

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชไร่จากกระเพาะฟ้าชั่วคราวโค
ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน

ประลองบุต ศรีปาลวิทย์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เมษายน 2544

An58

27 a.a. 2544

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้จากกระเพาะผ้าขี้ริ้วโค
ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน

ประลองยุทธ ศรีปาลวิทย์

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เมษายน 2544

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้จากกระเพาะผ้าจี๊รีวโค
ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน

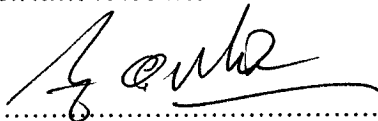
ประลองยุทธ ศรีปาลวิทย์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

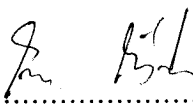
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยพล วงศ์สวัสดิ์

.....กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย

.....กรรมการ

อาจารย์ ดร. กนกพร กวีวัฒน์

26 เมษายน 2544

© ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางและวิธีแก้ปัญหาในการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. กนกพร กวีวัฒน์ ที่กรุณาสละเวลามาตรวจสอบงานวิจัยให้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำลังใจและกำลังใจทรัพย์สนับสนุนงานวิจัย คอยแนะนำ และหวังดีต่อลูกเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณธนุ มะระขงค์ คุณสวชัย สุวัฒนคุปต์ คุณนิพนธ์ หมาดอาหิน คุณอรรถพร นิษพันธ์ คุณวรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ คุณบุษบง กันทะลือ คุณณัฐชนาฏ ธิจักร์ พร้อมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับทุกท่านที่ไม่อาจกล่าวนามได้ ณ ที่นี้ ที่ช่วยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT 542084

ประลองบุทร ศรีปาลวิทย์

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้จากกระเพาะลำไส้วัวโค
ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน

ชื่อผู้เขียน นายประลองยุทธ ศรีपालวิทย์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	กรรมการ
อ.ดร. กนกพร กวีวัฒน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้จากกระเพาะลำไส้วัวของโค (*Bos indicus*) ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ในระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2543 พบพยาธิใบไม้ในโค 29 ตัวจากทั้งหมด 37 ตัว มีค่า prevalence รวมเท่ากับ 78.38% ชนิดของพยาธิใบไม้ที่พบ คือ *Fischoederius elongatus* (Poiries, 1883) *Orthocoelium streptocoelium* (Fischoeder, 1901) และ *Paramphistomum epiclitum* Fischoeder, 1904 มีค่า prevalence เท่ากับ 40.54% 48.65% และ 75.68% ตามลำดับ ในจังหวัดเชียงใหม่ มีค่า prevalence รวมเท่ากับ 87.50% พยาธิใบไม้ที่พบคือ *F. elongatus*, *O. streptocoelium* และ *P. epiclitum* มีค่า prevalence แต่ละชนิดเท่ากับ 50.00% 50.00% และ 81.25% ตามลำดับ ขณะที่จังหวัดลำพูน มีค่า prevalence รวมเท่ากับ 71.43% พบพยาธิใบไม้ชนิดเดียวกับจังหวัดเชียงใหม่ มีค่า prevalence แต่ละชนิดเท่ากับ 33.33% 47.62% และ 71.43% ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ทั้งสามชนิดโดยเทคนิค high annealing temperature - random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD) จากการใช้ arbitrary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 6 primers เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA แบบสุ่ม ซึ่งใช้

genomic DNA ของพยาธิเป็นแท่นพิมพ์ ด้วยวิธี PCR พบว่ามี 5 primers คือ OPA-02 OPA-04 OPB-18 OPC-09 และ OPH-11 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งมีแบบแผนลายพิมพ์ที่แตกต่างกันระหว่างสามชนิดได้ จากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของพยาธิแต่ละชนิดจากจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนด้วย arbitrary primer จำนวน 10 primers ไม่พบความแตกต่างภายในพยาธิชนิดเดียวกัน

Thesis Title Genetic Diversity of Rumen Cow Flukes in Amphoe Maung of Chiang Mai and Lamphun Province.

Author Mr. Pralongyut Sripalwit

M.S. Biology

Examining Committee

Asst. Prof. Dr. Chalobol Wongsawad	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Somboon Anantalabhochai	Member
Lecturer Dr. Kanokporn Kaweerat	Member

ABSTRACT

The rumen of cows (*Bos indicus*) from Amphoe Maung, Chiang Mai province and Amphoe Maung, Lamphun province were examined during January to March 2000; 37 cows were investigated, and trematodes were recovered from 29 cows. The prevalence of infections was 78.38%. Three species trematodes were found as follows; *Fischoederius elongatus* (Poiries, 1883), *Orthocoelium streptocoelium* (Fischoeder, 1901) and *Paramphistomum epiclitum* Fischoeder, 1904. The prevalence of infections were 40.54%, 48.65% and 75.68% in those species, respectively. From Chiang Mai Province, the prevalence was 87.50% and 71.43% in Lamphun province. The parasitic infections were observed as *F. elongatus* (50.00%, 33.33% in Chiang Mai and Lamphun province, respectively), *O. streptocoelium* (50.00%, 47.62%) and *P. epiclitum* (81.25%, 71.43%). Genomic DNA from all trematodes was amplified by polymerase chain reaction based on the high annealing temperature - random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. Five random 10-mer oligonucleotide primers (OPA-02, OPA-04,

OPB-18, OPC-09 and OPH-11, Operon Technologies Inc., California, USA) produced distinct banding patterns among three species. There are no genetic variations of any species between samples obtained from Chiang Mai and Lamphun province when analysed with 10 arbitrary primers.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
อักษรย่อ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	38
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก ข้อมูลการเก็บตัวอย่าง	46
ภาคผนวก ข การเตรียมบัฟเฟอร์ เอนไซม์และสารละลายอื่นๆ	49
ภาคผนวก ค รูปวิธาน (key)	56
ประวัติผู้เขียน	58

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงลำดับเบสของ primer และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค HAT-RAPD จากพยาธิ 4 ชนิด	27
2 แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 4 ชนิดโดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer OPA-02, OPA-04 OPB-18, OPC-09 และ OPH-11 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบเป็น 0	30
3 แสดงอัตราส่วนของ homologous fragments (ด้านบน) และค่า similarity index (ด้านล่าง)	31

สารบัญภาพ

รูป		หน้า
1	หลักการ Polymerase Chain Reaction	6
2	แสดงค่า prevalence รวมของพยาธิจากโคทั้งหมด	20
3	แสดงค่า Prevalence ของพยาธิเปรียบเทียบระหว่างจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน	20
4	รูปวาดและรูปถ่าย Median sagittal sections ของ <i>Fischoederius elongatus</i>	22
5	รูปวาดและรูปถ่าย Median sagittal sections ของ <i>Orthocoelium streptocoelium</i>	24
6	รูปวาดและรูปถ่าย Median sagittal sections ของ <i>Paramphistomum epiclitum</i>	26
7	แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 4 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer OPA-02, OPA-04, OPB-18, OPC-09 และ OPH-11	28
8	dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของพยาธิใบไม้จากกระเพาะผ้าชีวรีวโคทั้ง 3 ชนิด และพยาธิใบไม้ <i>S. falcatus</i> จากปลาเข็ม (control) จากการใช้ primer OPA-02, OPA-04, OPB-18, OPC-09 และ OPH-11	31
9	แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ <i>P. epiclitum</i> โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer OPA-04, OPA-07, OPH-11 และ OPQ-20	32
10	แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ <i>O. streptocoelium</i> โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer OPA-02, OPA-04, OPE-13, OPH-17 และ OPW-17	35
11	แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ <i>F. elongatus</i> โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer OPA-02, OPA-07, OPH-11, OPQ-14 และ OPW-14	36

อักษรย่อ

(Abbreviations)

A	=	Acetabulum
E	=	Esophagus
EG	=	Egg
GP	=	Genital pore
I	=	Intestine
MG	=	Mehlis's gland
O	=	Ovary
P	=	Pharynx
PM	=	Pars musculosa
SV	=	Seminal vesicle
T	=	Testis
U	=	Uterus
V	=	Vas efferens
VG	=	Vitelline gland
VP	=	Ventral pouch

บทที่ 1

บทนำ

เดิมการเลี้ยงโคในประเทศไทยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อการใช้งาน เช่น ใช้เป็นสัตว์พาหนะ ลากเกวียน ลากเลื่อน และนิยมใช้ปฏิบัติงานเพื่อการเพาะปลูก เมื่อใช้งานจนมีอายุ จึงปลดออกจากการปฏิบัติงาน บางครอบครัวเลี้ยงต่อไปจนตายเอง บางครอบครัวจำหน่ายออกไปเป็นโคเนื้อ (กลุ่มงานวิจัยสินค้าเกษตรกรรมที่ 1, 2537)

ปัจจุบันการเลี้ยงโคเพื่อใช้งานได้ลดความสำคัญลงเรื่อยๆ เนื่องจากการเข้าทดแทนด้วยเครื่องจักรซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามจำนวนโคที่เลี้ยงในประเทศไทยตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน มีความแตกต่างกันไม่มากนัก กล่าวคือ ในปี พ.ศ. 2521 มีประมาณ 4.44 ล้านตัว เพิ่มขึ้นเป็น 5.12 ล้านตัวในปี พ.ศ. 2532 และลดลงเป็น 4.92 ล้านตัวในปี พ.ศ. 2542 แม้จำนวนโคที่เลี้ยงเพื่อใช้งาน มีแนวโน้มลดลงแต่การเลี้ยงเพื่อเป็นโคเนื้อสำหรับบริโภคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากจำนวนประชากรไทยที่เพิ่มขึ้น ความต้องการบริโภคอาหารประเภทเนื้อสัตว์จึงสูงขึ้นตาม ส่งผลให้มีการขยายการเลี้ยงโคเนื้อเพิ่มขึ้นทดแทนในส่วนที่ลดลงของโคงาน ประกอบกับการขยายตัวของธุรกิจการท่องเที่ยวและกลุ่มผู้มียารายได้สูง ทำให้มีการขยายการเลี้ยงโคพันธุ์ดีเพื่อขุนให้ได้เนื้อโคมีคุณภาพเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคในระดับสูงเพิ่มขึ้น เพื่อทดแทนการนำเข้าเนื้อโคชั้นดีจากต่างประเทศ และเพิ่มรายได้จากการส่งออกให้ทัดเทียมกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ (ฝ่ายเศรษฐกิจการปศุสัตว์, 2535; กลุ่มงานวิจัยสินค้าเกษตรกรรมที่ 1, 2537; กรมปศุสัตว์, 2542)

การเลี้ยงโคส่วนใหญ่ที่เป็นอยู่ เป็นการเลี้ยงแบบดั้งเดิมโดยปราศจากความรู้ที่เหมาะสมด้านวิชาการ กล่าวคือ เกษตรกรมักจะด้อนโคออกไปเตะเล็มหญ้าและพืชอื่นๆ ที่ขึ้นอยู่ตามทุ่งหญ้าสาธารณะ หรือที่รกร้างข้างถนน เมื่อหญ้าที่หากันไม่พอก็จะมีการเก็บเกี่ยวหญ้ามาให้บ้างในฤดูแล้ง การเลี้ยงเช่นนี้ทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดโรคพยาธิเป็นอย่างมาก ประกอบกับการลักลอบนำเข้าโคจากประเทศเพื่อนบ้านโดยเฉพาะผ่านทางประเทศพม่า มีอัตราเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 9.98 ต่อปี พบว่าในปี 2536 มีการลักลอบนำเข้าประมาณกว่า 400,000 ตัว ซึ่งโคเหล่านี้ไม่ผ่านการกักกันสัตว์ จึงไม่ได้รับการถ่ายพยาธิ ทำให้มีการแพร่ระบาดของพยาธิเข้ามาภายในประเทศ การติดโรคพยาธิของโคจะมีผลทั้งทางตรงคือ ทำให้โคเจ็บป่วย เจริญเติบโตช้าและตาย และผลทางอ้อมคือ ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ อันเป็นปัญหาสำคัญมากในการเพิ่มผลผลิตโคทั้งทางด้านช่วงอายุของการให้ลูกตัว

แรกและช่วงเวลาของการให้ลูกของแต่ละตัวยาวนานเกินไป ช่วงอายุของการผสมพันธุ์สั้นกว่าปกติ การแท้งลูก การผสมติดยาก ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมานี้มีสาเหตุมาจากปัญหาสุขภาพโคทั้งสิ้น ดังนั้น การที่จะพัฒนาปริมาณและคุณภาพของโคจึงต้องเน้นหนักทางด้านหลักการสุขาภิบาล ป้องกันโรค เป็นอย่างมาก (ภาควิชาสัตวบาล, 2525; กลุ่มงานวิจัยสินค้าเกษตรกรรมที่ 1, 2537; ศรีเทพ, 2539; รพีพงษ์, 2540)

ดังนั้นถ้าหากได้มีการศึกษาถึงความหลากหลายของพยาธิที่พบในโคเพื่อให้ทราบชนิดของพยาธิ จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร เพื่อทำการป้องกันและรักษาโคต่อไป ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มศักยภาพในการผลิตให้สูงขึ้น อันจะมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตและรายได้ ในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของพยาธิในกลุ่มที่ศึกษาได้ใช้วิธีการทาง histological examination โดยทำ sagittal serial section ซึ่งต้องใช้เวลาในการทำและเป็นลักษณะที่ดูค่อนข้างยาก ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงได้นำเอาเทคนิค HAT-RAPD (High annealing Temperature - Random Amplified Polymorphic DNA) มาช่วยวิเคราะห์พันธุกรรมของพยาธิ เพื่อสนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธานของพยาธิในกลุ่มนี้ต่อไป อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาปรสิตให้มีความก้าวหน้าและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ ต่อไป อาทิเช่น การจำแนกให้ทราบชนิดที่แน่นอน แม่นยำ เพื่อประโยชน์ในการรักษาและควบคุมได้อย่างรวดเร็ว และถูกต้อง

