

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

การสำรวจพยาธิใบไม้ที่พบในกระเพาะลำไส้ของโคในประเทศไทย

Paramphistomum siamense Stiles & Goldberger, 1910 และ *Fischoederius siamense* Stiles & Goldberger, 1910 เป็นพยาธิในกลุ่ม amphistome ชนิดแรกที่มีการรายงานจาก Thai ruminants แต่ต่อมาภายหลังพบว่า เป็น synonym กับ *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) และ *Fischoederius elongatus* (Poirier, 1883) ตามลำดับ หลังจากนั้น Railliet (1924) รายงาน *Paramphistomum* (syn. *Orthocoelium*) *parvipapillatum* Stiles & Goldberger, 1910 จากโคและกระบือ ในปี 1971 Lee & Lowe รายงานว่าพบ *F. elongatus*, *F. cobboldi* และ *O. orthocoelium* (Fischoeder, 1901) จากโคและกระบือ และเมื่อเร็วๆ นี้ Eduardo (1983) พบ *Calicophoron calicophorum* ในโคและกระบือไทย (Sey et al., 1997)

สุภาภรณ์ (2525) รายงานถึงพยาธิใบไม้ที่พบในกระเพาะอาหารส่วน rumen และ reticulum ของโค กระบือ แพะ แกะ ในประเทศไทยว่าพบอยู่เพียง family เดียวคือ family Paramphistomatidae เป็นพยาธิที่มีลำตัวหนา ventral sucker เลื่อนไปอยู่ทางส่วนท้ายของลำตัว มีขนาดใหญ่และแข็งแรงมาก ภายในตัวอาจจะมีถุงอยู่ส่วนล่างของลำตัว ทำให้เกิดเป็นช่องว่างขึ้นทางด้าน ventral เรียกว่า ventral pouch ส่วน oral sucker มีขนาดเล็ก ไม่มี pharynx มีแต่ esophagus intestine แยกออกเป็น 2 สาย ปลายตัน ผิวหนังเรียบ ไม่มีหนาม รูเปิดอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ทางด้านล่าง ก่อนไปทางส่วนหน้าของลำตัว testes มี 2 อันขนาดใหญ่ อยู่ด้านหน้าของ ovary ซึ่งมีขนาดเล็กมาก vitellaria เจริญดี อยู่ทางด้านข้างตลอดลำตัว uterus ขดอยู่ตรงกลางของลำตัว แบ่งออกเป็น 2 Subfamilies คือ subfamily Paramphistominae พบ 3 genus คือ genus *Paramphistomum* พบ 2 ชนิด ได้แก่ *P. cervi* และ *P. gotoi* genus *Cotylophoron* พบเพียงชนิดเดียวคือ *Cotylophoron cotylophorum* และ genus *Calicophoron* พบเพียงชนิดเดียวคือ *Calicophoron calicophorum* ส่วนอีก subfamily หนึ่งคือ subfamily Gastrothylaxinae พบ 3 genus ได้แก่ genus *Gastrothylax* และ genus *Fischoederius* พบ 2 ชนิดคือ *F. elongatus* และ *F. cobboldi* และอีก genus หนึ่งคือ *Carmyerius* พบอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ *C. spatiosus* และ *C. gregarius*

Sey *et al.*, (1994) สํารวจพยาธิใบไม้ใน rumen และ bile duct ของโคและกระบือในจังหวัดสิงห์บุรีและกรุงเทพฯ พบพยาธิใบไม้ 10 ชนิดคือ *Gastrotylax crumenifer* (Creplin, 1847), *Carmyerius spatiosus* (Brandes, 1898), *Fischoederius elongatus* (Poirier, 1883), *Orthocoelium streptocoelium* (Fischoeder, 1901), *O. dicranocoelium* (Fischoeder, 1901), *O. parvipapillatum* (Stile & Goldberger, 1901), *Paramphistomum epiclitum* Fischoeder, 1904, *P. ichikawai* Fukui, 1922, *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) และ *Calicophoron calicophorum* (Fischoeder, 1901)

