



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

โดย ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การบ่งบอกระดับอนุของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* Onji & Nishino,
1916

คณะผู้วิจัย

สังกัด

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

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความคิดเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BGJ4580020

ชื่อโครงการ : การบ่งบอกระดับอนุของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus*

Onji & Nishino, 1916

ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.ชโลบล วงศ์สวัสดิ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นายประลองยุทธ ศรีपालวิทย์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Prof.Dr. Jong-Yil Chai

Department of Parasitology and Tropical

Medicine, College of Medicine,

Seoul National University

รศ.ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : cwongsawd@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี

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

คำหลัก : *Stellantchasmus falcatus*, heterophyidae, detection

Abstract

Project code : BGJ4580020

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

Onji & Nishino, 1916

Investigater :

Assoc.Prof. Chalobol Wongsawad

Department of Biology, Faculty of
Science, Chaing Mai University

Mr. Pralongyut Sripalwit

Department of Biology, Faculty of
Science, Chaing Mai University

Prof.Dr. Jong-Yil Chai

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

Assoc.Prof. Somboon Anantalabhochai

Department of Biology, Faculty of
Science, Chaing Mai University

E-mail Address : cwongsawd@yahoo.com

Project Period : 1 year

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

Keywords : *Stellantchasmus falcatus*, heterophyidae, detection

Executive summary

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

เนื้อหางานวิจัย

การบ่งบอกระดับอนุของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* Onji & Nishino, 1916

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

ก. ความเป็นมา

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

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

การตรวจวินิจฉัยโรคทำได้โดยการตรวจจากรถเพื่อหาไข่พยาธิ ซึ่งต้องแยกความแตกต่างจากไข่พยาธิ heterophyids ตัวอื่น จึงทำได้ยากเพราะไข่ของพยาธิใบไม้กลุ่มนี้มีขนาดเล็กและลักษณะคล้ายคลึงกันซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยได้ ดังนั้นวิธีการตรวจที่จำเพาะเจาะจงและแม่นยำเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อความรวดเร็วในการรักษาและเฝ้าระวังการ

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

ข. วัตถุประสงค์/เป้าหมายของการวิจัย

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

ค. แนวทางและแผนการดำเนินการวิจัย

วิธีการวิจัย

1. Parasite collection

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

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

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

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

2. DNA extraction

ในการวิจัยครั้งนี้สกัดดีเอ็นเอโดยชุด DNeasy Tissue Kit ของบริษัท QIAGEN จากนั้นดีเอ็นเอที่ได้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3. HAT-RAPD technique

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำตามวิธีการของ Anantalabhochai *et al.* (2000) ดังนี้

3.1 การเลือกใช้ primers

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

3.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

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

3.3 เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR

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

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ไปทำ agarose gel electrophoresis ต่อไป

4. Sequencing

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

5. Primer design

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

6. Data analysis

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

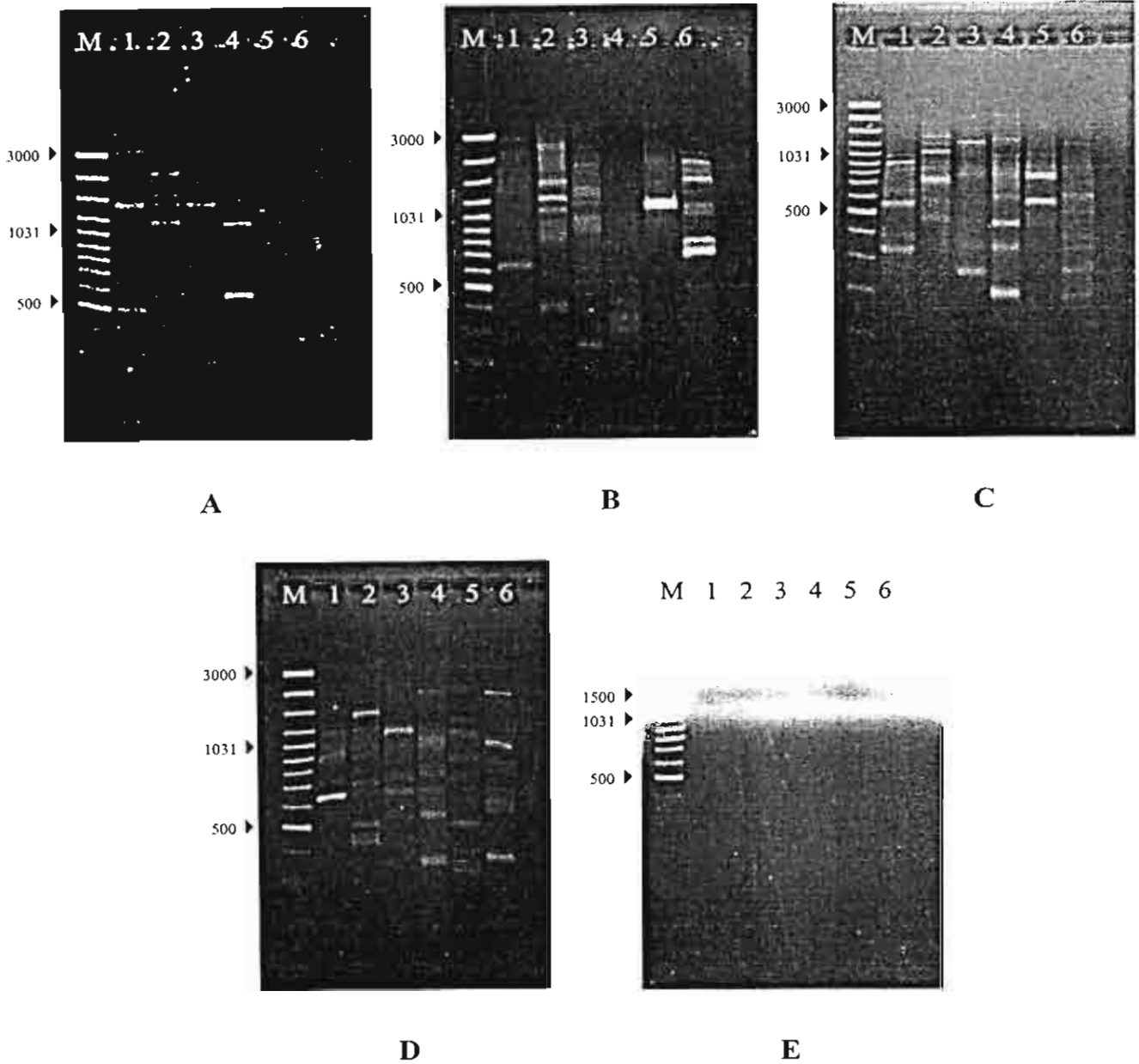
ง. ผลการทดลอง

HAT-RAPD technique

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

ตาราง 1 แสดงลำดับเบสของ primer และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค HAT-RAPD จากพยาธิ 6 ชนิด

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



รูป 1 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer
A) OPA-01 B) OPA-02 C) OPA-03 D) OPA-04 E) OPA-06
 (lane M, molecular weight marker ; lane 1, *S. falcatius* ; lane 2, *H. taichui* ; lane 3, *C. caninus* ; lane 4, *M. yokogawai* ; lane 5, *Haplorchoides* sp. ; lane 6, *O. viverrini*)

