

บทความวิจัย

การระบุถิ่นฐานวิทยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของ *Paragonimus paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรี

วิมลมาลย์ โสพรรณรัตน์¹ อิโรมุ ซูกิยามา² และ อัจฉริยา รั้งมิรุจิ^{1*}

บทคัดย่อ

การสำรวจในภาคสนามอย่างจริงจังนำไปสู่การค้นพบพยาธิใบไม้ปอดที่มีการบันทึกครั้งใหม่ในประเทศไทย (จังหวัดจันทบุรี) ซึ่งมีลักษณะพิเศษทางสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างอย่างชัดเจนจากพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย คือ ลักษณะของ excretory bladder มีการแตกแขนงหลายแขนง ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้สอดคล้องกับพยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus paishuihoensis* ที่มีรายงานการค้นพบในสาธารณรัฐประชาชนจีนจากการทดลองทำให้ติดเชื้อ *P. paishuihoensis* ของไทยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 2 ประเภท ได้แก่ หนู และแมว ปรากฏว่าไม่พบการติดเชื้อในหนู ส่วนในแมวพบการติดเชื้อและได้พยาธิในระยะ immature จำนวน 6 ตัว ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในครั้งนี้นี้กับ *P. paishuihoensis* ที่พบในมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่าพยาธิใบไม้ปอดทั้งสองกลุ่มมีความเหมือนกันสูงถึง 99.18% และ 97.09% ตามลำดับ ดังนั้นจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุลทำให้สามารถยืนยันการค้นพบ *P. paishuihoensis* ของไทย นอกจากนี้ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบในประเทศไทยพบว่า *P. paishuihoensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพยาธิใบไม้ปอดในกลุ่ม *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai*

คำสำคัญ: พยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus paishuihoensis* ITS2 COI ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: achariya@swu.ac.th

Morphological and Molecular Characterization of *Paragonimus paishuihoensis* from Chanthaburi Province

Wimonmarn Sopunnarat¹, Hiromu Sugiyama² and Achariya Rangsiruji^{1*}

ABSTRACT

Extensive field surveys have led to a finding of a lung fluke species as a new record in Thailand (Chanthaburi Province). This lung fluke possesses a distinguished morphological characteristic, *i.e.* a dendritic excretory bladder which is remarkably different from other lung flukes previously reported in Thailand. This characteristic is conforming with that of *Paragonimus paishuihoensis* which occurs in China. Experimental infections of these Thai *P. paishuihoensis* specimens were carried out using two types of mammalian host which were rats and cat. The results revealed no infection in the rats but a positive infection in the cat with six immature flukes obtained. Pairwise comparison of ITS2 as well as partial COI nucleotide sequences between *Paragonimus* found in this study and *P. paishuihoensis* from Yunnan Province, China showed high similarities of 99.18% and 97.09%, respectively. Therefore, based on the nucleotide sequence data the identity of Thai *P. paishuihoensis* has been confirmed. In addition, resulting molecular phylogenies using the ITS2 and partial COI nucleotide sequences among *P. paishuihoensis* and other Thai *Paragonimus* species illustrated a close relationship between *P. paishuihoensis* and a group of *P. bangkokensis* and *P. harinasutai*.

Keywords: lung fluke, *Paragonimus paishuihoensis*, ITS2, COI, phylogenetics

¹Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

²Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

*Corresponding author, e-mail: achariya@swu.ac.th

บทนำ

พยาธิใบไม้ปอด (*Paragonimus*) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ปอด (paragonimiasis) ซึ่งมีอาการคล้ายวัณโรค คือ ไอเรื้อรังและมีเสมหะปนออกมากับเสมหะ มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถติดเชื้อได้โดยการกินปูหรือกุ้งน้ำจืดที่ดิบหรือปรุงไม่สุก โดยสัตว์เหล่านี้จะเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองที่มีพยาธิระยะติดต่อเมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) [1]

ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดมากกว่า 40 สปีชีส์ [2] โดยส่วนใหญ่ (ประมาณ 30 สปีชีส์) ถูกค้นพบในประเทศจีน [3] ส่วนในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบพยาธิใบไม้ปอดแล้ว 7 สปีชีส์ ได้แก่ *P. westermani*, *P. macrorchis*, *P. heterotremus*, *P. siamensis*, *P. bangkokensis*, *P. harinasutai* [4] และ *P. pseudoheterotremus* [5] โดยมีเพียงหนึ่งสปีชีส์ คือ *P. heterotremus* ที่มีรายงานการระบาดในผู้ป่วยไทย [6]

