บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380075

ชื่อโครงการ: การพัฒนาเทคนิคการตรวจแยกชนิดและประมาณจำนวนตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ติดต่อผ่านปลาด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ในพื้นที่แพร่กระจายร่วมของพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiid liver flukes) และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (Heterophyid intestinal flukes)

ชื่อนักวิจัย อาจารย์ ดร. อุรุษา แทนขำ
ภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล์: urusa.tha@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

พยาธิใบไม้ติต่อผ่านปลาเป็นกลุ่มเชื้อปรสิตที่ยังคงมีความสำคัญทางการแพทย์ในหลายประเทศในเอเชีย โดยเฉพาะ พยาธิใบไม้ตับ ชนิด *Opisthorchis viverrini* ซึ่ง ไทป์ที่หนึ่ง ของตัวกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง (type-1 carcinogen) สามารถกระตุ้นในเกิดมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) แม้ว่าตลอดระยะเวลาในการวางแผนควบคุมการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ จะมีการรณรงค์การไม่บริโภคปลาดิบๆ สุกๆ แต่เนื่องจากค่านิยมการรับประทานอาหารของประชาชนโดยเฉพาะในแถบภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย โดยเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะก่อโรคจะฝังตัวอยู่ในเนื้อปลาและจะมีปริมาณสะสมในเนื้อปลามากโดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูฝนถึงต้นฤดูร้อน การประเมินปริมาณการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียในปลาน้ำจืดในพื้นที่ที่เป็นพื้นที่ระบาดของ *O. vivverini* จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการวางแผนการควบคุมการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ เนื่องจากปริมาณการติดเชื้อในแต่ละปีจะแปรผันมากน้อยตามปัจจัยทางธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม หรือ ภาวะแล้ง ด้วยวิธีการที่ใช้ดั่งเดิม (tissue compression และ tissue digestion) เพื่อการตรวจการติดเชื้อในปลานั้นมีข้อจำกัดในแง่ของเวลาและเป็นเทคนิคที่ต้องการกำลังคนและทักษะในการจัดจำแนกชนิดของพยาธิจากเมตาเซอร์คาเรีย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเทคนิค Real-time multiplex PCR ซึ่งช่วยให้สามารถลดเวลาและจัดจำแนกชนิดของพยาธิที่สนใจในเวลาอันรวดเร็วกว่า นอกจากนี้ยังสามารถประมาณจำนวนการติดเชื้อในปลาแต่ละตัวได้อย่างแม่นยำ โดยในงานวิจัยนี้ กำหนดชนิดพยาธิใบไม้ที่สนใจ คือ *O. viverrini* *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* ซึ่งมักพบการติดเชื้อร่วมในปลาตัวเดียวกัน ซึ่งมักเป็นปัญหาในการจัดจำแนกเนื่องจากลักษณะสัณฐานภายนอกมีความคล้ายคลึงกัน โดยวิธีการที่ได้พัฒนานี้ สามารถแยกชนิดของเมตาเซอร์คาเรียและประมาณจำนวนเมตาเซอร์คาเรียตั้งแต่ 1 ถึง มากกว่า 20 เม็ด โดยสามารถเทียบกับ median cycle threshold ที่แสดงผลในการทำ

real time PCR อยู่ในช่วง Ct 35 ถึง Ct $\leq$ 24 ตามลำดับ จากวิธีที่พัฒนานี้สามารถเพิ่มความถูกต้องในการจัดจำแนกชนิดพยาธิและลดจำนวนกำลังคนในการตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียในปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปลาที่มาจากบริเวณพื้นที่ซึ่งมีปริมาณการติดเชื้อสูง วิธีการนี้จึงเป็นทางเลือกของการประเมินปริมาณการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* *H. taichui* และ *H. pumilio* ของปลาในพื้นที่ซึ่งพบการติดเชื้อร่วมของพยาธิที่ดังกล่าว

คำหลัก : Multiplex real-time quantitative PCR, *Opisthorchis viverrini*, *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, 28S ribosomal DNA

Abstract

Project Code: MRG5380075

Project Title: Development of technique for discriminating species and estimating numbers of metacercariae of fish-borne trematodes in an area of mixed infection between Opisthorchiid liver flukes and Heterophyid intestinal flukes by using multiplex real-time PCR

Investigator: Lecturer Dr. Urusa Thaenkham

E-mail Address: urusat.tha@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Abstract:

Fish-borne zoonotic trematodes (FZT) remain a public health concern in many Asian countries, especially *Opisthorchis viverrini*, which is a known type-1 carcinogen that can induce cholangiocarcinoma. Despite a campaign to eat cooked fish dishes, the consumption of uncooked and undercooked fish dishes is still popular. Metacercarial-stage FZT infection of fish is largely seasonal. Periodic assessments of the degree of infection can inform FZT control programs of high levels of fish infection in endemic areas. Conventional methods (compression and digestion) used to detect and identify metacercariae in fish are ineffective, because they are time-consuming and require both manpower and metacercaria-identification skills. This study developed a new multiplex real-time quantitative PCR method for discriminating and quantifying the degree of infection with *O. viverrini, Haplorchis taichui* and *Haplorchis pumilio*. This method can distinguish and estimate the number of metacercariae with a median cycle threshold range of 1 to > 20 metacercariae (Ct 35 to Ct $\leq$ 24). The method proved more effective than conventional methods, with a high degree of accuracy, saving both skilled manpower and time for the study of FZT prevalence, especially in

endemic areas. Therefore, it might serve as an alternative method for detecting and quantifying metacercariae of *O. viverrini*, *H. taichui*, and *H. pumilio* in fish from endemic areas with evidence of co-infection.

Keywords: Multiplex real-time quantitative PCR, *Opisthorchis viverrini*, *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, 28S ribosomal DNA