



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

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

โดย อาจารย์ ดร. อรุษา แทนขำ และคณะ  
สังกัดภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน  
มหาวิทยาลัยมหิดล

โครงการดำเนินงานแล้วเสร็จ เดือนพฤษภาคม 2557

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจแยกชนิดและประมาณจำนวนตัวอ่อนระยะติดตัวของพยาธิใบไม้ติดต่อผ่านปลาด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ในพื้นที่แพร่กระจายร่วมของพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiid liver flukes) และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (Heterophyid intestinal flukes)

### ผู้วิจัย

1. อาจารย์ ดร. อรุษา แทนขำ
2. นางสาวอรวรรณ พุพิสุทธิ์
3. นายวัลลภ ภัคดี
4. นายนิรันดร หอมสุวรรณ
5. นายสุรพล สงวนเกียรติ

สังกัดสังกัดภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

**บทคัดย่อ**

รหัสโครงการ: MRG5380075

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

**ชื่อหลักวิจัย** อาจารย์ ดร. อุรุษา แทนขำ  
ภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

**อีเมล:** urusa.tha@mahidol.ac.th

**ระยะเวลาโครงการ:** 2 ปี

**บทคัดย่อ:**

พยาธิใบไม้ติดต่อผ่านปลาเป็นกลุ่มเชื้อปรสิตที่ยังคงมีความสำคัญทางการแพทย์ในหลายประเทศในเอเชีย โดยเฉพาะ พยาธิใบไม้ตับ ชนิด *Opisthorchis viverrini* ซึ่ง ไทป์ที่หนึ่ง ของตัวกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง (type-1 carcinogen) สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) แม้ว่าตลอดระยะเวลาในการวางแผนควบคุมการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ จะมีการรณรงค์การไม่บริโภคปลาดิบๆ สุกๆ แต่เนื่องจากค่านิยมการรับประทานอาหารของประชาชน โดยเฉพาะในแถบภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย โดยเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะก่อโรคจะฝังตัวอยู่ในเนื้อปลาและจะมีปริมาณสะสมในเนื้อปลามากโดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูฝนถึงต้นฤดูร้อน การประเมินปริมาณการติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรียในปลาน้ำจืดในพื้นที่ที่เป็นพื้นที่ระบาดของ *O. viverrini* จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการวางแผนการควบคุมการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ เนื่องจากปริมาณการติดเชื้อในแต่ละปีจะแปรผันมากน้อยตามปัจจัยทางธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม หรือ ภาวะแล้ง ด้วยวิธีการที่ใช้ดั้งเดิม (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](mailto: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 ≤ 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

**Executive summary**

In this study, the most effective approach for fish examination was multiplex real-time quantitative PCR method for discriminating the FZT species, *O. viverrini*, *H. taichui*, and *H. pumilio*. This was also used to estimate the number of metacercariae per fish. Currently, the means used to examine metacercariae in fish are compression and digestion methods. However, the limitations of these methods are accuracy, underestimation and time-consuming to identify all metacercariae.

The advantages of multiplex real-time quantitative PCR over the two conventional methods are higher accuracy to discriminate species of metacercariae, even when there are large numbers of subjects, and speed when working manually. This developed method is sensitive enough to detect a metacercaria of *O. viverrini* and/or *H. taichui* / *H. pumilio* in the same reaction that contains the genomic DNA of other parasites. Based on the numbers of metacercariae detected using the median cycle threshold value, the numbers of metacercariae of each parasite can be estimated more accurately when compared with the results of metacercaria separation and identification using the digestion and microscopic examination.

The method developed was used to examine fish containing metacercariae from *O. viverrini*-endemic areas in Sa Kaeo Province, Thailand, in March 2012. Four species of cyprinoid fish with reportedly high degrees of infection were examined. It was found only *B. gonionotus* and *C. enoplos* were infected with *O. viverrini*, with larger numbers than *H. dispar* and *P. orphoides*. The results obtained by digestion and real-time PCR methods were similar. However, real-time PCR was more accurate when the numbers of metacercariae were large, could contain many kinds of unknown and/or difficult to identify metacercariae, and where it is difficult to separate each species manually under a stereomicroscope. Both digestion and real-time PCR provided better results than the compression method. The multiplex real-time quantitative PCR assay developed in the present study is an alternative method of detecting and quantifying numbers of metacercariae of *O. viverrini*, *H. taichui* and *H. pumilio* in fish from endemic areas, where there is evidence of parasite co-infection. The method developed may be a useful tool for detecting FZT metacercariae in aquaculture fish in *O. viverrini*-endemic areas, and so contribute to the effective control of opisthorchiasis.

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจแยกชนิดของพยาธิที่มีการติดเชื้อปะปน ระหว่างพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiid liver flukes: OLF) และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (Heterophyid intestinal flukes: HIF) ในเนื้อปลาซึ่งมีเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิทั้งสองกลุ่มนี้ด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR

2. เพื่อเพิ่มผลสัมฤทธิ์ในการตรวจสอบแยกชนิดของพยาธิและประมาณจำนวนการติดเชื้อในปลาซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางลำดับที่ 2 ของพยาธิใบไม้ตับ (OLF) และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (HIF) ในพื้นที่ที่มีการติดเชื้อร่วมระหว่างพยาธิ 2 กลุ่มนี้ ด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR

3. เพื่อนำผลวิจัยที่คาดว่าจะได้รับไปเพิ่มศักยภาพงานวิจัยของนักวิจัยวุฒิเมธีวิจัยของ สกว. ซึ่งกำลังศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายและโครงสร้างประชากรของพยาธิใบไม้ตับ (OLF) และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (HIF) เพื่อเพิ่มผลสัมฤทธิ์ในการวางแผนควบคุมการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและโรคมะเร็งท่อน้ำดี ในแถบลุ่มน้ำโขง

## วิธีทดลอง

### การเก็บตัวอย่าง

ปลา 4 ชนิดซึ่งมีสถิติการพบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) มากในการศึกษาก่อนหน้านี้ ในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว ได้แก่ ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ปลาตะโกก (*Cyclocheilichthys enoplos*) ปลากะสูบจุด (*Hampala dispar*) และปลาแก้มช้ำ (*Puntius orphoides*) (Sithithaworn et al., 1997; Waikagul, 1998) โดยปลาแต่ละชนิดถูกจับมาจากคลอง หนอง บึง ในพื้นที่ตำบลบ้านคลองน้ำใส จังหวัดสระแก้ว ประเทศไทย ชนิดละ 25 ตัว ในการเก็บตัวอย่างปลาแต่ละครั้ง (Georeference coordinate 12° 35' 60"N 102° 4' 60"E) โดยทำการเก็บจำนวน 3 ครั้ง ครั้งแรกในเดือนธันวาคม 2554 ครั้งที่ 2 ในเดือนมีนาคม 2555 และครั้งสุดท้ายในเดือนพฤษภาคม 2555 ทั้งนี้ปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) ซึ่งอยู่ในตระกูล Anabantidae ถูกเก็บเพื่อนำมาตรวจหาเมตาเซอร์คาร์เรียด้วย



ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ตระกูล Cyprinidae



ปลาตะโกก (*Cyclocheilichthys enoplos*) ตระกูล Cyprinidae



ปลากระสุนจุด (*Hampala dispar*) ตระกูล Cyprinidae



ปลาแก้มขี้ (*Puntius orphoides*) ตระกูล Cyprinidae

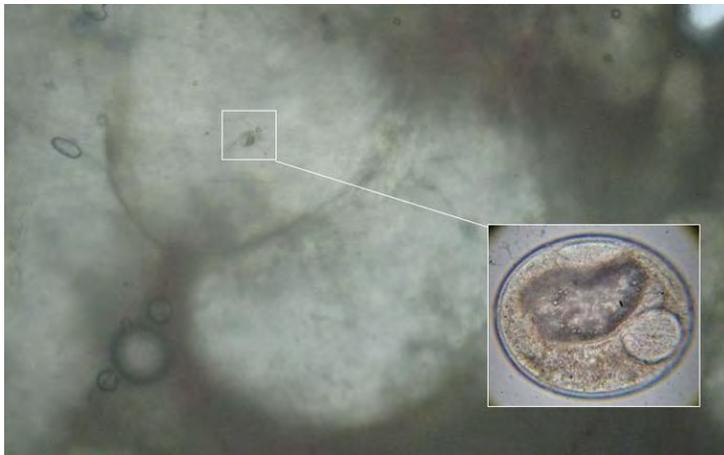


ปลาหมอ (*Anabas testudineus*) ตระกูล Anabantidae

รูปที่ 1 ปลาน้ำจืดในตระกูล Cyprinidae ที่พบอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในปริมาณสูงในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว และ ปลาหมอในตระกูล Anabantidae ซึ่งมีรายงานการติดเชื้อ Heterophyid intestinal fluke สูง