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อทราบชนิดและกายรูปวิทยาของพยาธิใบไม้ที่พบในกระเพาะลำไส้วัวโค ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน
2. เพื่อทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยาธิที่พบ เมื่อจัดจำแนกโดยกายรูปวิทยาแล้ว

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

การสำรวจพยาธิใบไม้ที่พบในกระเพาะลำไส้เล็กของโคในประเทศไทย

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)

สุภาพรณ (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 ผิวหนังเรียบไม่มีหนาม 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 ของโคและกระบือในจังหวัด สิงห์บุรีและกรุงเทพฯ 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 จำเป็นต้องให้การรักษาอย่างเร่งด่วนเนื่องจากความรุนแรงนี้ทำให้ สัตว์ถึงตายได้ โดยเฉพาะในโค แกะที่มีอายุน้อยและไม่เคยติดโรคมาก่อน (พีรศักดิ์,2530)

พยาธิใบไม้กลุ่มนี้ยากที่จะจัดจำแนกจากลักษณะทาง systematic point แต่ Sey (1991) ได้ใช้วิธีการทาง histological examination มาช่วยในการจำแนกโดยดูจากลักษณะของ muscular organs (acetabulum, terminal genitalium และ pharynx) แต่การทำค่อนข้างใช้เวลาและลักษณะที่ดู ค่อนข้างยาก ดังนั้นการศึกษาค้นคว้านี้ได้พยายามหาวิธีใหม่ๆมาช่วยในการจำแนกความแตกต่าง ของพยาธิในกลุ่มนี้โดยนำเอาเทคนิค High Annealing Temperature - Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) มาใช้โดยเทคนิคนี้ดัดแปลงมาจากเทคนิค RAPD ซึ่งใช้ได้ผลมา แล้วในการแยกความแตกต่างในพยาธิหลายๆชนิด 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 เป็นวิธีวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเออีกแบบหนึ่งซึ่งประยุกต์มาจากเทคนิค PCR ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยว ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (single arbitrary primer) มีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ และมี C+G content มากกว่า 50% เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยทั่วไปในขั้น annealing จะใช้ อุณหภูมิระหว่าง 33-38°C (Cunningham and Mo, 1997; Yu *et al.*, 1997; Dezfuli and Tinti, 1998) แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ (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 $90^{\circ}\text{--}95^{\circ}\text{C}$ 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

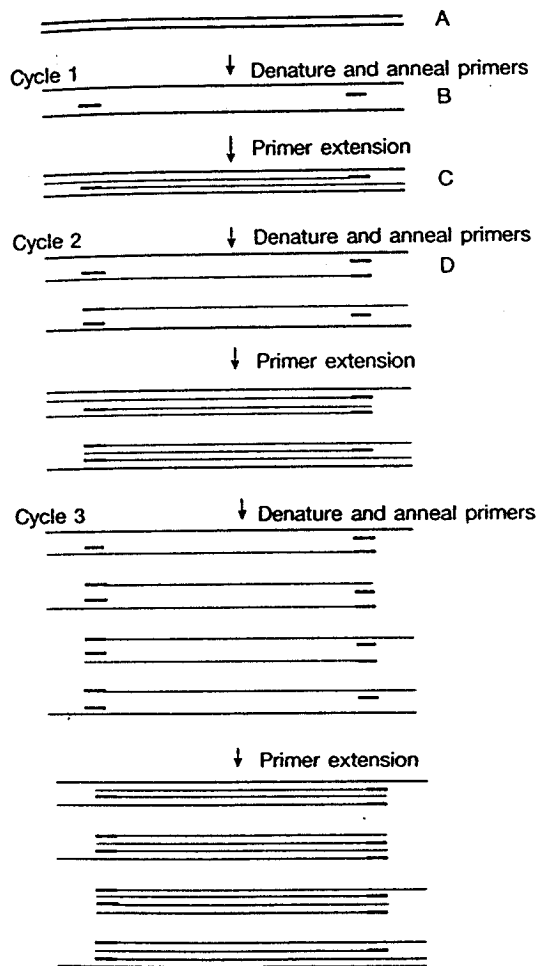
3. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาจะใส่ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 150-200 ไมโครโมลาร์

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

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่จะแยกต่างหาก เพื่อให้ปรับใช้ได้ ในปริมาณที่เหมาะสมกับแต่ละปฏิกิริยาเนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีเมอเรส 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

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

การตรวจสอบผลของ PCR product ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

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

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีจำนวนหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นกับขนาดเป็นส่วนใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังนี้

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

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

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

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสจะต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้า แยกตัวได้ไม่ดี 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 ก็เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่อยู่ถัดมาจากเทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมมาก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ ตรวจสอบความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ สปีชีส์ จินัส ฯลฯ เป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการศึกษาด้าน genetic variability และยังช่วยเพิ่มข้อมูลอันเป็นประโยชน์นอกเหนือจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางด้าน morphology, isozyme และ RFLP (บุรุษย์, 2536; Barral *et al.*, 1993) เทคนิค RAPD ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาในพยาธิหลายชนิด เช่น

พยาธิปลิงใส (monogenea) ในปี 1997 Cunningham and Mo ทำการศึกษา *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 จากปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ซึ่งจับจากแม่น้ำ Batnfjordselva, Lierelva และ Littledalselva 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 globosis* ซึ่งจับจาก 8 river sites ด้วยเทคนิค RAPD พบ variability ระหว่าง Schistosome populations ที่ได้จากหอยที่มาจากแม่น้ำ 2 สายที่แยกจากกันชัดเจน ในขณะเดียวกัน Sandoval *et al.*, (1999) ศึกษา genetic variability ในระยะตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ *Dicrocoelium dendriticum* ซึ่งได้จากตับของแกะจากแหล่งต่างๆใน Leon province (NW Spain) ด้วยเทคนิค RAPD โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variability) ทั้งภายในและภายนอก ประชากรด้วยวิธี means of the Jaccard similarity และสร้าง dendrograms ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ระหว่างพยาธิที่ได้จากแกะคนละตัวโดย FITCH method ผลการศึกษาพบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง และค่า genetic similarity ของพยาธิภายใน ประชากรเดียวกัน (แกะตัวเดียวกัน) มีค่าใกล้เคียงกับค่า average similarity ระหว่างพยาธิที่มาจาก แกะคนละตัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแกะแต่ละตัวถูก infect ด้วยพยาธิจากมดหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง ประชากร 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 และพบแบบแผนลายพิมพ์ ดีเอ็นเอที่ได้จาก primers OPA04 และ OPA12 แสดง intraspecific variability ระหว่าง *P. percae* ซึ่ง ได้จากปลาคนละพื้นที่ ต่อมา Reddy *et al.*, (1998) ใช้เทคนิค RAPD จำแนกความแตกต่างระหว่าง พยาธิตัวตืด *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 แล้ว นำไปทำ 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) โดยทำการทดลองในลิงจี่ 20 สายพันธุ์ พบว่าสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ (polymorphism) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ยังมีความคมชัด (high resolution) และผลของการทำปฏิกิริยามีความสม่ำเสมอ (reproducible results)

จะเห็นได้ว่าเทคนิค RAPD สามารถใช้ในการวิเคราะห์พันธุกรรมของพยาธิได้ดี จากการทดลองส่วนใหญ่สามารถใช้แยกความแตกต่างของพยาธิแต่ละ strains, species และ genus ได้ และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ด้วย

จากการตรวจสอบเอกสารทำให้ทราบว่ายังไม่มีการสำรวจชนิดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะไส้จิ๋วโคโนเซียงใหม่มาก่อนและยังไม่เคยมีรายงานการนำเอาเทคนิคทางอนุชีววิทยามาศึกษาพยาธิใบไม้ในกลุ่มนี้เลย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาเป็นครั้งแรกและเป็นการศึกษาร่วมกันระหว่างการศึกษาด้วยการดูโครงสร้างทางกายรูปวิทยาและเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อจะนำไปใช้ในการบอชนิดของพยาธิได้แม่นยำและรวดเร็วอันจะมีผลต่อความก้าวหน้าทางด้านปรสิตวิทยาต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. ตัวอย่างพยาธิ

เก็บพยาธิใบไม้ในกระเพาะไส้ชีว์โค จากโรงฆ่าสัตว์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และ
อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรและ sagittal section

2.1.1 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบเลนส์ประกอบ (binocular compound microscope)
พร้อมด้วยอุปกรณ์การถ่ายภาพและวาดภาพ

2.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (stereo microscope)

2.1.3 Hot plate

2.1.4 Rotary microtome

2.1.5 เครื่องมือผ่าตัด : มีด กรรไกร เข็มเย็บ ปากคีบ ถาดผ่าตัด

2.1.6 อุปกรณ์เครื่องแก้ว : จานแก้ว ปีกเกอร์ หลอดหยด กระบอกสไลด์ กระบอกปิดสไลด์
ขวดแก้วใส่แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ

2.1.7 อุปกรณ์ถ่ายรูป : กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูปสี-ขาวดำ

2.1.8 อุปกรณ์อื่นๆ : ทิชชู ปากกา กระดาษเลเบล พู่กัน กระดาษฟอยด์ ไม้บรรทัด
ถุงพลาสติก และ syringe

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านอนุชีววิทยา

2.2.1 เครื่อง PCR (Perkin Elmer : Gene Amp PCR system 2400)

2.2.2 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

2.2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

2.2.4 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

2.2.5 ตู้ดูดไอพิษ (toxicap)

2.2.6 โกร่งบดตัวอย่าง

2.2.7 ตู้บ่ม (incubator)

2.2.8 เครื่องทำความเย็น ได้แก่ ตู้เย็น ตู้แช่ -20°C

2.2.9 water bath

2.2.10 Vortex

2.2.11 เครื่องซั่งแบบละเอียด

2.2.12 เต้าไมโครเวฟ

2.2.13 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแนวนอน (บริษัท BIO-RAD)

2.2.14 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) (บริษัท BIO-RAD)

2.2.15 Adjustable automatic pipets และ tip ขนาดต่างๆ

2.2.16 Eppendorf tube

2.2.17 UV transilluminator

2.2.18 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

2.2.19 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ ปีเปต กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ฯลฯ

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรและ sagittal section

3.1.1 Formalin 4 %

3.1.2 น้ำเกลือ 0.85 %

3.1.3 Ethyl alcohol ความเข้มข้นต่างๆ

3.1.4 Absolute ethyl alcohol

3.1.5 Butyl alcohol

3.1.6 Xylene

3.1.7 Permount

3.1.8 paraffin

3.1.9 สีย้อม : Haematoxylin

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านอนุชีววิทยา

3.2.1 Agar

3.2.2 Agarose (บริษัท Promega, USA)

3.2.3 Bromophenol blue

3.2.4 Chloroform

3.2.5 Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) (บริษัท Promega, USA)

- 3.2.6 Ethidium bromide
- 3.2.7 Ethyl alcohol
- 3.2.8 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.2.9 Isoamyl alcohol
- 3.2.10 Isopropanol
- 3.2.11 Liquid nitrogen
- 3.2.12 Magnesium chloride ($MgCl_2$) (บริษัท Promega, USA)
- 3.2.13 Phenol
- 3.2.14 Primer (บริษัท Operon Technology, USA)
- 3.2.15 Reaction buffer (บริษัท Promega, USA)
- 3.2.16 Rnase ONETM ribonuclease (บริษัท Promega, USA)
- 3.2.17 Sodium chloride (NaCl)
- 3.2.18 Sucrose
- 3.2.19 Tag DNA polymerase (บริษัท Promega, USA)

วิธีการวิจัย

1. การสำรวจและการศึกษาทางด้านกายวิภาค

1. เก็บพยาธิใบไม้จากกระเพาะลำไส้เล็ก จากโรงฆ่าสัตว์ 2 แห่ง คือ

- 1. โรงฆ่าสัตว์เทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
- 2. โรงฆ่าสัตว์ของนายสิโรจ ดวงจิตร์ อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

โดยหลังจากเปิดช่องท้องของวัวกระเพาะอาหารมาผ่าเปิดแล้วนำไปล้างน้ำเพื่อกำจัดเศษอาหารที่ค้างอยู่ออก จากนั้นใช้ปากคีบหยิบพยาธิที่ติดอยู่กับผนังของกระเพาะอาหารใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่างที่มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% อยู่ แล้วจึงนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ

2. หลังจากนำตัวอย่างพยาธิมาถึงห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% จนกว่าเศษอาหารที่ปนมากับตัวอย่างหมด จากนั้นนำพยาธิส่วนหนึ่งไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ $-20^{\circ}C$ เพื่อนำไปศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาต่อไป

3. นำพยาธิอีกส่วนหนึ่งไปจัดทำเป็นสไลด์ถาวร โดยนำพยาธิที่ล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% มา fix ด้วย 4 % formalin เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นย้อมด้วยสี Haematoxylin เป็นเวลา 1 คืน ทำการดึงน้ำออกตัวอย่างด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 10% 20% 30% 50% ตามลำดับ จนถึงความเข้มข้น 70% ทำการ destain จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นทำการ

ดึงน้ำออกด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 85% และ 95% หลังจากนั้นนำไปแช่ 95% ethyl alcohol และ buthyl alcohol ในอัตราส่วน 2:1 1:1 และ 1:2 จนถึง buthyl alcohol แล้วจึงทำให้ตัวอย่างใสโดยแช่ใน buthyl alcohol และ xylene ในอัตราส่วน 2:1 1:1 และ 1:2 จนถึง xylene จากนั้นนำตัวอย่างไปวางบน slide ทำการ mount ด้วย Permount ปิดทับด้วย cover glass นำไปวางบน hot plate แล้วนำมาเก็บไว้ในกล่องเก็บ slide รอให้ตัวอย่างแห้งแล้วนำไปศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทำการวาดและถ่ายภาพเพื่อใช้ในการจัดจำแนกและเปรียบเทียบกับการศึกษาโดยวิธี sagittal sections