โรคที่มีสาเหตุมาจากพยาธิใบไม้ในกลุ่มนี้เรียกว่า paramphistomosis หรือ amphistomosis (Sey, 1991) โดยสัตว์ที่ติดพยาธิเข้าไปมากจะแสดงอาการเบื่ออาหารอย่างรุนแรง กินน้ำมาก ผิดปกติ และอุจจาระเหลวมีกลิ่น จำเป็นต้องให้การรักษาย่างเร่งด่วนเนื่องจากความรุนแรงนี้ทำให้สัตว์ถึงตายได้ โดยเฉพาะในโค แกะที่มีอายุน้อยและไม่เคยติดโรคมัก่อน (พีรศักดิ์, 2530)

พยาธิใบไม้กลุ่มนี้ยากที่จะจัดจำแนกจากลักษณะทาง systematic point แต่ Sey (1991) ได้ใช้วิธีการทาง histological examination มาช่วยในการจำแนกโดยดูจากลักษณะของ muscular organs (acetabulum, terminal genitalium และ pharynx) แต่การทำค่อนข้างใช้เวลาและลักษณะที่ดูค่อนข้างยาก ดังนั้นการศึกษครั้งนี้จึงได้พยายามหาวิธีใหม่ ๆ มาช่วยในการจำแนกความแตกต่างของพยาธิในกลุ่มนี้โดยนำเอาเทคนิค High Annealing Temperature - Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) มาใช้โดยเทคนิคนี้ดัดแปลงมาจากเทคนิค RAPD ซึ่งใช้ได้ผลมาแล้วในการแยกความแตกต่างในพยาธิหลายชนิด ได้แก่ *Proteocephalus* (Kral'ova, 1996), *Echinostoma* (Petrie *et al.*, 1996), *Metagonimus* (Yu *et al.*, 1997), *Neoechinorhynchus* (Dezfuli and Tinti, 1998) และ *Trichinella* (Pozio *et al.*, 1999)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis

เทคนิค RAPD เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเออีกแบบหนึ่งซึ่งประยุกต์มาจากเทคนิค PCR ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยวที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (single arbitrary primer) มีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ และมี C+G content มากกว่า 50% เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยทั่วไปในขั้น annealing จะใช้อุณหภูมิระหว่าง 33-38°C (Cunningham and Mo, 1997; Yu *et al.*, 1997; Dezfuli and Tinti, 1998) แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์, 2540; Grosberg *et al.*, 1996)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหลายรอบ (cycles) ซึ่งในแต่ละรอบของ PCR มี 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. Denaturation เกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90°C - 95°C ทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยว (two single strands) ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์

2. Primer annealing ในขั้นนี้ primers 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับปลาย 3' (3'-end) ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละสายจะเข้าไปจับตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมบนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing sites) ในการทดลองครั้งนี้จะใช้อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิปกติประมาณ 10°C หรือมากกว่า 46°C จึงเรียกว่า HAT-RAPD (Anuntalabhochai *et al.*, 2000)

3. Primer extension ขั้นตอนการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอ เกิดโดยเอนไซม์ DNA Tag Polymerase ซึ่งทำหน้าที่ต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของ primers ทั้ง 2 ในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 72°C

เมื่อทำซ้ำจำนวนหลายๆ รอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากเดิมได้อย่าง exponential โดยมีจำนวนผลผลิต (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ 100% (วัชรและมนตรี, 2536; ทวีศักดิ์, 2541; พรงาม, 2541) (รูป 1)

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

1. ดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปในเทคนิค RAPD นิยมใช้อยู่ในช่วง 10-25 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

2. ไพร์เมอร์ โดยทั่วไปจะละลายในน้ำหรือ TE buffer ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 40 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

