



การตรวจสอบสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้วงศ์ Paramphistomidae ในแหล่งเพาะเลี้ยง
ปศุสัตว์โค-กระบือ ทางภาคกลางของประเทศไทย ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมและอณูชีววิทยา

THE EPIDEMIC SITUATION STUDY OF THE TREMATODE, PARAMPHISTOMIDAE IN
THE LIVESTOCK OF CENTRAL THAILAND
BY CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS

จันทร์จุฬา ภาวะเวช

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การตรวจสอบสถานการณัการระบาดของพยาธิใบไม้วงศ์ Paramphistomidae ในแหล่ง
เพาะเลี้ยงปลุ่สตัวโค-กระบือ ทางภาคกลางของประเทศไทย ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมและอณู
ชีววิทยา



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE EPIDEMIC SITUATION STUDY OF THE TREMATODE, PARAMPHISTOMIDAE IN
THE LIVESTOCK OF CENTRAL THAILAND
BY CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS



JANJURA PARAWAT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบสถานการณัการระบาดของพยาธิใบไม้วงศ์ Paramphistomidae ในแหล่งเพาะเลี้ยง
ปลุ่สุ่ตัวโค-กระบือ ทางภาคกลางของประเทศไทย ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมและอณูชีววิทยา

ของ

จันทร์จุฬา ภาระเวช

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุาปนา ชลธนานารถ)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธิชาติ)
..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนวรรณ เตชางกูร)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

ชื่อเรื่อง	การตรวจสอบสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้วงศ์ Paramphistomidae ในแหล่งเพาะเลี้ยงปลาศุสสัตว์โค-กระบือ ทางภาค กลางของประเทศไทย ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมและอณูชีววิทยา
ผู้วิจัย	จันทร์จุฬา ภาระเวช
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพนา ชลธนานารถ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนวรรณ เตชาวงูร

พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวูว (rumen fluke) พบการระบาดอย่างกว้างขวางทั้งในทวีปยุโรปและเอเชีย พยาธิกลุ่มนี้ก่อโรค Paramphistomosis ในปลาศุสสัตว์ โดยจะแสดงอาการท้องร่วง เบื่ออาหาร ชูบผอม และหากติดพยาธิเป็นจำนวนมากจะทำให้สัตว์ตายได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตในฟาร์มปลาศุสสัตว์ที่มีการติดเชื้อ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ตั้งเป้าหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจพยาธิกลุ่มดังกล่าว โดยทำการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์จากบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงโคและกระบือ 8 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย ตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี formalin-ether sedimentation พบค่าความชุกของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวูวสูงถึงร้อยละ 42.1 จากนั้นเก็บตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัยจากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Carmyerius spatiosus*, *Fischoederius elongatus*, *Orthocoelium dicranocoelium* และ *Paramphistomum epiclitum* ศึกษาเอ็นบีเอ็นไอโทคอนเดรียของพยาธิกลุ่มดังกล่าวเพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *Cytochrome B (CYTB)* มีความจำเพาะกับพยาธิแต่ละชนิด ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโฮสต์รวมถึงสิ่งมีชีวิตชนิดใกล้เคียง และมีขนาดผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน (389, 675, 545 และ 198 คู่เบส ตามลำดับ) ทำให้สามารถนำไปพัฒนาการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบการติดพยาธิในมูลสัตว์จำนวน 41 ตัวอย่าง พบผลบวกในมูลสัตว์จำนวน 4 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ได้กับสภาพแวดล้อมจริง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคและเฝ้าระวังการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวูวได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวูว, ความชุก, Cytochrome B, Multiplex PCR

Title THE EPIDEMIC SITUATION STUDY OF THE TREMATODE,
PARAMPHISTOMIDAE IN THE LIVESTOCK OF CENTRAL
THAILAND
BY CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS

Author JANJURA PARAWAT

Degree MASTER OF SCIENCE

Academic Year 2021

Thesis Advisor Assistant Professor Dr. Thapana Chontanarth

Co Advisor Assistant Professor Dr. Thanawan Tejangkura

Rumen flukes are causing paramphistomosis in livestock. This infection has had an impact on farms with infected livestock. Therefore, the aim of this study is to develop a new method for detecting rumen fluke in feces. The cattle feces were collected from eight provinces in the central region of Thailand. Then, the specimens were examined using the formalin-ether sedimentation technique, and the prevalence of rumen fluke was found to be 42.1%. Adult rumen flukes were collected from slaughterhouses and four rumen fluke species were identified: *Carmyerius spatiosus*, *Fischoederius elongatus*, *Orthocoelium dicranocoelium* and *Paramphistomum epiclitum*. The nucleotide sequences of mitochondrial genes were studied in these flukes. The species-specific primers for each species were designed and validated. The *Cytochrome B (CYTB)* gene primers were found to be the most effective. These primers are species-specific, with no cross-amplification to other flukes or hosts DNA. As a result, these primers can be used to develop multiplex PCR. In addition, this method was validated by the fecal samples in the Nakhon Nayok province. The results revealed that four out of 41 feces samples were positive. This result showed that the multiplex PCR reaction developed in this study could be used in field samples.

Keyword : Rumen fluke, Prevalence, Cytochrome B, Multiplex PCR

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์เรื่องการตรวจสอบสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้วงศ์ Paramphistomidae ในแหล่งเพาะเลี้ยงปลุ่สดวิโค-กระบือ ทางภาคกลางของประเทศไทย ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมและอณูชีววิทยาสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ผศ.ดร.ฐาปนา ชลธนานารถ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับปรสิตวิทยา การสอนทำปฏิบัติการ ให้คำแนะนำในการเขียนปริญญานิพนธ์ ไปจนถึงให้คำแนะนำในการใช้ชีวิต

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ผศ.ดร.ธนวรรณ เตชาขงูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับการศึกษาทางอณูชีววิทยา ให้คำแนะนำและตรวจทานการเขียนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ รวมไปถึงให้คำแนะนำที่ดีตลอดการเรียนการศึกษา ทำให้ผู้เขียนประสบความสำเร็จได้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. กิตติศักดิ์ พุทษชาติ ที่ให้เกียรติเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอบพระคุณ อาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่อบรมสั่งสอนเนื้อหาความรู้ในรายวิชาต่าง ๆ จนทำให้นิสิตมีความรู้ ความสามารถจนประสบความสำเร็จ

ขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจสำคัญให้สามารถก้าวผ่านช่วงเวลาที่ยากลำบากไปได้

ขอขอบคุณ นิสิตทุกคนในห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

จันทร์จุฬา ภาวะเวช

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย	4
สมมติฐานงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	6
2.1. ข้อมูลทั่วไปและการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้.....	6
2.1.1. ข้อมูลทั่วไป.....	6
2.1.2. วงชีวิต	6
2.1.3. การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้.....	8
2.2. การจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา	9
2.2.1. วงศ์ Gastrothylacidae	11
2.2.1.1. สกุล <i>Carmyerius</i> Stiles et Goldberger, 1910.....	11
2.2.1.2. สกุล <i>Fischoederius</i> Stiles & Goldberger, 1910.....	12
2.2.1.3. สกุล <i>Gastrothylax</i> Poirier, 1883	13

2.3.3. รายงานการตรวจสอบการติดพยาธิในมูลสัตว์ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม	30
2.4. วิธีการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา	32
2.5. Multiplex polymerase chain reaction	35
2.6. ยีนบนไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้	39
2.6.1. <i>Cytochrome C Oxidase subunit I (COX1)</i>	39
2.6.2. <i>Cytochrome B (CYTB)</i>	40
2.6.3. <i>NADH Dehydrogenase subunit 1 (ND1)</i>	41
2.6.4. <i>NADH Dehydrogenase subunit 4 (ND4)</i>	42
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	46
อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา.....	46
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	47
3.1. สัตว์ทดลองและพื้นที่ศึกษา	48
3.1.1. การเก็บตัวอย่างมูลโคและกระบือ	48
3.1.2. การเก็บตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัย	49
3.2. การตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้ในมูลโคและกระบือด้วยวิธี formalin-ether sedimentation	49
3.3. ความชุกและการสร้างแผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้	51
3.4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิระยะตัวเต็มวัย	51
3.4.1. วิธีการทำสไลด์ถาวร.....	51
3.4.2. การตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง rotary microtome	52
3.5. การสกัดดีเอ็นเอ.....	52
3.5.1. การสกัดดีเอ็นเอพยาธิระยะตัวเต็มวัย	52
3.5.2. การสกัดดีเอ็นเอไขพยาธิจากมูลสัตว์	53

3.6. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน และการทดสอบด้วยเทคนิค PCR	54
3.7. การยืนยันชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีด้วยยีนบนไมโทคอนเดรีย	61
3.8. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิและการทดสอบด้วยเทคนิค PCR	61
3.8.1. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ	61
3.8.2. การทดสอบความจำเพาะและการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ในเทคนิค multiplex PCR	63
3.8.3. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน <i>CYTB</i>	64
3.9. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR	66
3.9.1. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR	66
3.9.2. การทดสอบการติดเชื่อมร่วมของพยาธิในปฏิกิริยา multiplex PCR	68
3.9.3. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR.....	69
3.10. การประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อวินิจฉัยการติดพยาธิในมูลสัตว์.....	69
บทที่ 4 ผลการศึกษา	70
4.1. ผลการเก็บตัวอย่างมูลโคและกระบือ	70
4.1.1. พื้นที่เก็บตัวอย่าง	70
4.1.2. จำนวนตัวอย่างมูลโคและกระบือ.....	70
4.2. ผลการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลโคและกระบือด้วยวิธี formalin-ether sedimentation.....	71
4.2.1. ลักษณะของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี	71
4.2.2. ปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัม	72
4.3. ความชุกและการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี	74
4.3.1. ความชุกของการปนเปื้อนพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี	74
4.3.2. การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในแหล่งเพาะเลี้ยงปลุสัตว์โคและกระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย	75

4.4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิระยะตัวเต็มวัย.....	81
4.4.1. <i>Carmyerius spatiosus</i> (n = 10)	81
4.4.2. <i>Fischoederius elongatus</i> (n = 12).....	84
4.4.3. <i>Orthocoelium dicranocoelium</i> (n = 10).....	87
4.4.4. <i>Paramphistomum epiclitum</i> (n = 14).....	90
4.5. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิไปไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วด้วยยีนบนไมโทคอนเดรีย.....	93
4.5.1. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ <i>C. spatiosus</i>	93
4.5.2. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ <i>F. elongatus</i>	99
4.5.3. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ <i>O. dicranocoelium</i>	104
4.5.4. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ <i>P. epiclitum</i>	110
4.6. ผลการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน และการทดสอบด้วยเทคนิค PCR	116
4.7. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนต่าง ๆ	117
4.7.1. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน COX1	117
4.7.2. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน CYTB	121
4.7.3. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน ND1	124
4.7.4. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน ND4	127
4.8. ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน CYTB	130
4.9. ผลการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR.....	133
4.9.1. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR.....	133
4.9.2. ผลการทดสอบการติดเชื่อมร่วมของพยาธิในปฏิกิริยา multiplex PCR.....	134
4.9.3. ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR	136
4.10. ผลการประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อวินิจฉัยการติดพยาธิในมูลสัตว์	138

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล.....	141
สรุปผลการวิจัย.....	141
อภิปรายผล	142
บรรณานุกรม	148
ประวัติผู้เขียน.....	159



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ลักษณะของมูลสัตว์และปรสิตที่คาดว่าจะพบด้วยการตรวจด้วยตาเปล่า	29
ตาราง 2 ไมโทคอนเดรียยีนของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว	43
ตาราง 3 ร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกัน	45
ตาราง 4 ข้อมูลพยาธิที่ได้จากการสืบค้นฐานข้อมูล GenBank	55
ตาราง 5 คุณสมบัติของไพรเมอร์สำหรับใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใบไม้ในกระเพาะ ผ้าขี้ริ้ว	55
ตาราง 6 สารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	56
ตาราง 7 การตั้งค่าปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermal cycle	56
ตาราง 8 คุณสมบัติของไพรเมอร์จำเพาะ	62
ตาราง 9 สารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับทดสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์	64
ตาราง 10 การตั้งค่าปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermal cycle สำหรับทดสอบความจำเพาะและ ความไวของไพรเมอร์	65
ตาราง 11 สารที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR	66
ตาราง 12 การตั้งค่าปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermal cycle	67
ตาราง 13 จำนวนตัวอย่างมูลโคและกระบือที่ใช้ในการศึกษาจากแต่ละจังหวัดภาคกลางของ ประเทศไทย	71
ตาราง 14 ปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมที่ตรวจพบในมูลสัตว์ด้วยวิธี formalin-ether sedimentation ..	73
ตาราง 15 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i>	82
ตาราง 16 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด <i>F. elongatus</i>	85
ตาราง 17 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด <i>O. dicranocoelium</i>	88
ตาราง 18 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด <i>P. epiclitum</i>	91

ตาราง 19 ผลความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน	116
ตาราง 20 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน COX1.....	118
ตาราง 21 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน CYTB.....	121
ตาราง 22 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน ND1	124
ตาราง 23 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน ND4	127
ตาราง 24 ผลิตภัณฑ์ multiplex PCR ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบการติดเชื้อร่วมของพยาธิ	134



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี่ของโคในวงกลมสีแดง.....	7
ภาพประกอบ 2 วงชีวิตทั่วไปของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี่.....	7
ภาพประกอบ 3 <i>Carmyerius bulbosus</i>	11
ภาพประกอบ 4 <i>Fischoederius elongatus</i>	12
ภาพประกอบ 5 <i>Gastrothylax crumenifer</i>	13
ภาพประกอบ 6 <i>Calicophoron calicophorum</i>	14
ภาพประกอบ 7 <i>Explanatum explanatum</i>	15
ภาพประกอบ 8 <i>Paramphistomum epiclitum</i>	16
ภาพประกอบ 9 <i>Orthocoelium dicranocoelium</i>	17
ภาพประกอบ 10 type of pharynx.....	19
ภาพประกอบ 11 calicophoron type.....	20
ภาพประกอบ 12 dicranocoelium type.....	21
ภาพประกอบ 13 paramphistomum type.....	22
ภาพประกอบ 14 type of acetabulum.....	24
ภาพประกอบ 15 fischoederius type.....	25
ภาพประกอบ 16 gastrothylax type.....	26
ภาพประกอบ 17 paramphistomum type.....	27
ภาพประกอบ 18 streptocoelium type.....	28
ภาพประกอบ 19 แผนภาพขั้นตอนเทคนิค multiplex PCR.....	38
ภาพประกอบ 20 ตำแหน่งการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ.....	38
ภาพประกอบ 21 ไมโทคอนเดรียจีโนมของ <i>Fischoederius elongatus</i> (KM397348.1).....	42

ภาพประกอบ 22 แผนที่จุดเก็บตัวอย่างมุลส์ตรีจากแหล่งเพาะเลี้ยงโคและกระบือ 8 จังหวัดภาคกลางในประเทศไทย.....	48
ภาพประกอบ 23 การเก็บตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัย	49
ภาพประกอบ 24 การตกตะกอนตัวอย่างมุลส์ตรีด้วยวิธี formalin-ether sedimentation technique.....	50
ภาพประกอบ 25 ข้อมูลจาก alignment ของยีน COX1	57
ภาพประกอบ 26 ข้อมูลจาก alignment ของยีน CYTB.....	58
ภาพประกอบ 27 ข้อมูลจาก alignment ของยีน ND1.....	59
ภาพประกอบ 28 ข้อมูลจาก alignment ของยีน ND4.....	60
ภาพประกอบ 29 พื้นที่เก็บตัวอย่างมุลส์ตรี	70
ภาพประกอบ 30 ไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี.....	71
ภาพประกอบ 31 ร้อยละความชุกของการปนเปื้อนพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลุสัตรีโคและกระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย	74
ภาพประกอบ 32 แผนที่จังหวัดในภาคกลางที่พบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี	76
ภาพประกอบ 33 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดชัยนาท.....	77
ภาพประกอบ 34 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดนครนายก.....	77
ภาพประกอบ 35 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา.....	78
ภาพประกอบ 36 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดลพบุรี.....	78
ภาพประกอบ 37 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดสระบุรี.....	79
ภาพประกอบ 38 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดสิงห์บุรี	79
ภาพประกอบ 39 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดสุพรรณบุรี	80
ภาพประกอบ 40 แผนที่การระบาดของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดอ่างทอง.....	80
ภาพประกอบ 41 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด <i>C. spatiosus</i>	83

ภาพประกอบ 42	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด <i>F. elongatus</i>	86
ภาพประกอบ 43	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด <i>O. dicranocoelium</i>	89
ภาพประกอบ 44	สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด <i>P. epiclitum</i>	92
ภาพประกอบ 45	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1	95
ภาพประกอบ 46	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1	95
ภาพประกอบ 47	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CYTB</i>	96
ภาพประกอบ 48	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน <i>CYTB</i>	96
ภาพประกอบ 49	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>ND1</i>	97
ภาพประกอบ 50	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน <i>ND1</i>	97
ภาพประกอบ 51	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>ND4</i>	98
ภาพประกอบ 52	แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i> กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน <i>ND4</i>	98

ภาพประกอบ 53 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 100

ภาพประกอบ 54 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1 100

ภาพประกอบ 55 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CYTB 101

ภาพประกอบ 56 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน CYTB..... 101

ภาพประกอบ 57 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND1 102

ภาพประกอบ 58 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND1..... 102

ภาพประกอบ 59 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND4 103

ภาพประกอบ 60 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND4..... 103

ภาพประกอบ 61 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 106

ภาพประกอบ 62 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1 106

ภาพประกอบ 63 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTb*..... 107

ภาพประกอบ 64 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *CYTb*..... 107

ภาพประกอบ 65 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ND1* 108

ภาพประกอบ 66 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ND1* 108

ภาพประกอบ 67 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ND4* 109

ภาพประกอบ 68 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ND4*..... 109

ภาพประกอบ 69 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* 112

ภาพประกอบ 70 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *COX1* 112

ภาพประกอบ 71 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTb* 113

ภาพประกอบ 72 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *CYTb*..... 113

ภาพประกอบ 73 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ND1* 114

ภาพประกอบ 74 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ND1*..... 114

ภาพประกอบ 75 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ND4* 115

ภาพประกอบ 76 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ND4*..... 115

ภาพประกอบ 77 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COX1* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ 119

ภาพประกอบ 78 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ที่ออกแบบจากยีน *COX1* 120

ภาพประกอบ 79 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTb* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ 122

ภาพประกอบ 80 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ที่ออกแบบจากยีน *CYTb* 123

ภาพประกอบ 81 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ND1* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ 125

ภาพประกอบ 82 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ที่ออกแบบจาก ยีน ND1	126
ภาพประกอบ 83 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND4 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ	128
ภาพประกอบ 84 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ที่ออกแบบจาก ยีน ND4	129
ภาพประกอบ 85 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ <i>C. spatiosus</i>	130
ภาพประกอบ 86 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ <i>F. elongatus</i>	131
ภาพประกอบ 87 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ <i>O. dicranocoelium</i>	131
ภาพประกอบ 88 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ <i>P. epiclitum</i>	132
ภาพประกอบ 89 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของ multiplex PCR.....	133
ภาพประกอบ 90 ผล gel electrophoresis การทดสอบการติดเชื้อมาร่วมกันของพยาธิ 2 ชนิด ใน ปฏิกริยา multiplex PCR	135
ภาพประกอบ 91 ผล gel electrophoresis การทดสอบการติดเชื้อมาร่วมกันของพยาธิ 3 และ 4 ชนิด ในปฏิกริยา multiplex PCR	135
ภาพประกอบ 92 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด <i>C. spatiosus</i>	136
ภาพประกอบ 93 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด <i>F. elongatus</i>	137
ภาพประกอบ 94 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด <i>O. dicranocoelium</i>	137
ภาพประกอบ 95 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด <i>P. epiclitum</i>	138
ภาพประกอบ 96 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR ทดสอบมูลสัตว์ ตัวอย่างที่ 1-11	139

ภาพประกอบ 97 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR ทดสอบมูลสัตว์
ตัวอย่างที่ 12-22 139

ภาพประกอบ 98 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR ทดสอบมูลสัตว์
ตัวอย่างที่ 23-33 140

ภาพประกอบ 99 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR ทดสอบมูลสัตว์
ตัวอย่างที่ 34-41 140



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว (rumen fluke) มีวงชีวิตซับซ้อนคล้ายพยาธิใบไม้ตับสกุล *Fasciola* (Cauquil et al., 2016) โดยระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้วมีรูปร่างคล้าย เม็ดทับทิมสีชมพู พบในกระเพาะผ้าขี้ริ้วของโฮสต์เฉพาะ (definitive host) เช่น โค (*Bos primigenius*), กระบือ (*Bubalus bubalis*) (Sey, 1985), แพะ (*Capra indica*) และแกะ (*Ovis aries*) (Tandon, 1961) ไข่มีรูปร่างกลมรี มีฝาปิด (operculum) พบในมูลของสัตว์ที่เป็นโฮสต์เฉพาะ ระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) พบในโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง (first intermediate host) ใน หอยน้ำจืดหลายชนิด เช่น ชนิด *Gyraulus scottianus*, *Helicorbis australiensis* (Rolfe, Boray, Nichols, & Collins, 1991) และหอยในวงศ์ Lymnaeidae ชนิด *Galba truncatula* (Jones, Williams, Dalesman, & Brophy, 2015) เป็นต้น ระยะเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) เป็นระยะติดต่อพบในพืชน้ำ (Arfaa, 1962) ก่อให้เกิดโรค paramphistomosis ส่งผลให้สัตว์เกิดอาการ ท้องร่วง มวลมีฟองสีเขียว กลืนเหม็นรุนแรง เกิดอาการเบื่ออาหารและทำให้ร่างกายสัตว์ซูบผอม (Boray, 1969) นอกจากนี้ยังพบว่าหากสัตว์เกิดการติดพยาธิกลุ่มนี้จำนวนมากอาจทำให้ตายได้ ภายในเวลา 22-36 วัน (Horak, 1971)

พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วพบการระบาดในหลายประเทศ เช่น ไทย (Sey & Prasitirat, 1994), ลาว (Sanguankiat et al., 2016), เวียดนาม (Ottó, 1985), อินเดีย (Bhalerao, 1935), อินโดนีเซีย (Eduardo, 1980), ญี่ปุ่น (Fukui, 1929), ไอร์แลนด์ (Zintl et al., 2014), เนเธอร์แลนด์ (Ploeger et al., 2017), ปากีสถาน (Chaudhry et al., 2017), ฝรั่งเศส (Szmidt-Adjidé et al., 2000) เป็นต้น โดยในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วเพียง 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Gastrothylacidae และ Paramphistomidae โดยใช้ลักษณะ ventral pouch ในการจำแนกวงศ์ของพยาธิ ซึ่งพยาธิในวงศ์ Paramphistomidae ไม่มีลักษณะพิเศษนี้ พบเฉพาะพยาธิในวงศ์ Gastrothylacidae เท่านั้น (Sey & Prasitirat, 1994)

การตรวจสอบการติดพยาธิในสัตว์เคี้ยวเอื้องเพื่อวินิจฉัยการเกิดโรคทำได้โดยการ ตรวจหาไข่พยาธิในมูลสัตว์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการที่หลากหลาย เช่น การตรวจมูลสัตว์ บนแผ่นกระจกสไลด์โดยตรง (direct wet smear) และการตรวจด้วยวิธีเข้มข้น (concentration technique) โดยแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ วิธีการตกตะกอนไข่พยาธิ (sediment technique) ด้วย

วิธี formalin-ether technique (Anuar et al., 2013) และวิธีการทำให้ไข่พยาธิลอย (floatation technique) ด้วยน้ำเกลืออิ่มตัวหรือการใช้สารละลาย zinc sulfate ซึ่งในกระบวนการตกตะกอนหรือการลอยของไข่พยาธิขึ้นอยู่กับความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ของชนิดพยาธิและความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ โดยไข่พยาธิใบไม้ที่มีฝาปิด (operculated eggs) มีความถ่วงจำเพาะอยู่ที่ประมาณ 1.35 น้ำเกลืออิ่มตัวมีค่าเท่ากับ 1.20 (Thienpont, Rochette, & Vanparijs, 1986) zinc sulfate มีค่าเท่ากับ 1.19 (Truant, Elliott, Kelly, & Smith, 1981) ซึ่งวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบการติดไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วในมูลสัตว์ คือ วิธีการตกตะกอนไข่พยาธิด้วยวิธี formalin-ether sedimentation เนื่องจากไข่พยาธิในกลุ่มดังกล่าวมีฝาปิดทำให้ความถ่วงจำเพาะสูงกว่าสารที่ใช้ การทำให้มูลสัตว์เข้มข้นจึงทำให้ไข่พยาธิดังกล่าวจมลงสู่ก้นหลอดทดลอง แต่หากใช้วิธีการลอยตัวในการตรวจสอบอาจไม่สามารถพบไข่พยาธิใบไม้ได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบการติดพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์มีข้อจำกัด คือ ใช้เวลานานในการดำเนินการและต้องอาศัยประสบการณ์ความชำนาญของผู้ตรวจเป็นอย่างมากในการจำแนกชนิดไข่พยาธิที่พบ ซึ่งพบว่าไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วมีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับไข่พยาธิใบไม้ตับสกุล *Fasciola* (Chryssafidis, Fu, De Waal, & Mulcahy, 2015) ดังนั้นหากการวินิจฉัยผิดพลาดจะส่งผลกระทบต่อกรกำจัดพยาธิ เช่น การให้ยา albendazole ซึ่งส่งผลกระทบต่อกำจัดพยาธิใบไม้ตับได้ดีกว่าพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว ภายหลังการได้รับการรักษาจึงไม่ประสบผลสำเร็จ (Arias et al., 2013)

การจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วเพื่อระบุชนิดของพยาธิทำได้โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพยาธิในระยะตัวเต็มวัยด้วยวิธีการต่าง ๆ ประกอบกัน เช่น การทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษารูปร่าง ขนาดและตำแหน่งของอวัยวะภายใน หรือการตัดชิ้นเนื้อของตัวอย่างพยาธิด้วยเครื่อง rotary microtome เพื่อศึกษาการจัดเรียงของอวัยวะภายในของพยาธิ เช่น การตัดแบบ sagittal เพื่อศึกษารูปร่างและขนาดของ acetabulum และคอหอย (pharynx) จากนั้นทำการจำแนกและระบุชนิดของพยาธิระยะตัวเต็มวัยด้วยอนุกรมวิธาน (taxonomic key) ตามหลักเกณฑ์ของ Yamaguti, Eduardo และ Otto Sey (Eduardo, 1982a, 1982b, 1983, 1984, 1985; Sey, 2019; Yamaguti, 1958) อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพยาธิเพียงด้านเดียวอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากพยาธิในกลุ่มนี้มีขนาดและรูปร่างทั้งภายนอกและภายในที่คล้ายคลึงกัน จึงต้องอาศัยวิธีการทางอณูชีววิทยาในการยืนยันชนิดของพยาธิร่วม

การศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วเพื่อระบุชนิดและแก้ไขปัญหาการวินิจฉัยที่ผิดพลาดจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ นิยมตรวจสอบด้วยเทคนิค

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction หรือ PCR) โดยมีการใช้ยีน (gene) หรือบริเวณเป้าหมายที่หลากหลายในการระบุชนิดของพยาธิ เช่น การใช้ยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA) ในการระบุพยาธิชนิด *Paramphistomum cervi* และ *Carmyerius gregarious* (El-Bahy, Bazh, & Elkhtam, 2017), การใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COX1) ในการระบุพยาธิชนิด *Fischoederius cobboldi* และ *Paramphistomum epiclitum* (Sanguankiat et al., 2016), การใช้บริเวณ internal transcribed spacer second (ITS2) ในการระบุพยาธิชนิด *Fischoederius cobboldi*, *Fischoederius elongatus*, *Gastrothylax crumenifer* และ *Carmyerius spatiosus* (Ghatani, Shylla, Tandon, Chatterjee, & Roy, 2012) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ไม่ว่าจะมีการใช้ยีนหรือบริเวณเป้าหมายที่หลากหลายในเทคนิค PCR เพื่อระบุชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้เล็ก แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์การใช้ยีนเหล่านี้ในเทคนิค multiplex PCR

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้เล็กในมูลโคและกระบือ โดยเก็บตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัยจากโรงฆ่าสัตว์และเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ในพื้นที่เพาะเลี้ยงปศุสัตว์ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของไข่พยาธิในมูลสัตว์ด้วยวิธีการตกตะกอนไข่พยาธิด้วยเทคนิค formalin-ether sedimentation เพื่อศึกษาการระบาดของพยาธิในกลุ่มดังกล่าว และใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการระบุชนิดของไข่พยาธิ โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนบนจีโนมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial gene) เนื่องจากดีเอ็นเอ (DNA) ของไมโทคอนเดรียมีความคงทนสูงและถูกทำลายโดยสภาพแวดล้อมได้ยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในนิวเคลียส (nuclear gene) และพบว่ายีนบนไมโทคอนเดรียถูกนำมาใช้ในตรวจสอบและระบุชนิดของพยาธิจากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนและมีการเสียดสภาพสูงอย่างในมูลสัตว์ (Rongchang, Brice, & Ryan, 2015) และอูจจาระของมนุษย์ (Buathong et al., 2015) นอกจากนี้ยังเป็นที่ยอมรับให้ใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Zarowiecki, Huyse, & Littlewood, 2007)

ด้วยเหตุข้างต้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนไมโทคอนเดรียจำนวน 4 ยีน ที่มีความอนุรักษ์ของลำดับอะมิโนสูง (Simon et al., 1994) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวเพียงพอสำหรับการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (species-specific primer) เพื่อนำไปพัฒนาการตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR ได้แก่ COX1, CYTB, nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 4 (ND1) และ nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 4 (ND4) โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากทั้ง 4 ยีน เพื่อนำมาใช้ในการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้เล็กแต่ละชนิดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่

Carmyerius spatiosus, *Fischoederius elongatus*, *Orthocoelium dicranocoelium* และ *Paramphistomum epiclitum* จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specificity) กับพยาธิเป้าหมายมาทดสอบความไว (sensitivity) และนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อร่วม (co-infection) ของพยาธิในคราวเดียวกันในมูลสัตว์ โดยผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในสัตว์เคี้ยวเอื้องได้อย่างแม่นยำ และทราบสถานการณ์การระบาดของพยาธิเพื่อนำไปสู่การวางแผนเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคได้ในอนาคต

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักดังนี้

1. ศึกษาสถานการณ์การระบาดของของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในโคและกระบือจากพื้นที่เพาะเลี้ยงปศุสัตว์ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมร่วมกับวิธีทางอณูชีววิทยา
2. พัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีจำนวน 4 ชนิด ได้ในเวลาเดียวกัน ได้แก่ *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum*

ขอบเขตการวิจัย

ในการวิจัยนี้มีขอบเขตการวิจัยดังนี้

1. ตรวจสอบสถานการณ์การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในโคและกระบือจากพื้นที่แหล่งเพาะเลี้ยงปศุสัตว์โค-กระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ชัยนาท อ่างทอง สุพรรณบุรี สระบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี และนครนายก
2. ตรวจสอบปนเปื้อนไข่พยาธิในมูลโคและกระบือด้วยวิธีการตกตะกอนมูลสัตว์ด้วย formalin-ether sedimentation technique
3. ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีด้วยวิธีการทำสไลด์ถาวรร่วมการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง rotary microtome
4. ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนบนไมโทคอนเดรียจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *COX1*, *CYTB*, *ND1* และ *ND4* ของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี
5. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีชนิด *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* จากยีนบนไมโทคอนเดรีย

6. ตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะน้ำข้าวชนิด *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในตัวอย่างมูลโคและกระบือ

สมมติฐานงานวิจัย

เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* ในมูลสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่ใกล้เคียง



บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1. ข้อมูลทั่วไปและการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี

2.1.1. ข้อมูลทั่วไป

พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีมีลำตัวหนา รูปร่างคล้ายเม็ดทับทิมสีชมพู ชั้นผิวหนังเรียบ ไม่มีหนาม มีอวัยวะยึดเกาะ (sucker) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ 1) oral sucker อยู่ตำแหน่งปลายหรือเกือบปลายสุดของลำตัวทางด้านหน้า (anterior) และ 2) ventral sucker หรือ acetabulum อยู่ตำแหน่งปลายหรือเกือบปลายสุดของลำตัวทางด้านท้าย (posterior) ในบางชนิดหลอดอาหาร (esophagus) เป็นกระเปาะ (bulb) ทางเดินอาหารยาวไปจนเกือบสุดลำตัว ลักษณะทางเดินอาหารมีทั้งแบบเป็นระเบียบ (simple) และแบบคดเคี้ยว (sinuous) ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ประกอบด้วย อัณฑะ (testis) จำนวน 1-2 ก้อน seminal vesicle, cirrus pouch ปรากฏเด่นชัดในบางชนิด genital pore พบได้ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 1) ด้านหน้า 2) กึ่งกลางด้านท้อง (midventral) และ 3) กึ่งกลางด้านหลัง (middorsal) ในบางชนิดพบว่า genital pore เจริญเป็นอวัยวะยึดเกาะ ระบบสืบพันธุ์เพศเมียประกอบด้วย รังไข่ (ovary) บางชนิดพบ laurer's canal ปรากฏอยู่ vittellaria อยู่ด้านข้างของลำตัว ท่อนำไข่ขดพันกันอยู่ระหว่างทางเดินอาหาร (intercecal) ระบบขับถ่ายพบ excretory vesicle อยู่ตำแหน่งด้านท้ายของลำตัว เมื่อจำแนกชนิดตามอวัยวะยึดเกาะ มักถูกจัดอยู่ในกลุ่ม amphistomes เนื่องจาก acetabulum มีขนาดใหญ่กว่า oral sucker

2.1.2. วงชีวิต

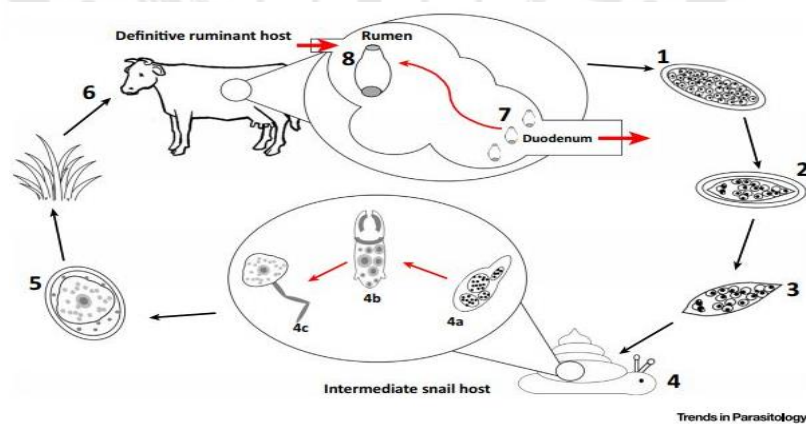
วงชีวิตของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีมีความคล้ายคลึงกับพยาธิใบไม้ตับสกุล *Fasciola* (Cauquil et al., 2016) ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วจะปนออกมากับมูลสัตว์และปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมไข่จะฟักเป็นระยะไมราซิเดียม (miracidium) และไข่เข้าสู่หอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่ง (first intermediated host) เช่น หอยในวงศ์ Lymnaeidae ชนิด *Galba truncatula* (Jones et al., 2015) หอยชนิด *Gyraulus scottianus*, *Helicorbis australiensis* (Rolfe et al., 1991) จากนั้นพัฒนาเป็นระยะสปอร์โรซิส (sporocysts) เรเดีย (redia) และเซอร์คาเรีย ตามลำดับ โดยระยะเซอร์คาเรียที่พัฒนาเต็มที่ จะว่ายออกจากหอยเข้าสู่พืชน้ำซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง (second intermediated host) เพื่อพัฒนาเป็นระยะเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อเข้าสู่โฮสต์เฉพาะ (definitive host) ในกลุ่มสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค กระบือ แพะ และแกะ เป็นต้น ดังภาพประกอบ 1 เมื่อเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์เฉพาะระยะเมตาเซอร์คาเรียจะเกิดการ excyst ภายในลำไส้ส่วน duodenum เป็นระยะที่ยังไม่โตเต็มที่ (immature) จาก

จะนั้นเคลื่อนที่เข้าสู่กระเพาะผ้าขี้ริ้วและพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัย (adult) ดังภาพประกอบ 2 ซึ่งพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วก่อให้เกิดโรค paramphistomosis ส่งผลให้สัตว์ที่ติดพยาธิเกิดอาการลำไส้อักเสบ ท้องเสีย มูลมีกลิ่นเหม็นรุนแรง เบื่ออาหารและสูบผอม (Boray, 1969) ซึ่งอาการของโรคจะแสดงเมื่อเกิดการติดเชื้อมากกว่า 2,700 ตัว และทำให้สัตว์ตายได้ภายในเวลา 22-36 วัน (Horak, 1971)



ภาพประกอบ 1 พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วของโคในวงกลมสีแดง

ที่มา: (Ali et al., 2018)



ภาพประกอบ 2 วงชีวิตทั่วไปของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว

- 1 = unembryonated egg 2 = embryonated egg 3 = ไมราชีเดียม 4 = หอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง
 4a = สปอร์โรซิส 4b = เรเดีย 4c = เซอร์คาเรีย 5 = เมตาเซอร์คาเรีย 6 = โคที่เป็นโฮสต์เฉพาะ
 7 = ตัวอ่อนของพยาธิที่ลำไส้เล็กส่วนต้น 8 = พยาธิระยะตัวเต็มวัยในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Huson, Oliver, & Robinson, 2017)

2.1.3. การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว

การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วมีรายงานในหลายประเทศ เช่น ไทย (Sey & Prasitirat, 1994), ลาว (Sanguankiat et al., 2016), เวียดนาม (Sey, 1985), อินเดีย (Bhalerao, 1935), อินโดนีเซีย (Eduardo, 1980), ญี่ปุ่น (Fukui, 1929), ไอร์แลนด์ (Zintl et al., 2014), เนเธอร์แลนด์ (Ploeger et al., 2017), ปากีสถาน (Chaudhry et al., 2017), ฝรั่งเศส (Szmidi-Adjidé et al., 2000), เอธิโอเปีย (Getahun, Siyoum, Yohannes, & Eshete, 2017), โดยพบว่าในทวีปยุโรปส่วนใหญ่พบการระบาดของ *Calicophoron daubneyi* (Arias et al., 2013; Jones et al., 2017; Malrait et al., 2015) ในขณะที่ทวีปเอเชียส่วนใหญ่พบการระบาดของ *Paramphistomum cervi* (Anuracpreeda, Wanichanon, & Sobhon, 2008; Panyarachun et al., 2010; Swarnakar, Kumawat, Sanger, Roat, & Goswami, 2014) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของพยาธิชนิด *Carmyerius spatiosus*, *Fischoederius elongatus*, *Fischoederius cobboldi* และ *Gastrothylax crumenifer* ในปศุสัตว์บริเวณทวีปเอเชีย (Ali et al., 2018)

ในปี ค.ศ. 1994 Sey และ Prasitirat ได้ทำการศึกษาพยาธิในกลุ่ม amphistomes จากกระเพาะผ้าขี้ริ้วและท่อน้ำดีของโคและกระบือจากจังหวัดสิงห์บุรีและกรุงเทพมหานคร และระบุชนิดของพยาธิด้วยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการศึกษาสามารถแบ่งพยาธิออกได้ 2 วงศ์ ได้แก่ 1) วงศ์ Gastrothylacidae ประกอบด้วย *Gastrothylax crumenifer*, *Carmyerius spatiosus* และ *Fischoederius elongatus* 2) วงศ์ Paramphistomidae ประกอบด้วย *Explanatum explanatum*, *Calicophoron calicophorum*, *Paramphistomum ichikawai*, *P. Epiclitum*, *Orthocoelium parvipapillatum*, *O. streptocoelium* และ *O. dicranocoelium* (Sey & Prasitirat, 1994) ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 Sripalwit และคณะ ได้ศึกษาพยาธิในกลุ่มกระเพาะผ้าขี้ริ้วในโคจำนวน 37 ตัว จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ผลการศึกษาพบว่าโคมีการติดพยาธิด้วยค่าความชุกกรวมร้อยละ 78.38 (29/37) พบพยาธิ 3 ชนิด ได้แก่ *Paramphistomum epiclitum*, *Orthocoelium streptocoelium*, และ *Fischoederius elongatus* โดยมีค่าความชุกร้อยละ 75.68, 48.65 และ 40.54 ตามลำดับ (Sripalwit, Wongsawad, Wongsawad, & Anuntalabhochai, 2007) ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 Roy และ Tandon ได้ทำการศึกษาพยาธิใบไม้ในกระเพาะปศุสัตว์จำนวน 249 ตัว ในทางตอนเหนือและตะวันออกของประเทศอินเดีย ผลการศึกษาพบพยาธิใบไม้ในวงศ์ Paramphistomidae ทั้งหมด 15 ชนิด โดยมีค่าความชุกดังนี้ *Calicophoron calicophorum* ร้อยละ 20.33, *Cotylophoron cotylophorum* ร้อยละ 21.18, *Paramphistomum epiclitum* ร้อยละ 28.81, *P. ichikawai* ร้อยละ 7.62, *Explanatum*

explanatum ร้อยละ 26.27, *Gastrothylax crumenifer* ร้อยละ 32.20, *Fischoederius elongatus* ร้อยละ 26.27, *F. cobboldi* ร้อยละ 12.71, *Orthocoelium dicranocoelium* ร้อยละ 18.64, *O. streptocoelium* ร้อยละ 5.08, *O. scolicoelium* ร้อยละ 1.69, *O. parvipapillatum* ร้อยละ 4.23, *O. dinniki* ร้อยละ 10.16, *O. dawesi* ร้อยละ 19.49 และ *O. Orthocoelium* ร้อยละ 12.71 (Roy & Tandon, 1992)

2.2. การจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วด้วยวิธีทางสัตววิทยา

พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วตามการจำแนกของ Yamaguti ในปี ค.ศ.1985 ประกอบด้วย 11 วงศ์ย่อย ได้แก่ 1) Balanorchiinae 2) Brumptiinae 3) Cladorchiinae 4) Gastrodiscinae 5) Gastrothylacinae 6) Johnsonitrematinae 7) Paramphistominae 8) Pseudodiscinae 9) Solenorchiinae 10) Strephanopharynginae และ 11) Zygoctylinae (Yamaguti, 1958) ต่อมาในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วด้วยวิธีทางสัตววิทยาแบบใหม่ โดยใช้เกณฑ์การปรากฏของ ventral pouch เพื่อจำแนกพยาธิในกลุ่มดังกล่าว ทำให้พยาธิกลุ่มนี้ที่พบในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Gastrothylacidae และวงศ์ Paramphistomidae (Sey & Prasitirat, 1994) นอกจากนี้ยังมีการศึกษารูปแบบของคอหอย (type of pharynx) และรูปแบบของ acetabulum (type of acetabulum) เพื่อใช้ในการจำแนกสกุลของพยาธิในกลุ่มดังกล่าวอีกด้วย โดยมีรายละเอียดดังนี้

Key to families

1. ก. ventral pouch ปรากฏ..... Gastrothylacinae
- ข. ventral pouch ไม่ปรากฏ..... Paramphistominae

Key to genera of Gastrothylacidae

1. ก. ท่อนำไข่ และ vas deferens ทอดยาวขนานไปตามลำตัว.....2
- ข. ท่อนำไข่ และ vas deferens ไขว้กันอยู่ตำแหน่งกึ่งกลางตัว...*Gastrothylax*
2. ก. อัณฑะเรียงตัวตามแนวนอน (horizontal).....*Carmyerius*
- ข. อัณฑะเรียงตัวตามแนวตั้ง (tandem).....*Fischoederius*

Key to genera of Paramphistomidae

1. ก. laurer's canal ไขว้เชื่อมกับ excretory vesicle.....2
 ข. laurer's canal ไม่ได้ไขว้เชื่อมกับ excretory vesicle..... *Orthocoelium*
2. ก. pars muscosa ยังพัฒนาไม่เต็มที่.....3
 ข. pars muscosa พัฒนาเต็มที่..... *Calicophoron*
3. ก. acetabulum มีขนาดใหญ่.....*Explanatum*
 ข. acetabulum ไม่ได้มีขนาดใหญ่.....*Paramphistomum*

Key to type of pharynx

1. ก. คอหอยไม่มี lip sphincters.....2
 ข. คอหอยมี lip sphincters ปกติ..... dicranocoelium
2. ก. ไม่มี middle circular units..... paramphistomum
 ข. มีการปรากฏของ middle circular unit ที่พัฒนาไม่เต็มที่....calicophoron

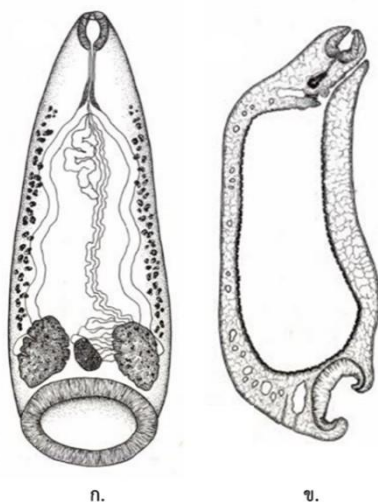
Key to type of acetabulum

1. ก. acetabulum มีขนาดเล็ก.....2
 ข. acetabulum มีขนาดใหญ่.....gastrothylax
2. ก. dorsal exterior circular (dec) มี 1 ชุด.....streptocoelium
 ข. dorsal exterior circular มี 2 ชุด (dec1, dec2).....3
3. ก. dec2 มีจำนวนมากกว่า dec1..... paramphistomum
 ข. dec2 มีจำนวนน้อยกว่า dec1..... fischoederius

2.2.1. วงศ์ Gastrothylacidae

2.2.1.1. สกุล *Carmyerius* Stiles et Goldberger, 1910

รูปร่างลำตัวคล้ายกรวย (conical) หรือ คล้ายวงรีเล็ก (subelliptical) บางชนิด ลำตัวตรงและมีเว้าโค้ง เมื่อทำการตัดขวาง (cross section) พบโครงสร้างเนื้อเยื่อที่เรียงตัวเป็นวง (circular) ภายในพบ ventral pouch ยาวไปจนเกือบถึง acetabulum ด้านหน้าของลำตัวพบ oral sucker หลอดอาหารไม่มีกระเปาะ ทางเดินอาหารอยู่ด้านข้างของลำตัวบางชนิดมีขนาดสั้น บางชนิดมีขนาดยาว บางชนิดเป็นคลื่น (wavy) บางชนิดเรียบ ระบบสืบพันธุ์เพศผู้พบอวัยวะที่มีลักษณะเป็นพู (lobed) และมีสมมาตร บริเวณกึ่งกลางของลำตัวพบ vas deferens, seminal vesicle, pars muscosa, pars prostatica และ ejaculatorius duct ส่วน genital pore มีลักษณะเป็น papilla ระบบสืบพันธุ์เพศเมียพบรังไข่มีตำแหน่งอยู่ระหว่างอวัยวะทั้งสองข้าง (intertesticular) laurer's canal เปิดที่ตำแหน่ง excretory pore ท่อนำไข่ขดตัวอยู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางตัวด้านหลัง vitellaria กระจายตัวอยู่ด้านข้างของลำตัวขนานกับทางเดินอาหารยาวไปจนถึง ventral pouch ส่วน excretory vesicle อยู่เหนือ acetabulum (Yamaguti, 1958) ดังภาพประกอบ 3



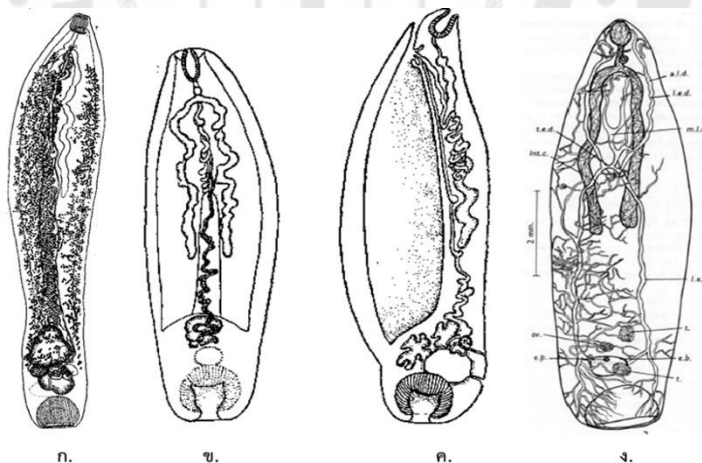
ภาพประกอบ 3 *Carmyerius bulbosus*

ก.-ข. ภาพวาด; ก. ด้านท้อง ข. sagittal section

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Sey, 1985)

2.2.1.2. สกุล *Fischoederius* Stiles & Goldberger, 1910

รูปร่างลำตัวยาวคล้ายกรวย เมื่อตัดขวางลำตัวมีลักษณะเป็นวง ทรงกลม หรือสามเหลี่ยม ภายในพบ ventral pouch ยาวไปจนถึงตำแหน่งของอวัยวะ acetabulum มีตำแหน่งอยู่ท้ายสุดของลำตัว ด้านหน้าของลำตัวพบ oral sucker หลอดอาหารไม่มีกระเปาะ ทางเดินอาหารมีลักษณะคดเคี้ยวยาวไปจนถึงตำแหน่งของอวัยวะและรังไข่ ระบบสืบพันธุ์เพศผู้พบ 2 อวัยวะ ส่วนแรกอยู่ที่ตำแหน่งด้านหลัง หรือส่วนหน้าของด้านหลัง (anterodorsal) และอีกส่วนอยู่ตำแหน่งกึ่งกลางเส้นลำตัว (median line) โดยพบ vas deferens, seminal vesicle, par musculosa, par prostatica และ ejaculator ที่ตำแหน่งกึ่งกลางด้านหลังของลำตัว ส่วน genital pore เปิดที่ตำแหน่ง ventral pouch ระบบสืบพันธุ์เพศเมียพบรังไข่อยู่ที่ตำแหน่งด้านท้ายของอวัยวะ (posttesticular) laurer's canal เปิดที่ด้านหน้าของ excretory pore ท่อนำไข่ขดพันกันที่ตำแหน่งกึ่งกลางด้านหลังของลำตัว vitellaria อยู่ที่ตำแหน่งด้านข้างส่วนท้อง (ventrolateral) กระจายตัวจากตำแหน่ง genital pore ไปจนถึงตำแหน่งของอวัยวะและรังไข่ ส่วน excretory vesicle มีลักษณะเป็นรูอยู่ตำแหน่งใกล้กับบริเวณ acetabulum (Yamaguti, 1958) ดังภาพประกอบ 4



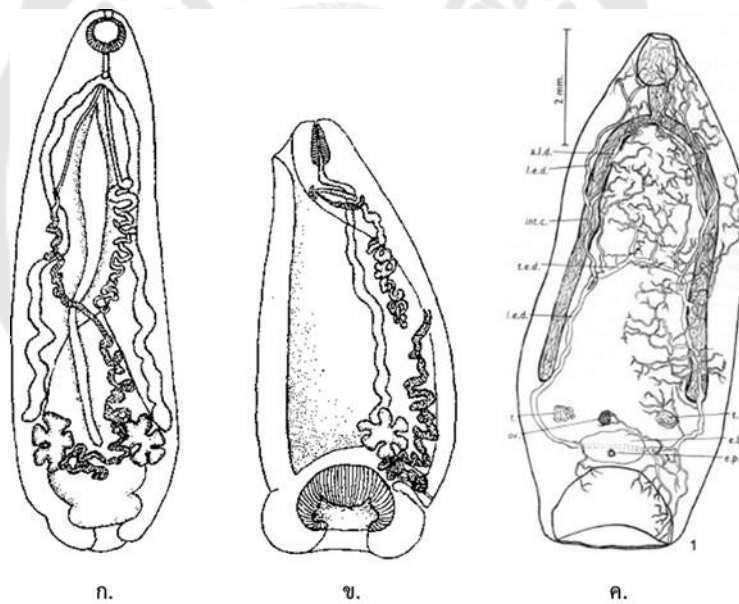
ภาพประกอบ 4 *Fischoederius elongatus*

ก.-ง. ภาพวาด; ก.-ข. ด้านท้อง ค. ด้านข้าง ง. ระบบขับถ่าย

ที่มา: (Tandon, 1961)