4. นำพยาธิอีกส่วนหนึ่งผ่านกระบวนการทำ paraffin sagittal section ในขั้นแรกทำเหมือน ข้อ 3 ทุกประการ จนถึงแช่ตัวอย่างใน xylene จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ใน xylene และ paraffin ในอัตราส่วน 2:1 1:1 และ 1:2 ตามลำดับ แล้วจึงนำไปแช่ต่อใน paraffin 1 paraffin 2 และ paraffin 3 จากนั้นทำการ embed ตัวอย่างลงในกระถาง (boat) รอให้ตัวอย่างแข็ง แล้วจึงทำการเหลา (trim) แท่งตัวอย่างให้ได้สัดส่วนที่ต้องการ นำไปตัด sagittal section ด้วย Rotary microtome จากนั้นนำ sections ที่ได้มาทำเป็นสไลด์ถาวรเพื่อการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
5. นำข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง ไปคำนวณหาค่า Prevalence of infection (ค่าความชุกชุม) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{Prevalence of infection} = \frac{\text{จำนวนโฮสต์ที่ตรวจพบพยาธิ}}{\text{จำนวนโฮสต์ทั้งหมดที่ได้รับการตรวจ}} \times 100$$

6. นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 5 มาวิเคราะห์ความแตกต่างของพยาธิแต่ละชนิดด้วยโดยใช้โปรแกรม SPSS

2. การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา

1. การเตรียมดีเอ็นเอ

1.1 การเตรียมพยาธิ

นำพยาธิมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่ง

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีการของ รศนา (2536) และ Yu *et al.*, (1997)

- 1.2.1 นำตัวอย่างพยาธิที่บดละเอียดประมาณ 0.1 กรัม ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml เติม lysis buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM EDTA, 0.5% SDS]

- ปริมาตร 800 μ l เขย่าด้วย vortex mixer แล้วนำไป incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37° C ค้างคืน
- 1.2.2 เติม proteinase K ให้ได้ความเข้มข้น 100 μ g/ml และ Rnase ให้ได้ความเข้มข้น 20 μ g/ml ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไป incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 - 1.2.3 สกัดด้วย phenol / chloroform : isoamy alcohol เพื่อให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้น โดยเติม phenol อิ่มตัว 0.5 เท่า (v/v) และ chloroform : isoamy alcohol (24:1) 0.5 เท่า (v/v) ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมาแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย phenol / chloroform : isoamy alcohol จนไม่มีตะกอนขาว
 - 1.2.4 สกัด phenol ออกด้วย chloroform โดยเติม chloroform 1 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่
 - 1.2.5 ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 2 เท่า (v/v) 99% ethanol และ 1/20 เท่า 5 M NaCl ที่อุณหภูมิ -20° C ค้างคืน
 - 1.2.6 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง ให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วนำมาคว่ำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
 - 1.2.7 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 μ l เขย่าเบาให้ตะกอนละลายหมดแล้วเติม RNase จำนวน 5 units/หลอด แล้วนำไป incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือค้างคืน
 - 1.2.8 สกัดด้วย phenol / chloroform : isoamy alcohol
 - 1.2.9 สกัดอีกครั้งด้วย chloroform
 - 1.2.10 ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 2 เท่า (v/v) 99% ethanol และ 0.5 M NaCl ของความเข้มข้นสุดท้ายในการตกตะกอน ที่อุณหภูมิ -20° C ค้างคืน
 - 1.2.11 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วนำมาคว่ำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 25 μ l นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20° C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณ 10-25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

2. เทคนิค HAT-RAPD

2.1 การเลือกใช้ primers

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองเป็น arbitrary primers ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology, USA จำนวน 13 ไพรเมอร์

2.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

ใส่สารละลายปริมาตร 20 μ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งสารละลายประกอบด้วย 1x reaction buffer, 2 mM $MgCl_2$, dNTPs, primer 40 ng, ดีเอ็นเอต้นแบบ 10-25 ng, Tag polymerase 0.5 unit/reaction

2.3 เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR

เริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ตามเงื่อนไขต่อไปนี้

อุณหภูมิ ($^{\circ}C$)	:	94	:	94	48	72	:	72
เวลา (นาที)	:	5	:	3/4	3/4	1	:	7
จำนวนรอบ (รอบ)	:	1	:		30		:	1

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ไปทำ agarose gel electrophoresis ต่อไป

3. Agarose gel electrophoresis

3.1 การเตรียม agarose gel

3.1.1 เตรียม agarose เข้มข้น 1.4 % โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1x TBE buffer ต้มจน agarose ละลาย เติม ethidium bromide

3.1.2 ทำความสะอาดถาดเจลขนาด 15x20 cm และหวีเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วใช้เทปพลาสติกใสปิดขอบถาดทั้งสองด้าน

3.1.3 วางหวีเสียบลงที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจลที่เตรียมไว้ เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) เมื่อ agarose แข็งตัว สำหรับหยอดตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลงไป

3.1.4 เท agarose ที่หลอมละลายแล้วลงในถาดเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่นเจลหนาประมาณ 3-5 mm ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.1.5 เมื่อ agarose แข็งตัวแล้ว คึงหวีเสียบออก พร้อมนำไปใช้ต่อไป

3.2 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis

- 3.2.1 นำแผ่นเจล agarose ที่เตรียมไว้มาแกะพลาสติกออก วางลงในอ่างอิเล็กโตโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ
- 3.2.2 เท 1x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่นเจล ให้สูงกว่าแผ่นเจลประมาณ 1-3 mm
- 3.2.3 ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากันใช้ ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องของเจลที่เตรียมไว้
- 3.2.4 ปิดฝาอ่างและต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ให้ความต่างศักย์ 60 V กระแสไฟฟ้า 150 mA ใช้เวลาปล่อยกระแสไฟฟ้าประมาณ 3-4 ชั่วโมง หรือเมื่อสังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่นเจล จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- 3.2.5 นำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพไว้ด้วยโพลาไรซ์

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

- 10.1 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานของ DNA marker
- 10.2 ตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิด ซึ่งการบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือ การปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้สัญลักษณ์เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอในแต่ละ primer ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม SPSS (cluster analysis) และเสนอเป็น dendrogram แสดงความสัมพันธ์ พร้อมทั้งคิดค่า similarity index (S) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$S = 2 \times N_{ab} / (n_a + n_b)$$

เมื่อ n_a และ n_b แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในชนิด a และ b ตามลำดับ และ N_{ab} คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้งสองชนิด โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0-1 โดย 0 คือทั้งสองชนิดไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเลย และ $S = 1$ หมายถึงทั้งสองชนิดมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด (Nei and Li, 1979)

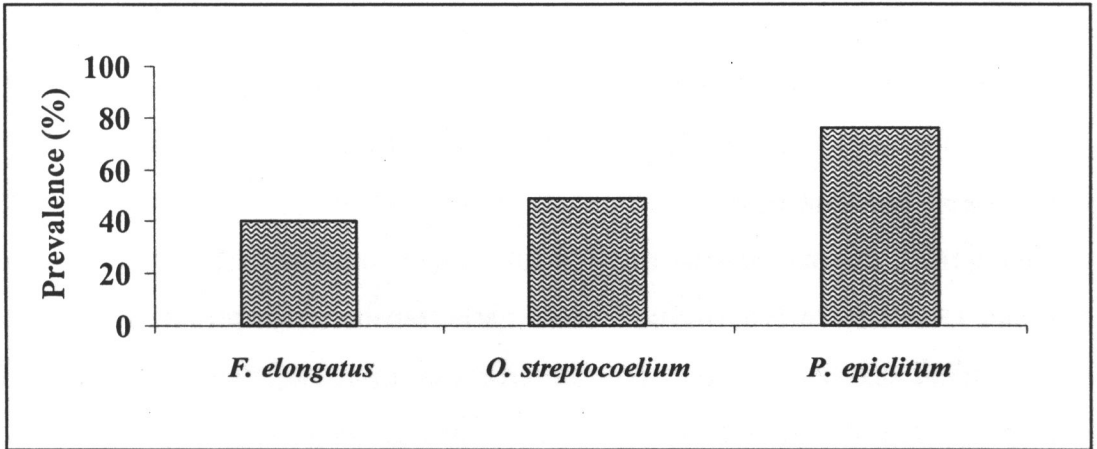
บทที่ 4

ผลการศึกษา

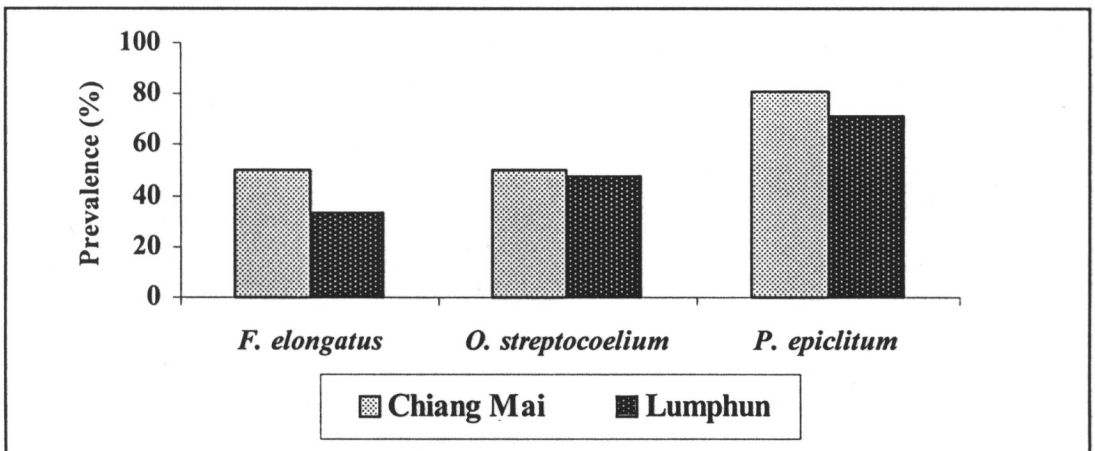
ผลการสำรวจชนิดของพยาธิใบไม้จากกระเพาะผ้าขี้ริ้วของโค

ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2543 ได้ทำการเก็บตัวอย่างพยาธิใบไม้จากกระเพาะผ้าขี้ริ้วของโค (*Bos indicus*) ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน จากโคทั้งหมด 37 ตัว พบพยาธิใบไม้ในโค 29 ตัวมีค่า prevalence รวมเท่ากับ 78.38% ชนิดของพยาธิใบไม้ที่พบคือ *Fischoederius elongatus* (Poiries,1883), *Orthocoelium streptocoelium* (Fischoeder,1901) และ *Paramphistomum epiclitum* Fischoedes,1904 มีค่า prevalence เท่ากับ 40.54%, 48.65% และ 75.68% ตามลำดับ (รูป 2)

ในจังหวัดเชียงใหม่ มีค่า prevalence รวมเท่ากับ 87.50% พบพยาธิใบไม้ 3 ชนิดคือ *F. elongatus*, *O. streptocoelium* และ *P. epiclitum* มีค่า prevalence เท่ากับ 50.00%, 50.00% และ 81.25% ตามลำดับ ส่วนจังหวัดลำพูน มีค่า prevalence รวมเท่ากับ 71.43% พบพยาธิ 3 ชนิดเช่นกัน โดยมีค่า prevalence เท่ากับ 33.33%, 47.62% และ 71.43% (รูป 3)



รูป 2 แสดงค่า prevalence รวมของพยาธิจากโคทั้งหมด



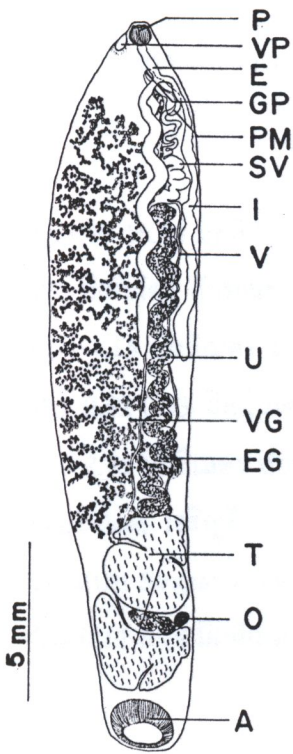
รูป 3 แสดงค่า prevalence ของพยาธิเปรียบเทียบระหว่างจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน

ผลการศึกษากายรูปวิทยาของพยาธิใบไม้

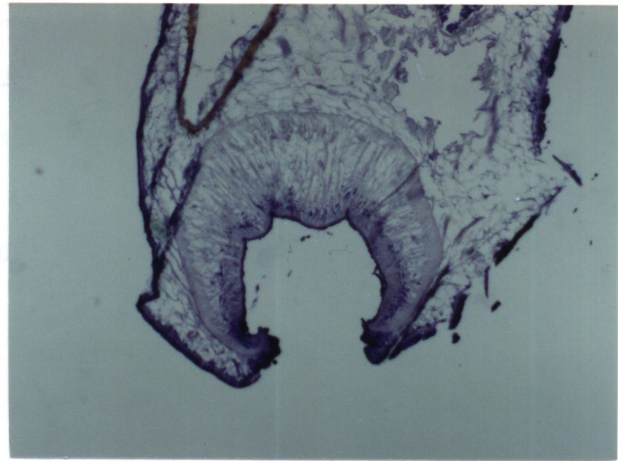
Fischoederius elongatus (Poiries, 1883)