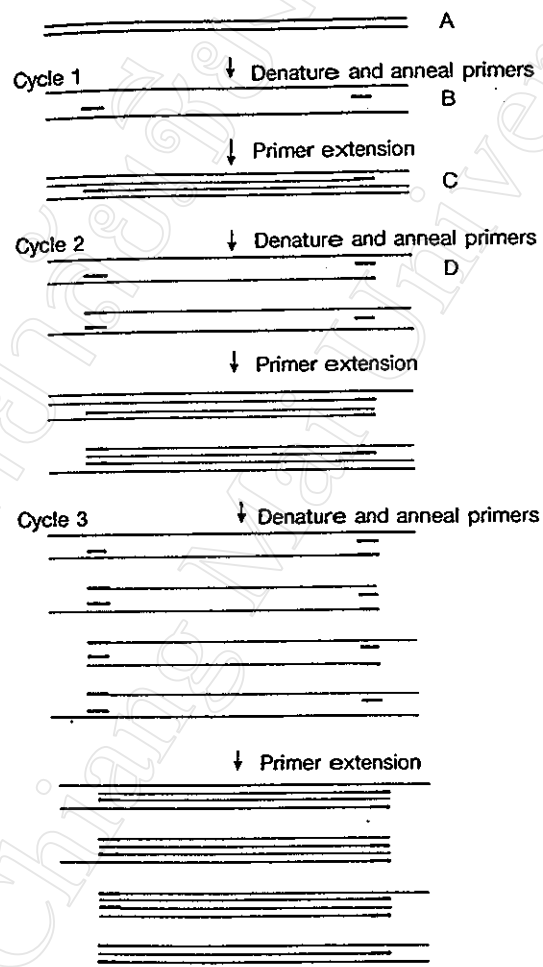
3. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาจะใส่ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 150-200 ไมโครโมลาร์

4. บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใช้เพียง 1 เท่าในปฏิกิริยา

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่จะแยกต่างหาก เพื่อให้ปรับใช้ได้ ปริมาณที่เหมาะสมกับแต่ละปฏิกิริยาเนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีเมอเรส และมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีผลต่อปฏิกิริยามาก ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ได้คือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์ในปฏิกิริยา ดังนั้นในการ

ทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน ต้องทดลองก่อนเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

6. เอนไซม์ ที่นิยมใช้ คือ DNA Tag Polymerase ซึ่งมักจะอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร โดยทั่วไปใช้ในปฏิกิริยา 2.5-5 หน่วยต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2542) แต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้ 0.5 หน่วยต่อปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร (Anuntalabhochai *et al.*, 2000)



รูป 1 หลักการ Polymerase Chain Reaction

- A ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนซึ่งเป็นเส้นคู่
- B แยกดีเอ็นเอออกเป็นเส้นเดี่ยวด้วยความร้อนสูงและทำให้เย็นลงเพื่อให้ primer 1 และ 2 ไป anneal กับแต่ละเส้นของดีเอ็นเอ
- C *Taq* polymerase จะสร้าง DNA ซึ่ง complementary กับ template
- D เข้ารอบที่สองของ PCR reaction

การตรวจสอบผลของ PCR product ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักว่าชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกันและจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้ามกัน การแยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสนั้นจะมีตัวกลางเป็นที่รองรับให้ชีวโมเลกุลเคลื่อนที่ผ่านไปซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีคุณสมบัติเฉื่อย ตัวกลางที่ใช้กันมากสำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิสในปัจจุบัน คือ agarose และ polyacrylamide (พิณทิพ, 2536)

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวกเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีจำนวนหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นกับขนาดเป็นส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังนี้

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

2. รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ดีเอ็นเอที่มีรูปแบบเป็น วงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoil หรือ covalently closed circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง (linear)

3. เบอรเซ็นต์และชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเบอรเซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้แยกกรดนิวคลีอิก คือ โพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1,000 คู่เบส และอะกาโรสเจล (agarose gel) ใช้แยก ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50,000 คู่เบส

