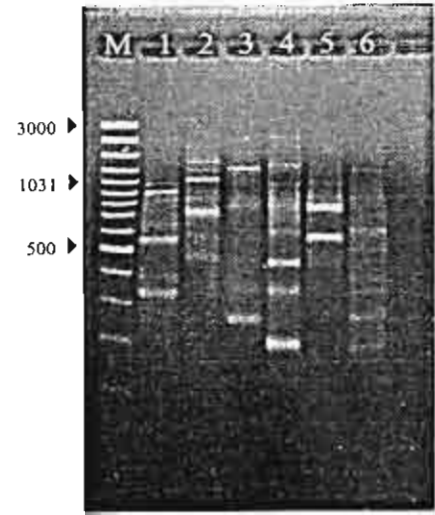
Primers	ลำดับเบส 5'→3'	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มี น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน
OPA-01	CAG GCC CTT C	22	12
OPA-02	TGC CGA GCT G	23	17
OPA-03	AGT CAG CCA C	19	12
OPA-04	AAT CGG GCT G	31	17
OPA-05	AGG GGT CTT G	0	0
OPA-06	GGT CCC TGA C	1	1
OPA-07	GAA ACG GGT G	24	17
OPA-08	GTG ACG TAG G	14	13
OPA-09	GGG TAA CGC C	19	9
OPA-10	GTG ATC GCA G	23	6
OPA-11	CAA TCG CCG T	16	10
OPA-12	TCG GCG ATA G	8	8
OPA-13	CAG CAC CCA C	25	12
OPA-14	TCT GTG CTG G	8	8
OPA-15	TTC CGA ACC C	16	10
OPA-16	AGC CAG CGA A	21	9
OPA-17	GAC CGC TTG T	19	11
OPA-18	AGG TGA CCG T	25	11
OPA-19	CAA ACG TCG G	20	9
OPA-20	GTT GCG ATC C	20	11
รวม		354	203



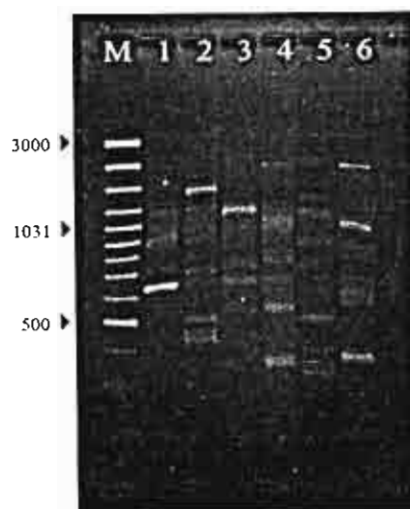
A



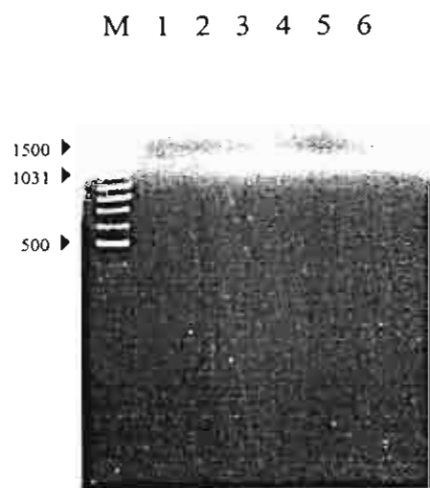
B



C



D



E

รูป 1 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

A) OPA-01 B) OPA-02 C) OPA-03 D) OPA-04 E) OPA-06

(lane M, molecular weight marker ; lane 1, *S. falcatatus* ; lane 2, *H. taichui* ; lane 3, *C. caninus* ; lane 4, *M. yokogawai* ; lane 5, *Haplorchoides* sp. ; lane 6, *O. viverrini*)

จากรูป 1A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-01 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 22 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,080 – 285 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 10 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 12 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,500 650 และ 315 bp. พบใน *S. falcatu*s
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,920 1,550 และ 1,350 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,800 และ 285 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 530 bp. พบใน *M. yokogawai*
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 900 และ 360 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
6. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,160 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 1B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-02 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 23 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,000 – 255 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 6 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 17 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 615 bp. พบใน *S. falcatu*s
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,750 1,500 1,200 และ 382 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,350 1,260 450 และ 255 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 420 365 และ 305 bp. พบใน *M. yokogawai*
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,950 1,550 765 720 และ 475 bp. พบใน *O. viverrini*

