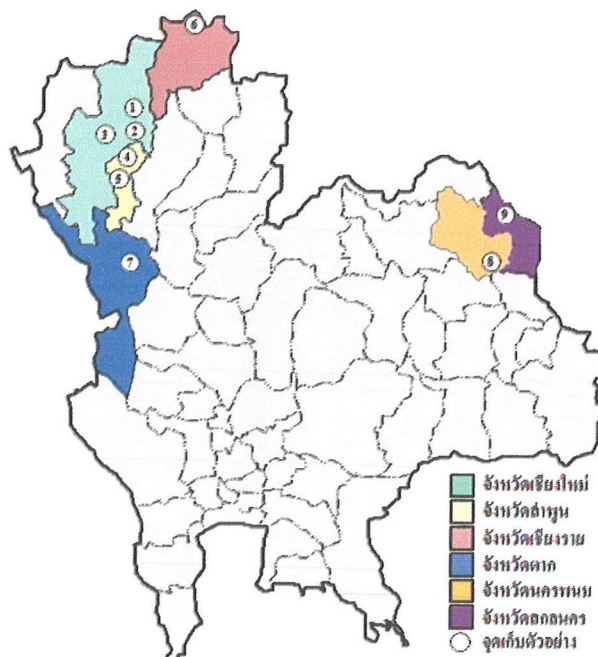


บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 สํารวจจุดเก็บตัวอย่าง

การสำรวจพยาธิระยะตัวเต็มวัยในวัว และควาย ได้กำหนดจุดเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ เพื่อเก็บตัวอย่างตับ ถุงน้ำดี และกระเพาะปัสสาวะของวัวและควาย จำนวน 6 จังหวัด แบ่งเป็นจุดเก็บตัวอย่างในภาคเหนือ 4 จังหวัด จำนวน 7 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดลำพูน จำนวน 2 จุดเก็บตัวอย่าง คือ อำเภอเมือง และ อำเภอป่าซาง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 จุดเก็บตัวอย่าง คือ อำเภอเมือง อำเภอดอยสะเก็ด และอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงราย 1 จุดเก็บตัวอย่าง คือ อำเภอแม่สาย และจังหวัดตาก 1 จุดเก็บตัวอย่าง คืออำเภอเมือง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัด จังหวัดละ 1 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดนครพนม คืออำเภอนาแก และจังหวัดสกลนคร คืออำเภอดำรงดำ (ภาพ 2)



ภาพ 2 แผนที่จุดเก็บตัวอย่างในจังหวัดต่าง ๆ

จังหวัดเชียงใหม่ (1) อำเภอเมืองเชียงใหม่ (2) สันกำแพง (3) ดอยสะเก็ด, จังหวัดลำพูน (4) อำเภอป่าซาง (5) เมืองลำพูน, จังหวัดเชียงราย (6) อำเภอแม่สาย, จังหวัดตาก (7) อำเภอเมืองตาก, จังหวัดสกลนคร (8) อำเภอดำรงดำ และจังหวัดนครพนม (9) อำเภอนาแก

4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของพยาธิใบไม้

Fasciola gigantica, Cobbold, 1855

(ภาพ 3-4)

Phylum Platyhelminthes

Class trematoda

Order Digenea

Family Fasciolidae

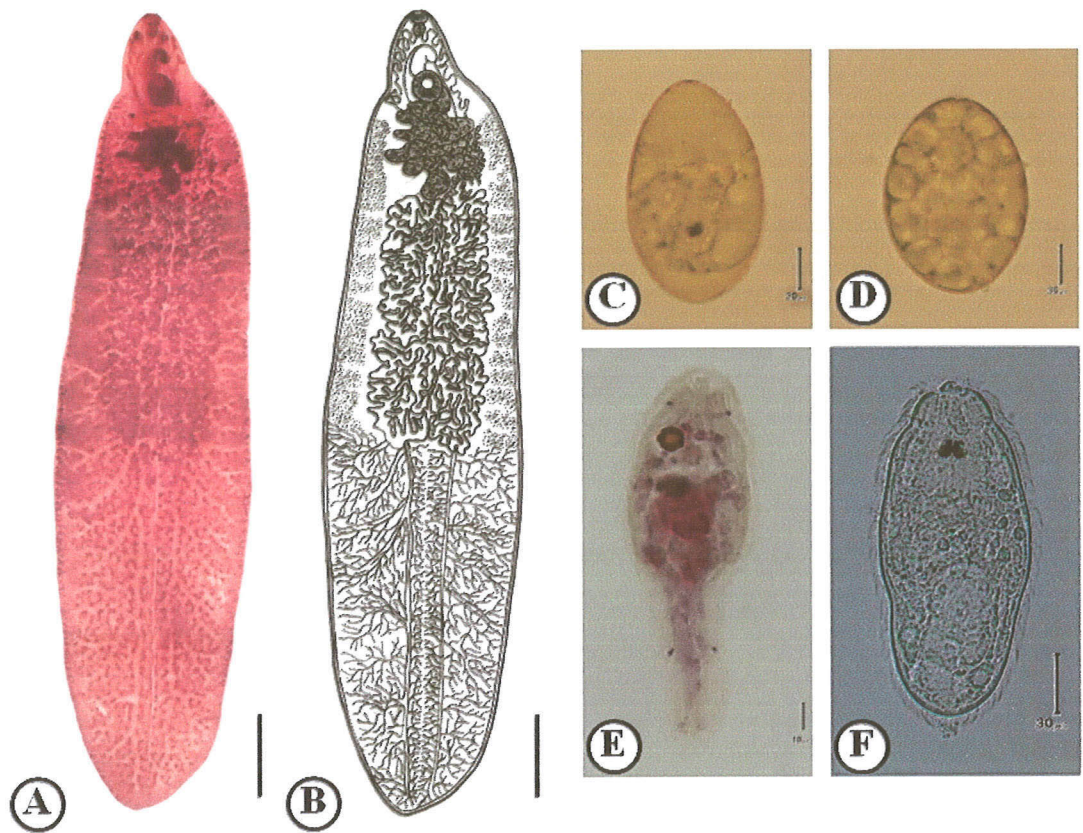
Genus *Fasciola*

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวมีขนาดใหญ่ แบน มีลักษณะรูปร่างคล้ายใบไม้ ขนาดลำตัวยาว 32.00–52.00 (42.78) มิลลิเมตร กว้าง 9.00–13.00 (10.70) มิลลิเมตร ส่วนหัวมีรูปร่างคล้ายกรวยเรียกว่า cephalic cone บริเวณ cuticle มี scale-like spine ส่วนของ oral sucker อยู่ในตำแหน่ง subterminal ยาว 0.59–0.98 (0.71) มิลลิเมตร กว้าง 0.75–0.115 (0.96) มิลลิเมตร prepharynx สั้น และพัฒนาดี ยาว 0.63–0.95 (0.79) มิลลิเมตร กว้าง 0.38–0.83 (0.58) มิลลิเมตร esophagus สั้น ยาว 0.08–0.60 (0.27) มิลลิเมตร กว้าง 0.18–0.40 (0.28) มิลลิเมตร genital pore อยู่ในตำแหน่งฐานของ cephalic cone ยาว 0.35–1.23(0.55) มิลลิเมตร กว้าง 0.40–1.13 (0.60) มิลลิเมตร ventral sucker ยาว 0.14–1.95 (1.57) มิลลิเมตร กว้าง 0.14–1.78 (1.47) มิลลิเมตร ลำไส้แยกเป็นแขนงจำนวนมากกระจายอยู่ทางด้านข้างลำตัว testes มี 2 อัน แยกเป็นแขนง ส่วนใหญ่ครอบคลุมตรงตำแหน่งของ postovarian อยู่ระหว่าง vitelline field เรียงตัวแบบ tandem ovary มี 1 อัน แยกเป็นแขนง อยู่ในตำแหน่ง submedian ก่อน testes vitellaria มีจำนวนมาก และพัฒนาดี กระจายอยู่ทางด้านข้างลำตัว uterus มีรูปแบบคล้ายดอกกุหลาบ อยู่ในตำแหน่งระหว่าง ventral sucker และ ovary ไข่มีขนาดใหญ่ ยาว 0.13–0.18 (0.14) มิลลิเมตร กว้าง 0.05–0.10 (0.07) มิลลิเมตร หลุดออกมาพร้อมกับอุจจาระของโฮสต์ ในระยะแรกไข่เป็นแบบ unembryonate eggs และพัฒนาไปเป็น embryonate eggs เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ระยะหนึ่ง และจะไชออกจากไข่เป็นระยะ miracidium

Host : วัว และควาย

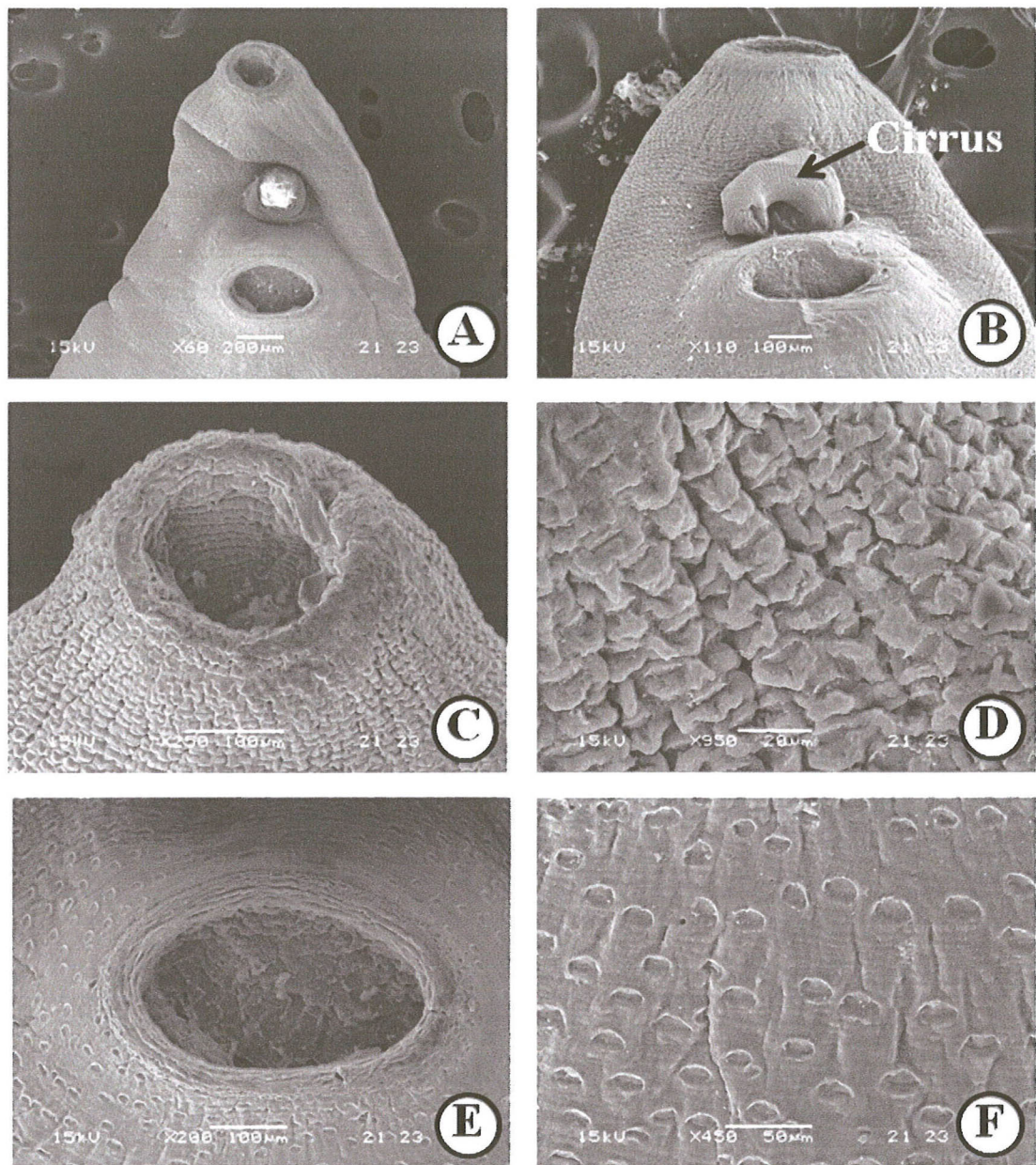
Habitat : ฤๅนน้ำดี และท่อน้ำดี



ภาพ 3 ลักษณะทั่วไป และระยะต่างๆ ของพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *Fasciola gigantica*

(Scale bar= 4mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) unembryonate egg (D) embryonate egg (E) ภาพถ่าย
ของไมราซิเดียมจากสไลด์ถาวร (F) ภาพถ่ายของไมราซิเดียมขณะยังมีชีวิต



ภาพ 4 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *Fasciola gigantica*

(A) แสดงตำแหน่งของ oral sucker, genital pore และ acetabulum (B) ลักษณะของ genital pore ที่มี cirrus โผล่ออกมา (C) ลักษณะของ oral sucker (D) ลักษณะของ tegument ที่อยู่รอบ oral sucker (E) ลักษณะของ acetabulum (F) ลักษณะ cuticle ที่มีลักษณะ scale-like spine

Fischoederius elongatus (Poiries, 1883)

(ภาพ 5-6)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Gastrothylacidae

Subfamily Gastrothylacinae

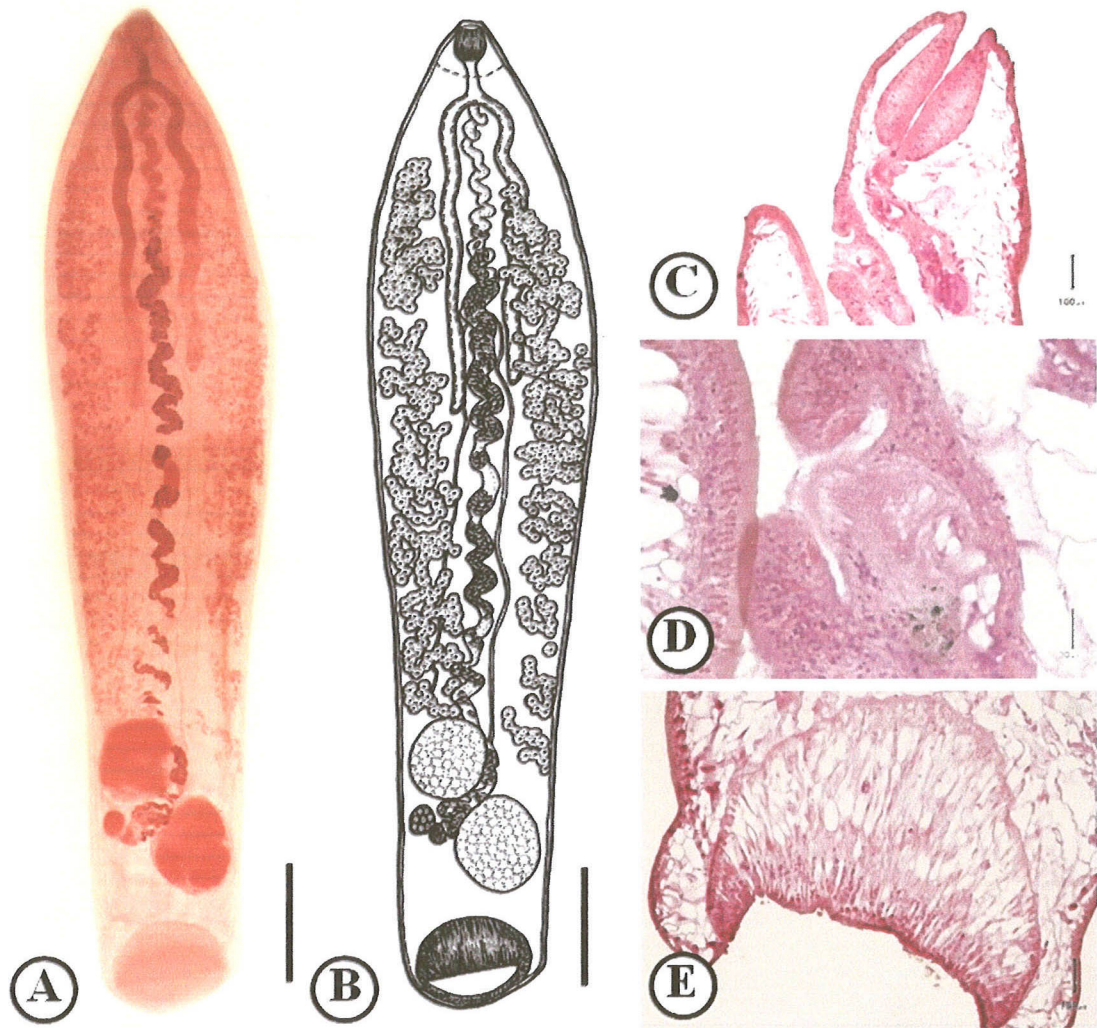
Genus *Fischoederius*

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวมีรูปร่างเรียว เกือบเป็นทรงกระบอก ยาว 13.00–21.50 (17.25) มิลลิเมตร กว้าง 2.00–4.50 (3.44) มิลลิเมตร acetabulum ค่อนข้างกลม อยู่ในตำแหน่ง terminal ยาว 1.08–1.48 (1.27) มิลลิเมตร กว้าง 1.58–1.98 (1.75) มิลลิเมตร ลักษณะแบบ gastrothylax type pharynx ยาว 0.53–0.65 (0.58) มิลลิเมตร กว้าง 0.33–0.50 (0.44) มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ *Calicophorn* type esophagus ยาว 0.55–0.80 (0.66) มิลลิเมตร กว้าง 0.13–0.20 (0.17) มิลลิเมตร พบ muscular sphincter testes มีขนาดปานกลางค่อนข้างกลม เป็น lobe เล็กน้อย เรียงตัวแบบ tandem anterior testis ยาว 1.10–1.63 (1.36) มิลลิเมตร กว้าง 0.95–1.45 (1.25) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 0.70–1.75 (1.28) มิลลิเมตร กว้าง 0.98–1.45 (1.23) มิลลิเมตร pars muscosa เจริญดี ovary ค่อนข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า ยาว 0.28–0.55 (0.40) มิลลิเมตร กว้าง 0.30–0.50 (0.40) มิลลิเมตร vitellaria อยู่ทางด้านข้างของลำตัว genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่ง postbifurcal terminal genitalium แบบ streptocoelium type eggs ยาว 0.13–0.18 (0.14) มิลลิเมตร กว้าง 0.05–0.08 (0.06) มิลลิเมตร

Host วัว และควาย

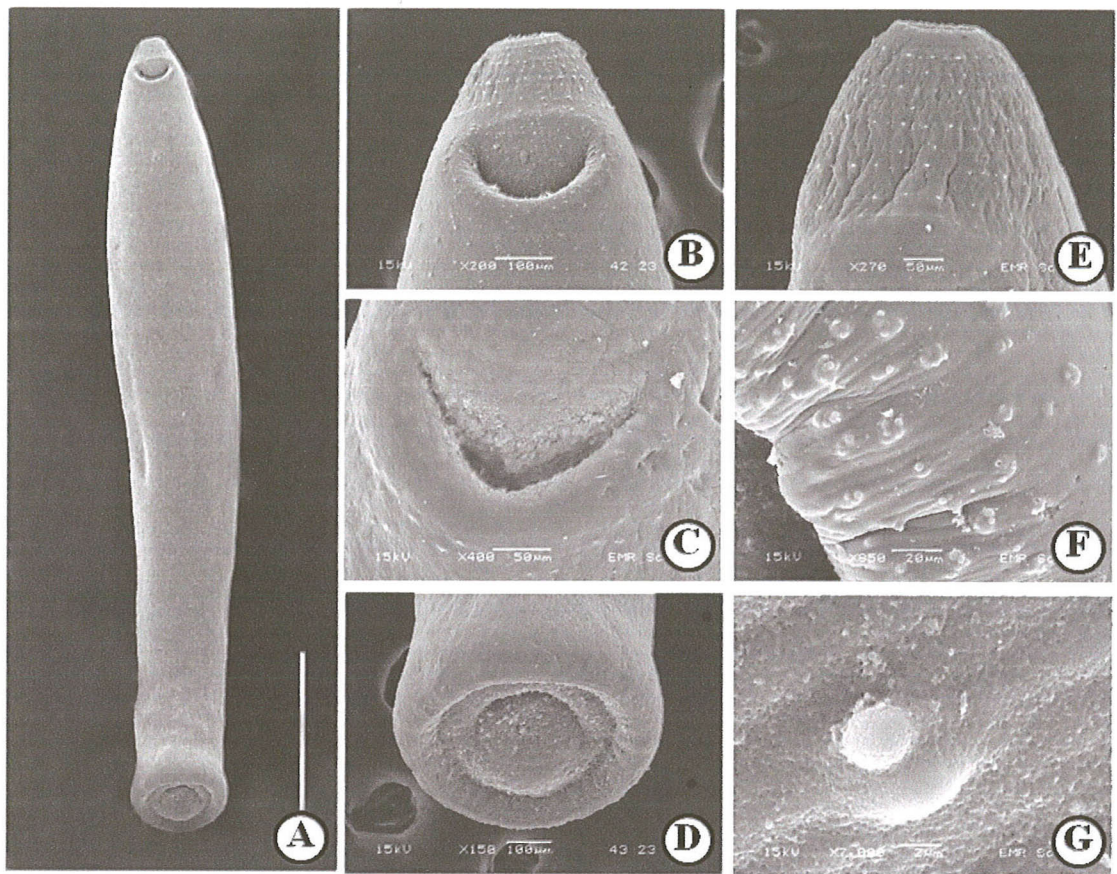
Habitat : กระเพาะผ้าชีวรี



ภาพ 5 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะปลาชี่ว *Fischoederius elongatus*

(Scale bar = 2 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagital section ของ pharynx แบบ *Fishoderius* type (D) sagital section ของ terminal genitalium แบบ gracile type (E) sagital section ของ acetabulum แบบ gastrothylax type



ภาพ 6 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีรี้ว *Fischoederius elongatus*

(A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) แสดงตำแหน่งของ oral sucker และ genital pore (C) แสดงลักษณะของ genital pore (D) ลักษณะของ acetabulum (E) ลักษณะของ spine ที่อยู่รอบ ๆ oral sucker (F) ลักษณะของ sensory papillae ที่อยู่รอบ ๆ acetabulum (G) ภาพขยายของ sensory papillae

Fischoederius sp.