ปลาที่เก็บได้จากพื้นที่ในช่วงเวลาดังกล่าวข้างต้นถูกเก็บมาในน้ำแข็งและนำมาตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียในปลาที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตหนอนพยาธิภายใน 5 ชั่วโมง ปลาแต่ละตัวจะ

ถูกนำมาตรวจอย่างละเอียดโดยแยกตรวจเป็นส่วนได้แก่ เนื้อ และครีบ โดยทำการตรวจบนกระจกใส ประกบกัน 2 แผ่น โดยเรียกรูปนี้ว่า Tissue compression โดยเป็นวิธีการตรวจหาเมตาเซอร์คาเรีย แบบหยาบผ่านกล้องสเตอริโอไมโครสโคป จากการดูผ่านกล้องดังกล่าว ดังรูปที่ 2 โดยจำนวนและ ชนิดของพยาธิจะถูกบันทึกไว้เป็นข้อมูลดิบเบื้องต้น



รูปที่ 2 เมตาเซอร์คาเรียของ *O. viverrini* ในเนื้อปลาที่ทำการตรวจด้วยวิธี tissue compression และมองใต้กล้อง stereo-microscope กำลังขยาย 10 เท่า

จากนั้น ทุกชิ้นส่วนของปลาแต่ละตัวจะถูกนำไปย่อยด้วยสารละลาย pepsin ประมาณ 1 ชั่วโมงที่ 37 °C ปลาที่ผ่านการย่อยแล้วแต่ละตัวจะถูกนำไปกรองผ่านตะแกรงร่อนลวดที่มีรูเล็กๆ ประมาณ 1 มิลลิเมตร พอให้เมตาเซอร์คาเรียลอดผ่านออกมาได้ ในขั้นตอนนี้ร้อยละของจำนวนการเมตาเซอร์คาเรียที่สูญหายจะถูกคำนวณเพื่อเป็นมาตรฐานว่าในการร่อนเมตาเซอร์คาเรียทุกครั้งจะมีจำนวนที่หายไปเท่าใด เมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นจะถูกนำไปแยกชนิดและนับจำนวน โดยผ่านกล้องสเตอริโอไมโครสโคป ผลการจัดจำแนกเบื้องต้นนี้จะถูกบันทึกเป็นข้อมูลชุดที่ 2 ของเมตาเซอร์คาเรียที่พบในปลาแต่ละชนิด เมตาเซอร์คาเรียจากขั้นตอนนี้จะถูกเก็บแยกจากปลาแต่ละตัวใน 70% เอทิลแอลกอฮอล์ และนำไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

#### การเตรียมตัวอย่าง DNA เพื่อการ PCR และการออกแบบ primer และ probes สำหรับ multiplex-real time PCR

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโดยทั่วไป *O. viverrini* มักพบปะปนกับ *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเน้นหนักไปที่เชื้อปรสิตหนอนพยาธิทั้ง 3 ชนิดข้างต้น ในขั้นตอนการเริ่มการทำ real time PCR จำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของ primer และ probe ที่ออกแบบ ดังนั้นเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 10 เม็ดจากทั้ง 3 ชนิดปรสิตถูกนำไปสกัด DNA เพื่อเตรียมไว้ในขั้นตอนทดสอบดังกล่าว จากการสกัดจะได้ปริมาณ DNA ประมาณ 2 ng / $\mu$ l (จากเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 10 เม็ด) โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan)

ตัวอย่างเมตาเซอรัคคาเรียที่ใช้ในขั้นตอนนี้ถูกนำมาจากตัวอย่างที่เก็บไว้ในภาควิชาปรสิตวิทยาของโรงพยาบาล  
จากโครงการของรองศาสตราจารย์ จิตรรา ไวกกุล นักวิจัยที่ปรึกษาของโครงการ

Probes และ primers ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัยออกแบบจากข้อมูล DNA sequence ของ  
28S rDNA ของ *O. viverrini*, *H. taichui* และ *H. pumilio* โดยตัดเอา *P. varium* จากที่วางแผนไว้เดิม  
ออกเนื่องจากไม่พบในพื้นที่ศึกษา ในการทดลองนี้ เนื่องจากการนำตัวอย่างเมตาเซอรัคคาเรียมาจาก  
เนื้อปลาเพื่อทดสอบ ต้องมาตัวควบคุมความผิดพลาดในการ amplify ซึ่งเรียกว่า internal  
amplification control ซึ่งเป็น probe และ primer ของปลาในตระกูล Cyprinidae ด้วย โดย probe  
และ primer ที่ใช้ทั้งหมดในการศึกษามีดังต่อไปนี้

**ตารางที่ 1** Real-time PCR primers & probes for 3 target FZTs & IAC

Target species	Probe	Sequence (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon size (bp)	Fluorophore
<i>H. taichui</i>	28S-F	GAAACCCAAAGGCGAAGTG	57.5	185	5'6FAM/ 3'
	(HM004185) 28S-R	GGGTCTCAACATGTACGCTCAT	62.1		
	Taichui-P	CGGTGACGAACACCAAAAAATGTCACC	68.2		
<i>H. pumilio</i>	28S-F	GAAACCCAAAGGCGAAGTG	57.5	183	5'YAK/ 3'
	(HM004186) 28S-R	GGGTCTCAACATGTACGCTCAT	62.1		
	Pumilio-P	CCGATGACGAACACTGAAGTGTCACCA	69.9		
<i>O. viverrini</i>	28S-F	GAAACCCAAAGGCGAAGTG	57.5	182	5'LC610/3'
	(HM004188) 28S-R	GGGTCTCAACATGTACGCTCAT	62.1		
	Opis-P	CGATGACAACTCTGAATAGGGTCATCACACC	72.5		
<i>P. ticto</i>	PT-F	CATTTACAATTGCAGACGGAG	57.5	207	5'LC670/3'
	( NC_00865) PT-R	CGT AAA GGA ATA GTC ATA CTA CGT C	62.5		
	8) IAC-P	GAAGCTGCCGCTGATACTGACACTT	69.5		

Primers และ probes ทั้งหมดออกแบบโดย LC probe design software (Roche Applied Science) และสังเคราะห์ probe โดยติดสี่ฟลูออเรสเซนต์สำหรับ TaqMan based real-time PCR assay (Tib Molbiol, Berlin, Germany)

หมายเหตุ ในการทดลองนี้ เนื่องจากการนำตัวอย่างเมตาเซอริคาเรียมาจากเนื้อปลาเพื่อทดสอบ ต้องมาตัวควบคุมความผิดพลาดในการ amplification ซึ่งเรียกว่า internal amplification control (IAC) ซึ่งเป็น probe และ primer ของปลาในตระกูล Cyprinidae