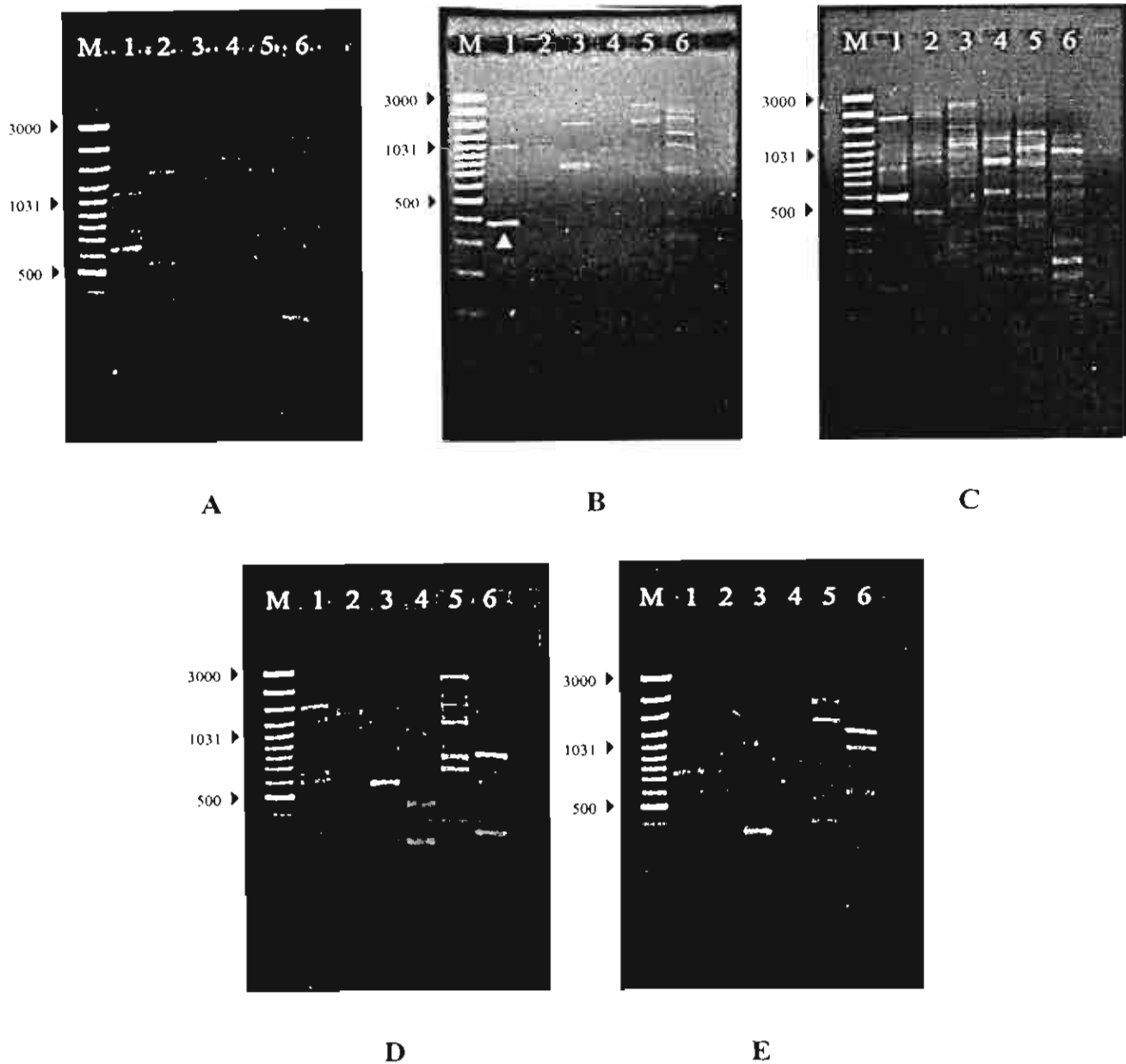
จากรูป 1C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-03 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,150 – 285 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 7 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 12 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 930 510 และ 460 bp. พบใน *S. falcatu*s
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,800 1,400 และ 700 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,250 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,300 440 และ 370 bp. พบใน *M. yokogawai*
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 750 และ 540 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.

จากรูป 1D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-04 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 31 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,550 – 265 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 14 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 17 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,550 650 และ 480 bp. พบใน *H. taichui*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,200 1,020 และ 680 bp. พบใน *C. caninus*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,250 1,850 1,750 1,180 770 310 และ 265 bp. พบใน *Haplorchooides* sp.
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,580 960 510 และ 340 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 1E แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-06 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 1200 bp. พบใน *C. caninus*



รูป 2 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer
A) OPA-07 B) OPA-08 C) OPA-09 D) OPA-10 E) OPA-11
 (lane M, molecular weight marker ; lane 1, *S. falcatus* ; lane 2, *H. taichui* ; lane 3, *C. caninus* ; lane 4, *M. yokogawai* ; lane 5, *Haplorchoides* sp. ; lane 6, *O. viverrini*)

จากรูป 2A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-07 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 24 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,000 – 290 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 7 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 17 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,000 990 และ 670 bp. พบใน *S. falcatus*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3,000 และ 590 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,340 1,280 และ 445 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,720 1,250 และ 700 bp. พบใน *M. yokogawai*
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,800 1,550 1,450 1,180 และ 970 bp. พบใน *Haplorhoides* sp.
6. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 290 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 2B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-08 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 14 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,620 – 390 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 1 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 13 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,700 และ 382 bp. พบใน *S. falcatus*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,420 และ 760 bp. พบใน *C. caninus*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,300 และ 1,450 bp. พบใน *Haplorhoides* sp.
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,620 2,000 1,900 1,600 1,500 1,350 และ 1,150 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 2C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-09 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,400 – 190 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 10 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 9 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,900 และ 470 bp. พบใน *H. taichui*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,400 และ 1,450 bp. พบใน *C. caninus*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 600 bp. พบใน *M. yokogawai*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,040 bp. พบใน *Haplorhoides* sp.
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 315 240 และ 190 bp. พบใน *O. viverrini*