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

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

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

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

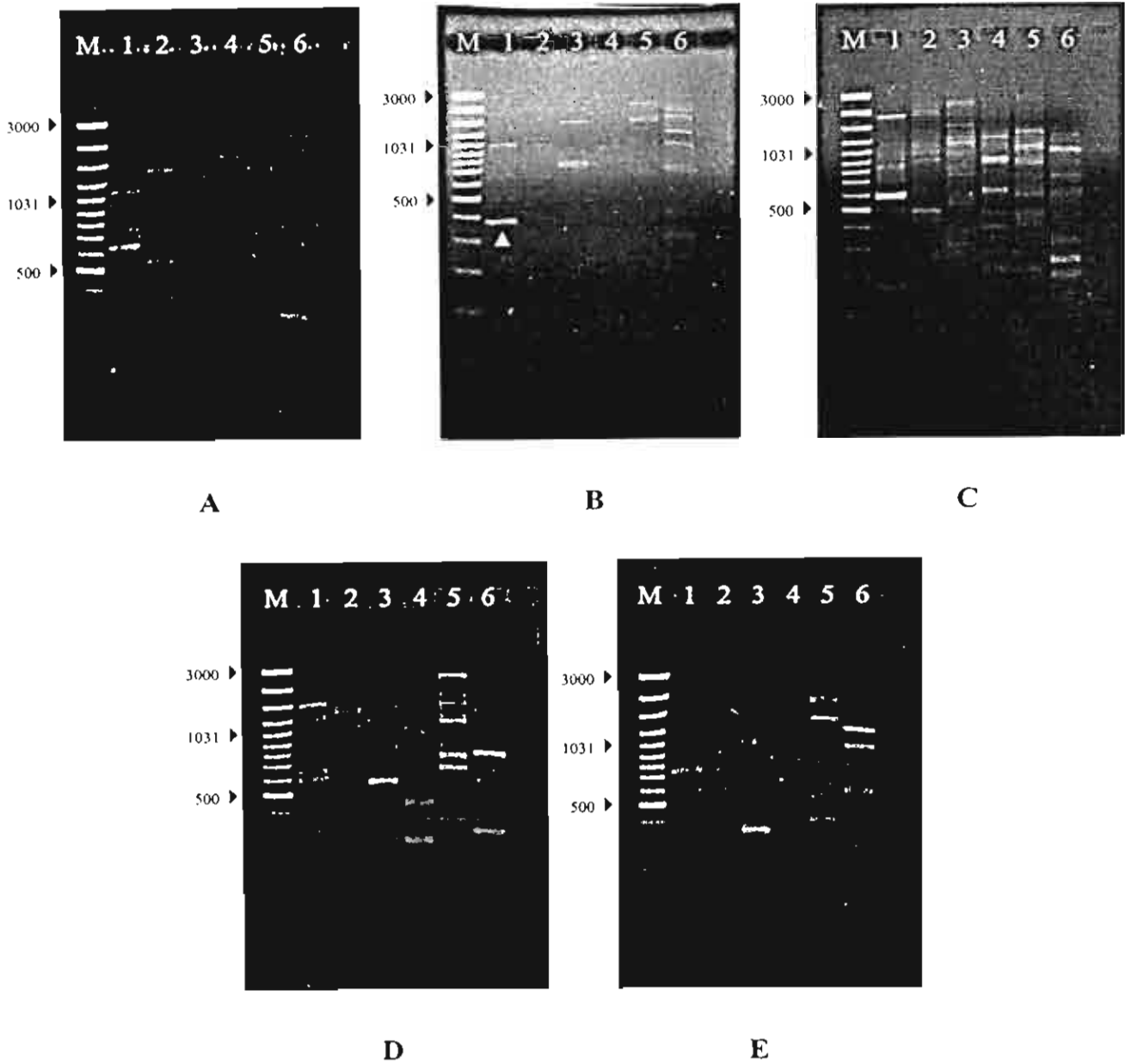
จากรูป 1C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-03 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,150 – 285 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 7 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 12 แถบ ได้แก่

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

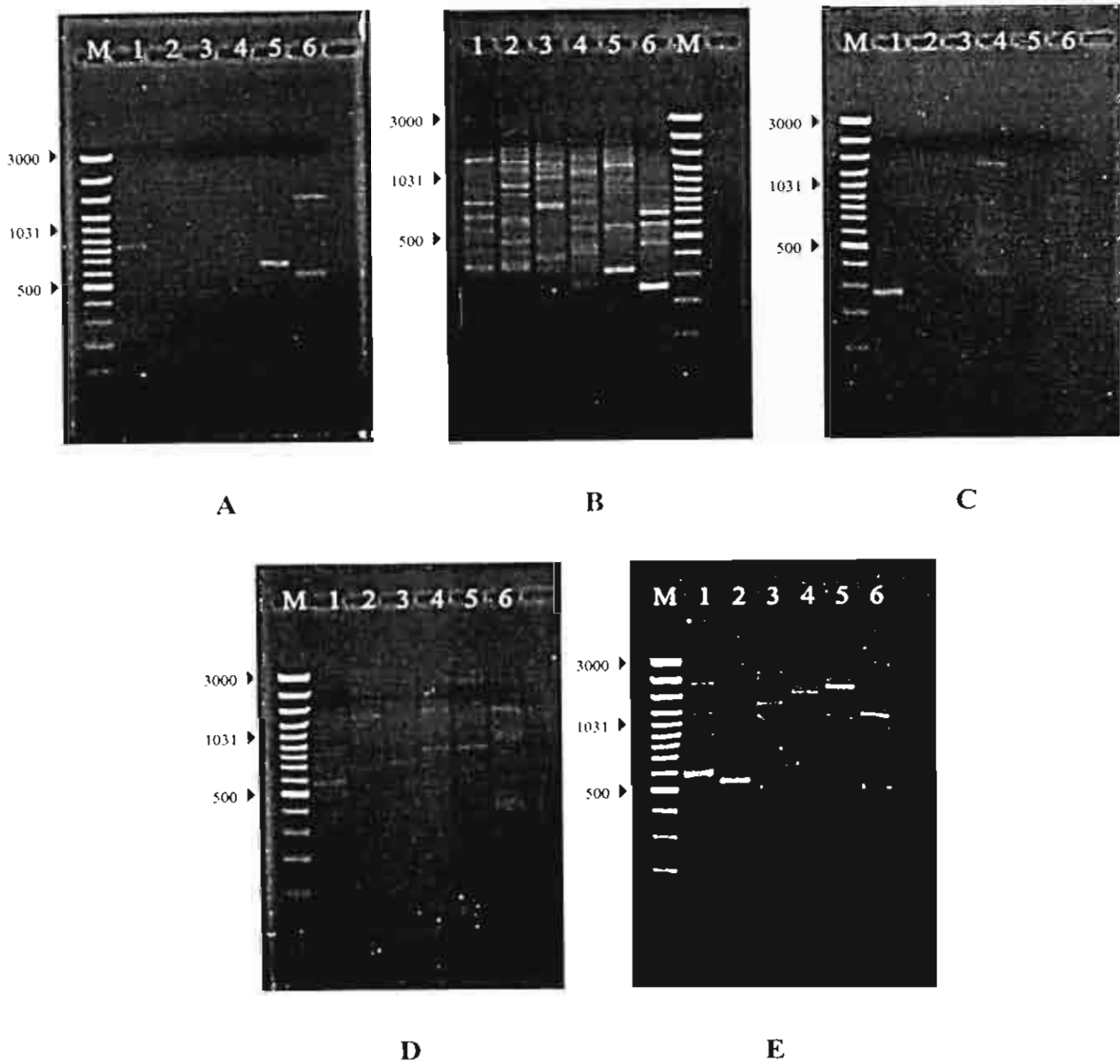
จากรูป 2D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-10 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 23 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,900 – 185 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 17 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 6 แถบ ได้แก่

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

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

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

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



รูป 3 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer
A) OPA-12 B) OPA-13 C) OPA-14 D) OPA-15 E) OPA-16
 (lane M, molecular weight marker ; lane 1, *S. falcatius* ; lane 2, *H. taichui* ; lane 3, *C. caninus* ; lane 4, *M. yokogawai* ; lane 5, *Haplorchooides* sp. ; lane 6, *O. viverrini*)

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

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

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

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

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

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

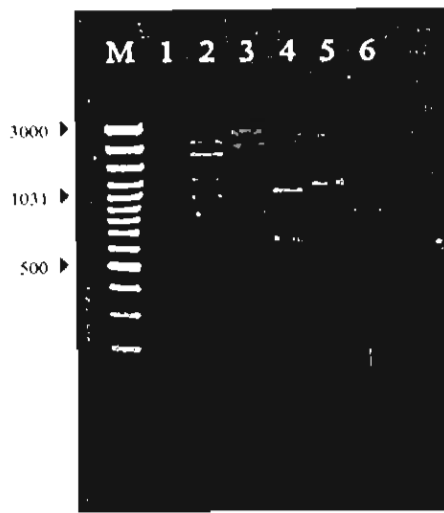
จากรูป 3D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-15 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,200 – 540 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 6 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 10 แถบ ได้แก่

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

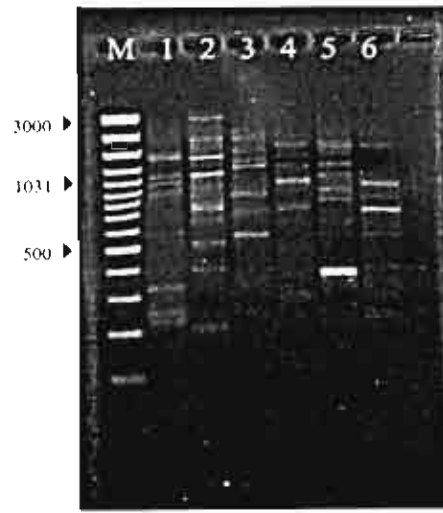
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 980 bp. พบใน *O. viverrini*

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

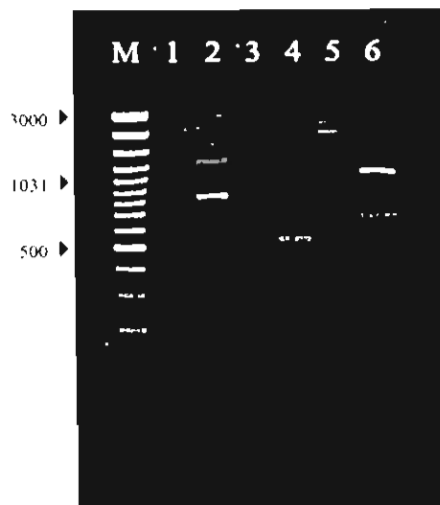
1. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 600 bp. พบใน *S. falcatu*s
2. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 540 และ 310 bp. พบใน *H. taichui*
3. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 350 bp. พบใน *C. caninus*
4. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 390 bp. พบใน *M. yokogawai*
5. แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,140 410 335 และ 295 bp. พบใน *Haplorchoides* sp.



