ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42110

CONTROL TRIAL TO REDUCE CONTAMINATION OF FISH BORNE ZOONOTIC TREMATODES IN AQUACULTURE FARMS IN LAO PDR

MS. KULTHIDA KOPOLRAT

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

KHON KAEN UNIVERSITY

2011

b00256199

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42110

CONTROL TRIAL TO REDUCE CONTAMINATION OF FISH BORNE ZOONOTIC TREMATODES IN AQUACULTURE FARMS IN LAO PDR

MS. KULTHIDA KOPOLRAT

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY
2011

CONTROL TRIAL TO REDUCE CONTAMINATION OF FISH BORNE ZOONOTIC TREMATODES IN AQUACULTURE FARMS IN LAO PDR

MS. KULTHIDA KOPOLRAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PARASITOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2011

THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
MASTER OF SCIENCE
IN PARASITOLOGY

Thesis Title: Control trial to reduce contamination of fish-borne zoonotic trematodes in aquaculture farms in Lao PDR

Author: Ms. Kulthida Kopolrat

Thesis Examination Committee:

Assoc. Prof. Dr. Thewarach Laha	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Paiboon Sithithaworn	Member
Assoc. Prof. Dr. Smarn Tesana	Member
Assoc. Prof. Prapast Chalorkpunrut	Member
Assist. Prof. Dr. Weerachai Saijuntha	Member

Thesis Advisors:

..... Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Paiboon Sithithaworn)

.....	.....
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)	(Prof. Dr. Pisake Lumbiganon)
Dean, Graduate School	Dean, Faculty of Medicine

Copyright of Khon Kaen University

กุลธิดา โกพลรัตน์. 2554. **การทดลองเพื่อลดการปนเปื้อนพยาธิใบไม้ในฟาร์มเลี้ยงปลาในประเทศลาว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. ไพบูลย์ สิทธิถาวร

บทคัดย่อ

E 42110

พยาธิใบไม้ในปลาจากสัตว์สู่คน (Fish-borne zoonotic trematodes, FZT) ประกอบด้วยพยาธิในกลุ่ม heterophyids และ opisthorchiids พบได้ทั้งในปลาธรรมชาติและปลาเลี้ยงในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อประเมินประสิทธิภาพของมาตรการในการควบคุมและป้องกันพยาธิใบไม้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาในประเทศลาว โดยมาตรการในการควบคุมและป้องกันพยาธิ ด้วยวิธีการเตรียมบ่อ ทำความสะอาดบ่อ ตากบ่อ โรยปูนขาว สร้างขอบบ่อและรั้ว ติดตั้งระบบกรองน้ำสำหรับกรองน้ำลงบ่อปลา ได้ทำการคัดเลือกฟาร์มปลาในเวียงจันทร์สองฟาร์มเพื่อการทดลองใช้โปรแกรมการควบคุมและติดตามสถานะของพยาธิใบไม้ FZT ในปลา เดือนละครั้งเป็นเวลา 6 เดือน จากการตรวจตัวอย่างปลา 9 ชนิด ได้แก่ ปลาตะเพียน, ปลานวลจันทร์เทศ, ปลากินหญ้า (ปลาเฉาฮื้อ), ปลาเกล็ดเงิน (ปลาลิ่นฮื้อ), ปลาไน, ปลาหัวโต (ปลาซ่งฮื้อ), ปลาจาระเม็ดน้ำจืด, ปลายี่สกเทศ และปลานิล พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเมตาเซอคาเรีย 4 ชนิด คือ *Haplorchis taichui*, *Haplorchis pumilio*, *Centrocestus* sp. และ *Opisthorchis viverrini* ในปลา 7 ชนิด, 4 ชนิด, 2 ชนิด และ 1 (ปลาตะเพียน) ชนิด ตามลำดับ ผลของการทดลองเป็นเวลา 6 เดือนสามารถลดความชุกของเมตาเซอคาเรีย *H. taichui* อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับบ่อที่ไม่ได้ทำการควบคุมในปลา 3 ชนิด คือ ปลาเกล็ดเงิน (ปลาลิ่นฮื้อ), ปลานวลจันทร์เทศและปลายี่สกเทศ ส่วนในปลาตะเพียนแม้ว่าความชุกของเมตาเซอคาเรีย *H. taichui* ในภาพรวมไม่แตกต่างกันแต่ความหนาแน่นในบ่อที่ทำการควบคุมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในเดือนที่ 5 และ 6 ของการทดลอง ผลของการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยจากฟาร์ม (*Melanoides tuberculata* และ *Tarebia granifera*) ด้วยวิธี cercarial shedding และยืนยันผลด้วยวิธี PCR พบเซอคาเรียของ *H. taichui* และ *H. pumilio* ซึ่งมีความสอดคล้องกับชนิดของเมตาเซอคาเรียที่พบในปลา นอกจากนั้นพบว่าคนงานและสัตว์เลี้ยงในฟาร์มมีการติดเชื้อพยาธิ FZT (*O. viverrini* และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก) ซึ่งอาจเป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อนบ่อเลี้ยงปลาได้