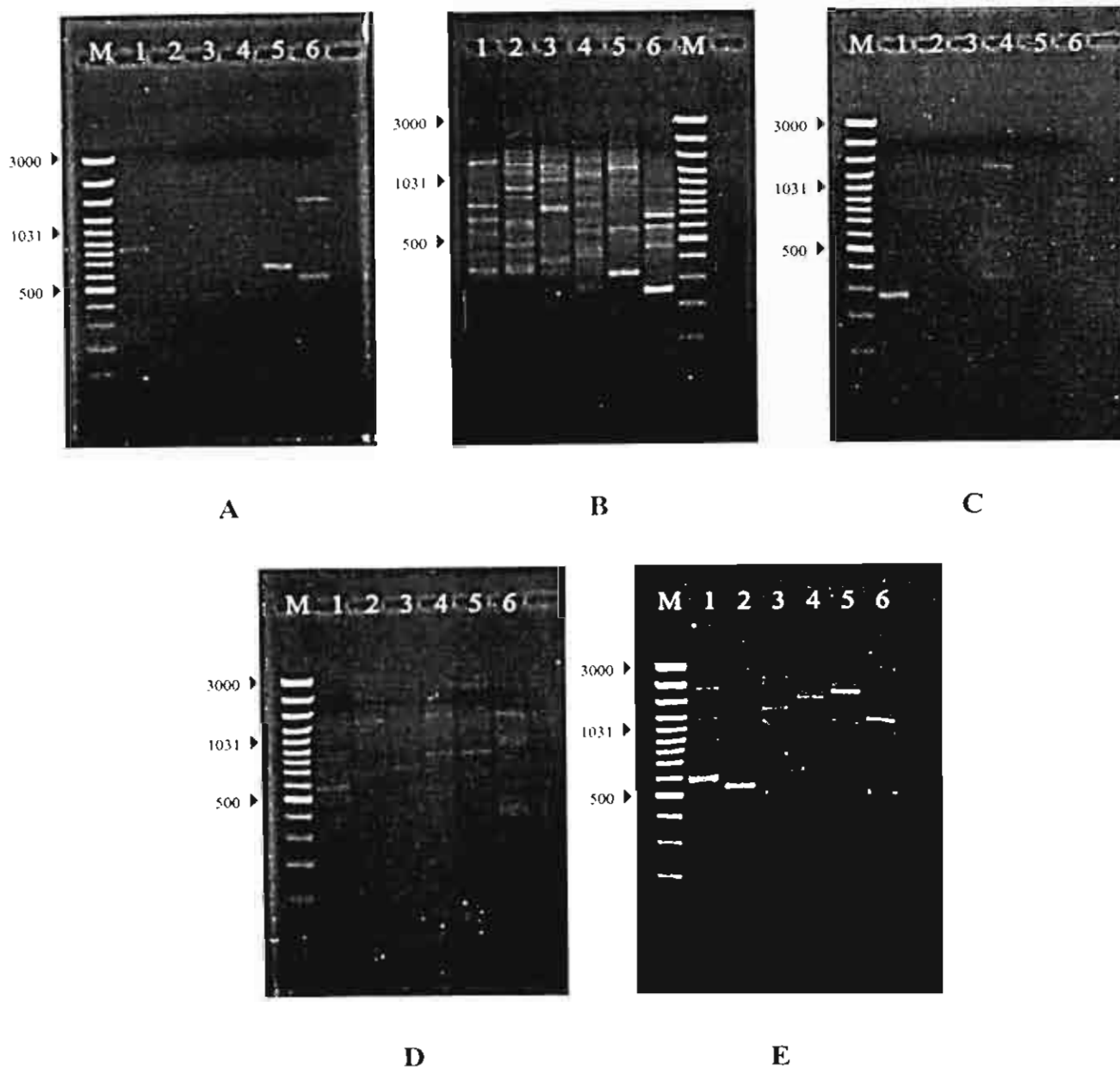
จากรูป 2D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-10 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 23 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,900 – 185 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 17 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 6 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,900 และ 2,300 bp. พบใน *H. taichui*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 450 bp. พบใน *M. yokogawai*

3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,650 และ 1,200 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 185 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 2E แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-11 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5,200 – 280 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 6 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 10 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,400 และ 360 bp. พบใน *C. caninus*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 930 และ 840 bp. พบใน *M. yokogawai*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5,200 1,500 และ 830 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,280 810 และ 280 bp. พบใน *O. viverrini*