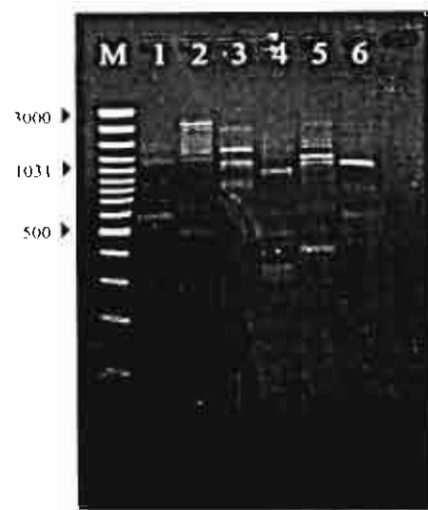
A



B



C



D

รูป 4 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-01 1 → 22	OPA-02 1 → 23	OPA-03 1 → 19
<i>S. falcatus</i>	1100010101000000101010	100000000000001000000000	1010000111000100100
<i>H. taichui</i>	1111011011101001000000	11110010010100000001000	0111001100010000000
<i>C. caninus</i>	0110100001000000000001	00100001100000010100001	0000010100000000010
<i>M. yokogawai</i>	0000000001101000010000	00000000000000010010110	1000100010000011001
<i>Haplorchoides</i> sp.	0000000001100111001100	00000000001000000000000	000000000101000000
<i>O. viverrini</i>	0000000001010100000000	10011100001111001000000	0000001000000000011

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-04 1 → 31	OPA-06 1 → 1	OPA-07 1 → 24
<i>S. falcatus</i>	0000000100001000100000000100000	0	0010000000000001101001000
<i>H. taichui</i>	10100001100000000000001000011000	0	111010000100000000000100
<i>C. caninus</i>	0010000001011110010010100001000	1	010000000011000000100010
<i>M. yokogawai</i>	000010000000000000011000000000000	0	000000100000100000010000
<i>Haplorchoides</i> sp.	0101010010100010000100010100011	0	000101011100010010100000
<i>O. viverrini</i>	0000101000010001111000111000100	0	001110000000000001000001

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

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

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-11 1 → 16	OPA-12 1 → 8	OPA-13 1 → 25
<i>S. falcatus</i>	0000000000011000	00000100	0101000000011001001010100
<i>H. taichui</i>	0000000000000000	00000000	1010100100110000100110100
<i>C. caninus</i>	0101001000010010	00001000	1110010101110100000001100
<i>M. yokogawai</i>	0010000110000000	10000000	0010000010111000001110100
<i>Haplorchoides</i> sp.	1001100001000100	00000010	0000000000010000010000010
<i>O. viverrini</i>	0010011000101101	01110001	0000001000000110010100001

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

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-17 1 → 19	OPA-18 1 → 25	OPA-19 1 → 20
<i>S. falcatus</i>	00000011000000000000	0011000010110000000001110	00001010011000001100
<i>H. taichui</i>	10010111010010000000	1100111010100000100100001	01010000110001100010
<i>C. caninus</i>	11001111000001000000	0011110001000010001000000	01001101001010001000
<i>M. yokogawai</i>	0000000110010110000	0000101000001000100000000	00000000000000000100
<i>Haplorchoides</i> sp.	0010000000100011001	0000001111010011000010000	01110011100000000001
<i>O. viverrini</i>	0000000001000101110	0000010100001101010000000	10100000000100010000

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

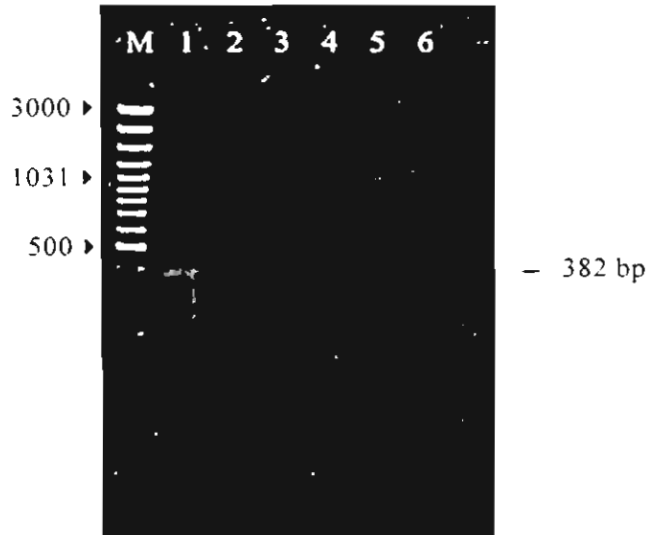
ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ
	OPA-20 1 → 20
<i>S. falcatus</i>	00000001011100010000
<i>H. taichui</i>	01110001101000001000
<i>C. caninus</i>	00010001000101000001
<i>M. yokogawai</i>	00001010000010000100
<i>Haplorchoides</i> sp.	10100110010100000010
<i>O. viverrini</i>	00000100010100110000

Sequencing and primer design

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

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

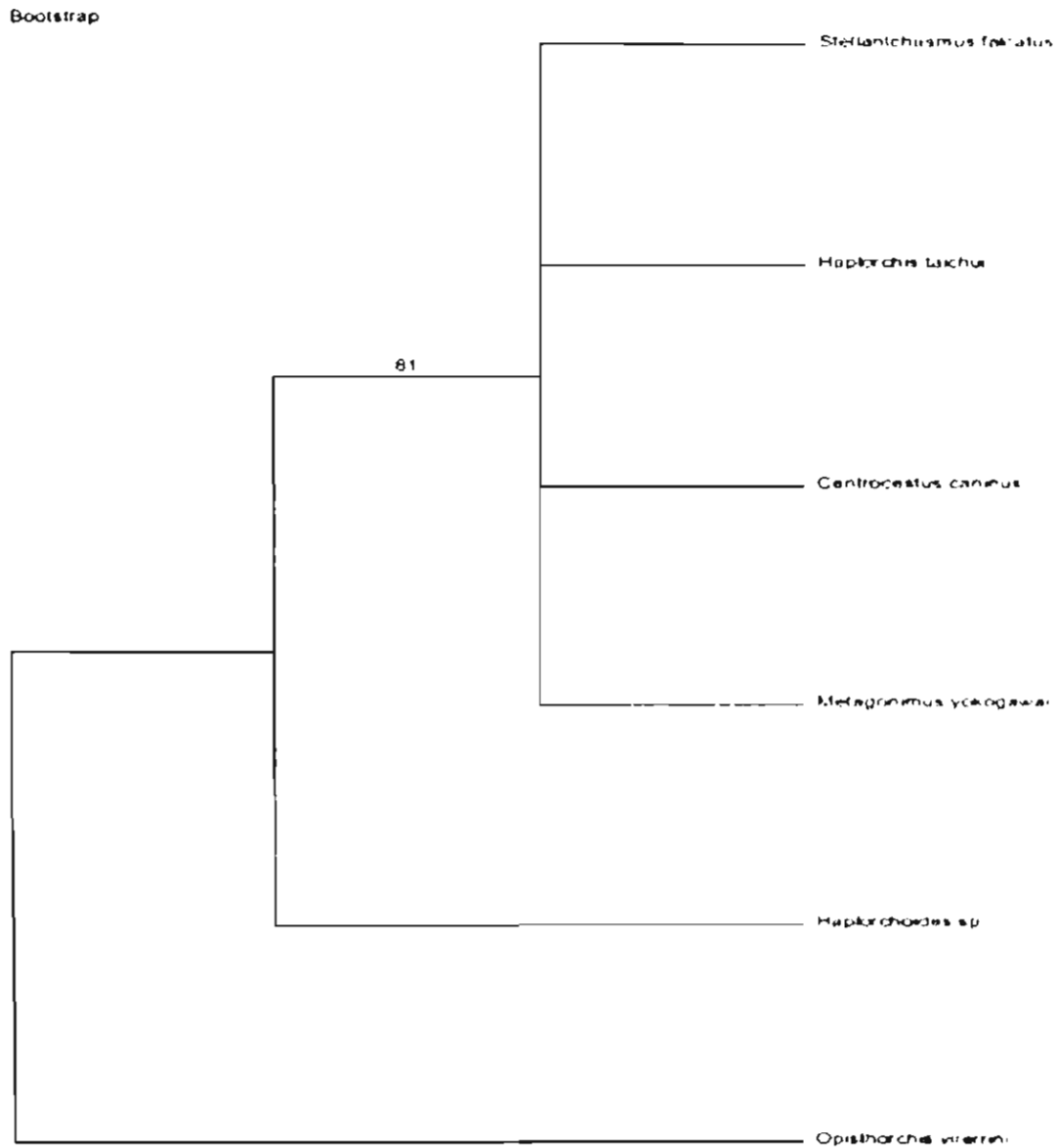
รูป 5 แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เลือกจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ *S. falcatus* จากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR โดย primer OPA-08