2.2.1.3. สกุล *Gastrothylax* Poirier, 1883

ลำตัวเรียวยาว รูปร่างคล้ายลูกโอ๊ก (acorn) ด้านท้องแบน (flattened) ด้านหลังนูน ภายในพบ ventral pouch มีความยาวเกือบถึง acetabulum ด้านหน้าลำตัวพบ oral sucker หลอดอาหารไม่มีกระเปาะ ทางเดินอาหารเป็นคลื่นยาวจนถึงตำแหน่งอวัยวะ ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ อวัยวะมีลักษณะเป็นพู่ มีสมมาตร อยู่ที่ตำแหน่งเหนือรังไข่ vas deferens ไข้วอยู่กึ่งกับท่อหน้าไข่และยืดยาวไปตามด้านข้างของลำตัว ไม่มี cirrus pouch ส่วน genital pore ไม่มีลักษณะเป็น sucker ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย รังไข่อยู่ตำแหน่งด้านท้ายของอวัยวะ laurer's canal เปิดที่ด้านหน้าของ excretory pore พบ vitellaria กระจายตัวใกล้กับ ventral pouch จากตำแหน่ง oral sucker ไปจนถึง acetabulum ท่อหน้าไข่ไข้วจากข้างหนึ่งไปอีกข้างหนึ่งของลำตัว ส่วน excretory vesicle อยู่ที่ตำแหน่งระหว่าง ventral pouch กับ acetabulum (Yamaguti, 1958) ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 *Gastrothylax crumenifer*

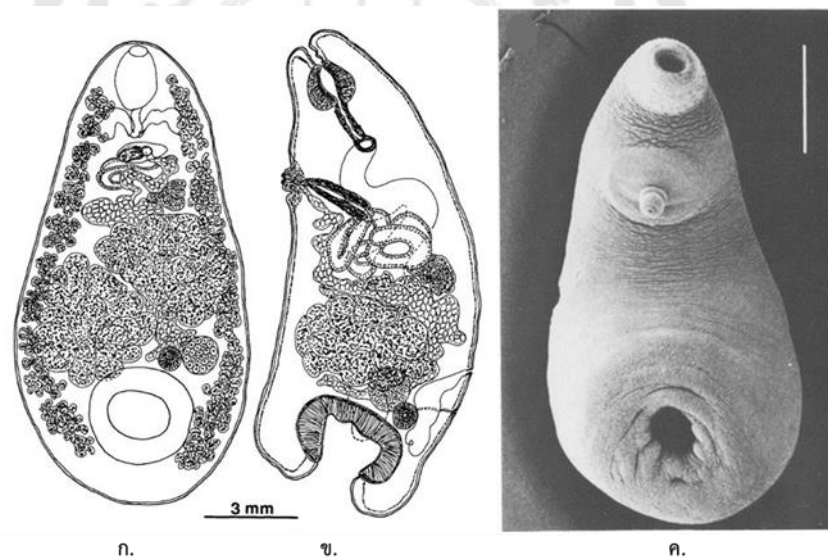
ก.-ค. ภาพวาด; ก. ด้านท้อง ข. ด้านข้าง ค. ระบบขับถ่าย

ที่มา: (Tandon, 1961)

2.2.2. วงศ์ Paramphistomidae

2.2.2.1. สกุล *Calicophoron* Näsmark, 1973

รูปร่างลำตัวคล้ายรูปชมพู่ (pyriform) หรือรูปกรวย บางชนิดแบนและโค้ง acetabulum มีขนาดใหญ่อยู่ตำแหน่งด้านท้องปลายสุดของลำตัว ด้านหน้าลำตัวพบ oral sucker หลอดอาหารมีหรือไม่มีกระเปาะหุ้ม ทางเดินอาหารยาว ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ อัณฑะมีลักษณะเป็น พู เรียงตัวได้ 3 รูปแบบ คือ เรียงแนวทแยงมุม (diagonal) ตามแนวตั้ง (tandem) หรือวางข้างกัน (juxtaposed) pars prostatica และ pars muscosa มีการพัฒนาเต็มที่ genital pore มีลักษณะเป็น papilla ไม่พบ cirrus pouch ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย รังไข่อยู่ด้านหลัง acetabulum พบ laurer's canal ไขว้อยู่กับ excretory vesicle ด้านข้างลำตัวพบ vitellaria กระจายตัวอยู่ ส่วน ท่อนำไข่ขาดพันอยู่ด้านหลังและด้านหน้าไปจนถึงตำแหน่งของอัณฑะ (Eduardo, 1983) ดัง ภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 *Calicophoron calicophorum*

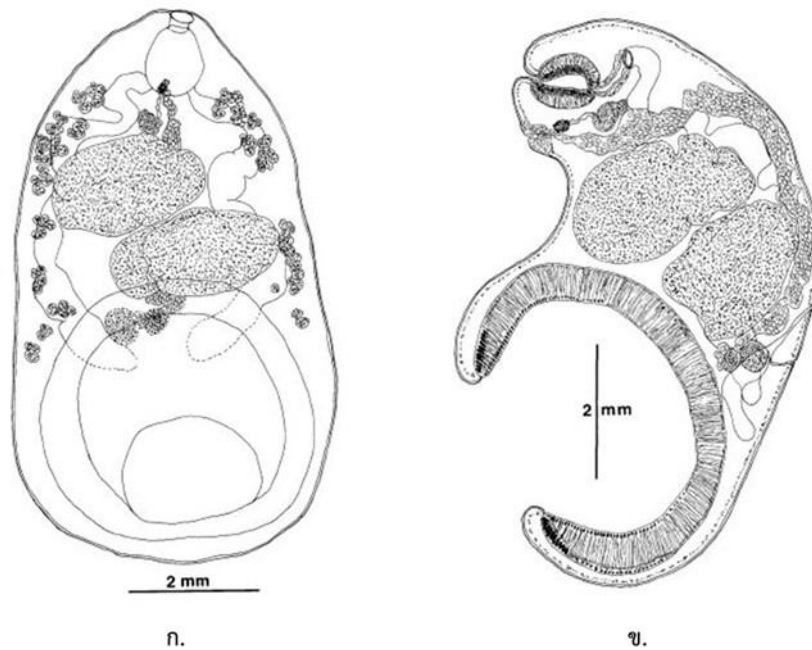
ก.-ข. ภาพวาด; ก. ด้านท้อง ข. sagittal section

ค. ด้านท้อง ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด bar = 2 มิลลิเมตร

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Eduardo, 1983)

2.2.2.2. สกุล *Explanatum* Fukui, 1929

รูปร่างคล้ายกรวย ด้านท้องมีลักษณะโค้ง ไม่มี ventral pouch มี acetabulum ขนาดใหญ่อยู่ตำแหน่งเกือบท้ายสุดของลำตัว หลอดอาหารไม่มีกระเปาะ ทางเดินอาหารอยู่ตำแหน่งด้านข้างของลำตัวมีลักษณะตรงหรือคดเคี้ยวยาวไปจนถึง acetabulum ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ อัณฑะลักษณะเป็นพู่ เรียงตัวในตำแหน่งตรงกันหรือเยื้องกันในแนวตั้ง seminal vesicle ผนังบาง ยาว และมีการหดเป็นรอยลึก pars muscosa มีขนาดสั้นและยังพัฒนาไม่เต็มที่ pars prostatica ยังพัฒนาไม่เต็มที่ genital pore ยังไม่พัฒนาเป็น sucker ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย รังไข่ อยู่ด้านท้ายของอัณฑะ vitellaria กระจายอยู่ด้านข้างของลำตัว laurer's canal ไข้วัวอยู่กับ excretory vesicle (Eduardo, 1984) ดังภาพประกอบ 7



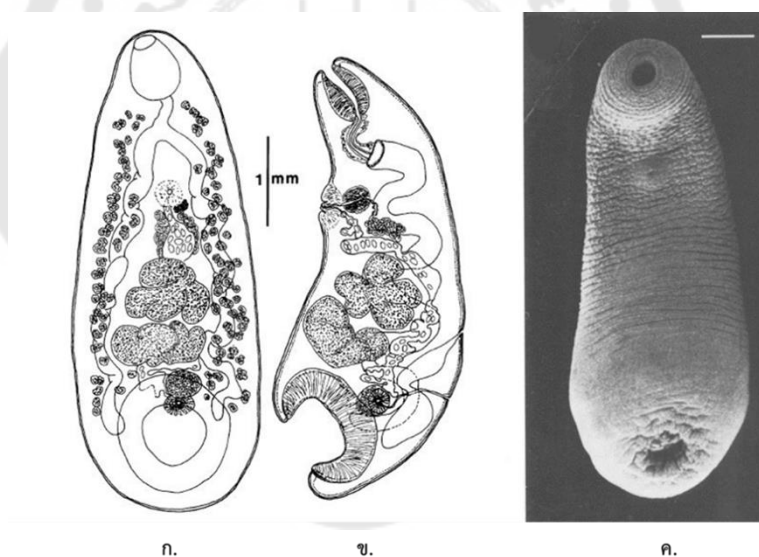
ภาพประกอบ 7 *Explanatum explanatum*

ก.-ข. ภาพวาด; ก. ด้านท้อง ข. Sagittal section

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Eduardo, 1984)

2.2.2.3. สกุล *Paramphistomum* Fiscoeder, 1901

รูปร่างลำตัวมีลักษณะคล้ายรูปกรวยหรือรูปชมพู ไม่มี ventral pouch ด้านหน้า ลำตัวพบ oral sucker ส่วน acetabulum อยู่ที่ตำแหน่งด้านท้องปลายสุดของลำตัว (ventroterminal) หลอดอาหารไม่พบกระเปาะ ทางเดินอาหารมีขนาดยาวและคดเคี้ยวอยู่ตำแหน่ง ด้านข้างลำตัวยาวไปจนถึงตำแหน่ง acetabulum ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ อัณฑะมี 2 ก้อน รูปร่างพู่ หรือกลม (rounded) เรียงตามแนวดิ่งหรือเรียงตัวตามแนวทแยงมุมของลำตัว seminal vesicle ขดทับซ้อนกัน pars muscosa พัฒนาไม่เต็มที่ ไม่พบ cirrus pouch ส่วน genital pore มี ลักษณะเป็นกล้ามเนื้อแต่ไม่พัฒนาเป็น sucker ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย รังไข่อยู่ตำแหน่งด้านท้าย ของอัณฑะ ท่อนำไข่ขดพันอยู่ทางด้านหน้ากึ่งกลางลำตัวไปด้านหลังของอัณฑะ laurer's canal ไขว้อยู่กับ excretory vesicle ส่วน vitellaria กระจายตัวอยู่ด้านข้างของลำตัวระหว่าง 2 sucker (Eduardo, 1982b) ดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 *Paramphistomum epiclitum*

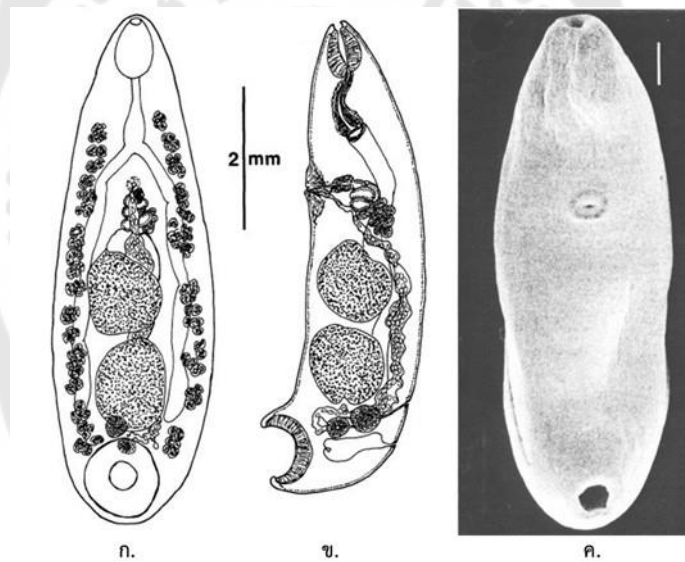
ก.-ข. ภาพวาด; ก. ด้านท้อง ข. sagittal section

ค. ด้านท้อง ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด bar = 500 ไมโครเมตร

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Eduardo, 1982b)

2.2.2.4. สกุล *Orthocoelium* Price & McIntosh, 1953 (Stiles & Goldberger, 1910)

รูปร่างคล้ายกรวย acetabulum อยู่ปลายหรือเกือบปลายสุดของลำตัว ด้านหน้า ลำตัวพบ oral sucker หลอดอาหารมีหรือไม่มีกระเปาะหุ้ม ทางเดินอาหารอยู่ตำแหน่งด้านข้าง ลำตัวรูปร่างตรง (straight) หรือเป็นคลื่น ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ อังทะมีลักษณะเป็นพูหรือไม่เป็นพู เรียงตัวในตำแหน่งตรงกันหรือเอียงกันในแนวตั้ง seminal vesicle มีผนังที่บางและขดม้วนกัน pars musculosa พัฒนาเต็มที่ pars prostatica มีขนาดสั้นหรือยาว ไม่พบ cirrus pouch ไม่มี genital sucker ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย รังไข่อยู่ตำแหน่งท้ายของอังทะก่อนนำไข่ ขดพันอยู่ข้างหน้า ไปด้านหลังของอังทะ vitellaria อยู่ตำแหน่งด้านข้างของลำตัว laurer's canal ไม่ใช่ไว้อยู่กับ excretory vesicle (Eduardo, 1985) ดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 *Orthocoelium dicranocoelium*

ก.-ข. ภาพวาด; ก. ด้านท้อง ข. sagittal section

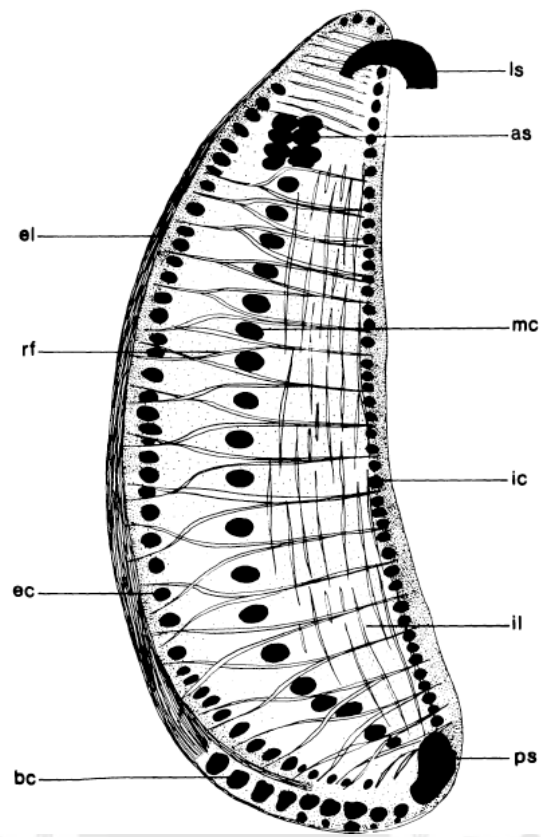
ค. ด้านท้อง ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด bar = 300 ไมโครเมตร

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Eduardo, 1985)

2.2.3. Type of pharynx

การจำแนกชนิดของพยาธิโดยอาศัยรูปแบบของคอหอย ทำได้โดยนำตัวอย่างพยาธิ ผ่านกระบวนการ histomorphology ซึ่งใช้เครื่อง rotary microtome ในการตัดชิ้นเนื้อและนำ ตัวอย่างที่ตัดไปย้อมสี (ขั้นตอนโดยละเอียดกล่าวในบทที่ 3) เพื่อศึกษาลักษณะของคอหอยดัง ภาพประกอบ 10 โดยมีรายละเอียดดังนี้

as	—	anterior sphincter
bph	—	body of pharynx
bs	—	basic circular
ec	—	exterior circular
el	—	exterior longitudinal
ic	—	interior circular
il	—	interior longitudinal
ls	—	lip sphincter
me	—	middle circular
o	—	esophagus
phb	—	pharyngeal bulb
pphs	—	primary pharyngeal sac
ps	—	posterior sphincter
rf	—	radial fibers
sphs	—	secondary pharyngeal sac

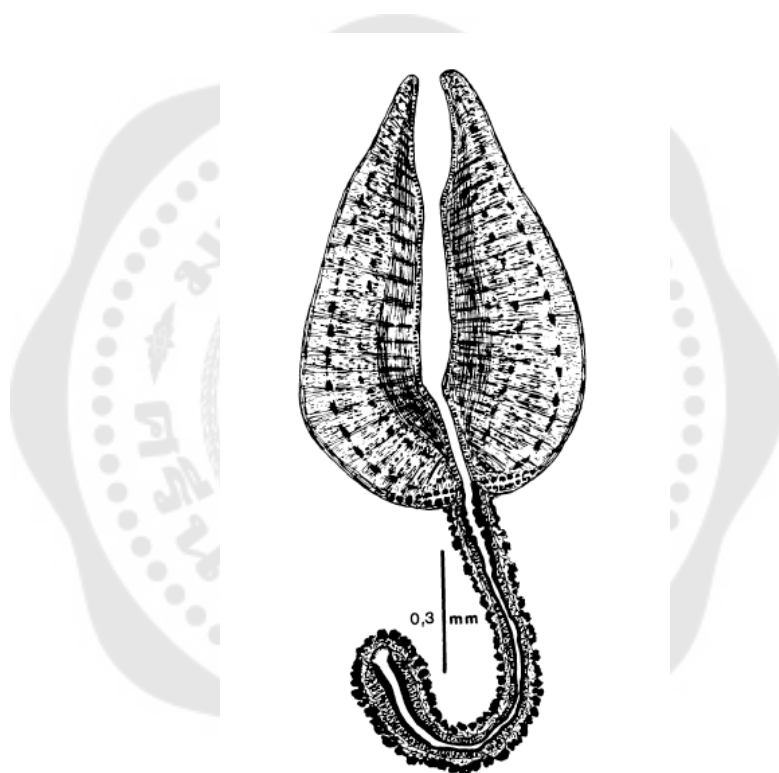


ภาพประกอบ 10 type of pharynx

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.3.1. Calicophoron type

พบ interior circular unit มีขนาดเล็ก middle circular unit พัฒนาไม่เต็มที่ (สังเกตได้เมื่อตัดแบบ transverse section) exterior circular unit มีจำนวนไม่คงที่ basal circular unit มีขนาดเล็กและเรียงตัว 2 แถว interior longitudinal fiber มีความหนาที่แตกต่างกันในแต่ละเส้นใย exterior longitudinal fiber พัฒนาการปกติ radial fiber พัฒนาการเต็มที่และไม่แตกแขนง ไม่พบ anterior sphincter ไม่พบ posterior sphincter และไม่พบ lip sphincter ดังภาพประกอบ 11

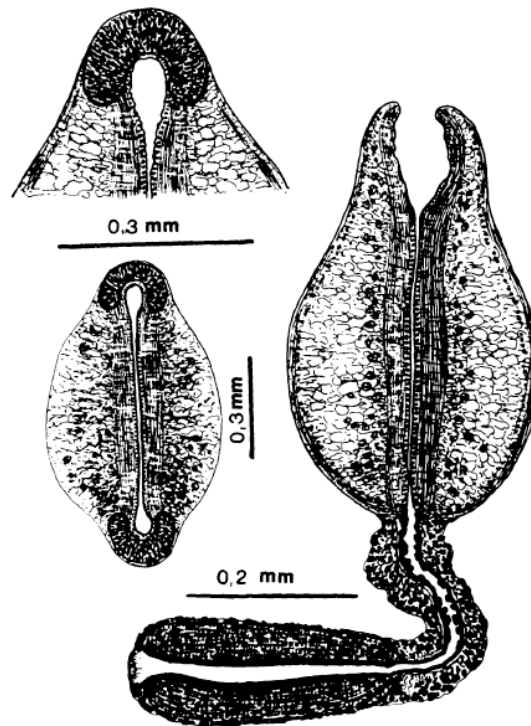


ภาพประกอบ 11 calicophoron type

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.3.2. Dicranocoelium type

พบมี lip sphincter ลักษณะคล้ายเกือกม้า (horseshoe-shape) ปรางูที่ตำแหน่งด้านข้างของคอหอยส่วนหน้า interior circular unit มีขนาดเล็ก basal circular unit เรียงตัว 1 แถว interior longitudinal fiber มีการพัฒนาค่อนข้างดี exterior longitudinal fiber มีจำนวนหลายเส้นอยู่ติดกับขอบผิว radial fiber พัฒนาได้ไม่ดี ไม่พบ anterior sphincter ไม่พบ posterior sphincter ไม่พบ middle sphincter และไม่พบ exterior circular unit ดังภาพประกอบ 12

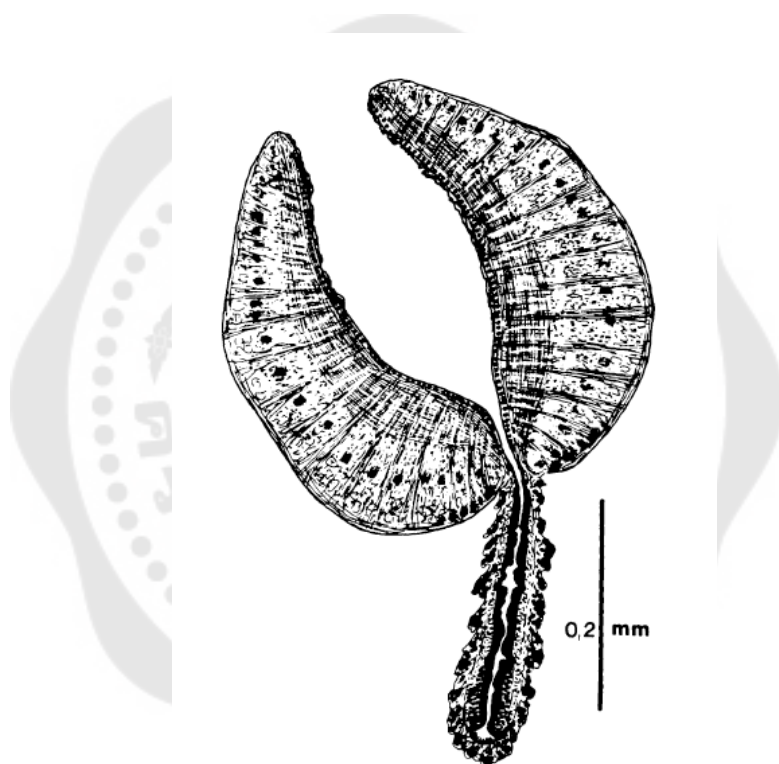


ภาพประกอบ 12 dicranocoelium type

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.3.3. Paramphistomum type

พบ interior circular unit มีขนาดปกติและกระจายทั่วกล้ามเนื้อ exterior circular unit อยู่ตำแหน่งขอบผิวหรือตำแหน่งกึ่งกลางและมีจำนวนไม่คงที่ basal circular units พัฒนาได้เต็มที่ มีจำนวน 1 หรือ 2 แถว interior longitudinal fiber มีความกว้างที่แตกต่างกันในแต่ละเส้น exterior longitudinal fiber มีความหนาที่แตกต่างในแต่ละเส้น radial fiber อยู่รวมกันเป็นมัดไม่มีการแตกแขนง ไม่พบ middle circular ไม่พบ anterior sphincter ไม่พบ posterior sphincter และไม่พบ lip sphincter ดังภาพประกอบ 13



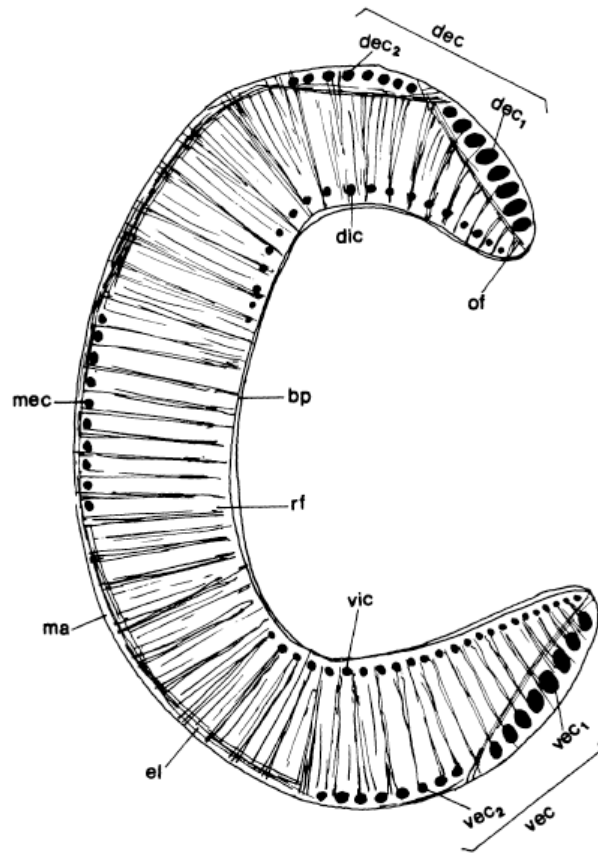
ภาพประกอบ 13 paramphistomum type

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.4. Type of acetabulum

การจำแนกชนิดของพยาธิโดยอาศัยรูปแบบของอวัยวะยึดเกาะหรือ acetabulum ทำได้โดยนำตัวอย่างพยาธิผ่านกระบวนการ histomorphology ซึ่งใช้เครื่อง rotary microtome ในการตัดชิ้นเนื้อและนำตัวอย่างที่ตัดไปย้อมสี (ขั้นตอนโดยละเอียดกล่าวในบทที่ 3) เพื่อศึกษาลักษณะของ acetabulum ดังภาพประกอบ 14 โดยมีรายละเอียดดังนี้

bp	—	basal part
dec	—	dorsal external circular
dec1	—	dorsal external circular outer
dec2	—	dorsal external circular inner
die	—	dorsal internal circular
el	—	exterior longitudinal
mp	—	marginal part
mec	—	middle exterior circular
of	—	oblique fibers
rf	—	radial fibers
vec	—	ventral exterior circular
vec1	—	ventral exterior circular outer
vec2	—	ventral exterior circular inner
vic	—	ventral internal circular

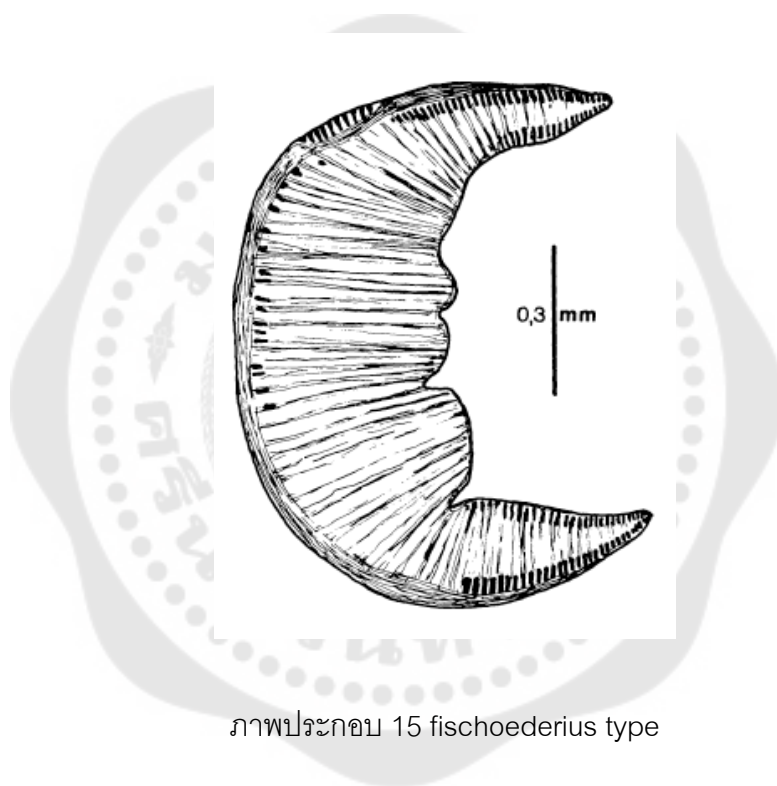


ภาพประกอบ 14 type of acetabulum

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.4.1. Fiscoederius type

Acetabulum มีขนาดปกติ กล้ามเนื้อของอวัยวะยึดเกาะรูปแบบนี้มีการพัฒนาในระดับปานกลาง โพรง (cavity) และผนัง (wall) กล้ามเนื้อพัฒนาค่อนข้างดี dorsal external circular แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ dec1 และ dec2 ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยยาวและบาง ventral internal circular มีจำนวนและขนาดเท่ากับ dec การพัฒนาของ radial musculature ค่อนข้างดี การพัฒนาของ exterior longitudinal fiber แข็งแรง และ middle exterior circular จัดเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ ดังภาพประกอบ 15

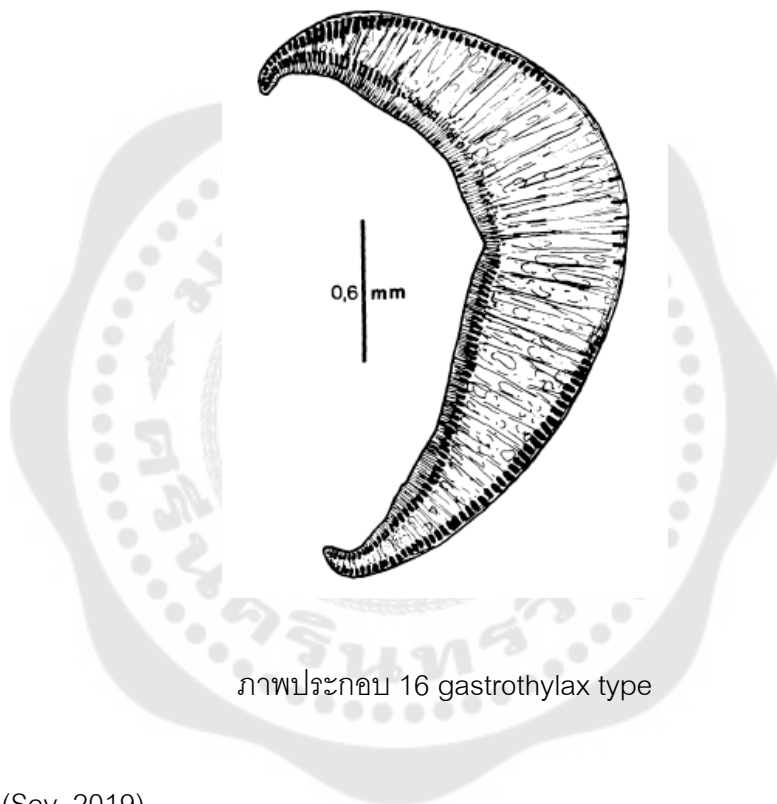


ภาพประกอบ 15 fiscoederius type

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.4.2. Gastrothylax type

Acetabulum มีขนาดใหญ่ กล้ามเนื้อของอวัยวะยึดเกาะรูปแบบนี้มีการพัฒนาค่อนข้างดี โพรงกล้ามเนื้อมีการพัฒนาในระดับปานกลาง ผนังกล้ามเนื้อพัฒนาค่อนข้างดี dorsal external circular มี 1 กลุ่ม และมีหน่วยจำนวนมาก ventral internal circular มี 1 กลุ่ม และมีหน่วยจำนวนมาก radial fiber พัฒนาเต็มที่ exterior longitudinal fibers พัฒนาในระดับปานกลาง middle exterior circular จัดเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ ดังภาพประกอบ 16

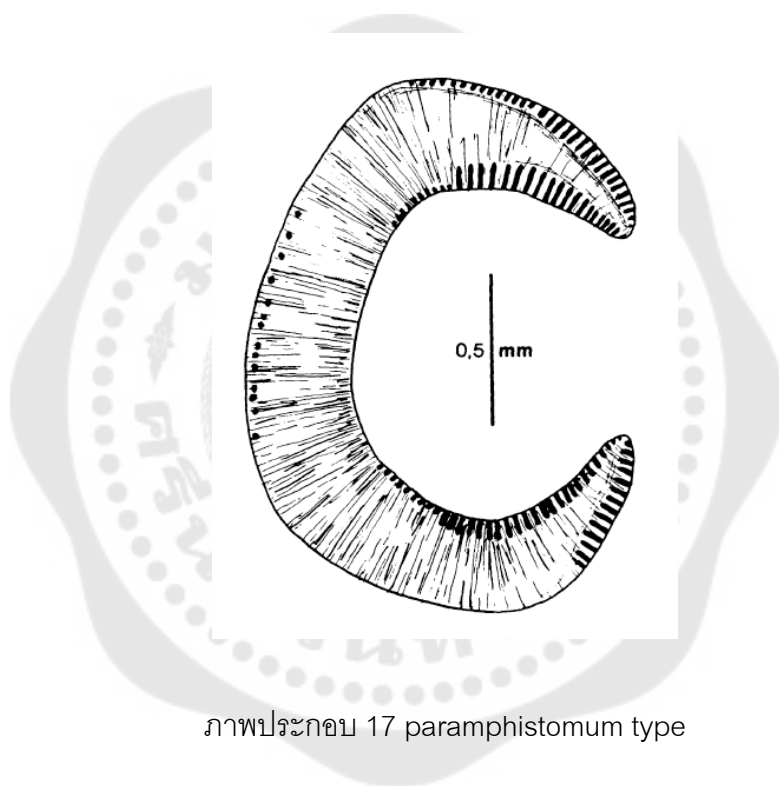


ภาพประกอบ 16 gastrothylax type

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.4.3. Paramphistomum type

Acetabulum มีขนาดปกติ โฟรงกล้ามเนื้อพัฒนาเต็มที่ ผนังกล้ามเนื้อพัฒนาในระดับปานกลาง dorsal external circular แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ dec1 และ dec2 ซึ่งพบว่า dec2 มีขนาดเล็กกว่า dec1 แต่มีจำนวนกล้ามเนื้อมากกว่า dec1 พบ dorsal internal circular และ ventral internal circular ด้านนอกมีขนาดกว้างกว่าด้านใน (ขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ) middle exterior circular จัดเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ exterior longitudinal fiber มีการพัฒนาในระดับปานกลาง radial fiber พัฒนาได้เต็มที่ ดังภาพประกอบ 17

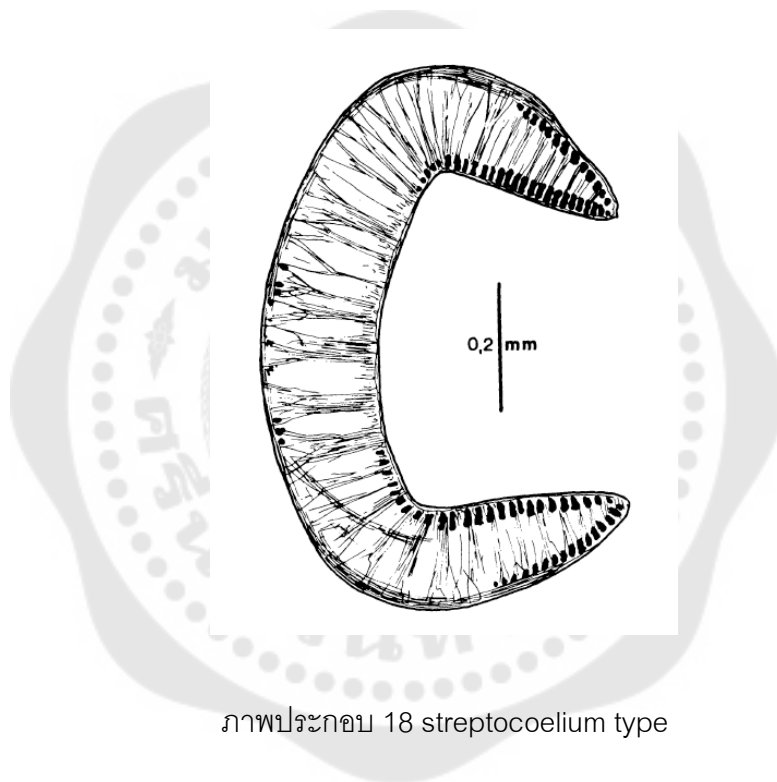


ภาพประกอบ 17 paramphistomum type

ที่มา: (Sey, 2019)

2.2.4.4. Streptocoelium type

Acetabulum มีขนาดเล็ก กล้ามเนื้ออวัยวะยึดเกาะพัฒนาได้เต็มที่ โพรงและผนัง กล้ามเนื้อพัฒนาได้ในระดับปานกลาง dorsal external circular มี 1 กลุ่ม ventral exterior circular มี 1 กลุ่ม ซึ่ง dec และ vec มีขนาดและจำนวนเท่ากัน dorsal internal circular และ ventral internal circular มีขนาดและการจัดเรียงตัวใกล้เคียงกัน middle exterior circular มีจำนวนน้อย radial fiber พัฒนาได้เต็มที่และการเรียงตัวของเส้นใยแต่ละเส้นห่างกัน exterior longitudinal fiber มีจำนวนเส้นใยน้อยและมีการพัฒนาเต็มที่ ดังภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 streptocoelium type

ที่มา: (Sey, 2019)

2.3. วิธีการตรวจสอบการติดพยาธิในมูลสัตว์ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม

ในการตรวจสอบการติดพยาธิในมูลสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสามารถทำได้โดยการตรวจสอบมูลสัตว์ด้วยตาเปล่า หรือใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาไข่พยาธิที่ปนออกมากับมูลสัตว์เป็นเครื่องมือช่วยในการตรวจสอบ ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

2.3.1. การตรวจด้วยตาเปล่า (macroscopic examination)

การตรวจด้วยวิธีนี้เป็นการดูลักษณะทั่ว ๆ ไปของมูลสัตว์ด้วยตาเปล่า เช่น สี รูปร่าง ความนิ่มของมูลสัตว์ เป็นต้น โดยลักษณะเหล่านี้สามารถบ่งบอกได้ถึงระยะต่าง ๆ ของปรสิตในมูลสัตว์ ดังตาราง 1 ซึ่งเป็นการวินิจฉัยเบื้องต้นเท่านั้น ควรนำมูลสัตว์ดังกล่าวไปตรวจสอบด้วยวิธีการ microscopic examination ในลำดับถัดไป

ตาราง 1 ลักษณะของมูลสัตว์และปรสิตที่คาดว่าจะพบด้วยการตรวจด้วยตาเปล่า

ลักษณะของมูลสัตว์	ปรสิตที่คาดว่าจะพบ
มูลเหลว (liquid)	protozoa ระยะ trophozoites ที่ยังมีการเคลื่อนที่
มูลนิ่ม (soft)	protozoa ระยะ trophozoites และ cyst
มูลแข็ง (formed)	protozoa ระยะ cyst
ผิวน้ำของมูล (surface)	<i>Ascaris lumbricoides</i>
ด้านล่างของมูล (beneath)	ปล้องของพยาธิตัวเต็ม

2.3.2. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination)

2.3.2.1. การตรวจมูลสัตว์โดยการป้ายลงบนแผ่นกระจกสไลด์ (direct wet smear)

วิธีการนี้เหมาะสำหรับการตรวจหาปรสิตที่ยังมีชีวิตและสามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น ปรสิตโพรโทซัว เป็นต้น โดยการหยดน้ำเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 % และหยดสารละลาย lugol's iodine ลงบนแผ่นกระจกสไลด์อย่างละ 1 หยด โดยสารละลาย lugol's iodine ช่วยทำให้ไข่หรือ cyst ของพยาธิมีสีเด่นชัดขึ้นง่ายต่อการตรวจสอบ จากนั้นป้ายมูลสัตว์ลงบนหยดน้ำทั้งสองชนิด ปิดทับด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อตรวจสอบการติดพยาธิ

2.3.2.2. การทำให้มูลสัตว์เข้มข้นขึ้น (concentration technique)

วิธีการนี้เหมาะสำหรับการตรวจไข่หรือ cyst ของพยาธิที่ไม่มีการเคลื่อนที่ และมีปริมาณไข่นอนพยาธิน้อยมากในมูลสัตว์ (light infection) สามารถแบ่งออกได้ 2 วิธี ดังนี้

2.3.2.2.1. การทำให้ไข่หรือ cyst ของพยาธิตกตะกอน (sedimentation technique) ด้วยวิธี formalin-ether sedimentation

วิธีการนี้เป็นการทำให้ไข่พยาธิตกตะกอนโดยอาศัยการปั่นเหวี่ยงและการแยกชั้นกันของสารละลาย ทำได้โดยการนำมูลสัตว์มาละลายด้วย formalin จากนั้นกรองลงในหลอดทดลองและเติม ether ลงไป เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ผลจากการปั่นเหวี่ยงจะทำให้เกิดการแยกชั้นกันของสารเป็น 4 ชั้น โดยชั้นบนสุดจะเป็น ether ตามด้วยไขมัน และกากอาหาร ชั้นถัดมาจะเป็น formalin และตะกอนไข่พยาธิจะอยู่ด้านล่างสุดของหลอดทดลอง (Anuar et al., 2013) วิธีการนี้สามารถตรวจพบปรสิตได้หลายชนิด เช่น ไข่หรือระยะตัวอ่อนของพยาธิตัวกลม ไข่หรือ cyst ของพยาธิตัวตืด ไข่พยาธิใบไม้ รวมไปถึงปรสิตโพรโทซัวบางชนิด

2.3.2.2.2. การทำให้ไข่หรือ cyst ของพยาธิลอย (floatation technique)

วิธีการนี้เป็นการทำให้ไข่พยาธิลอยขึ้นโดยอาศัยหลักการความถ่วงจำเพาะด้วยสารละลายชนิดต่างๆ เช่น การใช้น้ำเกลืออิ่มตัว (brine floatation) มีค่าความถ่วงจำเพาะ (specific gravity หรือ sg) เท่ากับ 1.20 (Thienpont et al., 1986) หรือการใช้ zinc sulphate ซึ่งมีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.18 (Truant et al., 1981) เป็นต้น วิธีการนี้จึงเหมาะสำหรับการตรวจหาไข่พยาธิที่ไม่มีฝาปิด (unoperculated eggs) เช่น ไข่พยาธิตัวกลม *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., ไข่พยาธิตัวตืด *Teania* spp. และ *Hymenolepis* spp. เป็นต้น โดยไข่ของพยาธิจะลอยอยู่ด้านบนสุดของหลอดทดลอง (surface film) ส่วนไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีซึ่งมีฝาปิดจะทำให้ความถ่วงจำเพาะเพิ่มมากขึ้น (ประมาณ 1.35) และไม่สามารถลอยตัวได้ในสารละลายจึงไม่เหมาะสำหรับการตรวจตัวอย่างด้วยวิธีการลอย

2.3.3. รายงานการตรวจสอบการติดพยาธิในมูลสัตว์ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม

ปี ค.ศ. 2011 Jittapalapong และคณะ ได้ศึกษาความชุกของพยาธิในทางเดินอาหาร (gastro-intestinal parasite) ในมูลโคจากภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 1,599 ตัวอย่าง ด้วยวิธี formalin-ethyl acetate centrifugal sedimentation พบได้มีการติดพยาธิรวมร้อยละ 46.59 โดยภาคใต้มีการติดพยาธิสูงสุดร้อยละ 100 ตามด้วยภาคเหนือร้อยละ 88.09 ภาคอีสานร้อยละ 65.22 และภาคกลางร้อยละ 46.67 ตามลำดับ พยาธิที่พบในทางเดินอาหาร ได้แก่ *Entamoeba* spp. ร้อยละ 33.04, *Coccidia* ร้อยละ 7.32, *Giardia* spp. ร้อยละ 0.06, พยาธิตัวกลมกลุ่ม Strongyles ร้อยละ 6.07, *Trichuris*

spp. ร้อยละ 0.63, *Strongyloides* spp. ร้อยละ 0.19, พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้ว ร้อยละ 28.41, *Fasciola* spp. ร้อยละ 3.69 และ *Moniezia benedeni* ร้อยละ 2.32 (Jittapalapong et al., 2011)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2014 Yuwajita และคณะ ได้ทำการศึกษาความชุกของพยาธิในทางเดินอาหารของโคและกระบือ โดยทำการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์จากจังหวัดอุดรธานีจำนวน 502 ตัวอย่าง (โค 322 ตัวอย่าง และกระบือ 180 ตัวอย่าง) ตรวจการติดพยาธิด้วยวิธี simple floatation และ simple sedimentation technique พบความชุกรวมร้อยละ 65.94 เมื่อจำแนกการติดพยาธิในสัตว์แต่ละชนิดพบว่าโคมีความชุกรวมร้อยละ 60.25 กระบือมีความชุกรวมร้อยละ 76.11 พยาธิที่พบในโคและกระบือ ได้แก่ *Fasciola* spp. ร้อยละ 10.54 และ 20.56 พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้ว ร้อยละ 20.08 และ 40.55 *Strongyloides* spp. ร้อยละ 13.66 และ 5.55 *Capillaria* spp. ร้อยละ 6.21 และ 5.55 และ *Trichuris* spp. ร้อยละ 4.79 และ 3.33 ตามลำดับ (Yuwajita, Pruangka, & Sukwong, 2014)

ปี ค.ศ. 2017 Getahun และคณะ ได้ทำการศึกษาค่าความชุกของพยาธิในทางเดินอาหารของโคจำนวน 206 ตัว จากประเทศเอธิโอเปีย เก็บตัวอย่างมูลสัตว์ด้วยการล้างโดยตรงผ่านช่องทวารหนัก (rectum) ทำการตรวจพยาธิด้วยวิธี sediment techniques ร่วมกับ floatation techniques ด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว รายงานผลในหน่วยปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัม (egg per gram หรือ EPG) ผลการตรวจพบค่าความชุกรวมของการติดพยาธิในทางเดินอาหารร้อยละ 87.9 ค่าเฉลี่ย EPG รวมเท่ากับ 179.8 พบพยาธิทั้งหมด 6 ชนิด โดยมีค่าความชุก ดังนี้ *Coccidia* ร้อยละ 56.3, *Fasciola* spp. ร้อยละ 26.2, *Paramphistomum* spp. ร้อยละ 10.2, *Bunostomum* spp. ร้อยละ 8.7, *Oesophagostomum* spp. ร้อยละ 8.3 และ *Trichuris* spp. ร้อยละ 1.5 (Getahun et al., 2017)

ปี ค.ศ. 2017 Chowdhury และคณะ ได้ทำการศึกษาค่าความชุกของพยาธิในทางเดินอาหารของโคและกระบือ จากประเทศบังกลาเทศ เก็บตัวอย่างโดยการล้างโดยตรงผ่านช่องทวารหนัก และคงสภาพตัวอย่างมูลสัตว์สดด้วย formalin ความเข้มข้น 10% จากนั้นทำการตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิด้วยวิธี direct smear ร่วมกับ sediment techniques และ floatation techniques ด้วย sulphate solution ผลการตรวจพบค่าความชุกรวมของพยาธิในทางเดินอาหารร้อยละ 64 พยาธิที่พบในทางเดินอาหาร ได้แก่ *Paramphistomum* spp. มีค่าความชุกสูงที่สุดร้อยละ 22 ตามด้วย *Toxocara* spp. ร้อยละ 12, *Trichostrongylus* spp. ร้อยละ 2

นอกจากนี้ยังพบการติดร่วมกันของพยาธิ *Paramphistomum* และ *Oesophagostomum* ในทางเดินอาหารของโค ซึ่งมีค่าความชุกร้อยละ 2 (Chowdhury, Sen, Kar, & Nath, 2017)

2.4. วิธีการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

ปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามามีบทบาทในการตรวจสอบการติดพยาธิในสัตว์ปศุสัตว์เพิ่มมากขึ้น วิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบ คือ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) ซึ่งเป็นกระบวนการจำลองกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยใช้วิธีการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้ 1) การแยกสายดีเอ็นเอในสภาพที่เป็นเกลียวคู่ (double-stranded) ออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded) เรียกว่า ขั้นตอนการทำให้เสียภาพธรรมชาติ (denaturation) ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิ ในช่วง 93-95 °C เพื่อให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย และเส้นดีเอ็นเอแยกออกจากกัน ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่แตกต่างจากกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากในสิ่งมีชีวิตมีเอนไซม์เฮลิคาส (helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ 2) ขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นลำดับเบสสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15-25 เบส โดยเข้าจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เรียกว่า ขั้นตอน annealing ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิที่เรียกว่า annealing temperature (T_a) โดยมีค่าเท่ากับ $T_m - 5$ °C (ขึ้นอยู่กับค่า melting temperature (T_m) ของสายไพรเมอร์ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สายไพรเมอร์แยกตัวออกจากกัน 50 % โดยค่า T_m ของไพรเมอร์ขึ้นกับจำนวนและปริมาณของอัตราส่วนเบส A T C และ G 3) ขั้นตอนสุดท้ายคือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ เรียกว่า extension ในขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิ 72 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ *Taq polymerase* ซึ่งทำหน้าที่สร้างสายพอลิเมอเมอร์ (polymer) จากนิวคลีโอไทด์อิสระที่ใส่ลงไปปฏิกิริยา ทำให้ได้สายดีเอ็นเอตามแม่แบบที่ต้องการในอัตราส่วน 2^n และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis (Saiki et al., 1988)

เทคนิค PCR นี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดของพยาธิรวมไปถึงหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิได้ โดยอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณที่ต้องการศึกษา เช่น ในปี ค.ศ. 2010 Lotfy และคณะได้ทำการตรวจสอบการติดพยาธิในกลุ่ม paramphistome จากแอฟริกาและเอเชีย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้บริเวณ ITS2 ในสร้างแผนภาพวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยไพรเมอร์ GA1 (5-AGA ACA TCG ACA TCT TGA AC-3) และ BD2

(5-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT3) โดยมีปฏิกิริยา PCR ดังนี้ รอบที่ 1 denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 2 นาที extension ที่ 74 °C นาน 90 วินาที และรอบที่ 2-31 denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 74 °C นาน 90 วินาที ก่อนเข้าสู่ final extension ที่ 74 °C นาน 7 นาที และทำการ sequencing เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *Calicophoron* spp., *Calicophoron microbothrium* *Orthocoelium* spp., *Paramphistomidae* และ *Gastrothylacidae* ด้วยวิธี maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) และ minimum evolution (ME) และสามารถจัดจำแนกพยาธิระยะเชอร์คาเรียที่ไม่ทราบชนิดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับพยาธิระยะตัวเต็มวัยแต่ละชนิดได้ (Lotfy et al., 2010)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 Sanguankiat และคณะได้ทำการตรวจสอบการติดพยาธิในโคด้วยเทคนิค PCR และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้สองชนิด ได้แก่ *Fischoederius cobboldi* และ *Paramphistomum epiclitum* โดยอาศัยไพรเมอร์ 1 คู่ ได้แก่ forward primer (5'-GGTTTTTGTGCATCCTGAGGTTTA-3') และ reverse primer (5'-AGAAAGAACGTAATGA AAATGAGCAAC-3') เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน cytochrome c oxidase subunit I (COX1) และสร้างแผนภาพวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining (bootstrap test 1,000 replicates) และใช้พยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola hepatica* เป็น out group (Sanguankiat et al., 2016)

ในปี ค.ศ. 2017 El-Bahy และคณะได้ทำการจำแนกชนิดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีออกจากกันด้วยวิธี PCR โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะของยีน 18S ribosomal DNA (18S rDNA) ของพยาธิในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการจำแนกพยาธิชนิด *Paramphistomum cervi* โดยใช้ไพรเมอร์ F5'- AGAACATCGACATCTTGAAC-3' และ R5'-TATGCTTAAATTCAG CGGGT-3' ได้ผลิตภัณฑืขนาด 456 คู่เบส และ *Carmyerius gregarius* โดยใช้ไพรเมอร์ F5'-TTGCGCTGATTACGTCCCTG-3' และ R5'-TTGGCTGCGCTCTTCATCGAC-3' ได้ผลิตภัณฑืขนาด 401 คู่เบส ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพยาธิสองชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันและแยกออกจากกันได้ยากเมื่อศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว (El-Bahy et al., 2017)

ในปี ค.ศ. 2017 Ploeger และคณะได้ทำการศึกษาและจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีของโคและแกะในประเทศเนเธอร์แลนด์ งานวิจัยนี้ใช้ข้อมูลจากส่วนหนึ่งของยีน

5.8S, 28S และบริเวณ ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS-2F (5'-TGTGTCGATGAAGAGCAG-3') และ ITS-2 R (5'-GGTTAGTTTCTTTTCCTCCGA-3') ในการจำแนกพยาธิด้วยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ปฏิกิริยาปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x buffer (Invitrogen, USA), ไพรเมอร์ความเข้มข้น 12.5 พิโคโมล (Eurofins, Germany), dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (Invitrogen, USA), MgCl₂ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (Invitrogen, USA), platinum Taq polymerase ความเข้มข้น 2.5 หน่วย (Invitrogen, USA) และดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR ดำเนินการที่อุณหภูมิ pre- denaturation เท่ากับ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย PCR 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing 53 °C เป็นเวลา 1.5 นาที extension 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ final-extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยมีขนาดผลิตภัณฑ์เท่ากับ 440 คู่เบส จากนั้นศึกษาและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยวิธี BLASTn ผลการทดสอบพบการติดพยาธิในโคและแกะรวมทั้งสิ้น 2 ชนิด ได้แก่ *Calicophoron daubneyi* และ *Paramphistomum leydeni* โดย *P. leydeni* พบเฉพาะในโคเท่านั้น (Ploeger et al., 2017)