รูป 3 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

A) OPA-12 B) OPA-13 C) OPA-14 D) OPA-15 E) OPA-16

(lane M, molecular weight marker ; lane 1, *S. falcatus* ; lane 2, *H. taichui* ; lane 3, *C. caninus* ; lane 4, *M. yokogawai* ; lane 5, *Haplorchoides* sp. ; lane 6, *O. viverrini*)

จากรูป 3A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-12 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,800 – 570 เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันทั้งหมด 8 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 800 bp. พบใน *S. falcatu*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 930 bp. พบใน *C. caninus*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,800 bp. พบใน *M. yokogawai*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 640 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,480 1,360 1,220 และ 570 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 3B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-13 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 25 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,700 – 260 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 13 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 12 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,450 และ 680 bp. พบใน *S. falcatu*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,380 และ 660 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,360 1,080 และ 380 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,160 bp. พบใน *M. yokogawai*
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 335 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
6. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,280 720 และ 260 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 3C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-14 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,320 – 260 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันทั้งหมด 8 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 260 bp. พบใน *S. falcatu*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,320 830 650 610 540 และ 340 bp.
พบใน *M. yokogawai*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 860 bp. พบใน *O. viverrini*

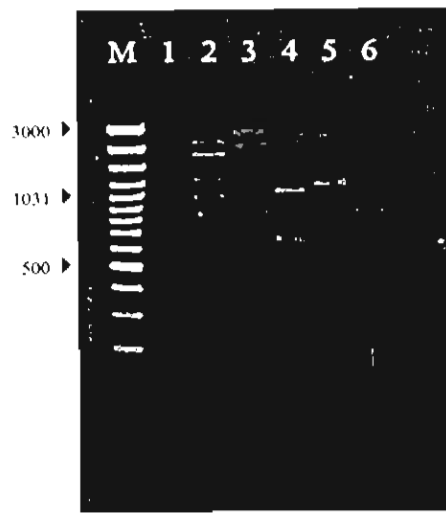
จากรูป 3D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-15 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,200 – 540 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 6 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 10 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 540 bp. พบใน *S. falcatu*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3,200 2,750 1,920 1,250 และ 650 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 700 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,880 และ 1,600 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.

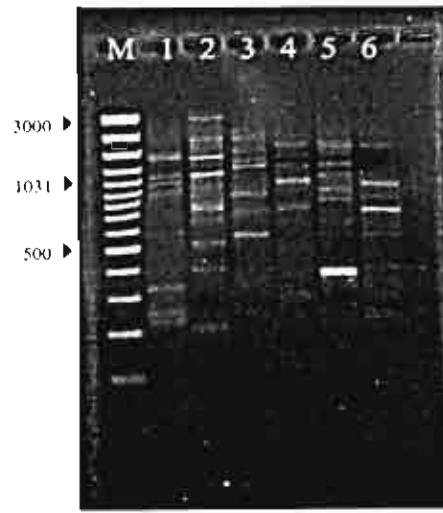
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 980 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 3E แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-16 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 21 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,000 – 295 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 12 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 9 แถบ ได้แก่

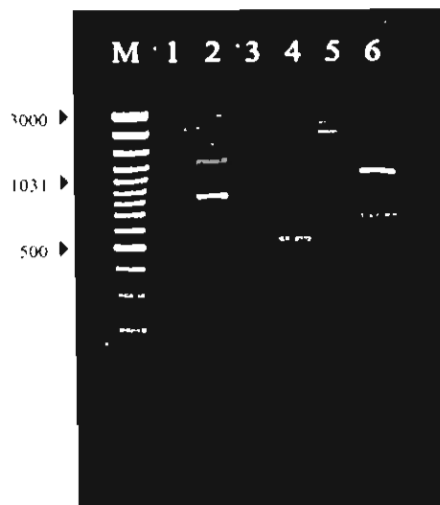
1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 600 bp. พบใน *S. falcatu*s
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 540 และ 310 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 350 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 390 bp. พบใน *M. yokogawai*
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,140 410 335 และ 295 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.



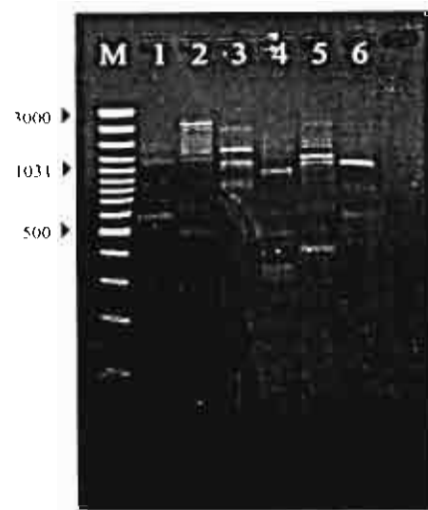
A



B



C



D

รูป 4 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

A) OPA-17 B) OPA-18 C) OPA-19 D) OPA-20

(lane M, molecular weight marker ; lane 1, *S. falcatus* ; lane 2, *H. taichui* ; lane 3, *C. caninus* ; lane 4, *M. yokogawai* ; lane 5, *Haplorchoides* sp. ; lane 6, *O. viverrini*)