PCR amplicons ของ 28S ribosomal RNA-specific target โดยใช้ PCR condition ดังต่อไปนี้ PCR mixture (30  $\mu$ l) ซึ่งประกอบด้วย TopTaq Master Mix (TopTaq DNA Polymerase PCR buffer ซึ่งมี 1.5 mM  $MgCl_2$  และ 200  $\mu$ M ของแต่ละ dNTP), 20 pmole ของแต่ละ specific primer และ 2 ng ของ genomic DNA จากแต่ละ species PCR amplification ด้วยการทำ conventional PCR โดยประกอบด้วยรอบ PCR ดังนี้ 95°C ประมาณ 3 นาที ตามด้วย 34 รอบของ 45 วินาที ที่ 95°C, 30 วินาที ที่ 60°C และ 30 วินาที ที่ 72°C โดยทำ final extension ที่ 72°C ประมาณ 8 นาที โดยหลังจากทำ PCR แล้วจะได้ PCR product ขนาด 185 bp ของพยาธิทุกชนิดที่ศึกษา โดย PCR product ที่ได้จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ แยก band ของ PCR product ที่จำเพาะใน 1% agarose gel หลังจากนั้น Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taipei City, Taiwan) โดยทำตามคู่มือที่ให้ไว้ประกอบของชุด kit โดย PCR product บริสุทธิ์แล้วจะถูกนำมาตรวจสอบบน 2% agarose gel โดย purified PCR product ถูกนำไปหาลำดับเบสเพื่อยืนยันความถูกต้องและจำเพาะของ primer โดยใช้เทคนิค BigDyeIM Terminator cycling กับเครื่อง Automatic Sequencer 3730xl (Macrogen, Seoul, Korea) ผลของการ sequence ถูกนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดย BioEdit version 7.0 program (Hall, 1999) และตรวจสอบความจำเพาะของ primer DNA sequences โดยโปรแกรม BLAST ผ่าน GenBank ว่าเป็น 28S ribosomal DNA หรือไม่ (McGinnis & Madden, 2004)

**การเตรียม PCR product บริสุทธิ์จากบริเวณที่เหมาะสมเพื่อใช้สร้าง Standard curve และการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทำ Real time multiplex PCR**

ในการทำ Multiplex real time PCR การทำการทำ internal amplification control เป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมความจำเพาะและความไวของการทำ PCR ในสถานะที่มีการปะปนของ DNA ชนิดอื่นซึ่งไม่ใช่ DNA ของพยาธิที่ต้องการศึกษา โดยในการศึกษานี้เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างเมตาเซอริคาเรียอาจมีเนื้อปลาปะปนมาด้วย ซึ่งเป็นปลาในตระกูล Cyprinidae แต่เนื่องจากในปี 2008 อินทพันธ์ และคณะ (Intaphan et al., 2008) ได้ทำการออกแบบทั้ง probe และ primers สำหรับปลาตระกูลนี้แล้ว (ตามตารางที่ 1) ผู้วิจัยจึงนำมาใช้เพื่อเป็น IAC ของการศึกษานี้โดย probe จะทำการติดสี่ฟลูออเรสเซนต์ LC670 สำหรับ TaqMan probe ซึ่งจะใช้สำหรับเครื่อง LightCycler 480 system II โดยหลังจากทดสอบความจำเพาะของ primer ด้วยการรัน PCR รหัสพันธุกรรมจาก PCR product ซึ่งมีขนาดประมาณ 207 bp ถูกนำไปตรวจสอบโดยการหาลำดับเบสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับในข้อ 2

Primers และ probes ที่ออกแบบสำหรับ *Haplorchis taichui*, *H. pumilio* และ *Opisthorchis viverrini* ในตารางที่ 1 ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex real time PCR และสร้าง standard curve สำหรับการทำให้ real time PCR นี้ ในการทดลองมี primer เพียง 1 คู่ที่ใช้สำหรับทั้ง 3 species ของพยาธิ และมี primer อีกคู่สำหรับ IAC การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมทดสอบในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.3-1.0  $\mu\text{M}$  โดยใช้ LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master Mix Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) ซึ่งประกอบด้วย FastStart Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix, and  $\text{MgCl}_2$  เป็นน้ำยาที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง LightCycler 480 system II ในการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมนี้จะใช้ genomic DNA 0.2 ng /  $\mu\text{l}$  ของทั้งเชื้อพยาธิและปลาแก้วฆ่า โดยกำหนดรอบของการทำ real time PCR ดังนี้ initial denaturation ที่  $95^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 10 min ตามด้วย 65 cycles ที่  $95^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 10 วินาที และ  $60^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 45 วินาที จากการทดสอบ primer ไม่ควรให้ PCR product ที่มี primer dimer ใน PCR product ต่อจากนั้น ความเข้มข้นของ probe ที่ใช้จะถูกทดสอบจากช่วงความเข้มข้นที่กำหนดคือ ระหว่าง 0.05-0.1  $\mu\text{M}$  โดยทดสอบในขบวนการ PCR ตามสภาวะที่กำหนดข้างต้น

หลังจากได้ความเข้มข้นของ primer และ probe ที่เหมาะสมเพื่อนำมาสร้าง standard curve เพื่อกำหนดมาตรฐานของ ค่า cycle threshold (Ct) ต่อความเข้มข้นของ genomic DNA โดยกำหนดช่วงความเข้มข้น DNA เป็น serial 10-fold dilutions ของ purified PCR product จากส่วน the DNA target region ของ species พยาธิที่ต้องการศึกษา เนื่องจาก DNA template เป็น PCR product ไม่ใช่ plasmid จึงต้องคำนวณหาจำนวน copies ของ PCR target จากสูตรต่อไปนี้

$$[\text{DNA amount (ng)} \times 6.022 \times 10^{23}] / [\text{length} \times (1 \times 10^9) \times 650]$$

ในการศึกษานี้ใช้ PCR product ความเข้มข้น  $10^{-3}$ - $10^{-8}$  ng จึงคิดเป็น  $5 \times 10^5$  –  $5 \times 10^1$  ของจำนวน copy ของส่วน PCR target และสำหรับ IAC ซึ่งเป็น internal control ไม่ต้องการการปรับความเข้มข้น DNA เพียงทำที่ความเข้มข้นต่ำสุดนั่นคือที่  $10^{-7}$  ng ซึ่งเมื่อคำนวณตามสูตรจะได้เป็น  $4.5 \times 10^2$  จำนวน copy ของ PCR target ของปลาแก้วฆ่า ในการทดสอบทำการทดสอบทั้งแบบที่มีและไม่มี IAC ในการทำ multiplex reactions ทั้งนี้เพื่อเป็นตัวชี้ถึงผลที่เกิดจากการมีตัวรบกวนปฏิกิริยา ในการทำ PCR จะทำในแต่ละตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง LightCycler 480 System II (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) ในการตรวจวัดการเกิด PCR product จะตรวจวัดแบบ real time ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละ annealing step ที่ 510, 580, 610 และ 660 nm สำหรับ *H. taichui*, *H. pumilio*, *O. viverrini* และ *P. orphoides* ตามลำดับ โดยค่า cycle threshold (Ct) value จะเป็นค่ารายงานจำนวนของรอบ PCR ที่ตรวจวัดได้จากสัญญาณแสงจาก PCR fluorescence การคำนวณ Efficiency ของการทำ real time PCR จะถูกคำนวณโดยการ plotting เทียบกับ serial dilution series (ซึ่งสามารถอ้างถึงจำนวน copies ของ DNA target) การ plot ดังกล่าวจะได้ standard curve เพื่อเป็นมาตรฐานในการประมาณ DNA ในการทำปฏิกิริยาจากตัวอย่างที่ไม่ทราบ

ชนิดและความเข้มข้นต่อไปในทั้งแบบ single and multiple targets ในขบวนการ multiplex real time PCR