ลักษณะรูปร่าง

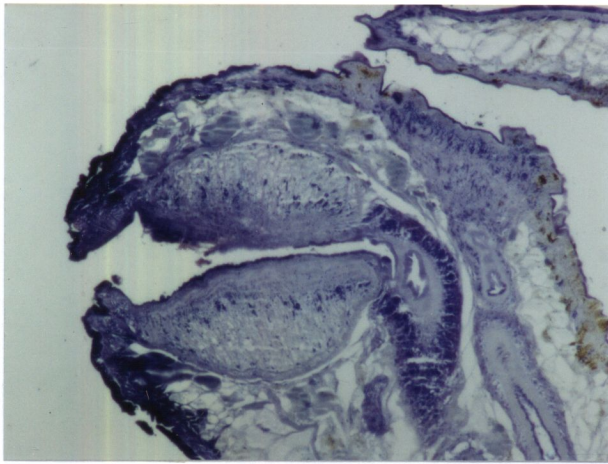
ลำตัวยาว 9.60-24.00 มิลลิเมตร กว้าง 2.88-6.15 มิลลิเมตร (รูป 4A) acetabulum ยาว 1.02-1.78 มิลลิเมตร กว้าง 1.32-2.5 มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ *Fischoederius* type (รูป 4B) Pharynx ยาว 0.57-0.73 มิลลิเมตร กว้าง 0.45-0.70 มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ *Paramphistomum* type (รูป 4B) esophagus ยาว 0.87-1.25 มิลลิเมตร กว้าง 0.2-0.3 มิลลิเมตร intestine แยกเป็น 2 ข้างไม่แยกห่างกันมาก ส่วนปลายสิ้นสุดประมาณกึ่งกลางลำตัว Testis เรียงกันตามยาว ยาว 1.17-2.83 มิลลิเมตร กว้าง 1.30-2.30 มิลลิเมตร pars muscosa เจริญพอสมควร Ovary ยาว 0.80-0.88 มิลลิเมตร กว้าง 0.52-0.58 มิลลิเมตร terminal genitalium อยู่ใน ventral pouch มีลักษณะแบบ *Gracile* type (รูป 4D) Egg ยาว 0.30-0.38 มิลลิเมตร กว้าง 0.15-0.18 มิลลิเมตร



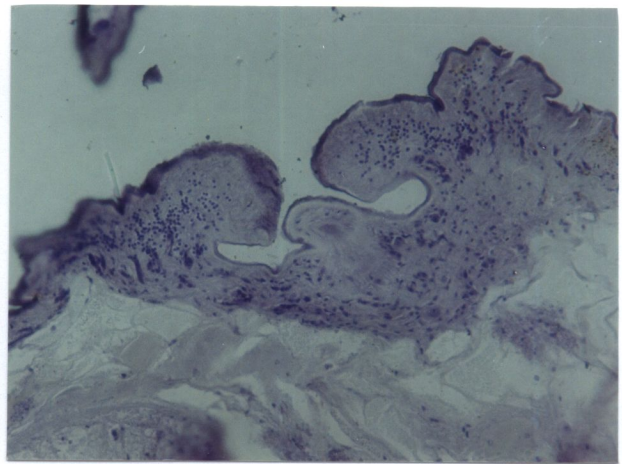
A



B



C



D

รูป 4 A) รูปวาด *Fischoederius elongatus*

B) รูปถ่าย Median sagittal section of acetabulum แบบ *Fischoederius* type

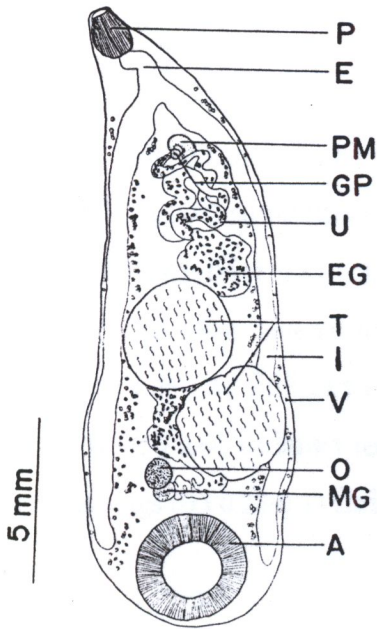
C) รูปถ่าย Median sagittal section of pharynx แบบ *Paramphistomum* type

D) รูปถ่าย Median sagittal section of terminal genitalium แบบ *Gracile* type

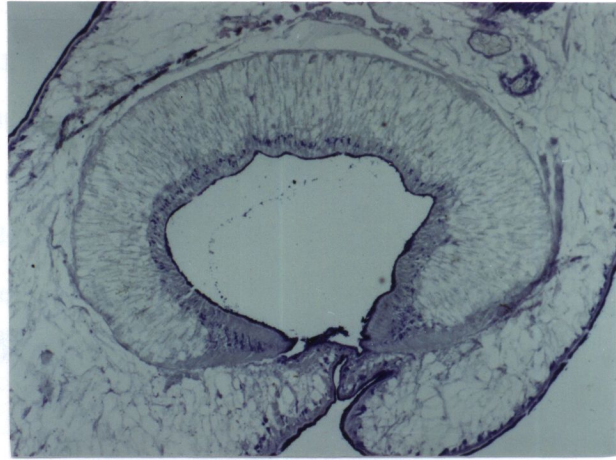
Orthocoelium streptocoelium (Fischoeder, 1901)

ลักษณะรูปร่าง

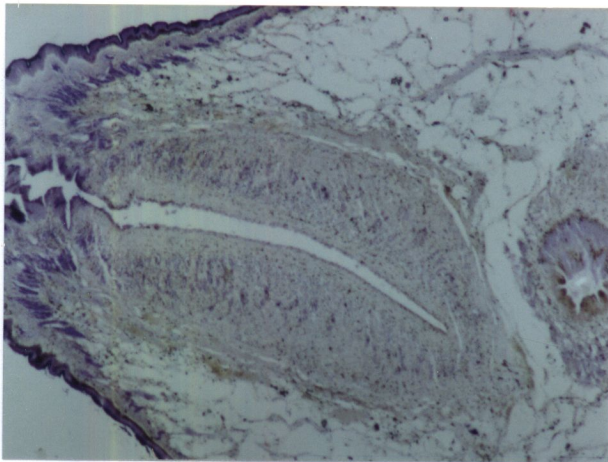
ลำตัวยาว 13.00-16.40 มิลลิเมตร กว้าง 5.30-7.20 มิลลิเมตร (รูป 5A) acetabulum มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.62-2.90 มิลลิเมตร ลักษณะแบบ *Streptocoelium* type (รูป 5B) Pharynx ยาว 0.97-1.40 มิลลิเมตร กว้าง 0.95-1.15 มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ *Calicophoron* type (รูป 5C) esophagus ยาว 1.00-1.13 มิลลิเมตร 0.42-0.53 มิลลิเมตร พบ muscular sphincter anterior testis ยาว 1.97-2.60 มิลลิเมตร กว้าง 1.67-2.75 มิลลิเมตร ส่วน Posterior testis ยาว 1.80-2.95 มิลลิเมตร กว้าง 1.70-2.63 มิลลิเมตร pars muscosa เจริญดี ovary ยาว 0.62-1.65 มิลลิเมตร กว้าง 0.45-0.90 มิลลิเมตร terminal genitalium แบบ *Streptocoelium* type (รูป 5D) genital pore postbifurcal Eggs ยาว 0.27-0.33 มิลลิเมตร กว้าง 0.12-0.18 มิลลิเมตร



A



B



C



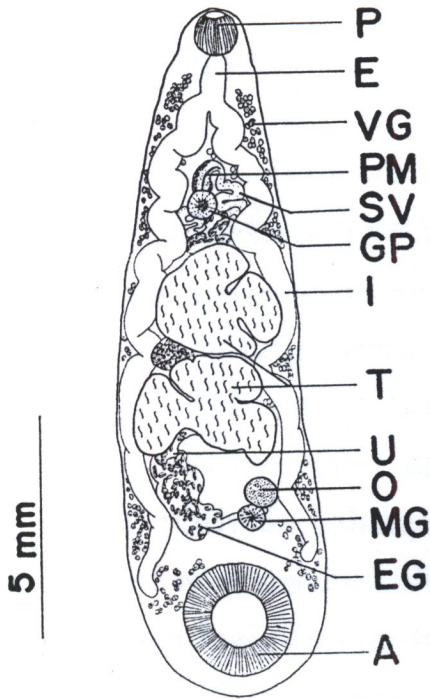
D

- รูป 5 A) รูปร่าง *Orthocoelium streptocoelium*
 B) รูปถ่าย Median sagittal sections of acetabulum แบบ *Streptocoelium* type
 C) รูปถ่าย Median sagittal section of pharynx แบบ *Calicophoron* type
 D) รูปถ่าย Median sagittal section of terminal genitalium แบบ *Streptocoelium* type

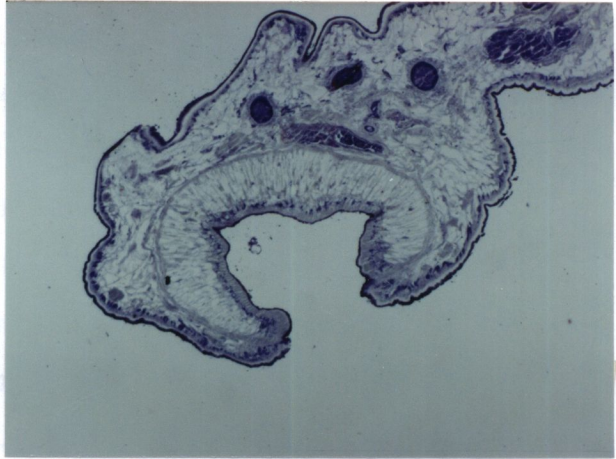
Paramphistomum epiclitum Fiscoedes, 1904

ลักษณะรูปร่าง

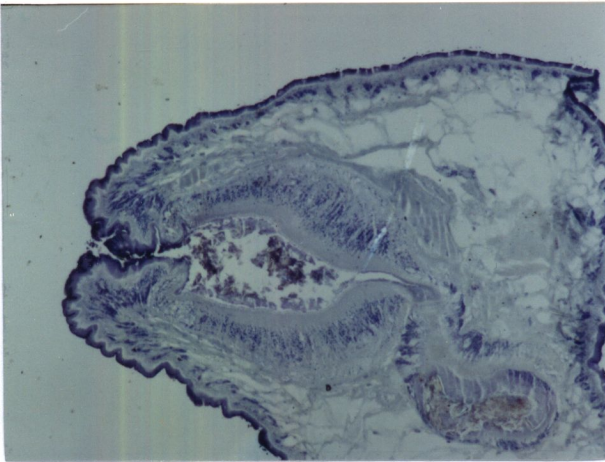
ลำตัวยาว 11.00-13.20 มิลลิเมตร กว้าง 3.15-4.10 มิลลิเมตร (รูป 6A) acetabulum ยาว 1.97-2.35 มิลลิเมตร กว้าง 1.90-2.50 มิลลิเมตร มีลักษณะแบบ *Paramphistomum* type (รูป 6B) pharynx ยาว 0.85-0.93 มิลลิเมตร กว้าง 0.82-0.88 มิลลิเมตร ลักษณะแบบ *Calicophoron* type (รูป 6C) without muscular thickening anterior testis ยาว 0.97-2.13 มิลลิเมตร กว้าง 1.17-2.38 มิลลิเมตร posterior testis ยาว 1.05-1.75 มิลลิเมตร กว้าง 1.02-2.50 pars muscosa ต้น เจริญไม่ค่อยดี Ovary มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50-0.60 มิลลิเมตร terminal genitalium แบบ *Epiclitum* type (รูป 6D) genital pore postbifurcal eggs ยาว 0.25-0.33 มิลลิเมตร กว้าง 0.12-0.18 มิลลิเมตร