จากรูป 4A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-17 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,550 – 280 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 8 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,000 และ 950 bp. พบใน *H. taichui*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,400 และ 1,840 bp. พบใน *C. caninus*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,250 และ 1,000 bp. พบใน *M. yokogawai*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,250 1,080 และ 280 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 475 และ 400 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 4B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-18 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 25 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,500 – 194 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 14 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 340 240 และ 205 bp. พบใน *S. falcatus*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3,500 3,000 510 และ 194 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 560 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 370 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 930 และ 680 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 4C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-19 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 20 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,000 – 230 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 11 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 9 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 810 720 และ 365 bp. พบใน *H. taichui*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,960 และ 870 bp. พบใน *C. caninus*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 230 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3,000 1,031 และ 640 bp. พบใน *O. viverrini*

จากรูป 4D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-20 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 20 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,450 – 310 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 9 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ ได้แก่

1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,300 1,250 และ 485 bp. พบใน *H. taichui*
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 820 และ 310 bp. พบใน *C. caninus*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,540 950 และ 460 bp. พบใน *M. yokogawai*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,450 และ 395 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 760 bp. พบใน *O. viverrini*

ตาราง 2 แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิดโดยเทคนิค HAT-RAPD จาก 19 primers ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบเป็น 0

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-01 1 → 22	OPA-02 1 → 23	OPA-03 1 → 19
<i>S. falcatus</i>	1100010101000000101010	100000000000000100000000	1010000111000100100
<i>H. taichui</i>	1111011011101001000000	11110010010100000001000	0111001100010000000
<i>C. caninus</i>	0110100001000000000001	00100001100000010100001	0000010100000000010
<i>M. yokogawai</i>	0000000001101000010000	00000000000000010010110	1000100010000011001
<i>Haplorchoides</i> sp.	0000000001100111001100	0000000000100000000000	0000000000101000000
<i>O. viverrini</i>	0000000001010100000000	10011100001111001000000	0000001000000000011

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-04 1 → 31	OPA-06 1 → 1	OPA-07 1 → 24
<i>S. falcatus</i>	0000000100001000100000000100000	0	0010000000000001101001000
<i>H. taichui</i>	10100001100000000000001000011000	0	1110100001000000000000100
<i>C. caninus</i>	0010000001011110010010100001000	1	010000000011000000100010
<i>M. yokogawai</i>	0000100000000000001100000000000	0	000000100000100000010000
<i>Haplorchoides</i> sp.	0101010010100010000100010100011	0	000101011100010010100000
<i>O. viverrini</i>	0000101000010001111000111000100	0	001110000000000001000001

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-08 1 → 14	OPA-09 1 → 19	OPA-10 1 → 23
<i>S. falcatus</i>	00001000000101	0010000000001000000	00010010010000111000100
<i>H. taichui</i>	00000000000100	0110001011000100000	10111011100100000100000
<i>C. caninus</i>	00000000100010	1011110010100000000	00001111000010101000010
<i>M. yokogawai</i>	00000000000000	0010111001010010010	00000111000100100111010
<i>Haplorchoides</i> sp.	01000001000000	0000100101001010010	01001111011011010001000
<i>O. viverrini</i>	10110110011100	0000000010101001101	00001010100001000000101

ตาราง 2 (ต่อ) แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิดโดยเทคนิค HAT-RAPD จาก 19 primers ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบเป็น 0

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-11 1 → 16	OPA-12 1 → 8	OPA-13 1 → 25
<i>S. falcatus</i>	0000000000011000	00000100	0101000000011001001010100
<i>H. taichui</i>	0000000000000000	00000000	1010100100110000100110100
<i>C. caninus</i>	0101001000010010	00001000	1110010101110100000001100
<i>M. yokogawai</i>	0010000110000000	10000000	0010000010111000001110100
<i>Haplorchoides</i> sp.	1001100001000100	00000010	0000000000010000010000010
<i>O. viverrini</i>	0010011000101101	01110001	00000010000001100101000001

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-14 1 → 8	OPA-15 1 → 16	OPA-16 1 → 21
<i>S. falcatus</i>	00000001	0000000100000001	0001000100101000000000
<i>H. taichui</i>	00000000	1010110100100010	110111000000010000010
<i>C. caninus</i>	00000000	0000000010000100	010000101100001001000
<i>M. yokogawai</i>	10111110	0000000011001000	000111101000000010000
<i>Haplorchoides</i> sp.	00000000	0101101000001000	001010000001000100101
<i>O. viverrini</i>	01000000	0000001001010000	111010011110001000000

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-17 1 → 19	OPA-18 1 → 25	OPA-19 1 → 20
<i>S. falcatus</i>	00000011000000000000	0011000010110000000001110	00001010011000001100
<i>H. taichui</i>	1001011101001000000	1100111010100000100100001	01010000110001100010
<i>C. caninus</i>	1100111100000100000	0011110001000010001000000	01001101001010001000
<i>M. yokogawai</i>	0000000110010110000	0000101000001000100000000	00000000000000000100
<i>Haplorchoides</i> sp.	0010000000100011001	0000001111010011000010000	011100111000000000001
<i>O. viverrini</i>	0000000001000101110	0000010100001101010000000	10100000000100010000