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

Data analysis

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



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

จ. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

M. yokogawai อยู่ใน subfamily Haplorchiinae ส่วน *C. caninus* อยู่ใน subfamily Centrocestinae (Yamaguti, 1958) ซึ่งทั้ง 4 ชนิดนี้มีรายงานสามารถติดต่อกันได้ โดย *S. falcatus*, *H. taichui* และ *C. caninus* มีรายงานการพบในคนในประเทศไทย (Kliks and Tantachamrun, 1974; Tantachamrun and Kliks, 1978; Radomyos *et al.*, 1990, 1994, 1998; Waikagul *et al.*, 1997) ส่วน *Haplorchoides* sp. ซึ่งอยู่ในกลุ่มถัดออกมายังเป็นที่ยกเถียงกันอยู่ในการจัดจำแนกตามอนุกรมวิธาน โดย Chen (1949) ได้ตั้ง genus นี้ขึ้นและจัดให้อยู่ใน subfamily Haplorchiinae ถัดมาได้ย้ายไปอยู่ใน family Gryptogomimidae (Yamaguti, 1958) เนื่องจากพบตัวเต็มวัยในปลาซึ่งต่างจากชนิดอื่นที่พบตัวเต็มวัยในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ต่อมาได้ย้ายกลับเข้าไปอยู่ใน subfamily Haplorchiinae อีกครั้ง (Pearson, 1964) ซึ่งจากความสัมพันธ์ที่ได้ในครั้งนี้น่าสอดคล้องกับการจัดจำแนกของ Yamaguti (1958) กล่าวคือ *Haplorchoides* sp. น่าจะแยกออกจาก subfamily Haplorchiinae

การตรวจวินิจฉัยโรคของพยาธิใบไม้ *S. falcatus* ทำได้โดยการตรวจอุจจาระเพื่อหาไข่ของพยาธิ โดยต้องแยกความแตกต่างจากไข่พยาธิชนิดอื่นรวมทั้งพยาธิในวงศ์เดียวกัน (Heterophyidae) ซึ่งทำได้ยากเพราะไข่ของพยาธิใบไม้กลุ่มนี้มีขนาดเล็กและลักษณะคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ไข่ของพยาธิกลุ่มนี้ยังคล้ายกับไข่ของพยาธิใบไม้ในตับ *O. viverrini* ซึ่งอาจต้องใช้เวลาและเกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยได้ง่าย จึงต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ในการจัดจำแนก (Radomyos *et al.*, 1984; Maleewong *et al.*, 2003) ดังนั้นเพื่อความแม่นยำจึงต้องตรวจหาตัวเต็มวัยอีกครั้งภายหลังจากการให้ยาฆ่าพยาธิและยาถ่าย (Manning *et al.*, 1971) Tesana (1991) นำเอากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมาช่วยในการจำแนกไข่ของพยาธิ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีการตรวจหาพยาธิโดยใช้ DNA primers เป็นวิธีได้แม่นยำและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน มีการพัฒนา primer ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับพยาธิชนิดนั้นๆ วิธีนี้มีความไวมากกว่าการตรวจหาพยาธิด้วยเทคนิค stool culture (Verweij *et al.*, 2001) เหมาะสำหรับการศึกษาการระบาดของพยาธิในประชากร ติดตามการติดเชื้อพยาธิในแต่ละฤดูและภายหลังการรักษา นอกเหนือจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิกับโฮสต์ (host-parasite interactions) ทั้งในโฮสต์ถาวร (definitive host) และโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host) (Peyerl-Hoffmann *et al.*, 2001) อีกทั้งยังนำไปใช้ตรวจการติดเชื้อในโฮสต์กึ่งกลาง เช่น ตรวจหาตัวอ่อนระยะ cercaria ในหอยหรือระยะ metacercaria ในปลา เพราะการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้เวลาและแรงงานมาก อาจเกิดความผิดพลาดได้ถ้าพบการติดเชื้อร่วมกับพยาธิชนิดอื่นแม้จะตรวจโดยผู้เชี่ยวชาญก็ตาม และอาจพบการติดเชื้อต่ำกว่าที่ควรจะเป็นในหอยถ้าตรวจด้วยวิธี shedding method (Maleewong *et al.*, 2003)

จ. เอกสารอ้างอิง

- Africa C.M., Garcia E.Y. 1935. Heterophyid trematodes from man and dogs in the Philippines with description of three new species. *Phil. J. Sci.*, 57, 253-267.
- Africa C.M., de Leon W., Garcia E.Y. 1940. Visceral complications in intestinal heterophyidiasis of man. *Acta Med. Philipina*, 1, 1-132.
- Allsopp B., Carrington M., Baylis H., Sohal S., Dolan T., Iams K. 1989. Improved characterization of *Theileria parva* isolates using the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 35, 137-148.
- Anuntalabhochai S, Chiangda J, Chundet R, Apavat P. 2000. Genetic diversity within *Lychee* (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. International Symposium on Tropical and Subtropical fruits. 26th Nov – 1st Dec. Cairns, Australia.
- Chai J.Y., Sohn W.M. 1988. Identification of *Stellantchasmus falcatus* metacercariae encysted in mullets in Korea. *Korean J. Parasit.*, 26(1), 65-68.
- Chen H.T. 1949. Systematic consideration of some heterophyid trematodes in the subfamilies Haplorchinae and Stellantchasmae. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 43, 304-312.
- Delves C.J., Goman M., Ridley R.G., Matile H., Lenson T.H.W, Ponnudurai T., Scaife J.G. 1989. Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes using a probe containing repetitive DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 32, 105-112.
- Ditrich O., Scholz T., Giboda M. 1990. Occurrence of some medically important flukes (Trematoda : Opisthorchiidae and Heterophyidae) in Nam Ngum Water Reservoir, Laos. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 21(3), 482-488.
- Harnett W., Chambers A.E., Renz A.R., Parkhouse R.M.E. 1989. An oligonucleotide probe specific for *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 35,119-126.
- Kliks M., Tantachamrun T. 1974. Heterophyid (trematoda) parasites of cats in North Thailand, with notes on a human case found at necropsy. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 5(4), 547-555.
- Komiya Y., Suzuki N. 1966. The metacercariae of trematodes belonging to the family Heterophyidae from Japan and Adjacent Countries. *Jpn. J. Parasitol.*, 15, 208-214.
- Maleewong W., Intapan P.M., Wongkham C., et al. 2003. Detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infection bithynid snails and cyprinoid fishes by a PCR-based method. *Parasitology*, 126, 63-67.

- Manning G.S., Lertprasert P., Watanasirmit K., Chetty C. 1971. A description of newly discovered intestinal parasites endemic to northeastern Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.*, 54, 466-475.
- Martin W.E. 1958. The life histories of some Hawaiian heterophyid trematodes. *J. Parasitol.*, 44, 305-323.
- Noda K. 1959. The larval development of *Stellantchasmus falcatus* (Trematoda : Heterophyidae) in the first intermediate host. *J. Parasitol.*, 45, 635-642.
- Pearson J.C. 1964. A revision of the subfamily Haplorchinae Looss, 1988 (Trematoda : Heterophyidae). *Parasitol.*, 54, 601-676.
- Pearson J.C., Ow-Yang C.K. 1982. New species of *Haplorchis* from Southeast Asia, together with keys to the *Haplorchis*-group of heterophyid trematodes of the region. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 13(1), 35-60.
- Peyerl-Hoffmann G., Jelinek T., Kilian A., Kabagambe G., Metzger W.G., von Sonnenburg F. 2001. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Tropical Medicine and International Health*, 6(8), 607-613.
- Radomyos B., Wonsaraj T., Wilairatana P., *et al.* 1998. Ophistorchiasis and intestinal fluke infections in northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 29(1), 123-127.
- Radomyos P., Bunnag D., Harinasuta T. 1984. Worms recovered in stools following parziquatel treatment. *Azneim Fosch*, 34, 1215-1217.
- Radomyos P., Charoenlarp P., Radomyos B., Tungtrongchitr A. 1990. Two human cases of *Stellantchasmus falcatus* (Trematode, Heterophyidae) infection in Northeastern Thailand. *Jpn. J. Parasitol.*, 39(1), 7-11.
- Radomyos P., Radomyos B., Tungtrongchitr A. 1994. Multi-infection with helminths in adults from northeast Thailand as determined by post-treatment fecal examination of adult worms. *Trop. Med. Parasitol.*, 45, 133-135.
- Tantachamrun T., Kliks M. 1978. Heterophyid infection in human ileum: report of three cases. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 9, 228-231.
- Tesana S., Srisawangwonk T., Kaewkes S., Sithithaworn P., Kanla P., Arunyanart C. 1991. Eggshell morphology of the small eggs of human trematodes in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 22(4), 631-636.