E 42110

ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของ FZT โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *H. taichui* เกิดขึ้นจริงในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลา มาตรการในการควบคุมโรคที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ส่งผลให้สามารถลดการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในปลาได้ระดับหนึ่ง ซึ่งหากส่งเสริมให้ใช้มาตรการดังกล่าวผนวกกับการเพาะเลี้ยงพันธุ์ปลาปลอดพยาธิที่ผลิตอย่างเข้มงวดจะเป็นแนวทางหนึ่งในการบริหารจัดการฟาร์มที่ดีและเป็นการควบคุมการแพร่กระจายของพยาธิใบไม้ในปลาสู่คนในภาพรวมด้วยอีกทางหนึ่ง

Kultida Kopolrat. 2011. **Control Trial to Reduce Contamination of Fish-borne Zoonotic Trematodes in Aquaculture Farms in Lao PDR.** Master of Science Thesis in Parasitology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisor: Assoc.Prof. Dr. Paiboon Sithithaworn

ABSTRACT

E 42110

Fish-borne zoonotic trematodes (FZT) consisting of heterophyids and opisthorchiids occur in both wild and culture fish in Southeast Asia. The present study evaluated an effectiveness of preventive measures for control of FZT in aquaculture farms. The preventive measures were pond preparation by applying limming, clear vegetation, create dice and fence surrounding the pond to prevent animal intrusion and installation of water filtration system to filter the water into the pond. Two farms in Vientiane, Lao PDR were selected, implemented a control program and status of FZT in fish monitored at monthly intervals for 6 months. Samples for examination of FZT covered 9 species of fish namely silver barb, mrigal, grass carp, silver carp, common carp, bighead carp, red finned pecu, rohu and nile tilapia. Four types of FZT namely, *Haplorchis taichui*, *Haplorchis pumilio*, *Centrocestus* sp. and *Opisthorchis viverrini* were found in 7, 4, 2 and 1 (silver barb) species of fish, respectively. The control actions resulted in significant reduction in *H. taichui* prevalence in 3 species of fish i.e. silver carp, mrigal and rohu compared with those in the untreated ponds ($p<0.05$) after 6 month of culture period. Although the overall prevalence of *H. taichui* in silver barb were similar but the intensities were significantly lower in fish from the treated compared with the untreated pond at month 5 and 6 ($p<0.05$). Analyses of snail samples (*Melanoides tuberculata* and *Tarebia granifera*) from the farms by cercarial shedding and PCR confirmation revealed the presence of cercarial types belonging to *H. taichui* and *H. pumilio* which correspond with those metacercariae in fish. A simultaneous survey of workers and domestic animals in the farms also indicated the presence of FZT (*O.*

E 42110

viverrini and minute intestinal flukes) which may serve as sources of contamination of the fish pond.

The findings in this study suggested an occurrence of a complete life cycle transmission of FZT particularly *H. taichui* within the aquaculture farms and the application of preventive measures for FZT were effective in certain species of fish. In addition to these results, availability of parasite-free fish fry should contribute not toward good aquaculture practice but also an important alternative mean for FZT control at large.

Goodness portion to the present thesis is dedicated

to my family, thesis advisors and entire teaching staffs

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Paiboon Sithithaworn for his kindness in providing an opportunity to be his advisee. I am also grateful for his valuable supervision, suggestions, supporting, encouragement, guidance and criticism through the course of my study.

Appreciation is also expressed to all staff of Departments of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, for their help and friendship during the time of study.

My special additional thanks are also to all my friends in the Department of Parasitology and E5 laboratory's members for their help, cheerfulness and support.

It is also impossible to forget that this study was supported by Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University and the Food and Agriculture Organization (FAO).

Finally, I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my dear parents and also the members of my family for their love, care, understanding and encouragement throughout my life.

Kulthida Kopolrat

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DECICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Backgrounds and rationales	1
1.2 Research questions	3
1.3 Objectives of this study	3
1.4 Limitations of this study	4
1.5 Anticipated outcome	4
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	
2.1 Fish-borne zoonotic trematodes	5
2.2 Biology of the fish-borne zoonotic trematodes	5
2.3 Epidemiology of fish-borne zoonotic trematodes	7
2.4 Aquaculture in Asia	13
2.5 Culture fish species in Lao PDR	14
2.6 Fish-borne zoonotic trematodes in aquaculture	15
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	
3.1 Study areas	18
3.2 Experimental design	20
3.3 Fish sampling and determination of metacercariae	25
3.4 Preparation of adult worm	26

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
3.5 Snail sampling	26
3.6 Cercarial shedding	26
3.7 Polymerase chain reaction (PCR)	26
3.7.1 Specific primer and PCR condition	27
3.7.2 Preparation of genomic DNA	28
3.7.3 Measurement of DNA	28
3.7.4 Agarose gel electrophoresis	28
3.8 Faecal examination	29
3.9 Statistical analyses	29
CHAPTER IV RESULTS	
4.1 *Haplorchis taichui* infections and species of fish	30
4.2 Prevalence and intensity of FZT metacercariae	32
4.3 Influence of fish size on prevalence and intensity of *H. taichui* infection	40
4.4 Identification of FZT metacercariae and cercariae by PCR method	45
4.5 Summary of FZT metacercariae detected by morphological and molecular methods	48
4.6 Prevalence of cercariae in snail samples from the studied farms	50
4.7 Prevalence of parasitic infection in human and animal hosts	52
CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION	
5.1 Discussion	53
5.2 Conclusion	57
REFERENCES	58
APPENDICES	68
CURRICULUM VITAE	87