นอกจากนี้เทคนิค PCR ยังสามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำได้ เช่น งานวิจัยของ Ai และคณะ ที่รายงานความไวที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola hepatica* และ *F. gigantica* ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 0.11 และ 0.35 นาโนกรัม ตามลำดับ (Ai et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าพยาธิใบไม้ชนิด *Fischoederius elongatus* จำนวน 1 ฟอง สามารถสกัดดีเอ็นเอได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 14.01 นาโนกรัม และพยาธิใบไม้ชนิด *Paramphistomum epiclitum* จำนวน 1 ฟอง สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ความเข้มข้นเท่ากับ 17.53 นาโนกรัม (Wongsawad, Wongsawad, Chai, Paratasilpin, & Anuntalabhochai, 2006)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้นนี้ จะเห็นได้ว่าเทคนิค PCR สามารถตรวจสอบพยาธิได้หลายชนิด โดยการใส่ไพรเมอร์จำเพาะหรือการสร้างแผนภาพวิวัฒนาการเพื่อจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเข้าด้วยกัน โดยอาศัยฐานข้อมูล GenBank เข้ามาช่วยในการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิต แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบการรายงานการใช้ไพรเมอร์หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวกันเพื่อระบุชนิดของพยาธิในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า multiplex PCR เพื่อให้สามารถใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยาและสามารถระบุชนิดของพยาธิที่ทำการทดสอบได้หลายชนิดพร้อมกันอย่างแม่นยำโดยไม่ต้องอาศัยการทำ sequencing ที่ใช้เวลาและงบประมาณในการศึกษาที่สูงกว่า

2.5. Multiplex polymerase chain reaction

Multiplex PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจาก PCR แบบดั้งเดิม เหมาะกับงานที่ต้องการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันให้สามารถแยกออกจากกันได้โดยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (species-specific primer) หลายคู่ในหนึ่งปฏิกิริยาเพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน (amplification) ลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่อยู่รวมกันให้เกิดผลิตภัณฑ์ (amplicon) ที่แตกต่างกันออกไปโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ระหว่างไพรเมอร์แต่ละเส้น ดังภาพประกอบ 19 รายงานการวิจัยที่ใช้เทคนิค multiplex PCR ในการแยกชนิดของพยาธิ อาทิเช่น ในปี ค.ศ. 2001 Zarlenga และคณะ ได้ทำการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับตรวจสอบพยาธิตัวกลมในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal nematode) ในสัตว์ปศุสัตว์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal และ external transcribed spacers ของ ribosomal DNA ในการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ เพื่อจำแนกชนิดของพยาธิตัวกลมในระบบทางเดินอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ 1) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 3' ของ internal transcribed spacer 1 (ITS1) ยาวไปจนถึงปลาย 5' ของ ITS2 ของพยาธิ *Oesophagostomum radiatum* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 329 คู่เบส 2) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *Trichostrongylus colubriformis* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 243 คู่เบส 3) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของ *Ostertagia ostertagi* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 257 คู่เบส 4) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ external transcribed spacers (ETS) ของ *Haemonchus placei* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 176 คู่เบส 5) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ETS ของ *Cooperia oncophora* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 151 คู่เบส ดังภาพประกอบ 20 โดยไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่นี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 5 ชนิด โดยใช้ปฏิกิริยา PCR 40 รอบ ประกอบด้วย 94 °C เป็นเวลา 1 นาที 60 °C เป็นเวลา 1 นาที 72 °C เป็นเวลา 2 นาที และใช้ final-extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นระยะเวลา 7 นาที (Zarlenga, Chute, Gasbarre, & Boyd, 2001)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Martinez-Ibeas และคณะ ได้นำเทคนิค multiplex PCR มาใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิในหอยชนิด *Galba truncatula* โดยใช้ยีน COX1 ในการออกแบบไพรเมอร์ ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ 2 ชนิดออกจากกันในหอยชนิด *Galba truncatula* ที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางร่วมกันได้ โดยพยาธิใบไม้ชนิด *Calicophoron daubneyi*

ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 885 คู่เบส และพยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola hepatica* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 425 คู่เบส (Martinez-Ibeas et al., 2013)

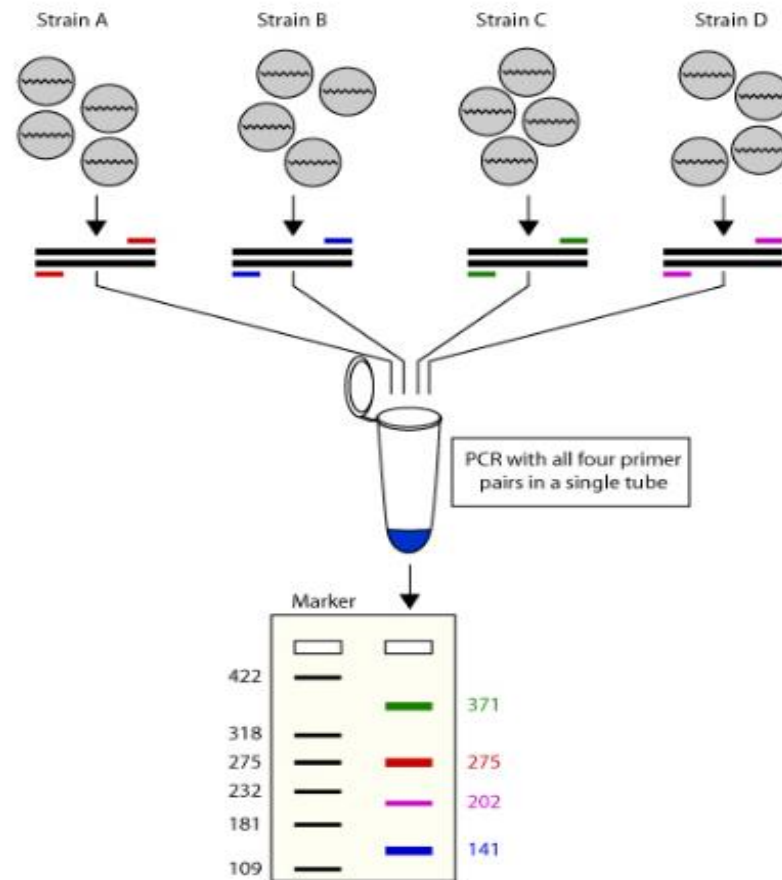
ในปี ค.ศ. 2014 Bisset และคณะ ได้พัฒนาชุดตรวจตัวอ่อนพยาธิตัวกลมกลุ่ม strongylid โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ ITS2 ของพยาธิจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Cooperia oncophora*, *Cooperia curticei*, *Chabertia ovina*, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Oesophagostomum venulosum*, และ *Nematodirus spathiger* โดยในงานวิจัยได้มีการปรับปรุงปฏิกิริยาเพื่อพัฒนา multiplex PCR ทั้งในเรื่องของอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การตรวจสอบ 10 ชนิดพร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยาเกิดความไม่เสถียร ทำให้ผู้วิจัยแบ่งการทดสอบออกเป็นครั้งละ 5 ชนิด โดยปฏิกิริยาแรกประกอบด้วย *T. circumcincta*, *T. axei*, *T. colubriformis*, *T. vitrinus* และ *C. ovina* และปฏิกิริยาที่สองประกอบด้วย *H. contortus*, *C. curticei*, *C. oncophora*, *N. spathiger* และ *O. venulosum* จึงจะสามารถดำเนินปฏิกิริยาต่อไปได้อย่างมีความแม่นยำและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น ๆ (Bisset, Knight, & Bouchet, 2014)

ต่อมาปี ค.ศ. 2017 Chontanarath ได้นำเทคนิค multiplex PCR ไปใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกลุ่ม heterophyid ระยะเมตาเซอร์คาเรียจากปลาน้ำจืด โดยใช้บริเวณ ITS2 ในการออกแบบไพรเมอร์ ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์สามารถจำแนกชนิดของพยาธิใบไม้ได้ 2 ชนิดพร้อมกัน ได้แก่ *Centrocestus caninus* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 231 คู่เบส และ *Stellantchasmus falcatus* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 137 คู่เบส โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโฮสต์หรือพยาธิชนิดอื่นๆ (Chontanarath, 2017)

ในปี ค.ศ. 2018 Bartolomé และคณะ ได้ออกแบบและพัฒนากการตรวจการติดปรสิตโพทโซซัวกลุ่ม trypanosomatid โดยวิธี multiplex PCR ในแมลงสกุล *Apis* และ *Bombus* โดยออกแบบไพรเมอร์จากยีน *RNA polymerase II large subunit (RPB1)* ให้จำเพาะกับ *Lotmaria passim* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 245 คู่เบส ออกแบบไพรเมอร์จากยีน *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* ให้จำเพาะกับ *Crithidia mellificae* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 177 คู่เบส และออกแบบไพรเมอร์จากยีน *DNA topoisomerase II (TOPII)* ให้จำเพาะกับ *Crithidia bombi* ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 133 คู่เบส โดยใช้สารละลายดังนี้ น้ำปริมาตร 5.6 ไมโครลิตร multiplex PCR NZYTaq 2x Colourless Master Mix (NZYTech, Portugal) ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล ปริมาตร 0.9 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุทธิ 0.3 ไมโครโมล) และดีเอ็นเอ

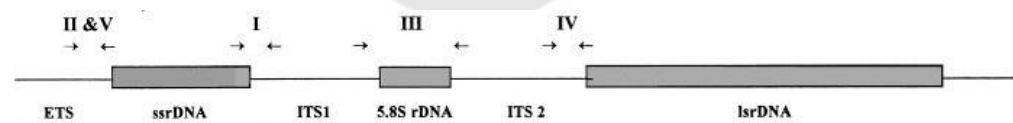
1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 25 รอบ ประกอบด้วย pre- denaturation 95 °C เวลา 10 นาที denaturation 94 °C เวลา 30 วินาที annealing 69.5 °C เวลา 30 วินาที extension 72 °C เวลา 10 วินาที และ final extension 72 °C เวลา 8 นาที ซึ่งสามารถพัฒนาปฏิกิริยาสำหรับการตรวจ โพรโทซัวทั้ง 3 ชนิดนี้พร้อมกันได้สำเร็จและไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (Bartolomé et al., 2018)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่า multiplex PCR สามารถใช้ตรวจสอบการ ติดพยาธิในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันออกจากกันได้ ภายใต้การปรับปฏิกิริยาให้ เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่ให้ไม่มีการรบกวนกันระหว่างการทำปฏิกิริยา และสามารถใส่จำแนก พยาธิหลายชนิดได้พร้อมกันอย่างแม่นยำ แต่ทั้งนี้พบว่ายังไม่มีรายงานการนำเทคนิค multiplex PCR ไปใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้ในมูลสัตว์ ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้ จึงได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR มาใช้ในการระบุชนิดพยาธิใบไม้ในกลุ่มดังกล่าว ด้วยการ ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากยีนบนไมโทคอนเดรียเพื่อให้จำเพาะต่อชนิดของพยาธิระยะตัวเต็ม วัยที่พบในการศึกษา และนำไปใช้ระบุชนิดของไข่พยาธิใบไม้ที่ปะปนอยู่ในมูลสัตว์ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และแม่นยำ



ภาพประกอบ 19 แผนภาพขั้นตอนเทคนิค multiplex PCR

ที่มา: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html



ภาพประกอบ 20 ตำแหน่งการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

I = *Ostertagia ostertagi* II = *Haemonchus placei* III = *Oesophagostomum radiatum*

IV = *Trichostrongylus colubriformis* V = *Cooperia oncophora*

ที่มา: (Zarlenga et al., 2001)

2.6. ยีนบนไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว

ในงานวิจัยได้เลือกใช้ยีนบนไมโทคอนเดรียเป็นยีนเป้าหมายสำหรับการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว ด้วยเทคนิค multiplex PCR เนื่องจากดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียมีความคงทนสูงและถูกทำลายโดยสภาพแวดล้อมได้ยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในนิวเคลียส (nuclear gene) ซึ่งในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะนั้น จำเป็นต้องใช้ยีนที่มีความอนุรักษ์และความยาวที่มากพอเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาที่มีขนาดแตกต่างกันและสามารถแยกชนิดของพยาธิออกจากกันได้อย่างชัดเจน จากการสืบค้นฐานข้อมูล GenBank พบการรายงานยีนบนไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วที่เป็น mitochondrion complete genome หลายชนิด ได้แก่ *Calicophoron microbothrioides* (KR337555.1), *Explanatum explanatum* (KT198989.1), *Gastrothylax crumenife* (KM400624.1), *Orthocoelium streptocoelium* (KM659177.1), *Paramphistomum cervi* (KT198987.1), *Fischoederius elongatus* (KM397348.1) และ *Fischoederius cobboldi* (KX169164.1) ซึ่งมีรูปแบบการจัดเรียงของจีโนมเป็นแบบ circular (Yang et al., 2015) ดังภาพประกอบ 21 และเมื่อศึกษารายละเอียดของตำแหน่งและความยาวของแต่ละยีน จะเห็นได้ว่ายีนที่มีความยาวสูงสุด 6 อันดับแรก ได้แก่ *ND5*, *COX1*, *ND4*, *CYTB*, *ND1* และ *ND2* ตามลำดับ ดังตาราง 2 สำหรับการศึกษาคความอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดตามการรายงานของ Simon และคณะ ในปี ค.ศ. 1994 พบว่ายีนบนไมโทคอนเดรียที่มีความอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนสูงสุด 6 อันดับแรก ได้แก่ *COX1*, *COX2*, *COX3*, *CYTB*, *ND1* และ *ND4* (Simon et al., 1994) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกยีนที่มีความยาวและบริเวณอนุรักษ์สูงสุด 4 ยีน เพื่อใช้เป็นยีนเป้าหมายในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ ได้แก่ *COX1*, *CYTB*, *ND1* และ *ND4* จากนั้นศึกษาบริเวณอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ยีน พบว่าแต่ละยีนมีบริเวณอนุรักษ์ในหลายตำแหน่ง ซึ่งตำแหน่งอนุรักษ์ดังกล่าวนี้สามารถใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่เป็นเป้าหมายให้ได้ขนาดที่ยาวที่สุด โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะใช้เป็นต้นแบบสำหรับการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อระบุชนิดของพยาธิในวงศ์ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วในลำดับต่อไป ทั้งนี้ยีนทั้ง 4 ยีนมีคุณสมบัติและสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการติดพยาธิด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.6.1. Cytochrome C Oxidase subunit I (COX1)

เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน cytochrome c oxidase ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการทำงานในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ โดย *COX1* เป็นหนึ่งใน 3 หน่วยย่อย (subunit) ที่ทำหน้าที่เป็น functional core ของ enzyme complex ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอน

(electrons transporting chain) ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนโมเลกุลของออกซิเจนให้กลายเป็นโมเลกุลน้ำ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ mitochondrial membrane potential และเกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนต่อไปจนเกิดการสร้าง ATP โดย COX1 เป็นยีนที่ได้รับความนิยมในการใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจสอบและจัดกลุ่มของพยาธิใบไม้หลายชนิด เช่น ในปี ค.ศ. 2013 Martinez-Ibeas และคณะได้ทำการจำแนกพยาธิใบไม้ชนิด *Calicophoron daubneyi* และ *Fasciola hepatica* ออกจากกัน โดยอาศัยลำดับที่จำเพาะในบริเวณยีน COX1 โดยใช้ forward primer (5'-TGGAGAGTTTGGC GTCTTTT-3') และ reverse primer (5'-CCATCTTCCACC TCATCTGG-3') สำหรับพยาธิเป้าหมายชนิด *C. daubneyi* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ขนาด 885 คู่เบส และ forward primer (5'-GCCGGGTCCTCAACATAATA-3') และ reverse primer (5'-AGCACAAAATCCTGATCTTA CCA-3') สำหรับพยาธิเป้าหมายชนิด *F. hepatica* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ขนาด 425 คู่เบส และทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิ 4 ชนิด ได้แก่ *Cotylophoron cotylophorum*, *Cotylophoron batycotyle*, *Calicophoron Calicophorum* และ *Dicrocoelium dendriticum* ซึ่งผลการทดสอบพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิใบไม้ที่นำมาทดสอบ (Martinez-Ibeas et al., 2013) ถัดมาในปี ค.ศ. 2014 Wannasan และคณะได้ใช้ยีน COX1 ร่วมกับยีน ND1 และบริเวณ ITS2 ในการแยกชนิดของพยาธิใบไม้ที่เป็น hybrid ระหว่าง *Fasciola hepatica* และ *F. gigantica* ในประเทศไทยออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างเพียงเล็กน้อยในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้เกิดการแยกสายวิวัฒนาการออกจากกันระหว่างพยาธิที่เป็น hybrid กับ wildtype (Wannasan et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ COX1 ในการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ เช่น *Fasciola hepatica* (Walker et al., 2007), *Opisthorchis viverrini* (Buathong et al., 2015), *Haplorchis taichui* (Thaenkham et al., 2017), *Clonorchis sinensis*, *Haplorchis pumilio* และ *Centrocestus formosanus* (Van De & Le, 2011) เป็นต้น

2.6.2. Cytochrome B (CYTB)

ทำหน้าที่สร้างโปรตีน cytochrome B ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นองค์ประกอบสำคัญของ complex 3 ของกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และเป็นหน่วยย่อยหลักของเอนไซม์ ubiquinol-cytochrome c reductase โดยเอนไซม์ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการ proton pumping ซึ่งส่งผลให้เกิด proton motive force โดยยีน *CYTB* พบการรายงานในการตรวจสอบและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น Barakat และคณะ ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะบริเวณยีน *CYTB* ของสุกร (*Sus scrofa*) นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเนื้อสุกรในอาหารฮาลาล เนื่องจากยีนนี้มีความคงทนสูงและสามารถเพิ่มปริมาณได้

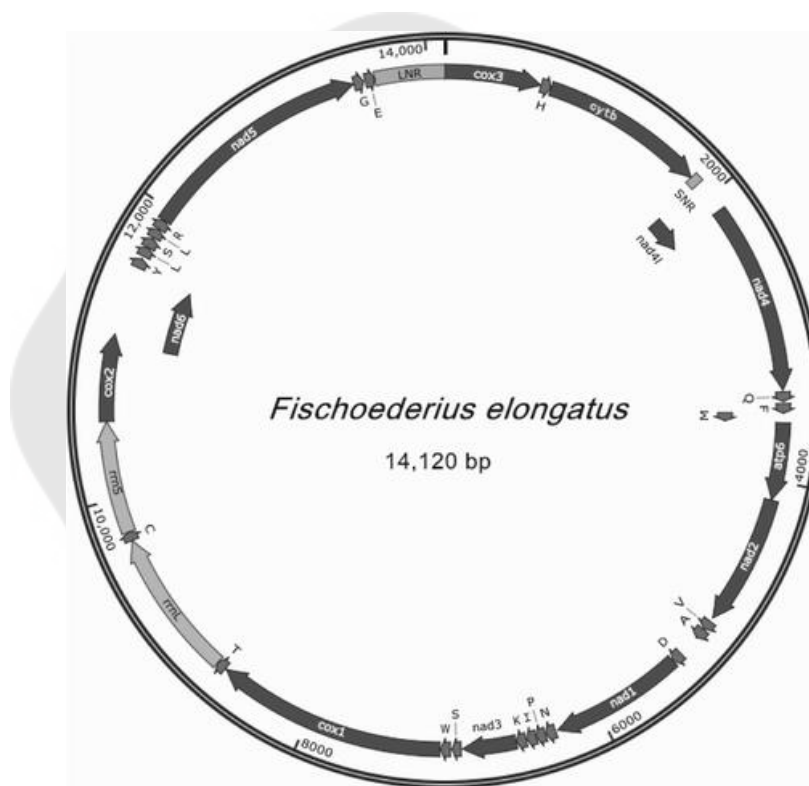
โดยง่าย แม้ว่าอาหารจะผ่านกระบวนการแปรรูปแล้ว (processed food) (Barakat, El-Garhy, & Moustafa, 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ระบุนิตของปรสิตอีกหลายกลุ่ม เช่น ในปี 2016 Wang และคณะได้ใช้ข้อมูลของยีน *CYTb* ร่วมกับ *COX1* ในเทคนิค PCR เพื่อทำการแยกชนิดของพยาธิตัวดีด *Taenia asiatica* ออกจาก *T. saginata* ด้วยโปรแกรม BLAST โดยผลการตรวจสอบพบว่ายีน *CYTb* ที่ใช้เป็นเป้าหมายแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. asiatica* กับฐานข้อมูลถึงร้อยละ 99 และร้อยละ *T. saginata* 96 ตามลำดับ (Wang et al., 2016) นอกจากนี้ยีน *CYTb* ยังถูกใช้เป็นเป้าหมายในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *Echinostoma revolutum* (Anucherngchai, Chontanarath, Tejangkura, & Chai, 2019), พยาธิใบไม้ตับชนิด *Fasciola gigantica* (Chontanarath & Parawat, 2019), โพรโทซัวในเลือด *Babesia* spp. (Y. Yang, Li, Wang, Chen, & Du, 2016), Haemosporidian รวมไปถึงพยาธิตัวกลมในหลอดอาหารของสุนัขชนิด *Spirocerca lupi* (Rojas, Segev, Markovics, Aroch, & Baneth, 2017)

2.6.3. NADH Dehydrogenase subunit 1 (ND1)

สร้างหนึ่งในหน่วยย่อยหลัก (core subunit) ของโปรตีน NADH dehydrogenase ทำหน้าที่ในการถ่ายเทอิเล็กตรอนจาก NADH ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ โดยรับอิเล็กตรอนจาก $\text{NADH} + \text{H}^+$ เพื่อทำให้เกิด electro-chemical gradient และส่งอิเล็กตรอนผ่านเข้าไปใน inner membrane ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งยีน *ND1* ได้ถูกใช้เป็นเป้าหมายในการระบุชนิดของพยาธิทางอณูชีววิทยา เช่น ในปี ค.ศ. 2004 Morozova และคณะ ได้ทำการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola hepatica* โดยใช้ยีน *COX1* ร่วมกับ *ND1* และได้สร้าง haplotype เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของพยาธิชนิดดังกล่าวในประเทศยูเครน เบลารุส มอสโก และมอร์โดเวีย (Morozova, Chrisanfova, Arkhipov, & Semyenova, 2004) ในปี ค.ศ. 2016 Chamuah และคณะได้ใช้ยีน *ND1* ร่วมกับ *28S rDNA* และ *ITS2* ในการระบุชนิดของพยาธิใบไม้ *Explanatum explanatum*, *Paramphistomum epiclitum*, *Calicophoron calicophorum* พยาธิตัวดีดชนิด *Echinococcus granulosus* และ *E. ortleppi* จาก *Bos frontalis* ในประเทศอินเดีย โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 1 คู่ ต่อพยาธิ 1 ชนิด (Chamuah et al., 2016) และในปี ค.ศ. 2017 Mohanta และคณะได้ใช้ยีน *ND1* ในการจำแนกพยาธิชนิด *Explanatum explanatum* ในประเทศเนปาลและบังกลาเทศออกจากกัน โดยอาศัยการสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพยาธิที่มาจกต่างแหล่งกัน (Mohanta, Rana, Devkota, & Itagaki, 2017)

2.6.4. NADH Dehydrogenase subunit 4 (ND4)

เป็นหนึ่งในหน่วยย่อยหลักของโปรตีน NADH dehydrogenase ทำหน้าที่ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก NADH ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ สำหรับการประยุกต์ใช้ยีน ND4 ในการตรวจสอบและระบุชนิดของพยาธิด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา มีการรายงานการใช้เพื่อระบุชนิดและจัดกลุ่มของพยาธิใบไม้ในตับ *Fasciola hepatica* ในประเทศไอร์แลนด์และเนเธอร์แลนด์ โดยการสร้าง haplotype เพื่อใช้แยกพยาธิ *F. hepatica* ที่มาจากสองประเทศนี้ออกจากกัน (Walker et al., 2007)



ภาพประกอบ 21 ไมโทคอนเดรียจีโนมของ *Fascioederius elongatus* (KM397348.1)

ที่มา: (Yang et al., 2015)

ตาราง 2 ไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ในกระเพาะปัสสาวะ

ชนิด	<i>Calicophoron microbothrioides</i>	<i>Explanatum explanatum</i>	<i>Orthocoelium streptocoelium</i>	<i>Paramphistomum cervi</i>	<i>Fiscoederius elongatus</i>	<i>Fiscoederius cobboldi</i>
Accession No.	KR337555.1	KT198989.1	KM659177.1	KT198987.1	KM397348.1	KX169164.1
ความยาว (bp)	14,028	13,968	13800	14,023	14,120	14,256
Cox3	ตำแหน่ง	1..645	1..645	1..645	1..645	1..645
	ความยาว	645	645	645	645	645
tRNA-His	ตำแหน่ง	653..719	647..714	647..714	647..715	650..714
	ความยาว	66	67	67	68	64
CYTB	ตำแหน่ง	720..1835	718..1830	716..1828	720..1832	717..1829
	ความยาว	1,115	1,112	1,112	1,112	1,112
NAD4L	ตำแหน่ง	1900..2163	1890..2153	1894..2157	1891..2154	1893..2156
	ความยาว	263	245	263	263	263
NAD4	ตำแหน่ง	2124..3404	2114..3394	2118..3398	2115..3395	2117..3397
	ความยาว	1,280	1,504	1,280	1,280	1,280
tRNA-Gln	ตำแหน่ง	3406..3471	3398..3460	3405..3468	3398..3462	3409..3474
	ความยาว	65	62	63	64	65
tRNA-Phe	ตำแหน่ง	3496..3560	3488..3554	3494..3557	3489..3553	3485..3549
	ความยาว	64	64	63	64	66
tRNA-Met	ตำแหน่ง	3561..3625	3555..3616	3558..3621	3553..3615	3549..3612
	ความยาว	64	61	63	62	63
ATP6	ตำแหน่ง	3626..4141	3619..4134	3621..4136	3616..4131	3613..4128
	ความยาว	515	515	515	515	515
NAD2	ตำแหน่ง	4149..5021	4139..5014	4159..5016	4139..5011	4133..5008
	ความยาว	872	875	857	872	875
tRNA-Val	ตำแหน่ง	5066..5130	5033..5099	5022..5084	5014..5077	5039..5102
	ความยาว	64	66	62	63	63
tRNA-Ala	ตำแหน่ง	5140..5210	5104..5173	5088..5156	5085..5154	5109..5179
	ความยาว	70	69	68	69	70
tRNA-Asp	ตำแหน่ง	5217..5284	5180..5242	5167..5231	5165..5229	5328..5397
	ความยาว	67	62	64	64	69
NAD1	ตำแหน่ง	5288..6184	5246..6142	5234..6130	5233..6129	5400..6296
	ความยาว	896	896	896	896	896
tRNA-Asn	ตำแหน่ง	6195..6261	6151..6217	6153..6219	6142..6207	6314..6379
	ความยาว	66	66	66	65	65
tRNA-Pro	ตำแหน่ง	6262..6329	6218..6273	6224..6286	6208..6270	6384..6447
	ความยาว	67	55	62	65	63
tRNA-Ile	ตำแหน่ง	6328..6390	6274..6334	6287..6351	6272..6334	6449..6511
	ความยาว	62	60	64	62	62
tRNA-Lys	ตำแหน่ง	6396..6461	6343..6408	6356..6419	6344..6409	6518..6582
	ความยาว	65	65	63	65	64
NAD3	ตำแหน่ง	6463..6819	6409..6765	6419..6774	6410..6766	6587..6943
	ความยาว	356	356	355	356	356
tRNA-Ser	ตำแหน่ง	6828..6886	6788..6849	6788..6846	6785..6843	6955..7014
	ความยาว	58	61	58	58	59

ตาราง 2 (ต่อ)

ชนิด	<i>Calicophoron microbothrioides</i>	<i>Explanatum explanatum</i>	<i>Orthocoelium streptocoelium</i>	<i>Paramphistomum cervi</i>	<i>Fiscoederius elongatus</i>	<i>Fiscoederius cobboldi</i>	
Accession No.	KR337555.1	KT198989.1	KM659177.1	KT198987.1	KM397348.1	KX169164.1	
tRNA-Trp	ตำแหน่ง	6899..6962	6858..6921	6853..6918	6853..6915	7027..7091	7161..7227
	ความยาว	63	63	65	62	64	66
COX1	ตำแหน่ง	6966..8507	6925..8466	6921..8462	6916..8460	7095..8636	7230..8771
	ความยาว	1,541	1,541	1,541	1,544	1,541	1,541
tRNA-Thr	ตำแหน่ง	8519..8580	8483..8544	8472..8537	8470..8534	8646..8709	8783..8842
	ความยาว	61	61	65	64	63	59
16S RNA	ตำแหน่ง	8581..9574	8545..9533	8536..9536	8535..9520	8710..9704	8843..9839
	ความยาว	993	988	1,000	985	994	996
tRNA-Cys	ตำแหน่ง	9575..9643	9534..9599	9538..9601	9527..9586	9707..9767	9840..9903
	ความยาว	68	65	63	59	60	63
12S RNA	ตำแหน่ง	9645..10395	9602..10353	9598..10358	9592..10340	9768..10518	9906..10655
	ความยาว	750	751	760	748	750	749
COX2	ตำแหน่ง	10396..10980	10354..10935	10359..10940	10341..10919	10519..11100	10656..11237
	ความยาว	584	581	581	578	581	581
NAD6	ตำแหน่ง	10974..11426	10929..11381	10934..11386	10920..11372	11046..11546	11231..11683
	ความยาว	452	452	452	452	500	452
tRNA-Tyr	ตำแหน่ง	11449..11512	11397..11461	11402..11468	11389..11455	11568..11632	11702..11766
	ความยาว	63	64	66	66	64	64
tRNA-Leu	ตำแหน่ง	11526..11590	11471..11536	11502..11565	11470..11536	11652..11715	11775..11838
	ความยาว	64	65	63	66	63	63
tRNA-Ser	ตำแหน่ง	11588..11659	11534..11604	11564..11635	11538..11609	11717..11785	11836..11906
	ความยาว	71	70	71	71	68	70
tRNA-Leu	ตำแหน่ง	11680..11746	11618..11684	11652..11716	11646..11710	11792..11856	11931..11997
	ความยาว	66	66	64	64	64	66
tRNA-Arg	ตำแหน่ง	11748..11814	11686..11752	11721..11789	11713..11778	11860..11925	11999..12066
	ความยาว	66	66	68	65	65	67
NAD5	ตำแหน่ง	11815..13395	11753..13333	11790..13370	11779..13359	11926..13506	12067..13644
	ความยาว	1,580	1,580	1,580	1,580	1,580	1,577
tRNA-Gly	ตำแหน่ง	13401..13474	13337..13407	13372..13443	13364..13433	13510..13574	13652..13718
	ความยาว	73	70	71	69	64	66
tRNA-Glu	ตำแหน่ง	13499..13568	13424..13492	13494..13555	13448..13513	13587..13651	13723..13791
	ความยาว	69	68	61	65	64	64

ตาราง 3 ร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกัน

Gene	<i>D.melanogaster-D. yakuba</i>	human-cow	<i>Apis-Drosophila</i>	<i>Drosophila-locust</i>	<i>Xenopus-human</i>	sea star-sea urchin	human-sea urchin	mouse- <i>Drosophila</i>	<i>Drosophila-nematode</i>	mouse-nematode
COX1	99	91	70	82	86	89	75	75	62	59
COX2	98	73	55	66	68	81	61	57	39	39
COX3	98	87	53	73	80	76	62	64	47	43
CYTB	96	79	53	76	71	-	62	68	43	42
ND1	96	78	47	68	63	67	55	45	36	35
ND4	95	74	45	58	59	-	43	42	30	28
ND3	95	74	49	62	58	67	48	43	30	25
ND5	89	70	42	64	55	-	44	49	31	25
ND4L	99	74	37	51	40	67	34	36	27	21
A6	96	78	47	73	53	69	37	34	22	22
ND2	94	63	27	47	50	57	39	34	17	21
A8	96	52	46	41	30	44	21	26	NF	NF
ND6	91	63	31	45	34	-	30	17	19	13

ที่มา: (Simon et al., 1994)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1. ภาชนะเก็บตัวอย่างมูลสัตว์
2. ไม้ตักมูลสัตว์
3. ผ้าก๊อซ (gauze pad)
4. กรวยกรอง (funnel)
5. ตู้ดูดควัน (hood)
6. เครื่องชั่งน้ำหนัก
7. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
8. เครื่องนึ่งไอน้ำ (autoclave)
9. เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
10. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome)
11. ตู้อบ (oven)
12. กรอบพลาสติก (embedding ring)
13. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
14. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)
15. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound light microscope)
16. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)
17. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

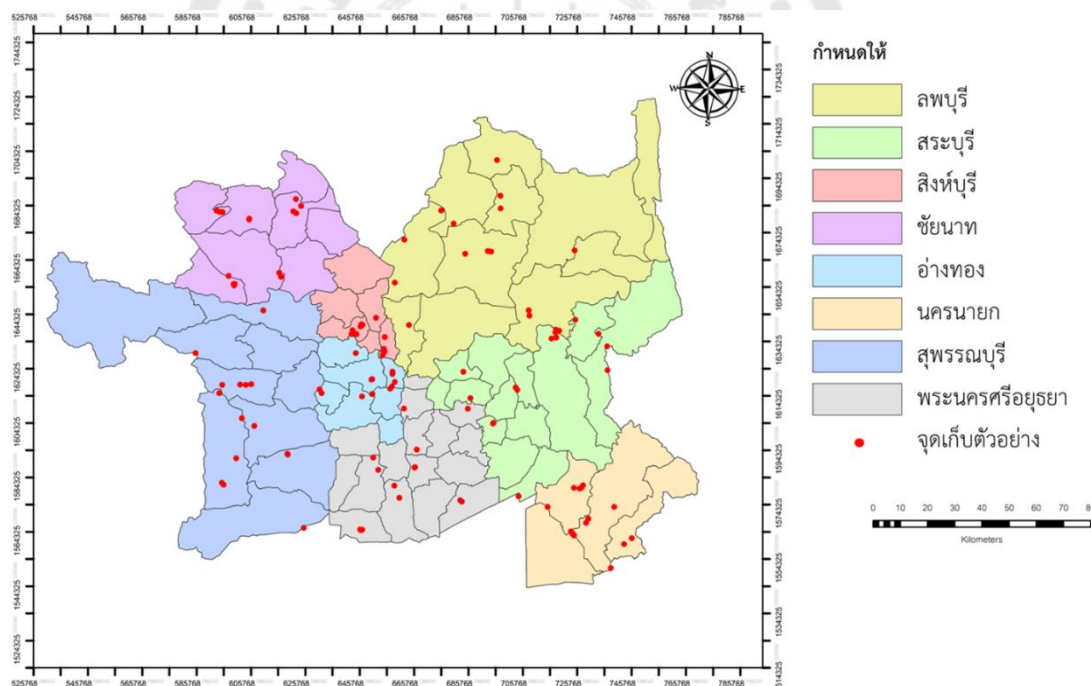
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. formalin
2. diethyl ether
3. haematoxylin
4. ethyl alcohol
5. butyl alcohol
6. xylene
7. permount
8. eosin
9. bouin
10. paraffin
11. agarose powder
12. phosphate-buffered saline (PBS)
13. *Taq* polymerase (Vivantis, Malaysia)
14. $MgCl_2$ (Vivantis, Malaysia)
15. PCR Buffer A (Vivantis, Malaysia)
16. oligonucleotide primer
17. SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)
18. deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Vivantis, Malaysia)
19. ชุดสกัด QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany)
20. ชุดสกัด DNA NucleoSpin® Tissue (MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG)

3.1. สัตว์ทดลองและพื้นที่ศึกษา

3.1.1. การเก็บตัวอย่างมูลโคและกระบือ

เก็บตัวอย่างมูลโคและกระบือจากบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงโคและกระบือใน 8 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ชัยนาท อ่างทอง สุพรรณบุรี สระบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี และนครนายก ดังภาพประกอบ 22 สุ่มเก็บตัวอย่างด้วยวิธี convenience sampling (Acharya, Prakash, Saxena, & Nigam, 2013) เก็บตัวอย่างมูลสัตว์โดยใช้ไม้ตักลงในกระปุกเก็บตัวอย่าง ทำการจดบันทึกวัน สถานที่ และพิกัดทางภูมิศาสตร์โดยใช้แอปพลิเคชัน GPS essentials (freeware) บันทึกในหน่วย UTM เพื่อนำไปสร้างแผนที่การระบาดของพยาธิในมูลสัตว์ ตัวอย่างมูลสัตว์ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรักษาสภาพมูลสัตว์ไม่ให้เกิดการเน่าเสีย และนำไปวินิจฉัยการติดพยาธิด้วยวิธี formalin-ether sedimentation ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้



ภาพประกอบ 22 แผนที่จุดเก็บตัวอย่างมูลสัตว์จากแหล่งเพาะเลี้ยงโคและกระบือ
8 จังหวัดภาคกลางในประเทศไทย

3.1.2. การเก็บตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัย

ตัวอย่างพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีชนิด *Carmyerius spatiosus*, *Fischoederius elongatus*, *Orthocoelium dicranocoelium* และ *Paramphistomum epiclitum* เก็บจากกระเพาะผ้าชีวรีของโคและกระบือจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดปทุมธานี ดังภาพประกอบ 23 นำมาศึกษาลักษณะพื้นฐานด้วยวิธีการทำสไลด์ถาวรร่วมกับการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง rotary microtome ทำการจัดจำแนกและระบุชนิดตัวอย่างพยาธิที่พบด้วยอนุกรมวิธาน (taxonomic key) ของ Yamaguti (Yamaguti, 1958), Eduardo (Eduardo, 1982a, 1982b, 1983, 1984, 1985) และ Sey (Sey, 2019) และเก็บตัวอย่างพยาธิที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้กลุ่มดังกล่าว ได้แก่ พยาธิใบไม้ชนิด *Fasciola gigantica* จากตับโคในจังหวัดเชียงใหม่ และพยาธิใบไม้ชนิด *Gastrothylax crumenifer* จากกระเพาะผ้าชีวรีกระบือในจังหวัดปทุมธานี



ก.

ข.

ภาพประกอบ 23 การเก็บตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัย

ก. กระเพาะผ้าชีวรีของกระบือ ข. พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีของกระบือ

3.2. การตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลโคและกระบือด้วยวิธี

formalin-ether sedimentation

ชั่งมูลสัตว์น้ำหนัก 1 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยมูลสัตว์ด้วย formalin ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปกรองผ่านผ้าก๊อช 2 ชั้น ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เทส่วนของเหลวทิ้ง (supernatant) จากนั้นเติม formalin ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนภายในหลอดทดลองเป็นเนื้อเดียวกันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย diethyl ether ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงประมาณ 15 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเวลา 2

นาที่ ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm (Anuar et al., 2013) ได้สารละลายแยกออกเป็น 4 ชั้น ดังภาพประกอบ 24 ดังนี้

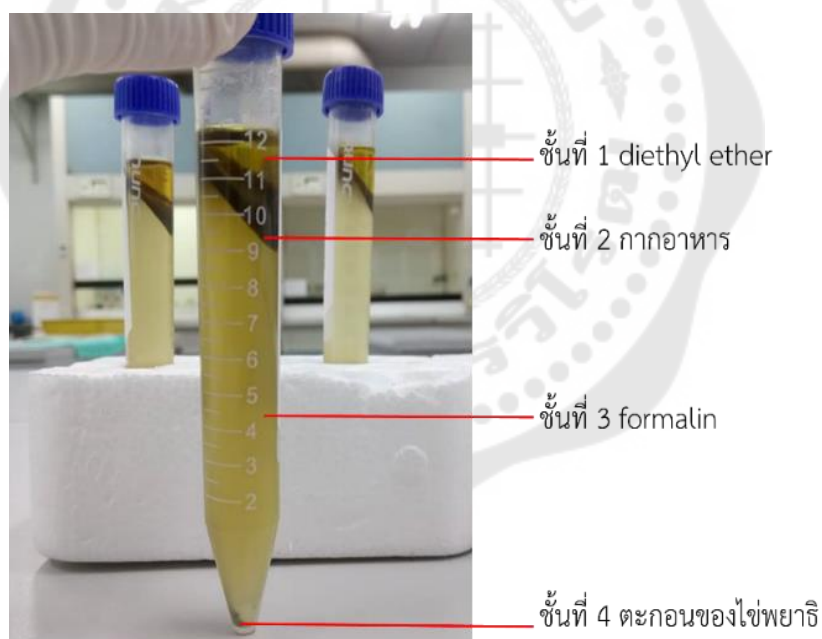
ชั้นที่ 1 คือ diethyl ether

ชั้นที่ 2 คือ กากอาหาร

ชั้นที่ 3 คือ formalin

ชั้นที่ 4 คือ ตะกอนที่อาจมีไข่พยาธิปนอยู่

เทชั้นที่ 1-3 ทั้ง นำตะกอนชั้นที่ 4 ไปตรวจหาการปนเปื้อนของไข่พยาธิในมูลสัตว์ หยดตัวอย่างลงบนแผ่นกระจกสไลด์ ตรวจสอบการติดพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ถ่ายรูปตัวอย่างไข่ที่พบ และเก็บไข่พยาธิไว้ใน ethyl alcohol ความเข้มข้น 95% สำหรับใช้ในการสกัด DNA ในลำดับต่อไป รายงานผลการตรวจไข่พยาธิที่พบด้วยค่าปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัม (egg per gram หรือ EPG)



ภาพประกอบ 24 การตกตะกอนตัวอย่างมูลสัตว์ด้วยวิธี

formalin-ether sedimentation technique

3.3. ความชุกและการสร้างแผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะพำชีรีว

จากผลการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะพำชีรีวในมูลโคและกระบือด้วยวิธี formalin-ether sedimentation นำมาคำนวณค่าความชุก (prevalence) ของการติดเชื้อ โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

สูตรคำนวณ

$$\text{ค่าความชุก (\%)} = \frac{\text{จำนวนโฮสต์ที่ตรวจพบพยาธิ (ตัว)}}{\text{จำนวนโฮสต์ทั้งหมดที่ทำการตรวจ (ตัว)}} \times 100$$

จากนั้นสร้างแผนที่การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะพำชีรีวในพื้นที่เพาะเลี้ยงโคและกระบือใน 8 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ชัยนาท อ่างทอง สุพรรณบุรี สระบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี และนครนายก ด้วยโปรแกรม Qgis 2.18.3 (freeware)

3.4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิระยะตัวเต็มวัย

เนื่องจากพยาธิใบไม้ในกระเพาะพำชีรีวมีลักษณะภายในและภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาลักษณะสัณฐานอย่างละเอียดโดยแบ่งเป็น 2 วิธีหลักคือ 1) วิธีการทำสไลด์ถาวร เพื่อศึกษาลักษณะ ขนาดและการตำแหน่งจัดเรียงตัวของอวัยวะภายใน และ 2) การศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาดและการจัดเรียงตัวของอวัยวะภายใน โดยอาศัยเทคนิคการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง rotary microtome โดยทั้ง 2 มีขั้นตอนดังนี้

3.4.1. วิธีการทำสไลด์ถาวร

นำตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัยวางลงบนแผ่นกระจกสไลด์ปิดทับด้วยแผ่นปิดกระจกสไลด์ กดทับให้แบนแล้วใช้ด้ายยึดตัวอย่าง คงสภาพตัวอย่างใน formalin ความเข้มข้น 4% เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ จากนั้นล้าง formalin ออกด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง formalin ออกจากตัวอย่างหมด ย้อมสีตัวอย่างด้วย Haematoxylin และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ตัวอย่างที่ผ่านการย้อมสีจะถูกตั้งน้ำออกด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80% และ 95% ตามลำดับ ตามด้วย ethyl alcohol:butyl alcohol อัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 ตามลำดับ จากนั้นทำตัวอย่างให้ใสด้วย xylene และปิดทับตัวอย่างที่เสร็จสิ้นกระบวนการแล้วด้วยสารละลาย permount วางให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 40 °C นำสไลด์ถาวรที่ได้ไปศึกษาขนาด รูปร่าง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.4.2. การตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง rotary microtome

คงสภาพตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัยด้วย bouin fixative เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ จากนั้นล้างตัวอย่างพยาธิด้วยน้ำสะอาด และดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 50%, 70%, 80% และ 95% ตามลำดับ ตามด้วย butyl alcohol และ xylene จากนั้นแทรก paraffin เข้าตัวอย่าง โดยใช้ xylene : paraffin อัตราส่วน 1:1 ตามด้วย liquid paraffin (อุณหภูมิ 60 °C) ทิ้งให้แข็งตัวในกรอบพลาสติก และนำเข้าเครื่อง rotary microtome เพื่อตัดชิ้นเนื้อ ขนาด 20-30 ไมโครเมตร ตัวอย่างพยาธิที่ถูกตัดจะนำไปติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ โดยใช้น้ำไขขาวเป็นตัวยึดเกาะ ทิ้งสไลด์ให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40 °C เพื่อให้ชิ้นเนื้อยึดตัวเต็มที่ และอบสไลด์ให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 °C

ตัวอย่างสไลด์ที่แห้งเรียบร้อยแล้วจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการย้อมสีตัวอย่างชิ้นเนื้อ ทำได้โดยล้าง paraffin ออกจากตัวอย่างด้วย xylene ตามด้วย xylene : butyl alcohol อัตราส่วน 1:1 ตามด้วย butyl alcohol และ ethyl alcohol ความเข้มข้น 95%, 80% และ 70% ตามลำดับ ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นก่อนย้อมสี haematoxylin จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง และดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 70%, 80% และ 95% ตามลำดับ ย้อมสีตัวอย่างซ้ำด้วย eosin ความเข้มข้น 0.1% และล้างสีส่วนเกินออกด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 95% ตามด้วย butyl alcohol ทำตัวอย่างให้ใสด้วย butyl alcohol : xylene อัตราส่วน 1:1 และ xylene จากนั้นผนึกตัวอย่างลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยสารละลาย permount ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ วางสไลด์ให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์และนำมาศึกษาขนาด รูปร่าง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.5. การสกัดดีเอ็นเอ

3.5.1. การสกัดดีเอ็นเอพยาธิระยะตัวเต็มวัย

นำพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่คงสภาพไว้ใน ethyl alcohol ความเข้มข้น 95% มาทำการสกัด ดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Tissue โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติม buffer T1 และ proteinase K ปริมาตร 180 และ 25 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีชิ้นเนื้อของพยาธิ แล้วเติม buffer T1 และ proteinase K ปริมาตร 180 และ 25 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เวลา 1-3 ชั่วโมง จากนั้นเติม buffer B3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เวลา 10 นาที แล้วเติม absolute ethanol ปริมาตร 210 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน NucleoSpin® Tissue Column แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 11,000 x g เวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายใน collection tube

และเติม buffer BW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เวลา 1 นาที ที่ทิ้งสารละลายใน collection tube และเติม buffer B5 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เวลา 1 นาที ที่ทิ้งสารละลายใน collection tube และปั่นเหวี่ยงซ้ำที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เวลา 3 นาที จากนั้นย้าย NucleoSpin® Tissue Column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer BE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 x g เวลา 3 นาที ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดแล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 °C

3.5.2. การสกัดดีเอ็นเอไข่มุกจากมูลสัตว์

การสกัดดีเอ็นเอไข่มุกจากมูลสัตว์ใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Stool Mini Kit โดยมีขั้นตอนดังนี้ ชั่งมูลสัตว์ขนาด 220 มิลลิกรัม ลง microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเพื่อให้มูลสัตว์แข็งตัว เติม buffer ASL ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร ลงไป เขย่า 1 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 2 นาที ดูดสารละลายปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube ใหม่ เติม InhibitEX tablet เขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 6 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน microcentrifuge tube ใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 6 นาที จากนั้นดูดสารละลาย 200 ไมโครลิตร ลงใน proteinase K ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เติม buffer AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป ผสมสารให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เวลา 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดูดสารละลาย 600 ไมโครลิตร ลงใน QIAamp spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 2 นาที ที่ทิ้ง collection tube ที่มีสารละลาย และย้าย QIAamp spin column ลง collection tube ใหม่ จากนั้นเติม buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 2 นาที ที่ทิ้ง collection tube ที่มีสารละลาย และย้าย QIAamp spin column ลง collection tube ใหม่ จากนั้นเติม buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 6 นาที ที่ทิ้ง collection tube ที่มีสารละลาย และย้าย QIAamp spin column ลง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 6 นาที หรือจนกว่าแผ่น membrane แห้ง จากนั้นย้าย QIAamp spin column ลง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer ATE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เวลา 2 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดแล้วไว้ในอุณหภูมิ -20 °C

3.6. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน และการทดสอบด้วยเทคนิค PCR

สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนไมโทคอนเดรียจำนวน 4 ยีน ได้แก่ COX1, CYTB, ND1 และ ND4 จากฐานข้อมูล GenBank ของพยาธิ ได้แก่ *Calicophoron microbothrioides*, *Explanatum explanatum*, *Fischoederius cobboldi*, *F. elongatus*, *G. crumenifer*, *Orthocoelium streptocoelium*, *Paramphistomum cervi*, *F. gigantea* และ *F. hepatica* ดังตาราง 4 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงในโปรแกรม MEGA7 ออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ต่อ 1 ยีน เพื่อใช้เป็นเป้าหมายในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิที่พบในการศึกษา โดยใช้วิธี manual design ในการคัดเลือกตำแหน่ง จากนั้นทำการตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม OligoAnalyzer tools (<https://sg.idtdna.com/calc/analzyer>) ดังตาราง 5 ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ด้วยบริษัท Integrated DNA Technologies IDT โดยแต่ละคู่ของไพรเมอร์มีตำแหน่งดังภาพประกอบ 25-28 จากนั้นนำไพรเมอร์แต่ละคู่มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารเคมีดังตาราง 6 ตั้งค่าปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง thermo cycler มีขั้นตอนดังตาราง 7 ทำการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% นำขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท 1st BASE DNA Sequencing Services (Axil Scientific Pty. Ltd) จากนั้นตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะในลำดับต่อไป

ตาราง 4 ข้อมูลพยาธิที่ได้จากการสืบค้นฐานข้อมูล GenBank

หมายเลข อ้างอิง	ชนิดของพยาธิใบไม้	ความยาว (คู่เบส)			
		COX1	CYTB	ND1	ND4
KR337555.1	<i>Calicophoron microbothrioides</i>	1,541	1,115	896	1,280
KT198989.1	<i>Explanatum explanatum</i>	1,541	1,112	896	1,504
KX169164.1	<i>Fiscoederius cobboldi</i>	1,541	1,112	896	1,280
KM397348.1	<i>Fiscoederius elongatus</i>	1,541	1,112	896	1,280
KM400624.1	<i>Gastrothylax crumenifer</i>	1,541	1,112	902	1,280
KM659177.1	<i>Orthocoelium streptocoelium</i>	1,541	1,112	896	1,280
KT198987.1	<i>Paramphistomum cervi</i>	1,544	1,112	896	1,280
KF543342.1	<i>Fasciola gigantica</i>	1,541	1,112	902	1,268
AP017707.1	<i>Fasciola hepatica</i>	1,541	1,112	902	1,271

ตาราง 5 คุณสมบัติของไพรเมอร์สำหรับใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใบไม้ในกระเพาะ
ผ้าขี้ริ้ว