- Vazquez-Colet A., Africa C.M. 1940. Morphological studies on various Philippine heterophyid metacercariae with note on the incidence, site and degree of metacercarial infection on three species of marine fish. *Phil. J. Sci.*, 72,395-419.
- Verweij J.J., Pit D.S.S., van Lieshout L., *et al.* 2001. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. *Tropical Medicine and International Health*, 6(9), 726-731.
- Waikagul J., Wongsaroj T., Radomyos P., Meesomboon V., Praewanich R., Jongsuksuntikul P. 1997. Human infection of *Centrocestus caninus* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 28, 831-5.
- Walker T.K., Rollinson D., Simpson A.J.G. 1989. A DNA probe from *Schistosoma mansoni* allows rapid determination of the sex of larval parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 33, 93-100.
- Wongratanacheewin S., Pumidonming W., Sermswan R.W., Maleewong W. 2001. Development of a PCR-based method for the detection of *Ophisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. *Parasitol.*, 122, 175-180.
- Yamaguti S. 1958. *Systema Helminthum*. Vol. I. The digenetic Trematodes of Vertebrates. New York, Interscience Publishers. 979 pp.
- Yu J.R., Chung J.S., Chai J.Y. 1997a. Different RAPD patterns between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus* Miyata type. *Korean J. Parasit.*, 35(4), 295-298.
- Yu J.R., Chung J.S., Huh S., Lee S.H., Chai J.Y. 1997b. PCR-RFLP patterns of three kinds of *Metagonimus* in Korea. *Korean J. Parasit.*, 35(4), 271-276.

ช. Output ที่ได้จากโครงการ

ประโยชน์ที่ได้รับการวิจัย

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ของ *S. falcatu*s เมื่อเปรียบเทียบกับพยาธิชนิดใกล้เคียงจากเทคนิค HAT-RAPD จะช่วยงานในด้านอนุกรมวิธาน และ DNA primers ที่จำเพาะสำหรับ *S. falcatu*s จะเป็นวิธีที่เป็นประโยชน์ในด้านการติดตามการติดเชื้อโดยพยาธิชนิดนี้ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการระบาดของพยาธิในประชากร ติดตามการติดเชื้อพยาธิในแต่ละฤดูและภายหลังการรักษา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิกับโฮสต์ (host-parasite interactions) ทั้งในโฮสต์ถาวร (definitive host) และโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host) อีกทั้งยังนำไปใช้ตรวจการติดเชื้อในโฮสต์กึ่งกลาง เช่น ตรวจหาคออีอีอีระยะ cercaria ในหอยหรือระยะ metacercaria ในปลา

การตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ

กำลังเตรียมบทความในเรื่อง Development of high annealing temperature RAPD technique for the identification of *Stellantchasmus falcatu*s เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Experimental Parasitology, International Journal for Parasitology, Journal of Parasitology หรือ Parasitology (ภาคผนวก)

การเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

ได้นำเสนอผลงานเรื่อง Development of high annealing temperature RAPD technique for the identification of *Stellantchasmus falcatu*s ในงานประชุม The 4th Seminar on Food-Borne Parasitic Zoonoses; Joint International Tropical Medicine Meeting 2003 ในระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2546 ณ โรงแรม Siam City Hotel กรุงเทพฯ

ภาคผนวก

DEVELOPMENT OF HIGH ANNEALING TEMPERATURE RAPD
TECHNIQUE FOR THE IDENTIFICATION OF *STELLANTCHASMUS*
FALCATUS

P Sripalwit¹, C Wongsawad¹, JY Chai², P Wongsawad¹, S Anuntalabhochai¹

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50202, Thailand; ²Department of Parasitology, Seoul National University College of Medicine, and Institute of Endemic Diseases, Seoul National University Medical Research Center, Seoul 110-799, Korea

Abstract

Genomic DNA from four heterophyid flukes (*Stellantchasmus falcatus*, *Haplorchis taichui*, *Centrocestus caninus* and *Metagonimus yokogawai*) and two other flukes (*Haplorchoides* sp. and *Opisthorchis viverrini*) were amplified by the high annealing temperature random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. Out of 20 random 10-mer oligonucleotide primers (Operon Technologies Inc.), 19 primers produced DNA polymorphism among those genomic DNAs. A unique of 382 bp band generated by the OPA-08 primer (GTGACGTAGG) was found in HAT-RAPD pattern of *S. falcatus*. Subsequently, this band was excised and sequenced. Based on sequence data, a pair of specific primers was designed to identify *S. falcatus*; SFF1 (5'-GTGACGTAGGACCTTAAAACAG-3') and SFR (5'-GTGACGTAGGTAGCCCAGGTAGCGCGTT-3'). These two specific primers designed here gave PCR-positive to *S. falcatus* whereas the other five species of

adults tested (*H. taichui*, *C. caninus*, *M. yakogawai*, *Haplorchoides* sp. and *O. viverrini*) were repeatedly PCR-negative.

Introduction

In Thailand, the heterophyid flukes and opisthorchiid fluke (*Opisthorchis viverrini*) are the common trematodes infecting humans (Jongsuksuntigul and Imsomboon, 1997, 1998; Waikagul, 1998). The infection rate and density of *O. viverrini* metacercariae in fish decreased markedly during the last ten years due to the National Liver Fluke Control Program (Jongsuksuntigul and Imsomboon, 1997, 1998; Waikagul, 1998). On the other hand, the prevalence of heterophyid metacercariae in fishes tended to increase, also with increase of the prevalence in humans (Radomyos *et al.*, 1998). Recent fish surveys in several areas in the northern Thailand revealed that most trematode metacercariae were heterophyid flukes (Waikagul, 1998; Sukontason *et al.*, 1999; Mard-arhin *et al.*, 2001; Saenphet *et al.*, 2001). *S. falcatus* is one of the heterophyid flukes that were reported in humans in the northern and northeastern Thailand (Kliks and Tantachamrun, 1974; Tantachamrun and Kliks, 1978; Radomyos *et al.*, 1998). Kliks and Tantachamrun (1974) initially reported a case of *S. falcatus* infection found at necropsy in Chiang Mai Province, and later added three more cases from surgical sections of the ileum (Tantachamrun and Kliks, 1978). *S. falcatus* infection was also reported in two cases from Skol Nakorn and Yasothorn Provinces, northeastern Thailand, obtaining adult worms after praziquantel treatment (Radomyos *et al.*, 1990). Radomyos *et al.* (1994) added one male and one female from northeastern Thailand infected with *S. falcatus*. A recent survey found *S. falcatus* infection in a human residing in Phayao Province (Radomyos

et al., 1998). *S. falcatus*, like other heterophyid flukes such as *Haplorchis* spp., has been reported as causing intestinal irritation accompanied by colicky pain and mucous diarrhea, with production of excess mucus and superficial necrosis of the mucous coat (Beaver *et al.*, 1984). However, some of heterophyid flukes perhaps wander in the deep layers of the intestinal wall, become imprisoned and die. Their eggs that degenerate are taken up by the lymphatic or blood circulation and are carried to various organs of the body, including the brain, heart and spinal cord. The cardiac, brain and spinal cord lesions were also recorded (Africa *et al.*, 1935, 1936, 1937).

The life cycle of *S. falcatus* is complex involving 2 intermediate hosts (snails and fishes) and 1 definitive host (human and other fish-eating mammals). From parasitological surveys in study area, 11.5% of snails were estimated to be infected, while up to 39-100% of fishes may contain metacercariae (Tantachamrun and Kliks, 1978; Saenphet *et al.*, 2001; Panyaarj, 2003; Sripalwit *et al.*, 2003) However, the parasitological technique is only reliable when the intensity of infection is high and when the procedure is performed by experienced laboratory personnel. In addition, the microscopy examinations for the presence of cercariae in snails or metacercariae in fishes are laborious and time consuming. Even experienced personnel can make a false positive diagnosis if the intermediate hosts are concomitantly infected with other trematodes. In order to identify the larval stages, mature worms are required. We have sought to develop a reliable technique for determining the presence of *S. falcatus* in infection snails, fishes or human, one that is based exclusively on PCR methodology. Recently, PCR-based techniques have been applied to classify and identify several parasitic species (Walker *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1997). Since High Annealing Temperature – Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique, which modified from RAPD technique, provides polymorphism and reproducibility at

low cost (Anuntalabhochai *et al.*, 2000), this technique is considered classification and identification the trematodes from the larval stages. The technique could prove to be of practical diagnostic value for those interested in checking for *S. falcatus* contamination in snail, fish or human and is well suited for epidemiological surveys.

Materials and Methods

Parasitic materials

Metacercariae of *S. falcatus*, *Haplorchis taichui*, *Centrocestus caninus* were collected from half-beaked fish (*Dermogenus pusillus*), Jullien's mud carp (*Henicorhynchus siamensis*) and goldfish (*Carassius auratus*), respectively, in Chiang Mai and Bangkok provinces. These adult parasites were obtained by orally force fed to mice (*Mus musculus*) or to chick (*Gallus gallus domesticus*) with metacercariae.

Adults of *Metagonimus yokogawai* were obtained from Prof. Jong-Yil Chai, Department of Parasitology and Tropical Medicine, College of Medicine, Seoul Nation University, Korea.

Adults of *Haplorchoides* sp. were gathered from yellow mystus (*Hemibagrus filamentus*) from Doi Tao reservoir, Chiang Mai province.

Adults of *Opisthorchis viverrini* were provided by Assoc. Prof. Paiboon Sithithaworn, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

DNA extraction

Each specimen was placed in a 1.5 ml microcentrifuge tube and followed by extraction using the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). The DNA was eluted in 5 mM Tris-HCl, pH 8.5 and 1 µl was used in the PCR reaction.