(ภาพ 7-8)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Gastrothylacidae

Subfamily Gastrothylacinae

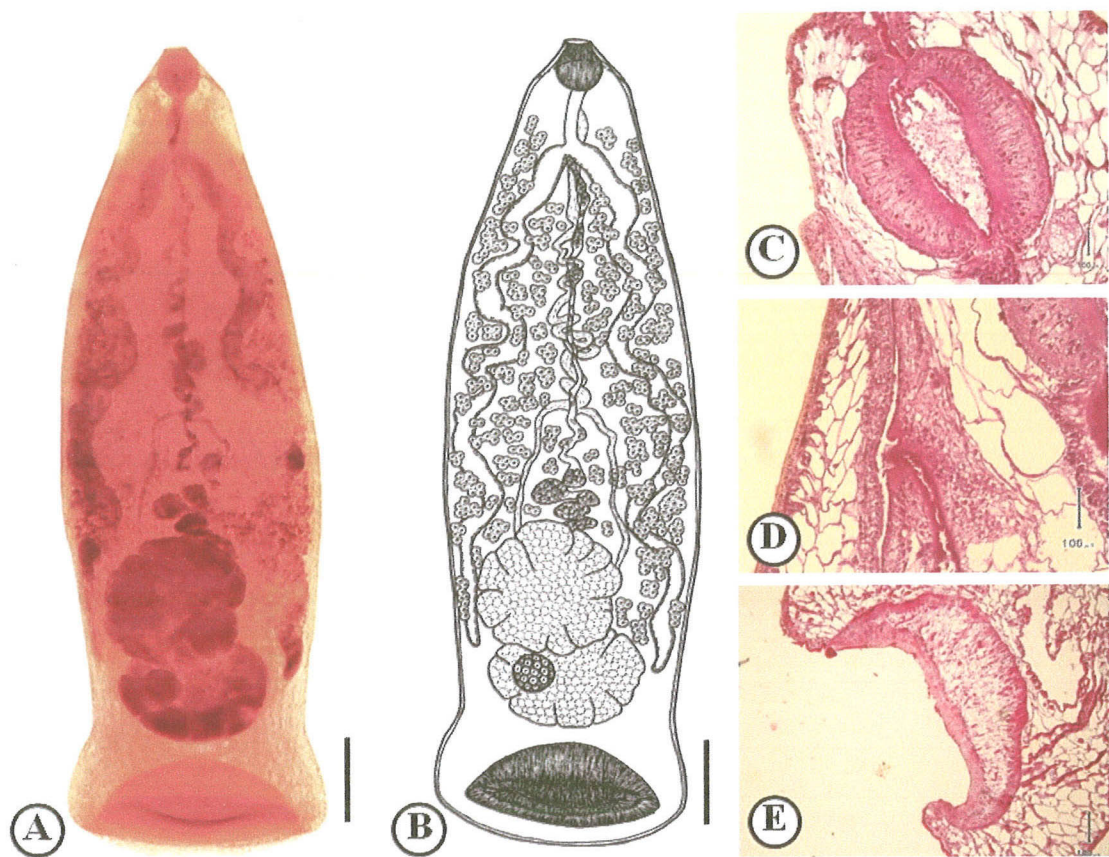
Genus *Fischoederius*

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวมีรูปร่างเกือบเป็นทรงกระบอก ยาว 12.50–21.50 (17.94) มิลลิเมตร กว้าง 5.50–7.50 (6.65) มิลลิเมตร acetabulum มีลักษณะค่อนข้างกลม อยู่ในตำแหน่ง terminal ยาว 1.95–2.80 (2.33) มิลลิเมตร กว้าง 3.55–5.58 (4.57) มิลลิเมตร ลักษณะเป็นแบบ gastrothylax type ส่วน pharynx ยาว 0.93–1.45 (1.14) มิลลิเมตร กว้าง 0.78–1.25 (0.99) มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ Calicophorn type esophagus ยาว 0.55–1.38 (0.91) มิลลิเมตร กว้าง 0.23–0.40 (0.31) มิลลิเมตร พบ muscular sphincter testes มีขนาดใหญ่ค่อนข้างกลม เป็น lobe เล็กน้อย เรียงตัวแบบ tandem ซึ่ง anterior testis ยาว 1.80–3.58 (2.66) มิลลิเมตร กว้าง 2.43–5.10 (3.25) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 1.83–3.50 (2.80) มิลลิเมตร กว้าง 2.45–4.40 (3.45) มิลลิเมตร pars muscosa เจริญดี ovary ค่อนข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า testis ยาว 0.35–1.20 (0.75) มิลลิเมตร กว้าง 0.38–1.25 (0.77) มิลลิเมตร vittellalia อยู่ทางด้านข้างของลำตัว genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่ง postbifurcal ส่วน terminal genitalium แบบ streptocoelium type eggs ยาว 0.10–0.13 (0.11) มิลลิเมตร กว้าง 0.05–0.08 (0.06) มิลลิเมตร

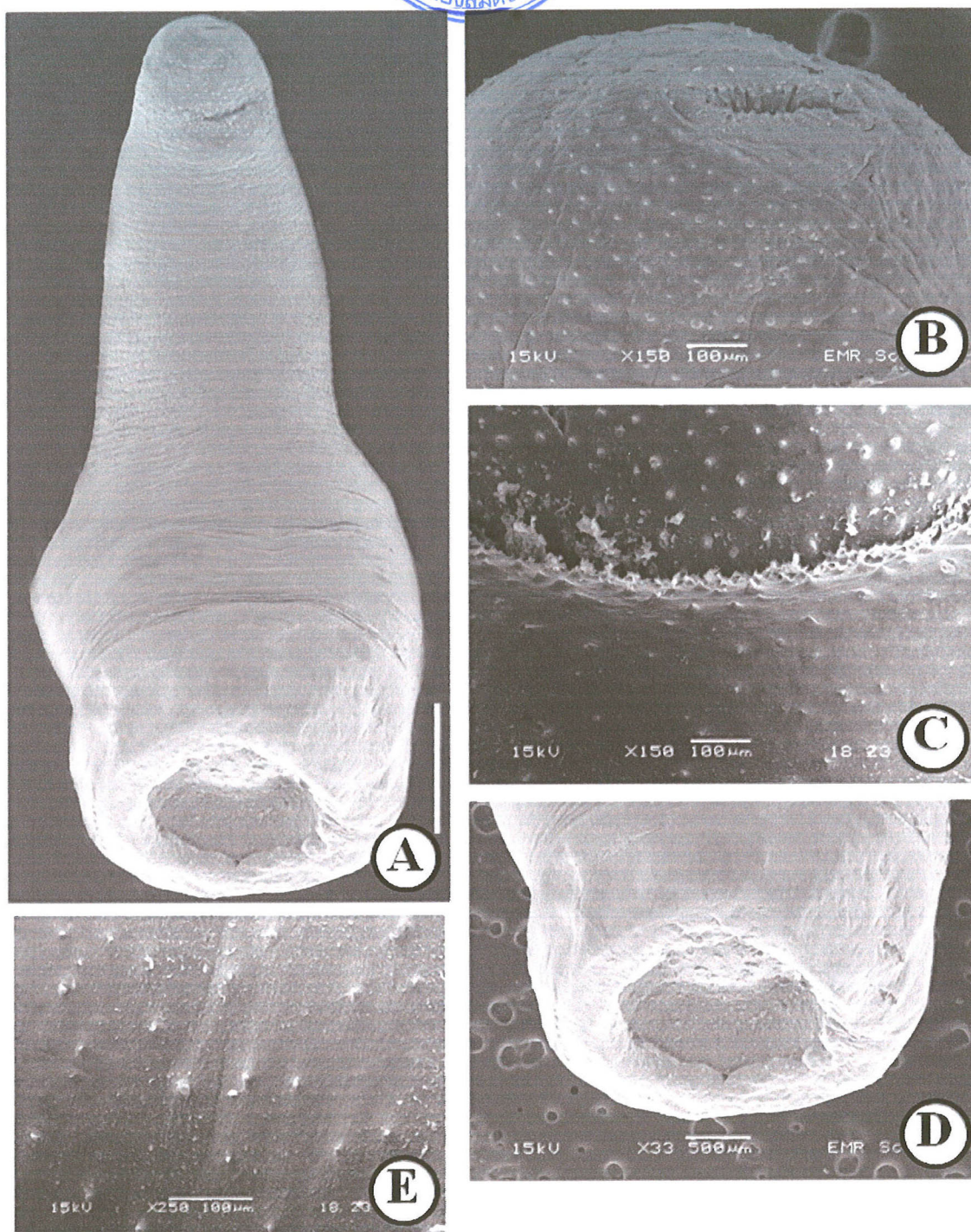
Host: วัว

Habitat : กระเพาะปัสสาวะ



ภาพ 7 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะปลาชื่อ *Fischoederius* sp. (Scale bar= 2 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagittal section ของ pharynx แบบ *Fishoderius* type (D) sagittal section ของ terminal genitalium แบบ gracile type (E) sagittal section ของ acetabulum แบบ gastrothylax type



ภาพ 8 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรี *Fischoederius* sp.

(A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) แสดงตำแหน่งของ oral sucker (C) แสดงลักษณะของ genital pore (D) ลักษณะของ acetabulum (E) ลักษณะของ tegument ที่มีตุ่มขนาดเล็กกระจายทั่วไป

Orthocoelium streptocoelium (Fischöder, 1901)

(ภาพ 9-10)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Paramphistomidae

Subfamily Paramphistomidae

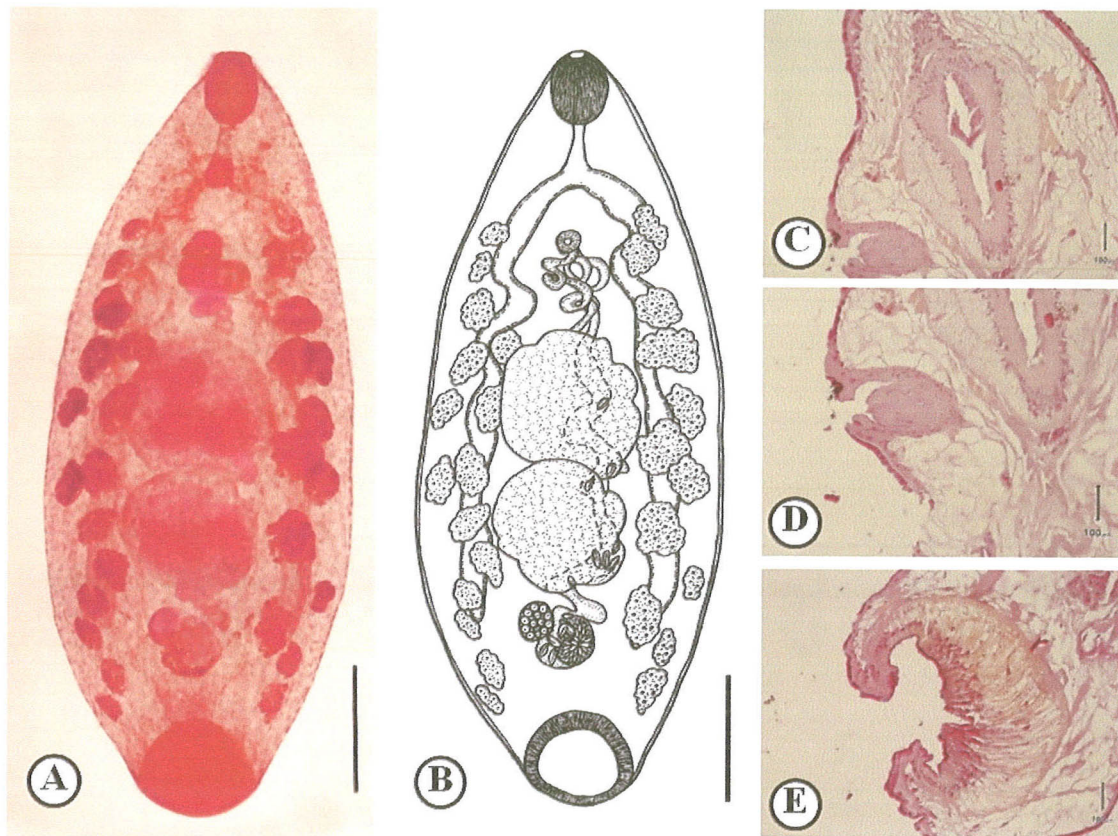
Genus *Orthocoelium*

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวเป็นทรงกรวย ยาว 6.00-10.00 (7.80) มิลลิเมตร กว้าง 2.00-3.50 (2.85) มิลลิเมตร acetabulum อยู่ในตำแหน่ง subterminal ยาว 0.68-0.93 (0.83) มิลลิเมตร กว้าง 0.80-1.00 (0.88) มิลลิเมตร ลักษณะแบบ *Streptocoelium* type pharynx ยาว 0.63-0.80 (0.67) มิลลิเมตร กว้าง 0.45-0.65 (0.56) มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ *Calicophorn* type ส่วน esophagus ยาว 0.38-0.63 (0.54) มิลลิเมตร กว้าง 0.20-0.33 (0.26) มิลลิเมตร พบ muscular sphincter testes 2 อัน มีขนาดปานกลางค่อนข้างกลม เป็น lobe เล็กน้อย เรียงตัวแบบ tandem anterior testis ยาว 0.75-1.75 (1.24) มิลลิเมตร กว้าง 0.63-1.83 (1.40) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 0.60-1.88 (1.27) มิลลิเมตร กว้าง 0.58-1.80 (1.45) มิลลิเมตร pars muscosa เจริญดี ovary ค่อนข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า testis ยาว 0.25-0.45 (0.35) มิลลิเมตร กว้าง 0.28-0.40 (0.34) มิลลิเมตร vitellaria อยู่ทางด้านข้างของลำตัว genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่ง postbifurcal terminal genitalium แบบ streptocoelium type eggs ยาว 0.10-0.13 (0.11) มิลลิเมตร กว้าง 0.06-0.08 (0.07) มิลลิเมตร

Host : วัว และควาย

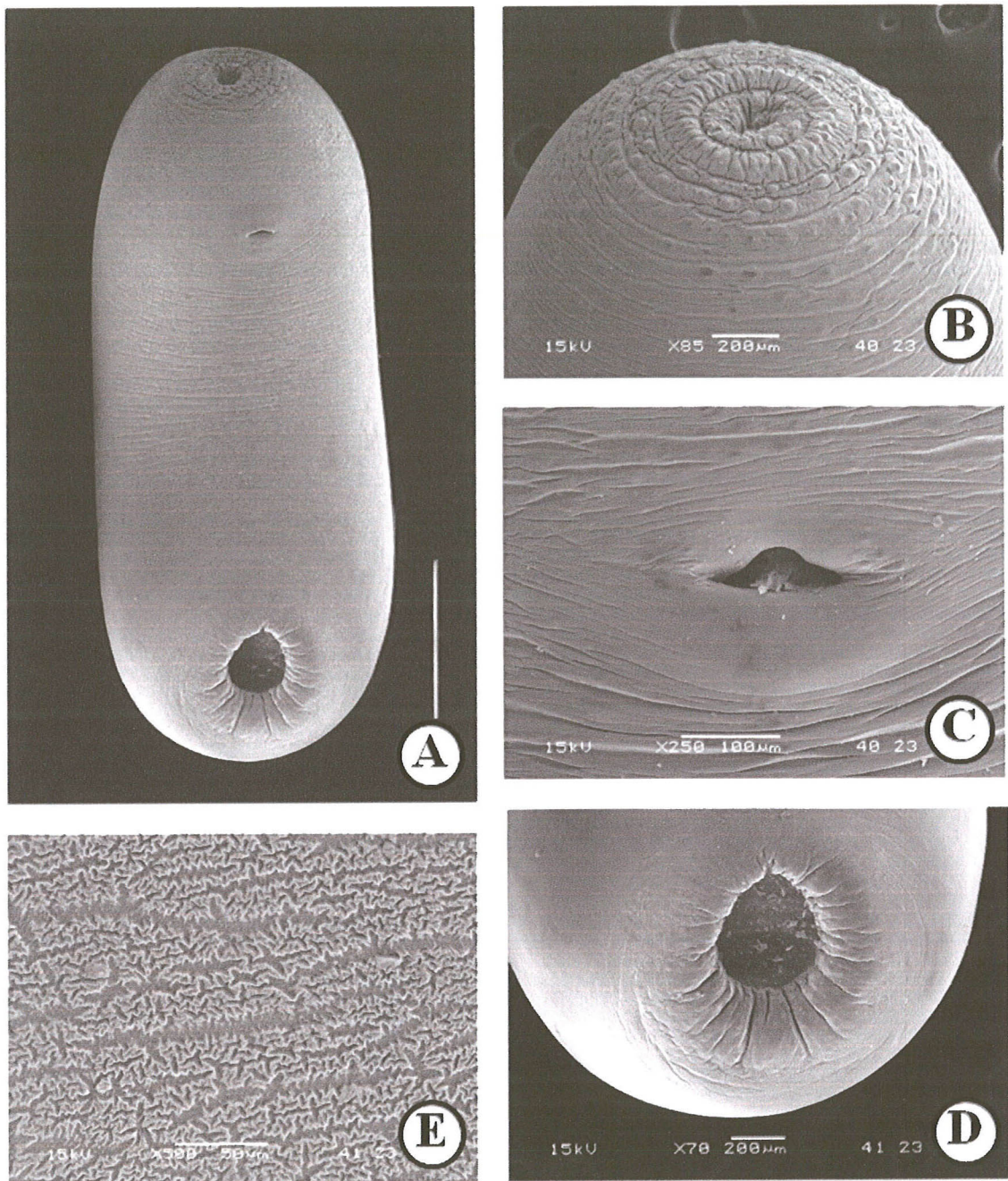
Habitat : กระเพาะ



ภาพ 9 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะปัสสาวะ *Orthocoelium streptocoelium*

(Scale bar= 1 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagittal section ของ pharynx แบบ caliophoron type (D) sagittal section ของ terminal genitalium แบบ streptocoelium type (E) sagittal section ของ acetabulum แบบ streptocoelium type



ภาพ 10 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีรีว *Orthocoelium streptocoelium*

(A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) ลักษณะของ oral sucker (C) ลักษณะของ genital pore (D) ลักษณะของ acetabulum (E) ลักษณะของ tegument ที่มีลักษณะเป็นรอยพับขดไปมา

Orthocoelium dicranocoelium (Fischöder, 1901)

(ภาพ 11-12)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Paramphistomidae

Subfamily Paramphistomidae

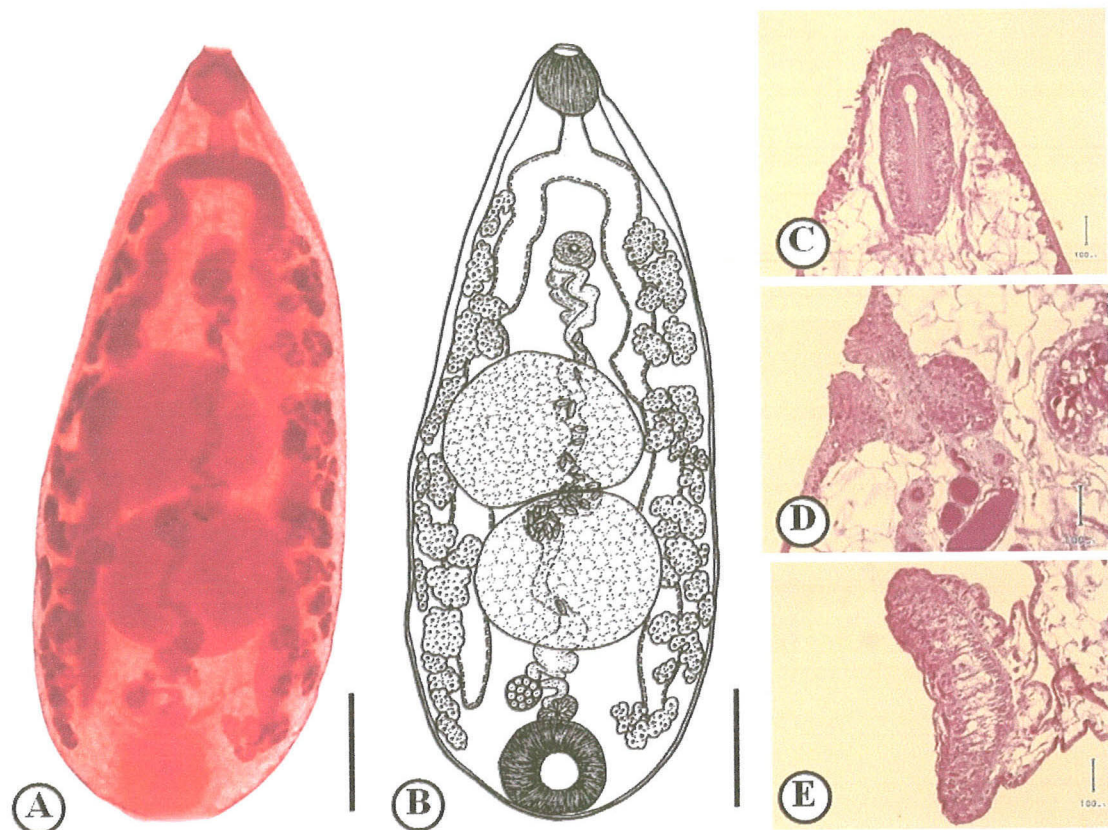
Genus *Orthocoelium*

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวเป็นทรงกรวย ยาว 5.00–8.00 (6.60) มิลลิเมตร กว้าง 2.00–3.00 (2.33) มิลลิเมตร acetabulum คู่ขนานข้างกลม อยู่ในตำแหน่ง subterminal ยาว 0.40–0.80 (0.56) มิลลิเมตร กว้าง 0.70–1.05 (0.83) มิลลิเมตร ลักษณะแบบ streptocoelium type ส่วน pharynx ยาว 0.48–0.65 (0.56) มิลลิเมตร กว้าง 0.35–0.50 (0.40) มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ dicranocoelium type บริเวณ esophagus ยาว 0.25–0.95 (0.55) มิลลิเมตร กว้าง 0.18–0.25 (0.21) มิลลิเมตร พบ muscular sphincter ส่วน testes มีขนาดใหญ่คู่ขนานข้างกลม ไม่เป็น lobe เรียงตัวแบบ tandem ซึ่ง anterior testis ยาว 0.85–1.40 (1.13) มิลลิเมตร กว้าง 0.78–1.40 (1.11) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 0.88–1.28 (1.09) มิลลิเมตร กว้าง 0.73–1.45 (1.09) มิลลิเมตร pars muscosa เจริญดี ovary คู่ขนานข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า testis มาก ยาว 0.25–0.38 (0.31) มิลลิเมตร กว้าง 0.25–0.40 (0.31) มิลลิเมตร vitellaria อยู่ทางด้านข้างของลำตัว genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่ง postbifurcal terminal genitalium แบบ gracile type eggs ยาว 0.10–0.15 (0.13) มิลลิเมตร กว้าง 0.08–0.10 (0.09) มิลลิเมตร

