



Pyrosequencing: the application for diagnosis of parasitic infections in genomic era

Tongjit Thanchomnang^{1,2*}

¹Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maharakham 44000, Thailand

²Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Abstract

Pyrosequencing technique facilitates direct sequencing via the synthesis of short nucleotide fragments using a novel enzymatic-cascade system. The technique relies on the addition of complementary nucleotides to a single stranded template next to a 3' side of sequencing primer. After a nucleotide is incorporated into the growing complementary strand by a DNA polymerase, pyrophosphate is left, and APS is changed to ATP by ATP sulphurylase. The released ATP is an energy source for luciferase, allowing it to oxidize luciferin and produce a noticeable quantity of light. Light is only shown when a newly added nucleotide is complementary to the next unpaired base in the template strand. The method has been widely used for various applications, such as SNP genotyping, *de novo* mutation detection, gene identification and microbial genotyping. Recently, pyrosequencing has been widely used for identification and single nucleotide genotyping of parasites, including protozoa and helminthes. These literatures suggest that the pyrosequencing assay is simple, rapid, sensitive, and accurate in identifying the parasites in a high throughput. The results from many samples can be obtained within 1 hour after PCR amplification. Not only having important implications for epidemiological studies of parasites in endemic countries but pyrosequencing is also a promising tool for yielding diagnostic data. The limitation of this method is that the analysis software cannot interpret the result if it has 4 or more than 4 identical nucleotides linked together in the target sequence. However, this problem can be solved by manual interpretation.

Keyword: pyrosequencing, genotyping, diagnosis, parasite

บทนำ

เทคนิคไพโรซีควีนซิ่ง (pyrosequencing) เป็นเทคนิคการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการสังเคราะห์ (sequencing

by synthesis) ซึ่งปฏิกิริยาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์อาศัยการตรวจหา pyrophosphate (PPi) ที่ถูกปลดปล่อยจากการที่นิวคลีโอไทด์ถูกนำไปใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ [1,2] เทคนิคนี้สามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นขนาดเล็กแบบประมวลผลในเวลาจริง สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ถึง 140 เบส (Qiagen, Hilden, Germany) เหมาะสำหรับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวไม่มากในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งมีการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจ single nucleotide polymorphisms (SNPs) การตรวจหา genotypes ของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย [3]

***Correspondence:** Tongjit Thanchomnang

Faculty of Medicine, Mahasarakham University,
Mahasarakham 44000, Thailand

E-mail: thanchomnang@yahoo.com

Tel: 66(0)-4375-4247; Ext. 1136;

Fax: 66(0)-4375-4121

ไวรัส [4,5] และ metazoan parasites [6] สำหรับการตรวจเชื้อปรสิตชนิดต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญด้านปรสิตวิทยา และหากมีการติดเชื้อต่ำมาก และมีจำนวนตัวอย่างส่งตรวจมาก อาจเกิดความเมื่อข้ล่าในการตรวจด้วยตา ทำให้มีโอกาสเกิดผลลบปลอมสูง เนื่องจากข้อด้อยของวิธีที่มีความไว (sensitivity) ต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น เช่น การตรวจหาแอนติบอดี (antibody) [7-10] การตรวจหาแอนติเจน (antigen) [11,12] การพัฒนาเทคนิควิธีทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ตรวจพยาธิหลายชนิด เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction; PCR) [13-16] เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [17-21] เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR) [22-25] และเทคนิค pyrosequencing [27-35]

ปัจจุบันเทคนิค pyrosequencing ถูกพัฒนามาใช้ตรวจหาการติดเชื้อปรสิตหลายชนิด เช่น พยาธิใบไม้ *Paragonimus* species [26], *Schistosoma japonicum* และ *S. mekongi* [27] *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, *Haplorchis taichui*, *H. pumilio* และ *Stellantchasmus falcatus* [28] พยาธิตัวกลม *Trichinella spiralis*, *T. pseudospiralis*, *T. zimbabwensis* และ *T. papuae* [29] พยาธิตืด *Taenia solium*, *T. saginata* และ *T. asiatica* [30] และโปรโตซัว *Toxoplasma gondii* [31] *Blastocystis* [32] *Entamoeba* complex [33] *Plasmodium vivax* และ *P. falciparum* [34] ซึ่งเป็นการตรวจหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวไม่เกิน 20-50 เบส สามารถใช้แยกชนิดของเชื้อปรสิตได้ เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก สะดวก รวดเร็ว สามารถตรวจตัวอย่างได้มากถึง 96 ตัวอย่างในแต่ละครั้ง โดยให้ผลการตรวจภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการทำเทคนิค PCR ซึ่งค่าใช้จ่ายถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Sanger sequencing แต่ทั้งนี้การตรวจตัวอย่างแต่ละครั้งควรจะต้องมีจำนวนตัวอย่างที่มากพอเพื่อให้คุ้มค่าและเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเทคนิค pyrosequencing เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ หรือการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

หลักการ pyrosequencing

เทคนิค pyrosequencing เป็นเทคนิคการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ถูกคิดค้นโดย Mostafa Ronaghi และ Pål Nyrén ในปี ค.ศ.1996 [1,2] โดยปฏิกิริยา pyrosequencing เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4 ชนิด คือ DNA polymerase, ATP

sulfurylase, luciferase และ apyrase ซึ่งส่วนผสมปฏิกิริยาประกอบด้วยซับสเตรทของเอนไซม์ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template), sequencing primer, นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (A, G, C และ T), adenosine 5' phosphate (APS) และ D- luciferin โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาศัยหลักการที่เรียกว่า sequencing by synthesis ซึ่งประกอบด้วย 6 ขั้นตอน (รูปที่ 1)

1. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ โดยคู่ของไพรเมอร์ (PCR primer) ด้วยวิธี PCR ซึ่ง primer อันใดอันหนึ่งต้องถูกติดฉลากด้วยสารไบโอทิน (biotinylated PCR primer) จากนั้นทำให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded template)

2. เมื่อ sequencing primer เข้าจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบที่มีไบโอทินติดอยู่ (biotinylated single-stranded template) โดยมีเอนไซม์ 4 ชนิด คือ DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase และ apyrase อยู่ในปฏิกิริยารวมทั้งมี adenosine 5' phosphate (APS) และ luciferin เป็นสารตั้งต้น

3. เมื่อมีการเติม deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ตัวแรกใส่เข้ามาในปฏิกิริยา หาก dNTP ชนิดนั้นสามารถเข้ากันได้กับสายดีเอ็นเอต้นแบบแล้ว เอนไซม์ DNA polymerase จะเร่งปฏิกิริยาการเติม dNTP เข้าที่ปลาย 3' ของ sequencing primer โดยจะปลดปล่อย pyrophosphate (PPi) ออกมา 1 หมู่ สำหรับการเติม dNTP 1 โมเลกุล

4. ในสภาวะที่มี APS เอนไซม์ ATP sulfurylase ทำหน้าที่เปลี่ยน PPi เป็น ATP โดย ATP ที่เกิดขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ luciferase เปลี่ยนสารตั้งต้นชนิด luciferin ไปเป็น oxyluciferin โดยในปฏิกิริยานี้จะมีผลทำให้เกิดแสงขึ้น และปริมาณแสงที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ ATP ที่เกิดขึ้น

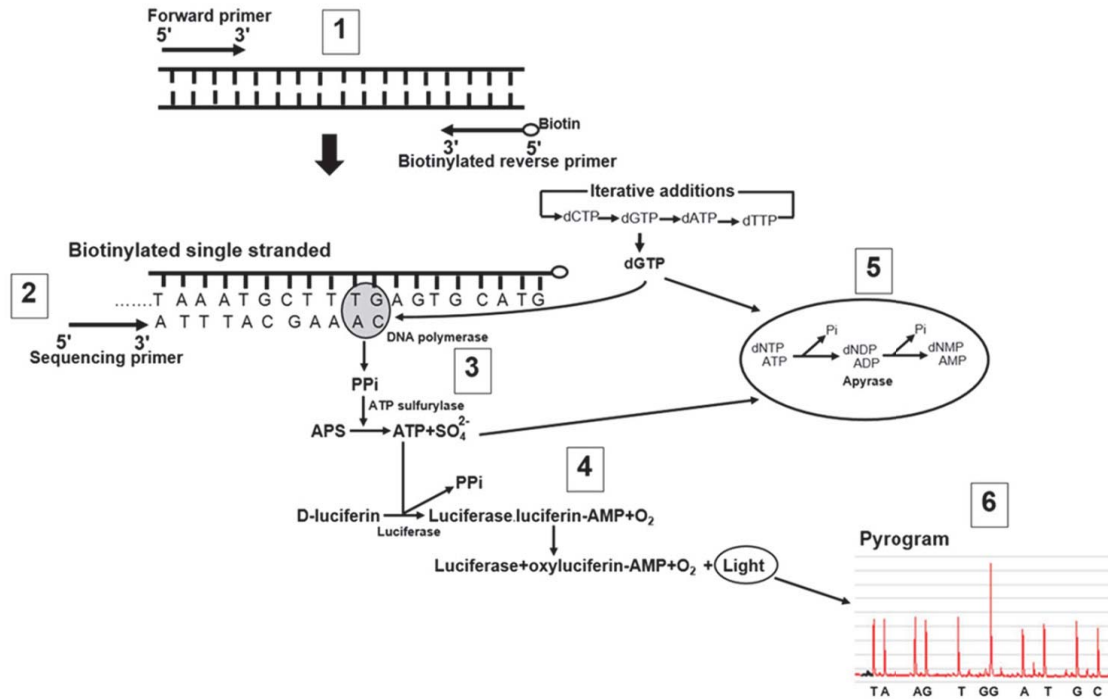
5. เอนไซม์ apyrase ทำหน้าที่ย่อยสลาย dNTP และ ATP ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา เช่น dNTP ที่ไม่เข้ากันกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ในแต่ละรอบของการใส่ dNTP หลังจากย่อยสลายสมบูรณ์แล้ว dNTP ตัวใหม่จะถูกเติมลงไปเพื่อทำปฏิกิริยาต่อไป

6. ในการทำปฏิกิริยารอบต่อไปยังคงมีการเติม dNTPs เพื่อให้สายดีเอ็นเอถูกสร้างยาวขึ้น โดยจะเติม dNTP ทีละ 1 ชนิด สำหรับลำดับเบสของดีเอ็นเอจะถูกแสดงอยู่ในรูปของกราฟที่เรียกว่า pyrogram โดยความสูงของ pyrogram จะเป็นสัดส่วนกับโดยตรงกับปริมาณ PPi ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยารอบนั้น

