**คู่มือการใช้ ABIapp อย่างง่าย**

**ข้อมูลทั่วไปของ ABIapp**

แอปพลิเคชัน ABIapp (**A**pplying taxonomic **B**oundaries for species **I**dentification) พัฒนาขึ้นสำหรับผู้ที่ต้องการตัวช่วยในการจำแนกชนิดของปรสิตหนอนพยาธิ โดยใช้ฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank sequence database) ของเชื้อปรสิตหนอนพยาธิก่อโรคทั้งหมดที่เป็นปัจจุบันเพื่อกำหนดค่า cut-off ของระดับชั้นทางอนุกรมวิธานตั้งแต่ระดับสปีชีส์ (species) ถึงอันดับ (order) โดยใช้ machine learning algorithm (Chan et al. 2021) ABIapp ใช้งานง่ายเพียงผู้ใช้มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของเครื่องหมายพันธุกรรมระดับโมเลกุล (molecular genetic marker) ที่มักใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อปรสิตหนอนพยาธิ (18S rRNA, 28S rRNA, ITS1, ITS2, *COI*, *COII*, *cytB*, *ND1*, 12S rRNA และ 16S rRNA) และกรอกข้อมูลดังกล่าว แอปพลิเคชันจะบอกถึงสถานะทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างพร้อมแนะนำทางเลือกในกรณีที่ molecular genetic marker ที่ใช้ยังไม่เหมาะสม

**ปัญหาของการระบุชนิดของปรสิตหนอนพยาธิ**

การระบุสปีชีส์ของปรสิตหนอนพยาธิโดยลักษณะทางสัณฐานเกิดอุปสรรคได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น ลักษณะทางสัณฐานที่คลุมเครือและความยืดหยุ่นแปรผันของลักษณะสัณฐานที่ปรากฎ (Phenotypic plasticity) ทำให้การจัดจำแนกบางครั้งสามารถทำได้เพียงระดับสกุล (genus) ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ นอกจากจะมีข้อมูลจากเครื่องหมายพันธุกรรมระดับโมเลกุลที่สามารถจัดจำแนกชนิดจากระดับความแปรผันทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามการกำหนดขอบเขตของสปีชีส์ยังเป็นปัญหาที่ท้าทายเนื่องจากความแปรผันทางพันธุกรรมจะมีระดับที่ต่างกันได้จากชนิดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้ รวมทั้งความแตกต่างของระดับความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มพยาธิที่ไม่สามารถนำมาเทียบกันได้ เช่นระหว่างกลุ่มพยาธิตัวกลมและพยาธิใบไม้

**ประโยชน์ที่ได้รับจาก ABIapp**

แอปพลิเคชัน ABIapp ใช้หลักการเทียบระยะห่างทางพันธุกรรมที่ตรงไปตรงมาเพื่อกำหนดขอบเขตและระบุสถานะทางอนุกรมวิธานของปรสิตหนอนพยาธิทั้งกลุ่มพยาธิตัวกลม ตัวตืด และพยาธิใบไม้ ซึ่งบ่อยครั้งมักประสบปัญหาในการจำแนกสายพันธุ์จากเพียงลักษณะสัณฐาน เนื่องจากมีลักษณะคลุมเครือ หรือตัวอย่างที่ได้ไม่สมบูรณ์ โดย ABIapp จะบอกถึงระดับทางอนุกรมวิธานของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างว่ามีในขอบเขตสถานะทางอนุกรรมวิธานใด เป็นสปีชีส์เดียวกันหรือต่างกัน โดยบอกขอบเขตความต่างได้ถึงระดับอันดับ ABIapp สามารถใช้ได้กับปรสิตหนอนพยาธิก่อโรคในคนและสัตว์ทุกกลุ่ม โดยผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญในการจำแนกสายพันธุ์จากลักษณะสัณฐานเพียงทราบว่าเป็นพยาธิในกลุ่มหรือวงศ์ (family) ใดก็สามารถใช้ประโยชน์จากแอปพลิเคชันนี้ได้