HAT-RAPD Reaction

Twenty decamer oligonucleotide primers Kit A (Operon Technologies Inc., California) were screened by polymerase chain reaction (PCR). PCR reactions were performed by using a 20 µl mixture, containing sample DNA (10-25 ng), 1 x QIAGEN PCR buffer, 100 µM of each dNTP, 40 ng of each primer and 0.5 units of *Taq* DNA polymerase. For DNA amplification, the PCR thermocycler (Perkin Elmer: Gene Amp System 2400) was programmed as follows: incubation at 94°C for 5 min; 30 cycles at 94°C for 45 sec, 48°C for 45 sec, 72°C for 1 min, followed by one final extension cycle of 7 min at 72°C. The amplification products were separated by electrophoresis in 1.4% (w/v) agarose gels with 1 x TBE buffer, stained by 0.5 µg/ml of ethidium bromide (EtBr) and photographed under exposure to UV light.

Screening fragments

The selected PCR fragments of *S. falcatus* were isolated from agarose gel by MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) and cloned in the pGEM-T easy vector (Promega) according to the supplier's instructions. One clone was then sequenced using T7 primer.

Specificity of the designed primers

The design of oligonucleotides SFF1 and SFR1 were based on the sequence of selected fragment from above. For specificity of the detection, 10-25 ng of genomic DNAs from *H. taichui*, *C. caninus*, *M. yokogawai*, *Haplorchoides* sp. and *O. viverrini* were use in PCR.

Data analysis

Amplified HAT-RAPD markers were scored as present (1) or absent (0) for each sample. Ambiguous bands that could not be easily distinguished were not scored (Williams *et al.*, 1990). The similarity of samples was calculated as follow: Similarity = $2 N_{AB}/N_A+N_B$, N_{AB} is the number of bands shared by individuals A and B, N_A and N_B are the number of bands in individuals A and B, respectively (Chapco *et al.*, 1992; Wilde *et al.*, 1992). Phylogenetic relationships among 6 species were analyzed using parsimony method and bootstrap analysis in the PAUP program (version 4.0b10).

Results

HAT-RAPD fingerprints

The HAT-RAPD technique produces very different genetic profiles among 6 species with all tested primers except OPA-05 (Table 1). Most of the differences among the genetic profiles of these species were provided by primers OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-13 and OPA-18 (Fig. 1). In total, HAT-RAPD had generated 354 genetic markers of which only 0.56% was shared by the six species studied. The primers OPA-01, OPA02, OPA-03, OPA-07, OPA-08, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPA-16 and OPA-18 separated *S. falcatus* from other studies specices. The

most polymorphic genetic profiles for *S. falcatus* were generated by the following primers, OPA-01 with 3 of the 22 fragments amplified being polymorphic, OPA-03 with 3 of the 19 amplified, OPA-07 with 3 of the 24 amplified and OPA-18 with three out of the 25. With primer OPA-08, a single 382 bp fragment was amplified for *S. falcatus*.

Development and specificity of the designed primers

In order to develop specific primers for detection of *S. falcatus*, the nucleotide sequence of the 382 bp fragment was obtained (Fig. 2). Based on sequence data, the designed primers for *S. falcatus* were SFF1 (5'-GTGACGTAGGACCTTAAACAG-3') and SFR1 (5'-GTGACGTAGGTAGCCCAGGTAGCGCGTT-3'). When the primer pair SFF1/SFR1 was used, which was designed to amplify a 382 bp target sequence in the genome of *S. falcatus*, the appropriate PCR product was only generated in *S. falcatus*, not in the five species of adults tested (*H. taichui*, *C. caninus*, *M. yakogawai*, *Haplorchoides* sp. and *O. viverrini*).

Data analysis

The results obtained with the HAT-RAPD data were consistent with the separation of species. The similarity between *S. falcatus* and *H. taichui*, *C. caninus*, *M. yakogawai*, *Haplorchoides* sp. and *O. viverrini* were 0.269, 0.240, 0.179, 0.140 and 0.168, respectively (Table 2). The phylogenetic tree was constructed using the parsimony method with *O. viverrini* as outgroup. The evolutionary relationships obtained with the HAT-RAPD data are shown in Fig. 4. The trees grouped the heterophyid fluke together and placed *Haplorchoides* sp. and *O. viverrini* outside the group. This clustering was supported by 80% of bootstrap replicas.

Discussion

Among the twenty primers screened, 19 primers produces very different genetic profiles among 6 species studied, whereas OPA-05 was not able to amplify PCR product. Of these primers, the primers OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-13 and OPA-18 yielded the best product for HAT-RAPD analysis. In total, HAT-RAPD had generated 354 genetic markers varied in size ranging from 185 to 5,200 bp. Among *S. falcatus*, *H. taichui*, *C. caninus*, *M. yakogawai*, *Haplorchoides* sp. and *O. viverrini*, 77, 109, 98, 79, 95 and 101 HAT-RAPD markers were revealed, with 21, 40, 33, 28, 39 and 42 of specific markers for each species, respectively. The sources of polymorphism in RAPD assay may include base change within priming site sequence, deletions of priming site, insertions that render priming sites too distant to support amplification, and deletions or insertions that change the size of a DNA fragment without preventing its amplification (Williams *et al.*, 1990). The differences in RAPD profiles are determined by a competition between potential priming sites in genomic DNA rather than by the total number of priming sites available (Rafalski *et al.*, 1991)

The consensus tree generated with the HAT-RAPD data separated the six species studied into two major clusters with the species *O. viverrini* as outgroup. For the first cluster, the heterophyid flukes were grouped together with supported by 80% of bootstrap replicas. For the second cluster, member was *Haplorchoides* sp. The Within the heterophyid species, *S. falcatus* and *H. taichui* (0.269) was more similar than (0.240) whereas *S. falcatus* and *M. yokogawai* (0.179) was less similar than *S. falcatus* and *C. caninus*. The similarity between *M. yokogawai* and *C. caninus* (0.237) was smaller than between *H. taichui* and *C. caninus* (0.280). Moreover, it was unexpected the similarity between *S. falcatus* and *O. viverrini* (0.168) and between

C. caninus and *O. viverrini* (0.181) were higher than between *S. falcatus* and *Haplorchoides* sp. (0.140) and between *C. caninus* and *Haplorchoides* sp. (0.166), respectively. It indicated that *S. falcatus* and *C. caninus* were more similar with *O. viverrini* than *Haplorchoides* sp. The phenomena could not be explained well and might be due to the confusion of the classification of the genus *Haplorchoides* which has still not cleared. Chen (1949) Genus *Haplorchoides* was erected and place by in the subfamily Haplorchinae, family Heterophyidae. Chatterji (1953) took the retrograde step of considering it as a synonym of *Haplorchis*, while Yamaguti (1958) removed it from the Haplorchinae and placed it in the family Cryptogonimidae. Pearson (1964) returned it to the family Heterophyidae. So the heterophyid flukes should similar with *Haplorchoides* sp. than *O. viverrini* which more different families. However, these heterophyid flukes and *O. viverrini* have reported in human whereas *Haplorchoides* occurred in fish, rather than birds or mammals (Pearson, 1964; Waikagul *et al.*, 1997; Radomyos *et al.*, 1998; Chai and Lee, 2002).

The PCR-based method has been successfully used for the detection of digenean flukes e.g. *Schistosoma mansoni* in Biomphalaria (Hlanelt *et al.*, 1997), *S. mansoni* in water (Hamburger *et al.*, 1998), *Flasiola hepatica* in intermediate hosts (Rognlie *et al.*, 1994) and *O. viverrini* in experimentally infected hamsters, bithynid snails and cyprinoid fishes (Wongratanacheewin *et al.*, 2001; Maleewong *et al.*, 2003) This report describes the first use of a PCR-based technique for the detection of *S. falcatus*. Pertaining to the specificity of the procedure, we have shown that the primers did not amplify the 382 bp band when DNA from other digenean flukes belonging to same family or different families than *S. falcatus* were used. Our specific PCR could be used for distinguishing *S. falcatus* from those other flukes that are common causes of human infection in Thailand i.e. *C. caninus*, *H. taichui* and

O. viverrini. There are several advantages of the method over the conventional parasitological method. First, it is highly sensitive which is suitable for diagnosis of the light infection that might otherwise give false negatives by a microscopical method. Comparison of results obtained with stool culture and PCR show that the prevalence derived from stool culture is considerably underestimated (Verweij *et al.*, 2001). Secondly, it can be used with large number of samples at one time, and results can be obtained within one day. Thirdly, it is independent of the subjective bias sometimes encountered in microscopical examinations and avoids confusion with other flukes. Fourthly, it may be further modified for detection of the parasite in the intermediate hosts (Rognlie *et al.*, 1994; Hanelt *et al.*, 1997; Wongratanacheewin *et al.*, 2001; Maleewong *et al.*, 2003). Fifthly, the method also offers a potential means of monitoring the effectiveness of drug treatment (Wongratanacheewin *et al.*, 2001). Last, it offered new possibilities to get a deeper understanding of host-parasite interactions and the biology of the parasite population (Peyerl-Hoffmann *et al.*, 2001).