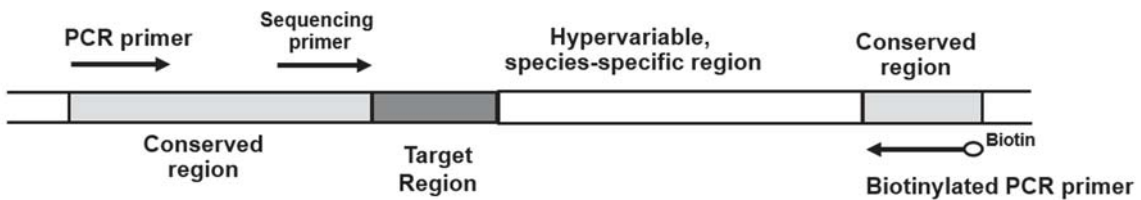
วิธีการทำ pyrosequencing

การทำ pyrosequencing ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่

1. การออกแบบไพรเมอร์ ไพรเมอร์ประกอบด้วย PCR primer 1 คู่ (forward primer, reverse primer) และ sequencing primer (รูปที่ 2) การออกแบบไพรเมอร์ใช้โปรแกรม PyroMark Q96 ID software version 1.0 (Biotage) โดยการออกแบบไพรเมอร์ต้องเลือกขึ้นให้เหมาะสมกับงาน



รูปที่ 1 ขั้นตอนแสดงหลักการของการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค pyrosequencing (ดัดแปลงจาก [4])



รูปที่ 2 ตำแหน่งการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค pyrosequencing

วิจัย สำหรับการแยกชนิดของเชื้อปรสิต บริเวณส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันจะใช้สำหรับการออกแบบ PCR primer และ sequencing primer ส่วนอื่นบริเวณเป้าหมาย (target region) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันถัดจาก sequencing primer จะใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการแยกชนิดของเชื้อปรสิต (ตารางที่ 1)

2. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการโดยวิธี PCR ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อเข้าเครื่อง pyrosequencing เป็นการแยกเอาเฉพาะ PCR product ที่มีไบโอตินติดอยู่ ซึ่งจะจับกับเม็ด streptavidin bead จากนั้นผ่านขั้นตอนการล้างด้วย 70% ethanol และแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้ 0.2 โมลาร์

ของ NaOH และล้างด้วย 10 มิลลิโมลาร์ของ Tris-acetate (pH 7.6) โดยใช้เครื่อง PyroMark™ Vacuum Prep Workstation จากนั้นใส่ biotinylated single stranded template ลงใน annealing buffer ที่มี sequencing primer จากนั้นนำไปวางที่เครื่อง heating block อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำเข้าเครื่อง pyrosequencing ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 15 นาที

4. การทำ pyrosequencing เป็นขั้นตอนการฉีด dNTP ชนิดต่างๆ คือ dGTP, dCTP, dATP และ dTTP ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจะถูกแสดงอยู่ในรูปของกราฟเรียกว่า pyrogram ขั้นตอนนี้ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง สำหรับเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ 140 เบส

ตารางที่ 1 ชนิดของเชื้อปรสิตและยีนเป้าหมาย (Target gene) สำหรับใช้ตรวจแยกชนิดด้วยเทคนิค pyrosequencing

Species	Target gene
<i>Paragonimus</i> sp. [26]	ITS2
<i>S. japonicum</i> และ <i>S. mekongi</i> [27]	18S rRNA
<i>O. viverrini</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>H. taichui</i> , <i>H. pumilio</i> และ <i>S. falcatius</i> [28]	28S rRNA
<i>Trichinella</i> sp. [29]	Isu- RNA
<i>T. saginata</i> , <i>T. solium</i> และ <i>T. asiatica</i> [30]	<i>cox1</i>
<i>T. gondii</i> [31]	GRA6 gene
<i>Blastocystis</i> [32]	18S rRNA
<i>Entamoeba</i> complex [33]	SSU rRNA
<i>P. falciparum</i> และ <i>P. vivax</i> [34]	SSU rRNA
<i>B. vogeli</i> , <i>H. canis</i> , <i>E. canis</i> และ <i>A. platys</i> [35]	18S rRNA, 16S rRNA

การประยุกต์ใช้เทคนิค pyrosequencing ในการวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อปรสิต

โปรโตซัว

1. เชื้อโปรโตซัวในเนื้อเยื่อ เช่น *Toxoplasma gondii* ซึ่ง Edvinsson และคณะ [31] ได้แยก *T. gondii* 3 ชนิด (type) คือ type I, type II และ type III โดยเทคนิค pyrosequencing จากการศึกษาเลือกยีน GRA6 (GenBank accession no. AF239283-AF239292) ในการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งบริเวณ target region ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัดจาก sequencing primer จำนวน 11 นิวคลีโอไทด์ (ตำแหน่ง 162-171) มีจำนวน 2 นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน คือ ตำแหน่งที่ 162 และ 171 *T. gondii* type I มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด G และ A, type II เป็นชนิด G และ G, type III เป็นชนิด A และ A ตามลำดับ และเมื่อมีการ mixed กัน 2 genotype จะสามารถแยกกันได้ แต่ mixed กัน 3 genotype ไม่สามารถแยกด้วยวิธีนี้ เมื่อ type I กับ II mixed กัน นิวคลีโอไทด์เป็นชนิด GA และ A, type I กับ III นิวคลีโอไทด์เป็นชนิด G และ AG และ type II กับ III นิวคลีโอไทด์เป็นชนิด GA และ AG การแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *T. gondii* ได้อย่างรวดเร็วจะช่วยให้สามารถทำนายความรุนแรงของเชื้อและช่วยให้นักรักษาได้เร็วขึ้น