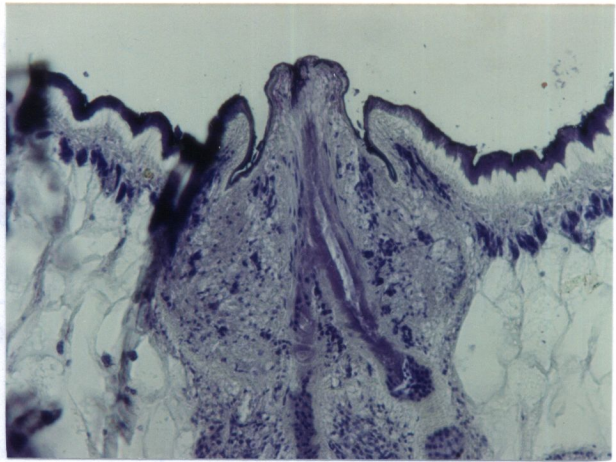
A



B



C



D

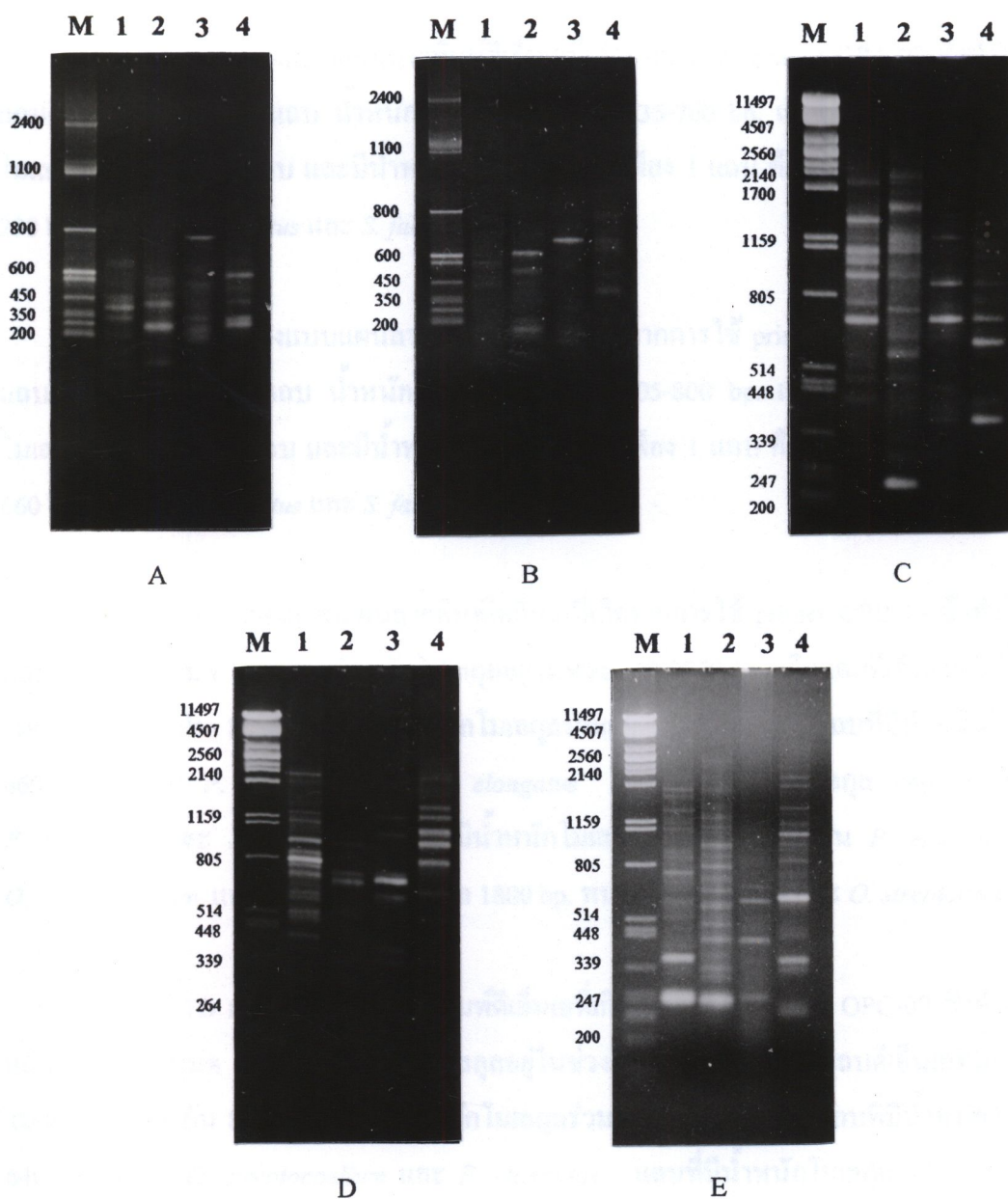
- รูป 6 A) รูปวาด *Paramphistomum epiclitum*
 B) รูปถ่าย Median sagittal sections of acetabulum แบบ *Paramphistomum* type
 C) รูปถ่าย Median sagittal section of pharynx แบบ *Calicophoron* type
 D) รูปถ่าย Median sagittal section of terminal genitalium แบบ *Epiclitum* type

ผลการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา

จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของพยาธิโดยเตรียมดีเอ็นเอจากพยาธิใบไม้จากกระเพาะปลาจืด 3 ชนิดคือ *F. elongatus*, *O. streptocoelium* และ *P. epiclitum* และตัวอ่อนระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* จากปลาเข็ม ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) แล้วนำไปเพิ่มขยายปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary primer จำนวน 6 primers พบว่า OPA-05 ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาได้ ส่วนอีก 5 primers คือ OPA-02 OPA-04 OPB-18 OPC-09 และ OPH-11 (ตาราง 1) สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้และยังพบว่ามีย่านโมเลกุลที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) ในระหว่างชนิดพยาธิอีกด้วย การศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 5 primers พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 61 แถบ มีย่านโมเลกุลตั้งแต่ 135-3450 bp. และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีมีย่านโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 50 แถบ ซึ่งใช้บอกความแตกต่างระหว่างชนิดพยาธิได้

ตาราง 1 แสดงลำดับเบสของ primer และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค HAT-RAPD จากพยาธิ 4 ชนิด

primer	ลำดับเบส 5'→3'	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีมีย่านโมเลกุลแตกต่างกัน
OPA-02	TGCCGAGCTG	10	9
OPA-04	AATCGGGCTG	8	7
OPB-18	CCACAGCAGT	16	12
OPC-09	CTCACCGTCC	11	8
OPH-11	CTTCCGCAGT	16	14



รูป 7 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 4 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

A) OPA-02 B) OPA-04 C) OPB-18 D) OPC-09 E) OPH-11

(lane M, molecular weight marker ; lane 1, *P. epicitum* ; lane 2, *O. streptocoelium* ;

lane 3, *F. elongatus* ; lane 4, *S. falcatus*)

จากรูป 7A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-02 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 135-760 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 9 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลร่วมกันเพียง 1 แถบ คือ แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 290 bp. พบใน *F. elongatus* และ *S. falcatius*

จากรูป 7B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-04 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 105-800 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 7 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลร่วมกันเพียง 1 แถบ คือ แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 660 bp. พบใน *F. elongatus* และ *S. falcatius*

จากรูป 7C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPB-18 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 220-2050 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 12 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลร่วมกัน 4 แถบ ได้แก่ แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 660 bp. พบใน *P. epiclitum* และ *F. elongatus* แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 840 bp. พบใน *F. elongatus* และ *S. falcatius* แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1050 bp. พบใน *P. epiclitum* และ *O. streptocoelium* แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1800 bp. พบใน *P. epiclitum* และ *O. streptocoelium*

จากรูป 7D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPC-09 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 570-2000 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 8 แถบ และที่มีน้ำหนักโมเลกุลร่วมกัน 3 แถบ ได้แก่ แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 640 bp. พบใน *O. streptocoelium* และ *F. elongatus* แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 700 bp. พบใน *P. epiclitum* และ *O. streptocoelium* แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1130 bp. พบใน *F. elongatus* และ *S. falcatius*

จากรูป 7E แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPH-11 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200-3450 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 14 แถบ และที่มีน้ำหนักโมเลกุลร่วมกัน 2 แถบ ได้แก่ แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 250 bp. พบใน *P. epiclitum* และ *O. streptocoelium* แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1350 bp. พบใน *P. epiclitum* และ *S. falcatius*

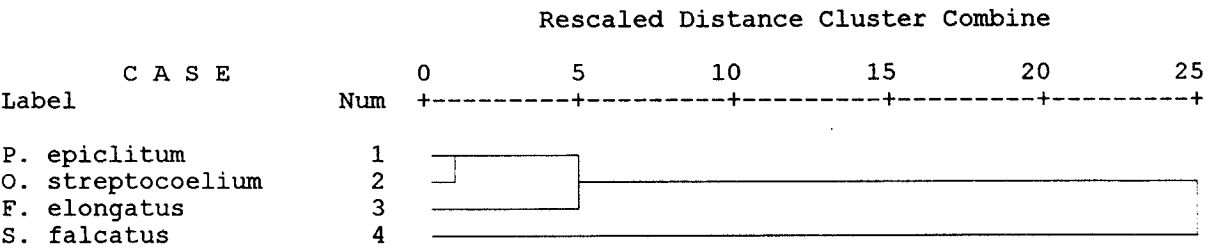
ตาราง 2 แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ
 พยาธิทั้ง 4 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer OPA-02, OPA-04, OPB-18,
 OPC-09 และ OPH-11 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบ
 เป็น 0

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ		
	OPA-02 1→ 10	OPA-04 1→ 8	OPB-18 1→ 16
<i>P. epiclitum</i>	0000110000	00101000	0000100101110101
<i>O. streptocoelium</i>	1100001000	10010100	1010000000010011
<i>F. elongatus</i>	0001000001	00000001	0000110010001000
<i>S. falcatu</i>	0011000110	01000011	0101001010000000

ตาราง 2 (ต่อ) แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
 ของพยาธิทั้ง 4 ชนิด โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer OPA-02, OPA-04, OPB-18,
 OPC-09 และ OPH-11 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบ
 เป็น 0

ชนิด	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ	
	OPC-09 1→ 11	OPH-11 1→ 16
<i>P. epiclitum</i>	00011010001	0100000000000100
<i>O. streptocoelium</i>	01010000000	0100001001110000
<i>F. elongatus</i>	01100001100	0010010100000000
<i>S. falcatu</i>	10000100110	1001100010001111

dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

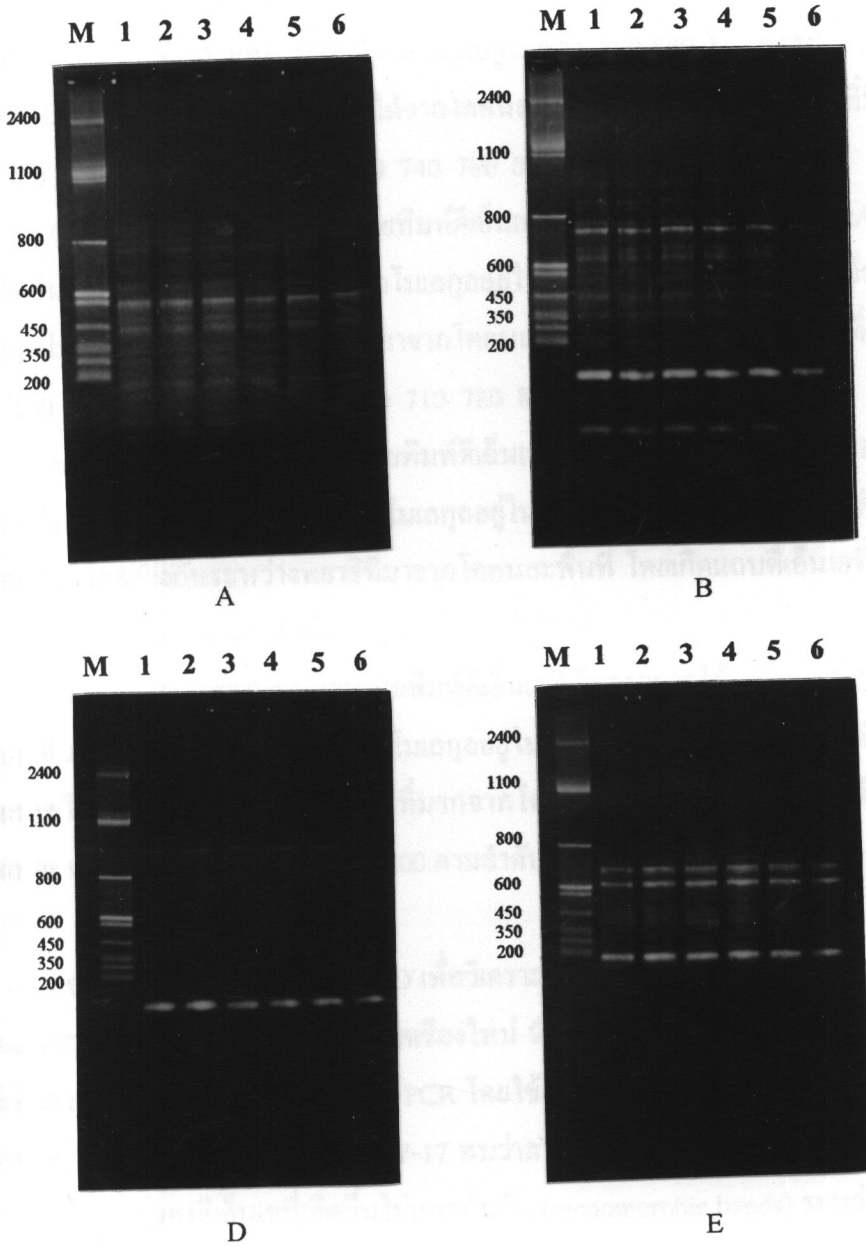


ภาพ 8 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของพยาธิใบไม้จากกระเพาะผ้าชีว้วโคทั้ง 3 ชนิด และพยาธิใบไม้ *S. falcatus* จากปลาเข็ม (control) จากการใช้ primer OPA-02, OPA-04, OPB-18, OPC-09 และ OPH-11

ตาราง 3 แสดงอัตราส่วนของ homologous fragments (ด้านบน) และค่า similarity index (ด้านล่าง)

	<i>P. epiclitum</i>	<i>O. streptocoelium</i>	<i>F. elongatus</i>	<i>S. falcatus</i>
<i>P. epiclitum</i>		4/35	1/31	1/40
<i>O. streptocoelium</i>	0.2286		1/32	0/41
<i>F. elongatus</i>	0.0645	0.0625		4/37
<i>S. falcatus</i>	0.0500	0	0.2162	

จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของ *P. epiclitum* ซึ่งเตรียมดีเอ็นเอจากพยาธิใบไม้ที่ได้จากโคจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 ตัว โคจากจังหวัดลำพูน 3 ตัว แล้วนำไปเพิ่มขยายปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary primer จำนวน 4 primers คือ OPA-04, OPA-07, OPH-11 และ OPQ-20 พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ทั้งหมด แต่น้ำหนักโมเลกุลของ ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) ระหว่างพยาธิที่มาจากโคคนละพื้นที่ การศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก 4 primers พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 34 แถบ น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 110-940 bp.



รูป 9 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *P. epiclritum* โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

A) OPA-04 B) OPA-07 C) OPH-11 D) OPQ-20

(lane M, molecular weight marker ; lane 1-3, ตัวอย่างพยาธิจากเชียงใหม่ ;

lane 4-6 , ตัวอย่างพยาธิจากลำพูน)

จากรูป 8A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-04 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 180-840 bp. แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาริที่ได้จากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180 230 360 425 475 500 600 670 740 780 810 และ 840 ตามลำดับ

จากรูป 8B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-07 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 110-940 bp. แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาริที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 110 180 310 430 510 560 610 640 710 780 840 และ 940 ตามลำดับ

จากรูป 8C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPH-11 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 4 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 150-930 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาริที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 150 720 810 และ 930 ตามลำดับ

จากรูป 8D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPQ-20 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 175-700 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาริที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 175 220 250 600 650 และ 700 ตามลำดับ

จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของ *O. streptocoelium* ซึ่งเตรียมดีเอ็นเอจากพยาริใบไม้ที่ได้จากโคจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 ตัว โคจากจังหวัดลำพูน 3 ตัว แล้วนำไปเพิ่มขยายปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary primer จำนวน 4 primers คือ OPA-02, OPA-04, OPE-13, OPH-17 และ OPW-17 พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ทั้งหมด แต่ น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) ระหว่างพยาริที่ได้จากโคคนละพื้นที่ การศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 5 primers พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 48 แถบ น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 100-1050 bp.