Host : วัว และควาย

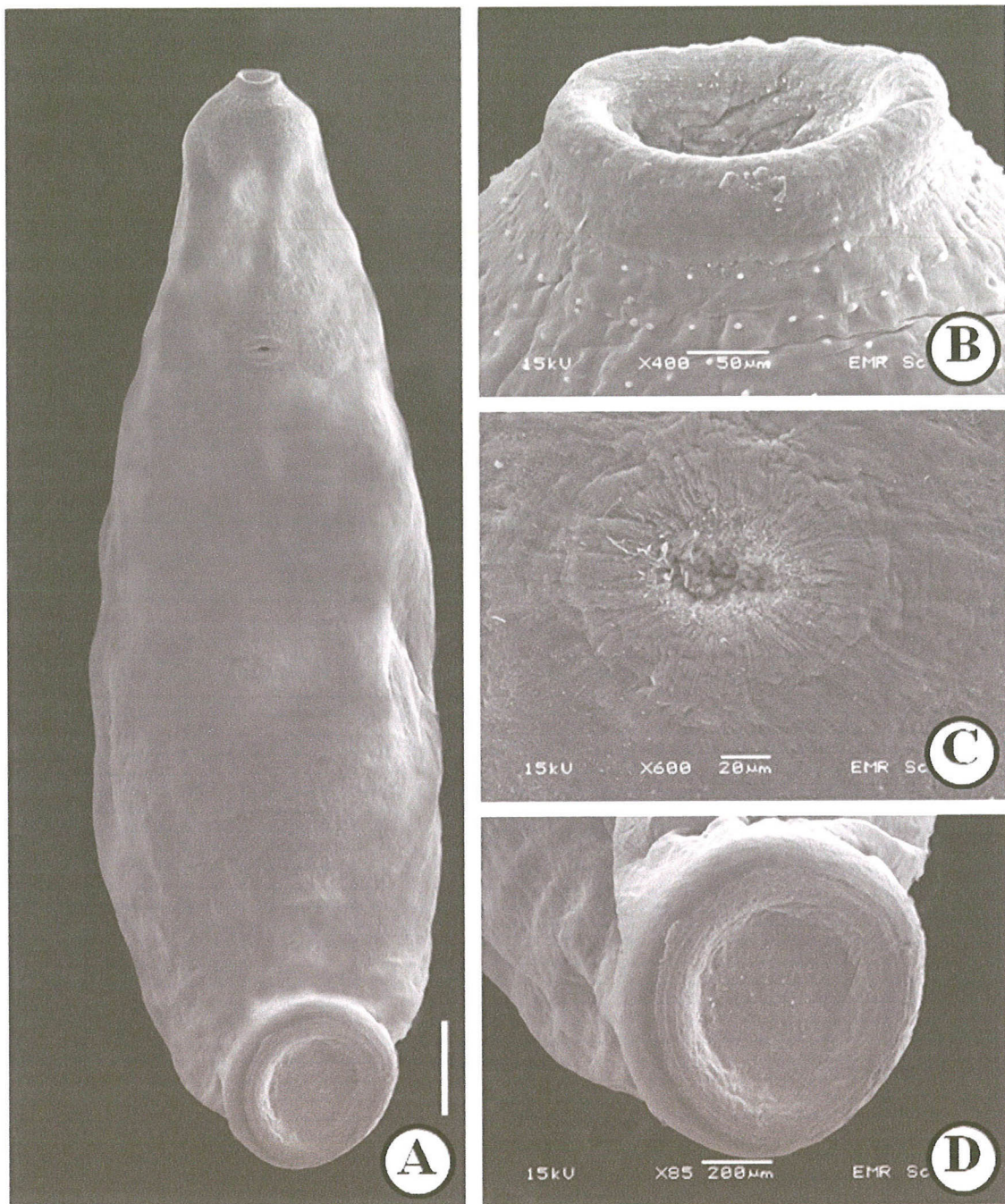
Habitat : กระเพาะ



ภาพ 11 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะปัสสาวะ *Orthocoelium dicranocoelium*

(Scale bar= 1 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagital section ของ pharynx แบบ dicranocoelium type (D) sagital section ของ terminal genitalium แบบ gracile type (E) sagital section ของ acetabulum แบบ streptocoelium type



ภาพ 12 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้ว *Orthocoelium dicranocoelium*

(A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) ลักษณะของ oral sucker (C) ลักษณะของ genital pore (D)

ลักษณะของ acetabulum (E) ลักษณะของ tegument ที่มีลักษณะเป็นรอยพับขดไปมา

Paramphistomum epiclitum Fischöder, 1904

(ภาพ 13–14)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Paramphistomidae

Subfamily Paramphistomidae

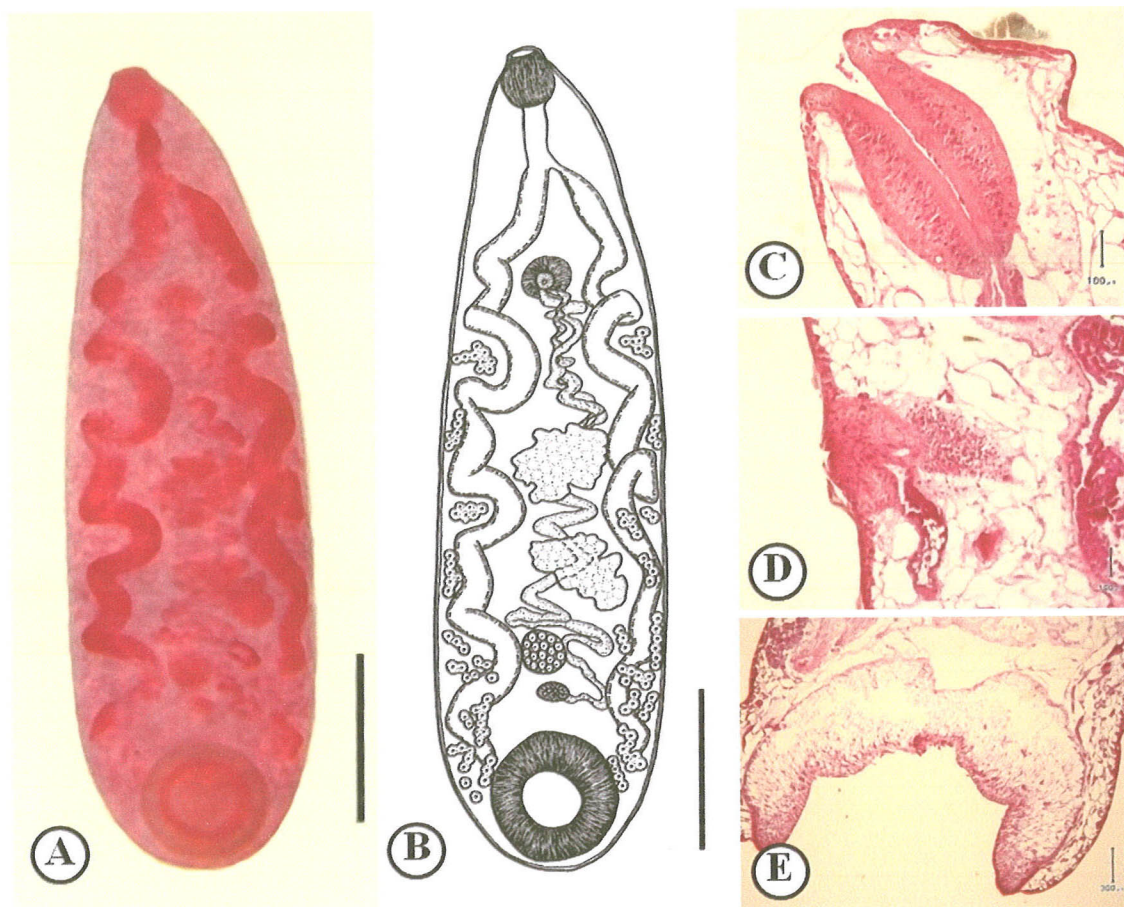
Genus *Paramphistomum*

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวรูปกรวย ยาว 9.50–14.00 (11.59) มิลลิเมตร กว้าง 2.00–5.00 (3.41) มิลลิเมตร acetabulum มีขนาดใหญ่ ค่อนข้างกลม กว้าง 1.20–2.38 (1.75) มิลลิเมตร ยาว 1.40–2.25 (1.82) มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ paramphistomum type บริเวณ pharynx ยาว 0.50–1.03 (0.74) มิลลิเมตร กว้าง 0.45–0.95 (0.66) มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ calicophoron type esophagus ยาว 0.40–1.18 (0.76) มิลลิเมตร กว้าง 0.20–0.35 (0.27) มิลลิเมตร พบ muscular sphincter ส่วน testes 2 อันมีขนาดปานกลาง เป็น lobe ลึก เรียงตัวแบบ tandem ซึ่ง anterior testis ยาว 0.75–2.68 (1.51) มิลลิเมตร กว้าง 0.70–2.78 (1.67) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 0.50–2.28 (1.39) มิลลิเมตร กว้าง 0.50–2.50 (1.65) มิลลิเมตร pars muscosa เจริญไม่ค่อยดี ovary ค่อนข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า testis มาก ยาว 0.25–0.80 (0.48) มิลลิเมตร กว้าง 0.30–1.00 (0.54) มิลลิเมตร vittellaria อยู่ทางด้านข้างของลำตัว genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่ง postbifurcal terminal genitalium มีลักษณะแบบ epiclitum type eggs ยาว 0.08–0.15 (0.12) มิลลิเมตร กว้าง 0.05–0.08 (0.06) มิลลิเมตร

Host : วัวและควาย

Habitat : กระเพาะผ้าม้าวัว



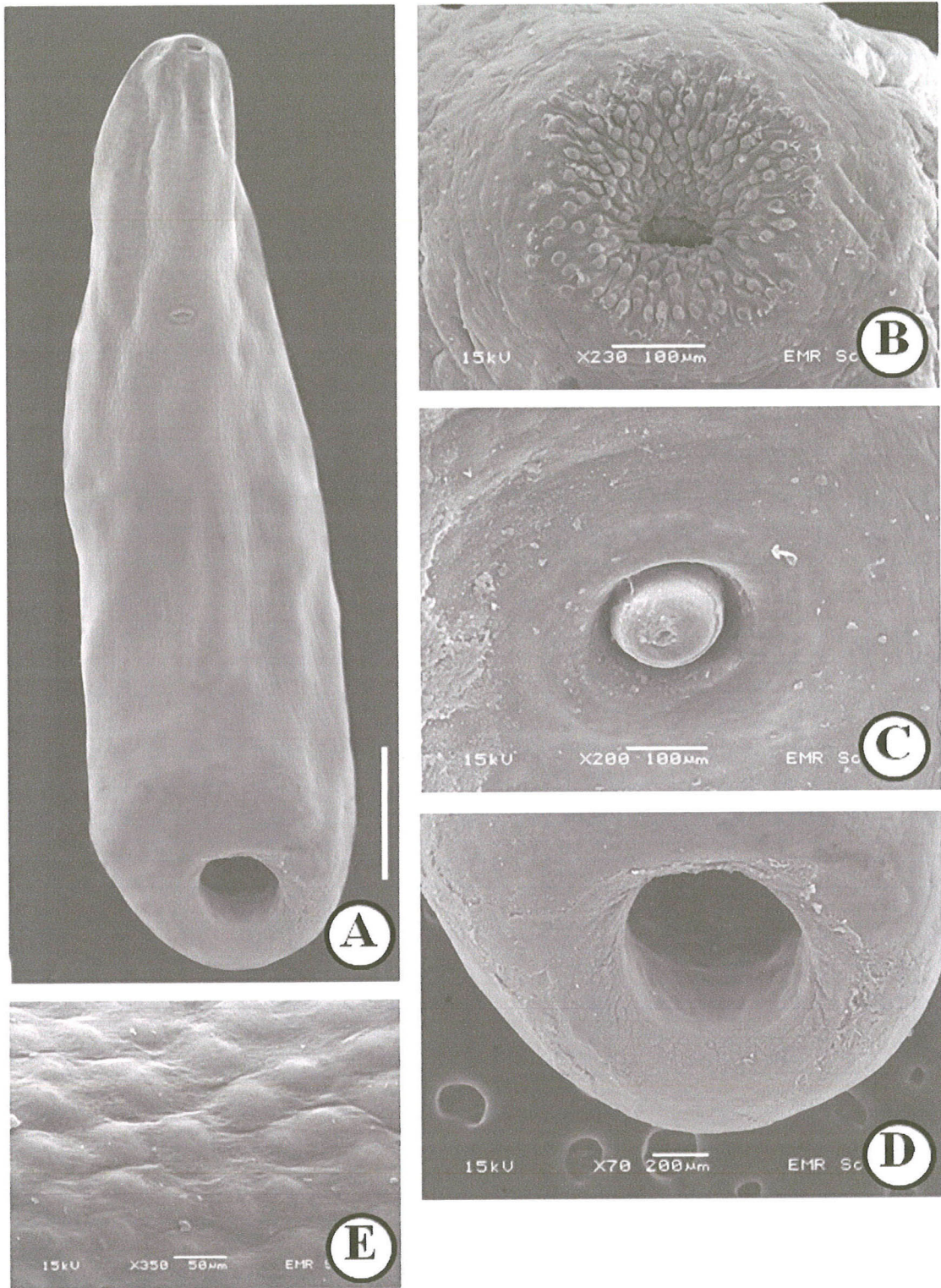
ภาพ 13 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะปัสสาวะวัว *Paramphistomum epiclitum*

(Scale bar = 2 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagittal section ของ pharynx แบบ calicophoron type

(D) sagittal section ของ terminal genitalium แบบ epiclitum type (E) sagittal section

ของ acetabulum แบบ paramphistomum type



ภาพ 14 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรี *Paramphistomum epiclitum*
 (A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) ลักษณะของ oral sucker (C) ลักษณะของ genital pore
 (D) ลักษณะของ acetabulum (E) ลักษณะของ tegument ที่มีลักษณะเป็นตุ่มนูน

Calicophoron calicophorum (Fischöder, 1901)

(ภาพ 15-16)

Phylum Platyhelminthes

Class Trematoda

Order Digenea

Family Paramphistomidae

Subfamily Paramphistominae

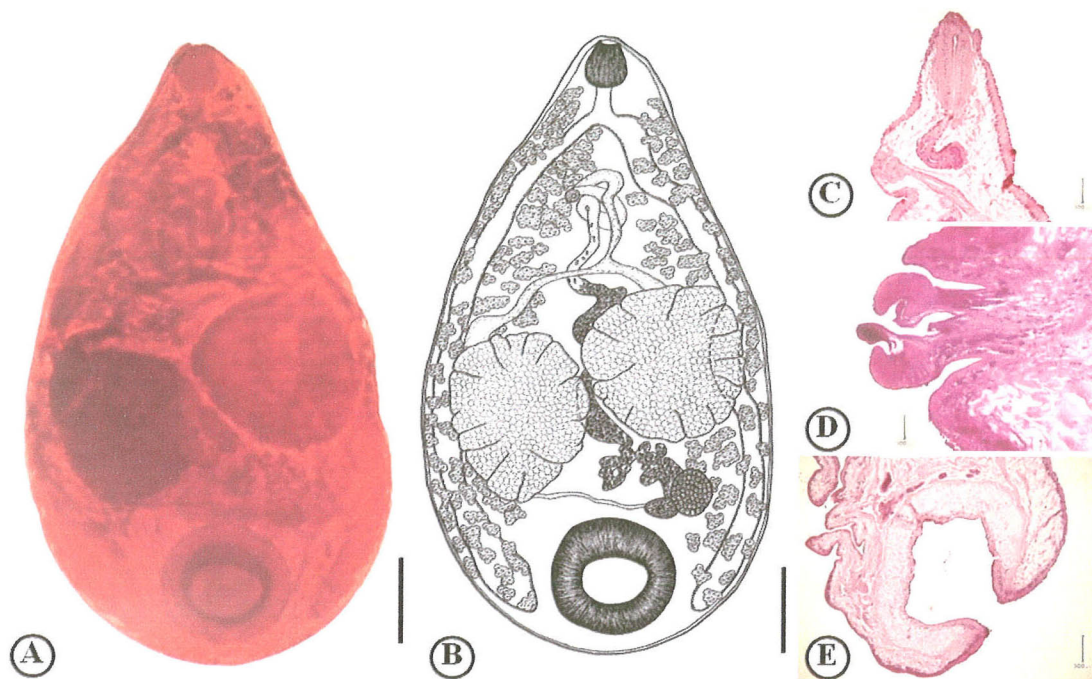
Genus *Calicophoron*

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวมีรูปร่าง pea shape ด้าน anterior เรียว และกว้างออกทางด้าน posterior มีขนาดยาว 16.00–20.00 (17.69) มิลลิเมตร กว้าง 7.00–10.00 (8.33) มิลลิเมตร acetabulum มีขนาดใหญ่ค่อนข้างกลม อยู่ในตำแหน่ง subterminal ยาว 2.98–3.45 (3.14) มิลลิเมตร กว้าง 3.00–3.80 (3.34) มิลลิเมตร ลักษณะแบบ calicophoron type บริเวณ pharynx ยาว 1.00–1.63 (1.31) มิลลิเมตร กว้าง 0.63–1.50 (1.05) มิลลิเมตร ลักษณะแบบ calicophoron type esophagus ยาว 0.50–1.50 (0.94) มิลลิเมตร กว้าง 0.33–1.13 (0.60) มิลลิเมตร genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่ง postbifurcal ซึ่งมี testes 2 อัน มีขนาดใหญ่ค่อนข้างกลม เป็น lobe ลึก เรียงตัวแบบ tandem เยื้องกันเล็กน้อย anterior testis ยาว 4.00–4.50 (4.21) มิลลิเมตร กว้าง 3.10–4.45 (3.75) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 3.60–4.30 (4.16) มิลลิเมตร กว้าง 3.08–4.88 (3.83) มิลลิเมตร pars muscosa สั้น เจริญไม่ค่อยดี ovary 1 อัน มีขนาดค่อนข้างกลมเล็กกว่า testes ยาว 0.75–1.55 (1.22) มิลลิเมตร กว้าง 0.63–1.10 (0.91) มิลลิเมตร vitellaria กระจายอยู่ทางด้านข้างลำตัว terminal genitalium มีลักษณะแบบ แบบ calicophoron type eggs ยาว 0.10–0.13 (0.12) มิลลิเมตร กว้าง 0.05–0.10 (0.08) มิลลิเมตร

Host : วัวและควาย

Habitat : กระเพาะผ้าม้าวัว



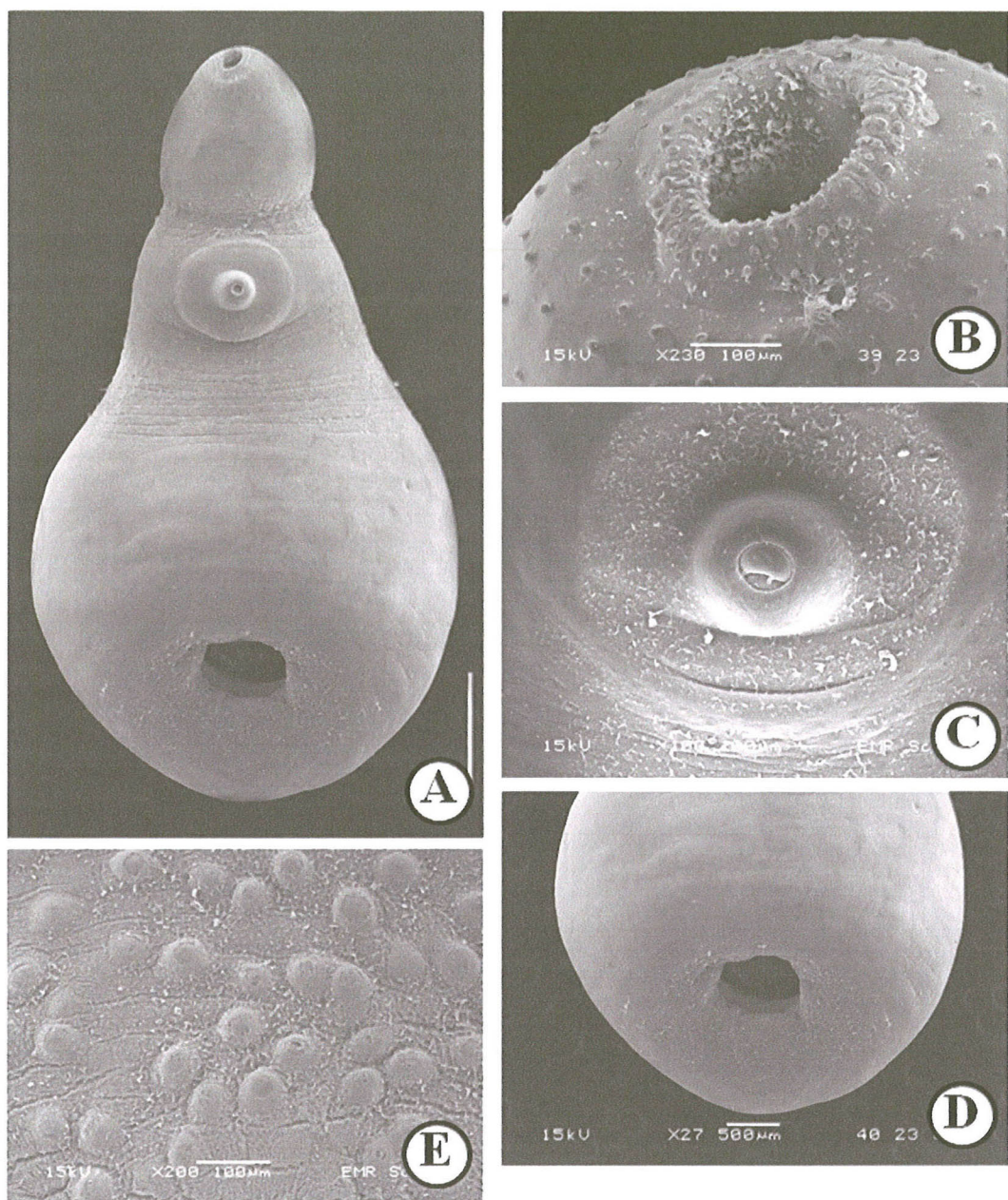
ภาพ 15 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรีว *Calicophoron calicophorum*