2. เชื้อโปรโตซัวในลำไส้ เช่น *Blastocystis* และ *Entamoeba* spp. ในปี ค.ศ. 2007 Stensvold และคณะ [32] ได้แยกเชื้อ *Blastocystis* โดยเทคนิค pyrosequencing ยีนเป้าหมายในการออกแบบไพรเมอร์ คือ 18S small subunit

ribosomal RNA gene (18S rRNA) พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Blastocystis* ได้ 7 subtype ต่อมาได้แยกเชื้อ *Entamoeba* complex [33] โดยเลือกยีนเป้าหมาย small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) ในการออกแบบไพรเมอร์ (X65163, X56991, AB197936, AB282658, AF113905, X89636, Y11272, X64142, X61116, AB282659, AB282660, S78856, AB282661, Z49256 และ AF149506) เพื่อแยกชนิด *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* และ *E. moshkovskii* ในการตรวจจุลภาวะ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับนำไปตรวจแยกชนิด *Entamoeba* species ทั้งในพื้นที่ที่มีการระบาดและไม่มี การระบาด เนื่องจากมีราคาถูก และสามารถตรวจได้จำนวนมากในแต่ละครั้ง

3. เชื้อโปรโตซัวในเลือด เช่น มาลาเรีย ในปี ค.ศ. 2012 Lulitanond และคณะ [34] ได้ตรวจวินิจฉัยแยกเชื้อมาลาเรีย ชนิด *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* จากตัวอย่างเลือดคนที่ติดเชื้อ โดยเลือก SSU rRNA ของ *P. falciparum* (AF145334) และ *P. vivax* (U83877) มาเปรียบเทียบหาความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อทั้งสองชนิด การเลือกยีนบริเวณเป้าหมายส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน สำหรับการออกแบบหาไพรเมอร์สำหรับเพิ่มขยายปริมาณ ยีนในส่วนนี้จากนั้นเพื่อนำผล PCR ที่ได้ไปทำ pyrosequencing และออกแบบ sequencing primer ส่วนยีนบริเวณที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์แตกต่างกันตัดจาก sequencing primer จะทำให้สามารถแยกชนิดของ *P. falciparum* และ *P. vivax* ได้ โดย

วิธี PCR จะให้ PCR product ขนาด 171 คู่เบส หลังจากการทำ pyrosequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ target region (ตำแหน่งถัดจาก ปลาย 3' ของ sequencing primer) มีจำนวน 21 และ 24 นิวคลีโอไทด์ สำหรับ *P. falciparum* และ *P. vivax* ตามลำดับ มีจำนวน 4 ตำแหน่งที่มีความแตกต่างกัน คือตำแหน่งที่ 1327, 1328, 1340 และ 1341 โดย *P. falciparum* มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด T, G, T และ G ตามลำดับ ส่วน *P. vivax* มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด C, T, A และ T ตามลำดับ โดยตรวจเลือดในผู้ป่วยติดเชื้อมี *P. falciparum* จำนวน 25 ราย และ *P. vivax* จำนวน 17 ราย จากผลการตรวจด้วยวิธีย้อมสี Giemsa ตรวจหาเชื้อมาเลเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing พบว่าให้ผลสอดคล้องกับวิธี pyrosequencing

ทั้งนี้ Kaewkong และคณะ [35] ได้ตรวจแยกเชื้อโปรโตซัวและริกเกตเซียจากเลือดสุนัข ได้แก่ *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* และ *Anaplasma platys* โดยใช้เทคนิค pyrosequencing ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดที่ 1 ออกแบบไพรเมอร์จากยีน 18S ribosomal RNA (18S rRNA) ที่จำเพาะต่อ *B. vogeli* และ *H. canis* ชุดที่ 2 ออกแบบไพรเมอร์จากยีน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) ที่จำเพาะต่อ *E. canis* และ *A. platys* โดยเชื้อโปรโตซัว *B. vogeli* และ *H. canis* สามารถแยกกันได้ในลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ target region มีจำนวน 30 นิวคลีโอไทด์ มีจำนวน 9 นิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกัน คือตำแหน่งที่ 119, 122, 126, 127, 128, 129, 130, 133 และ 142 โดย *B. vogeli* มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด C, G, C, -, -, -, G และ G ตามลำดับ ส่วน *H. canis* มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด T, A, G, T, T, T, G, A และ A ตามลำดับ ในขณะที่ *E. canis* และ *A. platys* แยกกันโดยมีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 15 ตำแหน่ง จาก 34 นิวคลีโอไทด์ถัดจากบริเวณ sequencing primer คือตำแหน่งที่ 40, 41, 42, 43, 45, 49, 51, 53, 54, 55, 58, 64, 66, 67 และ 70 โดย *E. canis* มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด C, A, A, T, A, A, A, C, C, T, G, A, G, A และ T ตามลำดับ ส่วน *A. platys* มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด -, -, -, -, T, G, C, T, A, G, T, -, A, T และ A ตามลำดับ จะเห็นว่าเชื้อทั้ง 4 ชนิดนี้ สามารถตรวจวินิจฉัยได้ด้วยเทคนิค pyrosequencing ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีเห็บเป็นพาหะนำโรคซึ่งยากต่อการควบคุม และการวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต้องอาศัยนักปรสิตที่เชี่ยวชาญ ถ้านำเทคนิคนี้ไปใช้เกี่ยวกับงานทางด้านสัตวแพทย์ตรวจในท้องปฏิบัติการจะทำให้การวินิจฉัยมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นและให้การรักษาที่เหมาะสมได้ และสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยพาหะของโรคเพื่อเฝ้าการระบาดของเชื้อได้