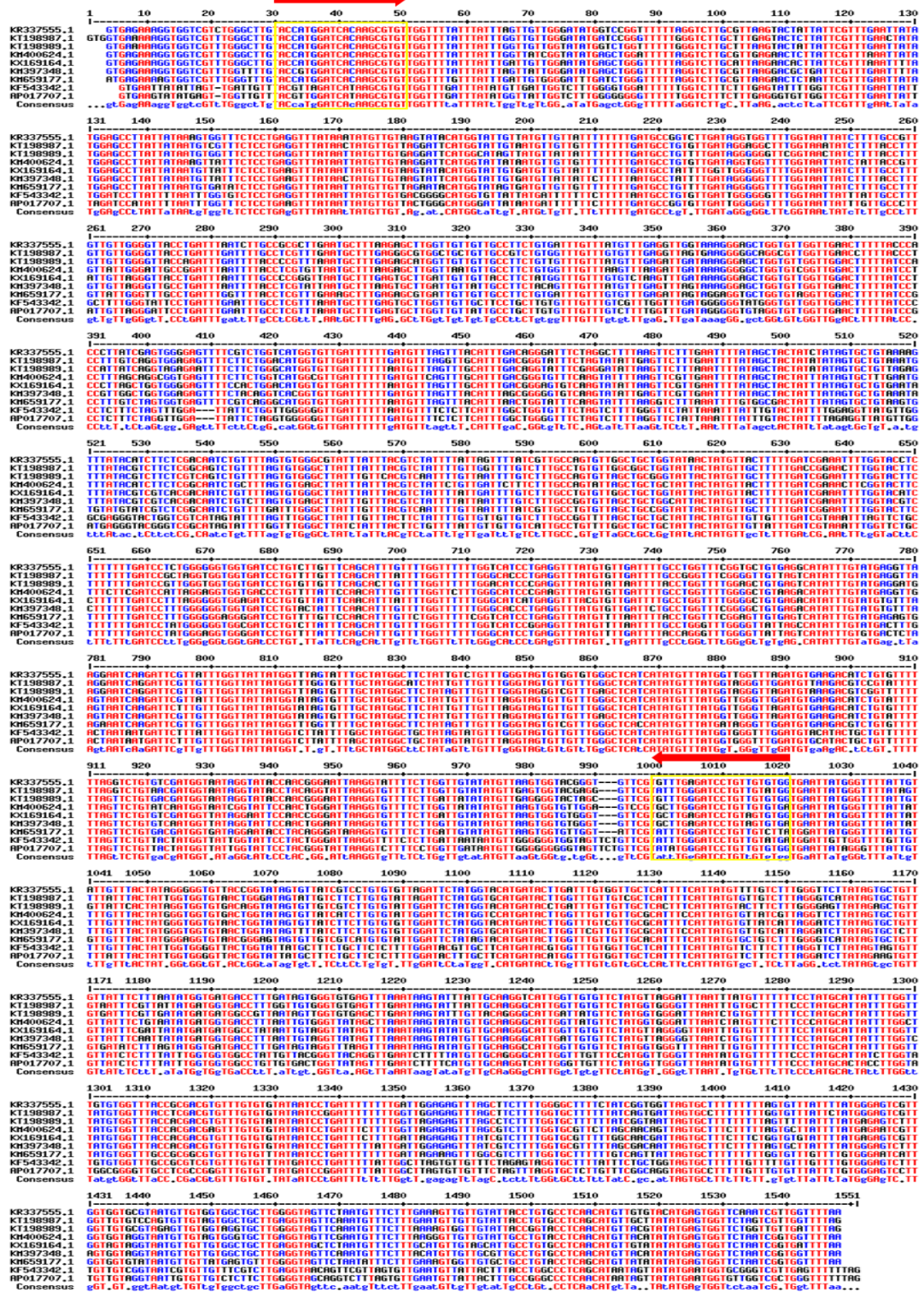
ยีน	ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ความยาว (mer)	GC content	T _m (°C)	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
COX1	Uni_COX1	forward	GAT CAC AAG CGT GTT GGT TT	20	45.0	53.9	989
		reverse	AAT TCA CCA CAC AAC AGG ATC	21	42.9	53.1	
CYTB	Uni_CYTB	forward	AAT GTT GTG GAT TTG CCT AC	20	40.0	51.0	976
		reverse	GGA TAC TCA GGA TGA CAA GC	20	50.0	52.5	
ND1	Uni_ND1	forward	GTT ATG TGC AAA TTC GGA AGG G	22	45.5	54.5	764
		reverse	CCA CAT AAA CCC CAC AAA ATA ATC	24	37.5	52.5	
ND4	Uni_ND4	forward	GAT TTA GGA AGT TTG ATT GAT AT	23	26.1	46.6	912
		reverse	AAA ATA AAA GTC ACA CCA GC	20	35.0	48.8	

ตาราง 6 สารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สาร	ความเข้มข้น	หน่วย	ปริมาตร	หน่วย
น้ำ	-	-	18.45	μL
ไพรมเมอร์	0.20	μM	0.50	μL
Buffer A	1.00	X	2.50	μL
MgCl_2	1.00	mM	0.50	μL
dNTPs	1.00	mM	1.25	μL
<i>Taq</i> polymerase	0.20	U	0.30	μL
template DNA	10.00	ng	1.00	μL

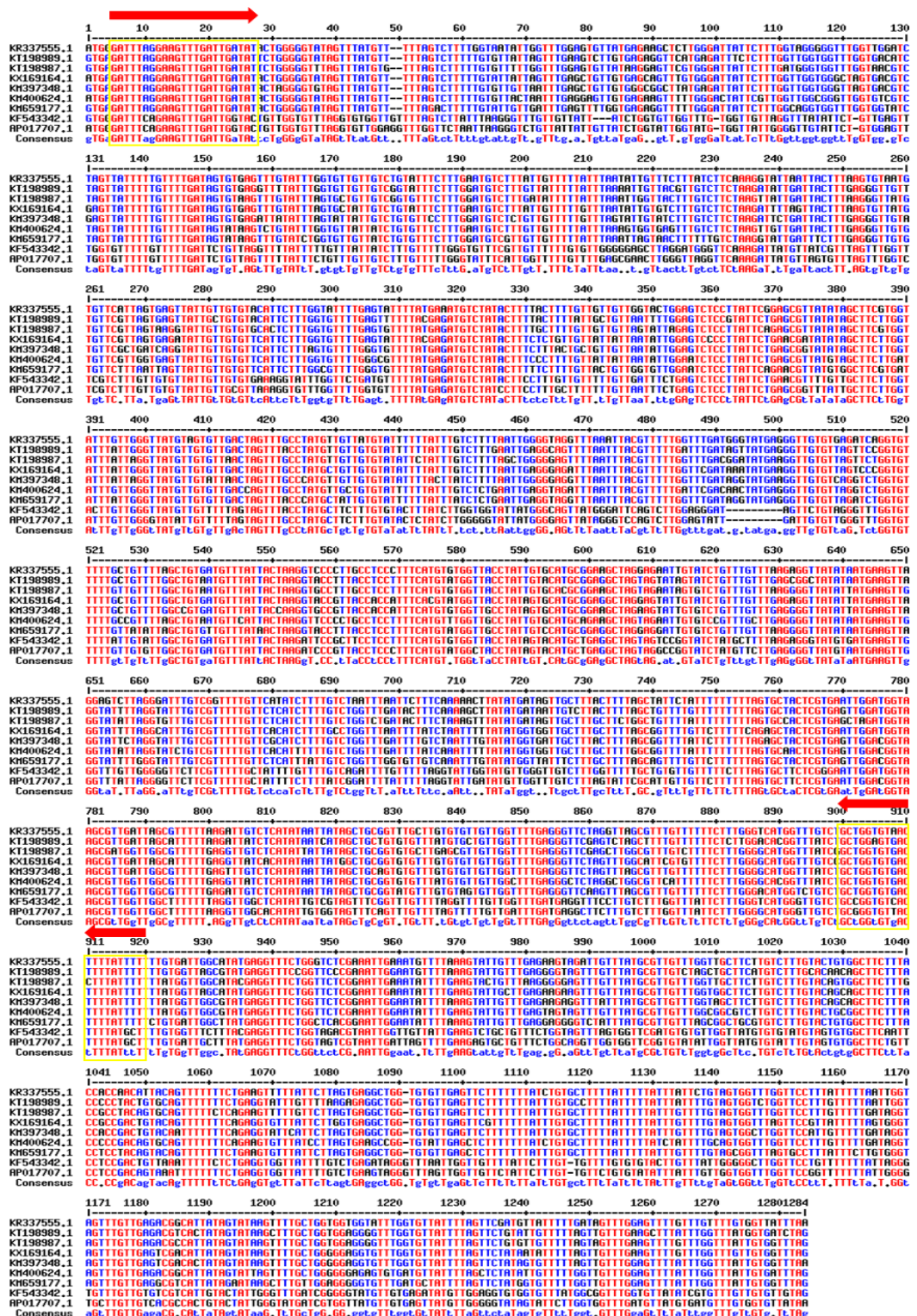
ตาราง 7 การตั้งค่าปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermal cycle

ขั้นตอน	ไพรมเมอร์	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (m:s)
pre-denaturation		94.00	5:00
denaturation		94.00	0:45
primer annealing	Uni_COX1	51.00	0:45
	Uni_CYTB	51.00	0:45
	Uni_ND1	52.00	0:45
	Uni_ND4	50.00	0:45
extension		72.00	0:50
final extension		72.00	7:00
จำนวนรอบ		35 รอบ	



ภาพประกอบ 25 ข้อมูลจาก alignment ของยีน COX1

กรอบสี่เหลี่ยมสีแดงตำแหน่งของภูมิภาคโปรโมเตอร์และลูกศรสีแดงแสดงทิศทางการ



ภาพประกอบ 28 ข้อมูลจาก alignment ของยีน ND4

กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งออกแบบไพรเมอร์และถูกครีเสียดงแสดงทิศทาง

3.7. การยืนยันชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้ด้วยยีนบนไมโทคอนเดรีย

นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการระบุชนิดพยาธิแล้วยังจำเป็นต้องศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการยืนยันชนิดพยาธิก่อนศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยนำตัวอย่างพยาธิในกลุ่มดังกล่าวเข้าสู่ขั้นตอน PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนบนไมโทคอนเดรียจากข้อ 3.6. ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของพยาธิ 4 ชนิดที่เป้าหมายในการศึกษา จากนั้นส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย 1st BASE DNA Sequencing Services (Axil Scientific Pty. Ltd) ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX เพื่อตรวจสอบโปรตีนที่เกิดขึ้น และโปรแกรม BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิจากการศึกษากับพยาธิในฐานข้อมูล จากนั้นสร้างแผนภาพวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA7 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของพยาธิที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบกับพยาธิในฐานข้อมูล โดยสร้างแผนภาพวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model สำหรับศึกษาวิวัฒนาการในระดับดีเอ็นเอ และสร้างแผนภาพวิวัฒนาการด้วยวิธี Poisson correction model สำหรับศึกษาวิวัฒนาการในระดับโปรตีน

3.8. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิและการทดสอบด้วยเทคนิค PCR

3.8.1. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 3.6. มาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิแต่ละชนิด ทั้ง 4 ชนิดที่เป็นเป้าหมายในงานวิจัย ได้แก่ *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* ออกแบบด้วยวิธี manual design โดยทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรแกรม MEGA7 เพื่อหาตำแหน่งที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิดของพยาธิ จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ด้วยโปรแกรม OligoAnalyzer tools (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>) เพื่อวิเคราะห์การเกิด self-dimer การเกิด hetero-dimer การเกิด hairpin ค่า GC content ค่าอุณหภูมิ Ta เป็นต้น โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีจำนวนทั้งสิ้น 16 คู่ ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน COX1 จำนวน 4 คู่ ยีน CYTB จำนวน 4 คู่ ยีน ND1 จำนวน 4 คู่ และยีน ND4 จำนวน 4 คู่ ดังตาราง 8

ตาราง 8 คุณสมบัติของไพรเมอร์จำเพาะ

ยีน	ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ความยาว (เบส)	GC content	Tm (°C)	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
COX1	Cs_COX1	forward	GCC TCG TAT TAA TGC TTT AAG TGC C	25	44.0	56.4	486
		reverse	CAT ACA AAT ATG CCT CAC TGC CC	23	47.8	56.1	
	Fe_COX1	forward	TTT AGG TCT TGC GTT AAG GAC AC	23	43.5	55.1	237
		reverse	AGG CAA CAA TAA TCA AGC ACC C	22	45.5	56.0	
	Od_COX1	forward	TAC GTC TTC TCG TCA GTC TGT TC	23	47.8	55.9	83
		reverse	GCA GCT AAC ACA GGT AAC GAC	21	52.4	55.9	
Pe_COX1	forward	CCT CGT TTG AAT GCT TTA AGG GC	23	47.8	56.8	314	
	reverse	CCA ATA CAG GCA ACG ACA AGA TC	23	47.8	56.1		
CYTB	Cs_CYTB	forward	TTC TGG TGT GAT ACT TTC GCT G	22	45.5	55.0	389
		reverse	ACT AAC GTA ACA TTA GTC ACT GAG	24	37.5	52.1	
	Fe_CYTB	forward	GCT TCT GGT GTA ATA CTT TCA TTG C	25	40.0	54.6	675
		reverse	GCT TTA TAG ATA CCG GAG TTA CC	23	43.5	52.4	
	Od_CYTB	forward	TAT GTG GTT AGT TCG GTA TGG T	22	40.9	53.2	545
		reverse	TAA CTC TCA ACA TCT AAC ACA TAG T	25	32.0	51.4	
Pe_CYTB	forward	ATA CCT TTG GTG GGA GGT GTA	21	47.6	55.4	198	
	reverse	CCA CAT CTC TAT AAC CAC CAG T	22	45.5	53.8		
ND1	Cs_ND1	forward	TAG TTG GTC ATC TTG GTG CGG C	22	54.5	59.7	203
		reverse	GAC CGA ATA CTA CTC AAC AGG G	22	50.0	54.6	
	Fe_ND1	forward	CTT GGT GTG GTG TAT TTT TGC TAG	24	41.7	54.4	289
		reverse	ACC GAC AAA ACT TAA CAA GTC G	22	40.9	53.5	
	Od_ND1	forward	ATC TGC TTT GAG TTC AGT AAC C	22	40.9	52.8	135
		reverse	ACA AAC AGG TAT CAC AAT CAC C	22	40.9	53.0	
Pe_ND1	forward	CAT TTG GGA GGG GAG GGA TTT C	22	54.5	57.8	248	
	reverse	CCA AAA ACC AAG CCC TGT CC	20	55.0	56.9		

ตาราง 8 (ต่อ)

ยีน	ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ความยาว (เบส)	GC content	Tm (°C)	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
ND4	Cs_ND4	forward	CTT GGG ATT ATT CGT TAG TCG G	22	45.5	53.1	454
		reverse	AAT AAA CAT CAC AGC TAA GAC TGC	24	37.5	53.4	
Fe_ND4	Fe_ND4	forward	GAG ATG TCT ATA CTT TCT TTA CTG C	25	36.0	51.1	192
		reverse	CAC AGC CTT CAT ACC TGT CG	20	55.0	55.5	
Od_ND4	Od_ND4	forward	ATT TAG TGT TGT TAT CTG TCT TCC	24	33.3	50.8	690
		reverse	TCA AAA CTA ACA GCA CAT AGA C	22	36.4	50.7	
Pe_ND4	Pe_ND4	forward	GGT TTC TGG TTC TCG GAA AG	20	50.0	53.4	257
		reverse	TAG CAC AAC CCT CGT ATC TAT C	22	45.5	53.5	

3.8.2. การทดสอบความจำเพาะและการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ในเทคนิค multiplex PCR

นำไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ ที่ทำการออกแบบไว้มาทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค PCR กับพยาธิเป้าหมายแต่ละชนิด ได้แก่ *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* และทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด ได้แก่ พยาธิใบไม้ตับชนิด *F. gigantica* พยาธิใบไม้ชนิด *G. crumenifer* รวมไปถึงเนื้อเยื่อกระเพาะผ้าขี้ริ้วของกระบือ กำหนดให้ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบทั้งหมดมีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม เท่ากันทุกชนิด โดยสารที่ใช้ในกระบวนการ PCR ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร แสดงดังตาราง 9 และการตั้งค่าขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง thermal cycler ดังตาราง 10 จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะของพยาธิชนิด *C. spatiosus* จำนวน 1 คู่ พยาธิชนิด *F. elongatus* จำนวน 1 คู่ พยาธิชนิด *O. dicranocoelium* จำนวน 1 คู่ และพยาธิชนิด *P. epiclitum* จำนวน 1 คู่ รวมทั้งสิ้น 4 คู่ และต้องเป็นไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบมาจากยีนเดียวกัน เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ในแต่ละยีนมีการกำหนดขนาดของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันไว้เรียบร้อยแล้ว เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในกระบวนการ multiplex PCR ได้ในลำดับต่อไป

3.8.3. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *CYTb*

นำดีเอ็นเอของพยาธิ 4 ชนิด ได้แก่ *C. spaiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* มาทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอลงทีละ 10 เท่า (ten-fold dilution) จาก 10.0 นาโนกรัม จนถึง 1.0 เฟมโตกรัม เพื่อหาความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับไพรเมอร์ได้ โดยทำการทดสอบกับชุดไพรเมอร์ของยีน *CYTb* ซึ่งเป็นชุดที่มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมายแต่ละชนิด และให้ผลิตภัณฑ์ที่ขนาดแตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในเทคนิค multiplex PCR ได้ในลำดับต่อไป

ตาราง 9 สารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับทดสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์

สาร	ความเข้มข้น	หน่วย	ปริมาตร	หน่วย
น้ำ	-	-	18.45	μL
ไพรเมอร์	0.20	μM	0.50	μL
Buffer A	1.00	X	2.50	μL
MgCl ₂	1.00	mM	0.50	μL
dNTPs	1.00	mM	1.25	μL
<i>Taq</i> polymerase	0.20	U	0.30	μL
template DNA	10.00	ng	1.00	μL

ตาราง 10 การตั้งค่าปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermal cycle สำหรับทดสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์

ขั้นตอน	ไพรเมอร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (m:s)
pre-denaturation		94.00	5:00
denaturation		94.00	0:45
primer annealing	Cs_COX1	56.00	0:45
	Fe_COX1	55.00	0:45
	Od_COX1	55.00	0:45
	Pe_COX1	56.00	0:45
	Cs_CYTB	55.00	0:45
	Fe_CYTB	56.00	0:45
	Od_CYTB	55.00	0:45
	Pe_CYTB	55.00	0:45
	Cs_ND1	52.00	0:45
	Fe_ND1	57.00	0:45
	Od_ND1	56.00	0:45
	Pe_ND1	54.00	0:45
	Cs_ND4	53.00	0:45
	Fe_ND4	53.00	0:45
	Od_ND4	53.00	0:45
	Pe_ND4	53.00	0:45
extension		72.00	0:50
final extension		72.00	7:00
จำนวนรอบ		35 รอบ	

3.9. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR

3.9.1. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR

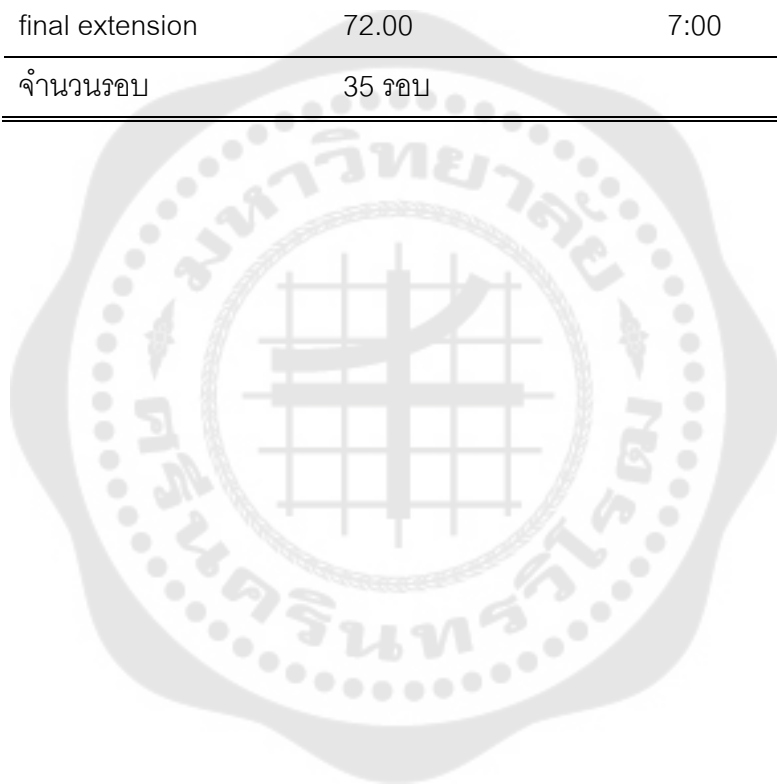
เทคนิค multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ไพรเมอร์หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อให้สามารถตรวจสอบการติดพยาธิหลายชนิดได้ในหนึ่งรอบปฏิกิริยาซึ่งลดระยะเวลาจนถึงขั้นตอนการตรวจสอบได้เมื่อเทียบกับ PCR แบบปกติ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่ จากยีน *CYTB* ได้แก่ Cs_CYTB, Fe_CYTB, Od_CYTB และ Pe_CYTB ร่วมกันในปฏิกิริยา multiplex PCR เพื่อทำการทดสอบความจำเพาะกับพยาธิเป้าหมาย 4 ชนิด ได้แก่ *C. spatiozus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epicloium* โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 10 นาโนกรัม เท่ากันทุกชนิด สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค multiplex PCR ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ดังตาราง 11 ขั้นตอนการตั้งค่าปฏิกิริยา multiplex PCR ในเครื่อง thermo cycler ดังตาราง 12 ตรวจสอบผลของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2%

ตาราง 11 สารที่ใช้ในปฏิกิริยา multiplex PCR

สาร	ความเข้มข้น	หน่วย	บริษัท	หน่วย
น้ำ	-	-	10.15	μL
ไพรเมอร์ Cs_CYTB	0.32	μM	0.80	μL
ไพรเมอร์ Fe_CYTB	0.48	μM	1.20	μL
ไพรเมอร์ Od_CYTB	0.48	μM	1.20	μL
ไพรเมอร์ Pe_CYTB	0.28	μM	0.70	μL
Buffer A	1.60	X	4.00	μL
MgCl ₂	1.00	mM	0.50	μL
dNTPs	1.00	mM	1.25	μL
Taq polymerase	0.20	U	0.30	μL
template DNA	10.00	ng	1.00	μL

ตาราง 12 การตั้งค่าปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermal cycle

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (m:s)
pre-denaturation	94.00	5:00
denaturation	94.00	0:45
primer annealing	61.00	0:45
extension	72.00	0:50
final extension	72.00	7:00
จำนวนรอบ	35 รอบ	



3.9.2. การทดสอบการติดเชื้อร่วมของพยาธิในปฏิกิริยา multiplex PCR

จากการศึกษาการติดพยาธิในกระเพาะผ้าขี้ริ้วของโคและกระบือด้วยวิธีแบบดั้งเดิม มักพบว่าพยาธิใบไม้ที่ทำการศึกษามีการติดเชื้อร่วมกันในโฮสต์ตัวเดียวกัน ดังนั้นจึงทำการจำลอง การเกิดการติดเชื้อร่วมกัน และใช้เทคนิค multiplex PCR ในการตรวจสอบ ทำได้โดยกำหนดความ เข้มข้นของดีเอ็นเอพยาธิทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* ที่ 10.0 นาโนกรัม จากนั้นนำมาผสมกันและทดสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR ซึ่ง สามารถออกแบบการผสมกันของ ดีเอ็นเอได้ 11 แบบ ดังนี้

- 1) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด *C. spatiosus* และ ชนิด *P. epiclitum* (CP)
- 2) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด *C. spatiosus* และ ชนิด *F. elongatus* (CF)
- 3) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด *C. spatiosus* และ ชนิด *O. dicranocoelium* (CO)
- 4) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด *O. dicranocoelium* และชนิด *F. elongatus* (OF)
- 5) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด *P. epiclitum* และ ชนิด *F. elongatus* (PF)
- 6) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด *P. epiclitum* และ ชนิด *O. dicranocoelium* (PO)
- 7) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด *C. spatiosus*, ชนิด *O. dicranocoelium* และชนิด *F. elongatus* (COF)
- 8) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด *P. epiclitum*, ชนิด *C. spatiosus* และชนิด *F. elongatus* (PCF)
- 9) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด *P. epiclitum*, ชนิด *O. dicranocoelium* และชนิด *F. elongatus* (POF)
- 10) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด *P. epiclitum*, ชนิด *O. dicranocoelium* และชนิด *C. spatiosus* (POC)
- 11) การทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 4 ชนิด ได้แก่ ชนิด *P. epiclitum*, ชนิด *C. spatiosus*, ชนิด *O. dicranocoelium* และชนิด *F. elongatus* (PCOF)

3.9.3. การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR

ทำการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอของพยาธิชนิด *C. spaiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* แต่ละชนิดลงทีละ 10 เท่า โดยเริ่มต้นที่ 10.0 นาโนกรัม ไปจนถึง 1.0 เฟมโตกรัม เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิเป้าหมายแต่ละชนิดได้ด้วยเทคนิค multiplex PCR ตรวจสอบผลของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2%

3.10. การประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อวินิจฉัยการติดพยาธิในมูลสัตว์

เก็บตัวอย่างมูลโคและกระบือในจังหวัดนครนายกจำนวน 41 ตัวอย่าง นำมูลสัตว์ในจังหวัดดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Stool Mini Kit และนำดีเอ็นเอดังกล่าวไปทดสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจสอบว่ามูลสัตว์จากจังหวัดดังกล่าวมีการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้หรือที่เป็นเป้าหมายหรือไม่ และหากติดเป็นพยาธิชนิดใด โดยตรวจสอบผลจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของ multiplex PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% โดยกำหนดให้ ผลบวก แสดงว่า มูลสัตว์มีการปนเปื้อนของพยาธิที่เป็นเป้าหมาย และ ผลลบ แสดงว่า มูลสัตว์ไม่มีการปนเปื้อนของพยาธิ 4 ชนิด ที่เป็นเป้าหมาย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1. ผลการเก็บตัวอย่างมูลโคและกระบือ

4.1.1. พื้นที่เก็บตัวอย่าง

จากการสำรวจแหล่งเพาะเลี้ยงปศุสัตว์โคและกระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 128 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดชัยนาท 17 จุดเก็บตัวอย่าง จังหวัดนครนายก 17 จุดเก็บตัวอย่าง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 15 จุดเก็บตัวอย่าง จังหวัดลพบุรี 16 จุดเก็บตัวอย่าง จังหวัดสระบุรี 15 จุดเก็บตัวอย่าง จังหวัดสิงห์บุรี 17 จุดเก็บตัวอย่าง จังหวัดสุพรรณบุรี 15 จุดเก็บตัวอย่าง และจังหวัดอ่างทอง 16 จุดเก็บตัวอย่าง ลักษณะพื้นที่และมูลสัตว์ ดังภาพประกอบ 29



ก.

ข.

ค.

ง.

ภาพประกอบ 29 พื้นที่เก็บตัวอย่างมูลสัตว์

ก. คอกโค ข. มูลโค ค. คอกกระบือ ง. มูลกระบือ

4.1.2. จำนวนตัวอย่างมูลโคและกระบือ

จากการเก็บตัวอย่างมูลโคและกระบือในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 - เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 จำนวนทั้งสิ้น 247 ตัวอย่าง จากแหล่งเพาะเลี้ยงปศุสัตว์โคและกระบือ 8 จังหวัดในภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชัยนาท 31 ตัวอย่าง จังหวัดนครนายก 41 ตัวอย่าง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 21 ตัวอย่าง จังหวัดลพบุรี 29 ตัวอย่าง จังหวัดสระบุรี 32 ตัวอย่าง จังหวัดสิงห์บุรี 30 ตัวอย่าง จังหวัดสุพรรณบุรี 38 ตัวอย่าง และจังหวัดอ่างทอง 25 ตัวอย่าง ดังตาราง 13

ตาราง 13 จำนวนตัวอย่างมูลโคและกระบือที่ใช้ในการศึกษาจากแต่ละจังหวัดภาคกลางของประเทศไทย

จังหวัด	จำนวน (ตัวอย่าง)		จำนวนรวม (ตัวอย่าง)
	มูลโค	มูลกระบือ	
ชัยนาท	30	1	31
นครนายก	39	2	41
พระนครศรีอยุธยา	21	0	21
ลพบุรี	29	0	29
สระบุรี	32	0	32
สิงห์บุรี	29	1	30
สุพรรณบุรี	38	0	38
อ่างทอง	24	1	25
รวมทั้งสิ้น	242	5	247

4.2. ผลการตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีรีวในมูลโคและกระบือด้วยวิธี formalin-ether sedimentation

4.2.1. ลักษณะของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีรีว

จากการนำตัวอย่างมูลสัตว์มาตรวจสอบการปนเปื้อนไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีรีวด้วยวิธี formalin-ether sedimentation พบว่าสามารถตรวจสอบไข่พยาธิใบไม้กลุ่มดังกล่าวได้ โดยไข่มีลักษณะรูปร่างกลมรี เบื้องบน สีเทา ขนาดความกว้างตั้งแต่ 61.4 – 91.3 ไมโครเมตร ความยาวตั้งแต่ 126.7 – 171.2 ไมโครเมตร ส่วนบนสุดของลำตัวพบฝาปิดเปลือกไข่ (operculum) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของไข่พยาธิกลุ่มนี้ ดังภาพประกอบ 30



ภาพประกอบ 30 ไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีรีว

4.2.2. ปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัม

จากตัวอย่างมูลสัตว์จำนวน 247 ตัวอย่าง จากแหล่งเพาะเลี้ยงปลุ่สัตว์โคและกระบือ 8 จังหวัดในภาคกลางของประเทศไทย นำมาตรวจสอบการปนเปื้อนไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะ ฝ้ายี่วด้วยวิธี formalin-ether sedimentation โดยทำการตรวจ 3 ซ้ำ เพื่อหาปริมาณไข่พยาธิที่ ตรวจพบในหนึ่งกรัม (EPG) ได้ผลดังตาราง 14 โดยมีรายละเอียดดังนี้

จังหวัดชัยนาทตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 38 ฟอง ต่ำสุดที่ 1 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 4.6 ฟอง

จังหวัดนครนายกตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 46 ฟอง ต่ำสุดที่ 1 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 11 ฟอง

จังหวัดพระนครศรีอยุธยาตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 56 ฟอง ต่ำสุดที่ 1 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 14.7 ฟอง

จังหวัดลพบุรีตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 23 ฟอง ต่ำสุดที่ 1 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 6.2 ฟอง

จังหวัดสระบุรีตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 27 ฟอง ต่ำสุดที่ 2 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 8.5 ฟอง

จังหวัดสิงห์บุรีตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 31 ฟอง ต่ำสุดที่ 1 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 9.4 ฟอง

จังหวัดสุพรรณบุรีตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 241 ฟอง ต่ำสุดที่ 1 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 33.3 ฟอง

จังหวัดอ่างทองตรวจพบปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมสูงสุดที่ 33 ฟอง ต่ำสุดที่ 1 ฟอง ค่าเฉลี่ยรวมการตรวจสอบทั้ง 3 ครั้ง ของปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมเท่ากับ 9.6 ฟอง

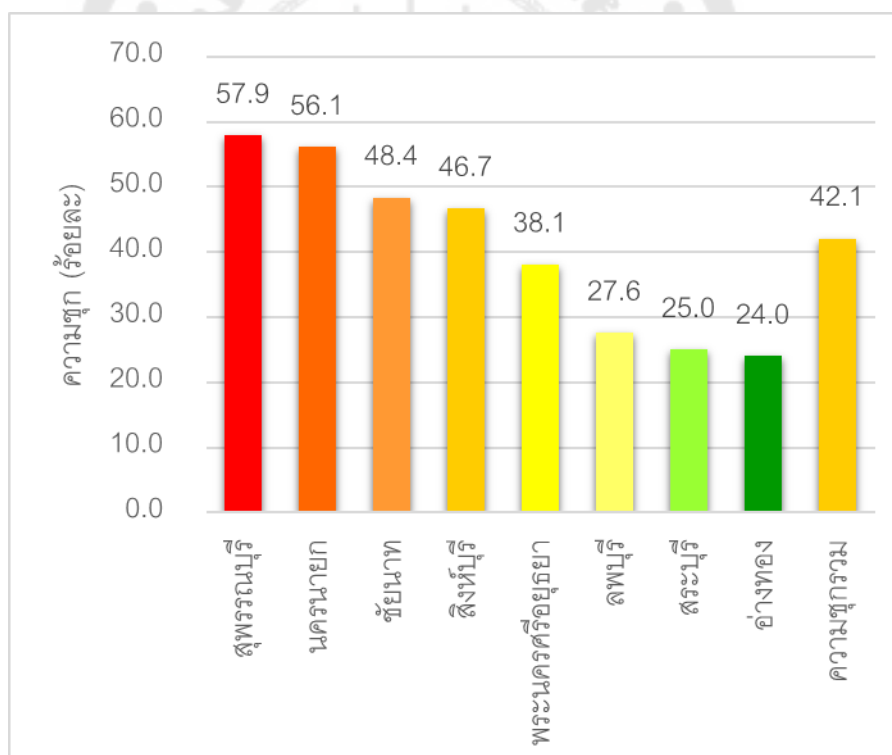
ตาราง 14 ปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัมที่ตรวจพบในมูลสัตว์ด้วยวิธี formalin-ether sedimentation

จังหวัด	จำนวนตรวจ (ตัว)			ปริมาณไข่ต่อหนึ่งกรัม 3 ชั่วโมง (ฟอง)		
	ทั้งหมด	ผลบวก	ผลลบ	ต่ำสุด	สูงสุด	ค่าเฉลี่ย
ชัยนาท	31	15	16	1	38	4.6
นครนายก	41	23	18	1	46	11.0
พระนครศรีอยุธยา	21	8	13	1	56	14.7
ลพบุรี	29	7	22	1	23	6.2
สระบุรี	32	7	25	1	27	8.5
สิงห์บุรี	30	14	16	1	31	9.4
สุพรรณบุรี	38	22	16	1	241	33.3
อ่างทอง	25	9	16	1	33	9.6

4.3. ความชุกและการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว

4.3.1. ความชุกของการปนเปื้อนพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วในตัวอย่างมูลโคและกระบือ จากแหล่งเพาะเลี้ยงปลุสสัตว์โคและกระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย ด้วยวิธี formalin-ether sedimentation พบว่ามูลสัตว์มีการปนเปื้อนไข่ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว จำนวน 104 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 247 ตัวอย่าง คำนวณร้อยละความชุกรวมได้เท่ากับ 42.1 โดยพบว่าตัวอย่างจากจังหวัดสุพรรณบุรีมีการติดพยาธิใบไม้กลุ่มดังกล่าวสูงที่สุด ร้อยละ 57.9 (22/38) รองลงมาได้แก่ จังหวัดนครนายก ร้อยละ 56.1 (23/41) จังหวัดชัยนาท ร้อยละ 48.4 (15/31) จังหวัดสิงห์บุรี ร้อยละ 46.7 (14/30) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ร้อยละ 38.1 (8/21) จังหวัดลพบุรี ร้อยละ 27.6 (8/29) จังหวัดสระบุรี ร้อยละ 25.0 (8/32) และจังหวัดอ่างทอง ร้อยละ 24.0 (6/25) ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 31



ภาพประกอบ 31 ร้อยละความชุกของการปนเปื้อนพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลุสสัตว์โคและกระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย

4.3.2. การระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในแหล่งเพาะเลี้ยงปลุสัศตว์โคและกระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย

จากผลการตรวจสอบการปนเปื้อนไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีด้วยวิธี formalin-ether sedimentation ในแหล่งเพาะเลี้ยงปลุสัศตว์โคและกระบือ 8 จังหวัด ภาคกลางของประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 128 จุดเก็บตัวอย่าง พบการปนเปื้อนไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี ทั้งหมด 64 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 32

โดยจังหวัดชัยนาทตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 11 จาก 17 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอเมืองชัยนาท 4 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอหนองมะโมง 3 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอดงสิงห์ 2 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอหันคา 1 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอเนินขาม 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 33

จังหวัดนครนายกตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 11 จาก 17 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอเมืองนครนายก 4 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอบ้านนา 4 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอองครักษ์ 2 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอปากพลี 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 34

จังหวัดพระนครศรีอยุธยาตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 4 จาก 15 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอบางไทร 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอบางปะหัน 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอวังน้อย 1 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอลาดบัวหลวง 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 35

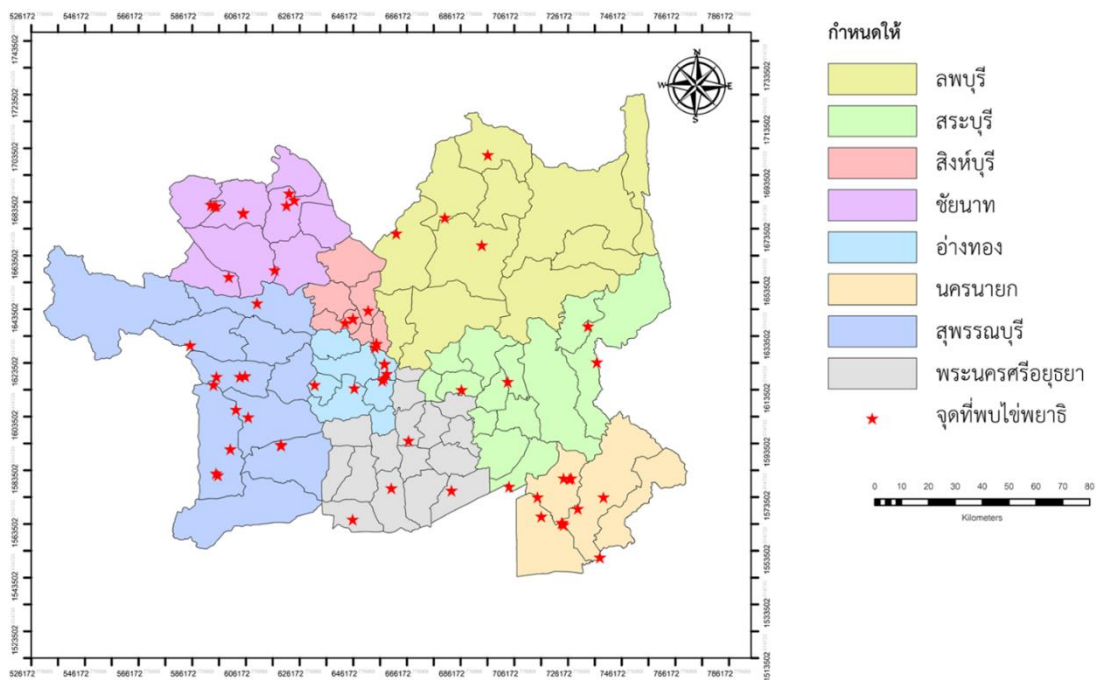
จังหวัดลพบุรีตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 4 จาก 16 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอโคกสำโรง 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอโคกเจริญ 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอหนองม่วง 1 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอบ้านหมี่ 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 36

จังหวัดสระบุรีตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 5 จาก 15 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอบ้านหม้อ 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอเฉลิมพระเกียรติ 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอวิหารแดง 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอมวกเหล็ก 1 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอวังม่วง 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 37

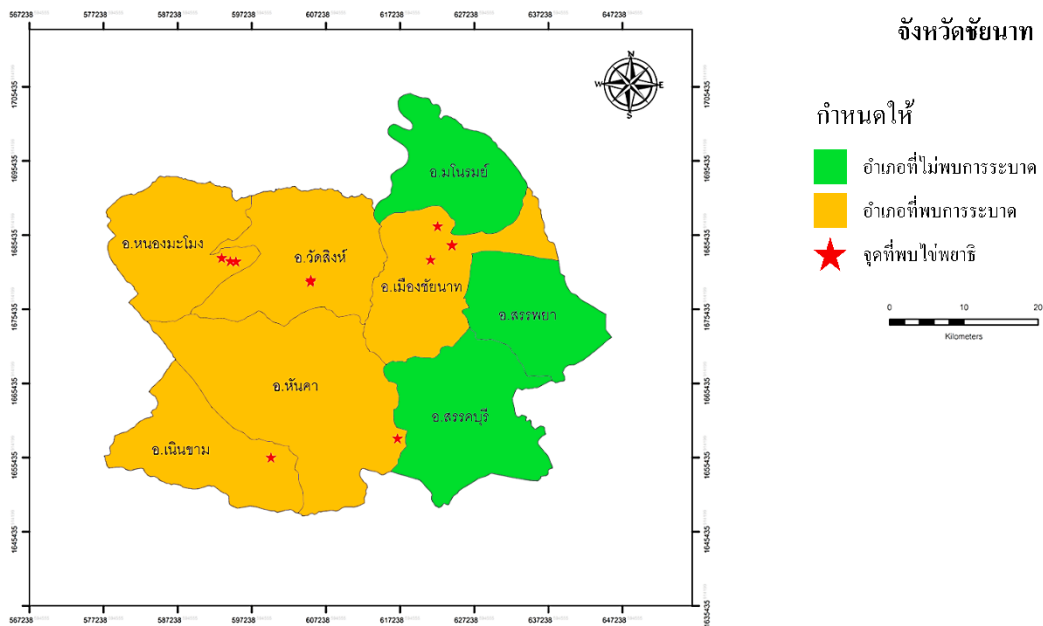
จังหวัดสิงห์บุรีตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 9 จาก 17 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอบรรพบุรี 4 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอค่ายบางระจัน 4 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอเมืองสิงห์บุรี 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 38

จังหวัดสุพรรณบุรีตรวจพบไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 13 จาก 15 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอดูหมอง 5 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอดอนเจดีย์ 3 จุดเก็บ

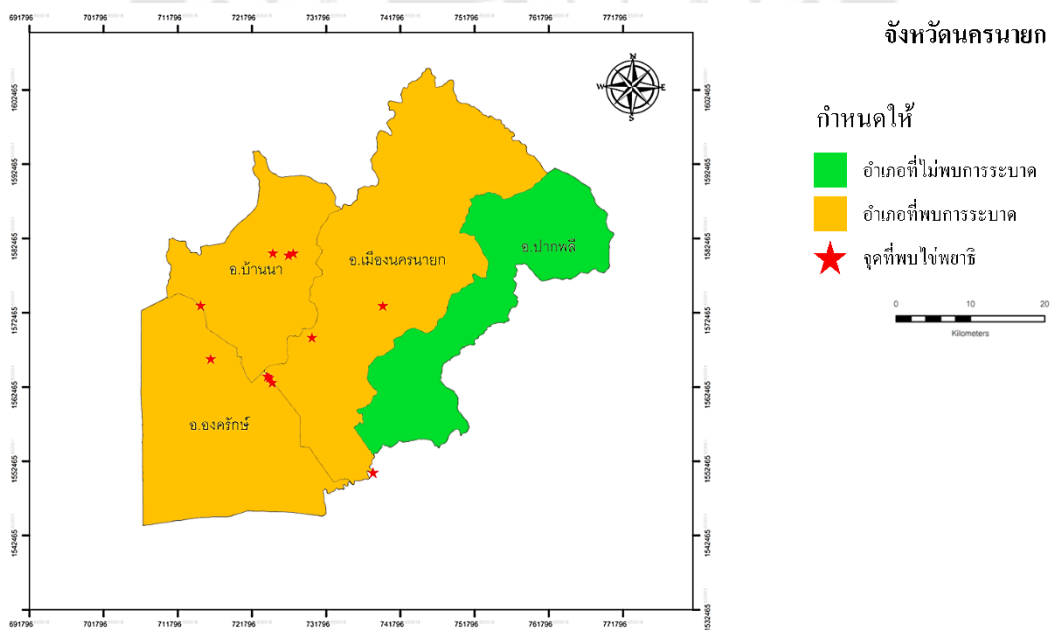
ตัวอย่าง อำเภอบางปลาม้า 2 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอหนองหญ้าไซ 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอเดิม
บางนางบัว 1 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอเมืองสุพรรณบุรี 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 39
จังหวัดอ่างทองตรวจพบไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในมูลสัตว์ทั้งหมด 7 จาก
16 จุดเก็บตัวอย่าง โดยพบในอำเภอไชโย 4 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอเมือง 1 จุดเก็บตัวอย่าง อำเภอ
วิเศษชัยชาญ 1 จุดเก็บตัวอย่าง และอำเภอสามโก้ 1 จุดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 40



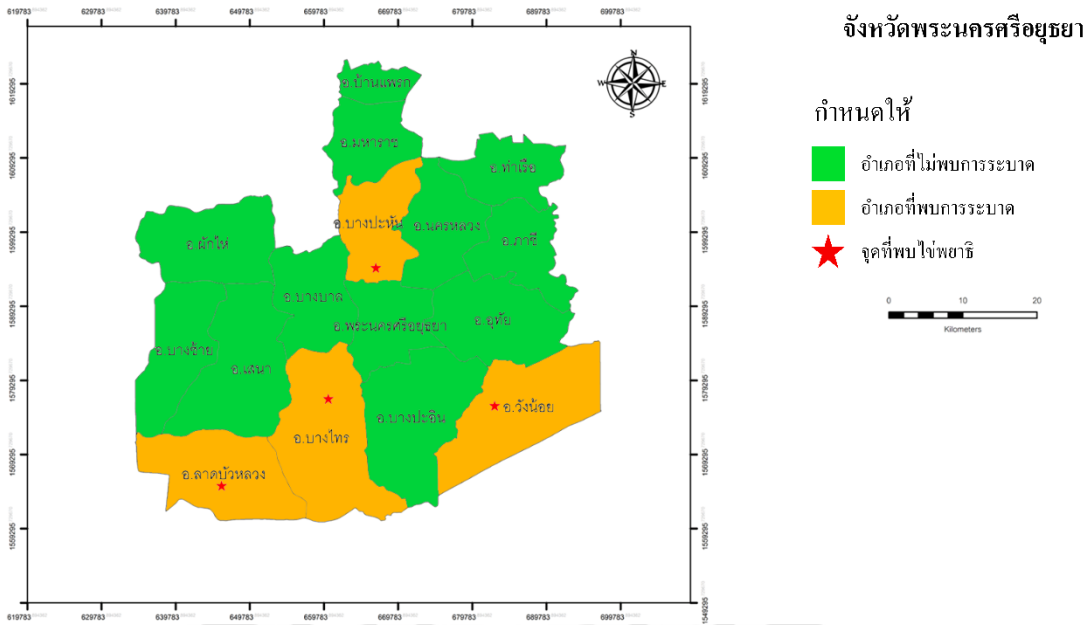
ภาพประกอบ 32 แผนที่จังหวัดในภาคกลางที่พบไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรี



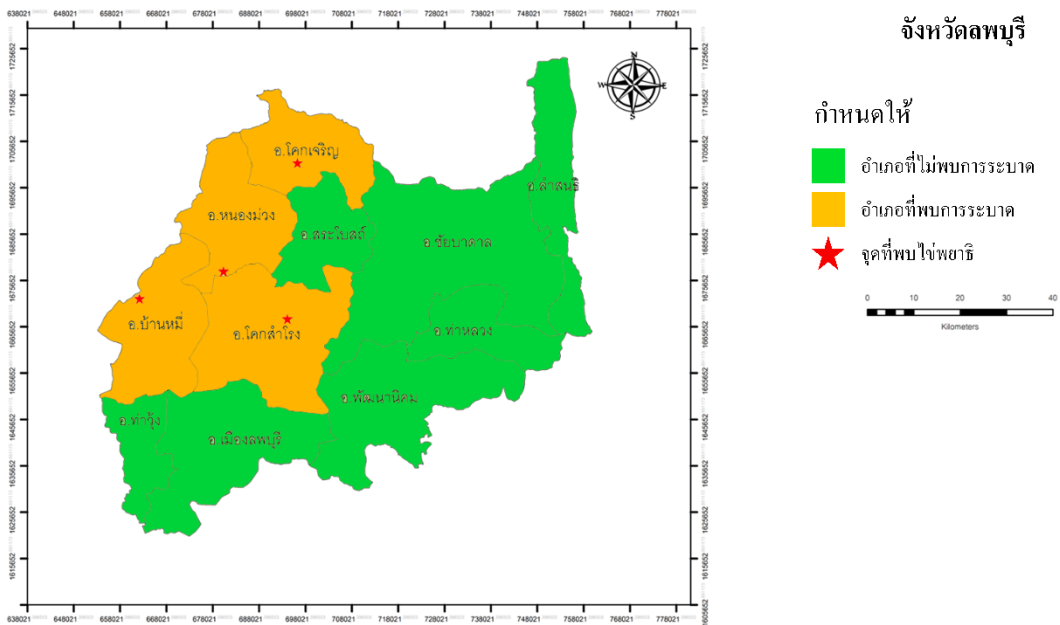
ภาพประกอบ 33 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดชัยนาท



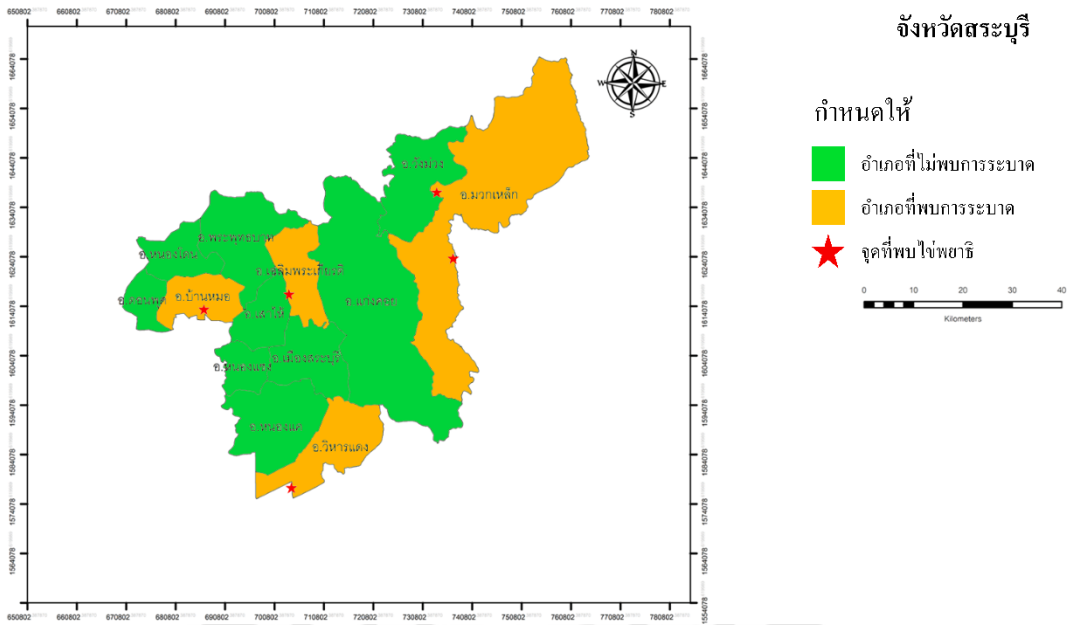
ภาพประกอบ 34 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดนครนายก



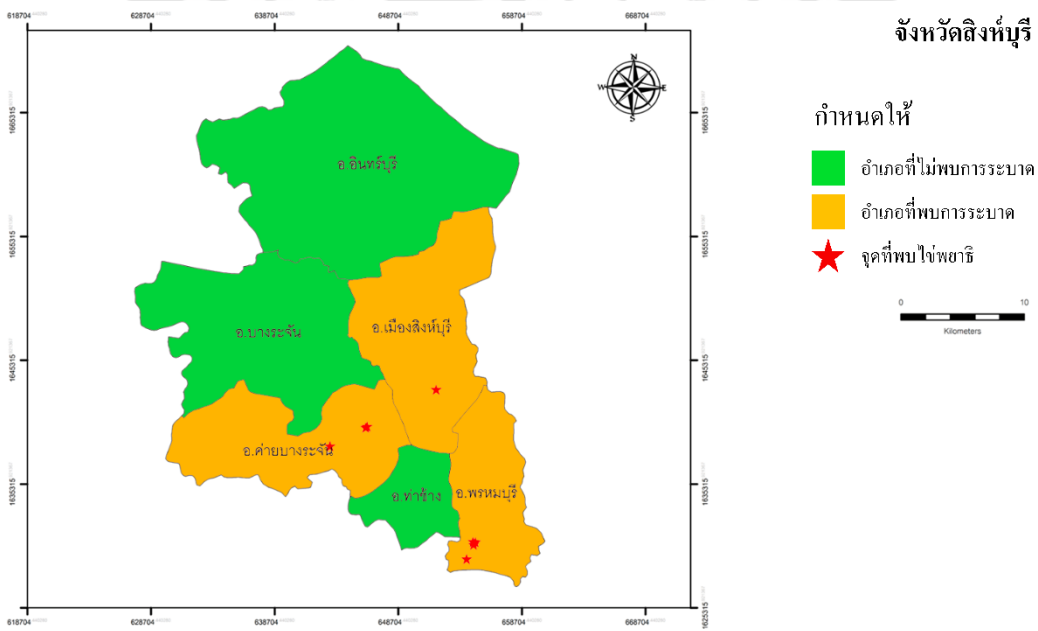
ภาพประกอบ 35 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา



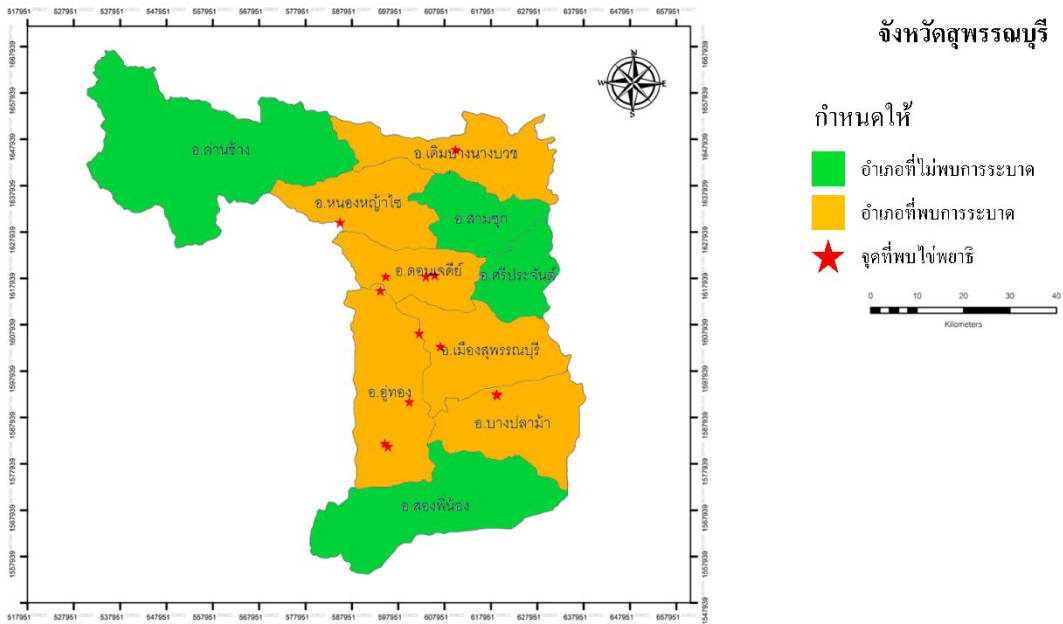
ภาพประกอบ 36 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดลพบุรี



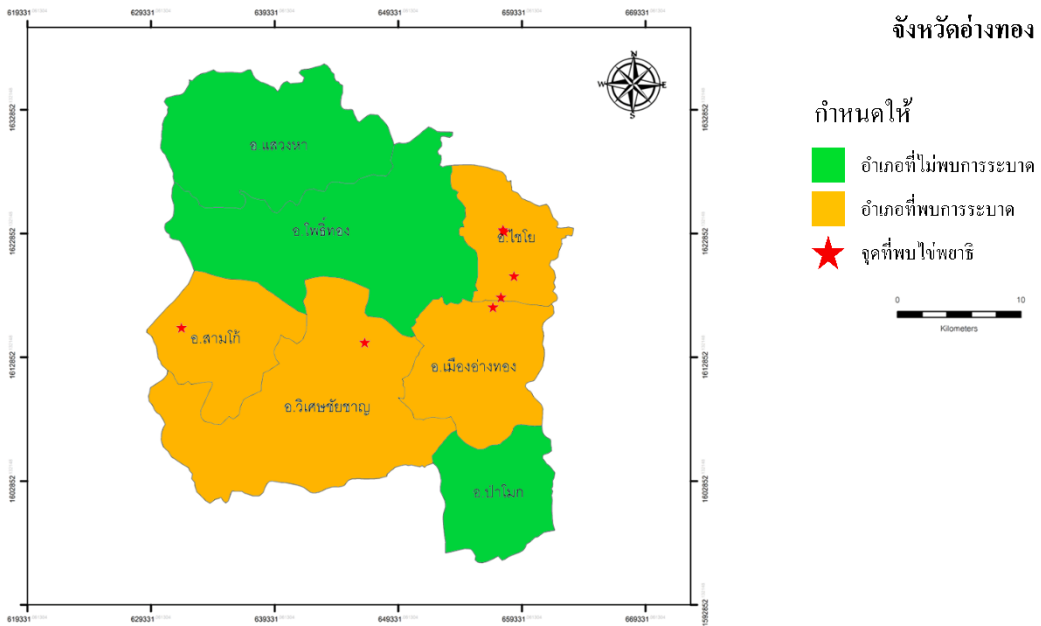
ภาพประกอบ 37 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดสระบุรี



ภาพประกอบ 38 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดสิงห์บุรี



ภาพประกอบ 39 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดสุพรรณบุรี



ภาพประกอบ 40 แผนที่การระบาดของไข้พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีในจังหวัดอ่างทอง

4.4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิระยะตัวเต็มวัย

จากการเก็บตัวอย่างพยาธิในโรงฆ่าสัตว์ เมื่อนำมาทำสไลด์ถาวรและตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง rotary microtome พบพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีวรีวจำนวน 4 ชนิด มีรายละเอียดดังนี้

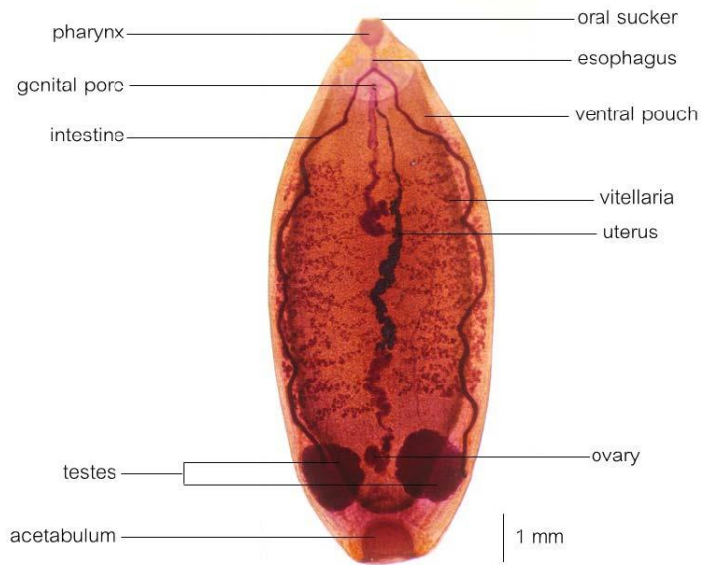
4.4.1. *Carmyerius spatiosus* (n = 10)

ลำตัวมีขนาดความยาวตั้งแต่ 12.00 – 15.00 มิลลิเมตร (13.40 ± 0.97) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 4.00 – 6.00 มิลลิเมตร (5.20 ± 0.63) ดังภาพประกอบ 41ก. ด้านหน้าลำตัวพบ oral sucker เชื่อมต่อกับคอหอย (pharynx) ซึ่งมีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.57 – 0.74 มิลลิเมตร (0.64 ± 0.05) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.53 – 0.73 มิลลิเมตร (0.62 ± 0.06) มีลักษณะแบบ paramphistomum type เนื่องจากไม่มี papillae รอบผิวชั้นใน ไม่มี middle circular unit และไม่พบ lip sphincter ดังภาพประกอบ 41ข. ถัดมาเป็นหลอดอาหารมีลักษณะเป็นท่อยาวขนาดตั้งแต่ 0.33 – 0.50 มิลลิเมตร (0.40 ± 0.07) ดังภาพประกอบ 41ค. ทางเดินอาหารพบลำไส้แยกออกเป็น 2 ทาง แบบ bifurcated มีลักษณะเป็นท่อคลื่นยาวขนานข้างลำตัวจากตำแหน่งหลอดอาหารไปจนถึงตำแหน่งของอวัยวะ (testis) โดยอวัยวะมีลักษณะเป็นพู (lobed) จำนวน 2 ก้อน เรียงตัวแบบ horizontal อวัยวะด้านซ้ายมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.84 – 2.94 มิลลิเมตร (2.19 ± 0.36) ส่วนอวัยวะด้านขวามีเส้นผ่านศูนย์กลาง-ขนาด 1.76 – 3.07 มิลลิเมตร (2.23 ± 0.48) รังไข่ (ovary) มีลักษณะค่อนข้างกลม อยู่ตำแหน่งระหว่างอวัยวะทั้ง 2 ก้อน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.52 – 0.64 มิลลิเมตร (0.58 ± 0.05) มดลูก (uterus) ขดพันกันจากตำแหน่งรังไข่เป็นท่อยาวเปิดตำแหน่ง genital pore ซึ่งอยู่ตำแหน่งใต้หลอดอาหาร ด้านท้ายของลำตัวพบ acetabulum มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.62 – 1.64 มิลลิเมตร (1.36 ± 0.34) มีลักษณะแบบ gastrothylax type เนื่องจาก acetabulum มีขนาดใหญ่ ผิวรอบนอกไม่มี papillae มีการเรียงตัวของ circular muscle ดังนี้ dorsal external circular (dec) จำนวน 60-63 หน่วย dorsal internal circular (dic) จำนวน 43-47 หน่วย และ ventral external circular (vec) จำนวน 49-56 หน่วย ดังภาพประกอบ 41ง.-จ. นอกจากนี้พบว่าพยาธิชนิดนี้มี vitellaria ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วลำตัวตั้งแต่ตำแหน่งลำไส้ไปจนถึงเหนือตำแหน่งอวัยวะ ทั้งยังพบ ventral pouch ปรางู ซึ่ง เป็นลักษณะเด่นของพยาธิในวงศ์ย่อย Gastrothylacinae ตำแหน่งที่พบพยาธิชนิด คือ กระเพาะผ้าชีวรีวของโคและกระบือ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับรายงานของ Sey และ Prasitirat พบว่าขนาดของอวัยวะต่าง ๆ ของพยาธิชนิดนี้ในงานวิจัยมีขนาดใหญ่กว่ารายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Sey & Prasitirat, 1994) ดังตาราง 15 เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการวัดขนาดจากตัวอย่างสไลด์ถาวร แต่งานวิจัยก่อนหน้านี้ทำการวัดขนาดจากตัวอย่างที่ผ่านนการตัดชิ้นเนื้อ ทำให้ขนาดขนาดที่วัดออกมาแตกต่างกันเล็กน้อย แต่สามารถระบุได้ว่าเป็นพยาธิชนิดเดียวกัน โดยอาศัยรูปแบบของคอ

หอย (paramphistomum type) และ acetabulum (gastrothylax type) ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับรายงานดังกล่าว ประกอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดกลุ่มพยาธิชนิดนี้ในวงศ์ Gastrothylacidae จึงสามารถสรุปได้ว่าพยาธิที่ศึกษานี้เป็นชนิด *C. spatiosus*

ตาราง 15 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด *C. spatiosus*

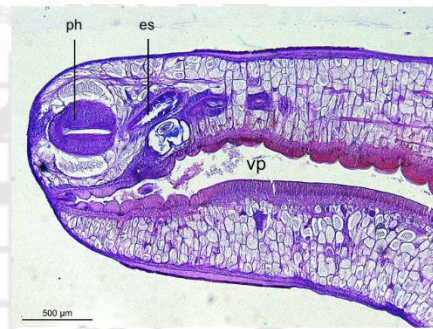
อวัยวะ	ขนาด (มิลลิเมตร)			
	ผลจากงานวิจัย		(Sey & Prasitirat, 1994)	
	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด
ความยาวลำตัว	12.00	15.00	8.70	11.20
ความกว้างลำตัว	4.00	6.00	2.30	3.00
เส้นผ่านศูนย์กลาง acetabulum	0.62	1.64	1.00	1.30
ความยาวคอหอย	0.57	0.74	0.50	0.70
ความกว้างคอหอย	0.53	0.73	0.40	0.60
ความยาวหลอดอาหาร	0.33	0.55	0.20	0.30
เส้นผ่านศูนย์กลางอวัยวะด้านซ้าย	1.84	2.94	N/A	N/A
เส้นผ่านศูนย์กลางอวัยวะด้านขวา	1.76	3.07	N/A	N/A
เส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่	0.52	0.64	0.20	0.30



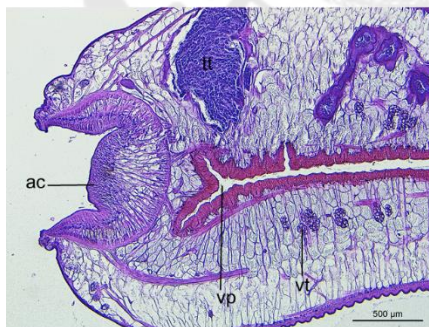
ก.



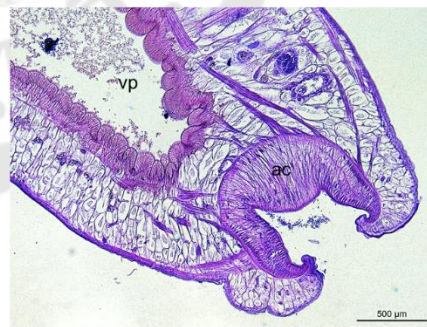
ข.



ค.



ง.



จ.

ภาพประกอบ 41 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด *C. spatiosus*

ก. สไลด์ถาวรเต็มตัว ข. frontal section ส่วนหน้า ค. sagittal section ส่วนหน้า

ง. frontal section ส่วนท้าย จ. sagittal section ส่วนท้าย

(ph): pharynx, (os): oral sucker, (in): intestine, (vp): ventral pouch, (gp): genital pore,

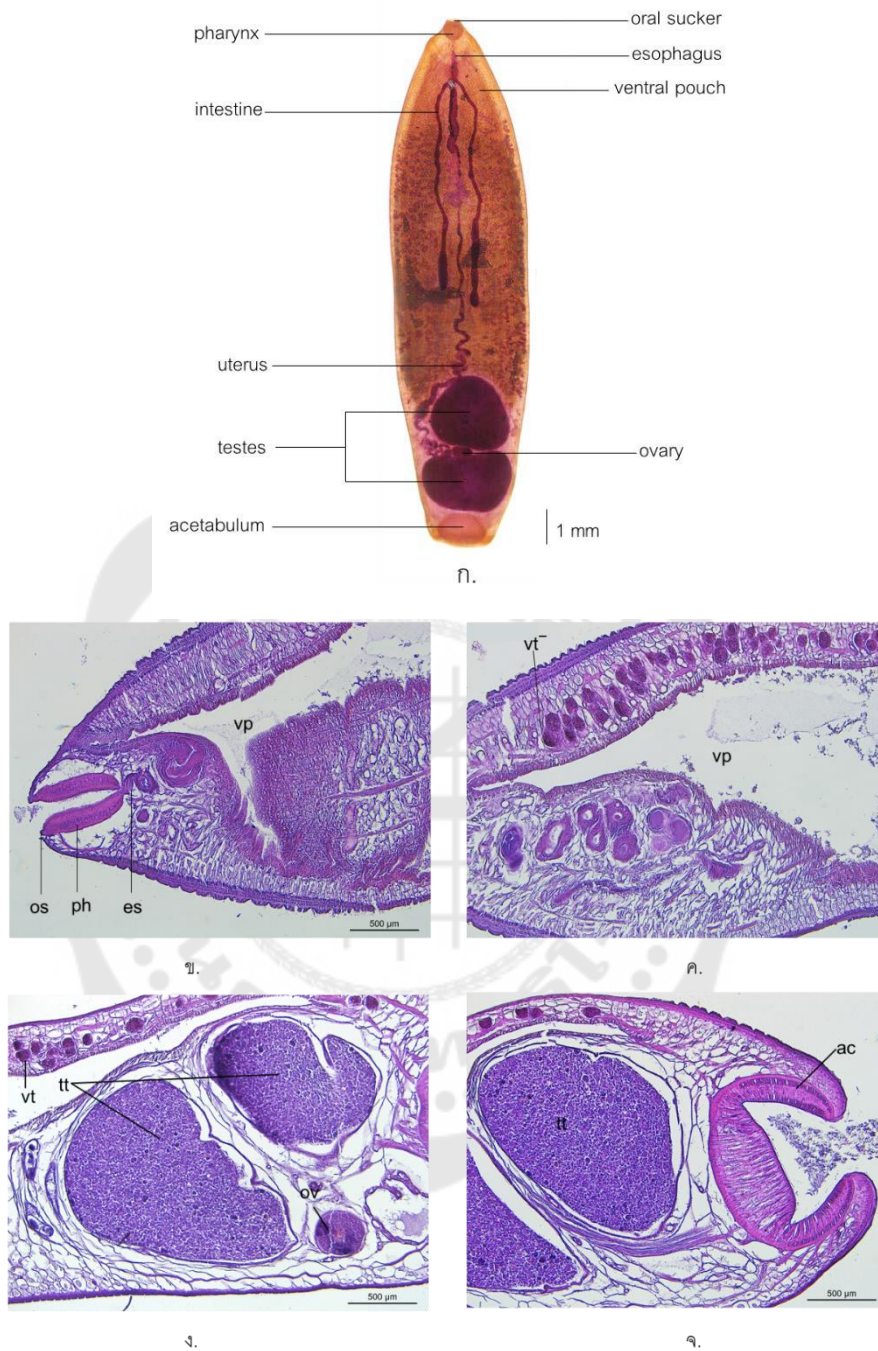
(ac): acetabulum, (vt): vitellaria, (tt): testis

4.4.2. *Fischoederius elongatus* (n = 12)

ลำตัวมีลักษณะคล้ายกระสวย ขนาดยาวตั้งแต่ 13.00 - 28.00 มิลลิเมตร (18.08 ± 4.29) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 3.00 - 5.00 มิลลิเมตร (4.00 ± 0.74) ดังภาพประกอบ 42ก. ด้านหน้าลำตัวพบ oral sucker เชื่อมกับคอหอยมีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.55 - 0.99 มิลลิเมตร (0.78 ± 0.12) มีขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.58 - 0.82 มิลลิเมตร (0.69 ± 0.06) มีลักษณะแบบ paramphistomum type เนื่องจากไม่มี papillae รอบผิวชั้นใน ไม่พบ middle circular unit และไม่พบ lip sphincter ดังภาพประกอบ 42ข. หลอดอาหารเป็นท่อที่มีขนาดยาวตั้งแต่ 0.90 - 1.59 มิลลิเมตร (1.21 ± 0.21) ลำไส้ของพยาธิมีลักษณะคดเคี้ยว แยกออกเป็น 2 ทาง แบบ bifurcated ขนานไปกับลำตัวตั้งแต่ตำแหน่งหลอดอาหารทอดยาวไปจนถึงบริเวณกึ่งกลางลำตัว อังทะมี 2 ก้อน ลักษณะเป็นพู่เล็กน้อย เรียงตัวแบบ tandem อยู่ตำแหน่ง $\frac{3}{4}$ ของลำตัว โดยอังทะด้านหน้ามีขนาดยาวตั้งแต่ 2.15 - 3.13 มิลลิเมตร (2.57 ± 0.41) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 1.68 - 2.96 มิลลิเมตร (2.12 ± 0.47) ส่วนอังทะด้านหลังมีขนาดยาวตั้งแต่ 2.17 - 2.99 มิลลิเมตร (2.72 ± 0.33) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 1.82 - 2.68 มิลลิเมตร (2.13 ± 0.30) รังไข่มีลักษณะค่อนข้างกลม อยู่ตำแหน่งกึ่งกลางระหว่างอังทะ 2 ก้อน โดยมีขนาดยาวตั้งแต่ 0.65 - 0.91 มิลลิเมตร (0.77 ± 0.09) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.38 - 0.82 มิลลิเมตร (0.53 ± 0.16) ดังภาพประกอบ 42ง. มดลูกมีลักษณะเป็นท่อคดพันยาวจากตำแหน่งรังไข่ไปเปิดตรงตำแหน่ง genital pore ซึ่งอยู่ตำแหน่งใกล้กับหลอดอาหาร ด้านท้ายของลำตัวพบ acetabulum มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1.31 - 1.81 มิลลิเมตร (1.53 ± 0.18) มีลักษณะแบบ fischoederius type เนื่องจาก acetabulum มีขนาดเล็ก ผิวรอบนอกไม่มี papillae โดยมี d.e.c. แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ded1 จำนวน 40-44 หน่วย และ dec2 จำนวน 4-5 หน่วย dorsal internal circular (dic) จำนวน 38-41 หน่วย vec จำนวน 48-53 หน่วย และ ventral internal circular (vic) จำนวน 32-36 หน่วย ดังภาพประกอบ 42จ. นอกจากนี้ยังพบว่าพยาธิชนิดนี้มี ventral pouch ปรากฏ ดังภาพประกอบ 42ค. ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพยาธิในวงศ์ Gastrothylacidae ตำแหน่งที่พบพยาธิชนิดนี้คือ กระจาเพาะผ้าขี้ริ้วของโคและกระบือ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Sey และ Prasitirat และ Nak-On และ Chontanarath พบว่าข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยดังกล่าว (Nak-On & Chontanarath, 2020; Sey & Prasitirat, 1994) ดังตาราง 16

ตาราง 16 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด *F. elongatus*

อวัยวะ	ขนาด (มิลลิเมตร)					
	ผลจากงานวิจัย		(Sey & Prasitirat, 1994)		(Nak-On, S., & Chontanarath, T, 2020)	
	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด
ความยาวลำตัว	13.00	28.00	3.20	20.10	3.00	22.24
ความกว้างลำตัว	3.00	5.00	1.60	3.20	1.64	7.21
เส้นผ่านศูนย์กลาง acetabulum	1.31	1.81	1.20	1.30	N/A	N/A
ความยาว acetabulum	N/A	N/A	N/A	N/A	0.90	2.44
ความกว้าง acetabulum	N/A	N/A	N/A	N/A	0.99	2.50
ความยาวคอหอย	0.55	0.99	0.50	0.70	0.46	0.87
ความกว้างคอหอย	0.58	0.82	0.02	0.50	0.47	0.82
ความยาวหลอดอาหาร	0.90	1.59	0.50	0.80	0.61	1.67
ความยาวอวัยวะด้านหน้า	2.15	3.13	N/A	N/A	0.38	3.06
ความกว้างอวัยวะด้านหน้า	1.68	2.96	N/A	N/A	0.52	2.58
ความยาวอวัยวะด้านท้าย	2.17	2.99	N/A	N/A	0.32	3.23
ความกว้างอวัยวะด้านท้าย	1.82	2.68	N/A	N/A	0.53	3.35
เส้นผ่านศูนย์กลางของอวัยวะ	N/A	N/A	0.70	1.10	N/A	N/A
ความยาวรังไข่	0.65	0.91	0.10	0.30	0.51	0.73
ความกว้างรังไข่	0.38	0.82	0.20	0.40	0.56	1.58



ภาพประกอบ 42 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด *F. elongatus*

ก. สไลด์ถาวรภาพเต็มตัว ข. sagittal section ส่วนหน้า ค. sagittal section ส่วนลำตัว

ง.-จ. sagittal section ส่วนท้าย

(ph): pharynx, (os): oral sucker, (es): esophagus, (in): intestine, (vp): ventral pouch,

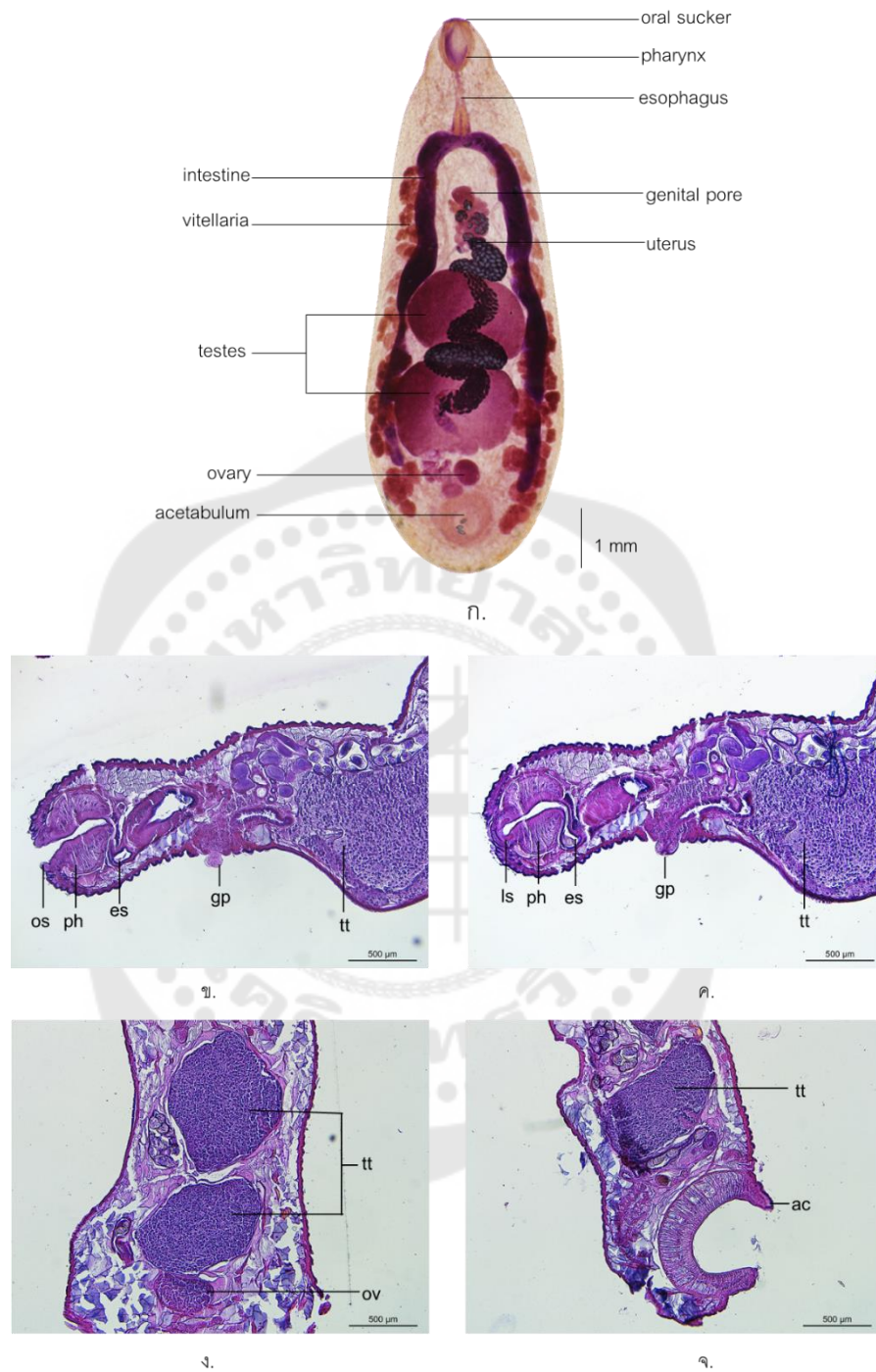
(gp): genital pore, (ac): acetabulum, (vt): vitellaria, (tt): testis/testes, (ov): ovary

4.4.3. *Orthocoelium dicranocoelium* (n = 10)

ลำตัวมีความยาวตั้งแต่ 9.00 – 11.0 มิลลิเมตร (9.75 ± 0.96) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 2.80 – 3.00 มิลลิเมตร (2.95 ± 0.10) ดังภาพประกอบ 43ก. ด้านหน้าพบ oral sucker มีขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.32 – 0.51 (0.42 ± 0.06) คอหอยมีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.53 – 1.05 มิลลิเมตร (0.78 ± 0.16) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.59 – 0.71 มิลลิเมตร (0.65 ± 0.04) ดังภาพประกอบ 43ข. คอหอยมีลักษณะแบบ dicranocoelium type เนื่องจากมี lip sphincter ดังภาพประกอบ 43ค. หลอดอาหารมีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.61 – 1.20 (0.86 ± 0.21) ลำไส้แยกเป็นสองทางแบบ bifurcated ขนานกับลำตัวยาวไปจนถึงเกือบ acetabulum พบ vitellaria กระจายตัวตั้งแต่ตำแหน่งทางแยกของลำไส้ไปจนถึงท้ายลำตัว genital pore ปรากฏอยู่ตำแหน่ง $\frac{1}{4}$ ของลำตัวใต้ทางแยกของลำไส้และเชื่อมต่อกับมดลูก รังไข่รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.39 – 0.60 มิลลิเมตร (0.50 ± 0.08) อยู่ตำแหน่งเหนือ acetabulum และได้ลักษณะ ลักษณะมีลักษณะค่อนข้างกลม (unlobed) จัดเรียงตัวแบบ tandem จำนวน 2 ก้อน ก้อนบนมีขนาดความยาวตั้งแต่ 1.76 – 2.29 มิลลิเมตร (2.04 ± 0.16) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 1.24 – 1.83 มิลลิเมตร (1.53 ± 0.20) ก้อนล่างมีขนาดความยาวตั้งแต่ 1.65 – 2.42 มิลลิเมตร (2.08 ± 0.22) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 1.29 – 2.08 มิลลิเมตร (1.66 ± 0.23) ดังภาพประกอบ 43ง. ด้านท้ายลำตัวพบ acetabulum มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1.00 – 1.26 มิลลิเมตร (1.10 ± 0.08) มีลักษณะแบบ streptocoelium type เนื่องจาก acetabulum มีขนาดเล็ก ไม่มี papillae เส้นใยของกล้ามเนื้อพัฒนาเต็มที่ โดยมี d.e.c. จำนวน 10-12 หน่วย, d.i.c. จำนวน 22-23 หน่วย, v.e.c. จำนวน 12-14 หน่วย, v.i.c. จำนวน 22-25 หน่วย ดังภาพประกอบ 43จ. พยาธิชนิดถูกจัดอยู่ในวงศ์ Paramphistomidae เนื่องจากไม่มี ventral pouch ตำแหน่งที่พบพยาธิชนิดนี้คือ กระเพาะน้ำขี้วัวของโคและกระบือ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Sey และ Prasitirat และ Eduardo พบว่าขนาดของ *O. dicranocoelium* ในงานวิจัยครั้งนี้มีความใกล้เคียงกันกับรายงานวิจัยก่อนหน้า (Eduardo, 1985; Sey & Prasitirat, 1994) ดังตาราง 17

ตาราง 17 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium*

อวัยวะ	ขนาด (มิลลิเมตร)					
	ผลจากงานวิจัย		(Sey & Prasitirat, 1994)		(Eduardo, 1985)	
	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด
ความยาวลำตัว	9.00	11.00	4.80	7.23	4.10	7.10
ความกว้างลำตัว	2.80	3.00	1.30	2.33	1.10	2.20
เส้นผ่านศูนย์กลางacetabulum	1.00	1.26	0.72	1.16	0.50	1.10
ความยาวคอหอย	0.53	1.05	0.48	0.86	0.30	0.80
ความกว้างคอหอย	0.59	0.71	0.31	0.49	N/A	N/A
ความยาวหลอดอาหาร	0.61	1.20	0.46	1.15	0.30	1.10
ความยาวอวัยวะด้านหน้า	1.76	2.29	0.94	1.23	0.60	1.20
ความกว้างอวัยวะด้านหน้า	1.24	1.83	0.75	1.09	0.50	1.10
ความยาวอวัยวะด้านท้าย	1.65	2.42	1.01	1.32	0.70	1.20
ความกว้างอวัยวะด้านท้าย	1.29	2.08	0.78	1.08	0.50	1.20
เส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่	0.39	0.60	0.30	0.45	0.20	0.40



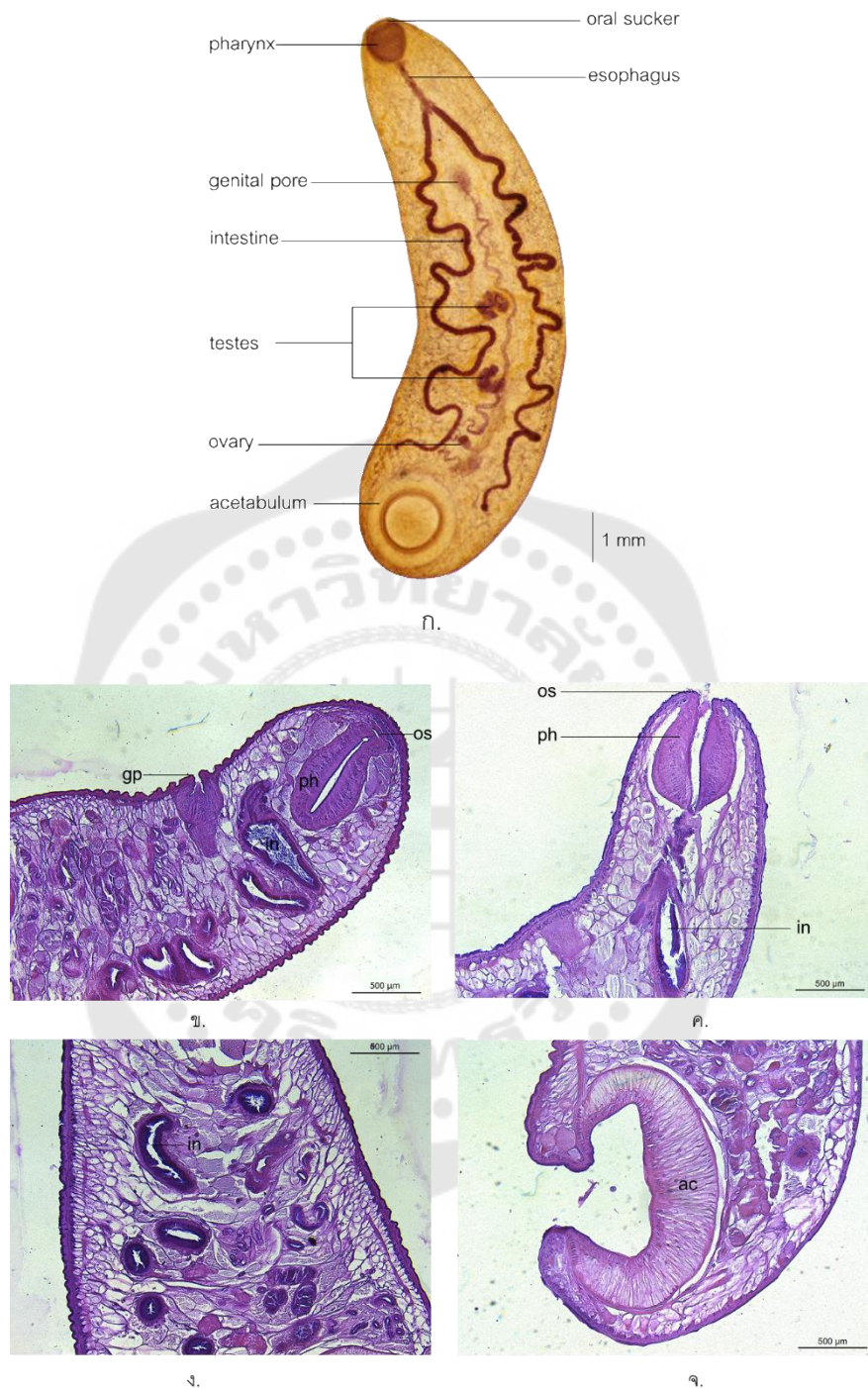
ภาพประกอบ 43 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด *O. dicranocoelium*
 ก.สไลด์ถาวรภาพเต็มตัว ข.-ค. sagittal section ส่วนหน้า ง.-จ. sagittal section ส่วนท้าย
 (ph): pharynx, (os): oral sucker, (es): esophagus, (ls): lip sphincter,
 (gp): genital pore, (ac): acetabulum, (tt): testis/testes, (ov): ovary

4.4.4. *Paramphistomum epiclitum* (n = 14)

ลำตัวมีขนาดความยาวตั้งแต่ 8.00 – 13.00 มิลลิเมตร (10.04 ± 1.45) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 3.00 – 4.00 มิลลิเมตร (3.36 ± 0.46) ดังภาพประกอบ 44ก. ด้านหน้าลำตัวพบ oral sucker เชื่อมต่อกับคอกอหอยซึ่งมีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.71 – 1.22 มิลลิเมตร (0.88 ± 0.16) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.66 – 1.06 มิลลิเมตร (0.83 ± 0.13) มีลักษณะแบบ calicophoron type เนื่องจากคอกอหอยไม่มี papillae ไม่มี lip sphincter แต่มี middle circular unit ที่พัฒนาไม่เต็มที่ ดังภาพประกอบ 44ข.-ค. ลำดับถัดมาเป็นหลอดอาหารมีความยาวตั้งแต่ 0.75 – 1.58 มิลลิเมตร (1.11 ± 0.33) ลำไส้แยกออกเป็น 2 ทาง แบบ bifurcated เป็นท่อคดยาวขนานข้างลำตัวจากตำแหน่งหลอดอาหารยาวไปถึงตำแหน่งเหนือ acetabulum ดังภาพประกอบ 44ง. อวัยวะมีลักษณะเป็นหยักลึก จำนวน 2 ก้อน เรียงตัวแบบ tandem อยู่ตำแหน่งกึ่งกลางของลำตัว โดยอวัยวะด้านหน้ามีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.40 – 0.75 มิลลิเมตร (0.50 ± 0.13) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.24 – 0.72 มิลลิเมตร (0.45 ± 0.16) ส่วนอวัยวะด้านหลังมีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.39 – 0.76 มิลลิเมตร (0.51 ± 0.14) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.30 – 0.72 มิลลิเมตร (0.45 ± 0.13) รังไข่มีลักษณะค่อนข้างกลม อยู่ตำแหน่งด้านหลังของอวัยวะ มีขนาดความยาวตั้งแต่ 0.24 – 0.46 มิลลิเมตร (0.38 ± 0.10) ขนาดความกว้างตั้งแต่ 0.21 – 0.36 มิลลิเมตร (0.28 ± 0.07) มดลูกมีลักษณะเป็นท่อขดพันกันจากตำแหน่งรังไข่ไปเปิดตำแหน่ง genital pore ที่อยู่ตำแหน่งใต้หลอดอาหาร ด้านท้ายพบ acetabulum มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1.57 – 2.43 มิลลิเมตร (2.08 ± 0.26) มีลักษณะแบบ paramphistomum type เนื่องจาก acetabulum มีขนาดเล็ก ไม่มี papillae ที่ผิว มี d.e.c. แบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ dec1 จำนวน 12-16 หน่วย dec2 จำนวน 28-33 หน่วย dic จำนวน 40-44 หน่วย vec จำนวน 18-23 หน่วย และ vic จำนวน 22-26 หน่วย ดังภาพประกอบ 44จ. พยาธิชนิดนี้ไม่มี ventral pouch จึงจัดอยู่ในวงศ์ Paramphistomidae ตำแหน่งที่พบพยาธิชนิดนี้ คือ ภาวะพาหะผ้าขี้ริ้วของโคและกระบือ เมื่อนำข้อมูลขนาดของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Sey และ Prasitirat, Eduardo และ Khan พบว่ามีความสอดคล้องกัน (Eduardo, 1982b; Khan et al., 2020; Sey & Prasitirat, 1994) ดังตาราง 18

ตาราง 18 ตารางเปรียบเทียบขนาดของพยาธิชนิด *P. epiclitum*

อวัยวะ	ขนาด (มิลลิเมตร)						
	ผลจากงานวิจัย		(Sey & Prasitirat, 1994)		(Eduardo, 1982)		(Khan, 2019)
	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย
ความยาวลำตัว	8.00	13.00	5.30	9.10	5.80	8.20	7.17
ความกว้างลำตัว	3.00	4.00	0.82	2.40	0.50	1.90	3.28
เส้นผ่านศูนย์กลาง acetabulum	1.57	2.43	1.02	1.82	0.70	1.50	N/A
ความยาวคอหอย	0.71	1.22	0.60	1.01	0.50	9.20	1.58
ความกว้างคอหอย	0.66	1.06	0.31	0.77	N/A	N/A	0.34
ความยาวหลอดอาหาร	0.75	1.58	0.40	1.09	N/A	N/A	1.31
ความยาวอวัยวะด้านหน้า	0.40	0.75	0.51	1.10	0.30	0.80	1.80
ความกว้างอวัยวะด้านหน้า	0.24	0.72	0.77	1.48	0.50	1.20	1.22
ความยาวอวัยวะด้านท้าย	0.39	0.76	N/A	N/A	0.60	1.20	1.65
ความกว้างอวัยวะด้านท้าย	0.30	0.72	N/A	N/A	1.10	1.40	0.47
ความยาวรังไข่	0.24	0.46	0.24	0.40	0.20	0.30	0.45
ความกว้างรังไข่	0.21	0.36	0.30	0.39	N/A	N/A	0.34



ภาพประกอบ 44 สัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้ชนิด *P. epiclitum*

ก. สไลด์ถาวรภาพเต็มตัว ข.-ค. sagittal section ส่วนหน้า

ค. sagittal section ส่วนลำตัว ง. sagittal section ส่วนท้าย

(ph): pharynx, (os): oral sucker, (in): intestine, (gp): genital pore, (ac): acetabulum

4.5. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้รั้วด้วยยีนบนไมโทคอนเดรีย

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนบนไมโทคอนเดรียซึ่งออกแบบด้วยวิธี manual design เพื่อระบุชนิดของพยาธิเป้าหมาย โดยการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นยีนและโปรตีนชนิดใด และสร้างแผนภาพวิวัฒนาการเพื่อหาความสัมพันธ์ของพยาธิ ได้ผลดังนี้

4.5.1. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ *C. spatiosus*

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_COX1 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* และนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTx พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน cytochrome c oxidase subunit I กับพยาธิหลายชนิด โดยพยาธิที่มีค่าร้อยละความเหมือน (percent identity) สูงที่สุด 2 อันดับแรก ได้แก่ *G. crumenifer* (93.20) และ *F. elongatus* (92.23) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTXn พบว่ามีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 กับพยาธิหลายชนิด ซึ่งพยาธิที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุด 2 อันดับแรก ได้แก่ *G. crumenifer* (90.47) และ *F. elongatus* (89.83)

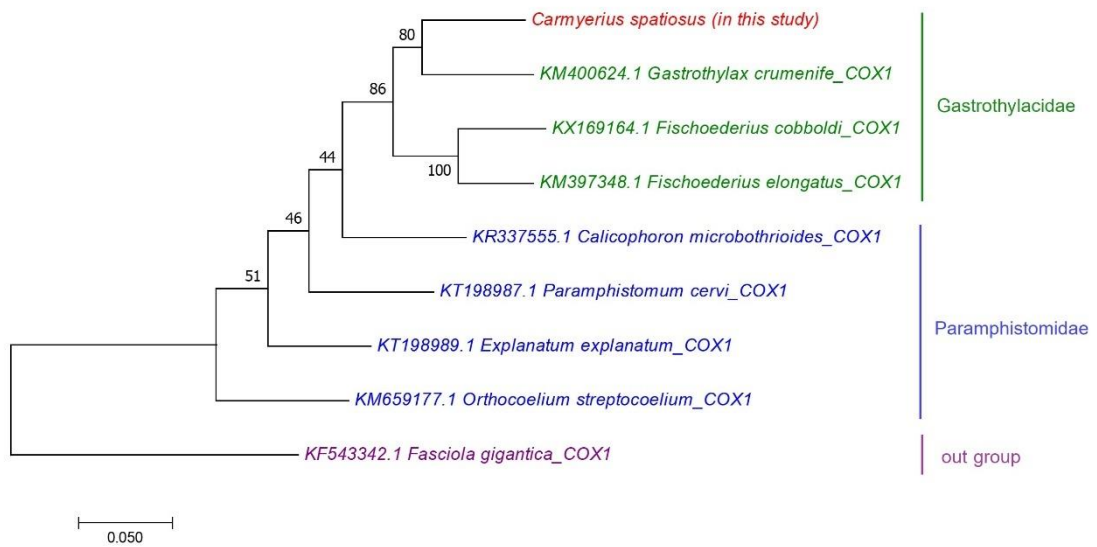
เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_CYTB เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* และนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน cytochrome B ของพยาธิหลายชนิด ได้แก่ *G. crumenifer*, *F. elongatus* และ *Fischoederius cobboldi* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนสูงถึงร้อยละ 95.70 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากการศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียจากจีโนมของพยาธิหลายชนิด โดยพบว่า 3 ลำดับแรกที่มีความเหมือนสูงสุด ได้แก่ *F. elongatus*, *F. cobboldi* และ *G. crumenifer* โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 89.94, 89.20 และ 89.18 ตามลำดับ ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* จากยีน CYTB ในฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นจึงปรากฏข้อมูลของพยาธิชนิดใกล้เคียงแทน

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_ND1 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* และนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 1 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* และ *G. crumenifer* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 85.97 และ 85.52 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน ND1 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* และ *G. crumenifer* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 87.29 และ 87.28 ตามลำดับ ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานข้อมูลลำดับ

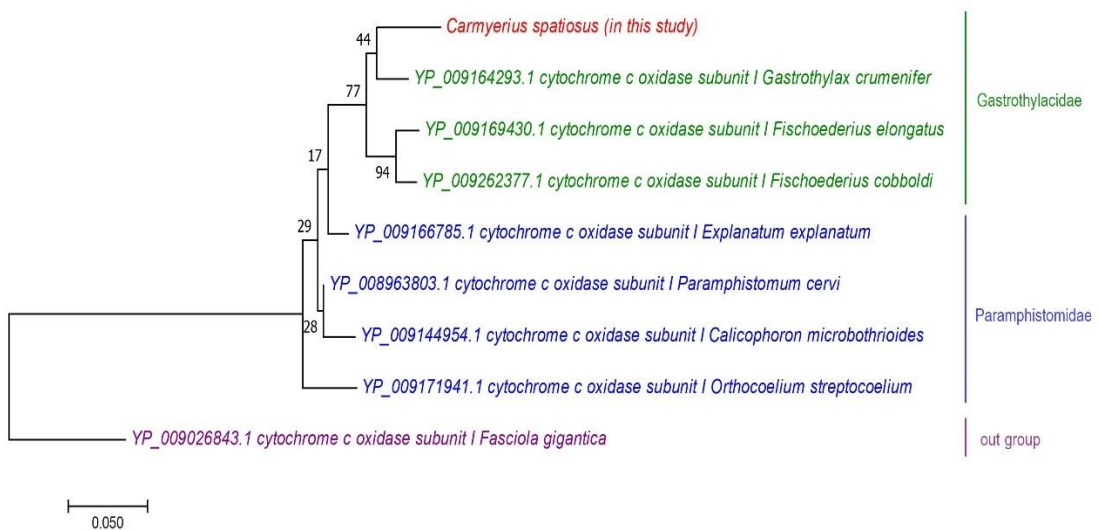
นิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* จากยีน *ND1* ในฐานะข้อมูล GenBank ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์จึงพบข้อมูลของพยาธิกลุ่มใกล้เคียงแทน

เมื่อใช้โปรแกรม Uni_ND4 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* และนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 4 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* และ *G. crumenifer* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 87.89 และ 87.20 ตามลำดับ เมื่อนำเข้าวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีน *ND4* ของพยาธิชนิด *G. crumenifer* และ *F. elongatus* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 86.18 และ 86.11 ตามลำดับ ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* จากยีน *ND4* ในฐานะข้อมูล GenBank ดังนั้นข้อมูลที่แสดงในโปรแกรม BLAST จึงเป็นข้อมูลของกลุ่มพยาธิที่ใกล้เคียงแทน

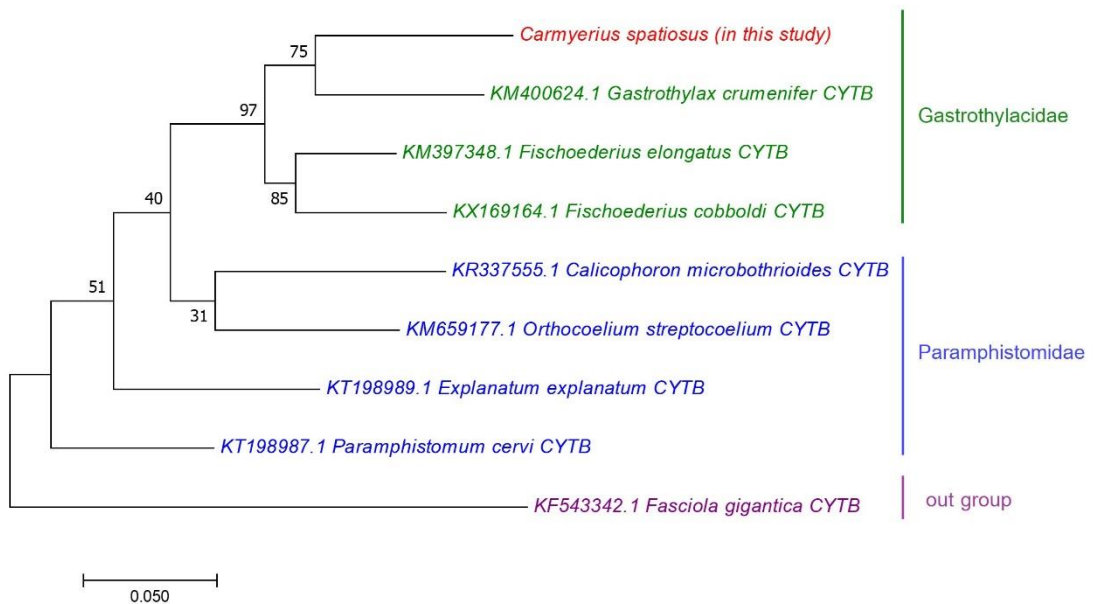
จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *CYTb*, *ND1* และ *ND4* ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* มาสร้างแผนภาพวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood และ Poisson correction model พบว่าพยาธิชนิด *C. spatiosus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มพยาธิวงศ์ Gastrothylacidae ดังภาพประกอบ 45-52 จากผลทั้งหมดที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* ในฐานะข้อมูล GenBank ยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิดดังกล่าวจากยีน *CYTb*, *ND1* และ *ND4* ดังนั้นผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ร่วมกับการสร้างแผนภาพวิวัฒนาการจึงทำให้พยาธิชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพยาธิในสกุล *Fischoederius* และ *Gastrothylax* ซึ่งทั้ง 2 สกุลจัดอยู่ในวงศ์ Gastrothylacidae เช่นเดียวกับพยาธิชนิด *C. spatiosus*



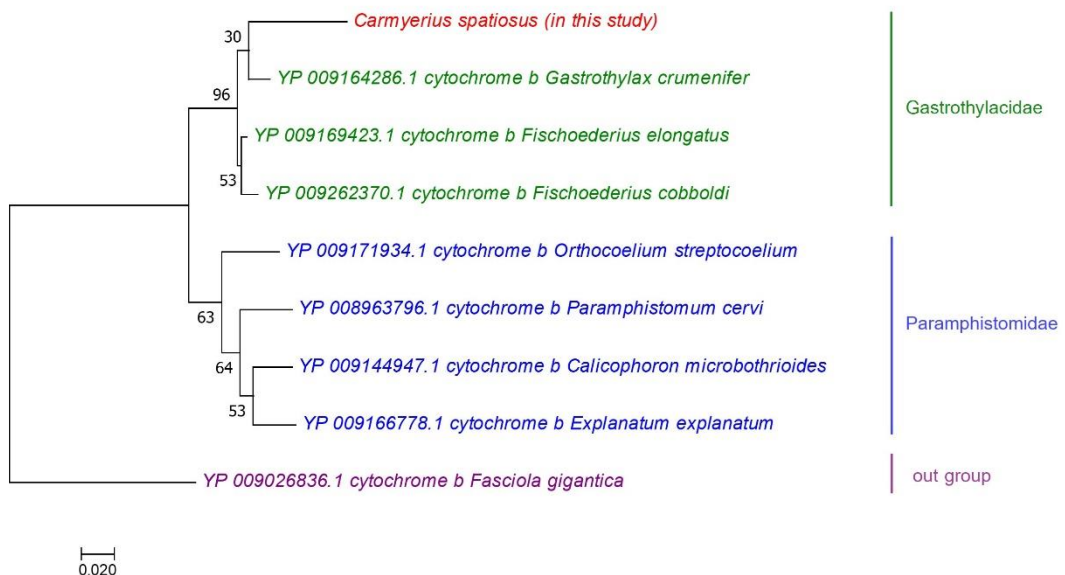
ภาพประกอบ 45 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1



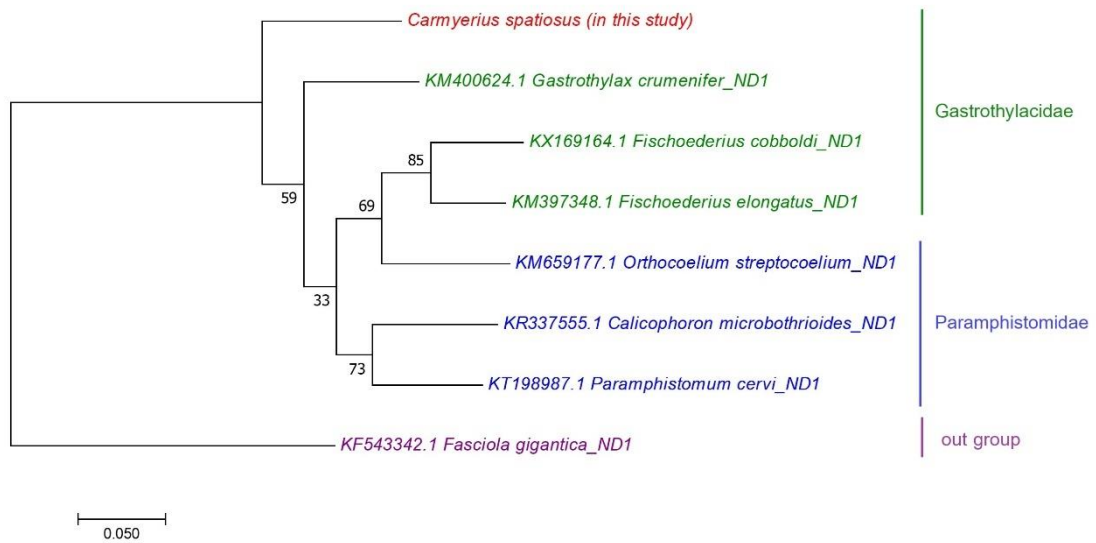
ภาพประกอบ 46 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1