จากรูป 9A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-02 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-820 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาริที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 120 175 190 250 320 390 450 620 670 720 780 และ 820 ตามลำดับ

จากรูป 9B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-04 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 14 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 190-1050 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนัก

โมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพหุชาติที่ได้จากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 190 280 490 600 620 670 700 780 810 860 880 930 960 และ 1050 ตามลำดับ

จากรูป 9C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPE-13 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 135-960 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพหุชาติที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135 175 205 295 350 460 550 580 620 660 810 850 880 920 และ 960 ตามลำดับ

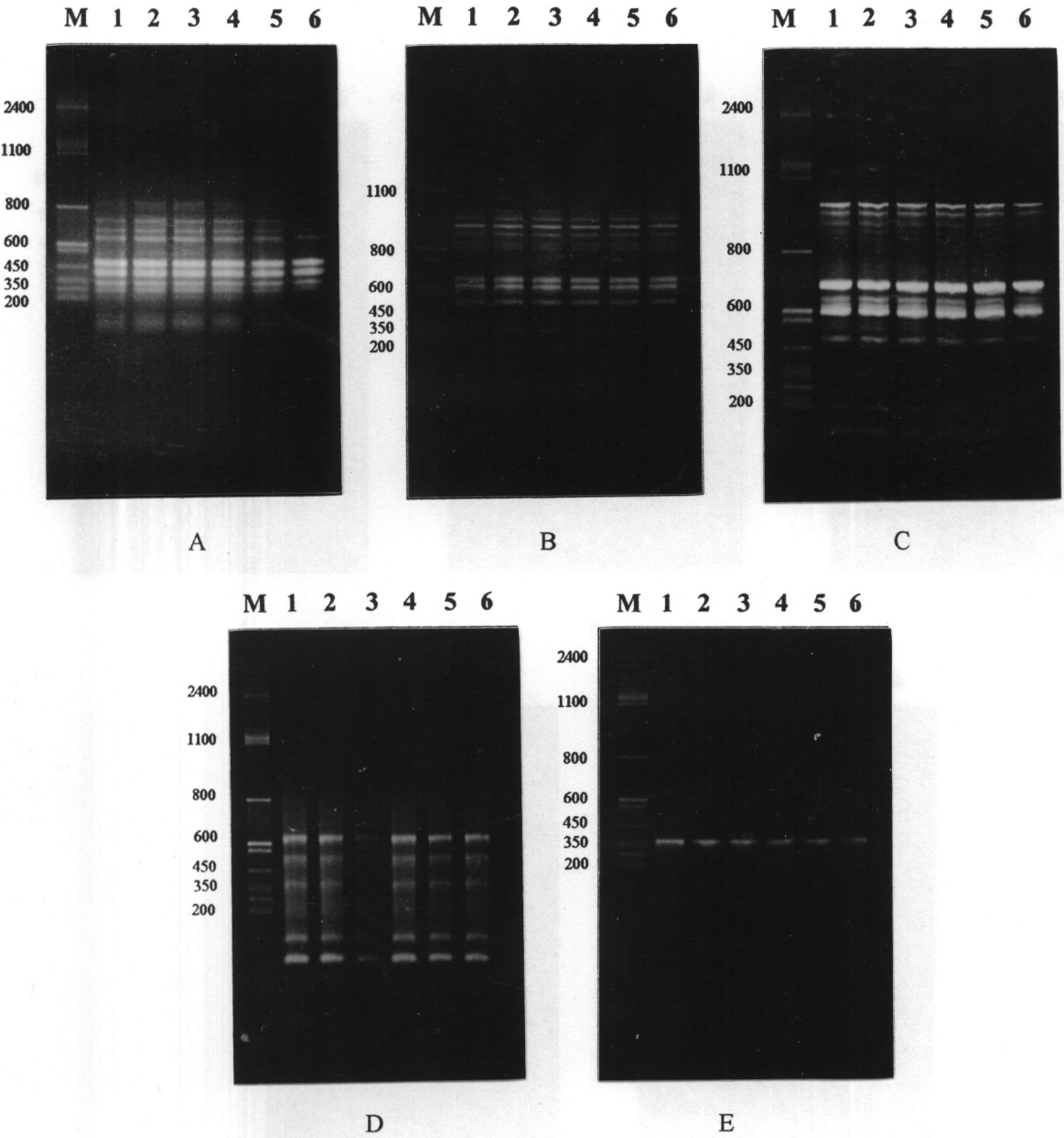
จากรูป 9D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPH-17 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 5 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-610 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพหุชาติที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 135 365 500 และ 610 ตามลำดับ

จากรูป 9E แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPW-17 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 350 bp. แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพหุชาติที่ได้จากโคคนละพื้นที่

จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของ *F. elongatus* ซึ่งเตรียมดีเอ็นเอจากพหุชาติใบไม้ที่ได้จากโคจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 ตัว โคจากจังหวัดลำพูน 3 ตัว แล้วนำไปเพิ่มขยายปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary primer จำนวน 5 primers คือ OPA-02, OPA-07, OPH-11, OPQ-14 และ OPW-14 พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ แต่น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) ระหว่างพหุชาติที่ได้จากโคคนละพื้นที่ การศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 5 primers พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 42 แถบ น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 100-1010 bp.

จากรูป 10A แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-02 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 180-780 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพหุชาติที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180 220 350 540 620 660 700 และ 780 ตามลำดับ

จากรูป 10B แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPA-07 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-880 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพหุชาติที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 230 600 700 800 และ 880 ตามลำดับ

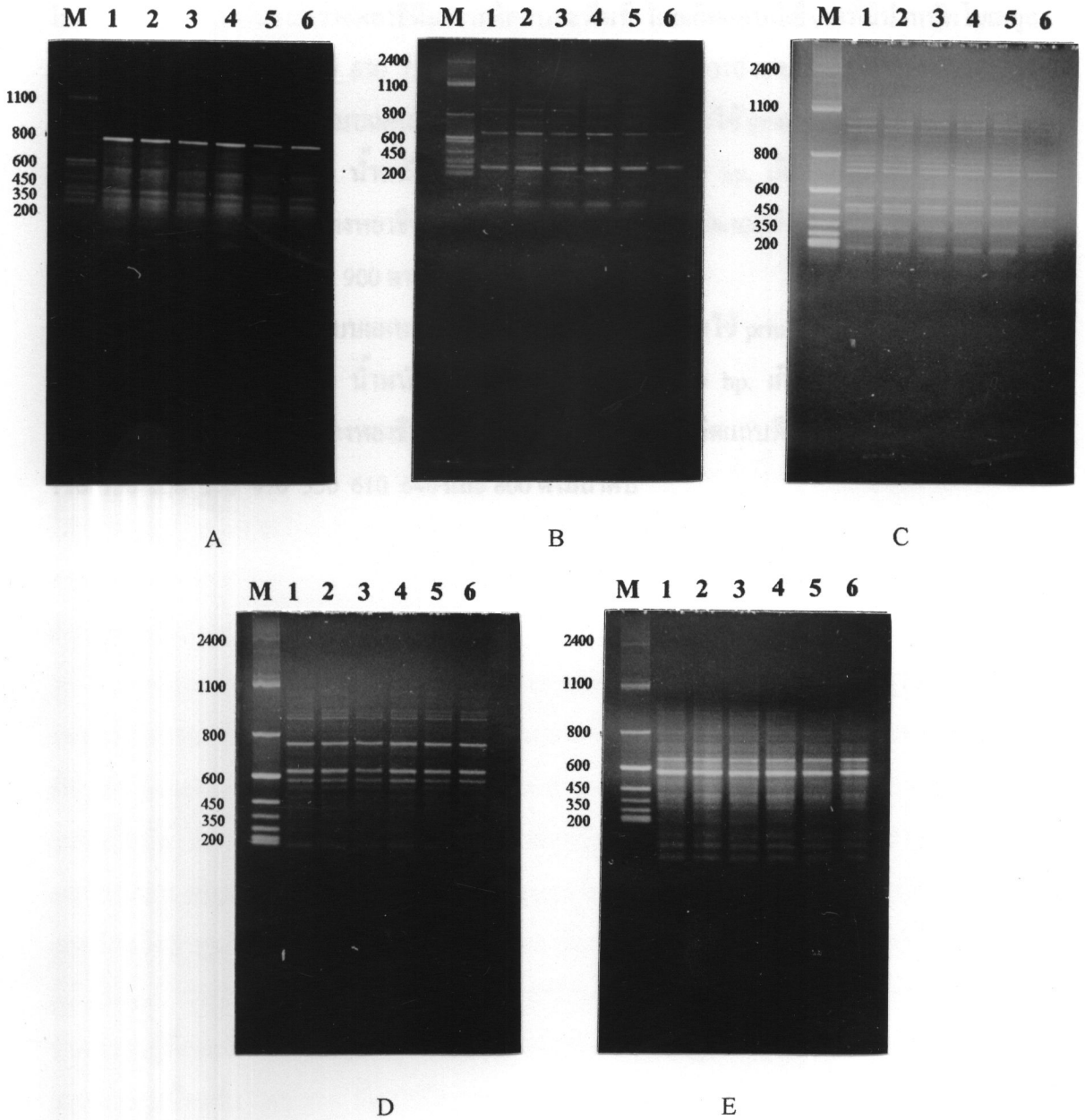


รูป 10 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *O. streptocoelium* โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

A) OPA-02 B) OPA-04 C) OPE-13 D) OPH-17 E) OPW-17

(lane M, molecular weight marker ; lane 1-3, ตัวอย่างพยาธิจากเชียงใหม่ ;

lane 4-6 , ตัวอย่างพยาธิจากลำพูน)



รูป 11 แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *F. elongatus* โดยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้ primer

A) OPA-02 B) OPA-07 C) OPH-11 D) OPQ-14 E) OPW-14

(lane M, molecular weight marker ; lane 1-3, ตัวอย่างพยาธิจากเชิงใหม่ ;

lane 4-6 , ตัวอย่างพยาธิจากลำพูน)

จากรูป 10C แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPH-11 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 190-1010 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาธิที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 190 235 320 470 510 600 630 720 760 800 830 970 และ 1010 ตามลำดับ

จากรูป 10D แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPQ-14 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200-900 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาธิที่มาจากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 200 540 570 520 750 และ 900 ตามลำดับ

จากรูป 10E แสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ primer OPW-14 ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 9 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 550-800 bp. เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันระหว่างพยาธิที่ได้จากโคคนละพื้นที่ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุล 110 130 250 370 470 550 610 640 และ 800 ตามลำดับ

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ พบพยาธิใบไม้ 3 ชนิดจากกระเพาะลำไส้ของโค (*Bos indicus*) ในอำเภอเมืองของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน คือ *Fischoederius elongatus*, *Orthocoelium streptocoelium* และ *Paramphistomum epiclitum* ในขณะที่ Sey et al., (1994) สำนวณพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้ของโคในจังหวัดสิงห์บุรีและกรุงเทพฯ พบพยาธิใบไม้นอกเหนือจากการศึกษาในครั้งนี้ถึง 6 ชนิด ได้แก่ *Gastrotylax crumenifer*, *Carmyerius spatiosus*, *O. dicranocoelium*, *O. parvipapillatum*, *P. ichikawai* และ *Calicophoron calicophorum* ทั้งนี้เนื่องด้วยการศึกษาในครั้งนี้สำนวนพยาธิใบไม้จากโคจำนวนไม่มากนัก จึงทำให้มีโอกาพบพยาธิได้น้อยกว่านั่นเอง ดังนั้นถ้าหากมีการขยายการศึกษาออกไปโดยการเพิ่มจำนวนของสัตว์รวมถึงเพิ่มชนิดและตำแหน่งที่ทำการสำนวนคาดว่าจะพบชนิดของพยาธิใบไม้ในพื้นที่นี้ได้มากขึ้น

จากการสำรวจพบค่า prevalence รวมของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนมีค่าสูงถึง 78.39% แสดงว่ามีการแพร่ระบาดของพยาธิใบไม้ในกระเพาะลำไส้ของโคเป็นอย่างมาก และเมื่อเปรียบเทียบค่า prevalence รวมของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนพบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% โดยค่า prevalence รวมของจังหวัดเชียงใหม่มีค่าสูงกว่าจังหวัดลำพูน (87.5% และ 71.43% ตามลำดับ) และเมื่อเทียบค่า prevalence ของพยาธิแต่ละชนิดระหว่างจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูนก็พบว่าค่า prevalence ของพยาธิแต่ละชนิดมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับค่า prevalence รวมของแต่ละจังหวัด ซึ่งค่าเหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงสภาพการเลี้ยงโคของเกษตรกรยังขาดความรู้ที่เหมาะสมด้านวิชาการเกี่ยวกับหลักการจัดการเลี้ยงดูหลักการให้อาหารตลอดจนด้านการควบคุมป้องกันโรคต่างๆ นับว่าเป็นอุปสรรคเป็นอย่างมากในด้านการเพิ่มผลผลิตโค อันจะส่งผลโดยตรงต่อรายได้ของเกษตรกรเองด้วย (ภาควิชาสัตวบาล, 2525; ศรีเทพ, 2539)