(Scale bar = 2 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagittal section ของ pharynx แบบ calicophoron type

(D) sagittal section ของ terminal genitalium แบบ calicophoron type (E) sagittal

section ของ acetabulum แบบ calicophoron type



ภาพ 16 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะปัสสาวะ *Paramphistomum epiclitum*
 (A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) ลักษณะของ oral sucker (C) ลักษณะของ genital pore
 (D) ลักษณะของ acetabulum (E) ลักษณะของ tegument ที่มีลักษณะเป็นตุ่มนูน

Unknown 1

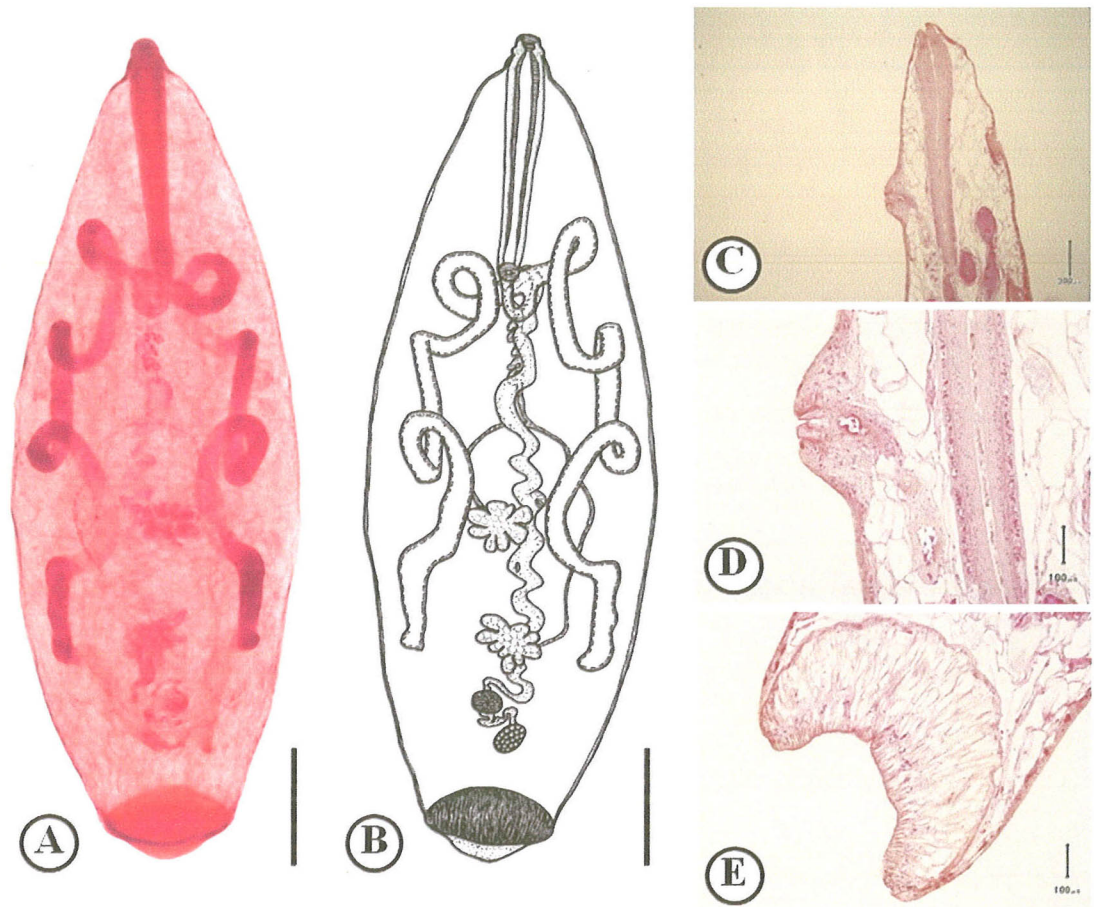
(ภาพ 17-18)

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวเป็นทรงกรวย มีขนาดยาว 6.00–8.00 (6.90) มิลลิเมตร กว้าง 2.00–3.00 (2.83) มิลลิเมตร acetabulum อยู่ในตำแหน่ง terminal ยาว 0.50–0.83 (0.66) มิลลิเมตร กว้าง 1.13–1.40 (1.23) มิลลิเมตร ลักษณะแบบ gastrothylax type ส่วนของ pharynx ยาวมาก มีความยาว 1.68–2.20 (1.99) มิลลิเมตร กว้าง 0.30–0.43 (0.36) มิลลิเมตร ไม่ทราบรูปแบบ มี testes 2 อัน ขนาดเล็ก เป็น lobe ลึก เรียงตัวแบบ tandem ซึ่ง anterior testis ยาว 0.30–0.93 (0.66) มิลลิเมตร 0.43–0.95 (0.62) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 0.45–0.90 (0.58) มิลลิเมตร กว้าง 0.33–1.03 (0.59) มิลลิเมตร pars muscosa เจริญดี ovary ค่อนข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า testis ยาว 0.15–0.53 (0.32) มิลลิเมตร กว้าง 0.13–0.40 (0.26) มิลลิเมตร ไม่พบ vittellalia ส่วน genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่งก่อนรอยแยกของลำไส้ terminal genitalium ลักษณะแบบ parvipapillatum type สำหรับ eggs ยาว 0.10–0.13 (0.12) มิลลิเมตร กว้าง 0.08 (0.08) มิลลิเมตร

Host : วัว และควาย

Habitat : กระเพาะอาหารวัว

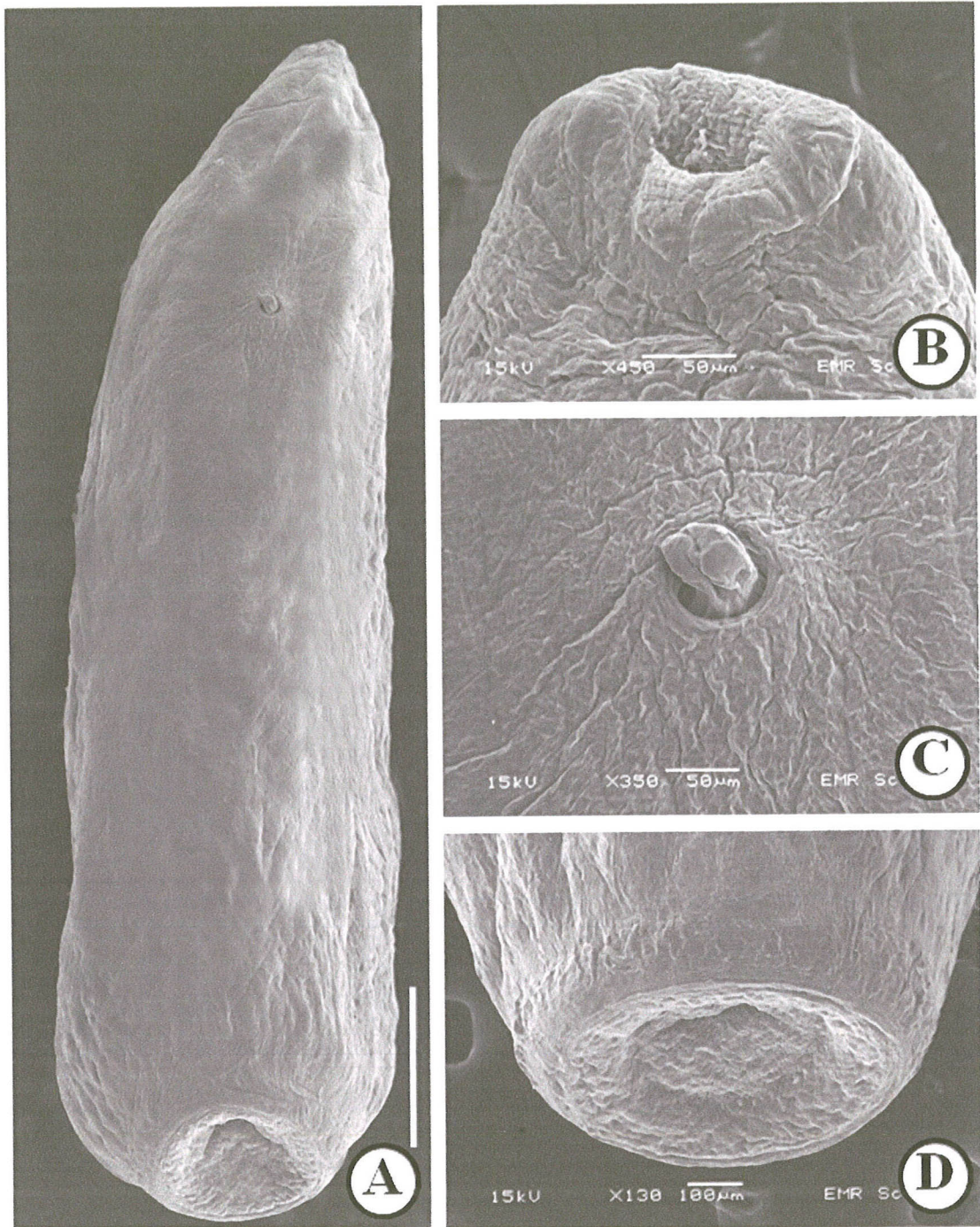


ภาพ 17 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรี unknown 1 (Scale bar = 1 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagital section ของ pharynx แบบ Unknown type

(D) sagital section ของ terminal genitalium แบบ parvipapillatum type (E) sagital

section ของ acetabulum แบบ gastrothylax type



ภาพ 18 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรี unknown 1

- (A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) ลักษณะของ oral sucker (C) ลักษณะของ genital pore
(D) ลักษณะของ acetabulum (E) ลักษณะของ tegument ที่มีลักษณะเป็นตุ่มมน

Unknown 2

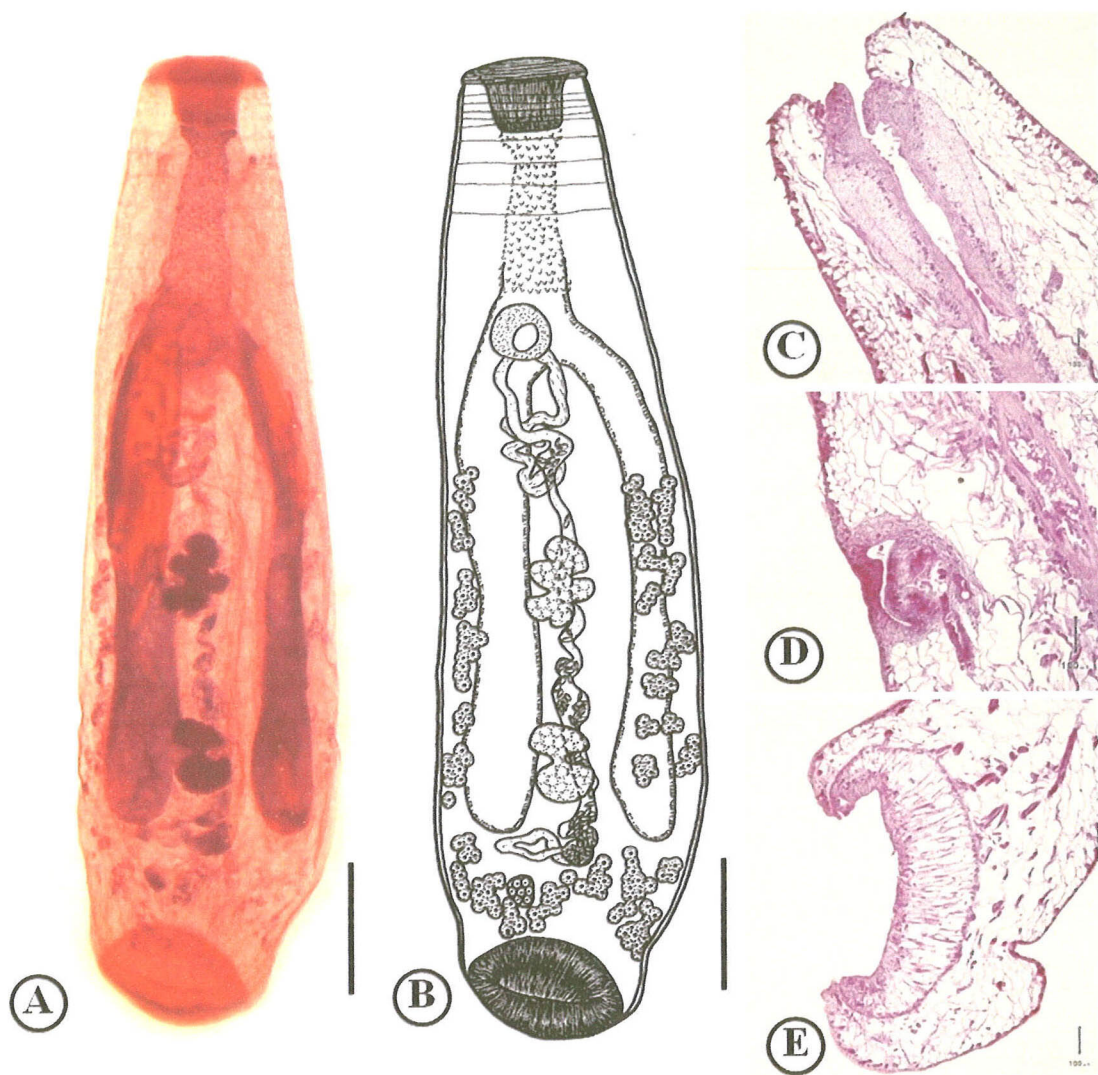
(ภาพ 19–20)

ลักษณะรูปร่าง

ลำตัวเรียวเกือบเป็นทรงกระบอก ยาว 10.50–18.00 (12.70) มิลลิเมตร กว้าง 2.00–4.00 (3.03) มิลลิเมตร acetabulum อยู่ในตำแหน่ง subterminal ยาว 0.80–1.18 (1.03) มิลลิเมตร กว้าง 1.48–2.00 (1.83) มิลลิเมตร ลักษณะแบบ paramphistomum type บริเวณของ pharynx ยาว 0.75–1.30 (0.98) มิลลิเมตร กว้าง 0.75–1.53 (1.17) มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ liochis type ส่วน esophagus ยาว 1.50–2.93 (2.13) มิลลิเมตร กว้าง 0.40–0.83 (0.64) มิลลิเมตร มี testes 2 อัน ขนาดเล็กเป็น lobe สีก เรียงตัวแบบ tandem ซึ่ง anterior testis ยาว 0.45–1.28 (0.81) มิลลิเมตร กว้าง 0.45–0.73 (0.59) มิลลิเมตร ส่วน posterior testis ยาว 0.55–1.05 (0.81) มิลลิเมตร กว้าง 0.40–0.75 (0.59) มิลลิเมตร ovary คู่ขนานข้างกลม มีขนาดเล็กกว่า testis ยาว 0.23–0.48 (0.32) มิลลิเมตร กว้าง 0.25–0.50 (0.31) มิลลิเมตร vittellalia อยู่ทางด้านข้างของลำตัว genital pore เปิดออกทางด้าน ventral อยู่ในตำแหน่งรอยแยกของลำไส้ terminal genitalium มีลักษณะแบบ clavula type eggs ยาว 0.08–0.13 (0.11) มิลลิเมตร กว้าง 0.05–0.08 (0.06) มิลลิเมตร

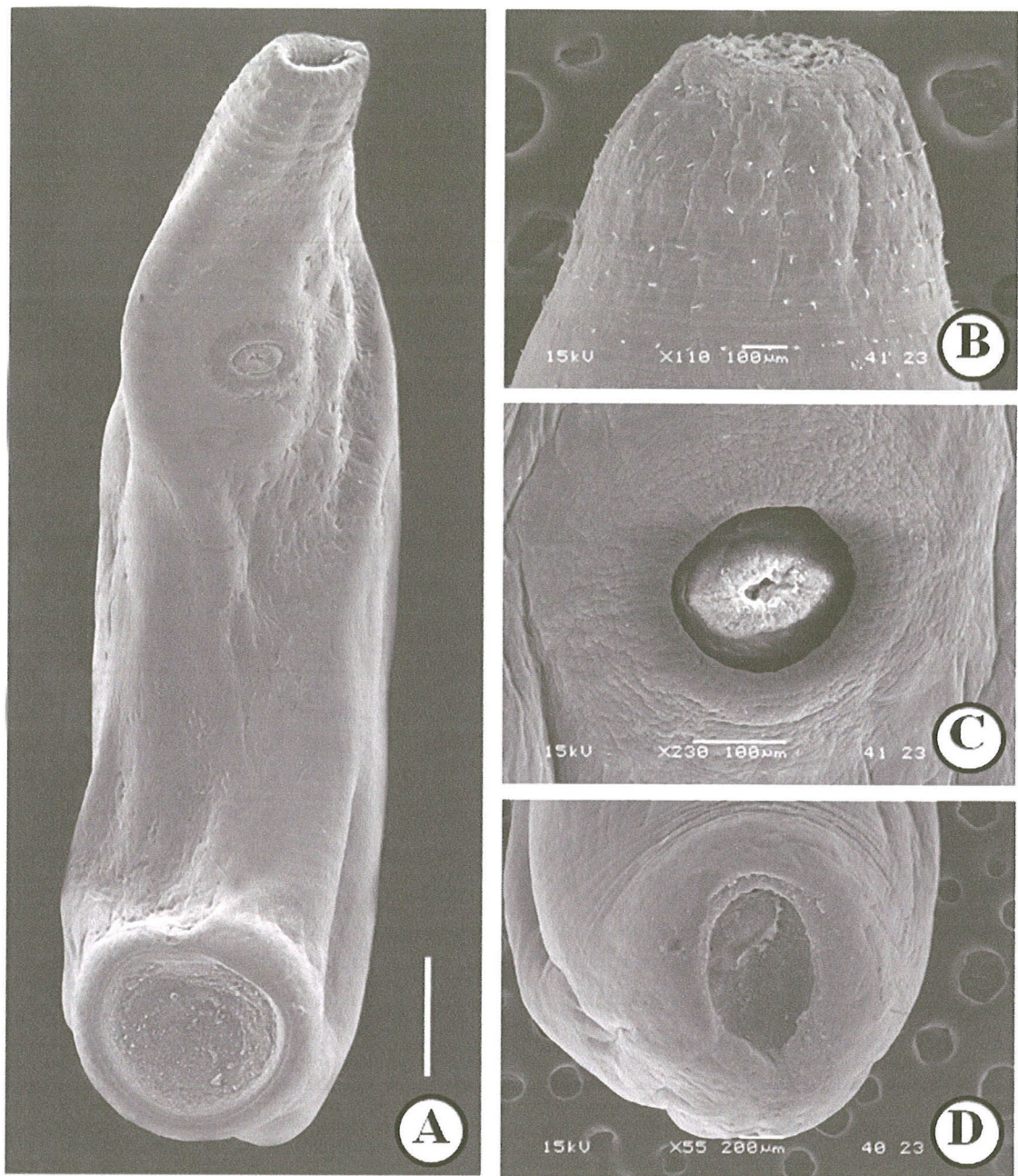
Host : วัว และควาย

Habitat : กระเพาะผ้าม้าวัว



ภาพ 19 ลักษณะทั่วไปของพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีรีว unknown 2 (Scale bar = 1 mm)

(A) ภาพถ่าย (B) ภาพวาด (C) sagital section ของ pharynx แบบ liochis type (D) sagital section ของ terminal genitalium แบบ clavula type (E) sagital section ของ acetabulum แบบ paramphistomum type

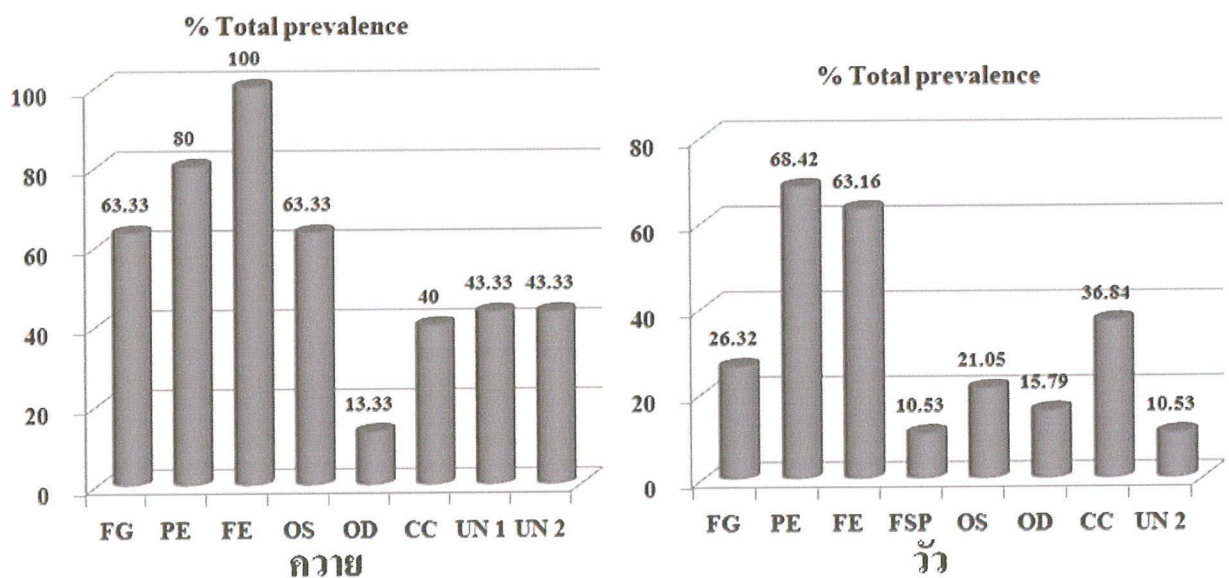


ภาพ 20 ภาพ SEM ของพยาธิใบไม้กระเพาะปัสสาวะ unknown 2

(A) ภาพถ่ายทั้งตัว (B) ลักษณะและตำแหน่งของ oral sucker (C) ลักษณะของ genital pore (D) ลักษณะของ acetabulum

