

เป็นรายงานแรกที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาจัดตั้งวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) ร่วมกับการวิเคราะห์ melting temperature สำหรับตรวจวัดหาการติดพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ในหอยไซ (bithynid snail) โสสต์กึ่งกลางตัวที่ 1, ปลาวงศ์ตะเพียน (cyprinoid fish) โสสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 และคนซึ่งเป็นโฮสต์เฉพาะแบบครบวงจร โดยใช้ชุดตรวจของ LightCycler FastStrat DNA Master HybProbe kit และเครื่อง LightCycler PCR (Roche Applied Science) ทั้งสามระบบใช้คู่ specific PCR primers และคู่ fluorophore-labeled probes เดียวกัน ที่ออกแบบสร้างมาจาก pOV-A6 specific probe sequence (Genbank Accession No. S80278) ได้ specific *O. viverrini* amplicon ขนาด 162 bp และใช้ คู่ internal control primer ที่ออกแบบจากลำดับ nucleotide ของ mitochondrion genome ของปลา *Puntius ticto* (Genbank accession no. NC_008658) สำหรับการตรวจวัดในปลา ได้ amplicon ขนาด 207 bp

วิธี real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ melting temperature ที่จัดตั้งนี้ ไม่เกิดปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน DNA product เมื่อใช้ DNA template ที่เตรียมจากตัวอย่างปรสิตอื่นที่มีหอยและปลาเป็นโฮสต์กึ่งกลาง คือ *Centrocestus* spp., *H. taichui*, *F. gigantica*, *E. malayanum*, *P. heterotremus*, *Haplorchoides* spp., *Stellantchasmus* spp. และพยาธิใบไม้เลือดของสัตว์ แสดงถึงความจำเพาะของคู่ specific primer และคู่ fluorophore-labeled probe ที่ถูกออกแบบมาอย่างจำเพาะ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันกับวิธี conventional-PCR ที่จัดตั้งขึ้นตรวจวัดหาการติดพยาธิ *O. viverrini* ในหอยไซและปลาวงศ์ตะเพียน ที่ใช้เปรียบเทียบกับวิธี real-time PCR

ผลการศึกษานี้พบว่าวิธี real-time PCR มีความไวสูง สามารถตรวจวัดหาเซอร์คาเรียของ *O. viverrini* จำนวน 1 ตัว ที่เติมในหอยไซปลอดพยาธิจำนวน 30 ตัว และสามารถแยกหอยไซที่ติดพยาธิ *O. viverrini* ออกได้จากหอยไซปลอดพยาธิได้ วิธีนี้ให้ค่าความไวและความจำเพาะเป็น 100% และสามารถให้ผลการตรวจเป็นลบกับหอยไซจากธรรมชาติ ที่ตรวจไม่พบเซอร์คาเรีย โดยวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีค่าความไวและค่าความจำเพาะสูง ในการตรวจวัดหาการติดพยาธิ *O. viverrini* ในหอยไซ มีความรวดเร็ว อ่านผลได้ทันที ไม่ต้องเสียเวลาในการตรวจหา PCR product โดย gel electrophoresis และยังใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย เป็นวิธีการที่มีศักยภาพสูง สำหรับการศึกษาด้านระบาดวิทยาของการติดพยาธิ *O. viverrini* ในหอยไซ ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 ของพยาธิ และยังสามารถใช้วิธี real-time PCR ที่พัฒนานี้ไปเป็นต้นแบบในการตรวจวัดหาเซอร์คาเรียของปรสิตอื่นในแหล่งน้ำธรรมชาติได้

วิธี real-time PCR นี้ยังได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาการติดเชื้อ *O. viverrini* ในปลาวงศ์ตะเพียน วิธีนี้สามารถตรวจวัดหาเมตาเซอร์คาเรีย จำนวน 1 ตัว ที่เติมในตัวอย่างหางปลา 30 ตัว และสามารถแยกระหว่างปลาวงศ์ตะเพียนที่มีพยาธิใบไม้ตับออกจากปลาวงศ์ตะเพียนปลอดพยาธิ และไม่เกิดปฏิกิริยากับ genomic DNA template ของปรสิตอื่นที่มีหอยและปลาเป็นโฮสต์กึ่งกลางเช่นเดียวกับที่ทำการศึกษาในหอยไซ ด้วยอาศัยการวิเคราะห์จาก melting curve วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะ 100% ในสถานะที่ศึกษาปลาวงศ์ตะเพียนในห้องทดลอง และได้ผลเช่นเดียวกันกับปลาที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ วิธี real-time PCR ร่วมกับ

การวิเคราะห์ melting curve เป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความถูกต้อง ความไวสูงในการตรวจหาการติดเชื้อ *O. viverrini* ในปลา เป็นวิธีที่มีศักยภาพสูงในการศึกษาเชิงสำรวจด้านระบาดวิทยาในปลาวงศ์ตะเพียน ซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 2 และยังมีประโยชน์ประยุกต์เป็นเครื่องมือในการตรวจหาปรสิตที่ก่อโรคจากการรับประทานปลาน้ำจืด (fish borne parasite)