In conclusion, a specific PCR method for detection of *S. falcatulus* has been developed. It is suitable for specific diagnosis, epidemiological studies, monitoring the drug treatment and host-parasite interaction studies.

Acknowledgements

Financial support from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No.PHD/0192/2543 and BGJ4580020) to student's initials and advisor's initials is acknowledged. Special thanks are extended to the Parasitology Research Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University and the Applied Technology in Biodiversity Research Unit,

Institute for Science and Technology Research and Development, Chiang Mai University.

References

- Africa C.M., De Leon W., Garcia E.Y. 1935. Heterophyidiasis; II, Ova in sclerosed mitral valves with other chronic lesions in the myocardium. J. Phil. Is. Med. Assoc., 15, 583-592.
- Africa C.M., De Leon W., Garcia E.Y. 1936. Heterophyidiasis; III, Ova associated with a fatal hemorrhage in the right basal ganglia of the brain. J. Phil. Is. Med. Assoc., 16, 22-28.
- Africa C.M., De Leon W., Garcia E.Y. 1937. Heterophyidiasis; V, Ova in the spinal cord of man. Phil. J. Sci., 62, 393-399.
- Anuntalabhochai S., Chiangda J., Chundet R., Apavat P. 2000. Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. International Symposium on Tropical and Subtropical fruits. 26th Nov – 1st Dec. Cairns, Australia.
- Beaver P.C., Jung R.C., Cupp E.W. 1984. Clinical Parasitology, 9th ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 825 pp.
- Chai J.Y., Lee S.H. 2002. Food-borne intestinal trematode infection in the Republic of Korea. Parasitology International, 51, 129-154.
- Chatterji P.N. 1953. Two new heterophyid trematodes of the genus *Haplorchis* Looss, 1899. Nat. Acad. Sci. India, 23, 163-174.

- Chen H.T. 1949. Systematic consideration of some heterophyid trematodes in the subfamilies Haplorchinae and Stellantchasminae. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 43, 304-312.
- Chapco W., Ashton N.W., Martel R.K.B., Antonishyn N. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematic of grasshoppers. *Genome*, 35, 569-574.
- Gupta S.P. 1955. Trematode parasites of fresh-water fishes. *Indian J. Helminth.*, 5, 1-80.
- Hamburger J., Yu-Xin X., Ramzy R.M., Jourdane J., Ruppel A. 1998. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(3), 468-473.
- Hanelt B., Adema C.M., Mansour M.H., Loker E.S. 1997. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *J. Parasitol.*, 83, 387-394.
- Jongsuksuntigul P., Imsomboon T. 1997. The impact of a decade long opisthorchiasis control program in noreastern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 28(3), 551-557.
- Jongsuksuntigul P., Imsomboon T. 1998. Epidemiology of opisthorchiasis and national control program in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 29(2), 327-32.
- Kliks M., Tantachamrun T. 1974. Heterophyid (trematoda) parasites of cats in North Thailand, with notes on a human case found at necropsy. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 5(4), 547-555.

- Maleewong W., Intapan P.M., Wongkham C., et al. 2003. Detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected bithynid snails and cyprinoid fishes by a PCR-based method. *Parasitol.*, 126, 63-67.
- Mard-arhin N., Prawang T., Wongsawad C. 2001. Helminths of freshwater animals from five provinces in northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 32(Suppl 2), 206-209.
- Panyaarj P. 2003. Diversity of Helminths of Climbing perch (*Anabas testudineus*) from Sankumphaeng District Chiang Mai Province. B.Sc. thesis. Chiang Mai University, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai, Thailand.
- Pearson J.C. 1964. A revision of the subfamily Haplorchinae Looss, 1899 (Trematoda: Heterophyidae). *Parasitol.*, 54, 601-676.
- Peyerl-Hoffmann G., Jelinek T., Killan A., Kabagambe G., Metzger W.G., von Sonnenburg F. 2001. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Tropical Medicine and International Health*, 6(2), 607-613.
- Radomyos B., Wonsaroj T., Wilairatana P, et al. 1998. Ophistorchiasis and intestinal fluke infections in northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 29(1), 123-127.
- Radomyos P., Charoenlarp P., Radomyos B., Tungtrongchitr A. 1990. Two human cases of *Stellanchasmus falcatus* (Trematode, Heterophyidae) infection in Northeastern Thailand. *Jpn. J. Parasitol.*, 39(1), 7-11.
- Radomyos P., Radomyos B., Tungtrongchitr A. 1994. Multi-infection with helminthes in adults from northeast Thailand as determined by post-treatment fecal examination of adult worms. *Trop. Med. Parasitol.*, 45, 133-135.

- Rafalski J.A., Tingey S.V., Williams J.G.K. 1991. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *Ag. Biotech News Info.*, 3, 645-648.
- Rognlie M.C., Dimke K.I., Knapp S.E. 1994. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. *J. Parasitol.*, 80, 748-755.
- Saenphet S., Wongsawad C., Saenphet K. 2001. A survey of helminths in freshwater animals from some areas in Chiang Mai. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 32(Suppl 2), 210-213.
- Sripalwit P., Wongsawad C., Chai J.Y., Anuntalabhochai S., Rojanapaibul A. 2003. Investigation of *Stellantchasmus falcatus* metacercariae in half-beaked fish, *Dermogenus pusillus* from four districts of Chiang Mai province, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 34(2), 281-285.
- Sukontason K., Piangjai S., Muangyimpong Y., Sukontason K., Methanitikorn R., Chaithong U. 1999. Prevalence of trematode metacercariae in cyprinoid fish of Ban Pao District, Chiang Mai Province, northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 30, 365-370.
- Tantachamrun T., Kliks M. 1978. Heterophyid infection in human ileum: report of three cases. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 9, 228-231.
- Verweij J.J., Pit D.S.S., van Lieshout L. et al. 2001. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. *Tropical Medicine and International Health*, 6(9), 726-731.
- Waikagul J. 1998. *Opisthorchis viverrini* metacercariae in Thai freshwater fish. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 29, 324-326.
- Waikagul J. 1991. Intestinal fluke infections in Southeast Asia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 22(Suppl), 158-162.

- Waikagul J., Wongsaroj T., Radomyos P., Meesomboon V., Praewanich R., Jongsuksuntikul P. 1997. Human infection of *Centrocestus caninus* in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 28, 831-835.
- Walker T.K., Rollinson D., Simpson A.J.G. 1989. A DNA probe from *Schistosoma mansoni* allows rapid determination of the sex of larval parasites. Mol. Biochem. Parasitol., 33, 93-100.
- Wilde J., Waugh R., Powell W. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet., 83, 871-877.
- Williams, J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535.
- Wongratanacheewin S., Pumidonming W., Sermswan R.W., Maleewong W. 2001. Development of a PCR-based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. Parasitol., 122, 175-180.
- Yamaguti S. 1958. Systema Helminthum. Vol. I. The digenetic Trematodes of Vertebrates. New York, Interscience Publishers. 979 pp.
- Yu J.R., Chung J.S., Chai J.Y. 1997. Different RAPD patterns between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus* Miyata type. Korean J. Parasit., 35(4), 295-298.

Table 1 Nucleotide sequence of primers used for generating RAPD markers among six studied species.

Primers	Sequence 5'→3'	Number of total	Number of polymorphic Markers
OPA-01	CAGGCCCTTC	22	12
OPA-02	TGCCGAGCTG	23	17
OPA-03	AGTCAGCCAC	19	12
OPA-04	AATCGG GCTG	31	17
OPA-05	AGGGGTCTTG	0	0
OPA-06	GGTCCCTGAC	1	1
OPA-07	GAAACGGGTG	24	17
OPA-08	GTGACGTAGG	14	13
OPA-09	GGGTAACGCC	19	9
OPA-10	GTGATCGCAG	23	6
OPA-11	CAATCGCCGT	16	10
OPA-12	TCGGCGATAG	8	8
OPA-13	CAGCACCCAC	25	12
OPA-14	TCTGTGCTGG	8	8
OPA-15	TTCCGAACCC	16	10
OPA-16	AGCCAGCGAA	21	9
OPA-17	GACCGCTTGT	19	11
OPA-18	AGGTGACCGT	25	11
OPA-19	CAAACGTCGG	20	9
OPA-20	GTTGCGATCC	20	11
Total		354	203