4.3 การศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิระยะตัวเต็มวัยในวัว และควาย

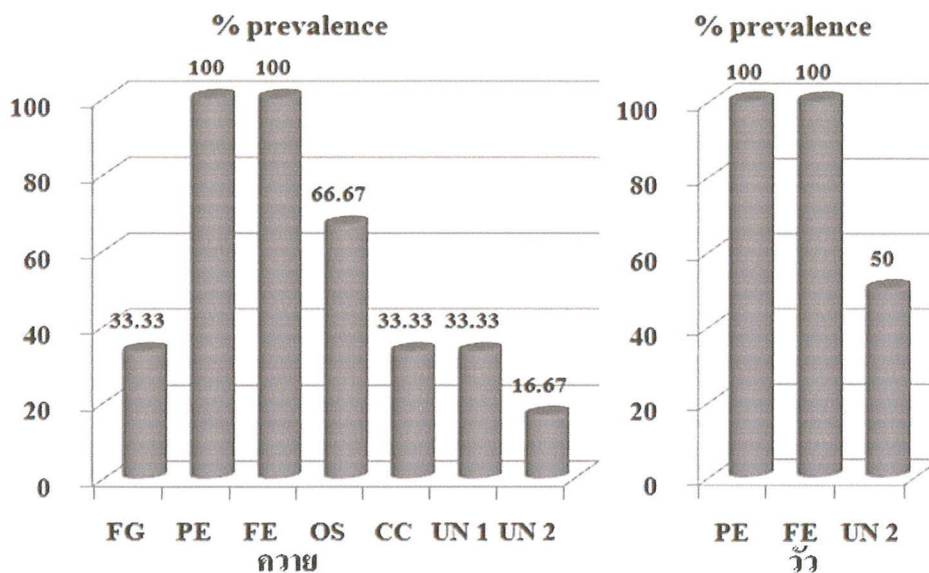
จากการเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ และพยาธิกระเพาะผ้าชีรีวในวัวและควาย จำนวน 49 ตัวอย่าง แบ่งเป็นควาย 30 ตัวอย่าง และวัว 19 ตัวอย่าง พบพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ 1 ชนิด คือ *Fasciola gigantica* พยาธิกระเพาะผ้าชีรีว 8 ชนิด ได้แก่ *Paramphistomum epicillium*, *Fischoederius elongatus*, *Fischoederius* sp., *Orthocoelium streptocoelium*, *Orthocoelium dicranocoelium*, *Calicophoron calicophorum* และพยาธิที่ยังไม่ทราบชนิดอีก 2 ชนิด ได้แก่ Unknown 1 และ Unknown 2 (ภาพ 2-16) ซึ่งในควายพบพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *Fasciola gigantica* มากกว่าในวัว โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 63.33% ขณะที่วัวพบเพียง 26.32% สำหรับพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีรีว พบว่าควายพบพยาธิ *Fischoederius elongatus* มีค่าความชุกรวมสูงที่สุดเท่ากับ 100% ขณะที่วัวกลับพบพยาธิ *P. epicillium* มีค่าความชุกรวมเท่ากับ 68.42% (ภาพ 21)



ภาพ 21 ค่าความชุกรวมของพยาธิแต่ละชนิดที่พบในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

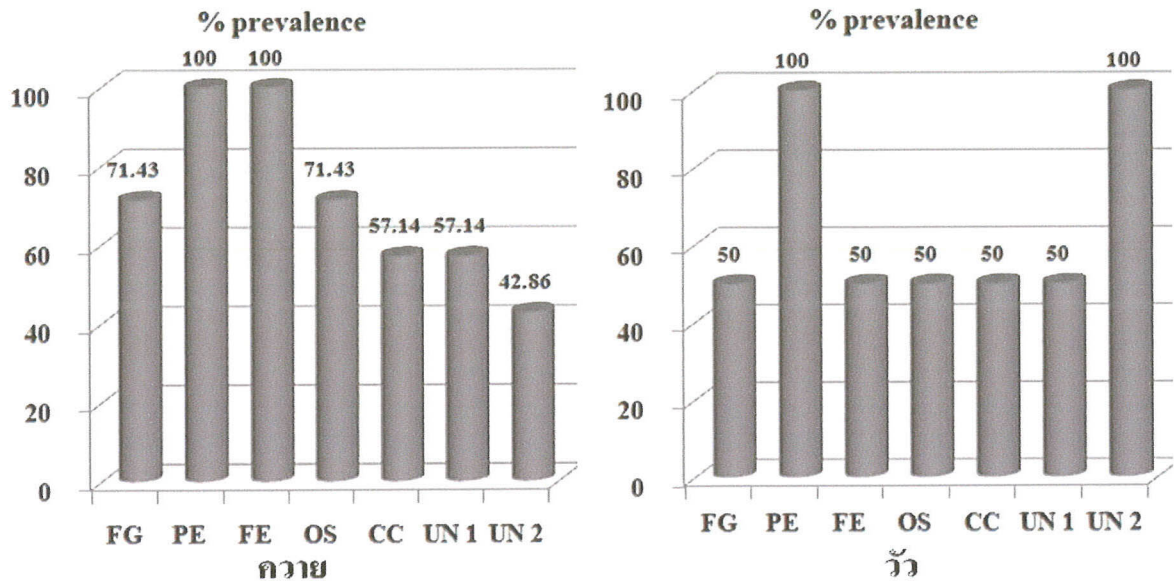
จังหวัดลำพูนมีจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอเมืองลำพูน และอำเภอป่าซาง ในอำเภอเมืองลำพูน เก็บตัวอย่างพยาธิจากควายทั้งหมด 6 ตัว และวัว 2 ตัว พบพยาธิทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ *F. gigantica*, *P. epicillium*, *O. streptocoelium*, *Fischoederius elongatus*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 ซึ่งพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantica* พบเฉพาะในควาย มีค่าความชุกเท่ากับ 33.33% ขณะที่พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีรีว

วัว *P. epiclitum* และ *Fischoederius elongatus* มีค่าความชุกสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 100% ทั้งในควาย และวัว (ภาพ 22)



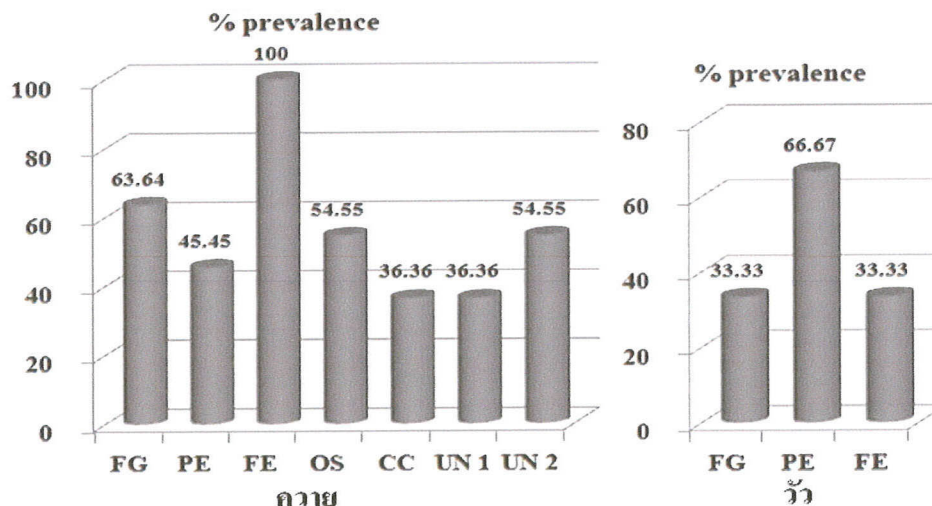
ภาพ 22 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

อำเภอป่าซาง เก็บตัวอย่างพยาธิจากควายทั้งหมด 7 ตัว และวัว 2 ตัว ในควายพบพยาธิทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ *F. gigantea*, *P. epiclitum*, *O. streptocoelium*, *Fischoederius elongatus*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 ซึ่งพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantea* ในควายมีค่าสูงกว่าวัว โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 71.43% และ 50% ตามลำดับ ขณะที่พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรีในควายพบพยาธิ *P. epiclitum* และ *Fischoederius elongatus* มีค่าความชุกสูงที่สุด 100% และวัวกลับพบพยาธิ *P. epiclitum* และ unknown 2 ที่มีค่าความชุกสูงที่สุด เท่ากับ 100% (ภาพ 23)



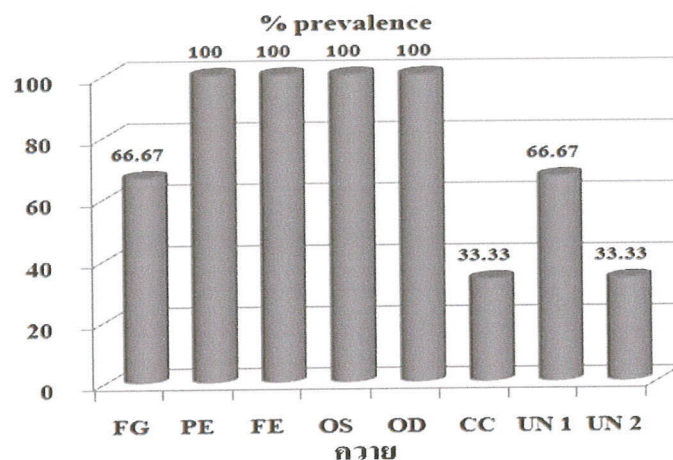
ภาพ 23 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอลำพูน จังหวัดลำพูน

จังหวัดเชียงใหม่ มีจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอเมืองเชียงใหม่ อำเภอดอยสะเก็ด และอำเภอสันกำแพง ในอำเภอเมืองเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างพยาธิจากควายทั้งหมด 11 ตัว และวัว 3 ตัว พบพยาธิทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ *F. gigantica*, *P. epiclitum*, *Fischoederius elongatus*, *O. streptocoelium*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 ซึ่งพบพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantica* ในควายมีค่าความชุกเท่ากับ 63.64% ขณะที่ในวัวมีค่าความชุกเท่ากับ 33.33% สำหรับพยาธิใบไม้กระเพาะปัสสาวะ พบว่าในควายพบพยาธิ *Fischoederius elongatus* มีค่าความชุกสูงที่สุด เท่ากับ 100% และในวัวพบพยาธิ *P. epiclitum* มีค่าความชุกสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 66.67% (ภาพ 24)



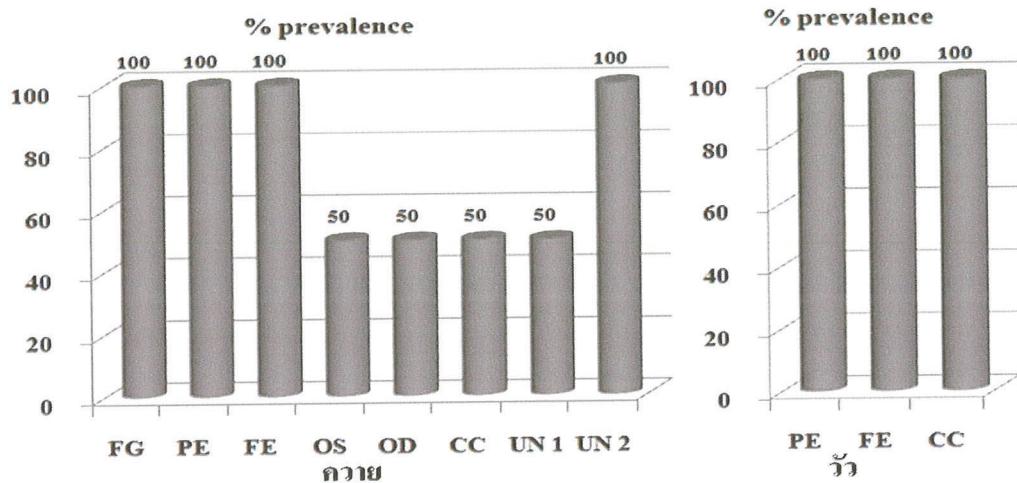
ภาพ 24 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

อำเภอคอยสะเกต เก็บตัวอย่างพยาธิจากควายทั้งหมด 3 ตัว พบพยาธิทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *F. gigantica*, *P. epiclitum*, *O. streptocoelium*, *O. dicranocoelium*, *Fischoederius elongatus*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 ซึ่งพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *Fasciola gigantica* มีค่าความชุกเท่ากับ 66.67% ขณะที่พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรีมีค่าความชุกสูงที่สุด 100% จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *P. epiclitum*, *O. streptocoelium*, *O. dicranocoelium* และ *Fischoederius elongatus* (ภาพ 25)



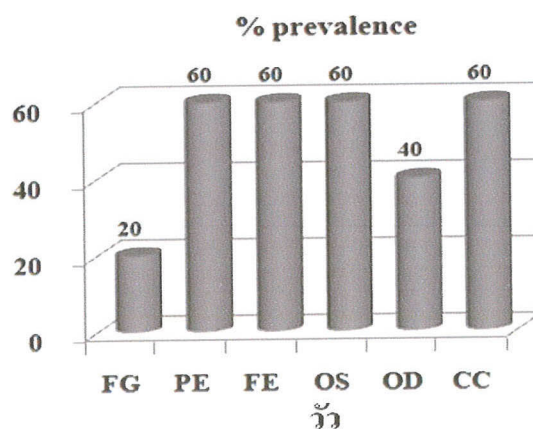
ภาพ 25 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอคอยสะเกต จังหวัดเชียงใหม่

อำเภอสันกำแพง เก็บตัวอย่างพยาธิในควายทั้งหมด 2 ตัว และวัว 1 ตัว พบพยาธิทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *F. gigantica*, *P. epiclitum*, *O. streptocoelium*, *O. dicranocoelium*, *Fischoederius elongatus*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 ซึ่งในควายพบพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *Fasciola gigantica* มีค่าความชุกเท่ากับ 100% ขณะที่พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรีมีค่าความชุกสูงที่สุด เท่ากับ 100% จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *P. epiclitum*, *Fischoederius elongatus* และ unknown 2 สำหรับในวัวพบพยาธิกระเพาะผ้าชีวรี จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *P. epiclitum*, *Fischoederius elongatus* และ *C. calicophorum* โดยทั้ง 3 ชนิดมีความชุกเท่า 100% (ภาพ 26)



ภาพ 26 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่

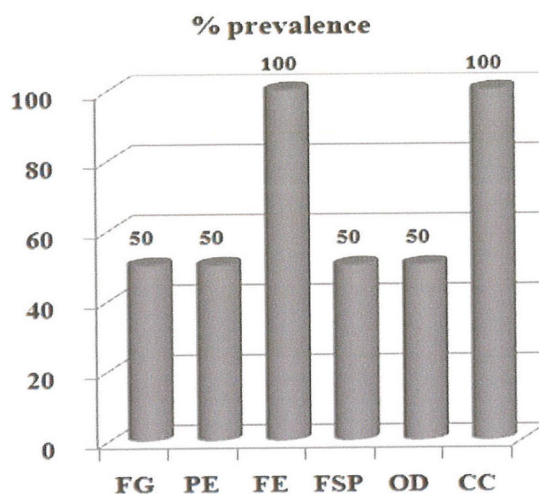
จังหวัดตาก มีจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 1 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอเมืองตาก ทำการเก็บตัวอย่างวักทั้งหมด 5 ตัว พบพยาธิทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *F. gigantea*, *P. epiclitum*, *Fischoederius elongatus*, *O. streptocoelium*, *O. dicranocoelium* และ *C. calicophorum* พบพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantea* มีค่าความชุกเท่ากับ 20% ขณะที่พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้ว พบว่ามีค่าความชุกสูงที่สุด เท่ากับ 60% จำนวน 4 ชนิด คือ *P. epiclitum*, *Fischoederius elongatus*, *O. streptocoelium* และ *C. calicophorum* (ภาพ 27)



ภาพ 27 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอเมืองตาก จังหวัดตาก

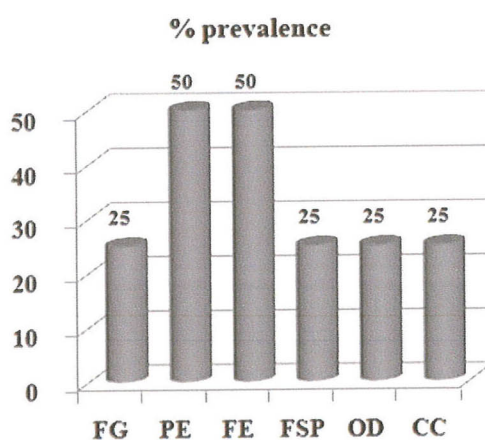
จังหวัดนครพนม มีจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 1 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอนาแก โดยเก็บตัวอย่างพยาธิจากวักทั้งหมด 2 ตัว พบพยาธิทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *F. gigantea*, *P. epiclitum*, *Fischoederius elongatus*, *Fischoederius sp.*, *O. dicranocoelium* และ *C. calicophorum* พยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantea* มีค่าความชุกเท่ากับ 50% ขณะที่พยาธิ

ใบไม้กระเพาะผ้าชีร์มีค่าความชุกสูงสุด เท่ากับ 100% จำนวน 2 ชนิด คือ *Fischoederius elongatus* และ *C. calicophorum* (ภาพ 28)



ภาพ 28 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอนาแก จังหวัดนครพนม

จังหวัดสกลนคร มีจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 1 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอดำตาล้า โดยเก็บตัวอย่างพยาธิจากวัวทั้งหมด 4 ตัว พบพยาธิทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *F. gigantica*, *P. epiclitum*, *Fischoederius elongatus*, *Fischoederius* sp., *O. dicranocoelium* และ *C. calicophorum* โดยพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantica* มีค่าความชุกเท่ากับ 25% ขณะที่พยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีร์มีค่าความชุกสูงสุด เท่ากับ 50% จำนวน 2 ชนิด คือ *P. epiclitum* และ *Fischoederius elongatus* (ภาพ 29)



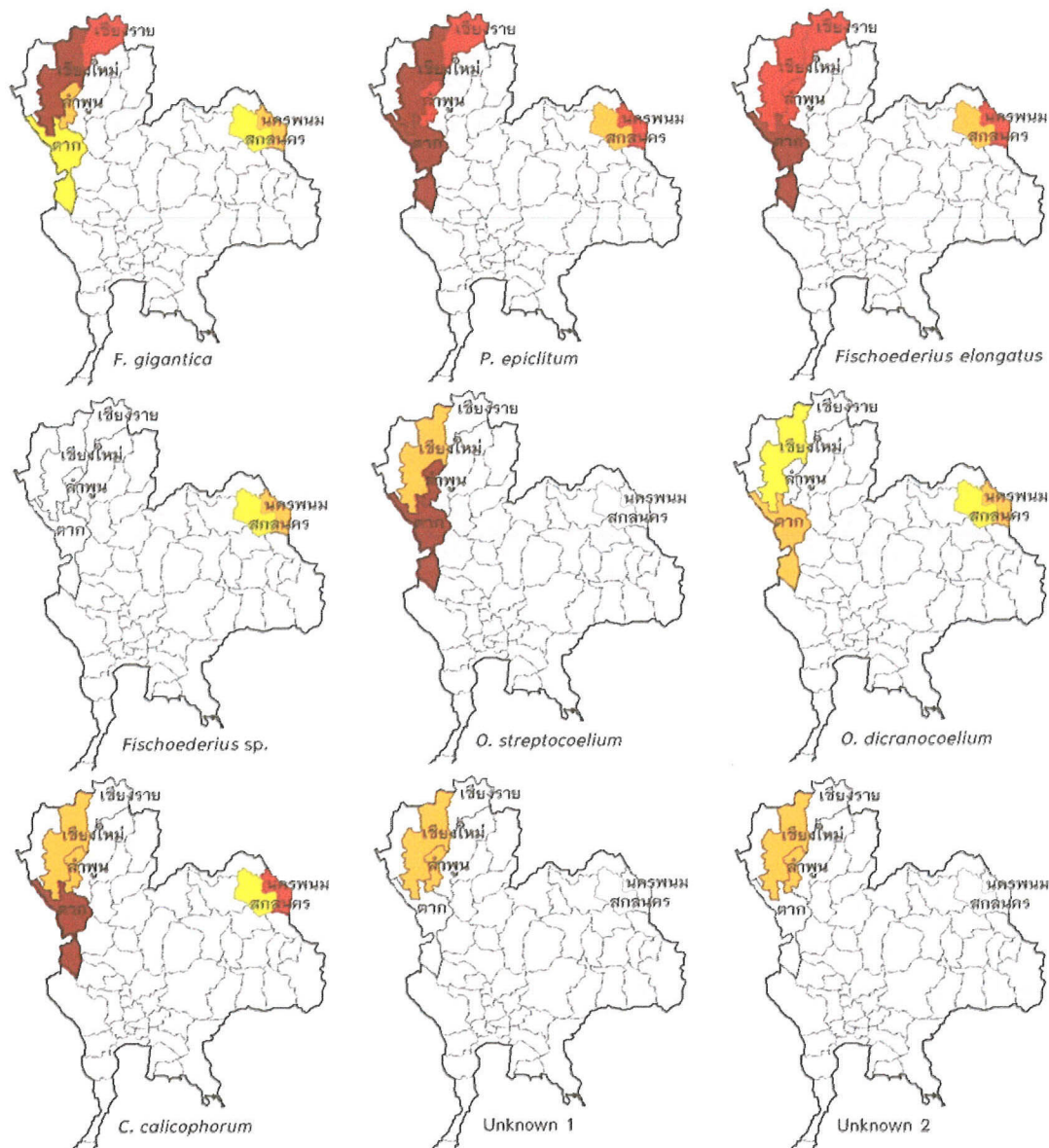
ภาพ 29 ค่าความชุกของพยาธิแต่ละชนิดในจุดเก็บตัวอย่างอำเภอดำตาล้า จังหวัดสกลนคร