พยาธิใบไม้ในกลุ่มที่ทำการศึกษานี้ยากที่จะจัดจำแนกจากลักษณะทางกายรูปวิทยา ถึงแม้ว่าจะมีวิธี histological examination เข้ามาช่วยในการจำแนกก็ตามแต่การทำค่อนข้างใช้เวลาและลักษณะที่ดูค่อนข้างยาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้นำเอาเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งประยุกต์มาจากเทคนิค RAPD แต่ให้ผลที่ดีกว่าคือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์พร้อมทั้งมีความชัดเจนมากขึ้น และผลของการทำปฏิกิริยายังมีความสม่ำเสมอ ซึ่งเทคนิค RAPD จะมี

ปัญหาเกี่ยวกับความสม่ำเสมอจากผลของการทำปฏิกิริยา จากการสุ่มใช้ arbitrary primer จำนวนทั้งหมด 6 primers พบว่า 5 primers สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลักษณะเป็น polymorphism และแต่ละ primer ก็ให้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเฉพาะตัว การศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 5 primers พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 61 แถบ น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 135-3450 bp. และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 50 แถบ ซึ่งใช้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดพยาธิได้

แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจาก 5 primers ได้แก่ OPA-02, OPA-04, OPB-18, OPC-09 และ OPH-11 เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลเพื่อหาความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันระหว่างชนิดพยาธิโดยใช้ cluster analysis ในโปรแกรม SPSS พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ *S. falcatulus* อยู่ในกลุ่มแรก กลุ่มที่สองคือ *P. epiclitum*, *O. streptocoelium* และ *F. elongatus* ซึ่งในกลุ่มที่สองนี้ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ *P. epiclitum* และ *O. streptocoelium* อยู่ในกลุ่มย่อยแรก และกลุ่มย่อยที่สอง ได้แก่ *F. elongatus* และเมื่อไปดูค่า similarity index ที่คำนวณได้จากสูตรของ Nei and Li (1979) พบว่าแนวโน้มไปในทางเดียวกันซึ่งสอดคล้องกับหลักทางอนุกรมวิธาน กล่าวคือพยาธิทั้งสามชนิด ได้แก่ *P. epiclitum*, *O. streptocoelium* และ *F. elongatus* จัดอยู่ใน family เดียวกัน ส่วน *P. epiclitum* และ *O. streptocoelium* อยู่ใน subfamily เดียวกัน และ *S. falcatulus* ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ (control) ในการศึกษาในครั้งนี้ ก็แยกออกไปเป็นอีกกลุ่มหนึ่งอย่างชัดเจน

จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของ *P. epiclitum*, *O. streptocoelium* และ *F. elongatus* ซึ่งเตรียมดีเอ็นเอจากพยาธิใบไม้ที่ได้จากโคจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 ตัว โคจากจังหวัดลำพูน 3 ตัว แล้วนำไปเพิ่มขยายปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary primer จำนวน 10 primers พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ทั้งหมด แต่น้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิที่ได้จึงไม่แตกต่างกันทั้งนี้อาจเนื่องจากจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนมีอาณาเขตติดต่อกันจึงมีการแลกเปลี่ยนโคระหว่างพื้นที่ได้ง่าย เมื่อเทียบกับการศึกษา *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 จากปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) จากแม่น้ำ 3 สายที่แยกจากกันชัดเจน โดยใช้เทคนิค RAPD ผลการศึกษาแสดงให้เห็น genetic variations ระหว่างกลุ่มประชากรของ *G. salaris* (Cunningham and Mo, 1997)

จะเห็นได้ว่าเทคนิค HAT-RAPD เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกสามารถนำมาช่วยในการจัดจำแนกและวิเคราะห์พันธุกรรมของพยาธิได้ดี จากการทดลองพบว่าแต่ละ primer สามารถใช้แยกความแตกต่างของพยาธิใบไม้ *F. elongatus*, *O. streptocoelium*, *P. epiclitum* และ *S. falcatulus* ได้

พร้อมทั้งแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคนี้มีความเฉพาะตัวในพยาธิแต่ละชนิด สามารถพัฒนาต่อไปเพื่อหา specific primer สำหรับพยาธิแต่ละชนิดได้

จากการวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงชนิดของพยาธิใบไม้จากกระเพาะไส้จี่วัวโคในจังหวัด เชียงใหม่และลำพูน รวมทั้งข้อมูลที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD ก็สามารถนำไปสนับสนุนงานด้าน อนุกรมวิธานของพยาธิในกลุ่มนี้ได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2542. ประมวลสถิติประจำปี 2542. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 173 หน้า.
- กลุ่มงานวิจัยสินค้าเกษตรกรรมที่ 1. 2537. การผลิต การตลาด โคเนื้อ (เอกสารวิจัยเศรษฐกิจ เลขที่ 4/2537). กลุ่มงานวิจัยสินค้าเกษตรกรรมที่ 1 กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 181 หน้า.
- ทวิศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. Polymerase Chain Reaction. ใน นรเศรษฐ สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, ขง ภู่วรรณ (บก.), อนุชีววิทยาทางการแพทย์. หน้า 69-81.
- บุรชัย สอนยานนท์. 2536. การวิเคราะห์ DNA โดยดูจาก RFLP และ RAPD. ใน วัฒนาลัย ปานเกร็ด, สรวง อุดมวรภัณฑ์ (บก.), หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ “เทคนิคทางอนุชีววิทยาและพันธุวิศวกรรม”. หน้า 18.28-18.42.
- ฝ่ายเศรษฐกิจการปศุสัตว์. 2535. สถานการณ์เศรษฐกิจการปศุสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ ช่วงครึ่งหลัง ปี 2535 และแนวโน้ม ปี 2536. ฝ่ายเศรษฐกิจการปศุสัตว์ กองแผนงาน กรมปศุสัตว์. 41 หน้า.
- พรงาม ลิ้มตระกูล. ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. เชียงใหม่ : โรงพิมพ์ดาว. 264 หน้า.
- พิณทิพ รื่นวงษา. 2536. การแยกโปรตีนด้วยวิธีการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส. ใน วัฒนาลัย ปานเกร็ด, สรวง อุดมวรภัณฑ์ (บก.), หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ “เทคนิคทางอนุชีววิทยาและพันธุวิศวกรรม”. หน้า 4.1-4.2.
- ภาควิชาพันธุศาสตร์. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 53 หน้า.
- ภาควิชาสัตวบาล. 2525. การผลิตโคเนื้อ. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 480 หน้า.
- รพีพงษ์ วงศ์ดี. 2540. โครงการป้องกันโรคจากสัตว์นำเข้า. ใน สัญชัย จตุรสีทธา (บก.), แนวโน้มการผลิตปศุสัตว์ในประเทศไทย. หน้า 26-36.
- วัชร อรรถทิพพหลคุณ, มนตรี อรรถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 208 หน้า.

- พิรศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2530. ยากำจัดพยาธิสำหรับสัตว์เลี้ยง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะ
ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 258 หน้า.
- ศรเทพ ชัมวาสร. 2539. การเลี้ยงโคเนื้อ แนวทางการพัฒนาอาชีพของเกษตรกรไทย. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้น
ส่วนจำกัด ฟันนี้ พบบลิชซิ่ง. 360 หน้า.
- สุกรณ์ โพธิ์เงิน. 2525. หนอนพยาธิวิทยาสาขาสัตวแพทยศาสตร์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
264 หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. การตรวจสอบสายพันธุ์พืชโดยเทคนิคอาร์เอฟดี. ใน ชีรัช ชนานันต์
(บก.), การจัดจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยา
ศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. หน้า 125-139.
- Anuntalabhochai S, Chiangda J, Chundet R, Apavat P. 2000. Genetic Diversity within Lychee (*Litchi
chinensis* Soonn.) based on RAPD analysis. International Symposium on Tropical and
Subtropical fruits. 26th Nov – 1st Dec. Cairhs, Australia.
- Barral V, This P, Imbert-Establet D, Combes C, Delseny. 1993. Genetic Variability and Evolution of
the *Schistosoma* genome Analysed by Using Random Amplified Polymorphic DNA Makers.
Mol Bioch P, 59(2) : 211-222.
- Grosberg, R.K., Levitan, D.R., Cameron, B.B. 1996. Charactorization of Genetic Structure and
Genealogies Using RAPD-PCR Markers: A Random Primer for the Novice and Nervous. In
Ferraris JD, Palumbi SR (Ed.), Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols.
Wiley-Liss, Inc., pp 67-100.
- Cunningham CO, Mo TA. 1997. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of Three
Norwegian *Gyrodactylus salaris* Populations (Monogenea; Gyrodactylidae). *J Parasitol*, 83(2)
: 311-314.
- Davies CM, Webster JP, Kruger O, Munatsi A, Ndamba J, Woolhouse MEJ. 1999. Host-parasite
Population Genetics: A Cross-sectional Comparison of *Bulinus globosus* and *Schistosoma
haematobium*. *Parasitol*, 119(3) : 295-302.
- Dezfuli BS, Tinti F. 1998. Species Recognition of Congeneric Acanthocephalands in Slider Turtles
by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *J Parasitol*, 84(4) : 860-862.

- Minchella DJ, Sorensen RE, Curtis JC, Bieberich. 1997. Molecular Biology of Trematodes : Approaches and Applications. In Fried B, Graczyk TK (ed.), *Advances in Trematode Biology*. New York : CRC Press LLC, pp 405-446.
- Hanna REB, Williamson DS, Mattison RG, Nizami WA. 1998. Seasonal Reproduction in *Paramphistomum epiclitum* and *Gastrothylax crumenifer*, Rumen Paramphistomes of the Indian Water Buffalo, and Comparison with the Biliary Paramphistome *Gigantocotyle explanatum*. *Int J Parasitol*, 18(4) : 513-521.
- Horak IG. Paramphistomiasis of domestic ruminants. *Adv Parasitol* 1971, 9 : 33-71.
- Kapel CMO, Pozio E, Sacchi L, Prestrud P. 1999. Freeze Tolerance, Morphology, and RAPD-PCR Identification of *Trichinella nativa* in Naturally Infected Arctic Foxes. *J Parasitol*, 85(1) : 144-147.
- Kral'ova I. 1996. A Total DNA Characterization in *Proteocephalus exiguus* and *P. percae* (Cestoda : Proteocephalidae) : Random Amplified Polymorphic DNA and Hybridization Techniques. *Parasit Res*, 82(8) : 668-671.
- Liu J, Berry RE. 1995. Differentiation of Isolates in the Genus *Steinernema* (Nematoda : Steinernematidae) by Random Amplified Polymorphic DNA Fragments and Morphological Characters. *Parasitol*, 111(1) : 119-125.
- Malek EA. 1980. Snail-transmitted Parasitic Diseases. Florida : CRC Press, Inc., pp 199-220.
- Minchella DJ, Sorensen, Curtis J, Bieberich AA. 1997. Molecular Biology of Trematodes: Approaches and Applications. *Advances in Trematode Biology*, Edited by Fried B, Braczyk TK. New York : CRC Press, Inc., pp 405-446.
- Nei M, Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 5269-5273.
- Noble ER, Noble GA. 1982. *The Biology of Animal Parasites*. Philadelphia : Lea & Febiger, pp 174-175.
- Petrie JL, Burg III EF, Cain GD. 1996. Molecular Characterization of *Echinostoma caproni* and *E. paraensei* by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *J Parasitol*, 82(2) : 360-362.

- Pozio E, Kapel CMO, Garmble HR. 1997. Specificity and sensitive of random amplified polymorphic DNA analysis for the identification of single larve of *Trichinella* after experimental infection of pigs. *Parasit Res*, 85(6) : 504-506.
- Pozio E, Meneghi DD, Roelke-Parker ME, Rosa GL. 1997. *Trichinella nelsoni* in Carnivores from the Serengeti Ecosystem, Tanzania. *J Parasitol*, 83(6) : 1195-1198.
- Reddy YA, Rao JR, Butchaiah, Sharma B. 1998. Random Amplified Polymorphic DNA for the Specific Detection of Bubaline *Echinococcus granulosus* by Hybriddization Assay. *Vet Parasit*, 79(4) : 315-323.
- Sandoval H, Manga-Gonzalez Y, Campo R, Garcia E, Castro JM, de la Vega Mp. 1999. Preliminary Study on Genetic Variability of *Dicrocoelium dendriticum* Determined by Random Amplified Polymorphic DNA. *Parasitology International*, 48(1) : 21-26.
- Sey O, Prasitirat P. 1994. Amphistomes (Trematoda, Amphistomida) of Cattle and Buffalo in Thailand. *Miscnea Zool hung*, 9 : 11-17.
- Sey O, Prasitirat P, Romratanapun S, Mohkaew K. 1997. Morphological Studies and Identification of Rumen Flukes of Cattle in Thailand. *Riv. Parassit.*, XIV(LVIII)-N.2 : 247-256.
- Steindel M, Grisars EC, de Carvalho Pinto CJ, Cordeiro FD, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha A. 1998. Characterization of Trypanosomes from the Subgenus *Schizotrypanum* Isolated from Bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera : Vespertilionidae), Captured in Florianopolis, Santa Catarina State, Brazil. *J Parasitol*, 84(3) : 601-607.
- Tsai MH, Marx KA, Ismail MM, Tao LF. 2000. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polymerase Chain Reaction Assay for Identification of *Schistosoma mansoni* Strains Sensitive or Tolerant to Anti-schistosomal grugs. *J Parasitol*, 86(1) : 148-149.
- Yu JR, Chung JS, Chai JY. 1997. Different RAPD Patterns Between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus* Miyata type. *Korean J Parasitol*, 35(4) : 295-298.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการเก็บตัวอย่าง