### การทำ Multiplex real-time quantitative PCR และตรวจหาเชื้อพร้อมประมาณจำนวนเมตาเซอร์คาเรีย

Probe ที่ออกแบบดังในตารางที่ 1 ถูกนำมาทดสอบหาความจำเพาะกับ heterologous DNA จากพยาธิดังต่อไปนี้ *Haplorchis yokogawai* *Procerovum varium* *Stellantchasmus falcatus* *Haplorchoides* sp. รวมถึง *Clonorchis sinensis* ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ Quantitative testing กับจำนวนเมตาเซอร์คาเรียของ *H. taichui* *H. pumilio* และ *O. viverrini* จากจำนวน 1, 2 ถึง 10, 11 ถึง 20, และ > 20 (21 ถึง 30) genomic DNA ของตัวอย่างถูกนำมาสกัดโดย Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd, Taipei City, Taiwan) ตามวิธีที่กำหนดมาตามคู่มือที่แนบมากับ kit โดยผลจากการทำเมตาเซอร์คาเรียตามจำนวนข้างต้นจะถูกเก็บเอามาวิเคราะห์เทียบกับจำนวนที่ได้จากปลาแต่ละตัวในท้องที่จริง (ซึ่งจากการสกัดจะมีเศษเนื้อปลาปนอยู่บ้างเล็กน้อย) โดยจำนวนเมตาเซอร์คาเรียแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของปลาและช่วงเวลาที่ยับ เมตาเซอร์คาเรียจากปลาแต่ละตัว จะถูกนำมารวมเพื่อสกัดพร้อมกันโดยไม่ต้องแยกชนิดของพยาธิเพื่อนำไปใช้ทดสอบ real-time quantitative PCR ในสภาวะที่เหมาะสม ในการนี้จะใช้ปริมาณของ PCR แต่ละ mixture เป็น 20  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer (LightCycler 480 Probe Master), 0.3  $\mu$ M ของแต่ละ primer, 0.06  $\mu$ M ของแต่ละ probe และ 1  $\mu$ l ของ DNA ต้นแบบ โดยแต่ละชุดปฏิบัติการจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำและทำ negative control (ปราศจาก DNA ต้นแบบ) และ positive control ( $10^6$  ng ของ purified PCR product ของแต่ละพยาธิ) แต่ละ reaction จะเติม  $10^7$  ng ของ purified PCR product ของ *P. orphoides* เพื่อให้แน่ใจจะไม่มีผลต่อการยับยั้งปฏิบัติการที่ต้องการ โดยจากการทดลองกำหนดให้ ในกรณีของ negative control ค่า Ct ไม่ควรเกิน Ct 39 และในกรณีของ IAC ค่า Ct ต้องไม่น้อยกว่า 33 จึงจะถือว่ามียับยั้งปฏิบัติการจากการสกัด DNA

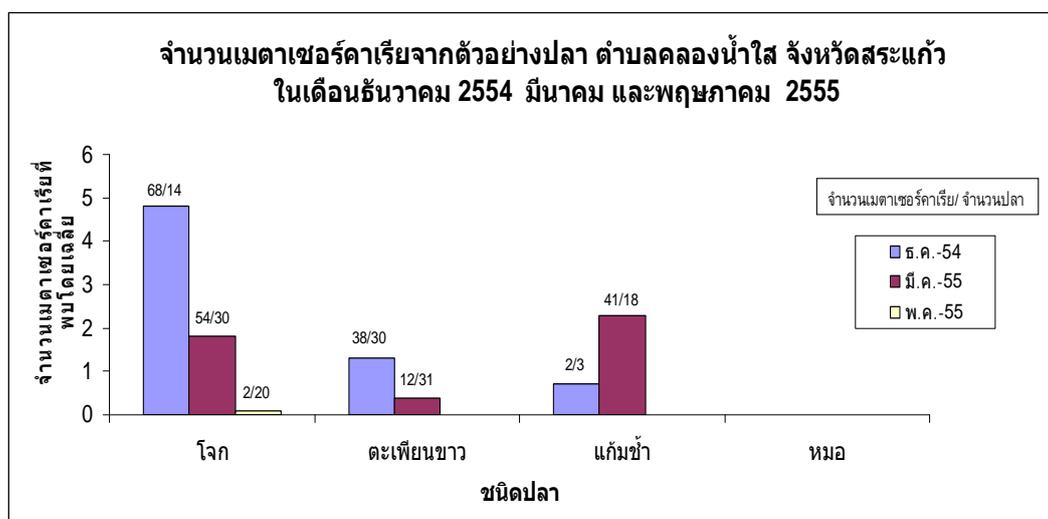
### การวิเคราะห์ทางสถิติ

เพื่อความถูกต้องจากการแยกแยะ species จากการทำ PCR และจำนวน metacercariae ระหว่างวิธี classical (tissue compression และ digestion) และวิธี real-time PCR ซึ่งผลความถูกต้องใช้ Chi-square test โดยใช้ SPSS software (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) โดยค่า P-value < 0.05 ถือว่าน่าเชื่อถือ

## ผลการทดลอง

จากการตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียของ *O. viverrini* ในปลาที่จับจากพื้นที่ตำบลคลองน้ำใส จังหวัดสระแก้ว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 ในเดือนธันวาคม 2554 ครั้งที่ 2 ในเดือนมีนาคม 2555 และครั้งที่ 3 ในเดือนพฤษภาคม 2555 พบว่าจำนวนเฉลี่ยของเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* ต่อจำนวนปลาที่ตรวจสูงสุดในปลาโกลในเดือนธันวาคม 2554 (ช่วงปลายฝนเข้าฤดูหนาว) คิดเป็นอัตราเฉลี่ยต่อปลาที่ตรวจทั้งหมดเท่ากับ 4.9 เม็ด (68/14) ในเดือนธันวาคม 2554 เป็นช่วงที่พบเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* มากที่สุด เมื่อเทียบกับช่วงเวลาอื่นและในเดือนพฤษภาคม 2555 (ช่วงสิ้นฤดูร้อนต้นฤดูฝน) เป็นช่วงที่พบเมตาเซอร์คาเรีย *O. viverrini* น้อยที่สุด ทั้งนี้เมตาเซอร์คาเรียที่พบโดยมากเป็นพวก unknown species ซึ่งจะไม่นับและนำมาคำนวณในที่นี้ จากการเก็บและตรวจปลาทั้งหมดไม่พบเมตาเซอร์คาเรียใดๆ เลยในปลาหมอซึ่งเป็นปลาในตระกูล Anabantidae แต่จะพบเฉพาะปลาในตระกูล Cyprinidae 3 ชนิด ได้แก่ ปลาโกล ปลาตะเพียนขาว ปลาแก้มช้ำ ทั้งนี้ปลากะสูบจุดไม่สามารถหาได้ในพื้นที่ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา จึงไม่สามารถบันทึกผลได้ (รูปที่ 3)

สรุปตัวอย่างตัวอย่างพยาธิจากปลาในตระกูล Cyprinidae จากการเก็บตัวอย่างปลาทั้งหมด 3 ครั้ง พบการติดเชื้อในปลากว่า 80 % เป็น *O. viverrini* โดยเป็นผลที่ได้จากวิธี tissue compression และ digestion



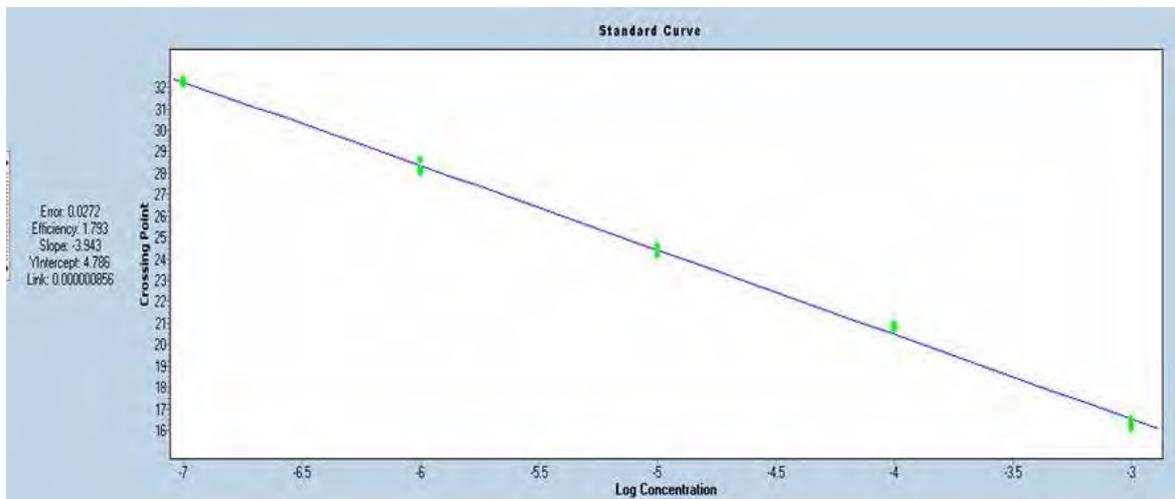
รูปที่ 3. จำนวนเมตาเซอร์คาเรียที่เก็บได้จากปลา 3 ชนิดในตระกูล Cyprinidae (ปลาโกล ปลาตะเพียนขาว และปลาแก้มช้ำ) และ อีก 1 ชนิดในตระกูล Anabantidae (ปลาหมอ) ในพื้นที่ตำบลคลองน้ำใส จังหวัดสระแก้ว 3 ช่วงเวลา ได้แก่ ช่วงปลายฤดูฝนเดือนธันวาคม 2554 ช่วงต้นฤดูร้อน เดือนมีนาคม 2555 และช่วงปลายฤดูร้อน เดือนพฤษภาคม 2555