สำหรับจังหวัดเชียงราย สามารถเก็บตัวอย่างพยาธิจากควายจำนวน 1 ตัว ในอำเภอแม่สาย โดยพบพยาธิจำนวนน้อย และพบเพียง 3 ชนิดเท่านั้น แบ่งเป็นพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantica* จำนวน 9 ตัว และพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าชีวรี จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *P. epiclitum* และ *Fischoederius elongatus* มีจำนวน 12 ตัว และ 8 ตัว ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลการระบาดของพยาธิระยะตัวเต็มวัยในแต่ละจังหวัดมาสร้างเป็นแผนที่การระบาด โดยใช้โปรแกรม ArcGIS Desktop version 9.3 ของบริษัท ESRI, CO, Ltd โดยกำหนดระดับการระบาดในแผนที่ จำนวน 5 ระดับ คือ

- ระดับสูงมาก (76–100%)
- ระดับสูง (51–75%)
- ระดับปานกลาง (26–50%)
- ระดับต่ำ (1–25%)
- ไม่พบ (0%)

จากการสร้างแผนที่การระบาดของพยาธิ พบว่าพยาธิ *F. gigantica* ในจังหวัดเชียงราย อยู่ในระดับที่สูงมาก รองลงมาคือจังหวัดเชียงใหม่ จัดอยู่ในระดับสูง จังหวัดลำพูนและนครพนม จัดอยู่ในระดับปานกลาง สำหรับจังหวัดตาก และสกลนคร จัดอยู่ในระดับต่ำ พยาธิ *P. epiclitum* พบการระบาดระดับที่สูงมาก จำนวน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย ลำพูน และนครพนม ระดับสูงจำนวน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดตาก และระดับปานกลางพบการระบาดในจังหวัดสกลนคร พยาธิ *Fischoederius elongatus* พบการระบาดในระดับที่สูงมาก จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน และนครพนม ระดับสูง และระดับปานกลางพบในจังหวัดตาก และสกลนคร ตามลำดับ พยาธิ *Fischoederius* sp. พบการระบาดใน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสกลนคร และนครพนม โดยพบการระบาดระดับปานกลางอยู่ในจังหวัดนครพนม และระดับต่ำอยู่ในจังหวัดสกลนคร พยาธิ *O. streptocoelium* พบการระบาดระดับสูงในจังหวัดลำพูน และตาก และระดับปานกลางพบในจังหวัดเชียงใหม่ พยาธิ *O. dicranocoelium* พบการระบาดระดับปานกลางจำนวน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดตาก และนครพนม การระบาดระดับต่ำพบในจังหวัดเชียงใหม่ และสกลนคร พยาธิ *C. calicophorum* พบการระบาดระดับสูงมากในจังหวัดนครพนม ระดับสูงพบในจังหวัดตาก ระดับปานกลางพบในจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน และระดับต่ำพบในจังหวัดสกลนคร สำหรับพยาธิ unknown 1 และ unknown 2 พบการระบาดใน 2 จังหวัด ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน พยาธิทั้ง 2 ชนิด พบการระบาดอยู่ในระดับปานกลาง (ภาพ 30)



ภาพ 30 แผนที่การระบาดของพยาธิแต่ละชนิดที่พบในแต่ละจังหวัด

4.3 การศึกษาการระบาดของตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอย

จากการสำรวจตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอยจาก 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ตาก และพะเยา โดยพบหอยทั้งหมด 7 ชนิด คือ *Adamietta housei*, *Filopaludina matensi matensi*, *Filopaludina doliaris*, *Indoplanorbis exustus*, *Lymnaea auricularia rubiginosa*, *Melanooides tuberculata* และ *Tarebia granifera* นั้นพบตัวอ่อนระยะ เซอร์คาเรียทั้งหมด 4 แบบ ดังนี้ amphistome cercaria, furcocercous cecaria, gymnocephalous cercaria และ parapleurolophocercous cercaria (ภาพ 31) ซึ่งในจังหวัด



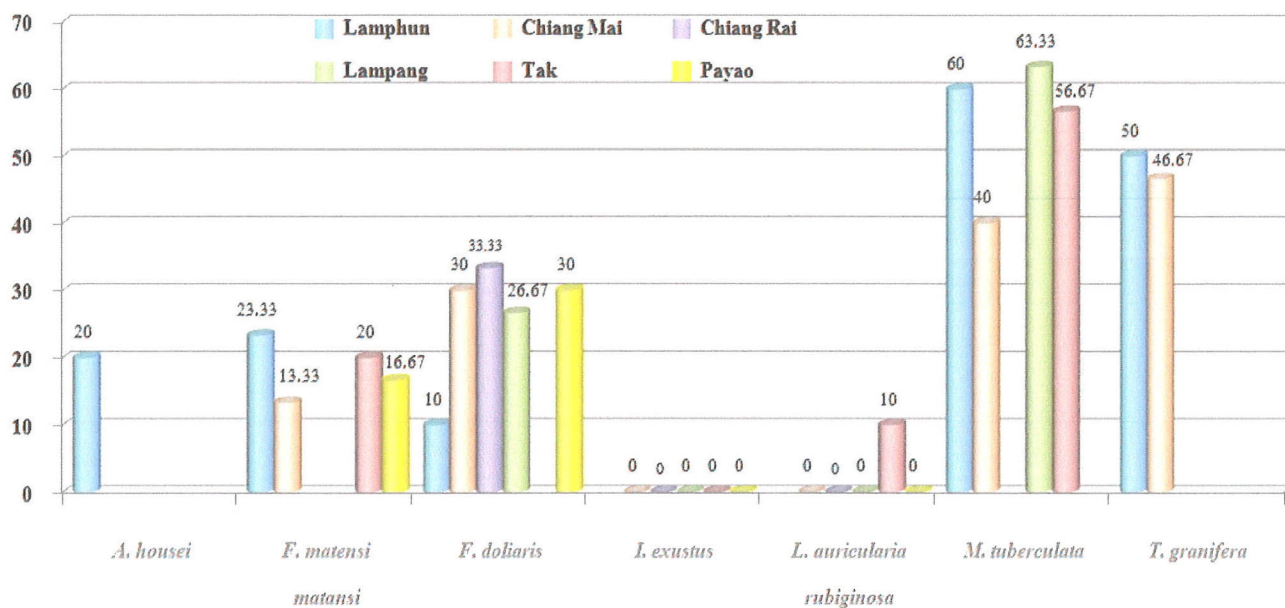
ลำปางพบค่าความชุกของเชอร์คาเรียมากที่สุดคือใน *M. tuberculata* เท่ากับ 63.33% รองลงมาพบในจังหวัดลำพูนใน *M. tuberculata* เท่ากับ 60% และน้อยที่สุดของการติดเชื้อมีตัวอ่อนระยะเชอร์คาเรียพบในจังหวัดลำพูนใน *F. doliaris* และจังหวัดตากใน *L. auricularia rubiginosa* เท่ากับ 10% นอกจากนี้จากการตรวจสอบในหอยทั้งหมดยังพบว่า *I. exustus* ไม่พบว่ามีการติดเชื้อของตัวอ่อนพยาธิจากทั้ง 6 จังหวัด ซึ่งจากการตรวจสอบ *L. auricularia rubiginosa* พบ gymnocephalous cercaria จากจังหวัดตากมีค่าความชุก 10% และไม่พบในจังหวัดอื่นในหอยชนิดเดียวกัน (ภาพ 32)



ภาพ 31 ภาพถ่ายของตัวอ่อนพยาธิใบไม้ ระยะเชอร์คาเรียที่พบในหอยชนิดต่างๆ

(Scale bar= 100 μ m)

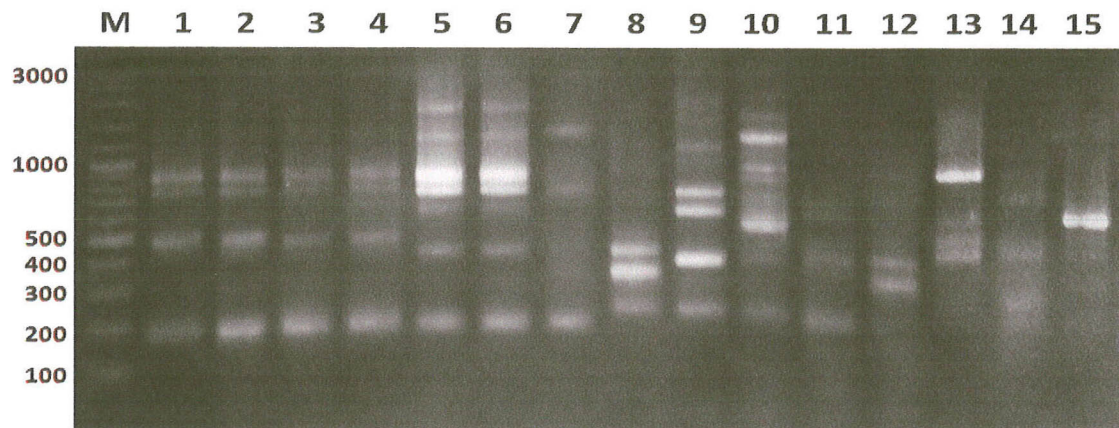
(A) gymnophallus cercaria (B) amphistome cercaria (C) parapleurolophocercous cercaria (D) furcocercous cercaria



ภาพ 32 ค่าความชุกของตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียจากตัวอย่างหอย

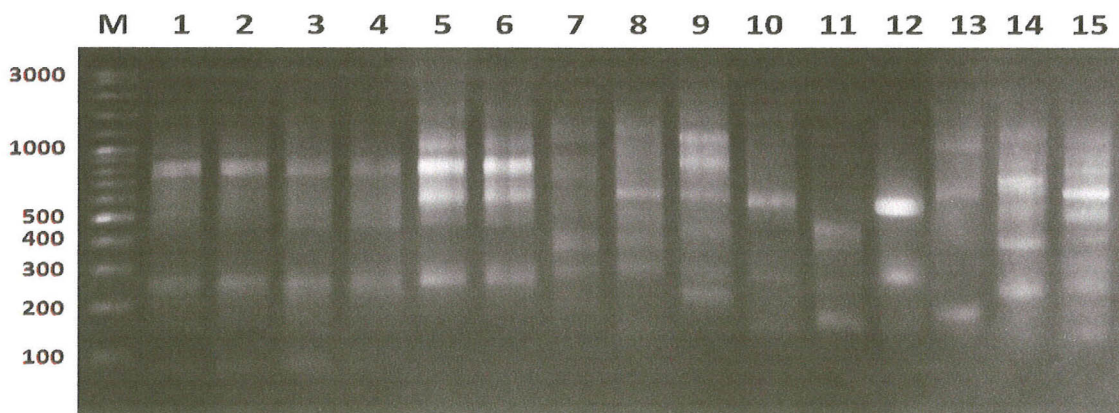
4.4 การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา

หลังจากที่สกัด DNA ของพยาธิที่สำรวจพบทั้งหมด และพยาธิที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ได้แก่ พยาธิ *Fasciola* sp.1 และ *Fasciola* sp.2 ที่พบในตับแกะจากประเทศเวียดนาม และพยาธิ *F. hepatica* จาก permanent slide หลังจากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic DNA) เป็นประโยชน์ในการแยกชนิดของพยาธิที่มีเหมือนหรือแตกต่างชนิดกันของพยาธิได้ นอกจากนี้แถบ DNA ที่แตกต่างกันของพยาธิ หรือมีความเฉพาะเจาะจงกับพยาธิชนิดนั้นๆ สามารถนำไปออกแบบและสร้างเป็นตัวติดตามสำหรับนำมาใช้ตรวจสอบพยาธิชนิดนั้นๆ ต่อไปได้ โดยใช้ arbitrary primer (Operon Technology, USA) ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 19 primers คือ OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPN-02, OPN-03, OPN-04, OPN-05, OPN-06, OPN-07, OPN-08, OPN-09, OPN-10 และ OPP-11 ผลการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD PCR โดยใช้ arbitrary primer ทั้ง 19 primers โดยแสดงผลในแต่ละ primer ดังต่อไปนี้ (ภาพ 33-51)



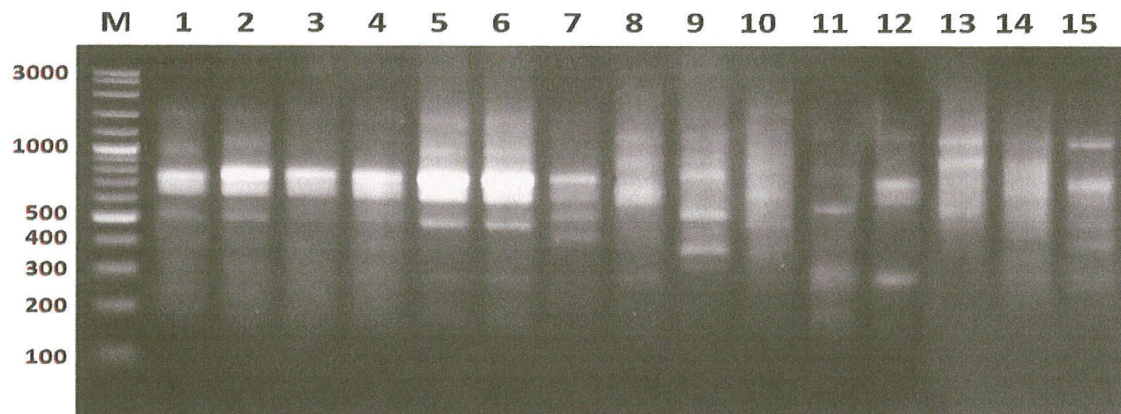
ภาพ 33 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-01

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



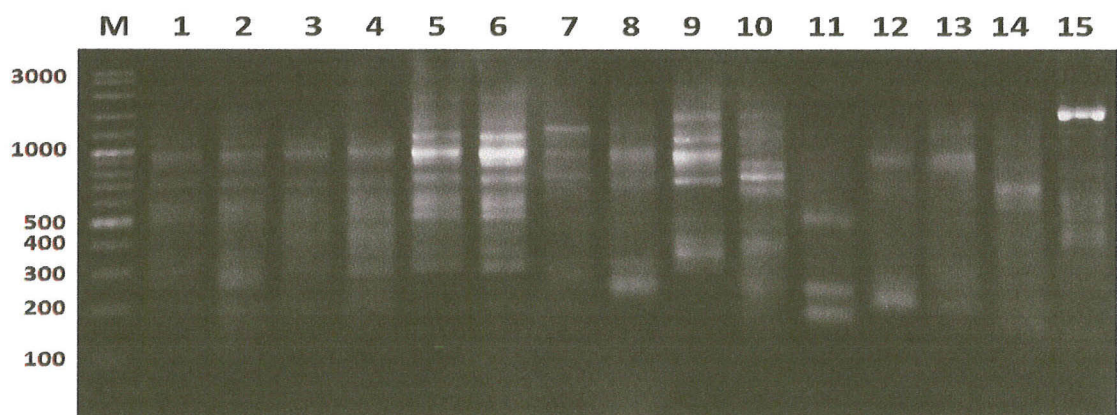
ภาพ 34 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-02

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



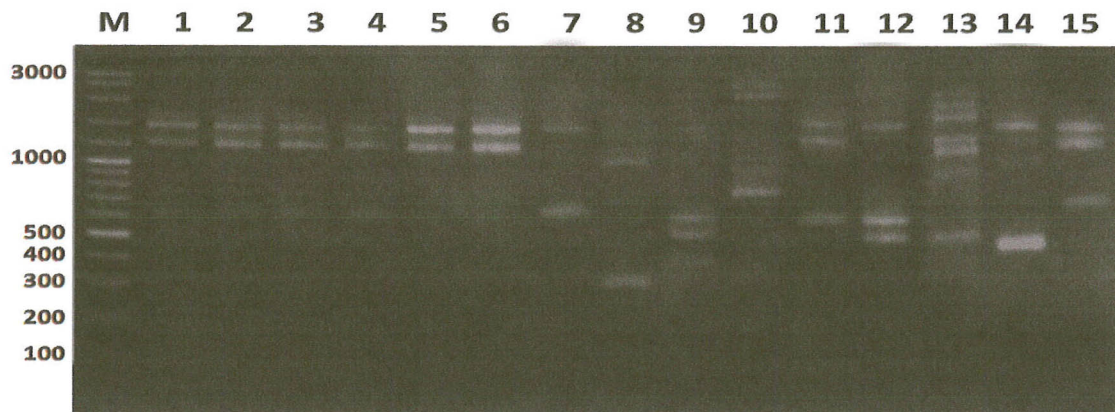
ภาพ 35 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-03

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียงตานาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียงตานาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



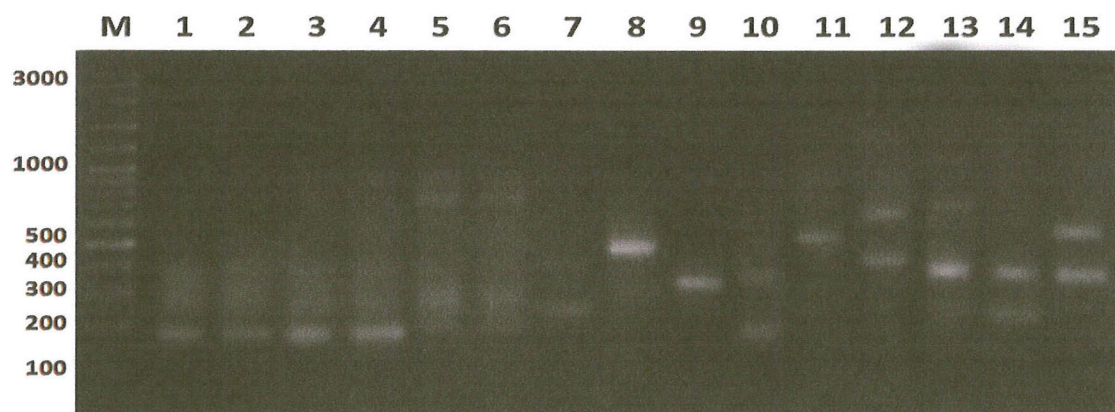
ภาพ 36 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-04

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียงตานาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียงตานาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



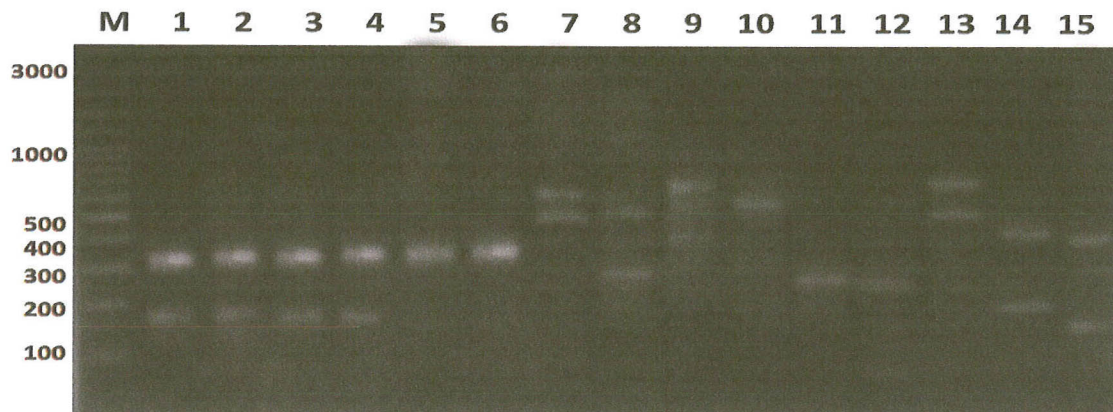
ภาพ 37 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-06

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



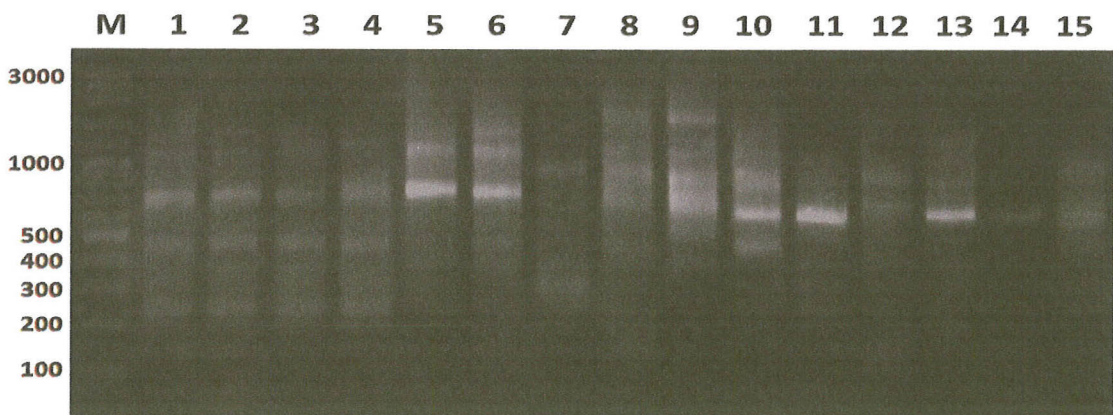
ภาพ 38 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-07