ก่อนเริ่ม

ควรระบุชนิดหรือกลุ่มของพยาธิจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตาม หากไม่สามารถระบุได้เนื่องจากตัวอย่างไม่สมบูรณ์ ผู้ใช้สามารถใช้ข้อมูลทางชีววิทยาหรือข้อมูลทางคลินิคในการพิจารณากลุ่มของพยาธิที่น่าจะเป็น ในการใช้แอปพลิเคชัน ผู้ใช้ต้องมีข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้เครื่องหมายทางพันธุกรรมตัวตัวใดตัวหนึ่งที่ระบุไว้ด้านบน แล้วนำข้อมูลที่ได้ไป BLAST หากลุ่มของชนิดของพยาธิที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงที่มีข้อมูลใน GenBank Sequnece Database จากนั้นนำสปีชีส์ที่ใกล้เคียงมาวิเคราะห์ร่วมกันประมาณ 3-5 ชนิด มาคำนวนหาระยะห่างทางพันธุกรรมแบบคู่ (pairwise distance) ระหว่างรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างที่สนใจจาก friendly-used program เช่น MEGA เป็นต้น

การใช้ ABIapp

ABIapp ต้องการข้อมูลต่อไปนี้: ค่าระยะทางทางพันธุกรรม กลุ่มความสนใจของหนอนพยาธิ และเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้

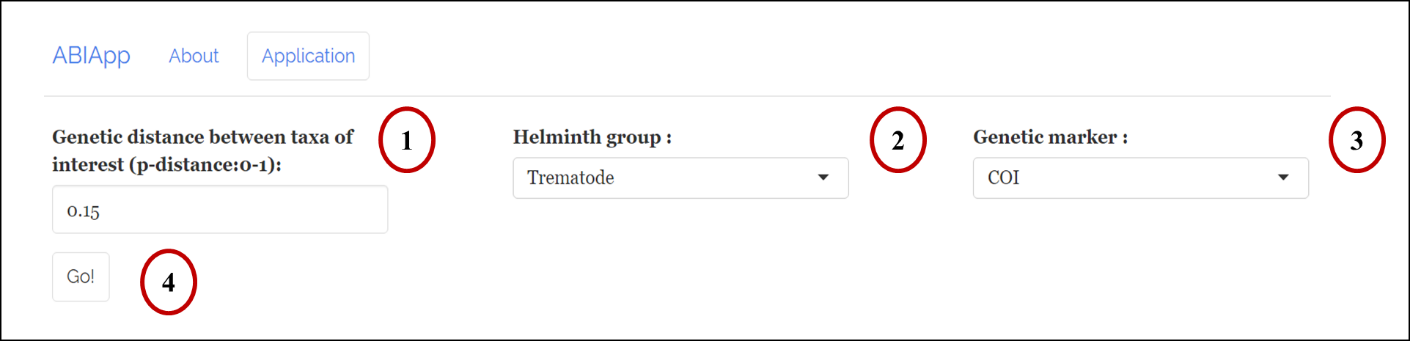
1. ป้อนค่าระยะทางทางพันธุกรรม (0 ถึง 1)

2. เลือกกลุ่มที่สนใจของหนอนพยาธิ:

3. เลือกเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้เพื่อให้ได้ระยะทางพันธุกรรม:

18S rRNA, 28S rRNA, ITS1, ITS2, *COI*, *COII*, *cytB*, *ND1*, 12S rRNA, 16S rRNA

4. เลือก 'ไป!' เพื่อเรียกใช้แอปพลิเคชัน



การตีความผลลัพธ์:

ABIapp แสดงผลผ่าน:

* การแสดงภาพกราฟิก โดยที่ค่าระยะทางทางพันธุกรรมที่สอบถามจะถูกระบุด้วยเส้นประสีเทาเทียบกับช่วงของระยะทางทางพันธุกรรมสำหรับระดับลำดับชั้นการจัดหมวดหมู่แต่ละระดับ

Timeline

Description automatically generated with medium confidence

* การตีความผลลัพธ์ที่ได้รับในกล่องข้อความ ซึ่งตัวอย่างได้แก่:

1. ‘They are different species/genera/family/order’ ระบุสองชนิด/สกุล/วงศ์/ลำดับที่ต่างกัน เนื่องจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่สอบถามอยู่ในค่าต่ำสุดและสูงสุดในระดับอนุกรมวิธานตามลำดับ