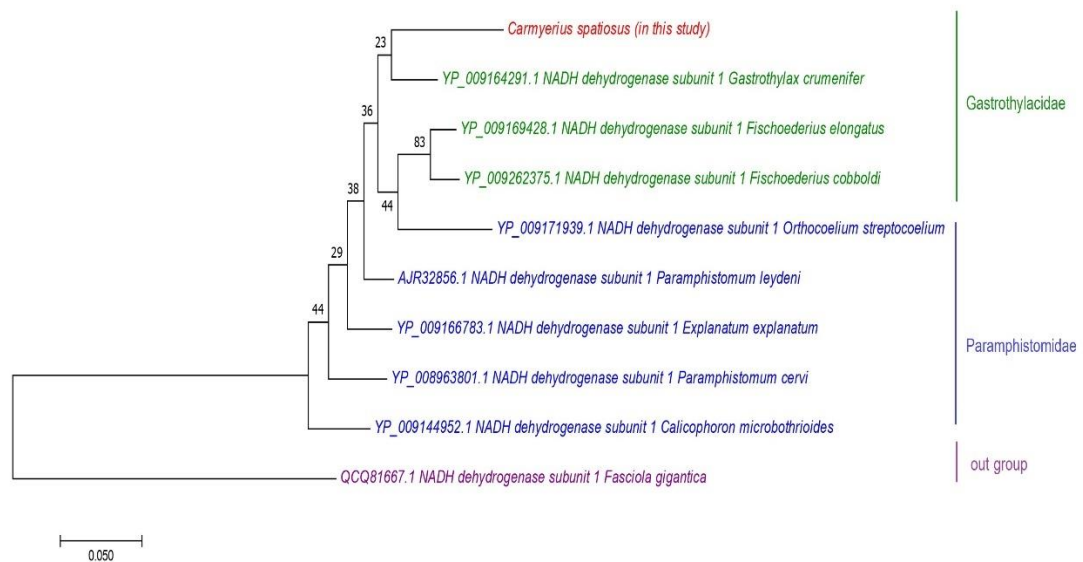
ภาพประกอบ 47 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTb*



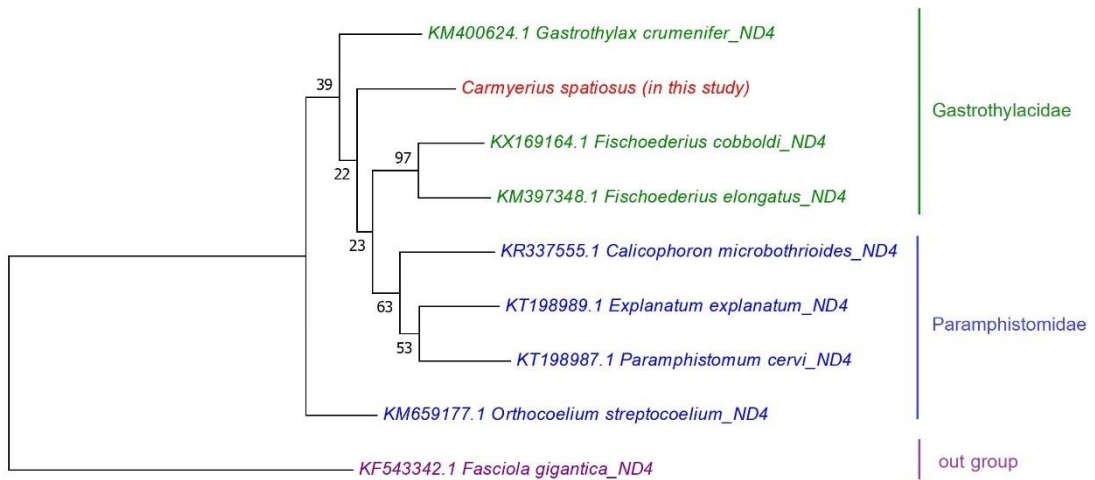
ภาพประกอบ 48 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *CYTb*



ภาพประกอบ 49 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND1

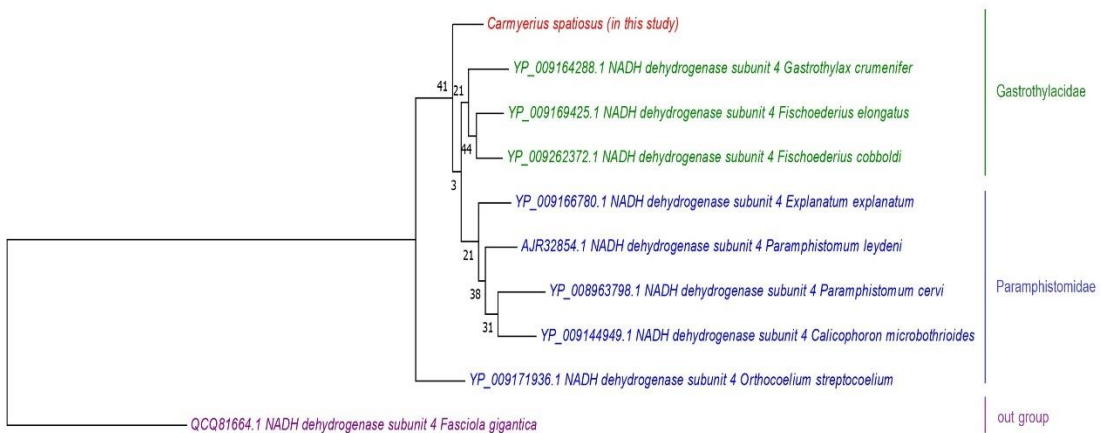


ภาพประกอบ 50 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND1



0.050

ภาพประกอบ 51 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND4



0.050

ภาพประกอบ 52 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND4

4.5.2. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ *F. elongatus*

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_COX1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *F. elongatus* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน cytochrome c oxidase subunit I กับพยาธิชนิด *F. elongatus* ในฐานข้อมูลโดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 97.06 เมื่อนำมาวิเคราะห์ BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีน COX1 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* ในฐานข้อมูลโดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 93.87

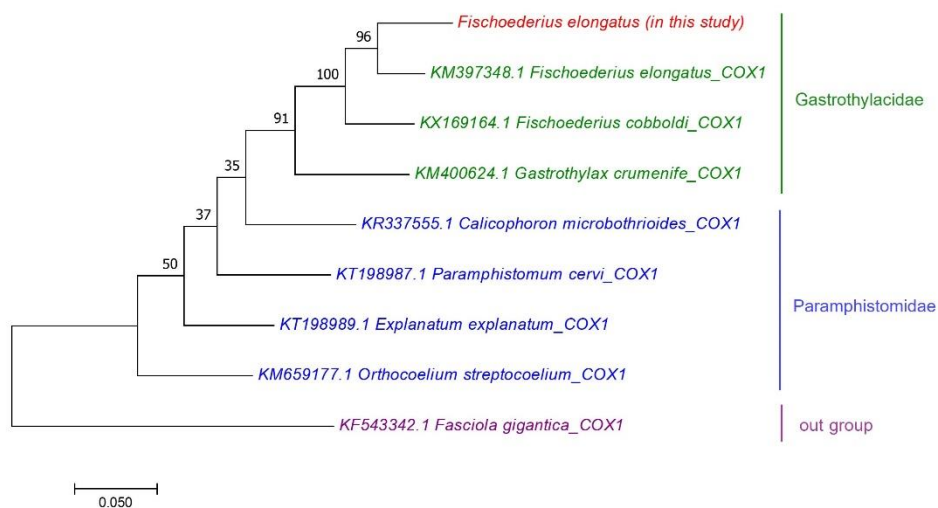
เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_CYTB เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *F. elongatus* ในโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน cytochrome B กับพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ *F. elongatus* และ *F. cobboldi* โดยมียค่าร้อยละความเหมือนสูงถึงร้อยละ 95.68 และ 95.68 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียจากจีโนมของพยาธิชนิด *F. elongatus* มากที่สุด โดยมียค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 92.70

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_ND1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *F. elongatus* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 1 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* โดยมียค่าความเหมือนร้อยละ 91.71 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน ND1 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* ในฐานข้อมูล โดยมียค่าร้อยละความเหมือนสูงถึง 91.08

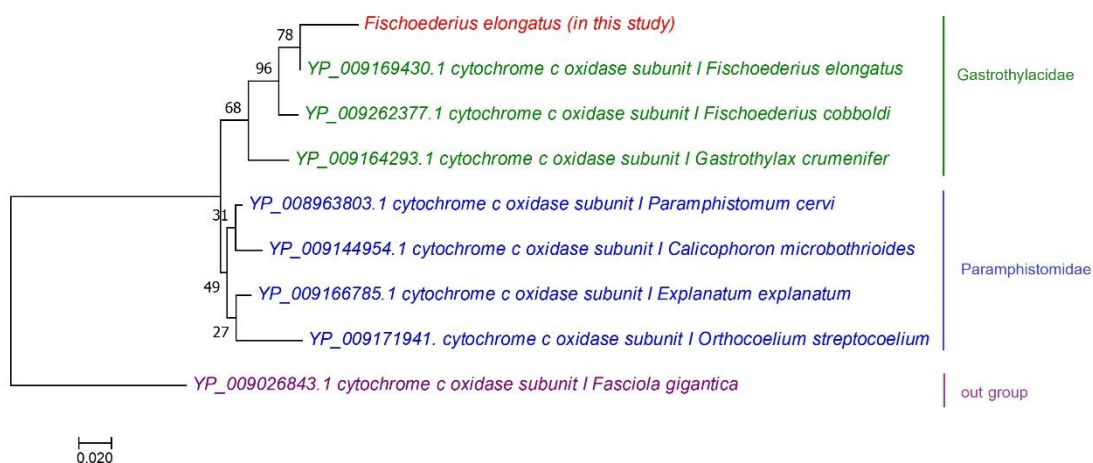
เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_ND4 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *F. elongatus* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนร้อยละ 92.98 กับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 4 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษามีค่าความเหมือนร้อยละ 91.59 กับยีน ND4 ของพยาธิชนิด *F. elongatus*

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน COX1, CYTB, ND1 และ ND4 ของพยาธิชนิดนี้ มาสร้างแผนภาพวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model พบว่าพยาธิชนิด *F. elongatus* จากการศึกษากลับมาจัดอยู่ในกลุ่มพยาธิวงศ์ Gastrothylacidae และมีวิวัฒนาการใกล้ชิดกับพยาธิชนิด *F. elongatus* จากฐานข้อมูลสอดคล้องกับแผนภาพวิวัฒนาการที่สร้างโดยใช้ Poisson correction model จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิดดังกล่าวมาทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ดังภาพประกอบ 53-60 แสดงให้เห็นว่าการระบุชนิดด้วยโปรแกรม BLAST ร่วมกับการสร้างแผนภาพวิวัฒนาการมีความ

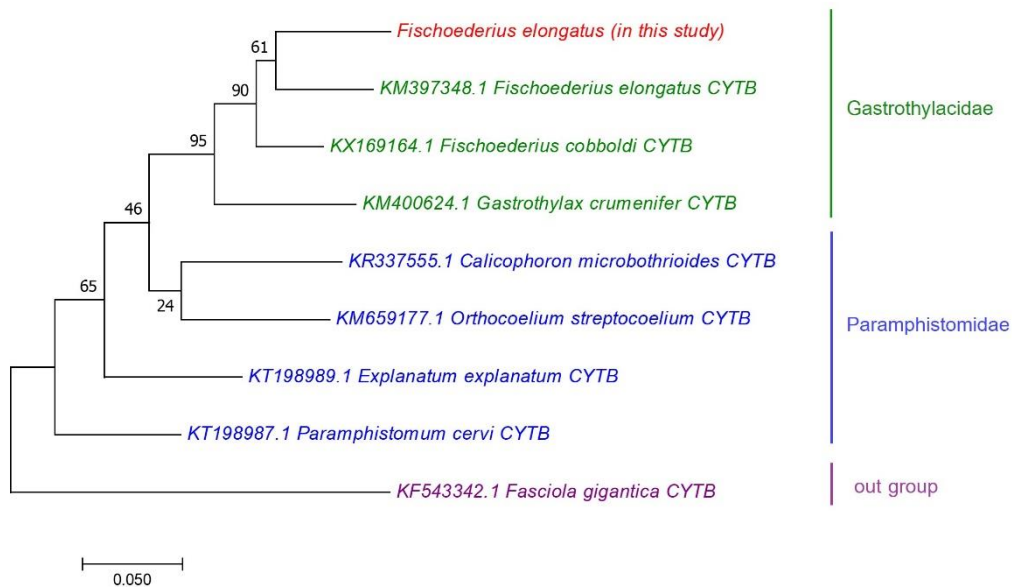
สอดคล้องกับการระบุชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าพยาธิที่ศึกษาเป็นพยาธิชนิด *F. elongatus*



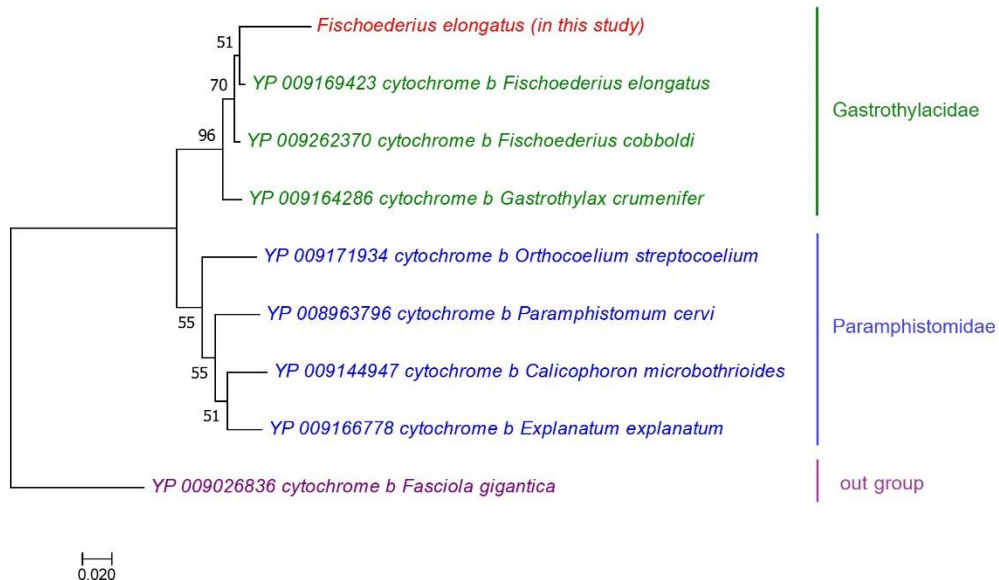
ภาพประกอบ 53 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1



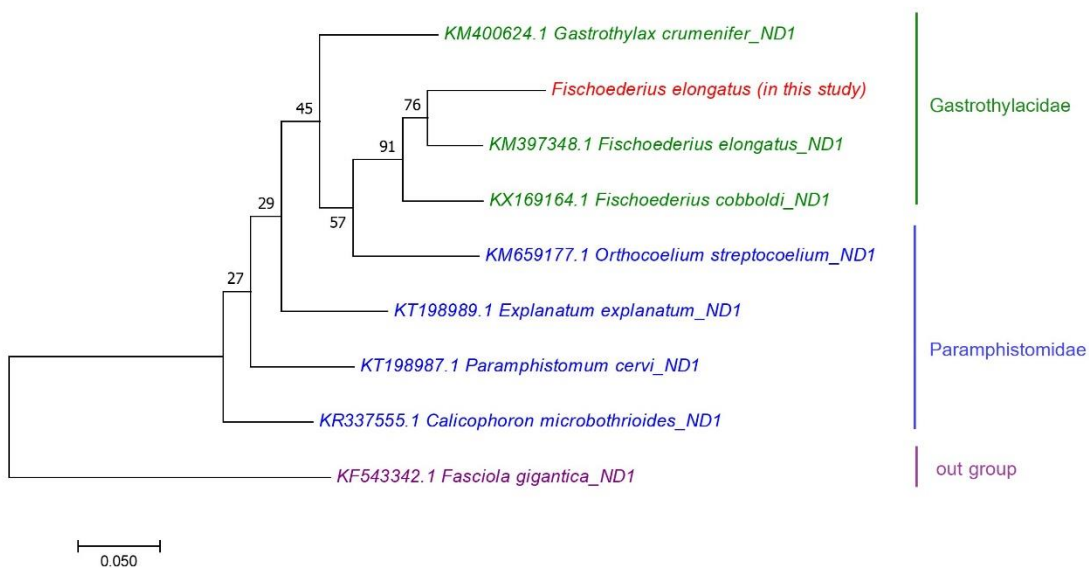
ภาพประกอบ 54 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1



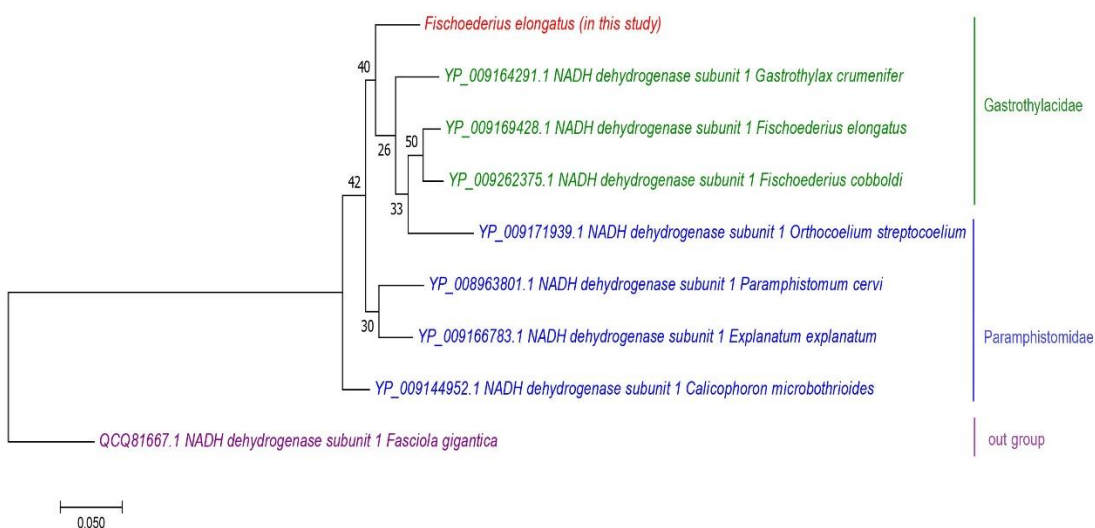
ภาพประกอบ 55 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CYTB



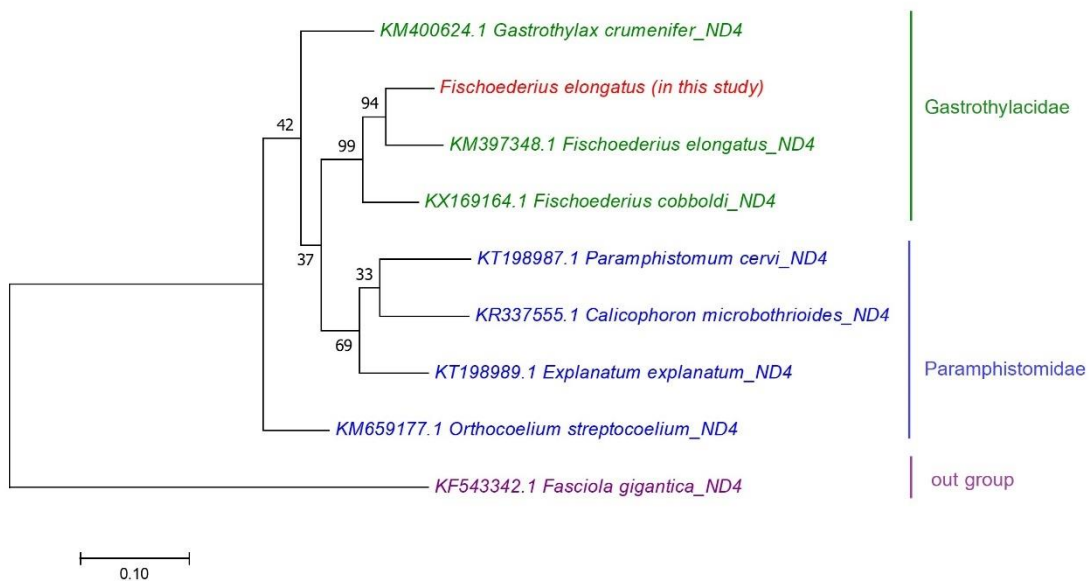
ภาพประกอบ 56 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน CYTB



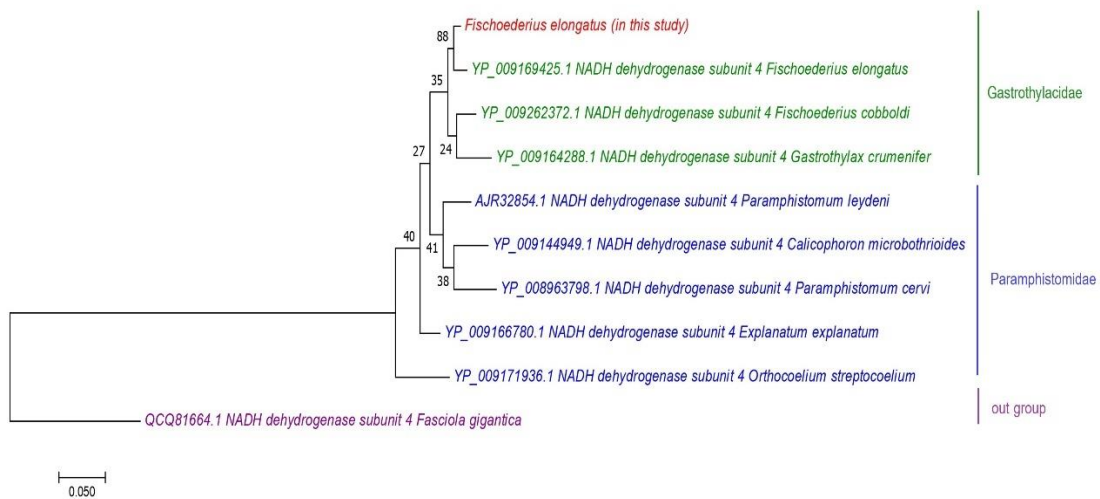
ภาพประกอบ 57 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND1



ภาพประกอบ 58 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND1



ภาพประกอบ 59 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND4



ภาพประกอบ 60 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND4

4.5.3. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ *O. dicranocoelium*

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_COX1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน cytochrome c oxidase subunit I ของพยาธิในวงศ์ Paramphistomidae หลายชนิด เช่น ชนิด *P. cervi* (ร้อยละ 90.43), *C. microbothrioides* (ร้อยละ 89.51) และ *O. streptocoelium* (ร้อยละ 88.58) เป็นต้น และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน COX1 ของพยาธิชนิด *E. explanatum* และ *C. microbothrioides* ซึ่งเป็นพยาธิที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุด 2 อันดับแรก เท่ากับ 85.80 และ 85.46 ตามลำดับ

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_CYTB เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* เข้าสู่โปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน cytochrome B กับพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ *P. leydeni* และ *E. explanatum* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 91.42 และ 91.42 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียจากจีโนมของพยาธิหลายชนิด เช่น *E. explanatum* (ร้อยละ 87.62), *F. cobboldi* (ร้อยละ 86.84), *F. elongatus* (ร้อยละ 86.07) และ *Orthocoelium steptocoelium* (ร้อยละ 85.96) เป็นต้น

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_ND1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 1 ของพยาธิชนิด *E. explanatum* ร้อยละ 82.86 และ *P. leydeni* ร้อยละ 83.81 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับยีน ND1 ของพยาธิชนิด *E. explanatum* ร้อยละ 86.66

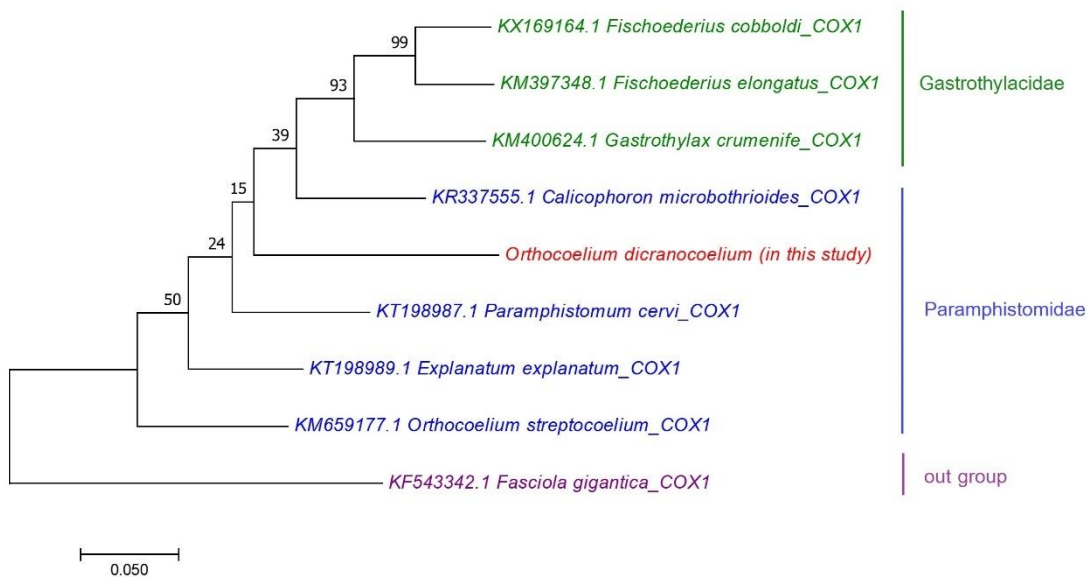
เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_ND4 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 1 ของพยาธิชนิด *P. leydeni* ร้อยละ 87.55 และ *P. cervi* ร้อยละ 86.75 และเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับยีน ND4 ของพยาธิชนิด *P. cervi*, *E. explanatum* และ *C. microbothrioides* ซึ่งเป็นพยาธิ 3 ชนิดที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุด เท่ากับ 85.60, 84.40 และ 84.11 ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* จากยีน COX1, CYTB, ND1 และ ND4 มาสร้างแผนภาพวิวัฒนาการโดยใช้ Kimura 2-parameter model ด้วยวิธี Maximum Likelihood และสร้างแผนภาพวิวัฒนาการโดยใช้ Poisson correction model พบว่า

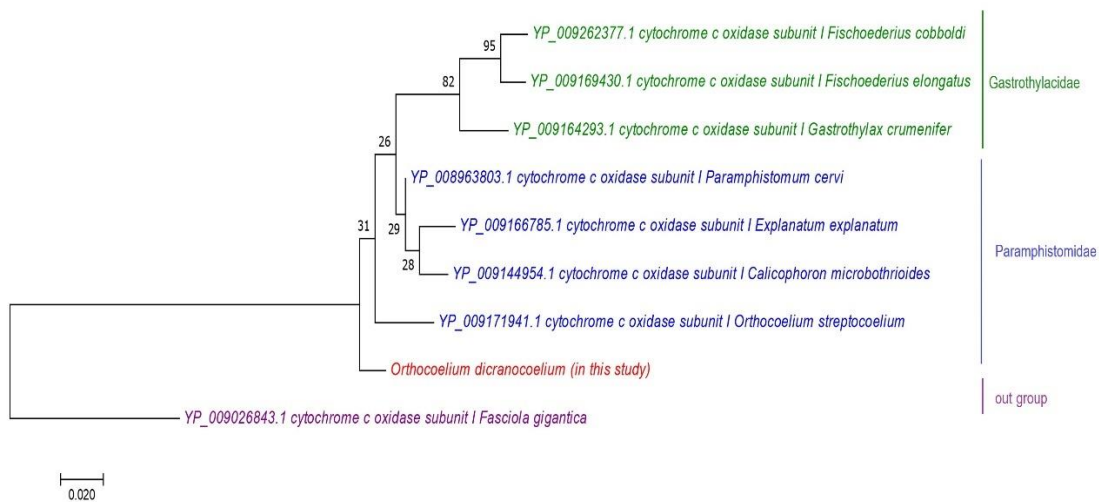
พยาธิชนิด *O. dicranocoelium* จากการศึกษากฎจัดอยู่ในกลุ่มพยาธิวงค์ Paramphistomidae ดังภาพประกอบ 61-68

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาระบุได้ว่าพยาธิที่นำมาศึกษาเป็นชนิด *O. dicranocoelium* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน COX1, ND1, CYTB และ ND4 ของพยาธิชนิดดังกล่าวในฐานข้อมูล GenBank มาก่อน ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST จึงไม่ปรากฏข้อมูลของพยาธิชนิดนี้ แต่ปรากฏข้อมูลของกลุ่มพยาธิที่ใกล้เคียงกับพยาธิชนิดดังกล่าวแทน ผลดังกล่าวสอดคล้องกับกับแผนภาพวิวัฒนาการซึ่งจัดให้พยาธิชนิด *O. dicranocoelium* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพยาธิในสกุล *Paramphistomum*, *Orthocoelium*, *Calicophoron* และ *Explanatum* ซึ่งจัดเป็นพยาธิวงค์ Paramphistomidae เช่นเดียวกับพยาธิชนิด *O. dicranocoelium*

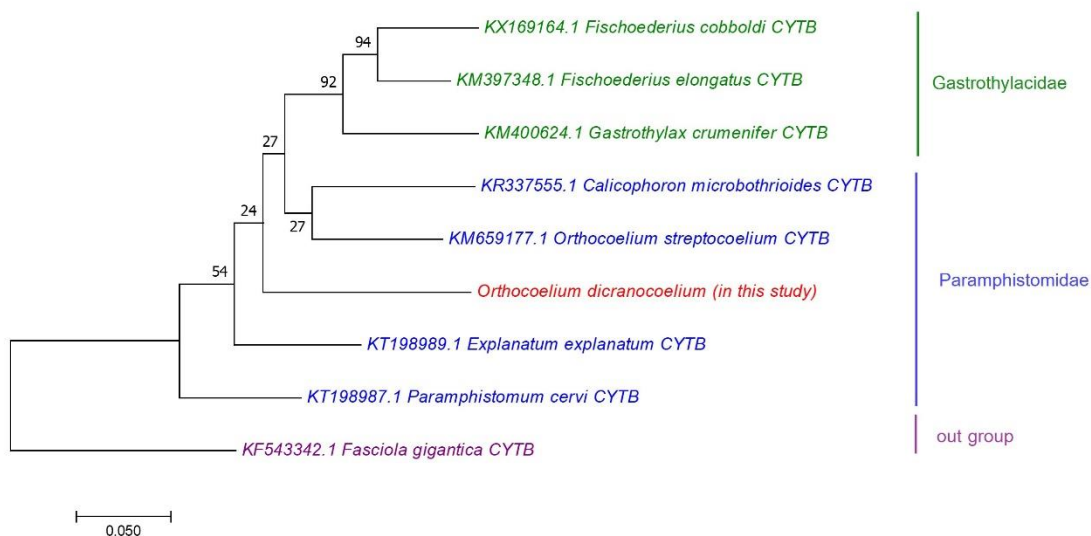




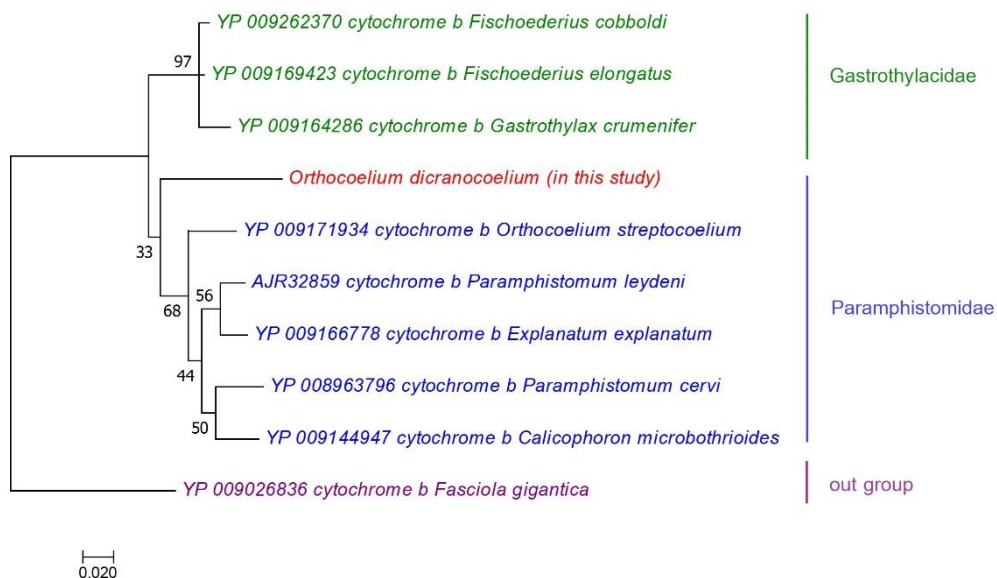
ภาพประกอบ 61 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1



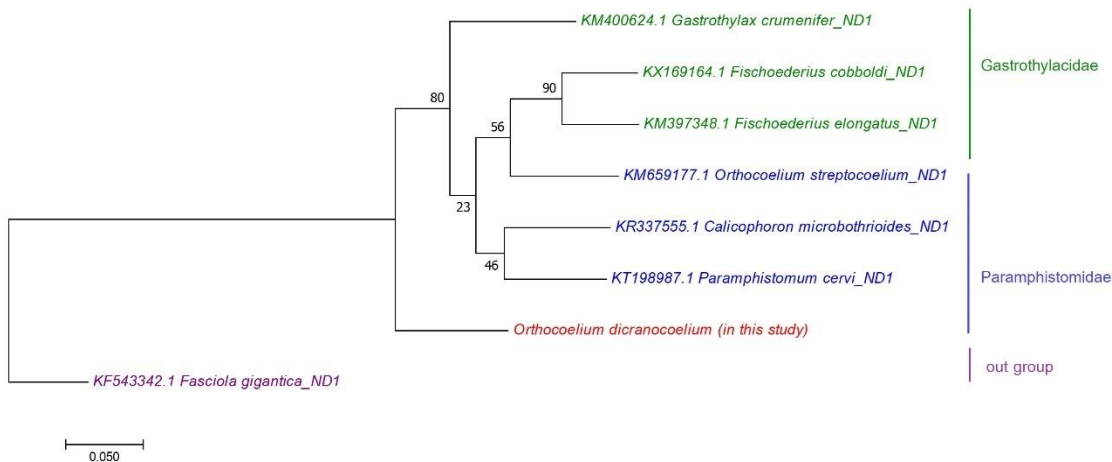
ภาพประกอบ 62 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1



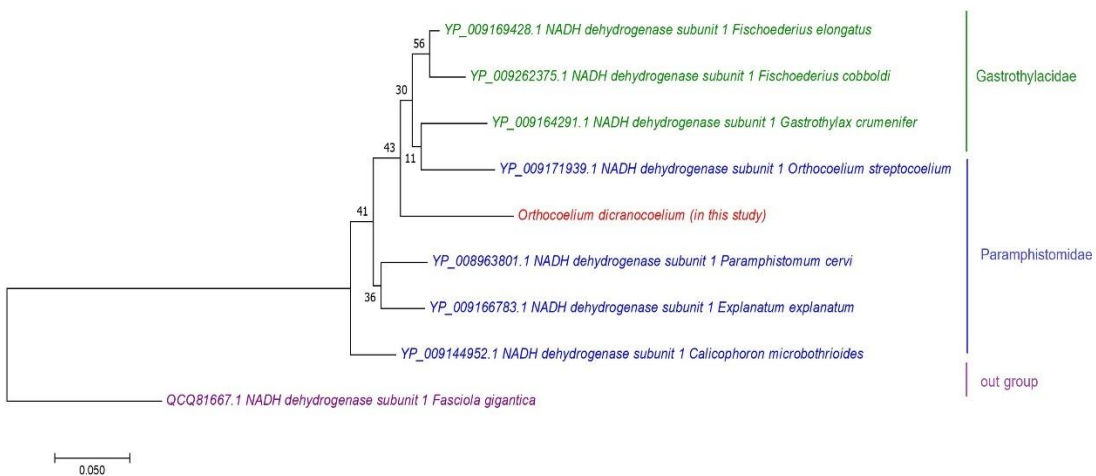
ภาพประกอบ 63 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTb*



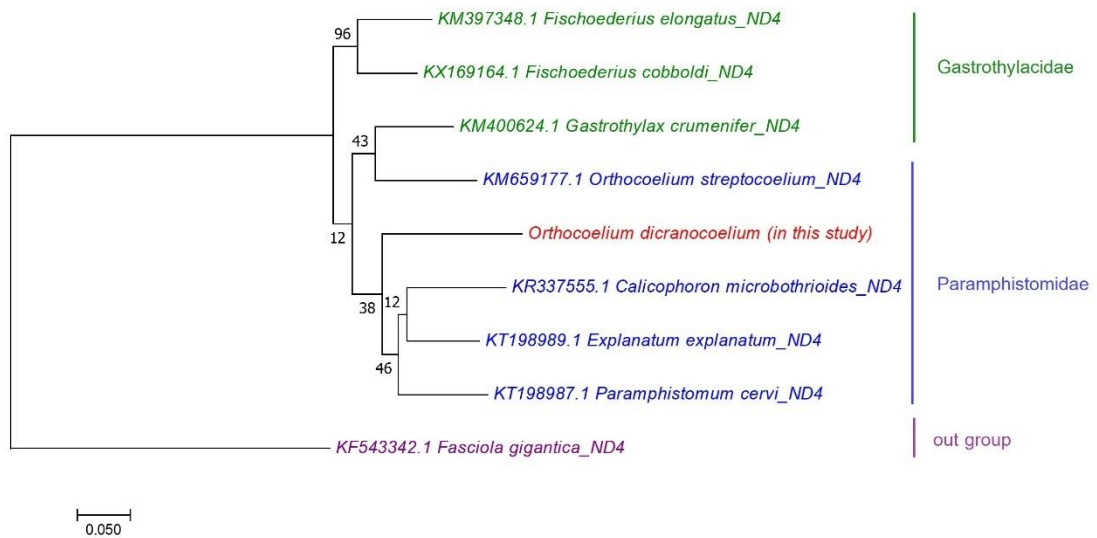
ภาพประกอบ 64 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *CYTb*



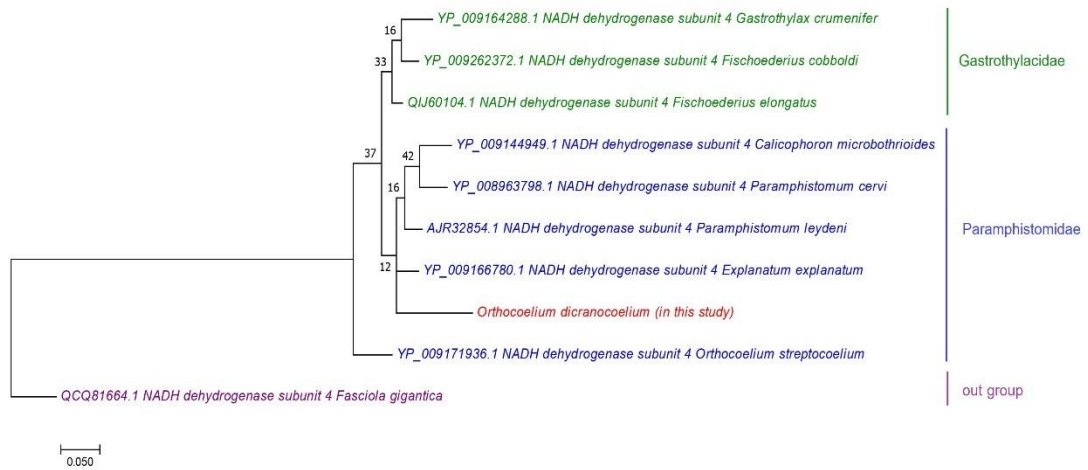
ภาพประกอบ 65 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
 สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND1



ภาพประกอบ 66 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
 สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND1



ภาพประกอบ 67 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND4



ภาพประกอบ 68 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND4

4.5.4. ผลการยืนยันชนิดของพยาธิ *P. epiclitum*

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_COX1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีค่าความเหมือนกับโปรตีน cytochrome c oxidase subunit I ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ในฐานข้อมูลสูงถึงร้อยละ 96.72 และเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษามีความเหมือนกับยีน COX1 ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ในฐานข้อมูล GenBank โดยมีค่าร้อยละความเหมือนสูงถึง 99.46

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_CYTB เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* เข้าสู่โปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน cytochrome B ของพยาธิ 2 ชนิด ได้แก่ *P. cervi* และ *P. leydeni* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 91.75 และ 90.43 ตามลำดับ จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียจากจีโนมของพยาธิหลายชนิด เช่น *F. elongatus*, *E. explanatum* และ *P. cervi* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับร้อยละ 87.25, 87.25 และ 87.16 ตามลำดับ

เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_ND1 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 1 ของพยาธิชนิด *P. leydeni* ซึ่งมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 87.96 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีน ND1 ของพยาธิชนิด *E. explanatum* โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับ 86.51

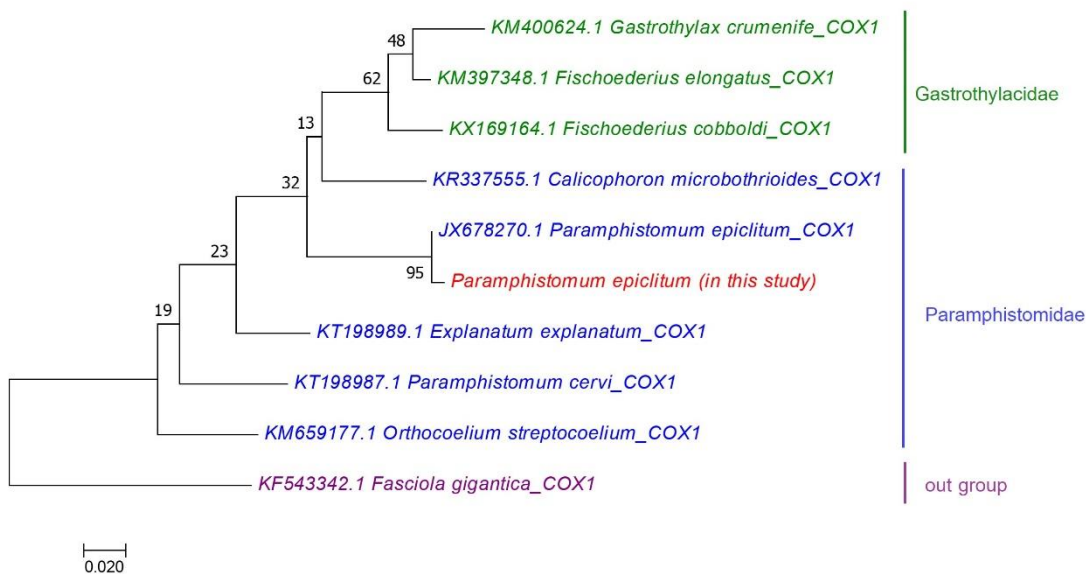
เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uni_ND4 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน NADH dehydrogenase subunit 4 ของพยาธิชนิด *P. leydeni* และ *E. explanatum* ซึ่งเป็นพยาธิ 2 ชนิดที่มีค่าความเหมือนสูงที่สุด เท่ากับ 85.40 และ 85.40 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษามีความเหมือนกับยีน ND4 ของพยาธิชนิด *P. cervi* โดยเป็นชนิดของพยาธิที่มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุดที่ เท่ากับ 85.80

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน COX1, CYTB, ND1 และ ND4 ของพยาธิชนิดนี้ มาสร้างแผนภาพวิวัฒนาการโดยใช้ Kimura 2-parameter model ด้วยวิธี Maximum Likelihood และสร้างแผนภาพวิวัฒนาการโดยใช้ Poisson correction model พบว่าพยาธิชนิด *P. epiclitum* จากการศึกษากฎจัดอยู่ในกลุ่มพยาธิวงศ์ Paramphistomidae ดังภาพประกอบ 69-76 ตามลำดับ

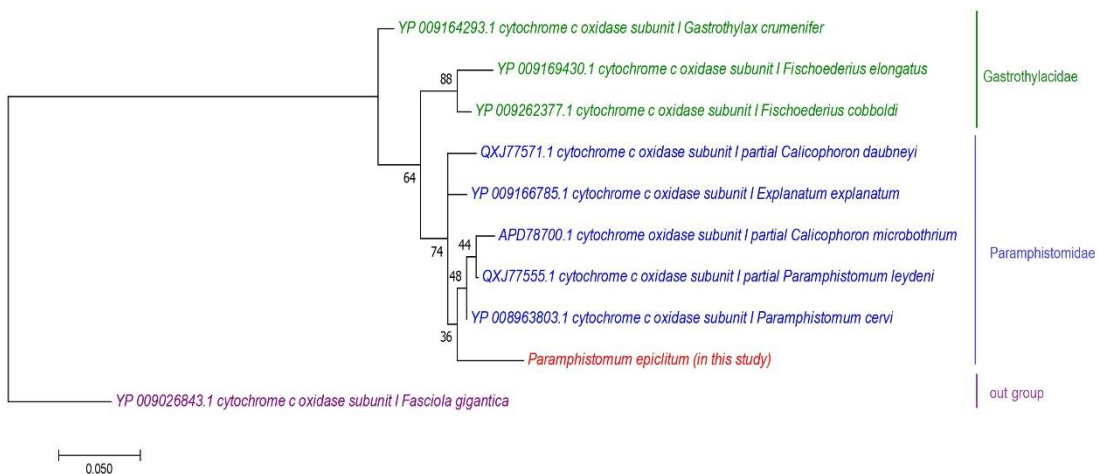
จากผลการศึกษาพบว่ายีน COX1 สามารถใช้ยืนยันชนิดของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank สอดคล้องกับการระบุชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าพยาธิที่ทำการศึกษาคือชนิด *P. epiclitum*

ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTB*, *ND1* และ *ND4* ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* บนฐานข้อมูล GenBank มาก่อน ส่งผลให้ไม่ปรากฏข้อมูลของพยาธิชนิดดังกล่าวเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST แต่ปรากฏข้อมูลของพยาธิในสกุล *Paramphistomum* ชนิดอื่น ๆ แทน ซึ่งสอดคล้องกับแผนภาพวิวัฒนาการที่จัดพยาธิชนิดนี้ให้มีความสัมพันธ์กับพยาธิในสกุล *Calicophoron*, *Explanatum*, *Orthocoelium* และ *Paramphistomum* ซึ่งจัดเป็นพยาธิวงศ์ *Paramphistomidae* เช่นเดียวกับพยาธิชนิด *P. epiclitum*

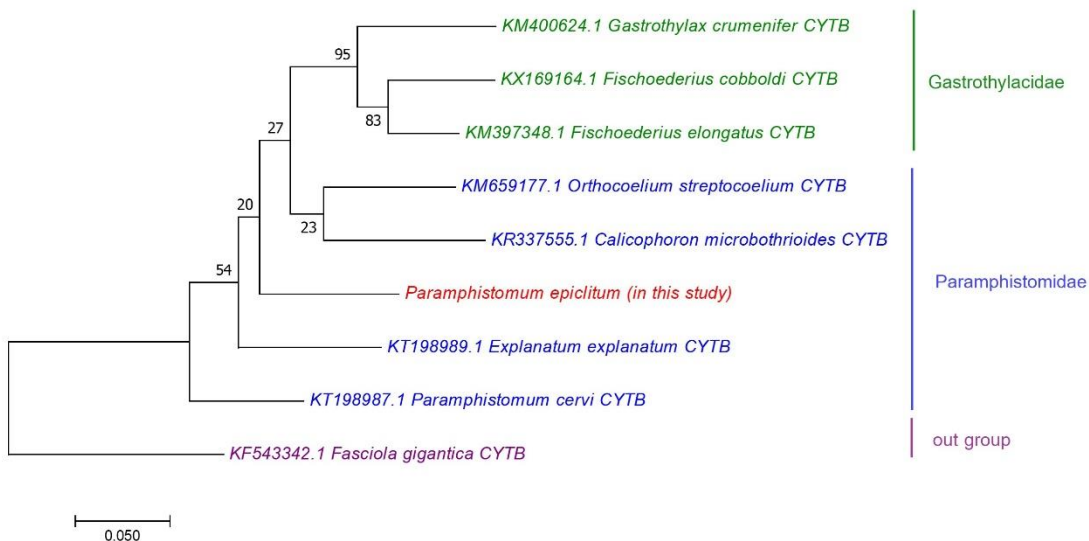




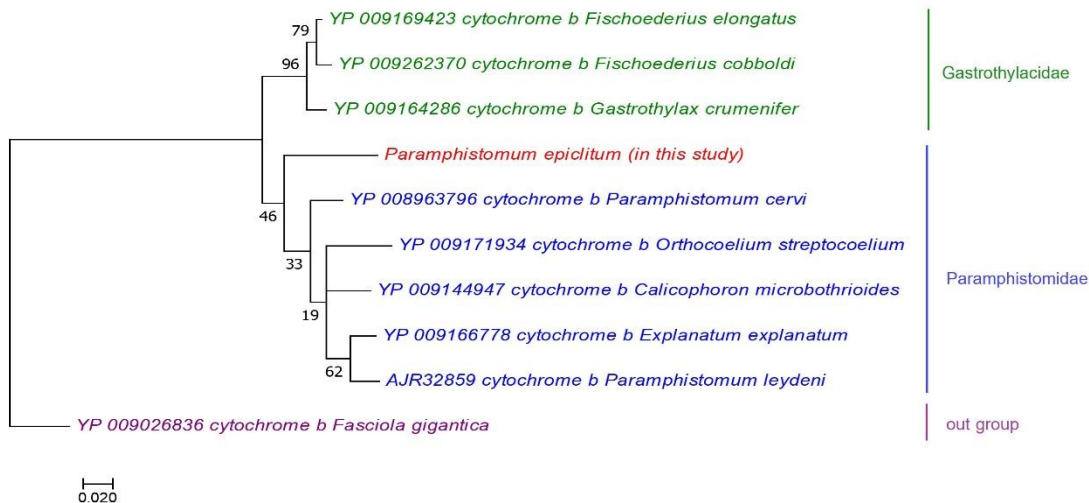
ภาพประกอบ 69 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1



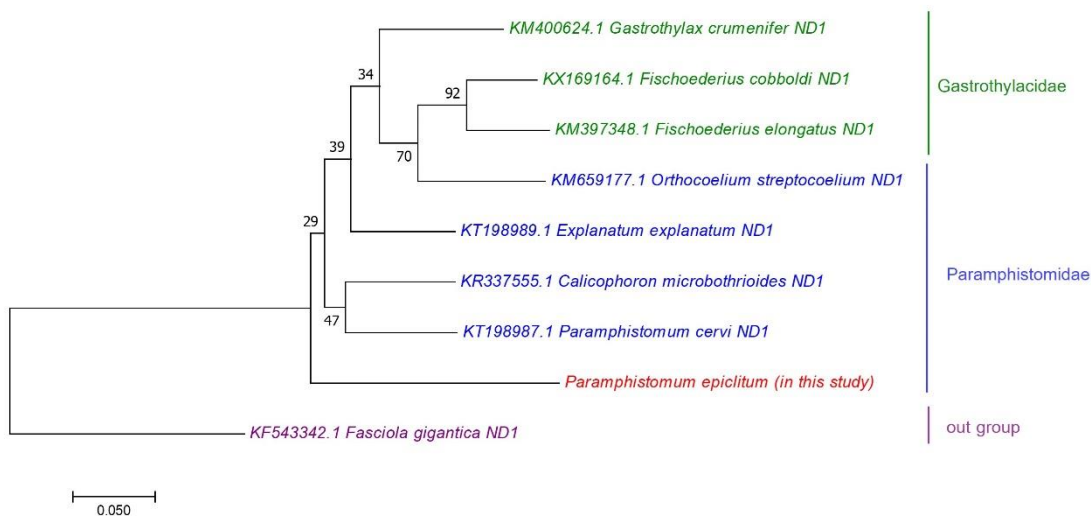
ภาพประกอบ 70 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1



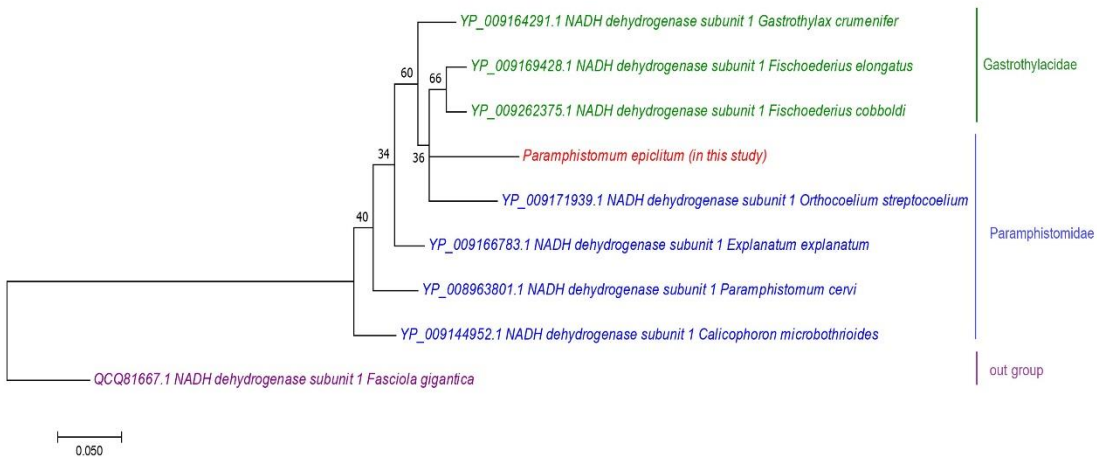
ภาพประกอบ 71 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTb*



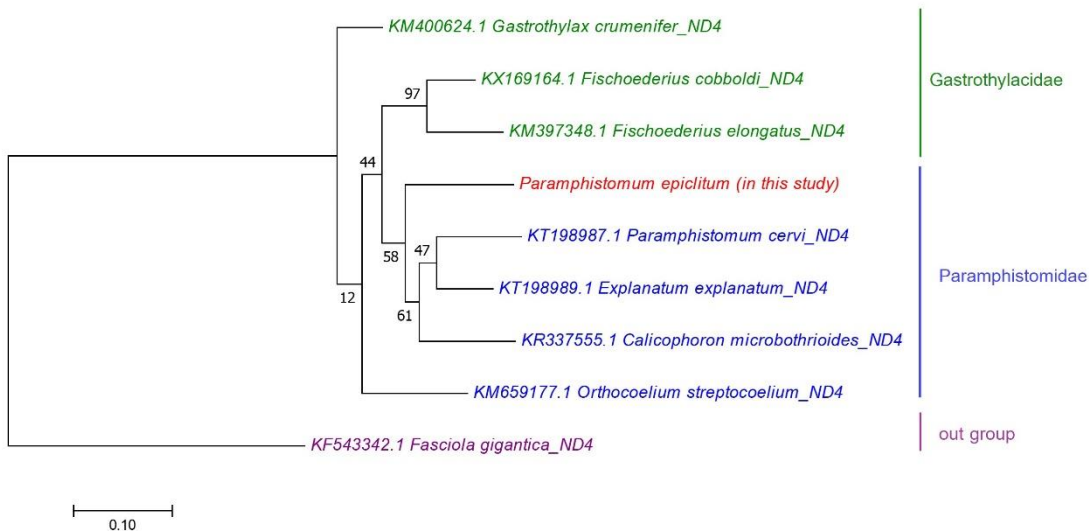
ภาพประกอบ 72 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *CYTb*



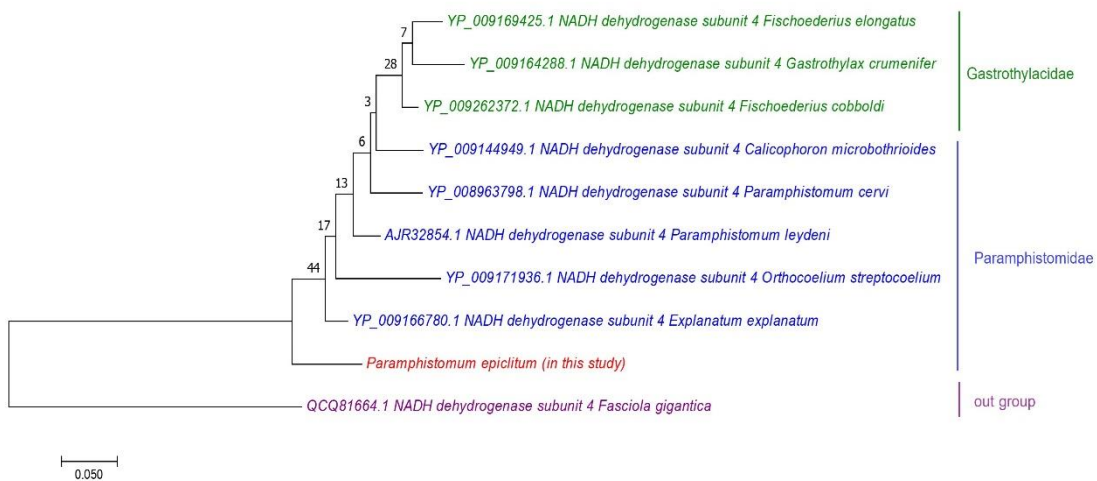
ภาพประกอบ 73 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND1



ภาพประกอบ 74 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND1



ภาพประกอบ 75 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
 สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Kimura 2-parameter model
 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ND4



ภาพประกอบ 76 แผนภาพแสดงวิวัฒนาการของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่น
 สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้ Poisson correction model โดยอ้างอิงจาก
 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน ND4

4.6. ผลการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน และการทดสอบด้วยเทคนิค PCR

ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4 ยีน ได้แก่ COX1, CYTB, ND1 และ ND4 ของพยาธิ 4 ชนิด ได้แก่ *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในแต่ละยีนเพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิด พบว่าไพรเมอร์ Uni_COX1 สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน COX1 ของพยาธิกลุ่มเป้าหมายได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 989 คู่เบส ไพรเมอร์ Uni_CYTB สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน CYTB ของพยาธิกลุ่มเป้าหมายได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 976 คู่เบส ไพรเมอร์ Uni_ND1 สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน ND1 ของพยาธิกลุ่มเป้าหมายได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 764 คู่เบส และไพรเมอร์ Uni_ND4 สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน ND4 ของพยาธิกลุ่มเป้าหมายได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 912 คู่เบส ดังตาราง 19 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนไปออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิแต่ละชนิดเพื่อใช้ในการระบุชนิดของพยาธิในลำดับต่อไป

ตาราง 19 ผลความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน

ยีน	ไพรเมอร์	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	พยาธิเป้าหมาย	ผลการทดสอบความจำเพาะ
COX1	Uni_COX1	989	<i>C. spatiosus</i> , <i>F. elongatus</i> , <i>O. dicranocoelium</i> , <i>P. epiclitum</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิ เป้าหมายทั้ง 4 ชนิด
CYTB	Uni_CYTB	976	<i>C. spatiosus</i> , <i>F. elongatus</i> , <i>O. dicranocoelium</i> , <i>P. epiclitum</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิ เป้าหมายทั้ง 4 ชนิด
ND1	Uni_ND1	764	<i>C. spatiosus</i> , <i>F. elongatus</i> , <i>O. dicranocoelium</i> , <i>P. epiclitum</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิ เป้าหมายทั้ง 4 ชนิด
ND4	Uni_ND4	912	<i>C. spatiosus</i> , <i>F. elongatus</i> , <i>O. dicranocoelium</i> , <i>P. epiclitum</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิ เป้าหมายทั้ง 4 ชนิด

4.7. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนต่าง ๆ

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 16 คู่ จาก 4 ยีน เมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค PCR ได้ผลดังนี้

4.7.1. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน COX1

นำไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่ ที่ออกแบบจากยีน COX1 มาทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค PCR ได้ผลดังนี้

ไพรเมอร์ Cs_COX1 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 486 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *C. spatiosus* และพยาธิที่ไม่ใช่เป้าหมายชนิด *F. elongatus* และ *G. crumenifer* เนื่องจากพยาธิทั้ง 2 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์ Gastrothylacidea เช่นเดียวกับพยาธิเป้าหมายชนิด *C. spatiosus* ทำให้เบสในลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน โดยเฉพาะตำแหน่งที่ทำการออกแบบไพรเมอร์ จะเห็นได้ว่าที่ปลาย 3' ของสาย forward ตำแหน่งเบสลำดับที่ 2 (C) และ 3 (G) เป็นเบสที่มีความอนุรักษ์สูงในพยาธิวงศนี้ ดังภาพประกอบ 77 ทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจับกับตำแหน่งดังกล่าวของดีเอ็นเอต้นแบบจนสามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิทั้ง 3 ชนิดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 300 คู่เบส ซึ่งยาวกว่าขนาดที่ควรได้จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* และสามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อกระเพาะผ้าขี้ริ้วของกระบือ ดังภาพประกอบ 78ก.