หนอนพยาธิ

1. พยาธิใบไม้

1.1 พยาธิใบไม้ปอด จากการศึกษา Tantrawatpan และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 [26] ได้พัฒนาเทคนิค pyrosequencing

สำหรับแยกชนิดพยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus* 6 ชนิด ได้แก่ *P. heterotremus* (AB354221), *P. macrorchis* (AF159608), *P. siamensis* (AB354222), *P. westermanni* (AB354216), *P. harinasutai* (AB354219) และ *P. bangkokensis* (AB248091) จากการศึกษาที่ออกแบบไพรเมอร์จาก second internal transcribed spacer region (ITS2) มี PCR product ขนาด 165 คู่เบส พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ target region (ตำแหน่งถัดจาก ปลาย 3' ของ sequencing primer) ซึ่งมีจำนวน 39 นิวคลีโอไทด์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ target region ของพยาธิใบไม้ปอดแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน สามารถแบ่งพยาธิใบไม้ปอดได้ 3 กลุ่ม ตามความเหมือนและแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพยาธิ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1, 7 และ 17 เป็นชนิด G, A และ G ตามลำดับ ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ใช้แยกพยาธิ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* ออกจากพยาธิกลุ่มอื่น ขณะที่ *P. bangkokensis* และ *P. harinasutai* สามารถแยกออกจากกันได้โดยดูนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2 โดยที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งนี้ *P. bangkokensis* เป็นชนิด A และ *P. harinasutai* เป็นชนิด G กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพยาธิ *P. heterotremus* และ *P. macrorchis* โดยมีนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3 เป็นชนิด C เป็นชนิดที่จำเพาะสำหรับกลุ่มนี้ และพยาธิ *P. heterotremus* และ *P. macrorchis* สามารถแยกออกจากกันได้ โดยใช้นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 4, 11 และ 28 โดยพยาธิ *P. heterotremus* จะเป็นชนิด G, T, A ขณะที่พยาธิ *P. macrorchis* จะเป็นชนิด C, C, G ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยพยาธิ *P. siamensis* และ *P. westermanni* ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 8 และ 15 เป็นชนิด T และ C ตามลำดับ และเป็นชนิดที่จำเพาะสำหรับพยาธิในกลุ่มนี้ โดยพยาธิ *P. siamensis* และ *P. westermanni* สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5, 11 และ 26 โดยพยาธิ *P. siamensis* เป็นชนิด A, C, T ขณะที่พยาธิ *P. westermanni* เป็นชนิด T, T, C ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสามารถพบการแปรผันของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide variation) ได้ในตำแหน่งที่ 34 ของพยาธิ *P. macrorchis* โดยพบทั้ง นิวคลีโอไทด์ชนิด G และ A ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการศึกษานี้สามารถแยกสายพันธุ์ในระดับ intra-species ของพยาธิ *P. macrorchis* ได้ด้วย

1.2 พยาธิใบไม้เลือด จากการศึกษาของ Thanchomnang และคณะ [27] ได้แยกชนิดพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma japonicum* (FJ176682) และ *S. mekongi* (U89871) โดยเทคนิค pyrosequencing เลือกยีนเป้าหมายในการออกแบบไพรเมอร์คือ 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA) ทำให้ได้ PCR product ขนาด 157 คู่เบส ซึ่งบริเวณ target region ลำดับนิวคลีโอไทด์ถัดจาก sequencing primer มีจำนวน 43 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมี 7 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกัน คือ ตำแหน่งที่ 7, 8, 10, 12, 17, 19 และ 43 โดย *S. japonicum* มี

นิวคลีโอไทด์เป็นชนิด A, G, A, A, C, A และ C ตามลำดับ ส่วน *S. mekongi* มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด G, A, G, G, T, G และ T ตามลำดับ ในการศึกษานี้ได้ตรวจแยกไข่พยาธิในมูลหนู และ cercaria ในหอยที่คิดเชื่อพบว่าเทคนิค pyrosequencing เป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูงสามารถตรวจไข่พยาธิได้ต่ำสุด 2 ฟองในอุจจาระ 100 มิลลิกรัม และ 1 cercaria ในหอยปกติ 10 ตัว โดยจัดทำขึ้นในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากไข่และ cercaria ของพยาธิใบไม้เลือด 2 ชนิดนี้ มีลักษณะใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ทำให้ไม่สามารถระบุ species ของพยาธิได้ แต่วิธี pyrosequencing ทำให้ทราบชนิดของพยาธิ และให้ผลสอดคล้องกับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing

1.3 พยาธิใบไม้ตับและลำไส้ จากการศึกษาของ Tantrawatpan และคณะ [28] พัฒนาเทคนิค pyrosequencing สำหรับแยกชนิดพยาธิใบไม้กลุ่ม fish-borne trematode (FBT) ได้แก่ *Opisthorchis viverrini* (HM004188), *Clonorchis sinensis* (JF823989), *Haplorchis taichui* (HM004187), *Haplorchis pumilio* (HM004191) และ *Stellantchasmus falcatus* (KF241630) โดยเลือกใช้ 28S large subunit ribosomal RNA (28S rRNA) สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งบริเวณ target region ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัดจาก sequencing primer มีจำนวน 46-47 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกัน จำนวน 24 นิวคลีโอไทด์ พยาธิ *O. viverrini* สามารถแยกออกจากพยาธิชนิดอื่นได้โดยดูนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 13, 15, 26, 27, 32, 33, และ 39 มีนิวคลีโอไทด์เป็น T/C, C, C, A, A, C และ C ส่วนพยาธิ *C. sinensis* แยกออกจากพยาธิชนิดอื่นได้โดยดูลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 32, 33, และ 35 มีนิวคลีโอไทด์เป็น C, G และ T ในขณะที่พยาธิ *H. taichui* และ *H. pumilio* แยกจากพยาธิอื่นได้ 3 ตำแหน่งโดยดูนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 5, 28, และ 43 มีนิวคลีโอไทด์เป็น T, T และ T ส่วน *H. taichui* และ *H. pumilio* แยกจากกันได้ 7 ตำแหน่ง คือ 3, 9, 21, 23, และ 45 *H. taichui* มีนิวคลีโอไทด์เป็น C, A, C, T, และ G ส่วน *H. pumilio* มีนิวคลีโอไทด์เป็น T, G, T, C, และ A ตามลำดับ พยาธิ *S. falcatus* แยกออกจากพยาธิชนิดอื่นได้โดยดูนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 37 และ 41 มีนิวคลีโอไทด์เป็น T และ T ซึ่งวิธีนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถแยกไข่พยาธิ *O. viverrini* และ *C. sinensis* ในอุจจาระได้ และตรวจได้ต่ำสุดไข่พยาธิ 1 ฟองในอุจจาระ 100 มิลลิกรัม และแยกระยะ cercaria และ metacercaria ของพยาธิ *O. viverrini* จากพยาธิชนิดอื่นได้ ทั้งนี้สามารถแยก metacercarial ของ *H. pumilio* และ *H. taichui* จากกันได้ ซึ่งวิธีนี้พบว่าให้ผลเร็วกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์ และวิธี Sanger DNA sequencing

2. พยาธิตัวกลม

Sadaow และคณะ [29] ใช้เทคนิค pyrosequencing ในการแยกพยาธิตัวกลมใน genus *Trichinella* ได้แก่ *Trichinella spiralis* (GU339148), *T. pseudospiralis*

(DQ159091), *T. zimbabwensis* (EF517131) และ *T. papuae* (AY851286) โดยนำส่วน large subunit ribosomal RNA (lsu- RNA) ของไมโทคอนเดรียมาใช้สำหรับในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อแยกพยาธิ *Trichinella* โดย PCR product มีขนาด 127 คู่เบส ตำแหน่งเป้าหมายสำหรับใช้แยกพยาธิมี 26 นิวคลีโอไทด์ คือตำแหน่งลำดับที่ 2019 ถึง 2044 โดยตำแหน่งที่จำเพาะของพยาธิ *T. spiralis* ที่ใช้แยกกับพยาธิชนิดอื่น คือ ตำแหน่ง 2028, 2031 และ 2041 มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด G, T และ C ส่วนพยาธิไม่มี capsule คือ *T. pseudospiralis*, *T. zimbabwensis* และ *T. papuae* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ ตำแหน่ง 2028, 2031 และ 2041 คือ A, C และ T ในขณะที่พยาธิ *T. zimbabwensis* และ *T. papuae* ตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับใช้แยกกับพยาธิชนิดอื่น คือ 2030 และ 2039 มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด C และ G ในขณะที่ตำแหน่งที่จำเพาะของพยาธิ *T. pseudospiralis* คือ 2021, 2026 และ 2033 มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด G, T และ C และตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับพยาธิ *T. zimbabwensis* ที่ใช้แยกกับพยาธิชนิดอื่น คือ 2027 มีนิวคลีโอไทด์เป็นชนิด C การศึกษานี้เป็นการรายงานครั้งแรกในการแยกชนิดของตัวอ่อนพยาธิ *Trichinella* โดยใช้เทคนิค pyrosequencing ทั้งนี้ยังสามารถแยกกลุ่มพยาธิที่มี capsule และไม่มี capsule ได้ วิธีนี้แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่รวดเร็ว จำเพาะเหมาะสมสำหรับที่จะนำไปประยุกต์ใช้แยกตัวอ่อนของพยาธิในกลุ่มเนื้อของสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าได้