2. Out of bounds’ – บ่งชี้ความเป็นไปได้ของสปีชีส์ที่คลุมเครือ สปีชีส์ย่อย หรือระดับประชากร เนื่องจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่สืบค้นต่ำกว่าค่าต่ำสุดที่ระดับสปีชีส์

3. ‘Suggest to use another genetic marker’ – ระบุว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมอื่นอาจเหมาะสมกว่าสำหรับการกำหนดขอบเขตของสายพันธุ์ของอนุกรมวิธานที่สนใจที่เลือก เนื่องจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่สอบถามอยู่ระหว่างสองระดับการจัดอนุกรมวิธาน

They are different species

* ตารางแสดงค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระยะห่างทางพันธุกรรมโดยประมาณโดยใช้ค่า K-mean พร้อมเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ระบุและกลุ่มที่สนใจของหนอนพยาธิ

Graphical user interface

Description automatically generated

จากตัวอย่างข้างต้น ระยะห่างทางพันธุกรรมที่สอบถามสำหรับพยาธิใบไม้ 2 แท็กซ่า โดยใช้ยีน COI คือ 0.15 โดยตาม ABIapp ระยะทางทางพันธุกรรมที่ 0.15 อยู่ในระดับ interspecies ซึ่งบ่งชี้ว่าพยาธิใบไม้ทั้งสองเป็นสปีชีส์ที่แตกต่างกัน ตารางยังแสดงให้เห็นว่าระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยที่ระดับสปีชีส์คือที่ 0.146 จากช่วงระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์อยู่ระหว่าง 0.087 ถึง 0.177

ในอีกตัวอย่างหนึ่ง หากระยะห่างทางพันธุกรรมที่สอบถามสำหรับพยาธิใบไม้สองแท็กซ่า โดยใช้ยีน COI คือ 0.18 ระยะห่างทางพันธุกรรมจะอยู่ระหว่างสปีชีส์และระดับสกุล (Genus) ผลที่ได้จาก ABIapp โดยใช้ยีน COI จะไม่สามารถระบุระดับอนุกรมวิธานของตัวอย่างที่ศึกษาได้ แนะนำให้ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดอื่นเพื่อการวิเคราะห์ตีความผลลัพธ์ที่ดีขึ้น โดย ABIapp จะแนะนำเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีศักยภาพให้แก่ผู้ใช้ในกล่องสีแดง ในกรณีนี้ แนะนำให้ใช้ยีน mitochondrial 16S rRNA เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมอีกตัวหนึ่งเพื่อตีความผลลัพธ์ได้ดีขึ้น แม้ว่ายีน rRNA ของไมโตคอนเดรีย (12S และ 16S) ยังไม่ได้รับความนิยมในการจัดจำแนกปรสิตหนอนพยาธิ อย่างไรก็ดี ได้มีการพิสูจน์ความเหมาะสมในการจำแนกสปีชีส์ที่มีความหลากหลายรวมทั้งสปีชีส์คลุมเครือได้อย่างดี (Chan et al. 2020, 2021, 2022)

A picture containing diagram

Description automatically generated

Suggest to use mt 16S

ข้อมูลเพิ่มเติมและสมมติฐานสำหรับ ABIapp สามารถพบได้บนหน้าเว็บแอปพลิเคชัน <https://slphyx.shinyapps.io/ABI>.

หมายเหตุ: เพื่อความสะดวกแก่ผู้ใช้ ABIapp ไพเมอร์สำหรับการทำ PCR เพื่อให้ได้ DNA sequences อยู่บนหน้า webpage ของแอปพลิเคชัน

**เอกสารอ้างอิง**

Chan AHE, Chaisiri K, Morand S, Saralamba N, Thaenkham U. (2020) Evaluation and utility of mitochondrial ribosomal genes for molecular systematics of parasitic nematodes. Parasites & Vectors. 13(364)

Chan AHE, Chaisiri K, Saralamba S, Morand S, Thaenkham U. (2021) Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for molecular systematics and species identification of helminths. Parasites & Vectors. 14(233)

Chan AHE, Saralamba N, Saralamba S, Ruangsittichai J, Thaenkham U. (2022) The potential use of mitochondrial ribosoma genes (12S and 16S) in DNA barcoding and phylogenetic analysis of trematodes. BMC Genomics.