ผลการแยกเมตาเซอร์คาเรียจากเนื้อปลาโดยเทคนิค digestion ได้มีการทดสอบความคลาดเคลื่อนของวิธีการดังกล่าวในการรักษาจำนวนเมตาเซอร์คาเรียก่อนและหลังกระบวนการย่อยและร้อนแยกเมตาเซอร์คาเรียจากเนื้อปลา พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการสามารถรักษาจำนวนเมตาเซอร์

ค่าเรียไว้ได้กว่า 99% ผลดังกล่าวสามารถประกันได้ว่าเมื่อทำการย่อยและแยกเมตาเซอร์คาเรียจากเนื้อปลามีความผิดพลาดเพียงเล็กน้อยในการสูญหายของเมตาเซอร์คาเรีย

#### การหา Standard curve

การทำ Multiplex real-time PCR โดยใช้เครื่อง LightCycler 480 system II โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ run อยู่ที่ 60°C เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการดังกล่าว Standard curve จึงถูกวัดจากจำนวน copy ของ PCR product โดยตรง เพื่อใช้เป็นตัวเทียบกับปริมาณ DNA ที่ได้จากเมตาเซอร์คาเรียจำนวน 1 เม็ด ของพยาธิทุกชนิดที่ศึกษา ซึ่ง standard curve ของ *O. viverrini* *H. taichui* และ *H. pumilio* ไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 Standard curve จาก serial dilution ของ PCR product จากความเข้มข้น  $10^{-3}$ – $10^{-7}$  ng คิดเป็นจำนวน copy number เท่ากับ  $5.1 \times 10^7$  –  $5.1 \times 10^3$  copies ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเอา DNA ของ purified PCR product จากทั้ง 3 species ข้างต้นมารวมกัน และการใส่ IAC หรือไม่ใส่ลงในปฏิกิริยา ให้ผลความแตกต่างไปบ้างเล็กน้อยดังตาราง

ตารางที่ 2 สภาวะที่แตกต่างที่ส่งผลต่อการกำหนด Standard curve

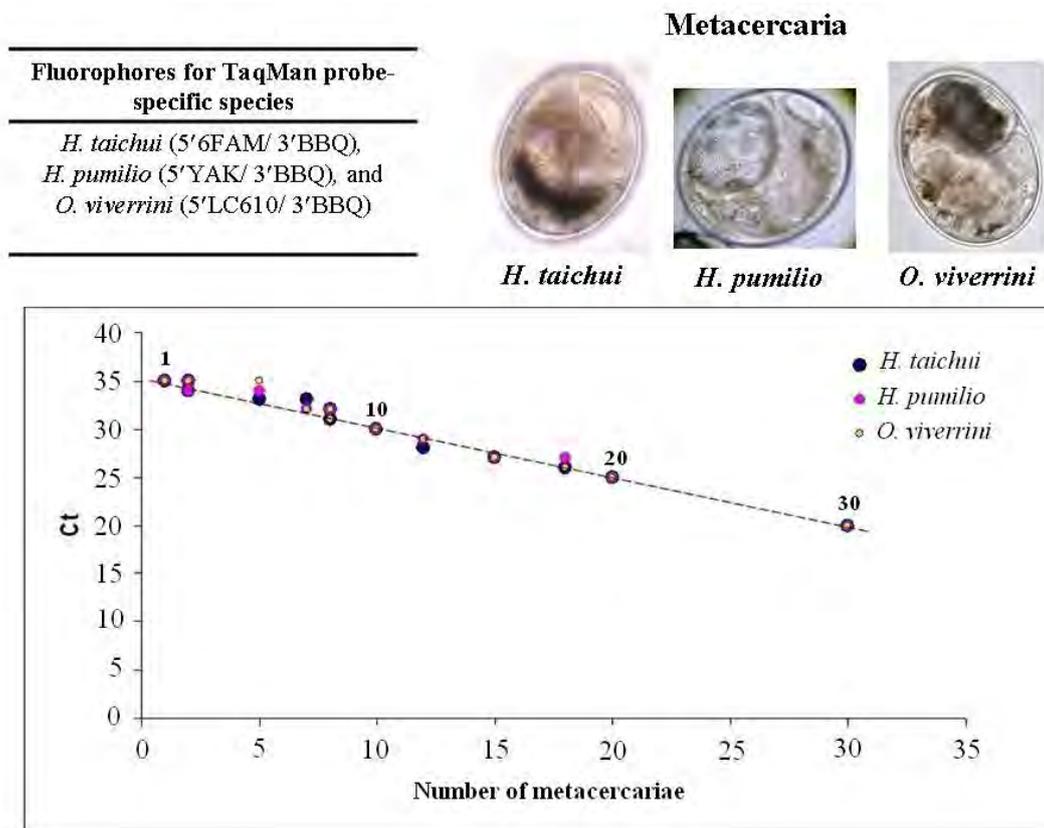
	Single target		Multiple target (without IAC)		Multiple target (with IAC)	
	Efficiency	Sensitivity (numbers of PCR copies)	Efficiency	Sensitivity (numbers of PCR copies)	Efficiency	Sensitivity (numbers of PCR copies)
<i>H. taichui</i>	99.5%	50	104%	50	102%	50
	$R^2 = 0.99$		$R^2 = 0.99$		$R^2 = 0.99$	
<i>H. pumilio</i>	95.0%	50	99.5%	50	100%	50
	$R^2 = 0.99$		$R^2 = 0.99$		$R^2 = 0.99$	
<i>O. viverrini</i>	99.5%	50	105%	50	104%	50
	$R^2 = 0.99$		$R^2 = 0.99$		$R^2 = 0.99$	
IAC	95.0%	45	n/a	n/a	99.5%	45
	$R^2 = 0.99$				$R^2 = 0.99$	

การตรวจสอบ Species พยาธิและการประมาณจำนวนเมตาเซอรัคคาเรียผ่าน median cycle threshold value (Ct value)

จาก Reaction ที่ผ่านการหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาศึกษาโดยการทำ multiplex real-time PCR กับเมตาเซอรัคคาเรียที่ได้จากปลาในพื้นที่โดย species และจำนวนที่พบพบว่าผลจากการตรวจโดยเทคนิค real-time PCR พบว่าหากพบเมตาเซอรัคคาเรียเพียง 1 เม็ด จะสามารถเทียบกับ Ct value ที่ 35 แต่หากจำนวนเมตาเซอรัคคาเรียอยู่ที่ประมาณ 2-10 เม็ด Ct value จะประมาณ 30 แต่หากจำนวนอยู่ระหว่าง 11-20 เม็ด Ct value จะอยู่ที่ประมาณ 26 แต่กรณีที่มีจำนวนเมตาเซอรัคคาเรียมากกว่า 20 เม็ด Ct value จะมากกว่า 24 ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 5

ตารางที่ 3 ประมาณจำนวนเมตาเซอร์คาเรียผ่าน median cycle threshold value (Ct value)

Parasites	Numbers of metacercariae	Median Ct value
<i>H. taichui</i> , <i>H. pumilio</i> , and	1	35 (34-36)
<i>O. viverrini</i>	2-10	30 (28-33)
	11-20	26 (24-28)
	>20	≤ 24



รูปที่ 5 ผลการปริมาณจำนวนเมตาเซอร์คาเรียของเชื้อปรสิต 3 ชนิด ได้แก่ *H. taichui* *H. pumilio* และ *O. viverrini* ด้วยวิธี real-time multiplex PCR โดยใช้ TaqMan probe ที่ติดสาร fluorophores จำเพาะต่อ DNA ส่วน 28S rDNA ของเชื้อปรสิตทั้ง 3 ชนิด

การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจหาเมตาเซอรัคคาเรียในปลาด้วยวิธี Conventional method และวิธี real-time PCR