3. พยาธิตืด

ในปี ค.ศ. 2014 Thanchoomng และคณะ [26] พัฒนาเทคนิค pyrosequencing ในการแยกพยาธิตืด *Taenia saginata* (AB645845), *T. solium* (AB524785) และ *T. asiatica* (AB608739) โดยออกแบบไพรเมอร์จากยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) ซึ่งบริเวณ target region ตัดจาก sequencing primer มีจำนวน 24 นิวคลีโอไทด์ มีตำแหน่งที่แตกต่างกัน จำนวน 6 นิวคลีโอไทด์ที่สามารถแยกชนิดของพยาธิ *Taenia* ได้ ตำแหน่งที่จำเพาะของพยาธิ *T. solium* ที่ใช้สำหรับแยกจากพยาธิ *T. saginata* และ *T. asiatica* คือ 996, 1011, 1012, 1014 และ 1017 โดยพยาธิ *T. solium* มีนิวคลีโอไทด์เป็น T, G/A, G, T และ A ส่วนพยาธิ *T. saginata* และ *T. asiatica* นิวคลีโอไทด์เป็น A, T, A, A และ G ในขณะที่พยาธิ *T. saginata* แยกจาก *T. asiatica* คือตำแหน่ง 1015 มีนิวคลีโอไทด์เป็น T และ G ตามลำดับ สำหรับการตรวจวินิจฉัยพยาธิตืด ทำโดยตรวจหาปล้องสุกหรือส่วนหัวของพยาธิที่ปนออกมากับอุจจาระ โดยดูรูปร่างลักษณะ จะทำให้สามารถแยกชนิดได้ แต่ทั้งนี้ยังมีปัญหาเนื่องจากพยาธิ *T. saginata* และ *T. asiatica* มีรูปร่างลักษณะใกล้เคียงกันทำให้การวินิจฉัยได้ยาก สำหรับการตรวจไข่พยาธิที่พบในอุจจาระภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้น ไม่สามารถแยกชนิดของพยาธิตืดทั้ง 3 ชนิดได้ นอกจากนี้สามารถนำเทคนิค pyrosequencing ไปประยุกต์ใช้ตรวจ cyst พยาธิตืดที่น่าสงสัยในคนหรือในสัตว์ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเทคนิค pyrosequencing เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ แต่อย่างไรก็ตามด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีที่รวดเร็วในปัจจุบัน คาดว่าในอนาคตการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคนี้จะสามารถตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ยาวมากขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตรวมถึงโรคติดเชื้ออื่นๆ ทางห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทสรุป

เทคนิค pyrosequencing เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกเชื้อปรสิตได้หลายชนิด ทั้งโปรโตซัว trematodes cestodes และ nematode ซึ่งมีประโยชน์มากโดยเฉพาะเชื้อปรสิตที่มีรูปร่างลักษณะเหมือนกันไม่สามารถแยกกันได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้เทคนิค pyrosequencing ยังสามารถแยก intra-species และเชื้อปรสิตหลายชนิดได้ในครั้งเดียว ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดของวิธี 1) ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวมากกว่า 140 เบส เนื่องจากอาจจะทำให้ pyrogram ที่ได้ไม่ถูกต้องและไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ 2) ถ้าบริเวณ Target region มีลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันเรียงซ้ำกันมากกว่า 4 เบส หรือมากกว่า จะทำให้ความสูงของ pyrogram ไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนนิวคลีโอไทด์ ซึ่ง software ของเครื่อง pyrosequencing อาจจะไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ กรณีนี้จำเป็นต้องวิเคราะห์ข้อมูลด้วยตัวบุคคล แทนการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้แสดงให้เห็นว่าเป็นเทคนิคที่มีความไว ความจำเพาะสูง ตรวจได้รวดเร็วและสามารถตรวจได้จำนวนมากในแต่ละครั้ง (high throughput) มีราคาถูก เหมาะสำหรับการเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำไปตรวจในห้องปฏิบัติการ และในประเทศที่เป็นแหล่งระบาดของโรคเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยในการแยกเชื้อปรสิตมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998;281(5375):363-5.
- Nyrén P. The History of Pyrosequencing. *Methods Mol Biology*. 2007;373:1-14.
- Nilsson HO, Ouis IS, Stenram U, Ljungh A, Moran AP, Wadstrom T, *et al*. High prevalence of *Helicobacter* species detected in laboratory mouse strains by multiplex PCR denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *J Clin Microbiol*. 2004;42(8):3781-8.
- Gharizadeh B, Kalantari M, Garcia CA, Johansson B, Nyrén P. Typing of human papillomavirus by pyrosequencing. *Lab Invest*. 2001;81(5):673-9.
- Elahi E, Pourmand N, Chaung R, Rofoogaran A, Boisver J, Samimi-Rad, K, *et al*. Determination of hepatitis C virus genotype by pyrosequencing. *J Virol Methods*. 2003;109(2):171-6.
- Troell K, Mattsson JG, Alderborn A, Höglund J. Pyrosequencing analysis identifies discrete populations of *Haemonchus contortus* from small ruminants. *Int J Parasitol*. 2003;33(7):765-71.
- Maleewong W, Wongkham C, Intapan P, Pariyanonda S, Morakote N. Excretory-secretory antigenic components of *Paragonimus heterotremus* recognized by infected human sera. *J Clin Microbiol* 1992;30(8):2077-9.
- Lal RB, Ottesen EA. Enhanced diagnostic specificity in human filariasis by IgG4 antibody assessment. *J Infect Dis* 1988;158(5):1034-7.
- Rascoe LN, Price C, Shin SH, McAuliffe I, Priest JW, Handali S. Development of Ss-NIE-1 recombinant antigen based assays for immunodiagnosis of strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):e0003694. doi: 10.1371/journal.pntd.0003694.
- Felgner J, Juarez S, Hung C, Liang LI, Jain A, Döşkaya M, *et al*. Identification of *Toxoplasma gondii* antigens associated with different types of infection by serum antibody profiling. *Parasitology*. 2015;142(6):827-38.
- Wongkamchai S, Choochote W, Jitpuckdee A, Suvannadabba S, Loymak S, Sakolvaree Y, *et al*. An antigen detection assay for diagnosing filariasis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003;21(4):241-51.
- Gao CH, Yang YT, Shi F, Wang JY, Steverding D, Wang X. Development of an immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis based on detection of a circulating antigen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003902. doi: 10.1371/journal.
- Ramzy RM, Farid HA, Kamal IH, Ibrahim GH, Morsy ZS, Faris R, *et al*. A polymerase chain reaction-based assay for detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood and