ในขณะเดียวกันได้พัฒนาจัดตั้งวิธี real-time PCR สำหรับการตรวจหาการติดเชื้อ *O. viverrini* ในตัวอย่างอุจจาระคน พบว่าวิธีการนี้ให้คุณค่าในการวินิจฉัยโรคโดยมีค่าความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง และค่าทำนายผลบวกและทำนายผลลบเป็น 97.5%, 100%, 98.9%, 100% และ 98.2% ตามลำดับ โดยค่าความไวของวิธี real-time PCR ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธี quantified formalin-ethyl acetate concentration ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ($p > 0.05$) ถือว่าเป็นวิธีการที่มีศักยภาพในการวินิจฉัยโรคพยาธิใบไม้ตับ opisthorchiasis ในคนสำหรับการศึกษาด้านระบาดวิทยาในประชากรที่มีจำนวนมากและเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิ สำหรับโปรแกรมการเฝ้าระวังและกำจัดโรคพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทางเดินท่อน้ำดี ซึ่งก่อให้เกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี

วิธี conventional-PCR โดยใช้คู่ primers เดียวกับวิธี real-time PCR เพื่อตรวจวัดหาการติดเชื้อ *O. viverrini* ในหอยไซและปลาวงศ์ตะเพียน ให้คุณค่าในการตรวจวัดต่ำกว่าวิธี real-time PCR แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการศึกษาด้านวิทยาการระบาดและการเฝ้าระวังเพื่อกำจัดพยาธิใบไม้ตับในพื้นที่แหล่งระบาดแทนวิธี c-PCR ได้ดีกว่า

A real-time PCR combined with a melting curve analysis were developed for detection of *Opisthorchis viverrini* in bithynid snails (first intermediate host), and in cyprinoid fishes (second intermediate host) as well as of *O. viverrini* eggs in human (final host) feces, for the first time. Real-time PCR is based on a fluorescence melting curve analysis of a hybrid between an amplicon generated from a family of repeated DNA elements, the pOV-A6 specific probe sequence (Genbank Accession No. S80278), a 162 bp repeated sequence specific to *O. viverrini*, and specific fluorophore-labeled probes.

The real-time PCR in experimentally *O. viverrini* infected bithynid snails, can detect as little as a single cercaria artificially introduced in one pool of 30 non-infected snails. The *O. viverrini* infected snails were discriminated from non-infected snails and from genomic DNA of other parasite DNAs such as *Haplorchis taichui*, *Centrocestus* spp., *Fasciola gigantica*, *Echinostoma malayanum*, *Stellantchasmus* spp., *Paragonimus heterotremus*, *Haplorchoides* spp. and animal schistosomes by their melting temperature. Sensitivity and specificity were both 100%. Melting curve analysis produces sensitive alternative for specific detection of *O. viverrini* infected snails, rapid and allows high throughput as well as no time-consuming post-PCR detection of amplification products by gel electrophoresis and can be carried on small samples. The assay not only has high potential for epidemiological surveys of *O. viverrini* infected bithynid snails, first intermediate hosts but also detection cercaria infested natural water.

This procedure was developed for the detection of *O. viverrini* in its fish intermediate host, cyprinoid fishes. For the internal control system, probes and primers designed base on the sequence of the *Puntius ticto* mitochondrion genome (GenBank accession no. No.008658) which resulting 207 bp amplicon were included in the analysis. This technique could detect as little as a single metacercaria artificially inoculated in 30 fish samples. The *O. viverrini* infected fishes were distinguished from non-infected fishes and from the genomic DNA of other parasites by their melting temperature. Also, sensitivity and specificity of this method were both 100% in the laboratory setting and it outperformed the microscopic method on field-collected samples as well. Similarly as above, melting curve analysis is a rapid, accurate, and sensitive alternative for the specific detection of *O. viverrini* infected fishes. It likewise allows a high throughput and can be performed on small volume of sample. The method has not only great potential for epidemiological surveys of fish intermediate hosts but it could also be adapted as screening tool for a range of food borne parasites in freshwater fishes.

We report the development of such a real-time PCR for the molecular detection of *O. viverrini* in human fecal samples. The diagnostic sensitivity, specificity, accuracy, and positive and negative

predictive values of this method were 97.5%, 100%, 98.9%, 100%, and 98.2% respectively. The sensitivity was not significantly different from that of the quantified formalin-ethyl acetate concentration technique, the gold standard ($P > 0.05$). The procedure has potential for human opisthorchiasis diagnosis in endemic areas, for large epidemiological investigations involving at risk populations and for monitoring eradication programs of the liver fluke which causes hepatobiliary diseases and induces cholangiocarcinoma.

When using the same pair of primers, the results were comparatively evaluated with that of conventional PCR (c-PCR). The c-PCR results showed lower diagnostic values than that of the real-time PCR for detection of *O. viverrini* DNA in both of infected bithynid snails and cyprinoid fishes. These results confirm that real-time PCR can be used instead of c-PCR for large epidemiological study and monitoring the liver fluke-elimination and control programs in endemic areas.