ตารางภาคผนวก 1 แสดงผลการเก็บตัวอย่างพยาธิจาก อ.เมือง จ.เชียงใหม่

วันที่	No.	ชนิดพยาธิ		
		<i>P. epiclutum</i>	<i>O. streptocoelium</i>	<i>F. elongatus</i>
25/1/43	1	-	*	-
26/1/43	2	*	-	-
28/1/43	3	*	*	-
29/1/43	4	*	*	3
30/1/43	5	*	-	-
12/2/43	6	41	17	1
15/2/43	7	*	-	40
16/2/43	8	*	-	*
17/2/43	9	*	-	-
19/2/43	10	*	2	43
21/2/43	11	22	33	72
22/2/43	12	10	-	-
23/2/43	13	49	23	81
24/2/43	14	27	7	94
1/3/43	15	-	-	-
2/3/43	16	-	-	-

- ไม่พบพยาธิ

* ไม่สามารถนับจำนวนพยาธิได้

ตารางภาคผนวก 2 แสดงผลการเก็บตัวอย่างพยาธิจาก อ.เมือง จ.ลำพูน

วันที่	No.	ชนิดพยาธิ		
		<i>P. epiclitum</i>	<i>O. streptocoelium</i>	<i>F. elongatus</i>
1/2/43	1	*	*	-
	2	*	1	*
	3	-	-	-
2/2/43	4	*	-	2
	5	*	12	*
	6	-	-	-
	7	-	-	-
4/2/43	8	*	-	-
	9	5	-	-
	10	*	*	-
	11	*	*	20
5/2/43	12	*	-	-
	13	*	-	-
	14	*	30	3
	15	15	3	-
7/2/43	16	-	-	-
8/2/43	17	*	*	1
	18	*	1	-
	19	*	20	*
	20	-	-	-
	21	-	-	-

- ไม่พบพยาธิ

* ไม่สามารถนับจำนวนพยาธิได้

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์ เอนไซม์ และสารละลายอื่นๆ

การเตรียมบัฟเฟอร์ เอนไซม์และสารละลายอื่นๆ

1. 5 M NaCl : NaCl 29.2 กรัม
ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร Sterile ด้วยการ Autoclave
2. 1 M HCl : Concentrated HCl 86.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น 913.8 มิลลิลิตร
เติม Concentrated HCl ลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ควรทำใน Chemical Hood เพราะไอกรดของ HCl จะเกิดเป็นควันฟุ้งกระจาย
3. 10 M NaOH : NaOH 40 กรัม
ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ถ้าต้องการ Sterile ก็ทำได้ด้วยการ Autoclave การใช้สารละลาย NaOH โดยทั่วไป เช่น นำไปเจือจางเพื่อใช้ในการเตรียม ดีเอ็นเอ ไม่จำเป็นต้อง Autoclave แต่อาจละลายหรือเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ Sterile ก็พอเพียง
4. 1 M Tris-HCl : Tris base 121.1 กรัม
ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ (pH 7-8) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร Sterile ด้วยการ Autoclave
5. 0.5 M EDTA : Disodium ethylenediamine tetraacetate - $2H_2O$ 136.1 กรัม
ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนอย่างแรงๆ ด้วยการใช้ Magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH โดยใช้ NaOH จนได้ pH 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA ละลายได้หมดพอดี ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไป Autoclave
6. 10% SDS : SDS 10 กรัม
ละลายในน้ำกลั่นที่ Sterile แล้ว 100 มิลลิลิตร อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง
7. chloroform – isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1)
ผสม chloroform 240 มิลลิลิตร และ isoamyl alcohol 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C
8. 50x TAE : Tris base 242 กรัม
glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร
เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำไป autoclave

9. 10x TBE : Tris.base 108 กรัม
boric acid 57.1 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร
เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำไป autoclave
10. 10x TPE : Tris.base 108 กรัม
85% phosphoric acid 15.5 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร
เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำไป autoclave
11. 6x loading buffer : 0.25% bromophenol blue
0.25% xylene cyanol
30% glycerol
ใน electrophoresis buffer หรือน้ำ
12. Rnase A : Rnase A 100 มิลลิกรัม
ละลายในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) และ 15 mM NaCl ผสมอยู่
13. Phenol อิมัตว : phenol 100 มิลลิลิตร
8-hydroxy quinoline 400 มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 8.0 > 500 มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol 100 ไมโครลิตร

นำ phenol มาหลอมละลายที่อุณหภูมิ 65°C แล้วเติม 8-hydroxy quinoline 400 มิลลิลิตรและ 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย magnetic stirrer นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแยกชั้น แล้วดูดเอา aqueous phase ชั้นบนออก จากนั้นเติม 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้งหรือจนกระทั่ง pH ของ phenol > 7.8 (ทดสอบด้วย pH paper) จึงเติม 2-mercaptoethanol 200 มิลลิลิตร และ 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อปิดผิวสารละลาย จากนั้นเก็บสารละลาย phenol อิมัตวที่ได้ไว้ในขวดสีเข้ม ที่อุณหภูมิ 4°C

14. ethidium bromide 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งสารละลายหมด ซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีเข้ม ที่อุณหภูมิ 4°C ในการเตรียมสารนี้จะต้องระมัดระวังมาก ต้องสวมถุงมือและอย่าหายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

15. Tris ethylenediaminetetra acetic acid buffer (TE buffer) : 10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วนำไป autoclave

16. RNase A

ชั่ง RNase A 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) และ 15 mM NaCl ผสมอยู่ จากนั้นต้มในน้ำเดือด 15 นาที (ระวังให้ระดับสารละลายเอนไซม์อยู่ต่ำกว่าระดับน้ำเดือด) ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แบ่งเป็น aliquots (100-500 มิลลิลิตร) เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เอนไซม์นี้จะยังทำงานได้ดี แม้ผ่านการทำ Freeze-thaw หลายๆ ครั้ง

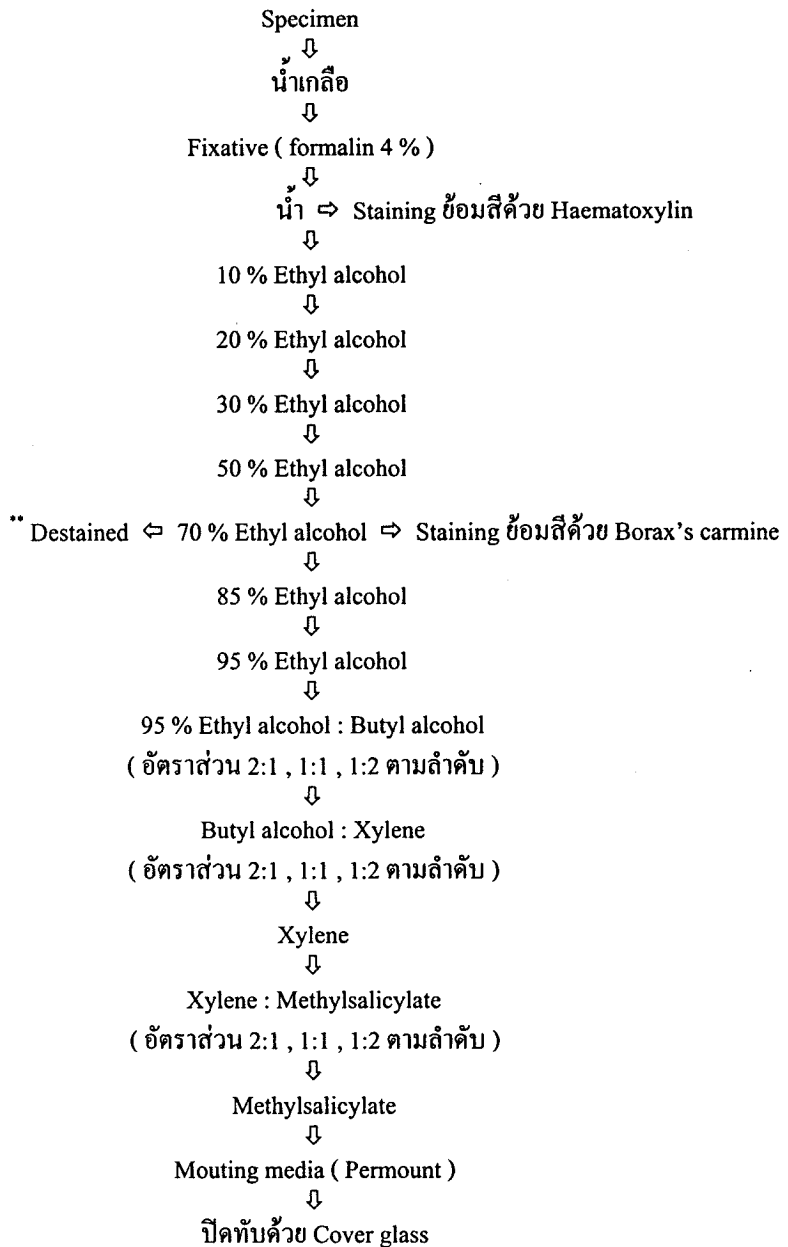
17. Proteinase K

เตรียม stock 20 มิลลิกรัม ในน้ำ เก็บที่ -20°C

Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

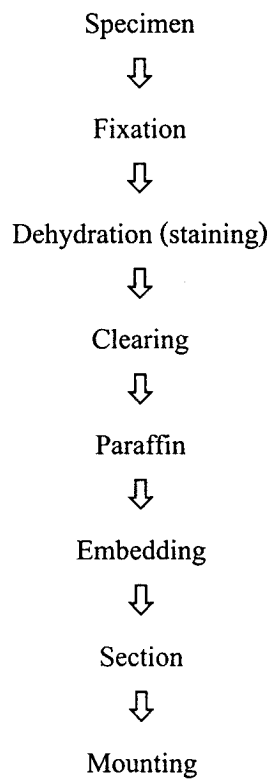
ตารางภาคผนวก 3 แสดง primer และ base sequence ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

primer	code sequence 5'→3'
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPB-18	CCACAGCAGT
OPC-09	CTCACCGTCC
OPE-13	CCCGATTCTGG
OPH-11	CTTCCGCAGT
OPH-17	CACTCTCCTC
OPQ-14	GGACGCTTCA
OPQ-20	TCGCCCAGTC
OPW-14	CTGCTGAGCA
OPW-17	GTCCTGGGTT



****หมายเหตุ** Destained เป็นการทำให้สีย้อม Specimens ในสไลด์จางลงโดยใช้ 1 % HCl ใน 70 % Ethyl alcohol เมื่อได้สีที่ต้องการแล้วใช้ Stop destained solution ซึ่งเป็นสารละลาย 1 % KOH ใน 70 % Ethyl alcohol

รูปภาคผนวก 1 สรุปขั้นตอนการทำสไลด์ถาวร (Permanent slide)



รูปภาคผนวก 2 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตัด section

ภาคผนวก ค

รูปวิธาน (key)

รูปวิธาน (key) ในการจัดจำแนกพยาธิใบไม้จากกระเพาะลำไส้วัวโค (Sey *et al.*, 1994)

Key to the subfamily of Paramphistomatidae

1. พบ ventral pouch.....Gastrothylacidae
- ไม่พบ ventral pouch.....Paramphistomidae

Key to the genera of Gastrothylacidae

1. Uterus และ vas deferens ไชว้กัน ใกล้กับกึ่งกลางลำตัว..... *Gastrothylax*
 Uterus และ vas deferens อยู่ทางด้าน dorsal ของ median line..... 2
2. Testes เรียงกันตามขวาง แต่ละด้านของ median line..... *Carmyyerius*
 Testes ไม่ได้เรียงกันตามขวาง อยู่กึ่งกลางลำตัว..... *Fischoederius*

Key to the genera of Paramphistomidae

1. Excretory duct and Laurer's canal ไชว้กัน..... 2
 Excretory duct and Laurer's canal ไม่ไชว้กัน..... *Orthocoelium*
2. Pars musculosa เจริญไม่ดี..... 3
 Pars musculosa เจริญดี..... *Caliocphoron*
3. Acetabulum แบบ *Explanatum* type..... *Explanatum*
 Acetabulum แบบ *Paramphistomum* or *Pisum* type..... *Paramphistomum*

Key to the species of *Orthocoelium*

1. Pharynx แบบ *Dicranocoelium* type..... 2
 Pharynx แบบ *Calicophoron* type..... *O. streptocoelium*
2. Terminal genitalium แบบ *Gracile* type..... *O. dicranocoelium*
 Terminal genitalium แบบ *Parvipapillatum* type..... *O. parvipapillatum*

Key to the species of *Paramphistomum*

1. Terminal genitalium แบบ *Epiclitum* type..... *P. epiclitum*
 Terminal genitalium แบบ *Ichikawai* type..... *P. ichikawai*

ประวัติการศึกษา

ชื่อ นาย ประลองยุทธ ศรีपालวิทย์
วัน เดือน ปีเกิด 4 สิงหาคม 2519
ประวัติการศึกษา

	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษาที่สำเร็จ
มัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนอัสสัมชัญ ลำปาง	2533
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนเชียงคำวิทยาคม	2536
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2541

ที่อยู่ปัจจุบัน 40 หมู่ 5 ถ. พิศาล ต. ห้วยน อ. เชียงคำ จ. พะเยา 56110
เบอร์โทรศัพท์ (054) 429483
E-mail address pralongyut@yahoo.com

ผลงานวิจัย

- Chariyahpongpun P, **Sripalwit P**, Wongsawad C. 2000. Reinvestigated life history of *Moniliformis dubius* Meyer, 1933 in Chiang Mai, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 31 (Suppl 1) : 65-68.
- Nichapun A, **Sripalwit P**, Wongsawad C. 2000. Light and Scanning Electron Microscopy of the Trematode *Acanthostomum burmimis* in the Watersnake *Xenochrophis piscator*. JEMST, 14(1) : 17-22.
- Sripalwit P**, Wongsawad C. 2000. The tegumental surface of the adult *Moniliformis dubius* Meyer, 1933 by scanning electron microscope. Songklanakarin J Sci Technol, 22(2) : 257-262.