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1 Species of liver flukes reported from humans	8
Table 2.2 Important heterophyid species reported from humans	12
Table 4.1 Summary of FZT metacercariae detected by morphological and molecular methods from Laos-viet farm	48
Table 4.2 Summary of FZT metacercariae detected by morphological and molecular methods from Sangsavang pun pla farm	49
Table 4.3 Trematodes cercariae identified by PCR method from the studied farms in Lao PDR	49
Table 4.4 Prevalence rates of trematode cercariae in snail samples from the studied farms in Lao PDR	51
Table 4.5 Prevalence rates of parasite infection in humans and animal reservoir hosts from the studied farms measured by stool examination	52

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Life cycle of fish-borne zoonotic trematodes (minute intestinal fluke)	7
Figure 3.1 Studies area for control trial to reduce contamination of fish-borne zoonotic trematodes in aquaculture farms in Lao PDR	18
Figure 3.2 Nine species of culture fish available in the studied farms in Lao PDR	21
Figure 3.3 Partition of large fish (>150 g) into 6 portions and 3 portions (head, body2, body4) of each fish were sampled for recovery of metacercariae	25
Figure 4.1 Prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in different species of culture fish from Laos-viet farm	31
Figure 4.2 Images of trematode metacercariae from fish	32
Figure 4.3 The prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in silver carp sampling at monthly intervals during the study period from Laos-viet farm. * Represent statistical significance between the treated and untreated ponds ($p<0.05$)	33
Figure 4.4 The prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in mrigal sampling at monthly intervals during the study period from Laos-viet farm. * Represent statistical significance between the treated and untreated ponds ($p<0.05$)	34
Figure 4.5 The prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in grass carp sampling at monthly intervals during the study period from Laos-viet farm. * Represent statistical significance between the treated and untreated ponds ($p<0.05$)	35

LIST OF FIGURES (cont.)

	Page
Figure 4.6 The prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in common carp sampling at monthly intervals during the study period from Laos-viet farm	36
Figure 4.7 The prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in silver barb sampling at monthly intervals during the study period from Laos-viet farm. * Represent statistical significance between the treated and untreated ponds ($p<0.05$)	37
Figure 4.8 The prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in bighead carp sampling at monthly intervals during the study period from Laos-viet farm	38
Figure 4.9 The prevalence and intensity of *H. taichui* metacercariae in rohu sampling at monthly intervals during the study period from Laos-viet farm	39
Figure 4.10 Size-related prevalence of *H. taichui* metacercariae in silver barb and common carp from Laos-viet farm	41
Figure 4.11 Size-related prevalence of *H. taichui* metacercariae in grass carp and silver carp from Laos-viet farm	42
Figure 4.12 Size-related intensity of *H. taichui* metacercaria in fish from Laos-viet farm	43
Figure 4.13 Size-related intensity of *H. taichui* metacercaria in fish from Laos-viet farm	44
Figure 4.14 The DNA fragments resulted from PCR analyses using *H. taichui*- specific primer	45
Figure 4.15 The DNA fragments resulted from PCR analyses using *H. pumilio*-specific primer	46

LIST OF FIGURES (cont.)

	Page
Figure 4.16 The DNA fragments resulted from PCR analyses using *Centrocestus* sp.-specific primer	47
Figure 4.17 Images of trematode cercariae observed in snails	51

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pair (s)
°C	degree celcius
CHCl3	Chloroform
DNTPs	Deoxynucleotide triphosphate (s)
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid diasodium salt
ELISA	Enzyme-linked-immonosorbent-assays
epg	egg per gram
et al.	et alii/alia (Latin), and other people or things
FAO	Food and Agriculture Organization
FZT	Fish-borne zoonotic trematodes
FECT	formalin ethyl acetate concentration technique
g	gram (s)
h	hour (s)
HCl	Hydrochloric acid
i.e.	that is
ITS	Internal transcribed spacer
KCl	Potassium chloride
Kg	Kilogram
Lao PDR	Lao people's democratic Republic
LV	Laos-viet farm
mg	Milligram
MgCl2	Magnesium chloride
MIF	Minute intestinal flukes
min	minute (s)
ml	Millilitre (s)
µl	Microlitre (s)

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

μM	Micromolar (s)
MW	Molecular weight
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
ng	Nanogram
nm	Nanometer
NSS	Normal saline solution
O.D.	Optical density
OV	*Opisthorchis viverrini*
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	round per minute
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	second (s)
SSPP	Sangsavang pun pla
TBE	Tris-borate EDTA
TE	Tris-EDTA buffer
UV	Ultraviolet
WHO	world health organization