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อน ไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสจะต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้า แยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ (diffusion) ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TAE, TBE และ TPE ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน TAE ใช้ได้ทั่วไปและใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก แต่มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นเวลานานมากหรือควรให้มีการหมุนเวียนของบัฟเฟอร์ (recirculation) TBE นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 1 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์

ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับอะกาโรสเจลได้ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก ส่วน TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็ว แต่ไม่เหมาะถ้ามีการสกัดดีเอ็นเอจากเจลและตกตะกอนด้วยเอธานอล เพราะจะเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตด้วย การเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2542)

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในการจำแนกความแตกต่างของพยาธิ

ปัจจุบันการศึกษาพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของหนอนพยาธิได้แพร่หลายมากขึ้นเนื่องจากให้ผลที่แม่นยำ โดยเฉพาะเทคนิค isoenzyme electrophoresis และ Restriction Fragment Polymorphism (RFLP) ซึ่งด้วยขนาดของพยาธิแต่ละตัวมีขนาดเล็กจึงเป็นข้อจำกัดของเทคนิคทั้งสอง แต่ข้อจำกัดนี้ไม่มีผลในเทคนิค PCR (Minchella *et al.*, 1997) RAPD ก็เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่เกิดขึ้นมาจากเทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมมาก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ ตรวจสอบความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ สปีชีส์ จินัส ฯลฯ เป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการศึกษาด้าน genetic variability และยังช่วยเพิ่มข้อมูลอันเป็นประโยชน์นอกเหนือจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางด้าน morphology, isozyme และ RFLP (บุรุษย์, 2536; Barral *et al.*, 1993) เทคนิค RAPD ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาในพยาธิหลายๆชนิด เช่น

พยาธิปลิงใส (monogenea) ในปี 1997 Cunningham and Mo ทำการศึกษา *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 จากปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ซึ่งจับจากแม่น้ำ Batnfjordselva, Lierelva และ Litledalselva ใน ประเทศ Norway โดยใช้เทคนิค RAPD ผลการศึกษาพบว่า 2 primers (OPA15 และ OPB18) จาก 40 primers (OPA และ OPB 10-mer primer kits; VH Bio Ltd, Newcastle, U.K.) แสดงให้เห็นความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่าง *G. salaris* ที่ได้จากปลาต่างแม่น้ำกัน

พยาธิใบไม้ (digenea) Petrie *et al.*, (1996) ศึกษา genomic DNA ของ *Echinostoma caproni* และ *E. paraensei* ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ primers (5'-TCGTAGCCAA-3') และ (5'-TCACGATGCA-3') ซึ่งมีรายงานว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง species และ strains ของ *Schistosoma* ได้ ผลการศึกษาพบว่าจากแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก primers ทั้งสองสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *E. caproni* และ *E. paraensei* ได้ และได้เสนออีกว่าเทคนิค RAPD อาจจะสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง species และ strains ของ echinostome ซึ่งยังสับสนอยู่ได้ พร้อมทั้งยังสามารถประยุกต์เทคนิคนี้ไปใช้ในการจัดจำแนก trematode อื่นๆได้ ต่อมาในปี 1997 Yu *et al.* นำเอาเทคนิค RAPD มาใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *Metagonimus yokogawai* และ *Metagonimus Miyata* type โดยใช้ 20 primers (Kit A, Operon Technologies Inc.,