ไพรเมอร์ Fe_COX1 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 237 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *F. elongatus* และเกิดผลิตภัณฑ์ขนาดอื่น ๆ กับพยาธิที่ไม่ใช่เป้าหมายชนิด *C. spatiosus*, *P. epiclitum* และ *G. crumenifer* เนื่องจากพบว่าตำแหน่งการออกแบบไพรเมอร์ที่ปลาย 3' ของสาย forward ลำดับเบสตัวที่ 1-10 ของพยาธิทั้ง 3 ชนิด ดังภาพประกอบ 77 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับพยาธิเป้าหมายหลายตำแหน่งทำให้สามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิเหล่านี้ได้ ดังภาพประกอบ 78ข.

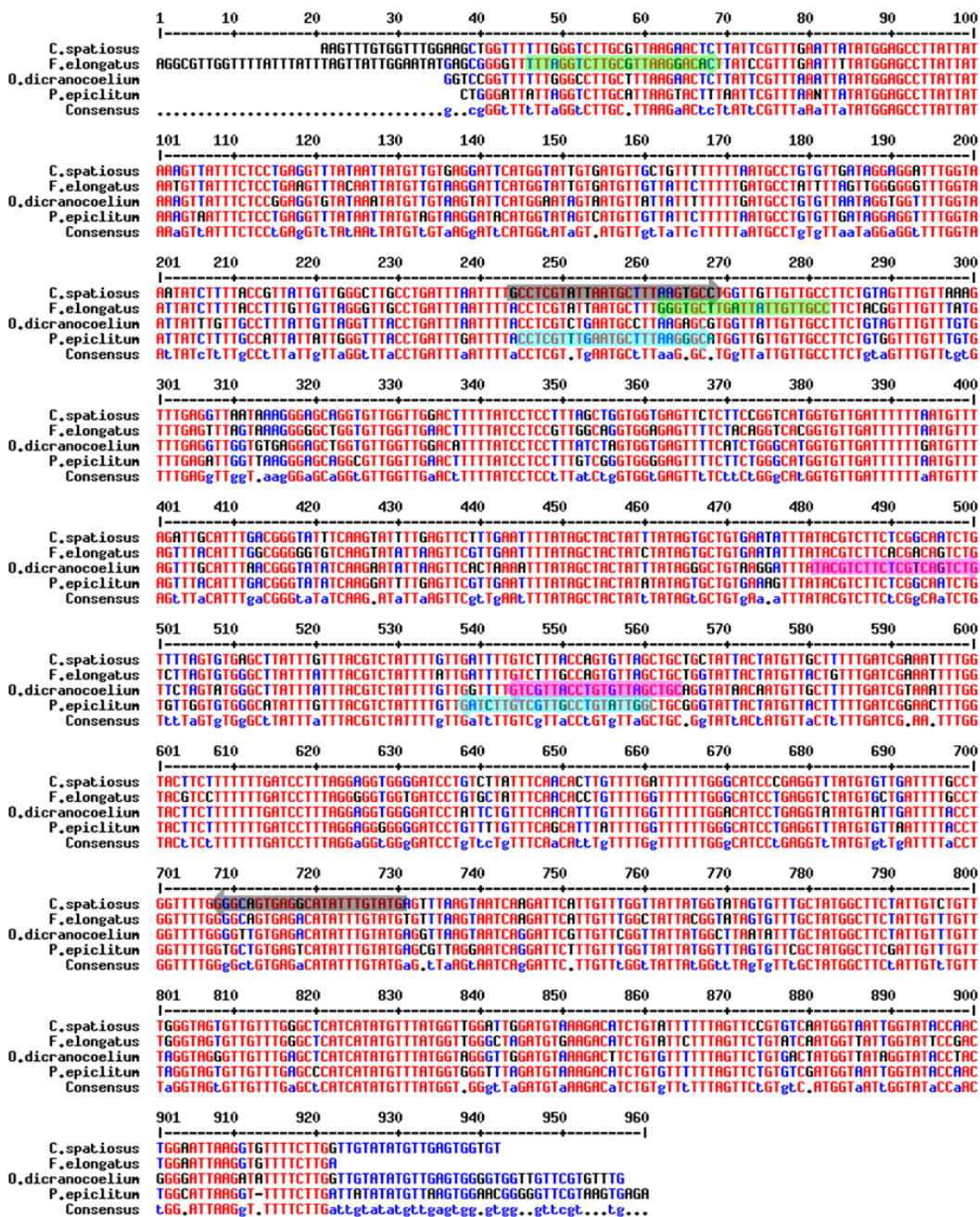
ไพรเมอร์ Od_COX1 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 83 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *O. dicranocoelium* และพยาธิที่ไม่ใช่เป้าหมายชนิด *P. epiclitum* เนื่องจากพยาธิทั้ง 2 ชนิดจัดอยู่ในวงศ์ Paramphistomidae ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน ส่งผลให้การเลือกตำแหน่งออกแบบทำได้ยาก ดังจะเห็นได้ว่าสาย reverse ของไพรเมอร์ออกแบบในตำแหน่งที่ค่อนข้างมีความอนุรักษ์ของเบสสูง ดังภาพประกอบ 77 ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดใกล้เคียง ดังภาพประกอบ 78ค.

ไพรเมอร์ Pe_COX1 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 314 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *P. epiclitum* และพยาธิที่ไม่ใช่เป้าหมายชนิด *O. dicranocoelium* เนื่องจากพยาธิทั้ง 2 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์ Paramphistomidae ซึ่งมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิที่ไม่ใช่เป้าหมายได้ ดังภาพประกอบ 78ง.

จากผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ จากยีน COX1 พบว่าไม่มีไพรเมอร์คู่ใดที่มีจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมายเพียงชนิดเดียว ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิที่เป็นตัวเทียบและ/หรือโฮสต์ได้ ดังตาราง 20

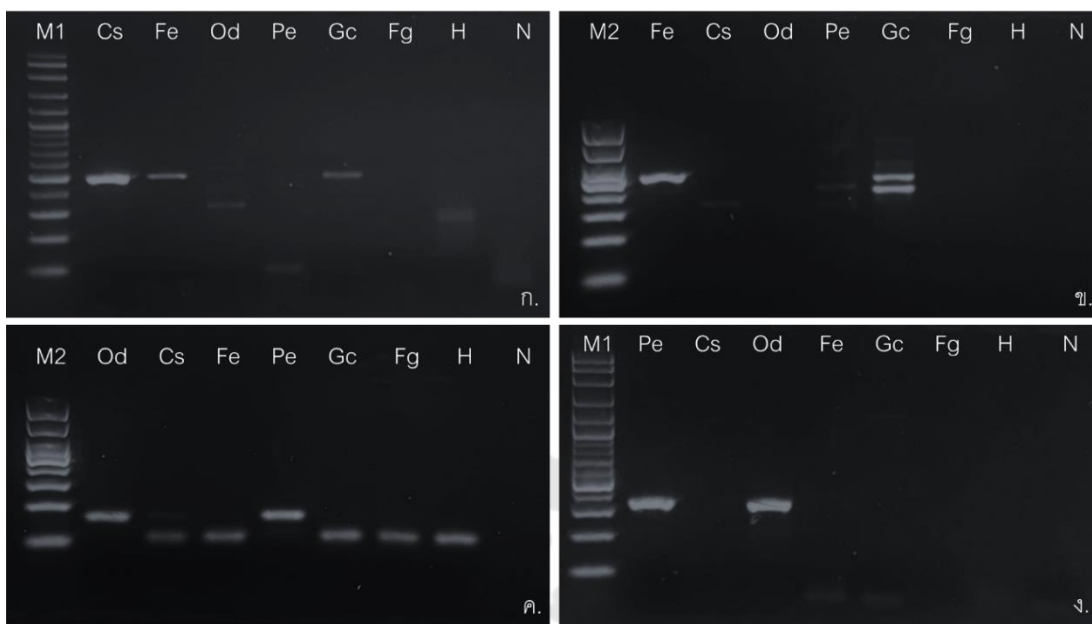
ตาราง 20 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน COX1

ยีน	ไพรเมอร์	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	พยาธิเป้าหมาย	ผลการทดสอบความจำเพาะ
COX1	Cs_COX1	486	<i>C. spatiosus</i>	เกิดผลิตภัณฑ์กับโฮสต์/พยาธิชนิดอื่น
	Fe_COX1	237	<i>F. elongatus</i>	เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิดอื่น
	Od_COX1	83	<i>O. dicranocoelium</i>	เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิดอื่น
	Pe_COX1	314	<i>P. epiclitum</i>	เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิดอื่น



ภาพประกอบ 77 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

- ลูกศรสีดำแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Cs_COX1
- ลูกศรสีเขียวแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Fe_COX1
- ลูกศรสีม่วงแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Od_COX1
- ลูกศรสีฟ้าแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Pe_COX1



ภาพประกอบ 78 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์
ที่ออกแบบจากยีน COX1

(ก.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *C. spatiosus*

(ข.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *F. elongatus*

(ค.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *O. dicranocoelium*

(ง.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *P. epiclitum*

เลน: (M1): ladder 100 bp, (M2): ladder 50 bp, (Cs): *C. spatiosus*, (Fe): *F. elongatus*,

(Od): *O. dicranocoelium*, (Pe): *P. epiclitum*, (Gc): *G. crumenifer*, (Fg): *F. gigantea*,

(H): host, (N): negative control

4.7.2. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *CYTB*

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่ ดังภาพประกอบ 79 เมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค PCR ได้ผลดังนี้

ไพรเมอร์ Cs_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 389 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *C. spaiosus* เพียงชนิดเดียว ดังภาพประกอบ 80ก.

ไพรเมอร์ Fe_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 675 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *F. elongatus* เพียงชนิดเดียว ดังภาพประกอบ 80ข.

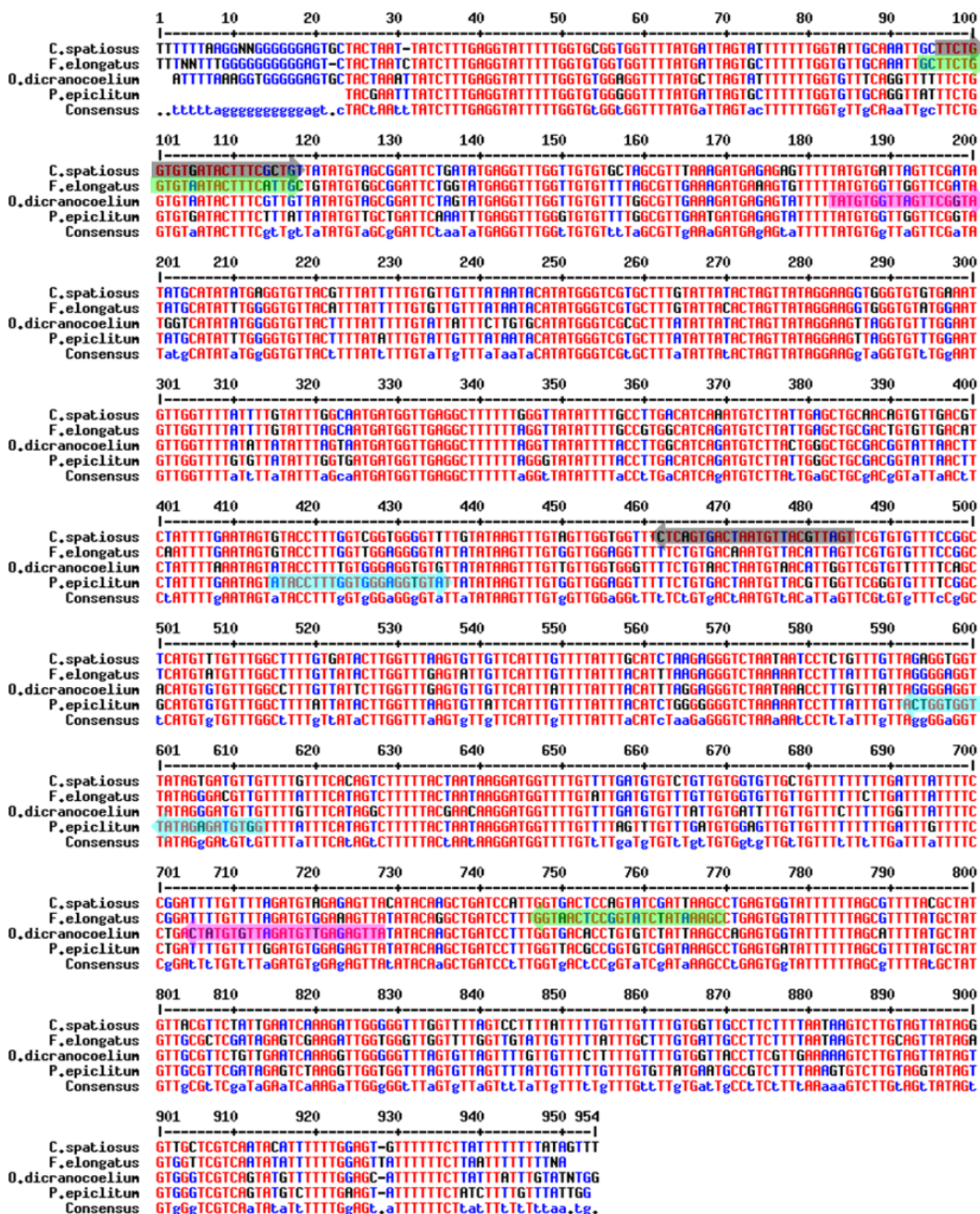
ไพรเมอร์ Od_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 545 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *O. dicranocoelium* เพียงชนิดเดียว ดังภาพประกอบ 80ค.

ไพรเมอร์ Pe_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 198 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *P. epiclitum* เพียงชนิดเดียว ดังภาพประกอบ 80ง.

จากผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ เห็นได้ว่าไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อพยาธิต่างชนิดกัน และให้ขนาดผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ดังตาราง 21 ดังนั้นไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากยีน *CYTB* นี้ จึงสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในเทคนิค multiplex PCR ได้

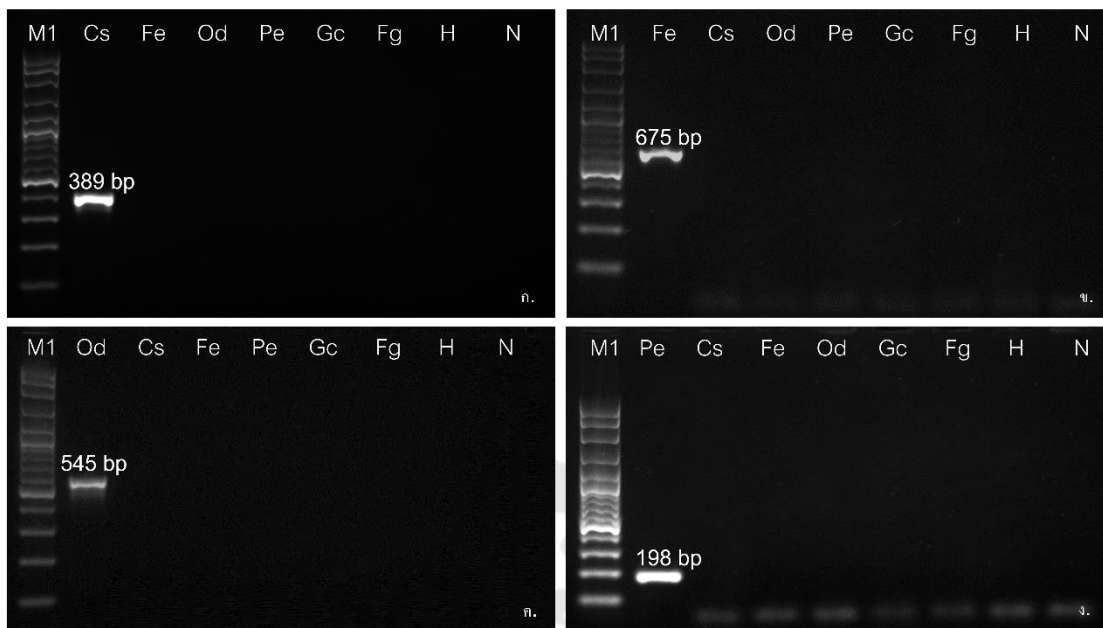
ตาราง 21 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน *CYTB*

ยีน	ไพรเมอร์	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	พยาธิเป้าหมาย	ผลการทดสอบความจำเพาะ
<i>CYTB</i>	Cs_CYTB	389	<i>C. spaiosus</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย
	Fe_CYTB	675	<i>F. elongatus</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย
	Od_CYTB	545	<i>O. dicranocoelium</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย
	Pe_CYTB	198	<i>P. epiclitum</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย



ภาพประกอบ 79 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTB* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

- ลูกศรสีดำแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Cs_CYTb
- ลูกศรสีเขียวแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Fe_CYTb
- ลูกศรสีม่วงแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Od_CYTb
- ลูกศรสีฟ้าแสดงทิศทางของไพรเมอร์ Pe_CYTb



ภาพประกอบ 80 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์
ที่ออกแบบจากยีน *CYTb*

(ก.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *C. spatiosus*

(ข.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *F. elongatus*

(ค.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *O. dicranocoelium*

(ง.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *P. epiclitum*

เลน: (M1): ladder 100 bp, (Cs): *C. spatiosus*, (Fe): *F. elongatus*,

(Od): *O. dicranocoelium*, (Pe): *P. epiclitum*, (Gc): *G. crumenifer*, (Fg):

F. gigantea, (H): host, (N): negative control

4.7.3. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน ND1

เมื่อนำไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่ ที่ออกแบบจากยีน ND1 มาทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค PCR ได้ผลดังนี้

ไพรเมอร์ Cs_ND1 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 203 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *C. spatiosus* และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโฮสต์ที่นำมาทดสอบ ดังภาพประกอบ 82ก.

ไพรเมอร์ Fe_ND1 มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมายชนิด *F. elongatus* เพียงชนิดเดียว เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 289 คู่เบส ดังภาพประกอบ 82ข.

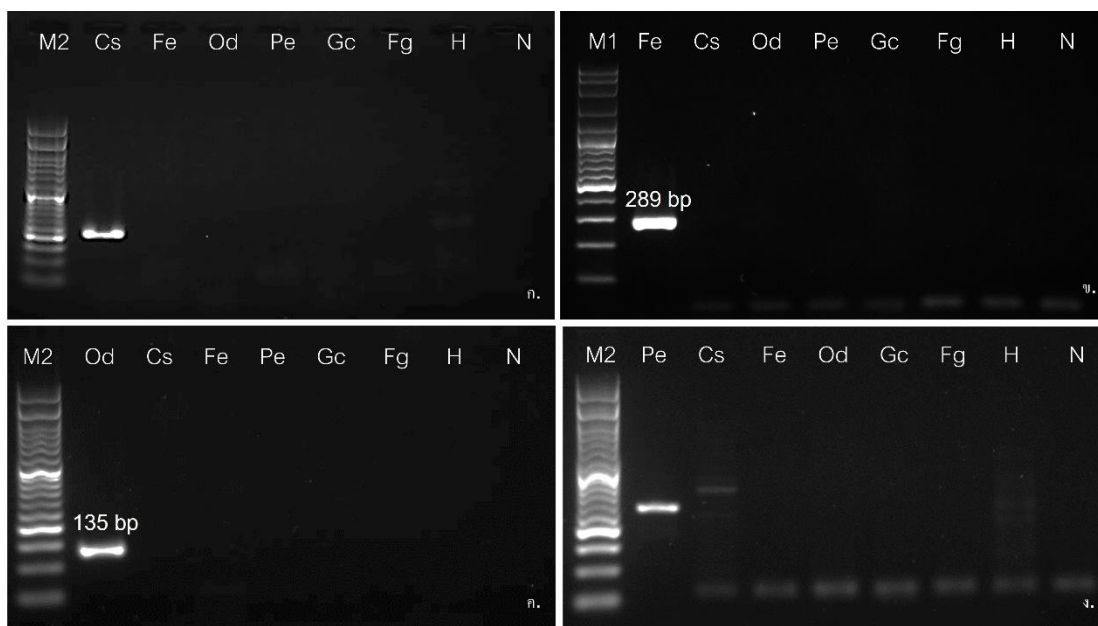
ไพรเมอร์ Od_ND1 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 135 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *O. dicranocoelium* เพียงชนิดเดียว ดังภาพประกอบ 82ค.

ไพรเมอร์ Pe_ND1 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 248 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *P. epiclitum* และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิด *C. spatiosus* เนื่องจากตำแหน่งออกแบบของไพรเมอร์ดังกล่าวที่ลำดับเบส 1-4 ตัวแรก ของสาย forward ปลาย 3' ของพยาธิทั้ง 2 ชนิด มีเบสเดียวกัน ดังภาพประกอบ 81 จึงทำให้ไพรเมอร์สามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิที่ไม่ใช่เป้าหมายได้ ดังภาพประกอบ 82ง.

จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ เห็นได้ว่ามีไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ที่มีความจำเพาะกับพยาธิเป้าหมาย และไพรเมอร์ 2 คู่ ที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิหรือโฮสต์ที่นำมาทดสอบ ดังตาราง 22

ตาราง 22 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน ND1

ยีน	ไพรเมอร์	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	พยาธิเป้าหมาย	ผลการทดสอบความจำเพาะ
ND1	Cs_ND1	203	<i>C. spatiosus</i>	เกิดผลิตภัณฑ์กับโฮสต์
	Fe_ND1	289	<i>F. elongatus</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย
	Od_ND1	135	<i>O. dicranocoelium</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย
	Pe_ND1	248	<i>P. epiclitum</i>	เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิดอื่น



ภาพประกอบ 82 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์
ที่ออกแบบจากยีน ND1

(ก.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *C. spatiosus*

(ข.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *F. elongatus*

(ค.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *O. dicranocoelium*

(ง.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *P. epiclitum*

เลน: (M1): ladder 100 bp, (M2): ladder 50 bp, (Cs): *C. spatiosus*, (Fe): *F. elongatus*,

(Od): *O. dicranocoelium*, (Pe): *P. epiclitum*, (Gc): *G. crumenifer*, (Fg): *F. gigantica*,

(H): host, (N): negative control

4.7.4. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน ND4

จากการนำไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่ มาทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค PCR ได้ผลดังนี้

ไพรเมอร์ Cs_ND4 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 454 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *C. spaiosus* และพยาธิที่ไม่ใช่เป้าหมายชนิด *P. epiclitum*, *G. crumenifer* และโฮสต์ที่นำมาทดสอบ ดังภาพประกอบ 84ก.

ไพรเมอร์ Fe_ND4 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 192 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *F. elongatus* เพียงชนิดเดียว ดังภาพประกอบ 84ข.

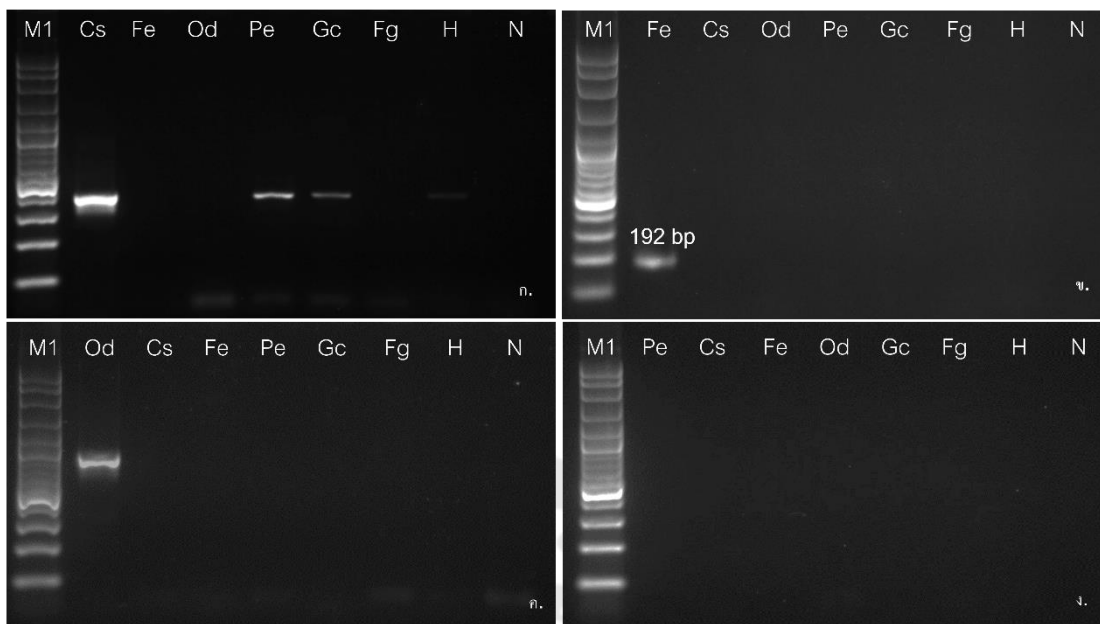
ไพรเมอร์ Od_ND4 เกิดผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส กับพยาธิเป้าหมายชนิด *O. dicranocoelium* ซึ่งขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่ตรงกับขนาดที่ประมาณไว้จากการออกแบบ ดังภาพประกอบ 84ค. เนื่องจากสาย reverse ของไพรเมอร์ดังกล่าวถูกออกแบบที่ตำแหน่งส่วนท้ายของยีน ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดความผิดพลาดในการอ่านลำดับเบสผิดได้ง่ายจากการทำ sequencing ส่งผลให้ตำแหน่งการออกแบบคลาดเคลื่อน และได้ผลิตภัณฑ์ที่ใหญ่กว่าที่ประมาณการไว้จากการออกแบบ ดังภาพประกอบ 83

ไพรเมอร์ Pe_ND4 เมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะกับพยาธิชนิด *P. epiclitum* พบว่าไม่เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิดดังกล่าวดังภาพประกอบ 84ง.

จากผลการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ เห็นได้ว่ามีไพรเมอร์เพียง 1 คู่ เท่านั้นที่มีจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมายเพียง 1 ชนิด ดังตาราง 23

ตาราง 23 ผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน ND4

ยีน	ไพรเมอร์	ผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	พยาธิเป้าหมาย	ผลการทดสอบความจำเพาะ
ND4	Cs_ND4	454	<i>C. spaiosus</i>	เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิดอื่น
	Fe_ND4	192	<i>F. elongatus</i>	มีความจำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย
	Od_ND4	690	<i>O. dicranocoelium</i>	ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ออกแบบ
	Pe_ND4	257	<i>P. epiclitum</i>	ไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น



ภาพประกอบ 84 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์
ที่ออกแบบจากยีน ND4

(ก.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *C. spatiosus*

(ข.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *F. elongatus*

(ค.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *O. dicranocoelium*

(ง.): การทดสอบความจำเพาะต่อพยาธิชนิด *P. epiclitum*

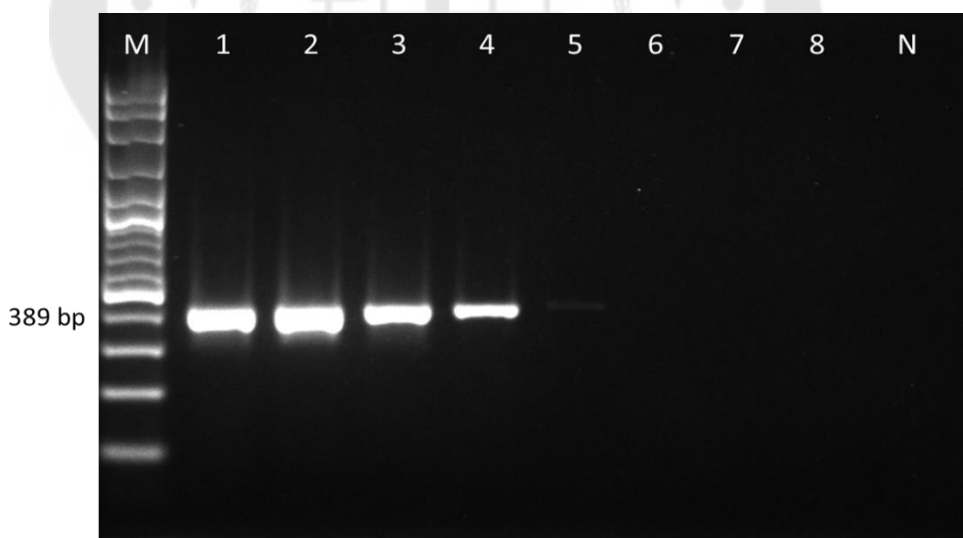
เลน: (M1): ladder 100 bp, (Cs): *C. spatiosus*, (Fe): *F. elongatus*,

(Od): *O. dicranocoelium*, (Pe): *P. epiclitum*, (Gc): *G. crumenifer*,

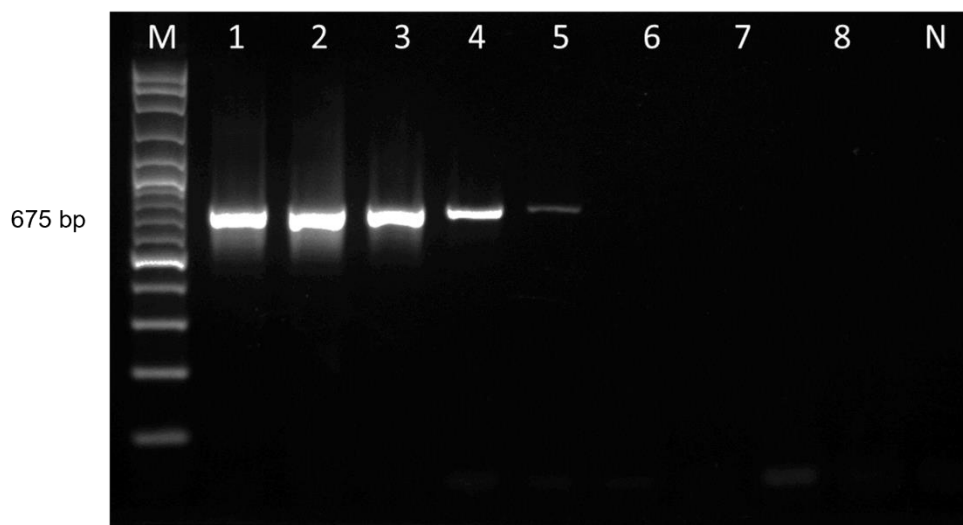
(Fg): *F. gigantea*, (H): host, (N): negative control

4.8. ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *CYTB*

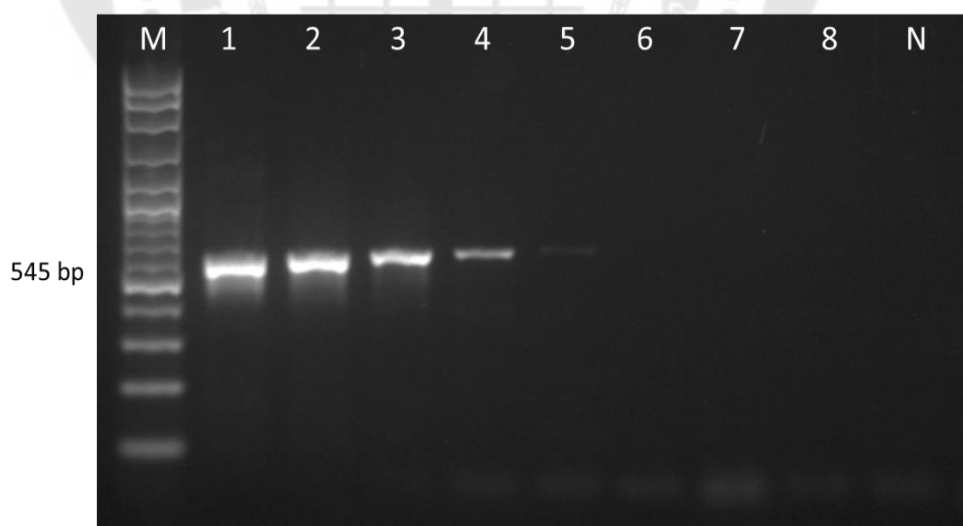
ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน *CYTB* เป็นไพรเมอร์เพียงชุดเดียวที่มีคุณสมบัติที่จำเพาะกับพยาธิแต่ละชนิดทั้ง 4 ชนิดที่ศึกษา ดังนั้นจึงนำไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนดังกล่าวมาทำการทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยากับพยาธิแต่ละชนิด เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิดที่สามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับไพรเมอร์ได้ ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ Cs_ *CYTB* เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิด *C. spatiosus* ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำที่สุดเท่ากับ 1.00 พิโคกรัม ดังภาพประกอบ 85 ไพรเมอร์ Fe_ *CYTB* มีความจำเพาะกับพยาธิชนิด *F. elongatus* และมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.00 พิโคกรัม ดังภาพประกอบ 86 ไพรเมอร์ Od_ *CYTB* เมื่อทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยากับพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* พบว่าสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.00 พิโคกรัม ดังภาพประกอบ 87 และ ไพรเมอร์ Pe_ *CYTB* ที่มีความจำเพาะกับพยาธิชนิด *P. epiclitum* สามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิได้ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.00 พิโคกรัม ดังภาพประกอบ 88



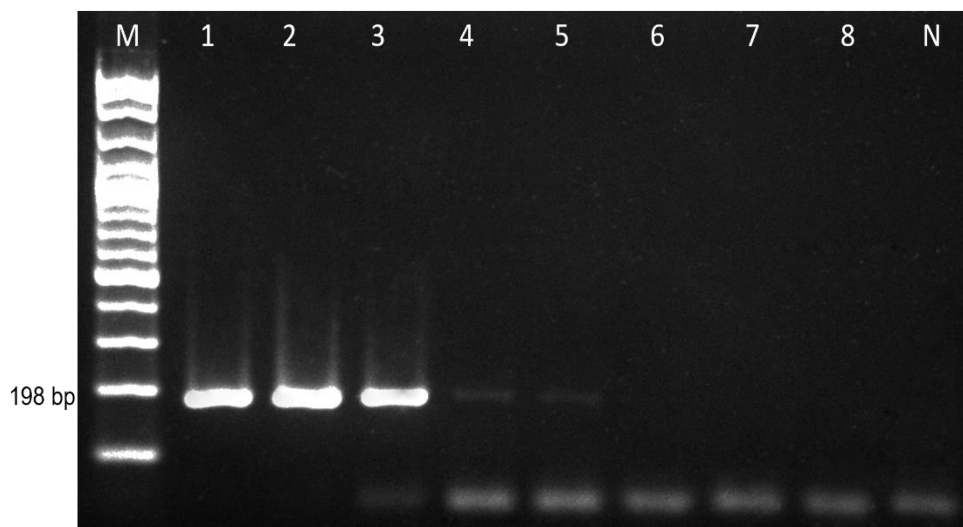
ภาพประกอบ 85 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ *C. spatiosus* เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม, (4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม, (8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control



ภาพประกอบ 86 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ *F. elongatus*
 เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม,
 (4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม,
 (8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control



ภาพประกอบ 87 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ *O. dicranocoelium*
 เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม,
 (4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม,
 (8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control

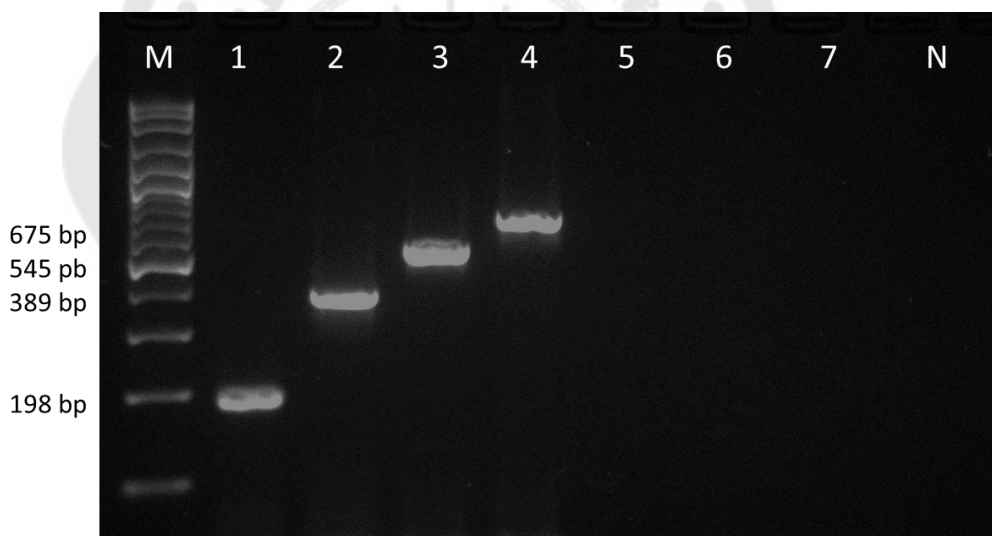


ภาพประกอบ 88 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของพยาธิ *P. epiclitum*
เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม,
(4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม,
(8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control

4.9. ผลการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR

4.9.1. ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR

เมื่อนำไพรเมอร์จำเพาะทั้ง 4 คู่ จากยีน *CYTB* ได้แก่ ไพรเมอร์ Cs_ *CYTB*, ไพรเมอร์ Fe_ *CYTB*, ไพรเมอร์ Od_ *CYTB* และไพรเมอร์ Pe_ *CYTB* มาระบุนชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วแต่ละชนิดทั้ง 4 ชนิด ในปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์จำเพาะแต่ละคู่สามารถเกิดผลิตภัณฑ์กับตัวอย่างดีเอ็นเอจากพยาธิใบไม้ชนิด *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* หรือ *P. epiclitum* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น และเกิดผลิตภัณฑ์ขนาดแตกต่างกัน 4 ขนาด ได้แก่ 389, 675, 545 และ 198 คู่เบส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพยาธิชนิดอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่นำมาทดสอบ รวมถึงไม่เกิดปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อกระเพาะผ้าขี้ริ้วกระป๋องที่นำมาทดสอบ ดังภาพประกอบ 89 ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ PCR ที่ได้กล่าวถึงไปแล้วข้างต้น



ภาพประกอบ 89 ผล gel electrophoresis การทดสอบความจำเพาะของ multiplex PCR
 เลน: (M): ladder 100 bp, (1): *P. epiclitum*, (2): *C. spatiosus*, (3): *O. dicranocoelium*,
 (4): *F. elongatus*, (5): *G. crumenifer*, (6): *F. gigantica*, (7): host, (N): negative control

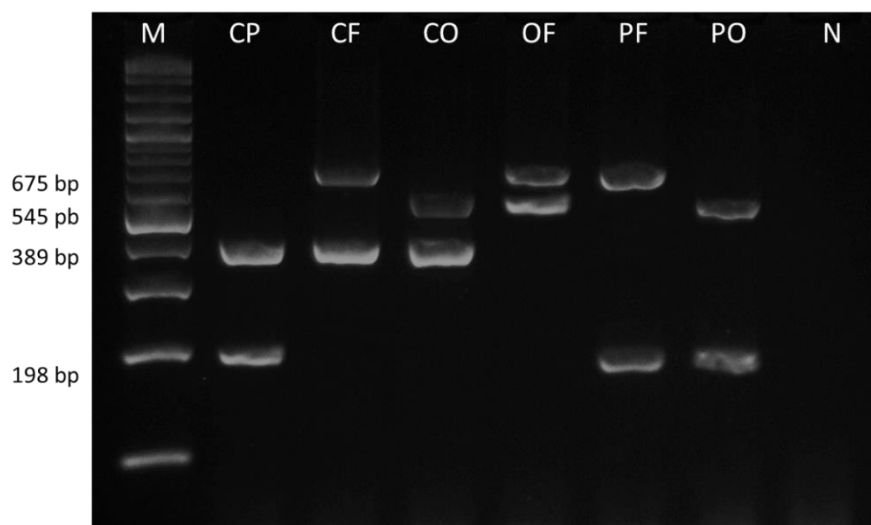
4.9.2. ผลการทดสอบการติดเชื้อร่วมของพยาธิในปฏิกิริยา multiplex PCR

เนื่องจากพยาธิใบไม้ในกระเพาะปัสสาวะทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ชนิด *C. spatiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* มีรายงานการระบาดร่วมกันในสัตว์เคี้ยวเอื้อง ดังนั้นจึงทำการทดลองผสมดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิดเข้าด้วยกันเพื่อทดสอบการติดเชื้อร่วมกันในปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการทดสอบพบว่าโปรแกรมที่ออกแบบสามารถระบุชนิดของพยาธิแต่ละชนิดได้แม้มีการผสมกันของดีเอ็นเอ ดังตาราง 24 โดยการติดเชื้อร่วมกันแบบ 2 ชนิด เกิดผลิตภัณฑ์ 2 ขนาดที่แตกต่างกัน และดังภาพประกอบ 90 การติดเชื้อร่วมกันแบบ 3 ชนิด และ 4 ชนิด เกิดผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน 3 และ 4 ขนาด ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 91

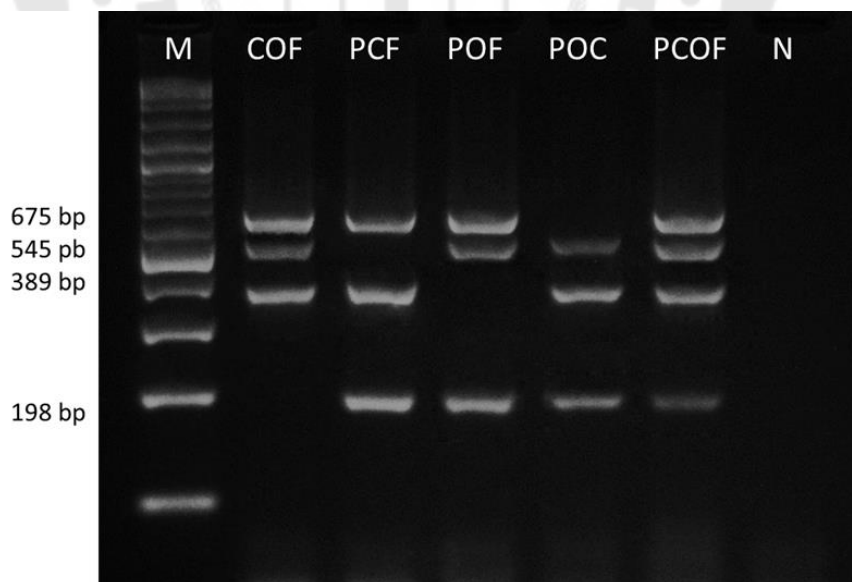
ตาราง 24 ผลิตภัณฑ์ multiplex PCR ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบการติดเชื้อร่วมของพยาธิ

ชนิดพยาธิ (คู่เบส)	รูปแบบการติดเชื้อร่วมของพยาธิ											
	CP	CF	CO	OF	PF	PO	COP	PCF	POF	POC	PCOF	
<i>F. elongatus</i> (675)	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
<i>O. dicranocoelium</i> (545)	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	
<i>C. spatiosus</i> (389)	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	
<i>P. epiclitum</i> (198)	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	

กำหนดให้ + หมายถึง เกิดผลิตภัณฑ์
- หมายถึง ไม่เกิดผลิตภัณฑ์



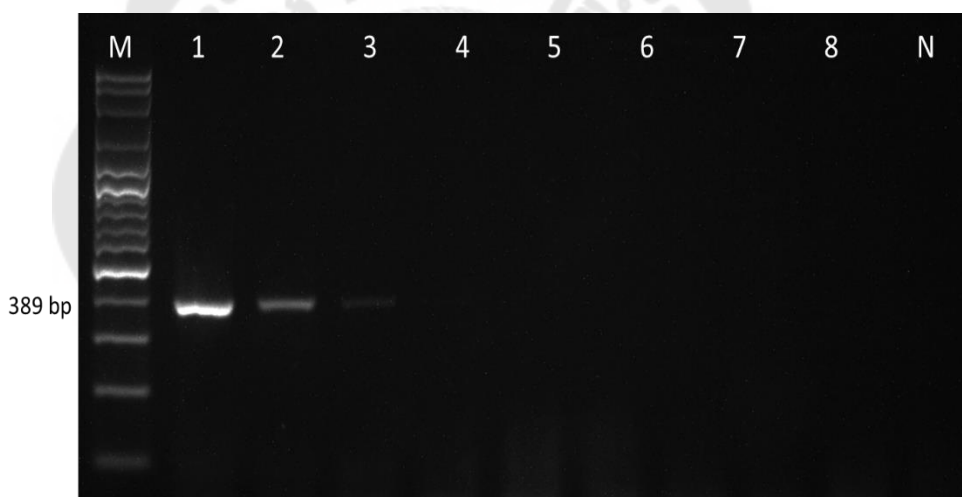
ภาพประกอบ 90 ผล gel electrophoresis การทดสอบการติดเชื้อร่วมกันของพยาธิ 2 ชนิด
ในปฏิกิริยา multiplex PCR
เลน: (M): ladder 100 bp, (P): *P. epicloium* (C): *C. spatiosus*, (O): *O. dicranocoelium*,
(F): *F. elongatus*, (N): negative control



ภาพประกอบ 91 ผล gel electrophoresis การทดสอบการติดเชื้อร่วมกันของพยาธิ
3 และ 4 ชนิด ในปฏิกิริยา multiplex PCR
เลน: (M): ladder 100 bp, (P): *P. epicloium* (C): *C. spatiosus*, (O): *O. dicranocoelium*,
(F): *F. elongatus*, (N): negative control