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



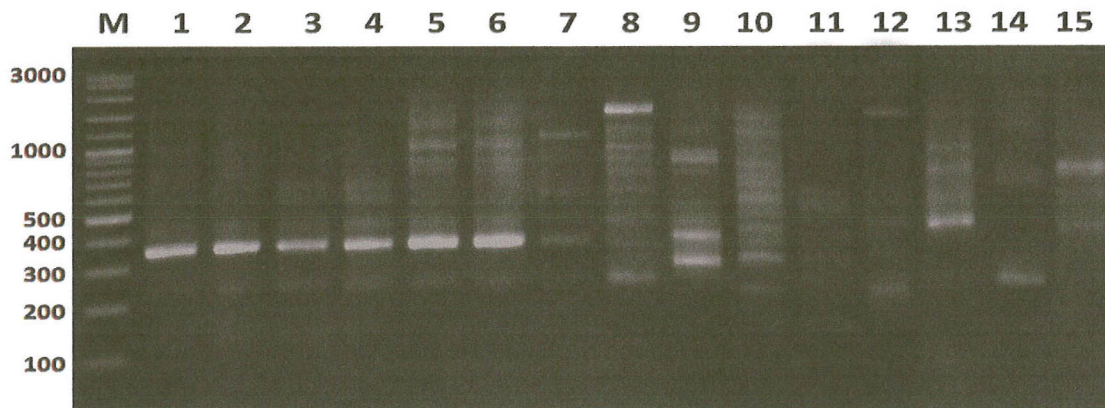
ภาพ 39 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-08

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพู่น), lane 2: *F. gigantica* (เซียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เซียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีसान), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



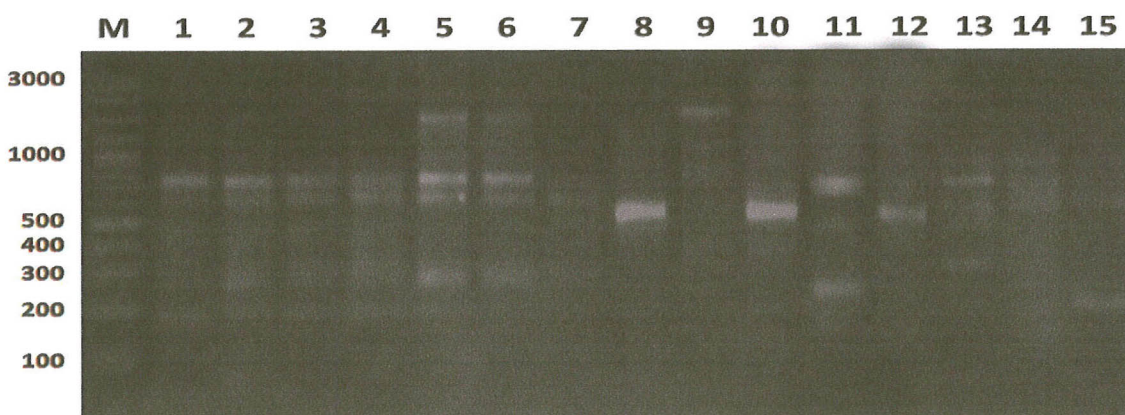
ภาพ 40 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-09

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพู่น), lane 2: *F. gigantica* (เซียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เซียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีसान), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



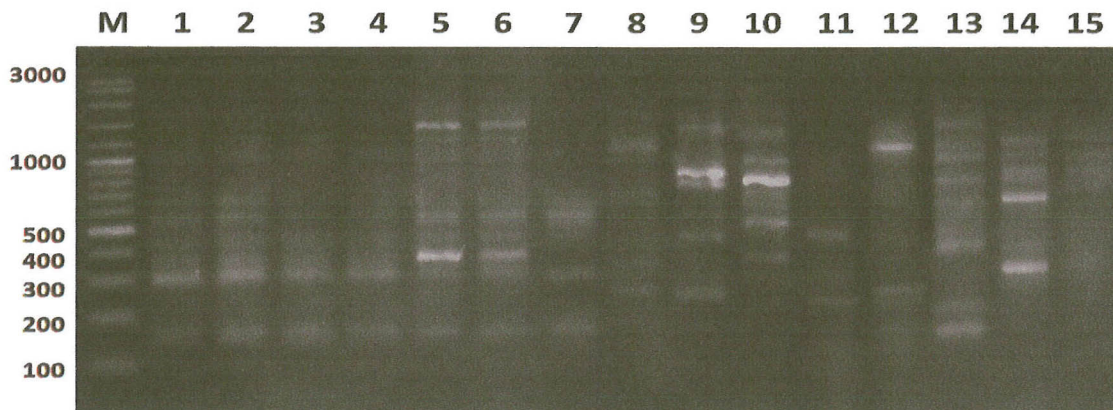
ภาพ 41 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPA-10

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



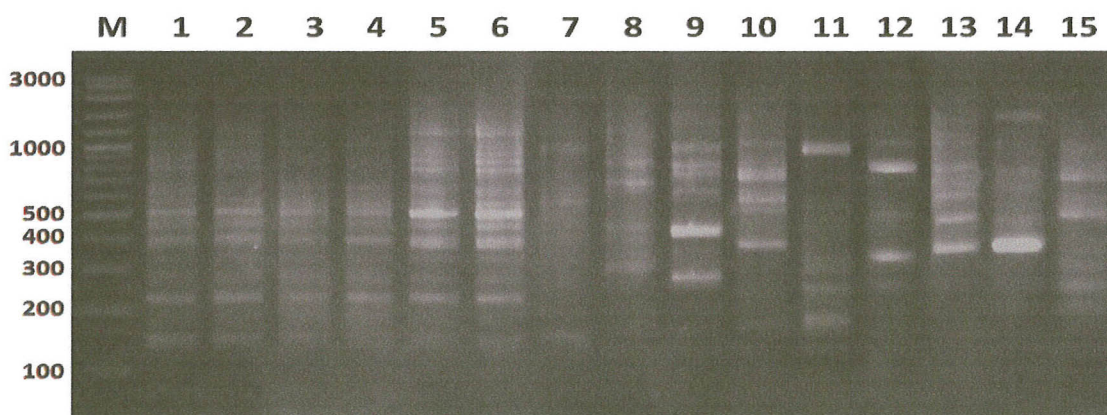
ภาพ 42 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-02

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



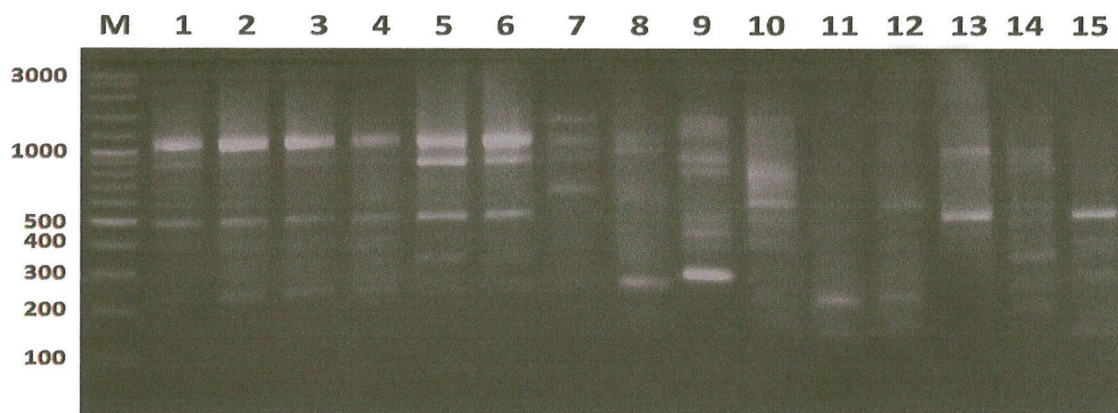
ภาพ 43 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-03

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



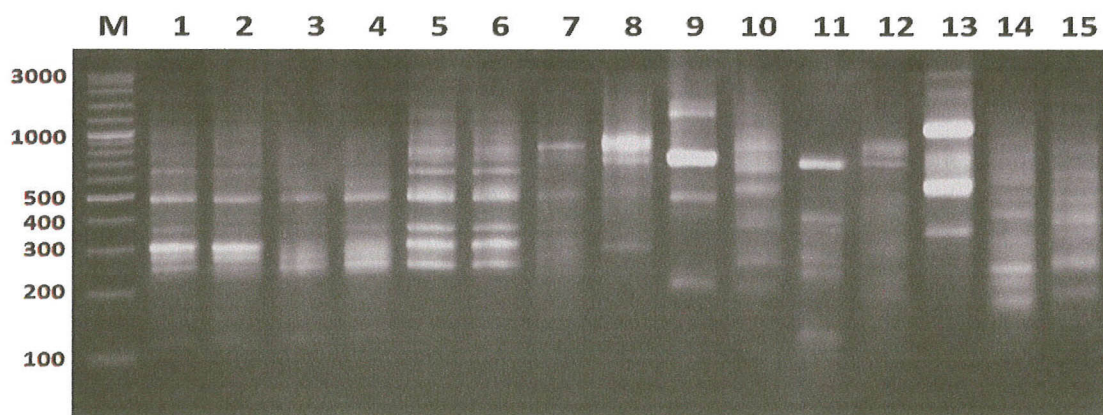
ภาพ 44 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-04

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



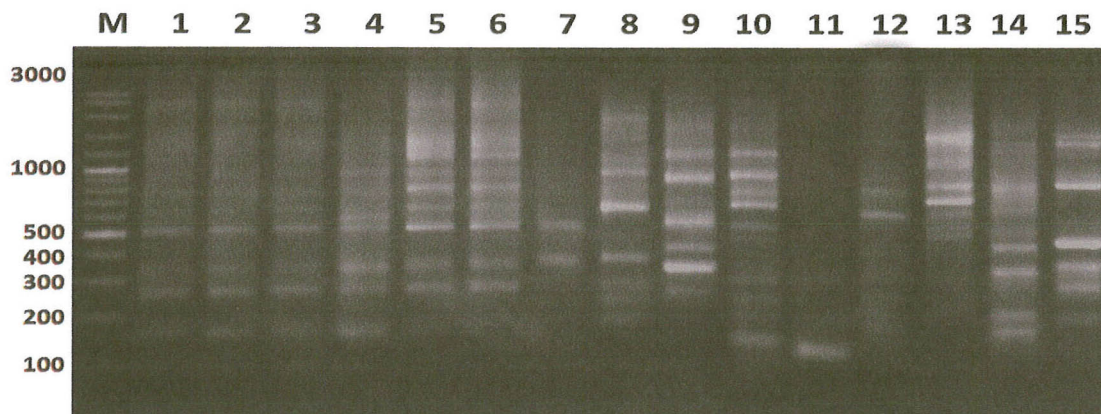
ภาพ 45 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-05

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



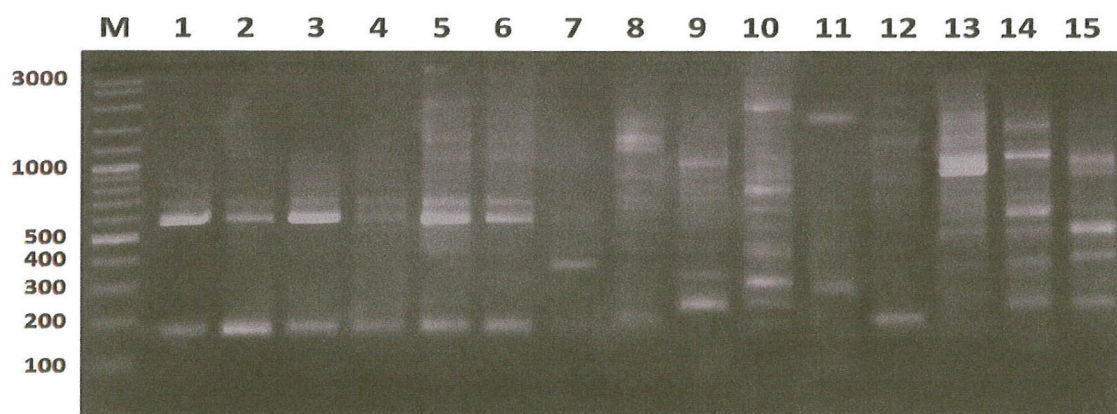
ภาพ 46 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-06

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



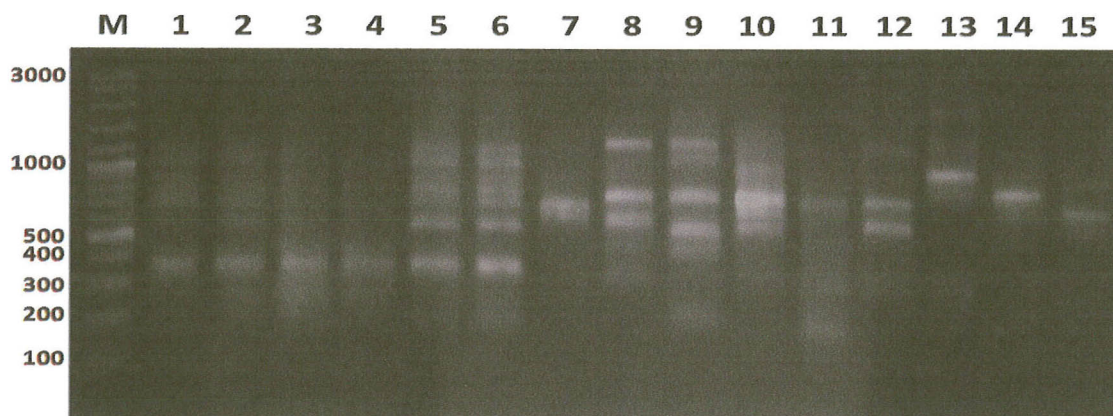
ภาพ 47 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-07

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพู่น), lane 2: *F. gigantica* (เซียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เซียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีसान), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



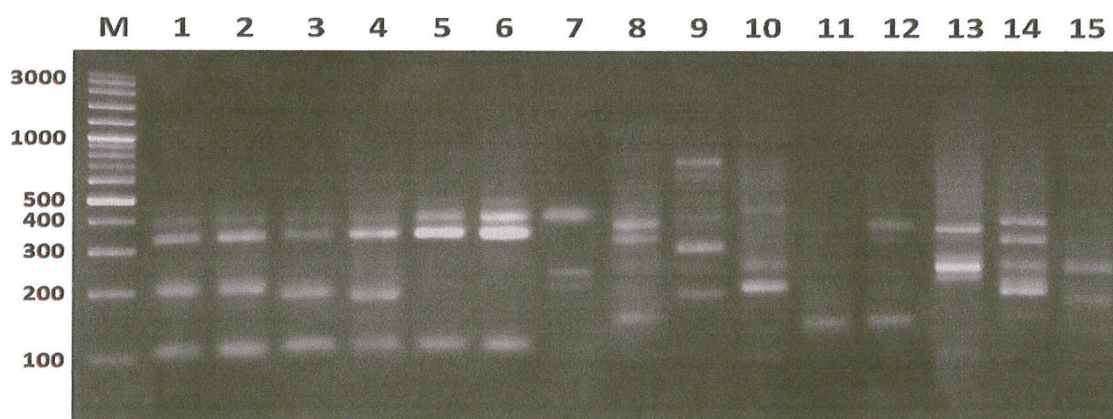
ภาพ 48 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-08

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพู่น), lane 2: *F. gigantica* (เซียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เซียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีसान), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียตนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียตนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



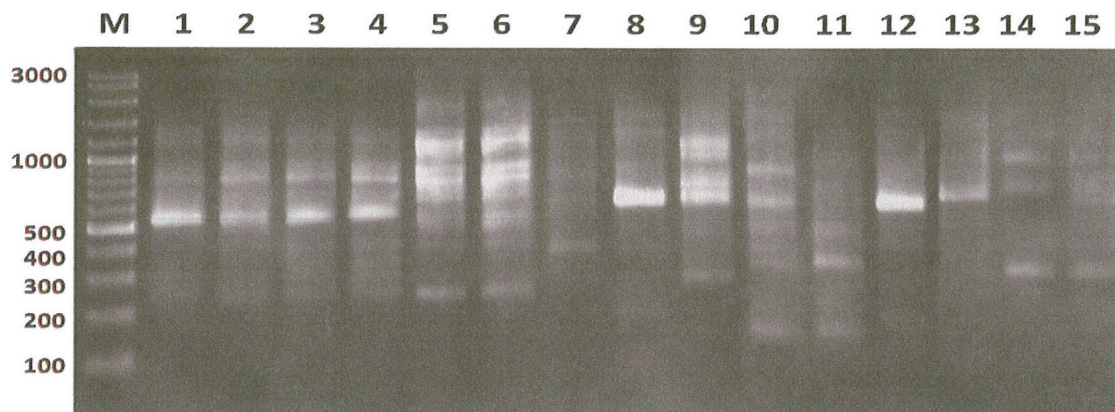
ภาพ 49 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-09

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียงตานม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียงตานม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



ภาพ 50 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPN-10

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียงตานม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียงตานม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2



ภาพ 51 แถบดีเอ็นเอของพยาธิที่เกิดจาก primer OPP-11

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2

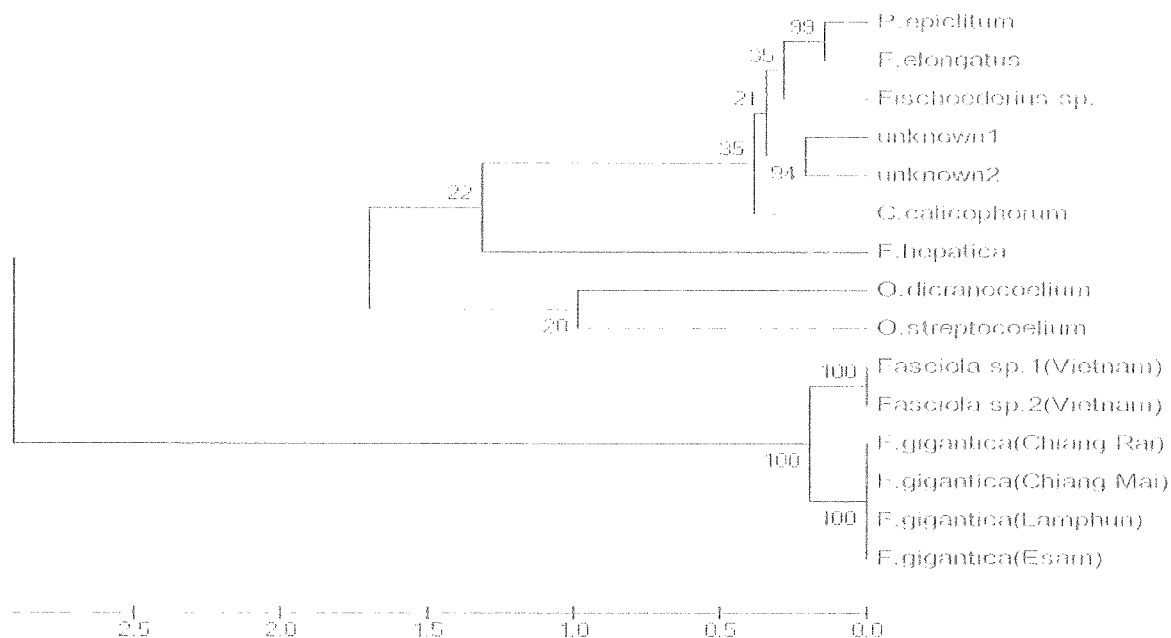
4.5 การหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของพยาธิที่สำรวจพบ และพยาธิที่ใช้เปรียบเทียบจำนวน ทั้งหมด 15 ได้แก่ *F. gigantica* (ลำพูน), *F. gigantica* (เชียงใหม่), *F. gigantica* (เชียงราย), *F. gigantica* (อีสาน), *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), *F. hepatica*, *Fischoederius* sp., *O. dicranocoelium*, *P. epiclitum*, *F. elongatus*, *O. streptocoelium*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก arbitrary primers ทั้ง 19 primers สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 80–3000 bp และทั้ง 19 primers สามารถทำให้เกิด %polymorphic band เท่ากับ 100% (ภาพ 33–51, ตาราง 1) จากนั้นนำไปแทนค่าข้อมูลให้เป็นระบบตัวเลขมาตรฐาน (0,1) เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.0 ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ สามารถยืนยันได้ว่าพยาธิ *F. gigantica* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้เป็นชนิดเดียวกัน และ *Fasciola* sp.1 กับ *Fasciola* sp.2 จากประเทศเวียดนามเป็นชนิดเดียวกัน ขณะเดียวกัน *F. gigantica* ที่พบในประเทศไทย กับ *Fasciola* sp. จากประเทศเวียดนามมีความใกล้เคียงกันมากกว่าพยาธิชนิดอื่น ขณะที่ *F. hepatica* ถูกแยกออกไปจาก genus เดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า *O. streptocoelium*

และ *O. dicranocoelium* มีความใกล้เคียงกันมากกว่าพยาธิในกระเพาะปัสสาวะชนิดอื่นที่มี *Fischoederius* sp., *P. epiclitum*, *F. elongatus*, *C. calicophorum*, unknown 1 และ unknown 2 ใกล้เคียงกันมากกว่า (ภาพ 52)

ตาราง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหลังจากการทำ PCR และตรวจสอบโดย Gel electrophoresis ของแต่ละ primers

Primers	ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ 5'-3'	ขนาด (bp)	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	polymorphic band	% polymorphic
OPA-01	TGCCGAGCTG	200-1900	76	76	100
OPA-02	TGCCGAGCTG	80-1600	78	78	100
OPA-03	AGTCAGCCAC	180-1500	81	81	100
OPA-04	AATCGGGCTG	190-1900	92	92	100
OPA-06	GGTCCCTGAC	300-2500	58	58	100
OPA-07	GAAACGGGTG	190-650	36	36	100
OPA-08	GTGACGTAGG	180-700	29	29	100
OPA-09	GGGTAACGCC	230-1600	57	57	100
OPA-10	GTGATCGCAG	120-1700	103	103	100
OPN-02	ACCAGGGGCA	190-1600	56	56	100
OPN-03	GGTACTCCCC	150-1500	96	96	100
OPN-04	GACCGACCCA	140-1200	142	142	100
OPN-05	ACTGAACGCC	150-2000	95	95	100
OPN-06	GAGACGCACA	120-3000	96	96	100
OPN-07	CAGCCCAGAG	110-2500	133	133	100
OPN-08	ACCTCAGCTA	190-2000	90	90	100
OPN-09	TGCCGGCTTG	170-1600	58	58	100
OPN-10	ACAAGTGGGG	120-1000	82	82	100
OPP-11	AACGCGTCGG	150-1800	56	56	100