การแยกสปีชีส์ของพยาธิใบไม้ปอดส่วนใหญ่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพยาธิตัวเต็มวัย เช่น ลักษณะของหนามที่ผิวลำตัว (cuticular spine) ลักษณะและขนาดของรังไข่กับอวัยวะ การเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง oral sucker และ ventral sucker นอกจากนี้อาจจะจำแนกโดยใช้ลักษณะของเมตาเซอร์คาเรีย เช่น รูปร่างและลักษณะของซิสต์ จำนวนชั้นและความหนาของผนังซิสต์ [7] อย่างไรก็ตาม สำหรับการระบุความแตกต่างและการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกหนอนตัวแบน (trematode) นั้น การใช้วิธีการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจให้ผลที่ไม่แม่นยำ เนื่องจากลักษณะภายนอกที่เด่นชัดอาจมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นในปัจจุบันจึงนำวิธีการศึกษาในระดับโมเลกุลมาช่วยยืนยันการจัดหมวดหมู่สิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น การศึกษา *P. pseudoheterotremus* [8] และการศึกษา *P. westermani* และ *P. siamensis* ในประเทศศรีลังกา [9] เป็นต้น

การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA บริเวณที่ต้องการร่วมกับเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของ PCR product เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอด โดยนิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear ribosomal DNA (nrDNA) ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่มีหน่วยซ้ำ (repeating unit) ประมาณ 5,000 ซ้ำ โดยแต่ละหน่วยซ้ำมีส่วนที่เป็นยีน (coding region) ได้แก่ 18S, 5.8S, และ 28S rDNA และส่วนที่เป็น non-coding region ได้แก่ บริเวณ ITS1 ซึ่งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S และบริเวณ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่างยีน 5.8S และ 28S [10]

นอกจากนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดยังนิยมใช้ยีนในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากภายในเซลล์มีจำนวนชุดของไมโทคอนเดรียค่อนข้างสูง และ DNA ในไมโทคอนเดรียของสัตว์มักจะไม่เกิด genetic recombination จากการศึกษาจีโนมที่สมบูรณ์ของไมโทคอนเดรียของพยาธิใบไม้ปอด *P. westermani filipinus* พบว่ามีความยาวประมาณ 21×10^3 คู่เบส (21 Kbp) ประกอบด้วย 35 ยีน โดยมียีนสำหรับการสร้าง rRNA จำนวน 2 ยีน ยีนสำหรับการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์จำนวน 12 ยีน และยีนสำหรับการสร้าง tRNA จำนวน 21 ยีน [11] ยีนหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอด คือ COI ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์ cytochrome c oxidase subunit I

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันสายพันธุ์ของพยาธิใบไม้ปอดที่ตรวจพบจากปูน้ำตกในจังหวัดจันทบุรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอดที่พบในครั้งนี้นี้กับพยาธิใบไม้ปอดสายพันธุ์อื่นๆ ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI

วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างปูน้ำจืดและการตรวจสอบสปีชีส์

เก็บตัวอย่างปูน้ำจืดจากบริเวณลำธารใกล้ลำน้ำตกตรอกนองในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง คือ เดือนมิถุนายน และธันวาคม พ.ศ. 2553 สปีชีส์ของปูน้ำจืดได้รับการตรวจสอบและยืนยันโดย Dr. Masatsune Takeda ผู้เชี่ยวชาญจากมหาวิทยาลัย Teikyo Heisei ประเทศญี่ปุ่น

การตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียและการตรวจสอบสปีชีส์เบื้องต้น

นำปูมาวัดขนาด แยกเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นจึงฉีกกระดองปูออก นำอวัยวะภายในและเหงือกวางบน petri dish ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm แล้วกดทับด้วย petri dish อีกอันหนึ่งซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm ตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียภายใต้กล้อง stereomicroscope โดยใช้กำลังขยาย 8 เท่า จากนั้นนำส่วนที่เหลืออื่นๆ ของตัวปูมาบดให้ละเอียด เติมเอนไซม์ pepsin นำไปคนโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองแยกส่วนกระดองปูและเศษต่างๆ ออก ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เติมน้ำส่วนบนทิ้งและเติม 0.9% NaCl ลงไป ทำซ้ำประมาณ 5-6 ครั้ง หรือจนกว่าของเหลวที่อยู่ด้านบนจะใส เทของเหลวด้านบนทิ้ง และนำตะกอนที่เหลือมาตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียโดยใช้กล้อง stereomicroscope เก็บรวบรวมและล้างเมตาเซอร์คาเรียด้วย 0.9% NaCl นำบางส่วนไปสกัด DNA และนำบางส่วนไปทำให้เกิดการติดเชื้อในสัตว์ทดลอง

การทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิ

เนื่องจากในวงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ปอดมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นโฮสต์สุดท้าย (definitive host) และเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด จึงมีการทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิโดยวิธีการดังนี้ นำเมตาเซอร์คาเรียที่ได้มาฉีดให้กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ปราศจากเชื้อจำเพาะ (specific pathogen free) 2 ประเภท ได้แก่ หนู (Wistar rat) จำนวน 2 ตัว และแมว (Japanese cat) จำนวน 1 ตัว โดยฉีดเข้าทางช่องท้องประมาณตัวละ 20 ซีซี เลี้ยงหนูและแมวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดแล้วจึงนำอุจจาระมาตรวจหาไข่ของพยาธิ และทำการผ่าพิสูจน์เพื่อตรวจหาตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด นำพยาธิใบไม้ปอดที่ได้มาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการทดลองนี้การเลี้ยงหนูได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ส่วนการเลี้ยงแมวที่ประเทศญี่ปุ่นได้รับการอนุญาตจาก National Institute of Infectious Diseases

การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

การสกัด DNA

นำเมตาเซอรัคคาเรียซีสต์เดี่ยวๆ จำนวน 3 ซีสต์ ใส่ลงไปในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL เติม extraction buffer (SDS : Proteinase K ในอัตราส่วน 99 : 1) 70 μ L นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง เติม RNase A (100 mg/mL) 5 μ L ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 95°C 10 นาที เติม 3M sodium acetate 1 μ L และ absolute ethanol 20 μ L ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -70°C ประมาณ 15 นาที ปั่นเหวี่ยง 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม 70% ethanol 100 μ L ปั่นเหวี่ยง 2 นาที ดูด ethanol ทิ้งไปให้เหลือเฉพาะตะกอน เติม TE buffer 50 μ L เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 xg

การทำ PCR สำหรับบริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI

Primer ที่ใช้สำหรับบริเวณ ITS2 คือ 3S และ A28 และสำหรับบริเวณ COI คือ JB3 และ JB4.5 รายละเอียดของ primer แสดงในตารางที่ 1 PCR reaction มีปริมาตร 25 μ L และมีองค์ประกอบต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 2 ng/ μ L DNA template, 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTP แต่ละชนิด, 0.5 μ M forward primer, 0.5 μ M reverse primer และ 0.05 U/ μ L *Taq* DNA polymerase

ตารางที่ 1 Primer สำหรับการทำ PCR

Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer	ทิศทาง	เอกสารอ้างอิง
3S	5'-GGT ACC GGT GGA TCA CTC GGC TCG TG-3'	forward	[12]
A28	5'-GGG ATC CTG GTT AGT TTC TTT TCC TCC GC-3'	reverse	[13]
JB3	5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3'	forward	[14]
JB4.5	5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3'	reverse	[14]

นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

Denaturation	98°C	5 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	55°C	10 วินาที	
Extension	72°C	10 วินาที	
Final extension	72°C	2 นาที	

ตรวจสอบ PCR product บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI จาก DNA ของเมตาเซอรัคคาเรียทั้ง 3 ซีสต์ ด้วยวิธี electrophoresis (1% (w/v) agarose gel) โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN) ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้าง phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ของพยาธิใบไม้ปอดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จากเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 3 ซีสต์ แต่ละบริเวณมาเทียบเคียงกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX [15] และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเอกฉันท์ (consensus sequence) ของบริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI มาเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. paishuihoensis* ที่พบในมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน (Dr. David Blair, pers. comm.) และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ที่พบในประเทศไทยดังรายละเอียดในตารางที่ 2 สร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b [16] ด้วยวิธี parsimony (branch-and-bound search) โดยใช้พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola hepatica* (ตารางที่ 2) เป็น outgroup และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นในความสัมพันธ์ของกลุ่มพยาธิใบไม้ปอดที่ศึกษาโดย bootstrap analysis [17]

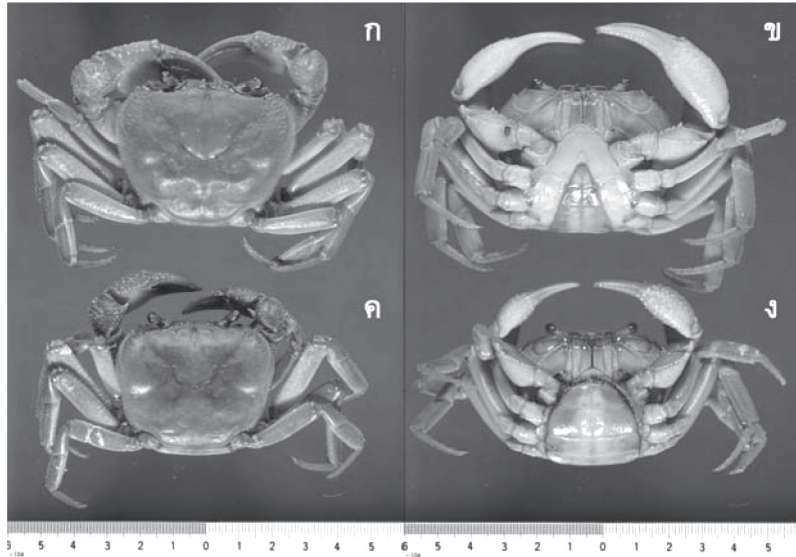
ตารางที่ 2 รายละเอียดของพยาธิใบไม้ปอดและพยาธิใบไม้ตับที่ใช้ในการศึกษา phylogenetic tree