ในการ run PCR ทุกครั้งจำเป็นที่ผลของ control ไม่ว่าจะ เป็น positive, negative หรือ IAC ต้อง ให้ผลดีทุกครั้งเพื่อให้ผลที่ได้จากการทำ multiplex real-time PCR น่าเชื่อถือ จากการตรวจสอบโดยใช้ วิธี real-time PCR เมื่อเทียบกับวิธี tissue compression และ digestion ให้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของการตรวจหาเมตาเซอร์คาเรียในปลาด้วยวิธี Conventional method และวิธี real-time PCR

Fish species	No. of fish	No. of metacercariae in fish (positive)											
		Compression (and identification under stereomicroscopy)				Digestion				Real-time PCR			
		<i>Ov</i>	<i>Ht</i>	<i>Hp</i>	<i>Unk</i>	<i>Ov</i>	<i>Ht</i>	<i>Hp</i>	<i>Unk</i>	<i>Ov</i>	<i>Ht</i>	<i>Hp</i>	<i>Unk</i>
<i>Barbonymus gonionotus</i>	20	0 (16)	0	0	>10 (20)	0 (9)	0	0	>10 (20)	0 (9)	0	0	n/a
		2-10 (4)				1 (6)				1 (6)			
						2-10 (5)				2-10 (4)			
										11-20 (1)			
<i>Cyclocheilichthys enoplos</i>	20	0 (15)	0	0	>10 (20)	0 (9)	0	0 (18)	>10 (20)	0 (9)	0	0 (16)	n/a
		1 (2)				1 (3)				1 (3)			
		2-10 (3)				2-10 (8)				2-10 (7)			
										11-20 (1)			
<i>Hampala dispar</i>	20	0	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	n/a
						2 (1)				2-10 (1)			
<i>Puntius orphoides</i>	20	0	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	n/a
						2 (1)				2-10 (1)			
No. of fish positive		9	0	0	80	24	2	80	24	0	4		
% of fish positive		11.3	0	0	100	30	0	2.5	100	30	0	5	n/a
Time for manually work per 10 fish		50 min - 2.5 hrs				1 day				1.5 hrs			

ในการศึกษาจากการตรวจปลาในพื้นที่พบว่าหากใช้วิธี Tissue compression จะพบปลาติดเชื้อ *O. viverrini* เพียง 9% โดยไม่พบการติดเชื้อ *Haplorchis* เลยในปลา แต่เมื่อใช้วิธี digestion พบว่าปลาติดเชื้อ *O. viverrini* ประมาณ 30% โดยพบเมตาเซอร์คาเรียของ *H. pumilio* ในปลาโຈก โดยผลของวิธี real-time PCR ให้ผลไม่ต่างจากวิธีนี้

จากตารางข้างต้นแสดงผลว่า Multiplex real-time quantitative PCR ให้ผลดีกว่าและแม่นยำกว่าวิธี tissue compression แต่ให้ความถูกต้องของผลการตรวจสอบทั้งชนิดและจำนวนของเมตาเซอร์คาเรียได้ใกล้เคียงกับวิธี digestion โดยเมื่อนำเอาวิธี digestion และ real-time PCR เทียบกับวิธี tissue compression ให้ความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** เที่ยบความถูกต้องของผลการตรวจสอบทั้งชนิดและจำนวนของเมตาเซอร์คาเรียวิธี digestion และ real-time PCR เทียบกับวิธี tissue compression

Examination	N	Positive	Negative	Chi-square	P value
method		frequency (%)	frequency (%)	(df)	
Compression	80	9 (11.25)	71 (88.75)	9.561 (1)	0.002
Digestion/ Real-time PCR		25 (31.25)	55 (68.75)		

แต่หากเปรียบเทียบระหว่างวิธี real-time PCR และ digestion แม่นยำจะให้ความถูกต้องแม่นยำเท่าเทียมกัน แต่วิธี digestion ต้องการความสามารของผูั identify เมตาเซอร์คาเรียและต้องใช้เวลาในการแยกเมตาเซอร์คาเรียออกมา identify ได้กล้อง light microscope ซึ่งจะใช้เวลาานมาก หากจำนวนเมตาเซอร์คาเรียที่ได้จากห้องที่มีปริมาณมากโดยอาจจะต้องใช้เวลาานหลายชั่วโมงในการทำงานให้เสร็จซึ่งเป็นข้อดีของวิธี real-time PCR เหนือวิธี digestion เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ต้องการผูัมีความสามารถในการ identify เมตาเซอร์คาเรียและใช้เวลาไม่นานในการทราบผล โดยคิดความต่างในชวงเวลาเป็น 16 เท่า (ตารางที่ 4)

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากในปัจจุบัน การกินอาหารที่ปรุงจากปลาดิบๆ สุกๆ ยังเป็นเมนูที่นิยมเนื่องจากเป็นสิ่งที่สอดแทรกอยู่ในวัฒนธรรมการรับประทานอาหารของประชากรบางพื้นที่ เช่น การนิยมกินปลาล้า ก้อยปลาในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของไทย ทำให้โรคติดต่อผ่านปลายังคงเป็นปัญหาหนัก โดยเฉพาะการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* อย่างไรก็ตาม พื้นที่ในการแพร่ระบาดของพยาธิชนิดนี้มักอยู่ในพื้นที่เดียวกับพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก Heterophyid intestinal flukes (HIFs) โดยลักษณะของตัวอ่อนระยะติดเชื่อในปลาของพยาธิทั้ง 2 กลุ่ม มีความคล้ายคลึงกันต้องการผู้ที่ได้มีความรู้ในการแยกชนิดของพยาธิจากระยะติดเชื่อในปลา โดยบ่อยครั้งมักประสบปัญหาเมื่อต้องการศึกษาความชุกของพยาธิในพื้นที่ระบาดเพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการติดเชื้อแก่สาธารณสุขเพื่อกระจายความรู้สู่ชุมชนต่อไป

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจแยกชนิดของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก Heterophyid intestinal fluke และประมาณจำนวนตัวอ่อนระยะติดเชื่อในปลาโดยใช้เทคนิค Multiplex real-time quantitative PCR ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของพยาธิ *O. viverrini*, *H. taichui* และ *H. pumilio* ได้พร้อมๆ กับสามารถประมาณจำนวนของเมตาเซอร์คาเรียได้ในเวลาเดียวกันได้

ในอดีตมักพบปัญหาในการตรวจชนิดพยาธิและนับจำนวนของเมตาเซอร์คาเรียจากวิธี Tissue compression ซึ่งจากการศึกษานี้ประเมินได้ว่ามีความน่าเชื่อถือของวิธีดังกล่าวนี้ต่ำกว่าวิธี Digestion และ Real-time PCR อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ;  $0.002$ ) ซึ่งหากทำการตรวจประมาณการติดเชื่อด้วยวิธี Tissue compression จะมีความน่าเชื่อถือในผลการประเมินต่ำกว่า อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการประเมินความถูกต้องคลาดเคลื่อนของการประมาณจำนวนและการจำแนกชนิดพยาธิพบว่าความถูกต้องของวิธี Digestion และ Real-time PCR มีความเท่าเทียมกันในแง่ของความถูกต้องแม่นยำ แต่มีความแตกต่างกันในเชิงของเวลาที่ใช้ โดยวิธี digestion จะใช้เวลาในการตรวจปลาที่มีเมตาเซอร์คาเรียที่มีปริมาณการติดเชื่อสูงมากกว่ากันถึง 16 เท่า เนื่องจากวิธี digestion ต้องการความถูกต้องและความชำนาญของผู้ตรวจแยกชนิดของเมตาเซอร์คาเรียได้กล้อง stereo-microscope และในบางกรณีอาจไม่สามารถแยกชนิดจากสัณฐานคร่าวๆ ได้ จำเป็นต้องดูลักษณะเพื่อจำแนกชนิดผ่านกล้อง Light microscope ซึ่งอาจจะต้องเวลานานเป็นวันเพื่อให้ได้ผลที่ละเอียดและถูกต้อง ซึ่งหากเทียบกับความถูกต้องแล้ว Real-time PCR จึงสามารถเป็นวิธีที่นำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการทำตรวจแยกชนิดและประมาณจำนวนเมตาเซอร์คาเรียจากปลาในท้องที่ได้ในปริมาณมากในเวลาจำกัด