ตาราง 2 (ต่อ) แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิดโดยเทคนิค HAT-RAPD จาก 19 primers ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบเป็น 0

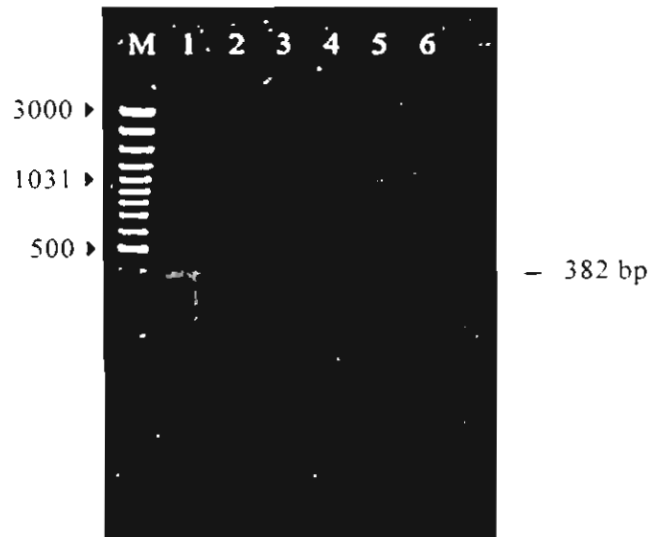
ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ
	OPA-20
	1 → 20
<i>S. falcatus</i>	00000001011100010000
<i>H. taichui</i>	01110001101000001000
<i>C. caninus</i>	00010001000101000001
<i>M. yokogawai</i>	00001010000010000100
<i>Haplorchoides</i> sp.	10100110010100000010
<i>O. viverrini</i>	00000100010100110000

Sequencing and primer design

จากแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จาก 19 primers พบแถบดีเอ็นเอขนาด 382 bp ที่พบเฉพาะใน *S. falcatus* และแยกออกจากแถบอื่นชัดเจนจาก primer OPA-08 (รูป 2B) จึงได้เลือกแถบดีเอ็นเอนี้ไปหาลำดับเบสและได้ลำดับเบสดังรูป 5 จากข้อมูลที่ได้นำไปออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อ *S. falcatus* และนำ primers ที่ได้กลับไปทดลองอีกครั้งกับพยาธิทั้ง 6 ชนิด และพบว่า primers ดังกล่าวสามารถสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เฉพาะใน *S. falcatus* (รูป 6)

```
1   GTGACGTAGG ACCTTAAAAC AGCAATACAA AAATTAATGG AGATACATCA   50
51  GGTACCCACT CCATGGAGAG CAGCAAGCGA TGCAAATATT TTTTCCAGTA   100
101 TTTTAAATTT TCAGTTATTC AAGCCGCGTC TGTACATGGT GAAAAAATAG   150
151 GTAAAGAAAT GATCAAAACA ATTCATTGTA ACGTCAGATT TTAATCTACA   200
201 TCACCCTGGA AAACCTAAAA ACTCTCATGA GCCTGCAGGT TTCTGCTGAA   250
251 GCTTTATGCG AACAGGATCC TCCCAAATTT AATGTGATTT CTTTGGAATC   300
301 ATTCCAAACC AACACATAAG GTTTAGCACC GCGTTCTTAC GCTACAGTGA   350
351 TTGAACGCGC TACCTGGGCT ACCTACGTCA CA                           382
```