California, USA) ผลการศึกษาพบ 8 primers (OPA02, OPA09, OPA10, OPA11, OPA13, OPA17, OPA19 และ OPA20) ที่ให้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่าง *Metagonimus* 2 ชนิด ถัดมาในปี 1999 Davies *et al.* ศึกษาพยาธิใบไม้ *Schistosoma haematobium* จากหอย *Bulinus globosus* ซึ่งจับจาก 8 river sites ด้วยเทคนิค RAPD พบ variability ระหว่าง Schistosome populations ที่ได้จากหอยที่มาจากแม่น้ำ 2 สายที่แยกจากกันชัดเจน ในขณะที่เดียวกัน Sandoval *et al.*, (1999) ศึกษา genetic variability ในระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ *Dicrocoelium dendriticum* ซึ่งได้จากตับของแกะจากแหล่งต่างๆใน Leon province (NW Spain) ด้วยเทคนิค RAPD โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variability) ทั้งภายในและภายนอกประชากรด้วยวิธี means of the Jaccard similarity และสร้าง dendrograms ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ระหว่างพยาธิที่ได้จากแกะคนละตัวโดย FITCH method ผลการศึกษาพบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง และค่า genetic similarity ของพยาธิภายในประชากรเดียวกัน (แกะตัวเดียวกัน) มีค่าใกล้เคียงกับค่า average similarity ระหว่างพยาธิที่มาจากแกะคนละตัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแกะแต่ละตัวถูก infect ด้วยพยาธิจากมดหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งประชากร ในปีถัดมา Tsai *et al.*, (2000) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพยาธิใบไม้ใน *Schistosoma mansoni* หลายๆสายพันธุ์จากหลายๆพื้นที่ที่มีรายงานว่า resistance หรือ sensitive ต่อ anti-schistosomal drugs โดยใช้เทคนิค RAPD จาก 20 RAPD primers พบ 6 primers ที่ให้ PCR bands ที่แตกต่างกันระหว่าง drug-resistant strain และ drug-sensitive strain และยังพบว่า primer (5'-CAGCGACAAG-3') ให้ 2 bands หลักที่แตกต่างกันระหว่าง praziquantel (PZQ)-resistant strain and PZQ-sensitive strain

พยาธิตัวตืด (cestode) ในปี 1996 Kral'ova แยกความแตกต่างของ *Protocephalus exiguus* และ *P. percae* ซึ่งมีลักษณะ morphology คล้ายกันด้วยเทคนิค RAPD และพบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก primers OPA04 และ OPA12 แสดง intraspecific variability ระหว่าง *P. percae* ซึ่งได้จากปลาคนละพื้นที่ ต่อมา Reddy *et al.*, (1998) ใช้เทคนิค RAPD จำแนกความแตกต่างระหว่างพยาธิตัวตืด *Echinococcus granulosus* สายพันธุ์ที่มาจากกระบือ (bubaline strain) จากโค (bovine strain) และ buffalo host DNA พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่าง *E. granulosus* ทั้งสอง isolates และได้เลือก fragment ขนาด 0.9 kb ที่เกิดจากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของ *E. granulosus* buffalo isolate โดย primer AP2 (5'-TGCCGAGCTG-3') มาใช้เป็น DIG-labelled DNA probe แล้วนำไปทำ dot-blot hybridization กับ genomic DNA ของทั้งหมดพบว่า buffalo *E. granulosus* isolate ต่างจาก bovine isolate และ bubaline host DNA โดยทั้งสองไม่พบ cross- hybridization signal

พยาธิหัวหนาม (acanthocephala) ในปี 1998 Dezfuli and Tinti พยายามนำเทคนิค RAPD มาแก้ปัญหาในการจัดจำแนกพยาธิหัวหนาม genus *Neoechinorhynchus* (Hamann, 1892) พบในเต่าน้ำจืด *Trachemys scripta* (Wied, 1838) ซึ่งก่อนหน้านี้ใช้เฉพาะลักษณะของ female body และ egg morphology ในการจัดจำแนก ส่วนลักษณะของเพศผู้ไม่สามารถนำมาใช้ได้ พบว่าแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก 3 primers สามารถแยก *N. pseudemydis* ออกจาก *N. emydis* และ *N. emyditoides* ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *N. emydis* และ *N. emyditoides* ได้