จากวิธี Multiplex real-time quantitative PCR ที่พัฒนาขึ้น นำไปใช้เพื่อกับการปลาที่ได้จากพื้นที่ที่มีรายงานพบการติดเชื่อพยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืด ที่ตำบลคลองน้ำใส จังหวัดสระแก้ว ประเทศไทย โดยผลจากการตรวจปลาทั้ง 4 ชนิดได้แก่ ปลาโຈก ปลาตะเพียนขาว ปลาแก้มช้ำ

และปลาหมอ พบว่า ปลาในตระกูลปลาโกลเป็นปลาที่พบการติดเชื้อสูงสุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธี digestion โดยสามารถตรวจแยกชนิดพร้อมประมาณจำนวนของเมตาเซอร์คาเรียได้ในเวลาเดียวกัน จากวิธีการข้างต้นมีศักยภาพเหนือกว่าวิธี tissue compression เนื่องจากวิธี real-time PCR สามารถตรวจหาตรวจพบเมตาเซอร์คาเรียของ *H. pumilio* หนึ่งเม็ดจากปลาโกล 2 ตัว ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธี digestion และ identification

ในการพัฒนาเทคนิค PCR ที่ผ่านมาเป็นการพัฒนาเพื่อใช้ในการแยกชนิดพยาธิได้เพียงหนึ่งถึงสองชนิดเท่านั้นและไม่สามารถประมาณจำนวนของเมตาเซอร์คาเรียได้ ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในการที่ต้องการใช้เทคนิค PCR กับการตรวจปลาที่มีเมตาเซอร์คาเรียปริมาณมากๆ และมีการปะปนกันจากพยาธิหลายชนิด โดยประโยชน์จากเทคนิคที่พัฒนานี้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่องานตรวจหาพยาธิใบไม้ติดต่อผ่านปลาชนิด *O. viverrini*, *H. taichui*, และ *H. pumilio* ซึ่งมักพบปะปนกันในห้องที่ แม้ว่าเทคนิคที่พัฒนาจะใช้ค่าใช้จ่ายสูง หากแต่สามารถนำมาใช้กับงานตรวจวินิจฉัยในงานที่ต้องการความถูกต้องและมีความจำกัดในแง่ของเวลา นอกจากนี้ เทคนิคนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้สำหรับงานตรวจวินิจฉัยพยาธิจากอุจจาระได้ เนื่องจาก probe และ primer มีศักยภาพในการแยกชนิดของพยาธิทั้งสามชนิดข้างต้นแม้ปริมาณ DNA ต้นแบบจะมีอยู่ในปริมาณน้อย

## ภาคผนวก

### 1. การตรวจหาเมตาเซอรัคคาเรียในเนื้อปลาด้วยเทคนิค tissue compression

เทคนิคนี้เป็นวิธีการตรวจหาเมตาเซอรัคคาเรียหรือตัวอ่อนพยาธิที่ฝังตัวอยู่ในเนื้อเยื่อของโฮสต์ โดยใช้การกดเนื้อเยื่อบนแผ่นกระจกใสบางจำนวน 2 แผ่น โดยมีวิธีการปฏิบัติดังต่อไปนี้

#### 1.1. วัสดุและอุปกรณ์

- ถาดพลาสติก
- ไม้บรรทัด
- แผ่นกระจกบางใสขนาด 10 x 15x 0.5 เซนติเมตร
- เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างหยาบ
- มีด
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo-microscope
- น้ำเกลือ (0.85% NaCl)
- หลอดหยด (Dropper)
- เครื่องนับจำนวนแบบมือกด (Hand tally counter)

#### 1.2. วิธีทำ

- แยกชนิดปลา วัดขนาด และชั่งน้ำหนักปลาแต่ละตัว พร้อมให้หมายเลข
- ล้างปลาให้สะอาดแล้วเอามีดเปิดช่องท้องของปลาเพื่อเอาอวัยวะภายในออกทั้งหมด
- แร่เนื้อปลาคอกแล้วแยกหนังของปลาแต่ละตัว
- ส่วนเนื้อปลา เอามาวางไว้บนกระจกใสหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใส่ 0.85% NaCl ประมาณ 5 หยด เพื่อไม่ให้เนื้อปลานั้นแห้งเกินไป
- กดทับเนื้อปลาด้วยกระจกอีกบาน ขนาดซึ่งมีขนาดเท่ากัน จนเนื้อปลาแผ่ออก
- นำเนื้อปลาที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกไปส่องดูใต้กล้อง Stereo-microscope เพื่อตรวจหาตัวอ่อนระยะเมตาเซอรัคคาเรียพร้อมทั้งจำแนกชนิดของเชื้อปรสิตจากสัณฐานภายนอก นับจำนวนแยกตามชนิดและบันทึกผล

### 2. การแยกเมตาเซอรัคคาเรียจากเนื้อปลาด้วยวิธี tissue digestion

วิธีนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาปรสิตที่อาศัยในเนื้อเยื่อ โดยการย่อยด้วยสารละลายน้ำย่อยสังเคราะห์ชนิด Pepsin ซึ่งจะทำให้ปรสิตที่มีถูกแยกออกจากเส้นใยของเนื้อเยื่อจึงง่ายต่อการตรวจพบและการจัดจำแนกชนิดอีกด้วย

#### 2.1. วัสดุและอุปกรณ์

- ปีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

- แผ่นพลาสติกใสถนอมอาหาร (Plastic wrap)
- ปากคีบ (Forceps)
- มีด
- ถาดแก้ว (Petri dish)
- แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod) ความยาว 10 นิ้ว
- สารละลายน้ำยอยสังเคราะห์ชนิดเปปซิน ความเข้มข้น 0.5% และอัตราส่วนของ

เนื้อเยื่อ : สารละลายน้ำยอยคือ 1: 10

- น้ำเกลือ (0.85% NaCl)
- เครื่องนับจำนวนแบบมือกด (Hand tally counter)
- พาสเตอร์ไปเปต (Pasteur pipette)

สารละลายเปปซิน 10 มิลลิลิตร	ความเข้มข้น 0.5%
ผงเปปซิน (มิลลิกรัม)	50
กรดเกลือเข้มข้น (Hydrochloric acid) (มิลลิลิตร)	0.05
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	10

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 37 องศาเซลเซียส

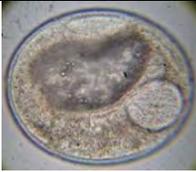
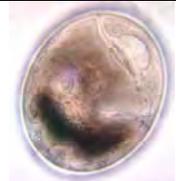
## 2.2. วิธีทำ

- สับตัวอย่างเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ
- คีบชิ้นเนื้อใส่ลงในบีกเกอร์ด้วยปากคีบ
- เติมสารละลายเปปซินในอัตราส่วนของ ตัวอย่างเนื้อเยื่อ ต่อ สารละลายเปปซิน ประมาณ 1 ต่อ 10
- ตั้งหลอดแก้วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้น้ำยอยทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส โดยในระหว่างนั้นให้คอยคนด้วยแท่งแก้วคนสารทุกๆ 15 นาที
- ภายหลังการย่อยสมบูรณ์ เติมน้ำเกลือลงไปอีก 1 ส่วน แล้วคนให้สารแขวนลอยฟุ้ง
- เนื้อปลาและสารแขวนลอยที่เกิดจากการย่อยจะมีน้ำหนักเบากว่าเมตาเซอร์คาเรีย ดังนั้นเมตาเซอร์คาเรียจะตกลงสู่ก้นของบีกเกอร์ภายในเวลา 10 นาที
- เมื่อปล่อยให้เกิดการตกตะกอนประมาณ 10 นาที เทสารแขวนลอยด้านบนบีกเกอร์ออก 1 ส่วน จากทั้งหมด 2 ส่วน โดยในการเท จะเทแบบครั้งเดียว เพื่อไม่ให้เกิดการฟุ้งของตะกอนด้านล่างที่มีเมตาเซอร์คาเรียอยู่ด้วย
- เทสารแขวนลอยที่ถูกทำให้ใส และง่ายต่อการตรวจสอบเมตาเซอร์คาเรีย ลงในถาดแก้วใส