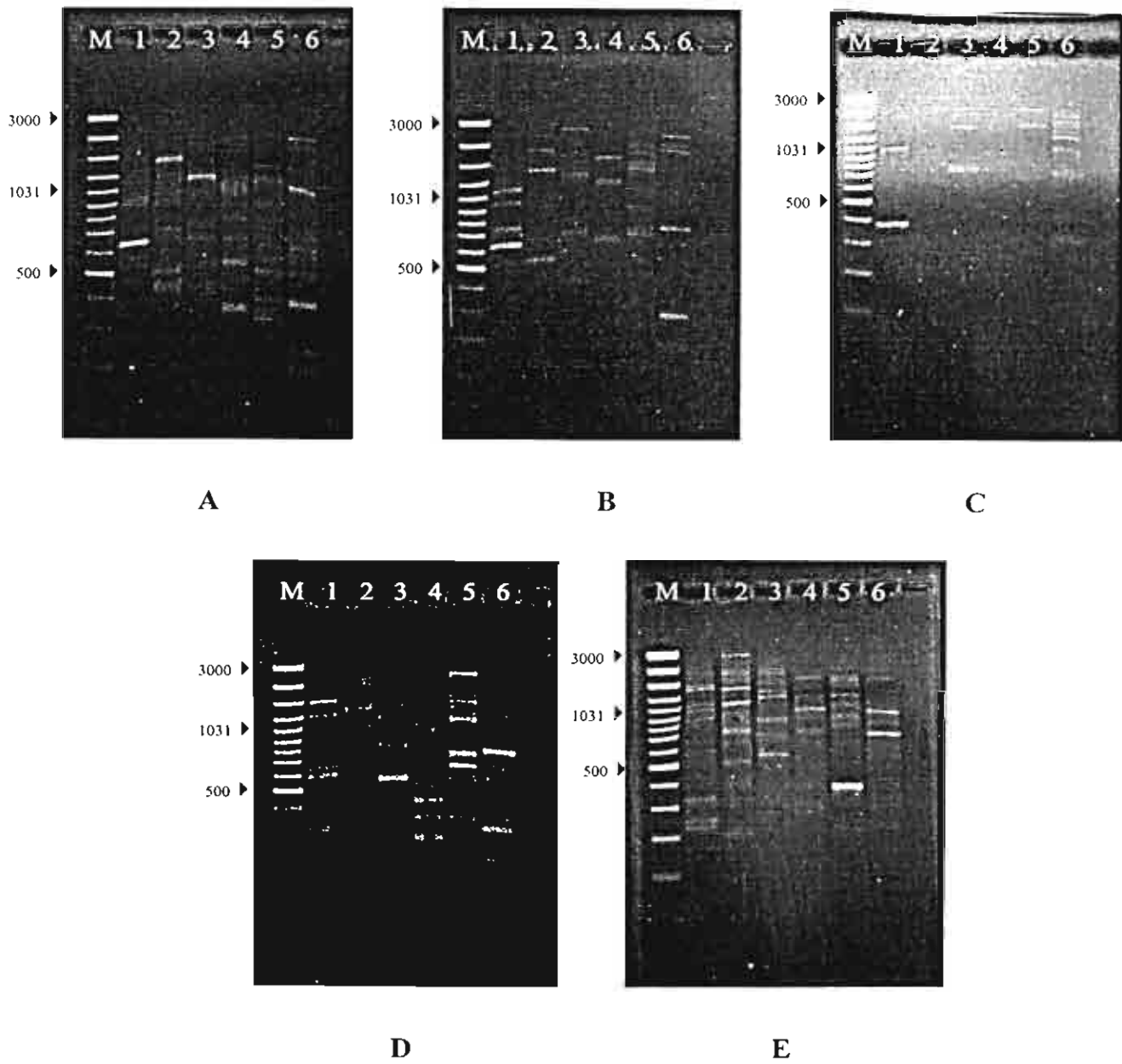


Fig. 1 HAT-RAPD fingerprints obtained with the primers OPA-04, OPA-07, OPA-08, OPA-10 and OPA-18 on six species studied; 1 corresponds to the molecular weight markers; 2 to *S. falcatus*; 3 to *H. taichui*; 4 to *C. caninus*; 5 to *M. yongogawai*; 6 to *Haplorchooides* sp.; 7 to *O. viverrini*.

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

Fig. 2 Sequence data of 382-bp band generated by the OPA-08 primer in HAT-RAPD pattern of *S. falcatus*.

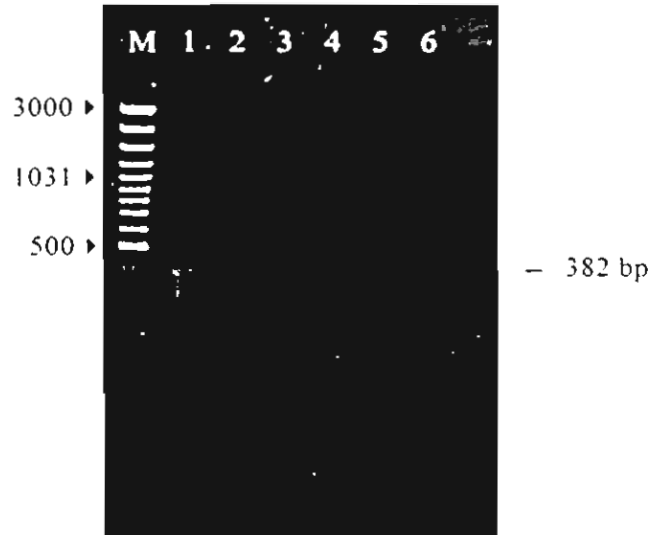


Fig 3 The fingerprints obtained with the primers SFF1 and SFR2 on six species studied. 1 corresponds to the molecular weight markers, 2 to *S. fulcatus*, 3 to *H. taichui*, 4 to *C. caninus*, 5 to *M. yugogawai*, 6 to *Haplorchoides* sp., 7 to *O. viverrini*

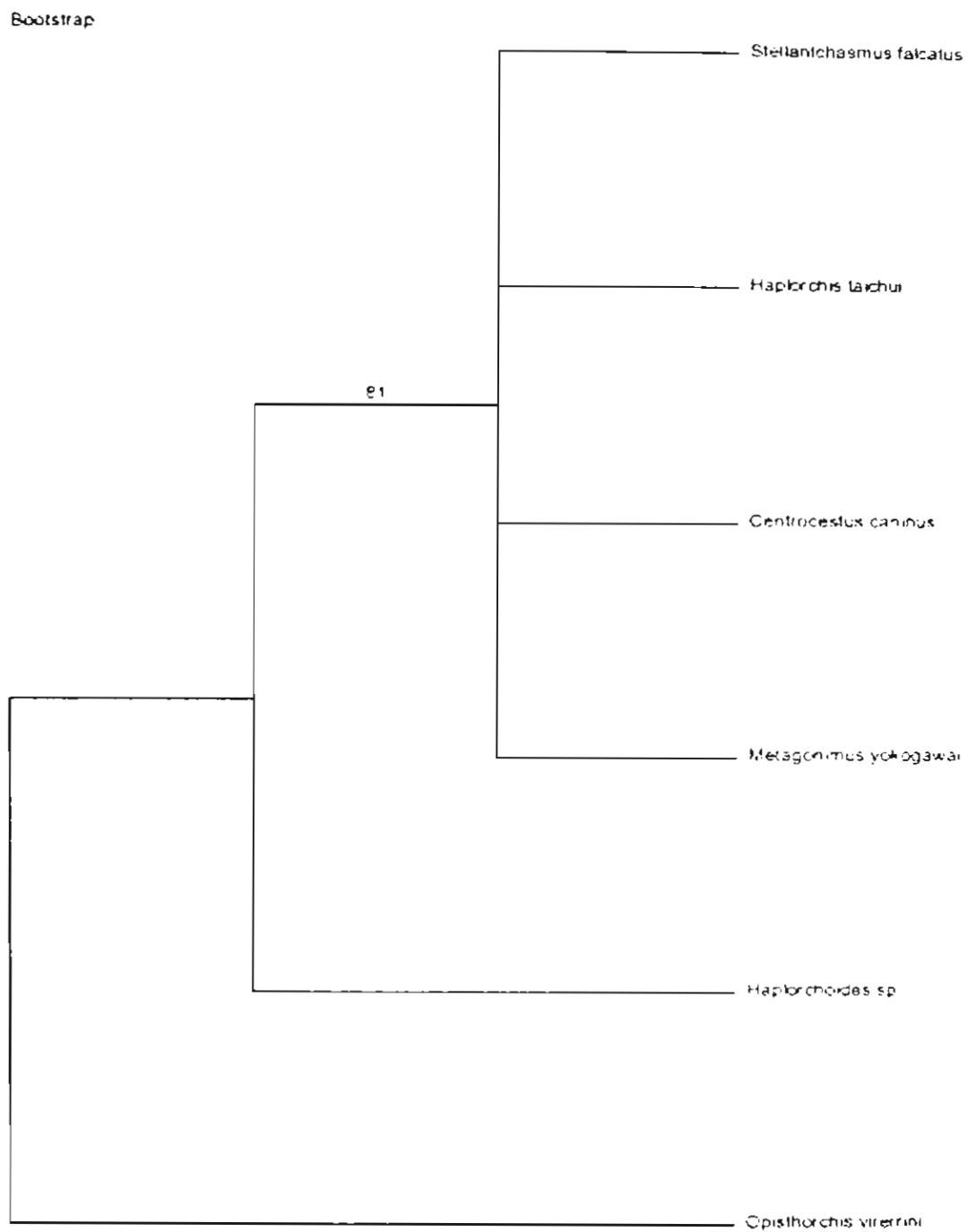


Fig. 4 Evolutionary tree (consensus tree) constructed with 354 genetic markers generated with the HAT-RAPD technique using the parsimony method. The number in each bifurcation indicates the number of times the two groups are separated in the 5000 trees constructed with bootstrap analysis with the species *O. viverrini* as an outgroup (CI = 0.704).