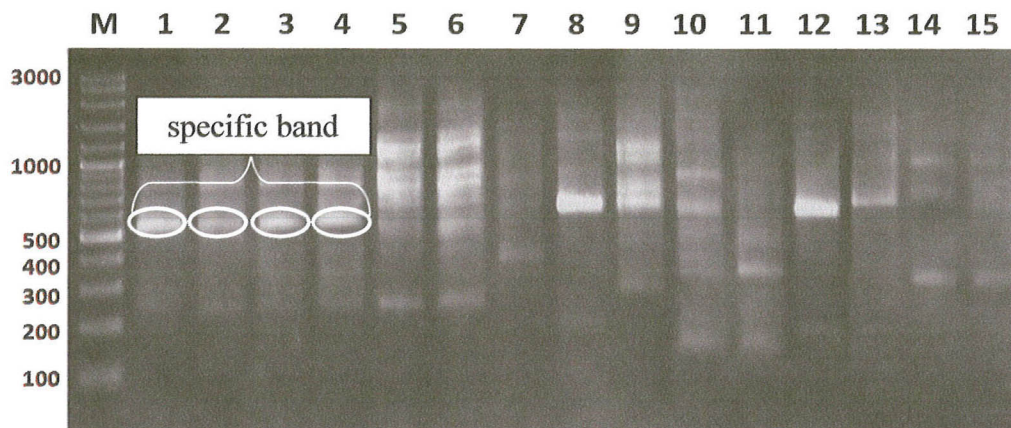


ภาพ 52 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิแต่ละชนิด

4.6 การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอ (HAT-RAPD marker) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับพยาธิ

F. gigantica

หลังจากที่นำดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิดมาทำ PCR ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ arbitrary primers ดังแสดงในก่อนหน้านี้ เพื่อทำให้เกิด markers ของพยาธิแต่ละชนิด แล้วคัดเลือกหาแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *F. gigantica* สามารถแยกความแตกต่างของพยาธิ *F. gigantica* ออกจากกลุ่มตัวอย่างพยาธิที่นำมาทดสอบได้โดยสมบูรณ์ ซึ่งหลังจากที่ได้เปรียบเทียบ marker ที่เกิดจาก primers แต่ละชนิดแล้ว พบว่า primer OPP-11 สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 550 bp. ที่คาดว่าจะมีความจำเพาะต่อพยาธิ *F. gigantica* (ภาพ 53) หลังจากนั้นจึงได้สกัดเอาดีเอ็นเอออกมา โดยใช้ Gel Recovery Kit (Vivantis, Malaysia) เพื่อที่จะนำไปใช้ในกระบวนการ ligation และ transformation ในลำดับต่อไป

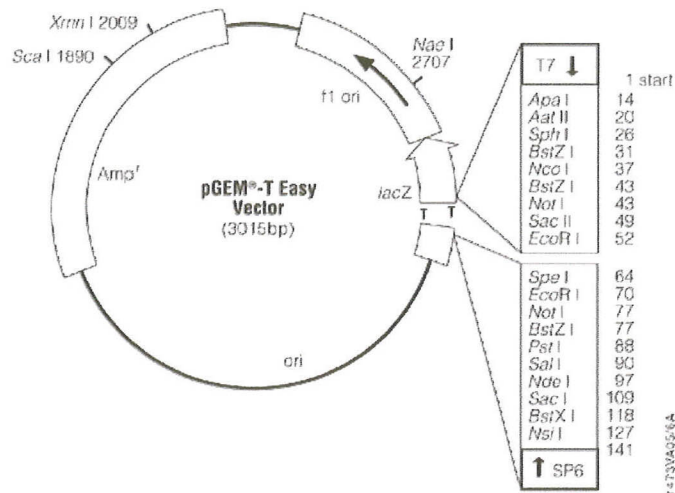


ภาพ 53 HAT-RAPD marker ที่เกิดจาก primer OPP-11 แสดงแถบดีเอ็นเอที่คาดว่าจะมีความจำเพาะต่อพยาธิ *F. gigantica* คือ 550 bp

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica* (ลำพูน), lane 2: *F. gigantica* (เชียงใหม่), lane 3: *F. gigantica* (เชียงราย), lane 4: *F. gigantica* (อีสาน), lane 5: *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), lane 6: *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), lane 7: *F. hepatica*, lane 8: *Fischoederius* sp., lane 9: *O. dicranocoelium*, lane 10: *P. epiclitum*, lane 11: *F. elongatus*, lane 12: *O. streptocoelium*, lane 13: *C. calicophorum*, lane 14: unknown 1, lane 15: unknown 2

4.7 การเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Ligation) เข้าใน plasmid vector

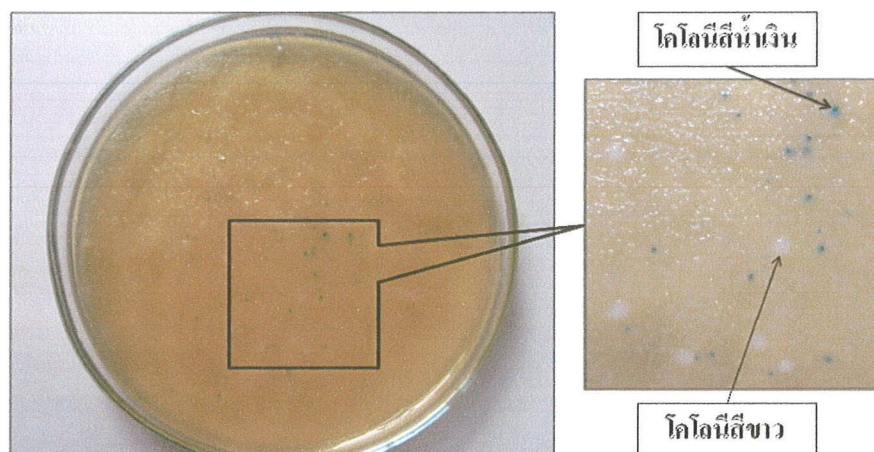
หลังจากที่ได้แถบดีเอ็นเอ หรือ marker ที่ในเบื้องต้นคาดว่าจะมีความจำเพาะต่อพยาธิใบไม้ *F. gigantica* แล้ว คือแถบที่มีขนาด 550 bp. ในขั้นตอนต่อมาคือ การเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เข้ากับ plasmid vector โดยการทำให้ ligase ตามกระบวนการที่ได้กล่าวไว้ในบทวิธีการวิจัย ซึ่งในครั้งนี้ได้เลือก pGEM-T Easy Vector (Promega) มาใช้ในการวิจัย เนื่องจากมีความสะดวกในการใช้งาน และตรวจสอบผลได้ง่าย คุณสมบัติที่สำคัญของ vector ชนิดนี้ คือเป็น vector ที่มีขนาด 3015 bp บริเวณที่เป็นจุดเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นจุดตัดของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) หลายชนิด และมียีนที่ต้านทานต่อสารแอมพิซิลิน (ampicillin resistant gene: Amp^r) ดังแสดงในภาพ 54 ซึ่งจะสะดวกในการตรวจสอบผล หลังจากที่ได้ subclone เข้าในแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ



ภาพ 54 แผนที่ องค์ประกอบ และโครงสร้างของ pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, USA)

4.8 การส่งถ่าย plasmid vector ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (insert) เข้าในเซลล์ของแบคทีเรีย

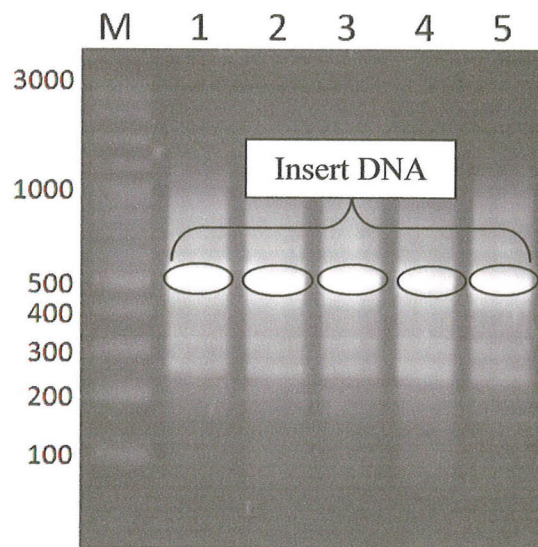
เมื่อได้ plasmid vector ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว ก็จะไปส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (transformation) ด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเครื่อง Electroporator ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ ใช้ *Escherichia coli* (DH5 α) เป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วเลี้ยงไว้ใน อาหารเหลว LB broth 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไป spread plate บนจานอาหาร lactose agar ที่เติม ampicilin, X-gal และ IPTG หลังจากนั้นนำไปที่ 37 °C ทำให้เกิดเป็นโคโลนีสีขาวเงิน และสีขาว ดังภาพ 55 โดย *E. coli* ที่ได้รับการส่งถ่าย plasmid vector เข้าได้สมบูรณ์ จะมี ampicilin resistant gene ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานแอมพิซิลิน (ampicilin resistant strain) แล้วจึงเก็บตัวอย่างโคโลนีสีขาวของ *E. coli* ที่เกิดขึ้นนี้ ไปเลี้ยงใน LB broth เช่นเดิม



ภาพ 55 โคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เจริญบน LB agar ที่เติม ampicilin, X-gal และ IPTG หลังจากการส่งถ่าย plasmid

4.9 การตรวจสอบ insert DNA ของ plasmid vector โดยวิธี PCR

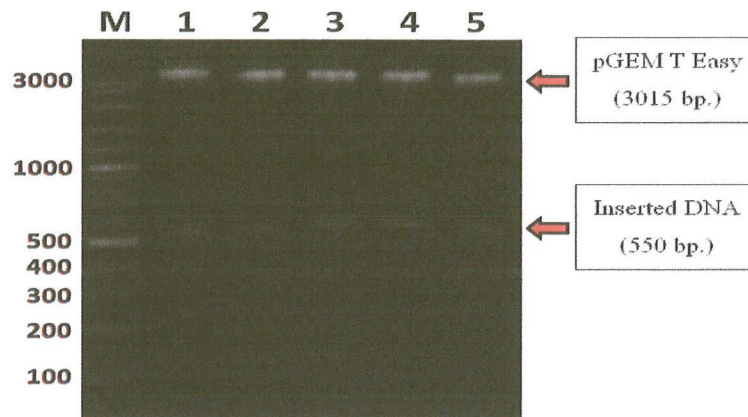
หลังจากเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แล้ว จากนั้นนำไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วมาแตะเบาตรงโคโลนีสีขาว และนำไม้จิ้มฟันไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นนำอาหารที่ได้มาสกัด plasmid โดยใช้ชุดสกัด PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA) และนำ plasmid ที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ primer OPP-11 (ภาพ 56)



ภาพ 56 HAT-RAPD marker ของ plasmid DNA ที่เกิดจาก primer OPP-11 แสดงแถบดีเอ็นเอของ insert DNA ที่มีขนาดประมาณ 550 bp.

4.10 การตรวจสอบหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *EcoR* 1

จากการนำ plasmid ที่สกัดได้มาตัดด้วย restriction enzyme ตามที่ระบุใน map ของ vector เพื่อทดสอบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ (insert) อยู่จริง ก่อนจะส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ต่อไป ซึ่งผลการสกัด plasmid แล้วตัดด้วย *EcoR* 1 พบว่าตัวอย่าง colony ของ *E. coli* (DH5α) จำนวน 5 โคโลนี ที่ได้จาก LB agar พบว่ามี insert DNA ในทุกตัวอย่างโคโลนีที่นำมาตรวจสอบ (ภาพ 57)



ภาพ 57 ผลการสกัด plasmid vector เพื่อตรวจหา insert DNA จาก *E. coli* จำนวน 5 โคโลนี
M: molecular markers (Lane 1–5): โคโลนีของ *E. coli* ที่นำมา spread plate หลังจาก transformation

4.11 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ และการออกแบบ primer
หลังจากที่ตรวจสอบว่ามี insert DNA ใน *E. coli* แล้ว จึงส่งตัวอย่าง *E. coli* ในอาหารเหลว lactose broth ไปที่ห้องปฏิบัติการของบริษัทไบโอดีไซด์ อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insert DNA ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insert DNA (550 bp) ของพยาธิ *F. gigantica* ที่เกิดจาก primer OPP-11 (ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้) โดยใช้ primer T7 (5' – 3') มีดังนี้ คือ

OPP-11

```

AACGCGTCGGGAAGAGCTCCTATGTAAACA      FG_F
TATCAATAAATTGCCCAGACCCAAGATT
CCCGGGGTGGGTAAGATCCCGGGTTACCGG
ATGGATCGAATTTGCAGGGACAGGGTTCCT
GGGTGGGTCAACTGAGGAGAGGGCTATTGC
CATCCTGCAACGCGTACGACATGGACACCA
GAAACATCCCACTCCCGCCCCTTTACGCTA
TTTGGAAGCAGATGAGTATAAATGGCCGTC
GTTTTACCATTACTAGCCAGGGCAAAACCT
GCGCTCCCCACACTTAGAACGTTGGAGCAA
TAGCGCTTTACGCCGTTGGGATTGAAGGGG
AGAGGGTCCGACGCGTT                      FG_R

```


4.12 การออกแบบ primers

ผลการ sequence พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ มีความยาวทั้งหมด 550 bp โดยนับเริ่มต้นและสิ้นสุดที่ตำแหน่งของ primer OPP-11 ที่ใช้ทำ PCR ในขั้นตอนแรก จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ สามารถออกแบบ specific primers ที่จำเพาะต่อพยาธิ *F. gigantea* ที่มีขนาด 20 bases โดย specific primers ที่ออกแบบได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากทำการสังเคราะห์เสร็จแล้วเป็นดังนี้ คือ

Forward primer;

FG_F: 5'- TCG GGA AGA GCT CCT ATG TA- 3'

มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ มีขนาด 20 bases ประกอบด้วยอัตราส่วน ของ A : C เท่ากับ 5/4 และ G : T เท่ากับ 6/5 มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weigh) เท่ากับ 6043 g/mole มี melting temperature: Tm เท่ากับ 60 °C ค่าการดูดกลืนแสง (OD/ml) เท่ากับ 10.6 และมีความเข้มข้นเท่ากับ 348.9 ไมโครกรัม

Reverse primer;

FG_R: 5'- ATT GAA GGG GAG AGG GTC CG- 3'

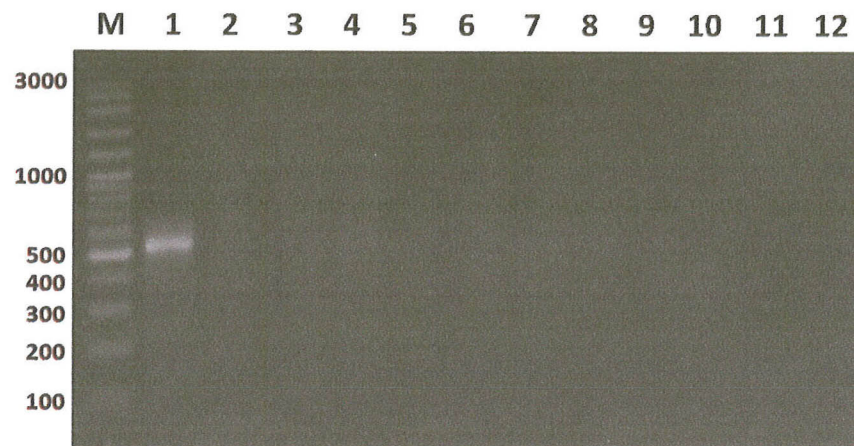
มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ มีขนาด 20 bases ประกอบด้วยอัตราส่วน ของ A : C เท่ากับ 5/2 และ G : T เท่ากับ 10/3 มี น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 6185 g/mole มี melting temperature : Tm เท่ากับ 64 °C ค่าการดูดกลืนแสง (OD/ml) เท่ากับ 10.0 และมีความเข้มข้นเท่ากับ 331.2 ไมโครกรัม

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ต้องการแล้ว จากนั้นส่งไปทำการสังเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของบริษัทไบโอดีไซด์ จำกัด อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

4.13 การทดสอบประสิทธิภาพของ specific primers ต่อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantea* ระยะตัวเต็มวัย

การทดสอบประสิทธิภาพของ primers ในการติดตามตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจงต่อพยาธิใบไม้ *F. gigantea* ทำได้โดยการนำ primers ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่นี้ ไปใช้ในกระบวนการ PCR แทน arbitrary primers ที่ใช้ในขั้นตอนแรก แต่ในการทำ PCR เพื่อทดสอบ specific primers จะต้องเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง annealing อย่างน้อยให้เท่ากับ ค่า melting temperature : Tm ที่ระบุในคุณสมบัติของ specific primers โดยอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมอยู่ที่ 60 °C เนื่องจากในการทำ PCR ก่อนหน้านี้ ใช้เทคนิค HAT-RAPD ใช้อุณหภูมิในช่วง annealing เพียง 56 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ arbitrary primers ทั่วไป ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพ

ของ specific primer กับพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย และตัวเต็มวัยของพยาธิอื่นๆ ที่สำรวจพบ พบว่า specific primers นี้ สามารถติดตามตรวจสอบ และมีความเฉพาะเจาะจงกับพยาธิ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด ประมาณ 550 bp เพียงแถบเดียวในตัวอย่างที่เป็นพยาธิ *F. gigantica* เท่านั้น (ภาพ 58)



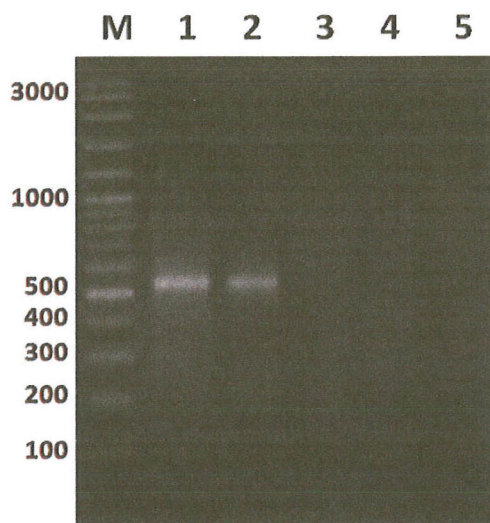
ภาพ 58 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ specific primer ของ *F. gigantica* กับระยะตัวเต็มวัยของพยาธิชนิดต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 550 bp เพียงแถบเดียวในตัวอย่างที่เป็นพยาธิ *F. gigantica*

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantica*, lane 2: *Fasciola* sp.1 (เวียดนาม), lane 3: *Fasciola* sp.2 (เวียดนาม), lane 4: *F. hepatica*, lane 5: *Fischoederius* sp., lane 6: *O. dicranocoelium*, lane 7: *P. epiclitum*, lane 8: *F. elongatus*, lane 9: *O. streptocoelium*, lane 10: *C. calicophorum*, lane 11: unknown 1, lane 12: unknown 2

4.14 การทดสอบประสิทธิภาพของ specific primers ต่อพยาธิใบไม้ *F. gigantica* ระยะตัวอ่อน

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ specific primers โดยการทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียจำนวน 4 แบบ คือ *gymnophallus cercaria*, *amphistome cercaria*, *parapleurolophocercous cercaria* และ *furcocercous cercaria* โดย *gymnophallus cercaria* พบในหอยคัน *Lymnaea* sp. *amphistome cercaria* และ *parapleurolophocercous cercaria* พบในหอยเจดีย์ *Melanoides tuberculata* สำหรับ *furcocercous cercaria* พบในหอยขม *Filopaludina* sp. ผลการทดสอบประสิทธิภาพ พบว่าสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 550 bp ในตัวอย่าง *gymnophallus cercaria* ที่พบในหอยคัน

Lymnaea sp. ซึ่งแสดงว่า *gymnophallus cercaria* ที่พบในการศึกษาค้างนี้ เป็นตัวอ่อนของ พยาธิ *F. gigantea* (ภาพ 59)



ภาพ 59 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ specific primer ของ *F. gigantea* ในพยาธิระยะ เซอร์คาเรียของพยาธิชนิดต่างๆ โดยทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 550 bp เพียงแถบ เดียวใน *gymnophallus cercaria* ซึ่งเป็นตัวอ่อนของพยาธิ *F. gigantea*

Lane M: DNA marker (VC 100 bp Plus DNA Ladder), lane 1: *F. gigantea* (ระยะตัว เต็มวัย), lane 2: *Gymnophallus cercaria*, lane 3: *Amphistome cercaria*, lane 4: *Parapleurocercous cercaria*

4.15 กิจกรรมการเผยแพร่ข้อมูล

กิจกรรมเผยแพร่ข้อมูลการวิจัยได้จัดขึ้นในช่วงสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์ ระหว่างวันที่ 18-20 สิงหาคม 2554 ซึ่งมีนักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไปเข้าร่วมงานเป็นจำนวนมาก ทำให้เป็นโอกาสที่ดีสำหรับการเผยแพร่ข้อมูลการวิจัย ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับพยาธิ รวมทั้งวิธีการ ป้องกัน และรักษาการติดพยาธิ โดยมีการนำเสนอทั้งในรูปแบบของสไลด์ถาวร โปสเตอร์ แผ่น พับ และพยาธิที่เก็บรักษาสภาพในฟอร์มมาลีน ซึ่งผลจากการเผยแพร่ข้อมูลวิจัยนั้น พบว่ามี นักเรียน นักศึกษา และบุคคลทั่วไปให้ความสนใจ และซักถามในรายละเอียดเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในภาพกิจกรรมดังต่อไปนี้ (ภาพ 60)



ภาพ 60 กิจกรรมต่าง ๆ ในเผยแพร่ข้อมูลการวิจัย ในช่วงสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์ ระหว่างวันที่ 18-20 สิงหาคม 2554