- Culex pipiens*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997;91(2):156-160.
14. Gonza'lez LM, Montero E, Morakote N, Puente S, Di'az de Tuesta JL, et al. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiatica* taeniasis through PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49(3):183-8.
 15. Wongsawad C, Wongsawad P. *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui*: development of a multiplex PCR assay for their detection and differentiation using specific primers derived from HAT-RAPD. Exp Parasitol. 2012;132(2):237-42.
 16. Masanja IM, McMorrow ML, Maganga MB, Sumari D, Udhayakumar V, McElroy PD, et al. Quality assurance of malaria rapid diagnostic tests used for routine patient care in rural Tanzania: microscopy versus real-time polymerase chain reaction. Malar J. 2015;14:85. doi: 10.1186/s12936-015-0597-3.
 17. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5517-24.
 18. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. Clin Chem. 2006;52(2):303-6.
 19. Thekisoe OM, Kuboki N, Nambota A, Fujisaki K, Sugimoto C, Igarashi I, et al. Species specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. Acta Trop. 2007;102(3): 182-9.
 20. Cai XQ, Xu MJ, Wang YH, Qiu DY, Liu GX, Lin A, et al. Sensitive and rapid detection of *Clonorchis sinensis* infection in fish by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Parasitol Res. 2010; 106(6): 1379-83.
 21. Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia* tapeworms from human: application to a field survey. Parasitol Int. 2012;61(4):723-5.
 22. Thanchomnang T, Intapan PM, Chungpivat S, Lulitanond V, Maleewong W. Differential detection of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* by real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and its evaluation for diagnosis of *B. pahangi*-infected dogs. Parasitol Res. 2010;106(3):621-5.
 23. Sanpool O, Intapan PM, Thanchomnang T, Janwan P, Lulitanond V, Doanh PN, et al. Rapid detection and differentiation of *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* eggs in human fecal samples using a duplex real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. Parasitol Res. 2012;111(1):89-96.
 24. Thanchomnang T, Intapan PM, Tantrawatpan C, Lulitanond V, Chungpivat S, Taweethavonsawat P, et al. Rapid detection and identification of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and blood samples by high resolution melting real-time PCR. Korean J Parasitol. 2013;51(6):645-50.
 25. Masanja IM, McMorrow ML, Maganga MB, Sumari D, Udhayakumar V, McElroy PD, et al. Quality assurance of malaria rapid diagnostic tests used for routine patient care in rural Tanzania: microscopy versus real-time polymerase chain reaction. Malar J. 2015;14:85. doi:10.1186/s12936-015-0597-3.
 26. Tantrawatpan C, Intapan PM, Lulitanond V, Srichantaratsamee C, Anamnart W, Maleewong W. Molecular identification of *Paragonimus* species by DNA pyrosequencing technology. Parasitol Int. 2013;62(3):341-5.
 27. Thanchomnang T, Tantrawatpan C, Intapan PM, Sri-Aroon P, Limpanont Y, Lulitanond V, et al. Pyrosequencing for rapid molecular identification of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* eggs and cercariae. Exp Parasitol. 2013;135(1):148-52.
 28. Tantrawatpan C, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Lulitanond V, et al. Development of a PCR assay and pyrosequencing

- for identification of important human fish-borne trematodes and its potential use for detection in fecal specimens. *Parasit Vectors*. 2014;7:88. doi: 10.1186/1756-3305-7-88.
29. Sadaow L, Tantrawatpan C, Intapan PM, Lulitanond V, Boonmars T, Morakote N, *et al*. Molecular differentiation of *Trichinella spiralis*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* and *T. zimbabwensis* by pyrosequencing. *J Helminthol*. 2013;13:1-6.
 30. Thanchomnang T, Tantrawatpan C, Intapan PM, Sanpool O, Janwan P, Lulitanond V, *et al*. Rapid molecular identification of human taeniid cestodes by pyrosequencing approach. *PLoS One*. 2014;9(6):e100611. doi: 10.1371/journal.
 31. Edvinsson B, Dardé ML, Pelloux H, Evengård B; ESCMID Study Group on Toxoplasmosis. Rapid genotyping of *Toxoplasma gondii* by pyrosequencing. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(4):424-9.
 32. Stensvold CR, Traub RJ, von Samson-Himmelstjerna G, Jespersgaard C, Nielsen HV, Thompson RC. *Blastocystis*: subtyping isolates using pyrosequencing technology. *Exp Parasitolol*. 2007;116(2):111-9.
 33. Stensvold CR, Lebbad M, Verweij JJ, Jespersgaard C, von Samson-Himmelstjerna G, Nielsen SS, *et al*. Identification and delineation of members of the *Entamoeba* complex by pyrosequencing. *Mol Cell Probes*. 2010;24(6):403-6.
 34. Lulitanond V, Intapan PM, Tantrawatpan C, Sankuntaw N, Sanpool O, Janwan P, *et al*. Molecular markers for detection and differentiation of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in human blood samples by pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1455-7.
 35. Kaewkong W, Intapan PM, Sanpool O, Janwan P, Thanchomnang T, Kongklieng A, *et al*. High throughput pyrosequencing technology for molecular differential detection of *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in canine blood samples. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5(4):381-5.