พยาธิตัวกลม (nematode) ในปี 1995 Liu and Berry ศึกษาพยาธิตัวกลม *Steinernema* จาก 11 isolates ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า fragments ที่ได้จาก 5 primers แสดงให้เห็นถึง inter-specific polymorphism และ intra-specific polymorphism อย่างชัดเจนซึ่งง่ายต่อการจำแนกความแตกต่างระหว่าง species และ isolates ต่อมา Pozio *et al.*, (1997a) สำรวจโรคที่เกิดจากพยาธิ *Trichinella* (trichinellosis) ในสเปนพบ *Trichinella* จากสัตว์ 91 ตัว (18 domestic pigs, 69 wild boars [*Sus scrofa*] และ 4 foxes [*Vulpes vulpes*]) และจากไส้กรอก 9 ตัวอย่างที่ทำมาจากเนื้อสุกร จากการจำแนกชนิดโดยเทคนิค RAPD พบ *T. spiralis* จากสัตว์ 71 ตัว (17 domestic pigs, 53 wild boars และ 3 foxes) และ *T. britovi* จากสัตว์ 17 ตัว (17 domestic pigs, 53 wild boars และ 3 foxes) ในปีเดียวกัน Pozio *et al.*, (1997b) ทำการสำรวจ trichinellosis ใน carnivore mammals จาก Serengeti Ecosystem, Tanzania โดยใช้เทคนิค RAPD มาช่วยจำแนกชนิดของตัวอ่อนของพยาธิที่ได้จากกล้ามเนื้อซึ่งเก็บมาจากซากสัตว์ โดยพบ *Trichinella nelsoni* ใน bat-eared fox (*Otocyon megalotis*) 1 ตัว, cheetah (*Acinonyx jubatus*) 3 ตัว, leopard (*Panthera pardus*) 1 ตัว, lion (*Panthera leo*) 3 ตัว และ spotted hyena (*Crocuta crocuta*) 3 ตัว และจากค่า prevalence ที่ได้แสดงให้เห็นว่า lion และ spotted hyena อาจจะเป็นแหล่งของ *T. nelsoni* ในพื้นที่นี้ ในปี 1999 Kapel *et al.* ศึกษา Arctic foxes (N = 319) จาก Greenland และ Svalbard พบว่า 7.5% ถูก infect ด้วยพยาธิตัวกลม *Trichinella* และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ช่วยยืนยันว่าทั้งหมดถูก infect ด้วย *Trichinella nativa*

จากที่กล่าวมาทั้งหมดในขั้น annealing ของเทคนิค RAPD ใช้อุณหภูมิประมาณ 37°C แต่ Anuntalabhochai *et al.*, (2000) ได้ดัดแปลงเทคนิคนี้โดยการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น annealing ให้สูงขึ้นประมาณ 10°C เรียกเทคนิคนี้ว่า HAT-RAPD (High annealing temperature - Random Amplified Polymorphic DNA) โดยทำการทดลองในลีนี่ 20 สายพันธุ์ พบว่าสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ (polymorphism) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ยังมีความคมชัด (high resolution) และผลของการทำปฏิริยามีความสม่ำเสมอ (reproducible results)

จะเห็นได้ว่าเทคนิค RAPD สามารถใช้ในการวิเคราะห์พันธุกรรมของพยาธิได้ดี จากการทดลองส่วนใหญ่สามารถใช้แยกความแตกต่างของพยาธิแต่ละ strains, species และ genus ได้ และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ด้วย

จากการตรวจสอบเอกสารทำให้ทราบว่ายังไม่มีการสำรวจชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้รั้วโคในเชียงใหม่มาก่อนและยังไม่มีเคยมีรายงานการนำเอาเทคนิคทางอนุชีววิทยาการศึกษาพยาธิใบไม้ในกลุ่มนี้เลย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเป็นครั้งแรกและเป็นการศึกษาร่วมกันระหว่างการศึกษาดูโครงสร้างทางกายวิพวิทยาและเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อจะนำไปใช้ในการบอกรายชื่อของพยาธิได้แม่นยำและรวดเร็วอันจะมีผลต่อความก้าวหน้าทางด้านปรสิตวิทยาต่อไป