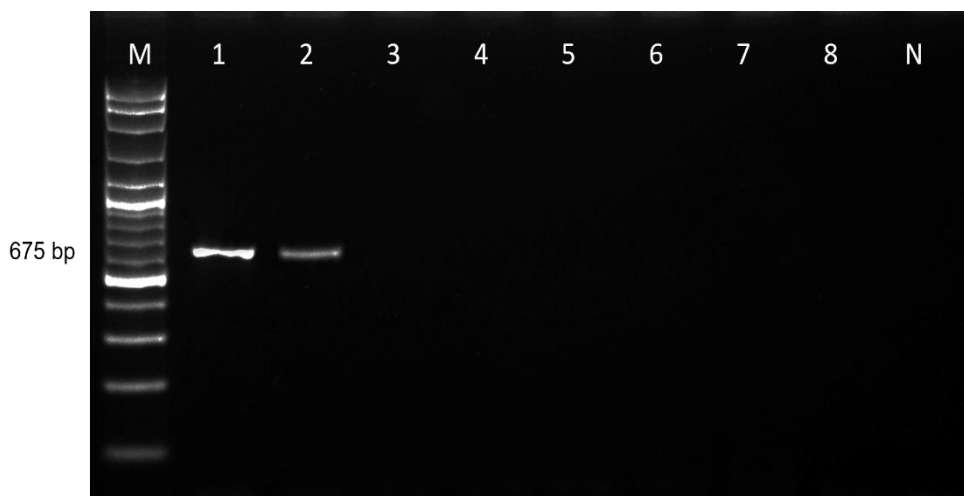
4.9.3. ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 4 ชนิด มาเจือจางความเข้มข้นลงทีละ 10 เท่า โดยเริ่มต้นที่ 10.0 นาโนกรัม เจือจางจนถึง 1.0 เฟมโตกรัม เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไพรเมอร์จำเพาะสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ได้ในปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์ Cs_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิด *C. spatiosus* ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 0.10 นาโนกรัม ดังภาพประกอบ 92 ไพรเมอร์ Fe_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิด *F. elongatus* ได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 1.00 นาโนกรัม ดังภาพประกอบ 93 ไพรเมอร์ Ort_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 1.00 นาโนกรัม ดังภาพประกอบ 94 และไพรเมอร์ Pe_CYTB เกิดผลิตภัณฑ์กับพยาธิชนิด *P. epiclitum* ได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.10 นาโนกรัม ดังภาพประกอบ 95



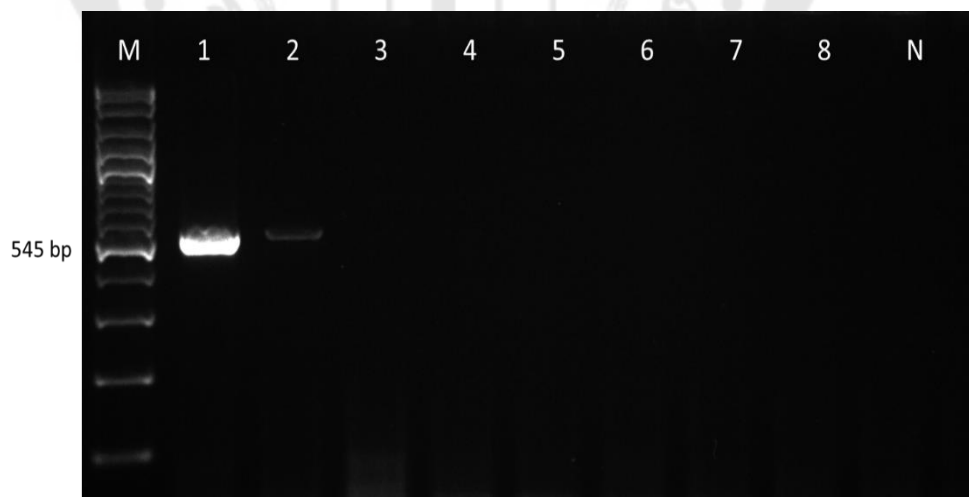
ภาพประกอบ 92 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด *C. spatiosus*

เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม, (4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม, (8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control



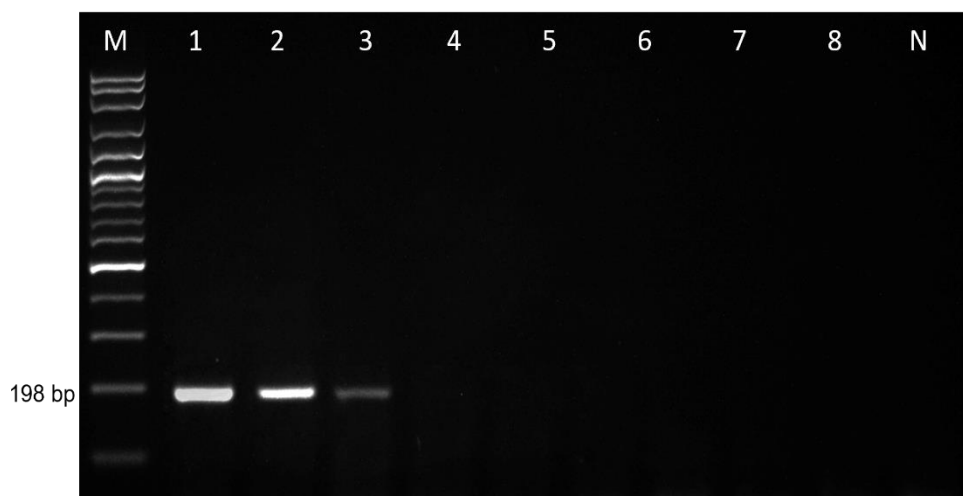
ภาพประกอบ 93 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไฟรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด *F. elongatus*

เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม, (4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม, (8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control



ภาพประกอบ 94 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไฟรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium*

เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม, (4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม, (8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control

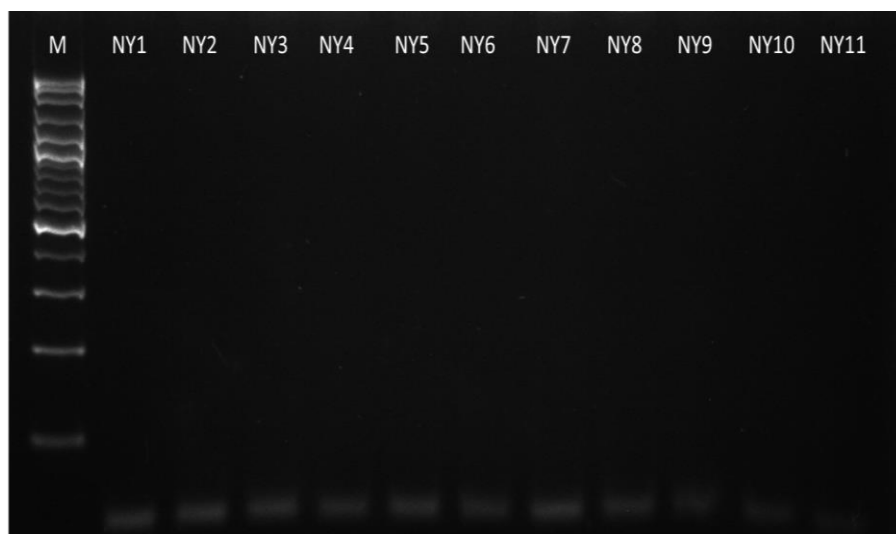


ภาพประกอบ 95 ผล gel electrophoresis การทดสอบความไวของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา multiplex PCR ของพยาธิชนิด *P. epiclitum*

เลน: (M): ladder 100 bp, (1): 10.0 นาโนกรัม, (2): 1.00 นาโนกรัม, (3): 0.10 นาโนกรัม, (4): 10.00 พิโคกรัม, (5): 1.00 พิโคกรัม, (6): 0.10 พิโคกรัม, (7): 10.00 เฟมโตกรัม, (8): 1.00 เฟมโตกรัม (N): negative control

4.10. ผลการประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อวินิจฉัยการติดพยาธิในมูลสัตว์

นำตัวอย่างมูลสัตว์จำนวน 41 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครนายก มาทดสอบการติดพยาธิใบไม้ชนิด *C. spaiosus*, *F. elongatus*, *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* ด้วยเทคนิค multiplex PCR ผลการตรวจสอบในตัวอย่างไม่พบการติดพยาธิในมูลสัตว์จำนวน 4 ตัวอย่าง และสามารถตรวจสอบพยาธิได้ 3 ชนิด ได้แก่ *C. spaiosus*, *F. elongatus* และ *P. epiclitum* ไม่พบการติดพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* โดยในมูลสัตว์ตัวอย่างที่ 1-11 มีผลเป็นลบในทุกตัวอย่าง แสดงว่าไม่พบการติดพยาธิ ดังภาพประกอบ 96 มูลสัตว์ตัวอย่างที่ 12-22 มีผลบวกในตัวอย่างไม่พบการติดพยาธิ เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 198 คู่เบส และตัวอย่าง NY21 ติดพยาธิชนิด *C. spaiosus* เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 389 คู่เบส ดังภาพประกอบ 97 มูลสัตว์ตัวอย่างที่ 23-33 ตรวจพบผลบวกในตัวอย่างไม่พบการติดพยาธิ เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 198 คู่เบส แสดงว่าติดพยาธิชนิด *P. epiclitum* ดังภาพประกอบ 98 และมูลสัตว์ตัวอย่างที่ 34-41 ตรวจพบผลบวกในตัวอย่างไม่พบการติดพยาธิ เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ขนาด 675 คู่เบส แสดงว่าติดพยาธิชนิด *F. elongatus* ดังภาพประกอบ 99



ภาพประกอบ 96 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR

ทดสอบมูลสัตว์ตัวอย่างที่ 1-11

โดย เลน: (M): ladder 100 bp, NY1-11: ลำดับตัวอย่างมูลสัตว์จากจังหวัดนครนายก



ภาพประกอบ 97 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR

ทดสอบมูลสัตว์ตัวอย่างที่ 12-22

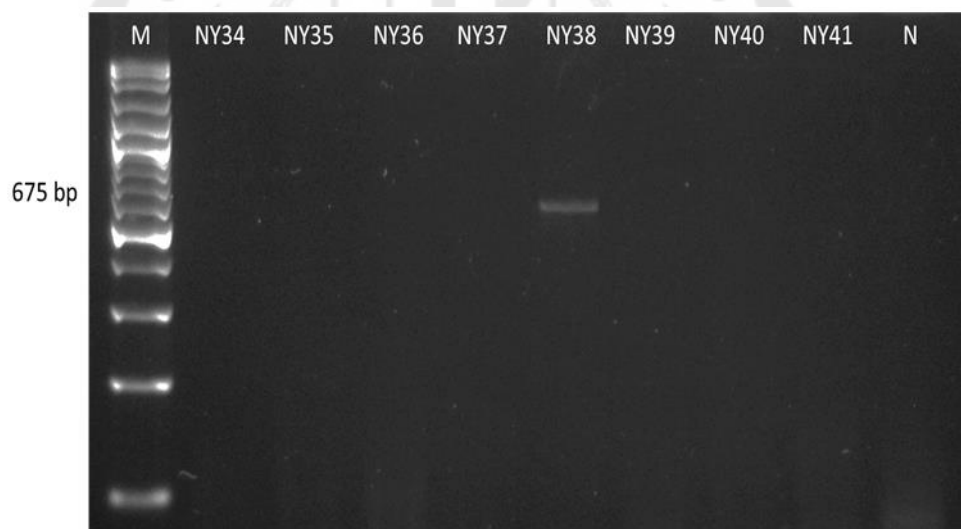
โดย เลน: (M): ladder 100 bp, NY12-22 : ลำดับตัวอย่างมูลสัตว์จากจังหวัดนครนายก



ภาพประกอบ 98 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR

ทดสอบมูลสัตว์ตัวอย่างที่ 23-33

โดย เลน: (M): ladder 100 bp, NY23-33 : ลำดับตัวอย่างมูลสัตว์จากจังหวัดนครนายก



ภาพประกอบ 99 ผล gel electrophoresis การใช้เทคนิค multiplex PCR

ทดสอบมูลสัตว์ตัวอย่างที่ 34-41

โดย เลน: (M): ladder 100 bp, NY34-41 : ลำดับตัวอย่างมูลสัตว์จากจังหวัดนครนายก

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ในพื้นที่แหล่งเพาะเลี้ยงปลุคสัตว์ในภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 8 จังหวัด เพื่อวินิจฉัยการติดพยาธิใบไม้กลุ่มกระเพาะผ้าซีริวด้วยวิธี formalin-ether sedimentation พบว่าจากจำนวนตัวอย่างมูลสัตว์ 247 ตัวอย่าง ตรวจพบการติดพยาธิในกุ่มดังกล่าวจำนวน 104 ตัวอย่าง คิดเป็นค่าความชุกรวมน้อยละ 42.1 โดยมีปริมาณไข่ต่อกรัมในมูลสัตว์สูงถึง 241 ฟอง พบการระบาดในจังหวัดสุพรรณบุรีสูงที่สุด (ร้อยละ 57.9) และจังหวัดอ่างทองมีการระบาดของพยาธิต่ำที่สุด (ร้อยละ 24.0) และจากการเก็บตัวอย่างพยาธิระยะตัวเต็มวัยจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดปทุมธานี สามารถระบุชนิดของพยาธิด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Carmyerius spatiosus*, *Fischoederius elongatus*, *Orthocoelium dicranocoelium* และ *Paramphistomum epiclitum*

จากการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนบนไมโทคอนเดรียของพยาธิทั้ง 4 ชนิด ที่พบในการศึกษา พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน COX1 (Uni_COX1) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 989 คู่เบส ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CYTB (Uni_CYTB) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 976 คู่เบส ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ND1 (Uni_ND1) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 764 คู่เบส และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ND4 (Uni_ND4) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 912 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีนทั้ง 4 ยีนไปออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิเป้าหมาย พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน CYTB เท่านั้นที่มีคุณสมบัติในการนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิค multiplex PCR โดยพบว่าไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *C. spatiosus* (Cs_CYTB) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 389 คู่เบส มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.0 พิโคกรัม ไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *F. elongatus* (Fe_CYTB) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 675 คู่เบส มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.0 พิโคกรัม ไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* (Od_CYTB) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 545 คู่เบส มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.0 พิโคกรัม และไพรเมอร์จำเพาะของพยาธิชนิด *P. epiclitum* (Pe_CYTB) ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 198 คู่เบส มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1.0 พิโคกรัม

จากผลการประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อจำลองสถานการณ์การติดเชื้อร่วมกันของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าซีริวในโฮสต์ตัวเดียวกัน พบว่าไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบ

จากยีน *CYTB* ทั้ง 4 คู่ ในปฏิกิริยา multiplex PCR สามารถใช้ระบุชนิดของพยาธิได้แม้เกิดการติด เชื้อร่วมกันของพยาธิในรูปแบบการผสมดีเอ็นเอของพยาธิ 2 ชนิด 3 ชนิด และ 4 ชนิด ซึ่งให้ขนาด ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis และเมื่อทำการทดสอบกับ ตัวอย่างมูลสัตว์ที่เก็บจากจังหวัดนครนายกจำนวน 41 ตัวอย่าง พบว่าเกิดผลบวกกับตัวอย่างมูล สัตว์จำนวน 4 ตัวอย่าง พบการติดพยาธิเพียง 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด *C. spatiosus* (1 ตัวอย่าง), *F. elongatus* (1 ตัวอย่าง) และ *P. epiclitum* (2 ตัวอย่าง) ไม่พบการติดเชื้อพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* ในตัวอย่างมูลสัตว์จากจังหวัดนครนายก และไม่พบการติดเชื้อร่วมกันของ พยาธิในมูลสัตว์

อภิปรายผล

จากการเก็บตัวอย่างพยาธิไปไม่ในกระเพาะผ้าชีวรีของโคและกระบือ จากโรงฆ่าสัตว์ นำมาระบุชนิดด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาพบพยาธิ 4 ชนิด แบ่งออกได้ 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Gastrothylacidae ชนิด *C. spatiosus* และ *F. elongatus* และวงศ์ Paramphistomidae ชนิด *O. dicranocoelium* และ *P. epiclitum* โดยพบว่าพยาธิในวงศ์ Gastrothylacidae มี ventral pouch เป็นลักษณะเด่นของวงศ์ ซึ่งไม่พบลักษณะนี้ในวงศ์ Paramphistomidae ซึ่งตรงตามหลัก ออนุกรมวิธานของพยาธิ (Eduardo, 1982a; Sey, 2019) นอกจากนี้พยาธิแต่ละชนิดยังมีลักษณะ เด่นที่แตกต่างกันออกไป โดยพยาธิชนิด *C. spatiosus* มีลักษณะของท่อนำไข่ และ vas deferens ทอดยาวไปตามลำตัว อัดทู่เรียงตัวตามแนวนอน ต่างจากพยาธิชนิด *F. elongatus* ที่มีลักษณะ ของท่อนำไข่ และ vas deferens ทอดยาวไปตามลำตัว แต่อัดทู่เรียงตัวในแนวตั้ง สอดคล้องกับ งานวิจัยก่อนหน้า (Sey & Prasitirat, 1994) พยาธิชนิด *O. dicranocoelium* มีรูปแบบของคอหอย แบบ dicranocoelium type ที่มี lip sphincter ต่างจากพยาธิชนิด *P. epiclitum* ที่มีรูปแบบของ คอหอยแบบ calicophoron type และไม่มี lip sphincter ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้า (Sey, 2019)

การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิชนิด *C. spatiosus* กับพยาธิชนิดอื่นใน สกุล *Carmyerius* จากการรายงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าในประเทศไทยมีการระบาดของพยาธิสกุล *Carmyerius* เพียงชนิดเดียว ได้แก่ ชนิด *C. spatiosus* (Sey & Prasitirat, 1994) ในขณะที่ ประเทศเวียดนามพบการระบาดของพยาธิชนิด *C. bulbosus* (Sey, 1985) โดยพบว่าชนิด *C. spatiosus* มีขนาดลำตัวและลำไส้ที่ยาวกว่าชนิด *C. bulbosus* แต่มีความยาวของหลอด อาหารที่สั้นกว่า และเมื่อยีสันชนิดด้วยยีสันบนไมโทคอนเดรียโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใน

งานวิจัย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1, CYTB, ND1 และ ND4 ของพยาธิชนิด *C. spatiosus* ที่ได้จากงานวิจัยไม่มีตำแหน่งที่ตรงกันกับฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นข้อมูลจึงแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดแทน อย่างไรก็ตามผลการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถระบุว่าเป็นพยาธิชนิด *C. spatiosus* ได้อย่างชัดเจน โดยอาศัย ลักษณะคอหอยแบบ paramphistomum type และมี acetabulum แบบ gastrothylax type ซึ่ง สอดคล้องกับรายงานวิจัยหลายงานก่อนหน้า (Coskun, Eslami, Halajian, & Nikpey, 2012; Otto & Eslami, 1980)

การเปรียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิชนิด *F. elongatus* กับพยาธิชนิดอื่นในสกุล *Fischoederius* พบว่าในประเทศไทยมีการระบาดของพยาธิสกุลดังกล่าวจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด *F. elongatus* และ *F. cobboldi* (Anuracpreeda et al., 2012; Nak-On & Chontanarth, 2020) และสามารถจำแนกชนิดออกจากกันได้โดยอาศัยความยาวของลำไส้ ซึ่งพยาธิชนิด *F. elongatus* มีลำไส้ที่สั้นกว่าพยาธิชนิด *F. cobboldi* โดยพยาธิชนิด *F. elongatus* มีลำไส้ยาวประมาณกลางลำตัว ในขณะที่พยาธิชนิด *F. cobboldi* มีลำไส้ยาวจนเกือบถึงตำแหน่งของอวัยวะ สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้า (Tandon, 1961) นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COX1, CYTB, ND1 และ ND4 ของพยาธิชนิด *F. elongatus* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา สอดคล้องกับผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถระบุชนิดของพยาธิชนิด *F. elongatus* ได้อย่างชัดเจน

การเปรียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* กับพยาธิชนิดอื่นในสกุล *Orthocoelium* โดยอาศัยรูปแบบของคอหอยพบว่าพยาธิ *O. dicranocoelium* มีคอหอยแบบ dicranocoelium type ต่างจากพยาธิชนิด *O. streptocoelium* ที่มีคอหอยแบบ calicophoron type และชนิด *O. orthocoelium* ที่มีคอหอยแบบ orthocoelium type เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งการเปิดของ genital pore พบว่าพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* มีตำแหน่งเปิดอยู่ที่ใต้หลอดอาหาร ต่างจากพยาธิชนิด *O. scolicoelium* และ *O. parvipapillatum* ที่มีตำแหน่ง genital pore อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับหลอดอาหาร สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า (Eduardo, 1985) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *O. dicranocoelium* จากยีน COX1, CYTB, ND1 และ ND4 ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในงานวิจัย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิในวงศ์ Paramphistomidae หลายชนิด และไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับพยาธิชนิด

O. dicranocoelium ในงานวิจัย ดังนั้นจึงแสดงผลข้อมูลของพยาธิที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิพบว่าสามารถระบุชนิดพยาธิ *O. dicranocoelium* ได้อย่างชัดเจน โดยอาศัยรูปแบบของคอหอยแบบ *dicranocoelium type* ที่มี lip sphincter ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของพยาธิชนิดดังกล่าว

การเปรียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิชนิด *P. epiclitum* กับพยาธิชนิดอื่นในสกุล *Paramphistomum* โดยอาศัยรูปแบบของคอหอยพบว่าพยาธิชนิด *P. epiclitum* มีคอหอยแบบ *calicophoron type* ต่างจากพยาธิชนิด *P. cervi* ที่มีคอหอยแบบ *liorchis type* เมื่อใช้ลักษณะของ *acetabulum* เปรียบเทียบ พบว่าพยาธิชนิด *P. epiclitum* มีรูปแบบ *paramphistomum type* ต่างจากพยาธิชนิด *P. ichikawai* ที่มีรูปแบบ *pisum type* สอดคล้องกับการรายงานวิจัยก่อนหน้า (Eduardo, 1982b) อีกทั้งขนาดและรูปร่างของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ในงานวิจัยนี้ยังมีลักษณะที่สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้า (Khan et al., 2020) ทั้งนี้เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากวิจัย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COX1 ของพยาธิชนิด *P. epiclitum* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับพยาธิชนิด *P. epiclitum* ในฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าผลการระบุชนิดของพยาธิชนิด *P. epiclitum* ด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีความสอดคล้องกัน

ผลการวินิจฉัยการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว ในมูลสัตว์ด้วยวิธี *formalin-ether sedimentation* ในงานวิจัยนี้พบลักษณะของไข่พยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วมีรูปร่างกลมรีเปลือกบาง สีเทา มีฝาปิดเปลือกไข่ ขนาดความกว้าง 61.4-91.3 ไมโครเมตร ความยาว 126.7-171.2 ไมโครเมตร สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (Gordon et al., 2013) พบปริมาณไข่ต่อกรัมสูงถึง 241 ฟอง ค่าความชุกขรร้อยละ 42.1 (104/247) ซึ่งมีค่าความชุกสูงกว่ารายงานวิจัยก่อนหน้าหลายรายงาน เช่น รายงานของ Jittapalapong ที่รายงานความชุกของการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วร้อยละ 28.41 (Jittapalapong et al., 2011) รายงานของ Yuwajita และคณะ ที่รายงานค่าความชุกของการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้วร้อยละ 20.08 (Yuwajita et al., 2014) รายงานของ Chowdhury และคณะ ที่รายงานความชุกของพยาธิในสกุล *Paramphistomum* ร้อยละ 22.0 (Chowdhury et al., 2017) รายงานของ Getahun และคณะ ที่รายงานความชุกของพยาธิในสกุล *Paramphistomum* ร้อยละ 10.2 (Getahun et al., 2017) และรายงานของ Shameem และคณะ ที่รายงานความชุกของพยาธิสกุล *Paramphistomum* ร้อยละ 25.47 (Shameem, Malathi, & Marlapudi, 2021) เมื่อเปรียบเทียบความชุกกับรายงานวิจัยก่อนหน้า

แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีรี้วมีการระบาดเพิ่มมากขึ้น โดยจังหวัดที่มีการระบาดของพยาธิสูงที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี ร้อยละ 57.9, จังหวัดนครนายก ร้อยละ 56.1 และจังหวัดชัยนาท ร้อยละ 48.4 ซึ่งมีสาเหตุมาจากพื้นที่จังหวัดดังกล่าวเป็นพื้นที่เกษตรกรรมและมีการรายงานการระบาดของหอยน้ำจืดซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีรี้ว (Anucherngchai, Chontanarath, Tejangkura, & Wongsawad, 2020; Dunchungzin & Chontanarath, 2020, 2021) ซึ่งส่งผลให้ความเสี่ยงในปศุสัตว์บริเวณพื้นที่จังหวัดดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นมากกว่าพื้นที่อื่น ๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการสร้างแผนเฝ้าระวังการระบาด เพื่อให้เกิดการติดเชื้อในปศุสัตว์น้อยที่สุด โดยต้องทำการตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิในระยะไข่ในมูลสัตว์ เพื่อคัดแยกสัตว์ที่ติดพยาธิและไม่ติดพยาธิออกจากกัน ป้องกันการกระจายของเชื้อ เนื่องจากสัตว์ปศุสัตว์มีการเลี้ยงแบบเป็นกลุ่มและมีการบริโภคพืชในแหล่งพื้นที่เดียวกัน หากมีสัตว์ติดเชื้อจะสามารถแพร่กระจายไปยังสัตว์ตัวอื่นได้ผ่านทางมูลสัตว์ที่มีระยะติดต่อ (ระยะเมตาเซอร์คาเรียในพืช) ของพยาธิที่ขับออกมา ส่งผลทำให้เกิดการระบาดของพยาธิเป็นวงกว้างมากขึ้น และกระทบต่อผลผลิตจากปศุสัตว์โดยรวมได้ ทั้งนี้การวินิจฉัยการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าชีรี้วแบบดั้งเดิม (formalin-ether sedimentation) เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้นไม่สามารถระบุชนิดของพยาธิที่พบได้ เนื่องจากไข่พยาธิในกลุ่มดังกล่าวมีลักษณะใกล้เคียงกันภายในกลุ่มพยาธิและมีขนาดใกล้เคียงกับพยาธิใบไม้ตับ และมีรายงานการตรวจพบพยาธิทั้ง 2 กลุ่มร่วมกันในปศุสัตว์อย่างต่อเนื่อง (Chryssafidis et al., 2015; Ploeger et al., 2017) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยในการระบุชนิดของพยาธิ โดยทำการระบุชนิดของพยาธิในระยะตัวเต็มวัยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ จากนั้นนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบกับระยะไข่ในมูลสัตว์

โดยในงานวิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนบนไมโทคอนเดรียจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *COX1*, *CYTB*, *ND1* และ *ND4* เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพยาธิกลุ่มเป้าหมายทั้ง 4 ชนิด และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ เพื่อใช้ในการระบุชนิดของพยาธิ โดยพบว่ายีนเหล่านี้เคยถูกนำไปใช้ในการระบุชนิดของพยาธิหลายชนิด เช่น ยีน *COX1* เคยใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิชนิด *Calicophoron daubneyi* และ *C. calicophorum* (Martinez-Ibeas et al., 2013) ยีน *ND1* เคยใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อพยาธิชนิด *C. calicophorum* และ *Expplanatum explanatum* (Chamuah et al., 2016) และยีน *ND4* เคยใช้ในการระบุชนิดของพยาธิชนิด *Fasciola hepatica* (Walker et al., 2007) ถึงแม้ทั้ง 3 ยีนจะมีความสามารถในการระบุชนิดของ

พยาธิชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มกระเพาะผ้าขี้ริ้วและพยาธิใบไม้ในตับ เนื่องจากมีตำแหน่งอนุรักษ (conserve region) ภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันค่อนข้างสูง (Simon et al., 1994) แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 ยีน มาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ในกระเพาะผ้าขี้ริ้ว จำนวน 4 ชนิดที่เป็นเป้าหมายในงานวิจัย พบว่าไพรเมอร์จำเพาะบางคู่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อโฮสต์และ/หรือพยาธิที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดได้ ส่งผลให้ไม่สามารถใช้ระบุชนิดของพยาธิได้อย่างชัดเจน สาเหตุเนื่องมาจากข้อจำกัดในการเลือกตำแหน่งการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องมีขนาดผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของพยาธิเพื่อนำไปพัฒนาการตรวจในรูปแบบ multiplex PCR เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อร่วมกันของพยาธิ ซึ่งทำให้ไพรเมอร์บางคู่ ตำแหน่งที่ออกแบบมีความคาบเกี่ยวหรือทับซ้อนกับบริเวณอนุรักษร่วมกันของพยาธิหลายชนิดในยีนเดียวกัน เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค PCR แม้มีการปรับเวลาหรืออุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยารวมถึงปรับปริมาตรหรือความเข้มข้นของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา ก็ไม่สามารถให้ความจำเพาะกับพยาธิเป้าหมายได้เพียงชนิดเดียว

อย่างไรก็ตามพบว่าไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน *CYTb* ให้ผลที่แตกต่าง แม้ว่ามีข้อจำกัดในการออกแบบไพรเมอร์เช่นเดียวกันกับ 3 ยีนข้างต้น แต่เมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างพยาธิที่พบในงานวิจัย พบว่ามีความจำเพาะกับพยาธิเป้าหมายเพียงชนิดเดียว ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อของโฮสต์และพยาธิชนิดอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยหลายงานก่อนหน้าที่กล่าวว่ายีน *CYTb* สามารถใช้ระบุชนิดของพยาธิหลายชนิด เช่น ระบุชนิดของพยาธิตัวกลมในหลอดอาหารของสุนัขชนิด *Spirocerca lupi* (Rojas et al., 2017) พยาธิใบไม้ในลำไส้ชนิด *Echinostoma revolutum* (Anucherngchai et al., 2019) พยาธิใบไม้ชนิด *Fasciola gigantica* (Chontanarith & Parawat, 2019) ปรสิตโพรโทซัวในเลือดชนิด *Babesia bovis* และ *B. bigemina* (Y. Yang et al., 2016) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYTb* ในพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้วมีความยาวประมาณ 1,112 - 1,115 เบส (Yang et al., 2015) ซึ่งมีความยาวที่มากพอทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่ ที่มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันของพยาธิ 4 ชนิดที่พบในงานวิจัย (198, 389, 545 และ 675 คู่เบส) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อร่วมกันของพยาธิในสัตว์ตัวเดียวได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยหลายงานที่ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะให้มีขนาดที่แตกต่างกันเพื่อให้สามารถแยกชนิดของพยาธิได้อย่างชัดเจน (Bartolomé et al., 2018; Bisset et al., 2014; Chontanarith, 2017; Martinez-Ibeas et al., 2013; Zarlenga et al., 2001)

เมื่อเปรียบเทียบความไวของไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน *CYTB* พบว่าความไวในเทคนิค PCR สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของพยาธิได้ต่ำสุดในช่วง 10.0 นาโนกรัม ถึง 1.0 พิโคกรัม ในขณะที่เทคนิค multiplex PCR สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอของพยาธิต่ำสุดได้ในช่วง 1.0 - 0.1 นาโนกรัม จะเห็นได้ว่าความไวของไพรเมอร์ในเทคนิค multiplex PCR มีความไวที่ต่ำกว่าเทคนิค PCR เนื่องจากในเทคนิค multiplex PCR มีการใช้ไพรเมอร์หลายคู่ (4 คู่) ในปฏิกิริยาเดียว ทำให้เกิดการยับยั้งกันในปฏิกิริยา (inhibitor) ส่งผลให้ความไวต่ำ ต่างจากเทคนิค PCR ที่มีไพรเมอร์เพียงคู่เดียวจึงให้ความไวที่สูงกว่า ทั้งนี้พบว่า Wongsawad และคณะ เคยรายงานว่าไข่พยาธิชนิด *F. elongatus* และ *P. epiclitum* จำนวน 1 ฟอง มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 14.01 และ 17.53 นาโนกรัม ตามลำดับ (Wongsawad et al., 2006) แสดงให้เห็นว่าความไวของไพรเมอร์ในงานวิจัยนี้สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างไข่พยาธิได้ โดยในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบกับตัวอย่างมูลสัตว์ที่เก็บจากจังหวัดนครนายก ซึ่งเป็นหนึ่งในจังหวัดที่พบการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะปัสสาวะสูง ผลการทดสอบพบว่าเกิดผลบวกในตัวอย่างมูลสัตว์ และสามารถระบุชนิดของไข่พยาธิที่พบได้ ดังนั้นไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบในงานวิจัยเพื่อใช้ในเทคนิค multiplex PCR จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปประยุกต์ใช้กับแหล่งเพาะเลี้ยงโค-กระบือ ช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสามารถตรวจวินิจฉัยการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะปัสสาวะในปศุสัตว์ได้ก่อนที่สัตว์จะแสดงอาการของโรค paramphistomosis และสามารถวางแผนเฝ้าระวังการระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะปัสสาวะได้อย่างทัน่วงที โดยงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ที่สามารถตรวจสอบการติดพยาธิใบไม้ในกระเพาะปัสสาวะได้ 4 ชนิด ในปฏิกิริยาเดียวกัน และสามารถใช้ในการตรวจสอบระยะไข่ในมูลสัตว์ได้

บรรณานุกรม

- Acharya, A. S., Prakash, A., Saxena, P., & Nigam, A. (2013). Sampling: Why and how of it. *Indian Journal of Medical Specialties*, 4(2), 330-333.
- Ai, L., Dong, S., Zhang, W., Elsheikha, H., Mahmmod, Y., Lin, R., . . . Zhu, X. (2010). Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 104(1), 65-72.
- Ali, Q., Rashid, I., Shabbir, M. Z., Akbar, H., Shahzad, K., Ashraf, K., . . . Chaudhry, U. (2018). First genetic evidence for the presence of the rumen fluke *Paramphistomum epiclitum* in Pakistan. *Parasitology international*, 67(5), 533-537.
- Anuar, T. S., Al-Mekhlafi, H. M., Ghani, M. K. A., Bakar, E. A., Azreen, S. N., Salleh, F. M., & Moktar, N. (2013). Evaluation of formalin-ether sedimentation and trichrome staining techniques: its effectiveness in detecting *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* in stool samples. *Journal of microbiological methods*, 92(3), 344-348.
- Anucherngchai, S., Chontanarith, T., Tejangkura, T., & Chai, J.-Y. (2019). The study of Cytochrome B (CYTB): species-specific detection and phylogenetic relationship of *Echinostoma revolutum*, (Froelich, 1802). *Journal of Parasitic Diseases*, 43(1), 66-74.
- Anucherngchai, S., Chontanarith, T., Tejangkura, T., & Wongsawad, C. (2020). Molecular classification of rumen fluke eggs in fecal specimens from Suphanburi Province, Thailand, based on cytochrome C oxidase subunit 1. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 20, 100382.
- Anuracpreeda, P., Panyarachun, B., Ngamniyom, A., Tinikul, Y., Chotwiwatthanakun, C., Poljaroen, J., & Sobhon, P. (2012). *Fischoederius cobboldi*: a scanning electron microscopy investigation of surface morphology of adult rumen fluke. *Experimental parasitology*, 130(4), 400-407.
- Anuracpreeda, P., Wanichanon, C., & Sobhon, P. (2008). *Paramphistomum cervi*:

- Antigenic profile of adults as recognized by infected cattle sera. *Experimental parasitology*, 118(2), 203-207.
- Arfaa, F. (1962). A study of *Paramphistomum microbothrium* in Khuzistan S.-W. Iran. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 37(4), 549-555.
- Arias, M., Sanchis, J., Francisco, I., Francisco, R., Pineiro, P., Cazapal-Monteiro, C., . . . Paz-Silva, A. (2013). The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle. *Veterinary parasitology*, 197(1-2), 126-129.
- Barakat, H., El-Garhy, H. A., & Moustafa, M. M. (2014). Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and *cytb* genes. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(23), 9805-9816.
- Bartolomé, C., Buendía, M., Benito, M., De la Rúa, P., Ornosá, C., Martín-Hernández, R., . . . Maside, X. (2018). A new multiplex PCR protocol to detect mixed trypanosomatid infections in species of *Apis* and *Bombus*. *Journal of invertebrate pathology*, 154, 37-41.
- Bhalerao, G. D. (1935). *Helminth parasites of the domesticated animals in India* Helminth parasites of the domesticated animals in India. India: Imperial Council of Agricultural Research, Scientific Monograph.
- Bisset, S., Knight, J., & Bouchet, C. (2014). A multiplex PCR-based method to identify strongylid parasite larvae recovered from ovine faecal cultures and/or pasture samples. *Veterinary parasitology*, 200(1-2), 117-127.
- Boray, J. (1969). Studies on intestinal paramphistomosis in sheep due to *Paramphistomum ichikawai* Fukui, 1922. *Veterinary medical review*(4), 290-308.
- Buathong, S., Leelayoova, S., Mungthin, M., Naaglor, T., Taamasri, P., Suwannahitorn, P., & Tan-ariya, P. (2015). Development and evaluation of PCR methods based on cytochrome c oxidase subunit one (*cox1*) and NADH dehydrogenase subunit one gene (*nad1*) to detect *Opisthorchis viverrini* in human fecal samples. *Parasitology research*, 114(9), 3547-3549.
- Cauquil, L., Hùe, T., Hurlin, J.-C., Mitchell, G., Searle, K., Skuce, P., & Zadoks, R. (2016).

- Prevalence and sequence-based identity of rumen fluke in cattle and deer in New Caledonia. *PloS one*, 11(4), e0152603.
- Chamuah, J., Raina, O., Lalrinkima, H., Jacob, S., Sankar, M., Sakhrie, A., . . . Banerjee, P. (2016). Molecular characterization of veterinary important trematode and cestode species in the mithun *Bos frontalis* from north-east India. *Journal of helminthology*, 90(5), 577-582.
- Chaudhry, U., van Paridon, B., Lejeune, M., Shabbir, M. Z., Rashid, M. I., Ashraf, K., . . . Sargison, N. (2017). Morphological and molecular identification of *Explanatum explanatum* in domestic water buffalo in Pakistan. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 8, 54-59.
- Chontanarith, T. (2017). Multiplex PCR assay for discrimination of *Centrocestus caninus* and *Stellantchasmus falcatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 103-106.
- Chontanarith, T., & Parawat, J. (2019). Development of Cytochrome B, a new candidate gene for a high accuracy detection of *Fasciola* eggs in fecal specimens. *Veterinary parasitology*, 274, 108922.
- Chowdhury, R., Sen, A., Kar, J., & Nath, S. K. (2017). Prevalence of gastrointestinal parasitism of cattle at Chandaniash Upazilla, Chittagong, Bangladesh. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(6), 144-149.
- Chryssafidis, A. L., Fu, Y., De Waal, T., & Mulcahy, G. (2015). Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: A tool for evaluating new technologies of parasite control. *Veterinary parasitology*, 210(1-2), 25-31.
- Coskun, S., Eslami, A., Halajian, A., & Nikpey, A. (2012). Amphistome species in cattle in South coast of Caspian Sea. *Iranian journal of parasitology*, 7(1), 32.
- Dunghungzin, C., & Chontanarith, T. (2020). Prevalence of cercarial infections in freshwater snails and morphological and molecular identification and phylogenetic trends of trematodes. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 13(10), 439.
- Dunghungzin, C., & Chontanarith, T. (2021). The prevalence of cercarial infection and

- development of a duplex PCR for detection of the cercarial stage of *Haplorchis taichui* and *H. pumilio* in first intermediate hosts from Chai Nat province, Thailand. *Acta Tropica*, 214, 105795.
- Eduardo, S. (1980). *Orthocoelium indonesiense*, a new species of amphistome from ruminants in Indonesia. *Systematic Parasitology*, 1(3-4), 203-210.
- Eduardo, S. (1982a). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. I. General considerations. *Systematic Parasitology*, 4(1), 7-57.
- Eduardo, S. (1982b). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. II. Revision of the genus *Paramphistomum* Fiscoeder, 1901. *Systematic Parasitology*, 4(3), 189-238.
- Eduardo, S. (1983). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. III. Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937. *Systematic Parasitology*, 5(1), 25.
- Eduardo, S. (1984). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants IV. Revision of the genus *Gigantocotyle* Näsmark, 1937 and elevation of the subgenus *Explanatum* Fukui, 1929 to full generic status. *Systematic Parasitology*, 6(1), 3-32.
- Eduardo, S. (1985). The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. VI. Revision of the genus *Orthocoelium* (Stiles & Goldberger, 1910) Price & McIntosh, 1953. *Systematic Parasitology*, 7(2), 125-158.
- El-Bahy, N. M., Bazh, E. K., & Elkhtam, A. (2017). New approach to molecular characterization of *Paramphistomum cervi* and *Carmyerius gregarius* and comparative analyses with selected trematodes. *Parasitology research*, 116(5), 1417-1422.
- Fukui, T. (1929). Studies on Japanese amphistomatous parasites, with revision of the group. *Japanese Journal of Zoology, Transactions and Abstracts*, 2(21), 351.

- Getahun, T. K., Siyoum, T., Yohannes, A., & Eshete, M. (2017). Prevalence of gastrointestinal parasites in dry season on dairy cattle at Holeta Agricultural Research Center Dairy Farm, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(12), 356-360.
- Ghatani, S., Shylla, J., Tandon, V., Chatterjee, A., & Roy, B. (2012). Molecular characterization of pouched amphistome parasites (Trematoda: Gastrothylacidae) using ribosomal ITS2 sequence and secondary structures. *Journal of helminthology*, 86(1), 117-124.
- Gordon, D., Roberts, L., Lean, N., Zadoks, R., Sargison, N., & Skuce, P. (2013). Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Veterinary parasitology*, 195(1-2), 65-71.
- Horak, I. (1971). Paramphistomiasis of domestic ruminants. *Advances in parasitology*, 9, 33-72.
- Huson, K. M., Oliver, N. A., & Robinson, M. W. (2017). Paramphistomosis of ruminants: an emerging parasitic disease in Europe. *Trends in parasitology*, 33(11), 836-844.
- Jittapalapong, S., Sangwaranond, A., Nimsuphan, B., Inpankaew, T., Phasuk, C., Pinyopanuwat, N., . . . Anakewith, T. (2011). Prevalence of gastro-intestinal parasites of dairy cows in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 45(1), 40-45.
- Jones, R. A., Williams, H. W., Dalesman, S., Ayodeji, S., Thomas, R. K., & Brophy, P. M. (2017). The prevalence and development of digenean parasites within their intermediate snail host, *Galba truncatula*, in a geographic area where the presence of *Calicophoron daubneyi* has recently been confirmed. *Veterinary parasitology*, 240, 68-74.
- Jones, R. A., Williams, H. W., Dalesman, S., & Brophy, P. M. (2015). Confirmation of *Galba truncatula* as an intermediate host snail for *Calicophoron daubneyi* in Great Britain, with evidence of alternative snail species hosting *Fasciola hepatica*. *Parasites & vectors*, 8(1), 656.
- Khan, I., Afshan, K., Shah, S., Akhtar, S., Komal, M., & Firasat, S. (2020). Morphological

- and molecular identification of *Paramphistomum epiclitum* from buffaloes in Pakistan. *Acta parasitologica*, 65(1), 225-236.
- Lofy, W. M., Brant, S. V., Ashmawy, K. I., Devkota, R., Mkoji, G. M., & Loker, E. S. (2010). A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. *Veterinary parasitology*, 174(3-4), 234-240.
- Malrait, K., Verschave, S., Skuce, P., Van Loo, H., Vercruyssen, J., & Charlier, J. (2015). Novel insights into the pathogenic importance, diagnosis and treatment of the rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) in cattle. *Veterinary parasitology*, 207(1-2), 134-139.
- Martinez-Ibeas, A., Gonzalez-Warleta, M., Martínez-Valladares, M., Castro-Hermida, J., González-Lanza, C., Minambres, B., . . . Manga-González, M. Y. (2013). Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Veterinary parasitology*, 195(1-2), 57-64.
- Mohanta, U., Rana, H., Devkota, B., & Itagaki, T. (2017). Molecular and phylogenetic analyses of the liver amphistome *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) Fukui, 1929 in ruminants from Bangladesh and Nepal based on nuclear ribosomal ITS2 and mitochondrial *nad1* sequences. *Journal of helminthology*, 91(4), 497-503.
- Morozova, E., Chisankova, G., Arkhipov, I., & Semyenova, S. (2004). Polymorphism of the *ND1* and *CO1* mitochondrial genes in populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Russian Journal of Genetics*, 40(7), 817-820.
- Nak-On, S., & Chontanarith, T. (2020). Rumen fluke, *Fischoederius elongatus* (Trematoda: Gastrothylacidae): Preliminary investigation of suitable conditions for egg hatching. *Veterinary parasitology*, 282, 109135.
- Ottó, S. (1985). Amphistomes of vietnamese vertebrates (Trematoda: Amphistomida). *Parasitologia Hungarica*, 18, 17-24.
- Otto, S., & Eslami, A. (1980). Review of amphistomes (Trematoda, paramphistomata) of Iranian domestic ruminants. *Parasitologia Hungarica*, 14, 61-65.
- Panyarachun, B., Sobhon, P., Tinikul, Y., Chotwivatthanakun, C., Anupunpisit, V., &

- Anuracpreeda, P. (2010). *Paramphistomum cervi*: surface topography of the tegument of adult fluke. *Experimental parasitology*, 125(2), 95-99.
- Ploeger, H., Ankum, L., Moll, L., van Doorn, D., Mitchell, G., Skuce, P., . . . Holzhauer, M. (2017). Presence and species identity of rumen flukes in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary parasitology*, 243, 42-46.
- Rojas, A., Segev, G., Markovics, A., Aroch, I., & Baneth, G. (2017). Detection and quantification of *Spirocerca lupi* by HRM qPCR in fecal samples from dogs with spirocercosis. *Parasites & vectors*, 10(1), 435.
- Rolfe, P., Boray, J., Nichols, P., & Collins, G. (1991). Epidemiology of paramphistomosis in cattle. *International Journal for Parasitology*, 21(7), 813-819.
- Rongchang, Y., Brice, B., & Ryan, U. (2015). Morphological and molecular characterization of *Eimeria haematodi*, coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) in a rainbow lorikeet (*Trichoglossus haematodus*). *Experimental parasitology*, 153, 123-128.
- Roy, B., & Tandon, V. (1992). Trematodiasis in North-East India: A study on the spectrum of digenetic trematodes among pigs, buffaloes, cattle goats and sheep. *Indian Journal of Animal Health*, 13, 5-14.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., . . . Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sanguankiat, S., Sato, M. O., Sato, M., Maipanich, W., Yoonuan, T., Pongvongsa, T., . . . Waikagul, J. (2016). First Record of Paramphistomes *Fischoederius cobboldi* and *Paramphistomum epiclitum* Detected in Bovine Rumen from a Local Market of Savannakhet Province, Lao PDR. *The Korean journal of parasitology*, 54(4), 543.
- Sey, O. (1985). Review of pouched amphistomes of Vietnamese ruminants, with a description of *Carmyerius bulbosus* sp. n. (Trematoda, Amphistomida). *Miscellanea Zoologica Hungarica*, 3, 31-35.
- Sey, O. (2019). *CRC Handbook of the Zoology of Amphistomes*. Florida: CRC press.
- Sey, O., & Prasitirat, P. (1994). Amphistomes (Trematoda, Amphistomida) of cattle and buffalo in Thailand. *Miscellanea Zoologica Hungarica*, 9, 11-17.

- Shameem, U., Malathi, S., & Marlapudi, K. (2021). Prevalence Of Gastrointestinal Helminth Parasites In Domestic Ruminants From Srikakulam District, Andhra Pradesh, India. *Journal of Parasitic Diseases*.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Sripalwit, P., Wongsawad, C., Wongsawad, P., & Anuntalabhochai, S. (2007). High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) analysis of three paramphistome flukes from Thailand. *Experimental parasitology*, 115(1), 98-102.
- Swarnakar, G., Kumawat, A., Sanger, B., Roat, K., & Goswami, H. (2014). Prevalence of amphistome parasites (Trematoda: Digenea) in Udaipur of southern Rajasthan, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(4), 32-37.
- Szmidt-Adjidé, V., Abrous, M., Adjidé, C., Dreyfuss, G., Lecompte, A., Cabaret, J., & Rondelaud, D. (2000). Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Veterinary parasitology*, 87(2-3), 133-138.
- Tandon, R. (1961). Studies on the excretory system of amphistome parasites of ruminants: II. The genera *Gastrothylax* Poirier, 1883, and *Fischoederius* Stiles & Goldberger, 1910. *Parasitology*, 51(1-2), 127-132.
- Thaenkham, U., Phuphisut, O., Nuamtanong, S., Yoonuan, T., Sa-Nguankiat, S., Vonghachack, Y., . . . Waikagul, J. (2017). Genetic differences among *Haplorchis taichui* populations in Indochina revealed by mitochondrial COX1 sequences. *Journal of helminthology*, 91(5), 597-604.
- Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparijs, O. (1986). *Diagnosing helminthiasis by coprological examination* (Vol. 1986). Belgium: Janssen research foundation Beerse.
- Truant, A. L., Elliott, S. H., Kelly, M. T., & Smith, J. H. (1981). Comparison of formalin-ethyl

- ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. *Journal of clinical microbiology*, 13(5), 882-884.
- Van De, N., & Le, T. H. (2011). Human infections of fish-borne trematodes in Vietnam: prevalence and molecular specific identification at an endemic commune in Nam Dinh province. *Experimental parasitology*, 129(4), 355-361.
- Walker, S., Prodöhl, P., Fletcher, H., Hanna, R., Kantzoura, V., Hoey, E., & Trudgett, A. (2007). Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitology research*, 101(1), 117-125.
- Wang, L., Luo, X., Hou, J., Guo, A., Zhang, S., Li, H., & Cai, X. (2016). Infection of *Taenia asiatica* in a Bai Person in Dali, China. *The Korean journal of parasitology*, 54(1), 67.
- Wannasan, A., Khositharattanakool, P., Chaiwong, P., Piangjai, S., Uparanukraw, P., & Morakote, N. (2014). Identification of *Fasciola* species based on mitochondrial and nuclear DNA reveals the co-existence of intermediate *Fasciola* and *Fasciola gigantica* in Thailand. *Experimental parasitology*, 146, 64-70.
- Wongsawad, C., Wongsawad, P., Chai, J.-Y., Paratasilpin, T., & Anuntalabhochai, S. (2006). DNA quantities and qualities from various stages of some trematodes using optical and HAT-RAPD methods. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 37, 62.
- Yamaguti, S. (1958). *Systema Helminthum The Digenetic Trematodes of Vertebrates-Part I*. New York: Interscience Publishers Inc.
- Yang, Zhao, Y., Wang, L., Feng, H., Tan, L., Lei, W., . . . Fang, R. (2015). Analysis of the complete *Fischoederius elongatus* (Paramphistomidae, Trematoda) mitochondrial genome. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-8.
- Yang, Y., Li, Q., Wang, S., Chen, X., & Du, A. (2016). Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Veterinary parasitology*, 219, 71-76.

- Yuwajita, C., Pruangka, S., & Sukwong, T. (2014). Prevalence of gastrointestinal parasites of cattle in Udon Thani, Thailand. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42(Suppl 4), 20-24.
- Zarlenga, D. S., Chute, M. B., Gasbarre, L. C., & Boyd, P. C. (2001). A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary parasitology*, 97(3), 201-211.
- Zarowiecki, M., Huyse, T., & Littlewood, D. (2007). Making the most of mitochondrial genomes—markers for phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology*, 37(12), 1401-1418.
- Zintl, A., Garcia-Campos, A., Trudgett, A., Chryssafidis, A. L., Talavera-Arce, S., Fu, Y., . . . Brennan, G. (2014). Bovine paramphistomes in Ireland. *Veterinary parasitology*, 204(3-4), 199-208.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จันทร์จุฬา ภาวะเวช
วัน เดือน ปี เกิด	28 มีนาคม 2537
สถานที่เกิด	อุบลราชธานี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ มัธยมศึกษา (วิทย์-คณิต) โรงเรียนนารีนุกูล จังหวัดอุบลราชธานี
ที่อยู่ปัจจุบัน	466/51 หมู่ 5 ต.ขามใหญ่ อ.เมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000
ผลงานตีพิมพ์	1) จันทร์จุฬา ภาวะเวช, ธนวรรณ เตชะกฤษ และ สุภาพนา ชลธนานารถ. (2564). การพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ชนิด <i>Fischoederius elongatus</i> โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1). ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ "มศว วิจัย" ครั้งที่ 14 . หน้า 575-583. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2) Chontanarith, T., & Parawat, J. (2019). Development of Cytochrome B, a new candidate gene for a high accuracy detection of <i>Fasciola</i> eggs in fecal specimens. <i>Veterinary parasitology</i> , 274, 108922. 3) จันทร์จุฬา ภาวะเวช, เมธาวิ สบายใจ และ สุภาพนา ชลธนานารถ. (2561). ค่าความชุกและสัดส่วนวิทยาของหนอนพยาธิในลำไส้กบนาชนิด <i>Hoplobatrachus rugulosus</i> (Wiegmann, 1834) จากอำเภอฟาร์มโพธิ์ จังหวัดอุบลราชธานี. <i>แก่นเกษตร</i> , 46: 986-991.
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลระดับชมเชย ในการนำเสนอแบบโปสเตอร์ ประเภทนักศึกษา งานประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 19 ประจำปี 2561