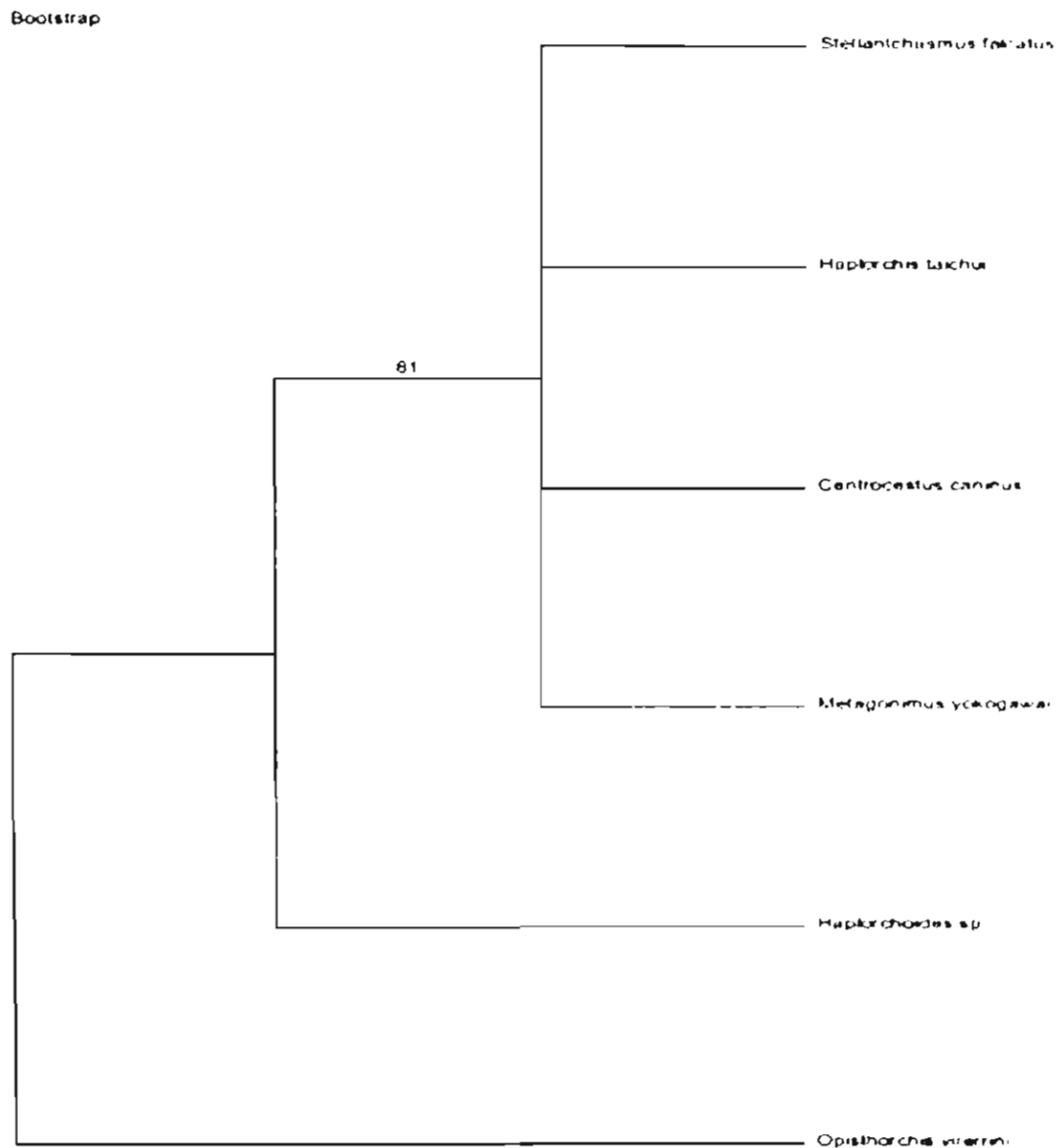
รูป 5 แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เลือกจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ *S. falcatus* จากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR โดย primer OPA-08



รูป 6 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค PCR ที่ใช้ specific primer ที่จำเพาะต่อ *S. falcatus* (lane M, molecular weight marker ; lane 1, *S. falcatus* ; lane 2, *H. taichui* ; lane 3, *C. caninus* ; lane 4, *M. yokogawai* ; lane 5, *Haplorchoides* sp. ; lane 6, *O. viverrini*)

Data analysis

จากแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 19 primers เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดพยาธิโดยโปรแกรม PAUP พบว่า *S. falcatus*, *H. taichui*, *C. caninus* และ *M. yokogawai* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 81 ส่วน *Haplorchoides* sp. อยู่ถัดออกมา และ *O. viverrini* ซึ่งเป็น outgroup อยู่นอกสุด (รูป 6)



รูป 7 Evolutionary tree (consensus tree) จากแถบดีเอ็นเอ 354 แถบ โดยเทคนิค HAT-RAPD ของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยวิธี parsimony method จากโปรแกรม PAUP (tree length = 500, CI = 0.704 และ rep. = 5,000)

จ. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

จากการสุ่มใช้ arbitrary primer จำนวนทั้งหมด 20 primers พบว่า 19 primers สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลักษณะเป็น polymorphism และแต่ละ primer ก็ให้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเฉพาะตัว การศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 19 primers พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,200 - 185 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 203 แถบ ซึ่งใช้บอกความแตกต่างระหว่างชนิดพยาธิได้ และเกิดแถบดีเอ็นเอเพียง 2 แถบที่พบในพยาธิทั้ง 6 ชนิดที่ศึกษา จาก primer OPA-01 และ OPA-10 คิดเป็น 0.56% จากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ส่วน primer OPA-04 OPA-08 OPA-10 OPA-13 และ OPA-18 สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้มาก

primer OPA-01, OPA02, OPA-03, OPA-07, OPA-08, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPA-16 และ OPA-18 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่างของ *S. falcatus* จากพยาธิชนิดอื่นที่ทำการศึกษามาก 5 ชนิดได้ โดย primer OPA-01 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมดที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ 22 แถบ primer OPA-02 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-03 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-07 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 24 แถบ primer OPA-08 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 14 แถบ primer OPA-12 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-13 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-14 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-15 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-16 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 21 แถบ และ primer OPA-18 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ รวมทั้งหมด 21 แถบจากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ คิดเป็น 5.93% จากทั้งหมด

primer OPA-01, OPA02, OPA-03, OPA-04, OPA-07, OPA-09, OPA-10, OPA-13, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19 และ OPA-20 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่างของ *H. taichui* จากพยาธิชนิดอื่นที่ทำการศึกษามาก 5 ชนิดได้ โดย primer OPA-01 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมดที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ 22 แถบ primer OPA-02 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-03 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-04 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 31 แถบ primer OPA-07 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 24 แถบ primer OPA-09 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-10 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-13 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-15 พบแถบดีเอ็นเอ 5 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-16 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 21 แถบ primer OPA-17 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-18 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-19 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ

และ primer OPA-20 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ รวมทั้งหมด 40 แถบจากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ คิดเป็น 11.30% จากทั้งหมด

จาก arbitrary primer ทั้งหมด 20 primers พบ 17 primers ยกเว้น primer OPA-05, OPA-10 และ OPA-14 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่างของ *C. caninus* จากพยาธิชนิดอื่นที่ทำการศึกษามาก 5 ชนิดได้ โดย primer OPA-01 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมดที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ 22 แถบ primer OPA-02 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-03 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-04 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 31 แถบ primer OPA-06 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 1 แถบ primer OPA-07 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 24 แถบ primer OPA-08 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 14 แถบ primer OPA-09 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-11 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-12 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-13 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-15 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-16 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 21 แถบ primer OPA-17 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-18 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-19 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ และ primer OPA-20 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ รวมทั้งหมด 33 แถบจากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ คิดเป็น 9.32% จากทั้งหมด

primer OPA-01, OPA02, OPA-03, OPA-07, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-16, OPA-17 และ OPA-20 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่างของ *M. yokogawai* จากพยาธิชนิดอื่นที่ทำการศึกษามาก 5 ชนิดได้ โดย primer OPA-01 พบแถบดีเอ็นเอ เพียง 1 แถบจากทั้งหมดที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ 22 แถบ primer OPA-02 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-03 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-07 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 24 แถบ primer OPA-09 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-10 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-11 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-12 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-13 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-14 พบแถบดีเอ็นเอ 6 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-16 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 21 แถบ primer OPA-17 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ และ primer OPA-20 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ รวมทั้งหมด 28 แถบจากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ คิดเป็น 7.91% จากทั้งหมด

จาก arbitrary primer ทั้งหมด 20 primers พบ 16 primers ยกเว้น primer OPA-02, OPA-05, OPA-06 และ OPA-14 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่าง

ของ *Haplorchoides* sp. จากพยาธิชนิดอื่นที่ทำการศึกษามาก 5 ชนิดได้ โดย primer OPA-01 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมดที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ 22 แถบ primer OPA-02 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-03 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-04 พบแถบดีเอ็นเอ 7 แถบจากทั้งหมด 31 แถบ primer OPA-07 พบแถบดีเอ็นเอ 5 แถบจากทั้งหมด 24 แถบ primer OPA-08 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 14 แถบ primer OPA-09 พบแถบดีเอ็นเอ เพียง 1 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-10 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-11 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-12 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-13 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ OPA-15 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-16 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบจากทั้งหมด 21 แถบ primer OPA-17 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-18 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-19 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ และ primer OPA-20 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ รวมทั้งหมด 39 แถบจากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ คิดเป็น 11.02% จากทั้งหมด

จาก arbitrary primer ทั้งหมด 20 primers พบ 17 primers ยกเว้น primer OPA-02, OPA-05, OPA-06 และ OPA-16 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่างของ *O. viverrini* จากพยาธิชนิดอื่นที่ทำการศึกษามาก 5 ชนิดได้ โดย primer OPA-01 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมดที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ 22 แถบ primer OPA-02 พบแถบดีเอ็นเอ 5 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-04 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบจากทั้งหมด 31 แถบ primer OPA-07 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 24 แถบ primer OPA-08 พบแถบดีเอ็นเอ 7 แถบจากทั้งหมด 14 แถบ primer OPA-09 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-10 พบแถบดีเอ็นเอ เพียง 1 แถบจากทั้งหมด 23 แถบ primer OPA-11 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-12 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-13 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-14 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบจากทั้งหมด 8 แถบ primer OPA-15 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 16 แถบ primer OPA-17 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 19 แถบ primer OPA-18 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากทั้งหมด 25 แถบ primer OPA-19 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ และ primer OPA-20 พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 20 แถบ รวมทั้งหมด 42 แถบจากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 354 แถบ คิดเป็น 11.86% จากทั้งหมด

จากแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 19 primers เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดพยาธิโดยใช้โปรแกรม PAUP พบว่า *S. falcatus*, *H. taichui*, *C. caninus* และ *M. yokogawai* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วน *Haplorchoides* sp. อยู่ถัดออกมา และ *O. viverrini* ซึ่งเป็น outgroup อยู่นอกสุด พยาธิทั้ง 4 ชนิดที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจัดจำแนกอยู่ใน family เดียวกันคือ family Heterophyidae แต่ *S. falcatus*, *H. taichui* และ