สปีชีส์	แหล่งที่มา	GenBank accession number	
		ITS2	COI
<i>P. westermani</i>	สระบุรี	AB354214	AB354223
<i>P. siamensis</i>	ปราจีนบุรี	AB354222	AB354231
<i>P. bangkokensis</i>	สระบุรี	Unpublished data	AB354228
<i>P. harinasutai</i>	สระบุรี	AB354219	AB354226
<i>P. macrorchis</i>	จันทบุรี	AF159608	AF159598
<i>P. heterotremus</i>	สระบุรี	AF159603	AB354230
<i>P. pseudoheterotremus</i>	กาญจนบุรี	EF014340	EF446317
<i>P. paishuihoensis</i>	มณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน	pers.comm.	pers.comm.
<i>Fasciola hepatica</i>	ประเทศออสเตรเลีย	AB207148	AF216697

ผลการทดลอง

ตัวอย่างปูน้ำจืดที่ใช้ในการศึกษา

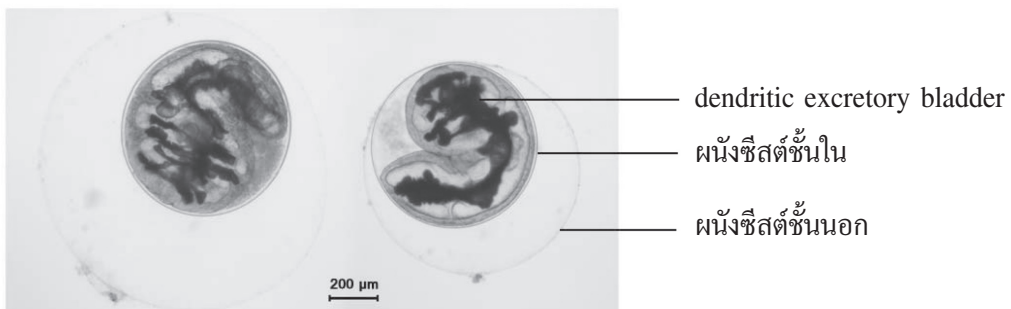
จากการเก็บตัวอย่างปูน้ำจืดจากบริเวณลำธารใกล้น้ำตกตรอกนองจำนวนทั้งหมด 212 ตัว และผลการศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยาของปูโดย Dr. Masatsune Takeda สามารถยืนยันว่าเป็นสปีชีส์ *Potamon boonyaratae* (Naiyanetr, 1987) (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สองของพยาธิใบไม้ปอดที่ศึกษา



รูปที่ 1 ปูน้ำจืด *Potamon boonyaratae* (Naiyanetr, 1987) เพศผู้ (ก และ ข) และเพศเมีย (ค และ ง)

เมตาเซอร์คาเรียและการตรวจสอบสปิซิสเบื้องต้น

การศึกษาในครั้งนี้ได้เมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดทั้งหมด 133 ซีสต์ เมตาเซอร์คาเรียมีรูปร่างค่อนข้างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย $624.45 \times 647.00 \mu\text{m}$ มีผนังซิสต์ 2 ชั้น โดยผนังซิสต์ชั้นในมีลักษณะค่อนข้างบางใสและเหนียว มีความหนาเฉลี่ยประมาณ $4.60 \mu\text{m}$ ส่วนผนังซิสต์ชั้นนอกมีความหนาไม่สม่ำเสมอ เฉลี่ยประมาณ $3.37 \mu\text{m}$ และถูกทำลายหรือหลุดได้ง่าย ตัวอ่อนของพยาธิอยู่ติดผนังซิสต์ชั้นใน และมีลักษณะของ excretory bladder แตกแขนงหลายแขนง (dendritic shape) (รูปที่ 2) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะพิเศษเฉพาะที่แตกต่างจากเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดสปิซิสอื่นๆ ที่เคยมีรายงานในประเทศไทย และสอดคล้องกับลักษณะที่พบในพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* ที่มีรายงานการค้นพบในสาธารณรัฐประชาชนจีน ดังนั้นผลการตรวจสอบสปิซิสเบื้องต้นบ่งชี้ว่าพยาธิใบไม้ปอดที่พบในการศึกษาครั้งนี้ คือ *P. paishuihoensis*



รูปที่ 2 เมตาเซอร์คาเรียของ *P. paishuihoensis* ซึ่งมีลักษณะพิเศษของ dendritic excretory bladder

นอกจากนี้ยังพบตัวอ่อนของพยาธิที่ออกจากซิสต์แล้ว ซึ่งมีรูปร่างยาวรี มีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ $478.10 \times 870.01 \mu\text{m}$ และมีลักษณะของ excretory bladder แตกแขนงหลายแขนง (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ตัวอ่อนของพยาธิ *P. paishuihoensis* ที่ออกจากซิสต์แล้ว และมีลักษณะพิเศษของ dendritic excretory bladder

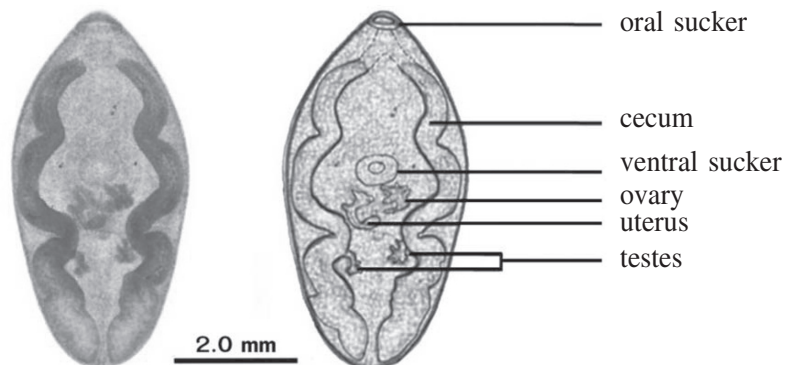
การทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิ

การติดเชื้อในหนู

การตรวจสอบผลการทดลองการติดพยาธิใบไม้ปอดจากจังหวัดจันทบุรีในหนู 2 ตัว หลังจาก 8 สัปดาห์ ปรากฏว่าไม่พบไข่ของพยาธิใบไม้ปอดในอุจจาระ และเมื่อผ่าพิสูจน์หนูทั้ง 2 ตัว ผลปรากฏว่าไม่พบตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด

การติดเชื้อในแมว

8 สัปดาห์ภายหลังจากการทดลองทำให้แมวติดพยาธิใบไม้ปอดจากจังหวัดจันทบุรี ผลการตรวจสอบปรากฏว่าไม่พบไข่ของพยาธิใบไม้ปอดในอุจจาระ และเมื่อผ่าพิสูจน์แมวปรากฏว่าไม่พบตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ปอด แต่พบพยาธิในระยะ immature จำนวน 6 ตัว ที่บริเวณกล้ามเนื้อของแมว โดยมีขนาดของลำตัวเฉลี่ย $2.72 \times 5.43 \text{ mm}$ (รูปที่ 4) อย่างไรก็ตาม พยาธิในระยะ immature เหล่านี้ยังแสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ (รังไข่และอัณฑะ) ที่ไม่ชัดเจน



รูปที่ 4 พยาธิใบไม้ปอดจากจังหวัดจันทบุรีในระยะ immature ที่ได้จากการติดเชื้อในแมว

การศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล

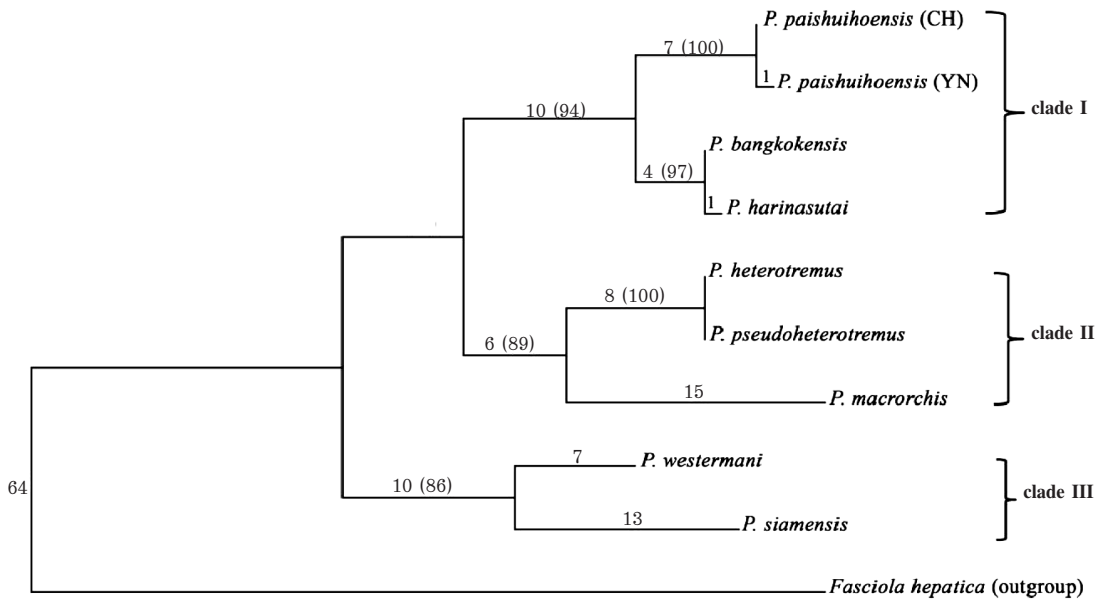
การตรวจสอบ PCR product ของพยาธิใบไม้ปอดจากจังหวัดจันทบุรีจำนวน 3 ซีสต์ ในบริเวณ ITS2 พบว่ามีขนาดประมาณ 500 คู่เบส และบริเวณบางส่วนของยีน COI มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส

การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS2 จากพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 3 ซีสต์ พบว่ามีความเหมือนกันทุกประการ (identical sequences) เช่นเดียวกันกับผลของการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณบางส่วนของยีน COI จากพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 3 ซีสต์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ ITS2 เพียงหนึ่งลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ COI หนึ่งลำดับ เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป

การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ระหว่างตัวอย่าง *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีนกับตัวอย่างพยาธิใบไม้ปอดที่ได้จากจังหวัดจันทบุรี พบว่าทั้งสองตัวอย่างมีความเหมือนกัน 99.18% สำหรับบริเวณ ITS2 และ 97.09% สำหรับบริเวณบางส่วนของยีน COI

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ในประเทศไทยโดยใช้บริเวณ ITS2

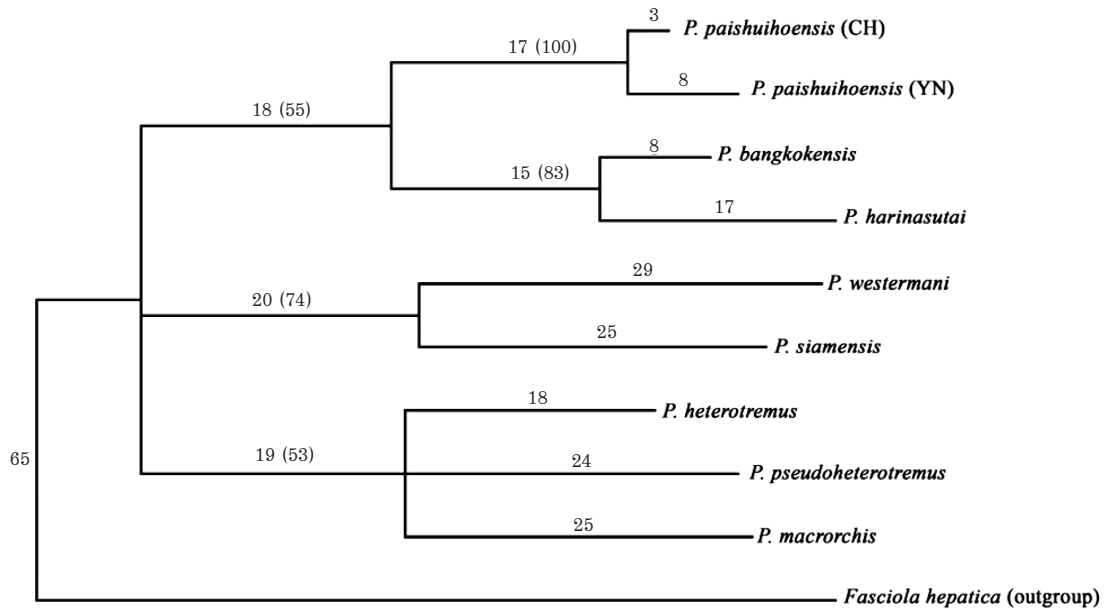
จากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ของไทย โดยใช้ *F. hepatica* เป็น outgroup พบว่ามีความยาวเท่ากับ 445 คู่เบส ซึ่งจำแนกเป็นประเภทของลักษณะได้ดังนี้ constant character = 332 (74.61%), parsimony-uninformative character = 57 (12.81%) และ parsimony-informative character = 56 (12.58%) ในการสร้าง phylogenetic tree ผลที่ได้ คือ พบ 1 most parsimonious tree (รูปที่ 5) ที่มีความยาว 153 step ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจัดกลุ่มที่สำคัญ 3 clade คือ clade I (BS = 94%) แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันระหว่าง *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีกับ *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน (BS = 100%) นอกจากนี้ยังพบว่า *P. paishuihoensis* จากทั้ง 2 แหล่งมีความใกล้ชิดกับ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* อีกด้วย ส่วน clade II (BS = 89%) ประกอบด้วย *P. heterotremus*, *P. pseudoheterotremus* และ *P. macrorchis* ซึ่ง *P. heterotremus* และ *P. pseudoheterotremus* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า (BS = 100%) และ clade III (BS = 86%) ประกอบด้วย *P. westermanni* และ *P. siamensis*



รูปที่ 5 Single most parsimonious tree (ความยาว 153 step) ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS2 ของ *P. paishuihoensis* และพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ในประเทศไทย โดยมี *F. hepatica* เป็น outgroup และใช้วิธี parsimony (branch-and-bound search) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้: CI = 0.856, RI = 0.788, และ RC = 0.675 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงความยาวของกิ่ง (branch length) และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap support (%BS) จาก 1,000 ซ้ำ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ในประเทศไทยโดยใช้บริเวณบางส่วนของยีน COI

จากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณบางส่วนของยีน COI ของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ของไทย โดยใช้ *F. hepatica* เป็น outgroup พบว่ามีความยาวเท่ากับ 381 คู่เบส ซึ่งจำแนกเป็นประเภทของลักษณะได้ดังนี้: constant character = 242 (63.52%), parsimony-uninformative character = 47 (12.33%) และ parsimony-informative character = 92 (24.15%) ผลการสร้าง phylogenetic tree ได้ 2 equally parsimonious tree (รูปที่ 6) ที่มีความยาว 311 step ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจัดกลุ่มของ *P. paishuihoensis* สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้บริเวณ ITS2 คือ *P. paishuihoensis* จากจังหวัดจันทบุรีมีความใกล้ชิดกับ *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนาน (BS = 100%) และ *P. paishuihoensis* จากทั้งสองแหล่งมีความใกล้ชิดกับ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* (BS = 55%)



รูปที่ 6 Strict consensus tree ซึ่งได้มาจาก 2 equally parsimonious tree (ความยาว 311 step) ที่ได้จาก การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน COI ของ *P. paishuihoensis* และ พยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ในประเทศไทย โดยมี *F. hepatica* เป็น outgroup และใช้วิธี parsimony (branch-and-bound) ข้อมูลทางสถิติเกี่ยวกับ tree มีดังนี้: CI = 0.646, RI = 0.447, และ RC = 0.289 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงความยาวของกิ่ง (branch length) และตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บแสดง bootstrap support (%BS) จาก 1,000 ซ้ำ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ปอดที่ได้จาก จังหวัดจันทบุรีพบว่า มีลักษณะพิเศษซึ่งแตกต่างจากพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ที่พบในประเทศไทย คือ มี excretory bladder ที่มีการแตกแขนงหลายแขนง ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะของ *P. paishuihoensis* ที่ได้เคยมีรายงานการศึกษาในมณฑลเสฉวนและมณฑลยูนนานในสาธารณรัฐประชาชนจีน [18] และเมื่อได้เปรียบเทียบลักษณะต่างๆ (รูปร่างและขนาดของเมตาเซอร์คาเรีย จำนวนชั้นของผนังชีสต์ และลักษณะของ excretory bladder) ของ *P. paishuihoensis* ที่พบในสาธารณรัฐประชาชนจีนกับ *P. paishuihoensis* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก และที่สำคัญ *P. paishuihoensis* จากมณฑลเสฉวน มณฑลยูนนาน และจังหวัดจันทบุรี ต่างมีโฮสต์กึ่งกลางตัวที่สอง คือ ปูน้ำจืดในจีนัส *Potamon* เช่นเดียวกัน [18-19] ดังนั้นหากพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียทำให้สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า พยาธิใบไม้ปอดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ คือ *P. paishuihoensis*

จากการทดลองทำให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมติดพยาธิ ผลปรากฏว่าไม่พบการติดพยาธิ *P. paishuihoensis* ในหนู ส่วนในแมวมีการตรวจพบเฉพาะระยะ immature ของพยาธิเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ในสาธารณรัฐประชาชนจีน [19] ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า หนูและแมวอาจจะไม่ใช่โฮสต์สุดท้ายที่จำเพาะกับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง *P. paishuihoensis* จากมณฑลยูนนานกับตัวอย่างจากจังหวัดจันทบุรี พบว่าในบริเวณ ITS2 มีความเหมือนกันสูงถึง 99.18% ส่วนในบริเวณบางส่วนของยีน COI มีความเหมือนกัน 97.09% และค่าความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1-3% ซึ่งถือว่าเป็นค่าความต่างภายในสปีชีส์เดียวกัน [20]

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *P. paishuihoensis* กับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์อื่นๆ ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 พบว่า *P. paishuihoensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณบางส่วนของยีน COI และสอดคล้องกับการศึกษาของ Cui และคณะ ในปี ค.ศ. 2003 [21] ซึ่งศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ปอด 5 สปีชีส์ ได้แก่ *P. paishuihoensis*, *P. menglaensis*, *P. bangkokensis*, *P. xiangshanensis* และ *P. hokuoensis* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 และบางส่วนของยีน COI ผลการศึกษาพบว่า *P. paishuihoensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. xiangshanensis* และพบว่าพยาธิใบไม้ปอดทั้ง 4 สปีชีส์ คือ *P. paishuihoensis*, *P. menglaensis*, *P. bangkokensis* และ *P. xiangshanensis* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

การค้นพบพยาธิใบไม้ปอด *P. paishuihoensis* ในจังหวัดจันทบุรีนับว่าเป็นการบันทึกครั้งใหม่ (new record) ของพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์ที่ 8 ในประเทศไทย รายละเอียดเกี่ยวกับพยาธิใบไม้ปอดสปีชีส์นี้ยังมีรายงานค่อนข้างน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของพยาธิตัวเต็มวัยสัตว์ที่เป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่หนึ่งและโฮสต์สุดท้าย รวมถึงข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในมนุษย์ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุธีวรรณ บินชัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเทคนิคและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. เตชะ ศรีสนธิ์ จิตรา ไวกุล และ สนั่น แยมพุดม. 2540. พยาธิใบไม้ปอด. กรุงเทพฯ. บริษัท ลิฟวิ้งทรานส์ มีเดีย จำกัด. หน้า 1.
2. Blair, D., Xu, Z. B., and Agatsuma, T. 1999. Paragonimiasis and the Genus *Paragonimus*. In: Baker, J.R., Muller, R., and Rollinson, D., Editors. *Advances in Parasitology*. Volume 42. London. Academic Press. p. 113-222.
3. Li, Y. S. 1999. Species Index Table for the Adult and Metacercaria of Chinese *Paragonimus*. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology* 7: 59-62. [Chinese with English Abstract].
4. Vajrasthira, S. 1969. Paragonimiasis in Thailand. In: Harinasuta, C., Editor. *Proceedings of the Fourth Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine, Schistosomiasis and Other Snail-Transmitted Helminthiasis*. 24-27 February 1969. Manila. Philippines. p. 299-304.

5. Waikagul, J. 2007. A New Species of *Paragonimus* (Trematoda: Troglotrematidae) from a Cat Infected with Metacercariae from Mountain Crabs *Larnaudia larnaudii*. *Journal of Parasitology* 93(6): 1496-1500.
6. Miyazaki, I., and Harinasuta, T. 1966. The First Case of Human Paragonimiasis Caused by *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 60: 509-514.
7. Miyazaki, I. 1991. Paragonimiasis. In: Miyazaki, I., Editor. Helminthic Zoonoses. Tokyo. International Medical Foundation of Japan. p. 76-146.
8. Thaenkham, U., and Wiakagul, J. 2008. Molecular Phylogenetic Relationship of *Paragonimus pseudoheterotremus*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 39(2): 217-221.
9. Iwagami, M., Rajapakse, R. P. V. J., Paranagama, W., and Agatsuma, T. 2003. Identities of Two *Paragonimus* Species from Sri Lanka Inferred from Molecular Sequences. *Journal of Helminthology* 77: 239-245.
10. Gerbi, J. A. 1985. Evolution of Ribosomal DNA. In: MacIntyre, R.J., Editor. Molecular Evolutionary Genetics. New York. Plenum.
11. Sato, Y., Iwagami, M., Iwashita, J., Abe, T., Yukawa, M., Blas, B. L., Kawashima, K., and Agatsuma, T. 2003. Phylogenetic Status of a Lung Fluke in the Philippines Based on Mitochondrial Genome. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31(1): 1-3.
12. Bowles, J., Hope, M., Tiu, W. U., Liu, X., and McManus, D. P. 1993. Nuclear and Mitochondrial Genetic Marker Highly Conserved Between Chinese and Philippine *Schistosoma Japonicum*. *Acta Tropica* 55: 217-229.
13. Blair, D., Agatsuma, T., Watanobe, T., Okamoto, M., and Ito, A. 1997. Geographical Genetic Structure within the Human Lung Fluke, *Paragonimus westermani*, Detected from DNA Sequences. *Parasitology* 115: 411-417.
14. Bowles, J., Blair, D., and McManus, D. P. 1995. A Molecular Phylogeny of the Human Schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4(2): 103-109.
15. Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1998. Multiple Sequence Alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 403-405.
16. Swofford, D. L. 1998. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*. Version 4. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates.
17. Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

18. Wang, W., Lei, L., Zhou, B., Zhang, X., Wang, M., and Xia, D. 2002. Investigation and Observation on *Paragonimus paishuihoensis* in Mengla County, Yunnan Province. *Endemic Diseases Bulletin* 17(2): 62-64. [Chinese with English Abstract].
19. Ts'ao, W. C., and Chung, H. L. 1965. Preliminary Observations on Metacercaria Cysts, Excysted Metacercariae and Adolescent Worm of a New Species of Lung Fluke *Paragonimus paishuihoensis* sp. nov. Discovered in P'enghsien in Szechuan Province. *Acta Parasitologica Sinica* 2(3): 252-255. [Chinese with English Abstract].
20. Le, T. H., Blair, D., and McManus, D. P. 2002. Revisiting the Question of Limited Genetic Variation within *Schistosoma japonicum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 96(2): 155-164.
21. Cui, A. L., Chang, Z., Chen, M., Blair, D., Chen, S., Zhang, Y., and Feng, Z. 2003. Taxonomic Status in DNA Sequences of Five Species of Genus *Paragonimus*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases* 2(21): 27-30. [Chinese with English Abstract].

ได้รับบทความวันที่ 14 มีนาคม 2554

ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 9 พฤษภาคม 2554