- ตรวจสอบปรสิตภายใต้กล้องสเตอริโอ (Stereo-microscope) พร้อมจำแนกชนิดโดย  
 ลักษณะภายนอก และนับจำนวนแต่ละชนิด

- ใช้ฟาสเตอร์ไปเปิดดูเมตาเซอร์คาเรียเก็บรักษาไว้ใน 80% EtOH ที่ -20 องศาเซลเซียส  
 เพื่อใช้ในขั้นตอน real-time PCR ต่อไป

### 3. การจำแนกชนิดของเมตาเซอร์คาเรียจากลักษณะภายนอก

ชนิด/ ลักษณะ	<i>O. viverrini</i>	<i>H. taichui</i>	<i>H. pumilio</i>
ขนาดและรูปร่าง	รูปไข่	รูปไข่	ทรงกลม
สีของพาราโคมา	สีเหลืองและมีเม็ดสี กระจายทั่วไป	สีน้ำตาล	สีเหลืองและมีเม็ดสี กระจายทั่วไป
ช่องว่างภายในซีส	น้อยมาก	น้อยมาก	น้อยมาก
ขนาดของ oral sucker	ใหญ่	ใหญ่	ใหญ่
ขนาดของ ventral sucker	ใหญ่	เป็น modified sucker ลักษณะ คล้ายหวี กว้าง (Crescentic group of sclerites)	เห็นไม่ชัดเจน
ลักษณะของ excretory bladder	O- or V-shape	O- or V-shape	O-shape
เมตาเซอร์คาเรีย (x100)			

## 4. การออกแบบ PCR primers และ TaqMan probe

### 4.1. หลักการการออกแบบ primer

การเลือก Primer หรือ DNA สายสั้นๆ ที่สามารถเข้าคู่สมกับ DNA ต้นแบบที่บริเวณจำเพาะนั้นเป็นส่วนซึ่งสำคัญที่สุดจะเป็นตัวกำหนดว่าการเพิ่มจำนวน DNA ในกระบวนการ PCR จะประสบผลสำเร็จหรือล้มเหลว ดังนั้นก่อนเริ่มกระบวนการ PCR การออกแบบและพิจารณา primer ที่เหมาะสมจึงเป็นงานแรกๆ ที่ต้องทำให้ถูกต้องแม่นยำ โดยในการเลือก primer ที่ดีมีหลักการดังนี้

- เลือก primer ที่มีการกระจายตัวของ base ต่าง ๆ เหมือนกันกับ sequence ที่เราจะเพิ่มจำนวน หลีกเลี่ยง primer ที่มี polypyrimidine หรือ polypurine และควรมีจำนวน G+C ประมาณ 50% ขึ้นไปจากความยาวของ primer
- หลีกเลี่ยง primer ที่จะเกิด secondary structure เช่น hairpin และ primers
- หลีกเลี่ยง primer ที่จะทำให้เกิด primer dimer โดย primer ทั้ง 2 เส้น จะต้องไม่มีปลายด้าน 3' ของ primer ไปเข้าคู่สมกันเองกับ primer ด้วยกันเอง
- มีค่า Tm อยู่ในช่วง 55-65°C และค่า Tm ของ primers ทั้งคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกันโดยการหาค่า Tm ของ primer โดยการใช้ software หรือ สูตรคำนวณง่าย ๆ ดังนี้

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

ซึ่งจะได้ค่า Tm อย่างคร่าว ๆ จากนั้นเปรียบเทียบการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกัน (ประมาณ 3-5°C) หลาย ๆ อุณหภูมิ โดยใช้สำหรับขั้นตอน annealing ควรเป็นอุณหภูมิต่ำกว่า 50°C โดยหากต่ำกว่านี้จะมีโอกาสทำให้การเข้าคู่ของ primer ในบริเวณที่ไม่จำเพาะทำให้ได้ PCR product ผิดจากที่ต้องการ ในขณะที่หากใช้อุณหภูมิสูงไปก็จะเพิ่มความจำเพาะเจาะจงระหว่าง primer กับบริเวณที่ต้องการให้ primer ลงเกาะ ซึ่งจะส่งผลให้ในบางครั้งอาจจะทำให้ได้ PCR product ในปริมาณน้อยหรืออาจไม่ได้เลย สำหรับความเข้มข้นของ primers ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1-0.6  $\mu\text{M}$  (ยกเว้นในบางกรณี อาจใช้ความเข้มข้นถึง 1  $\mu\text{M}$ ) การใช้ primers ในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้โอกาสการเกิด mispriming primer-dimer และ non-specific amplified product เพิ่มขึ้นในทางกลับกัน การใช้ primers ในปริมาณที่น้อยเกินไป จะทำให้ primers ในปริมาณที่น้อยเกินไป จะทำให้ primers ถูกใช้หมดก่อนปฏิกิริยาสิ้นสุดลง เป็นผลให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลง

## 4.2 บริเวณที่ออกแบบ primers จาก 28 S ribosomal sequences



ซึ่ง primers คู่นี้เป็นคู่เดียวที่สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของ *O. viverrini* *H. taichui* และ *H. pumilio* ในขนาดประมาณ 180 คู่เบส

## 5. การออกแบบ Taqman probe สำหรับ multiplex realtime PCR

Taqman Probe เป็นการใช้ oligonucleotide เส้นเดียว โดยปลาย 5' ของ probe จะมีการติดฉลาก reporter dye และภายในสาย probe ห่างจาก reporter dye ไม่เกิน 5 คู่เบส จะติดฉลากด้วย Quencher dye หลังจากการ hybridization แล้ว เมื่อ reporter dye ถูก excite ด้วยแสงแสงจะถ่ายพลังงานผ่านไปที่ Quencher dye โดย Quencher dye จะดูดซับพลังงานนั้นไว้แล้วคายออกมาในรูปของแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น เมื่อกระบวนการ PCR เข้าสู่ช่วงการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ 5' exonuclease activity ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase จำทำการย่อย Taqman probe ทำให้ reporter dye หลุดเป็นอิสระและห่างจาก Quencher fluorophore ดังนั้น fluorescence ของ reporter fluorophore จะถูกวัดได้ ในระหว่างแต่ละรอบของ PCR cycle แสง fluorescence จะเพิ่มขึ้นเพราะมีจำนวน reporter fluorophore ที่เป็นอิสระ สะสมมากขึ้นเรื่อยๆ

### 5.1. การออกแบบ Taqman probe

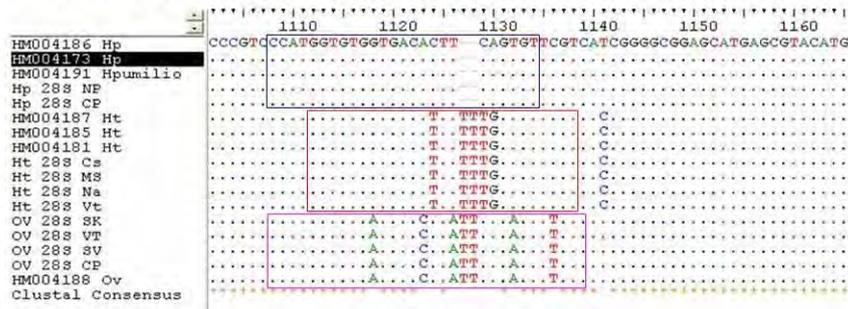
Probes สามารถออกแบบโดยใช้ Primer design software สำหรับเครื่อง real-time PCR รุ่น LightCycler 480 system II โดยมีหลักการดังต่อไปนี้

- Probe ต้องมีความยาวระหว่าง 13 ถึง 25 คู่เบส
- Melting temperature (Tm) ควรอยู่ในช่วงประมาณ 68°C ถึง 70°C
- GC content ควรอยู่ในช่วงระหว่าง 30% ถึง 50%

- ด้าน 5' ไม่ควรลงท้ายด้วย guanosine residue เนื่องจาก guanosine residue ที่อยู่ใกล้เคียงกับ reporter dye สามารถระงับ reporter fluorescence แม้ว่าจะถูก cleavage แล้ว
- หลีกเลี่ยงการใช้ sequences สายยาวๆ ที่มี identical nucleotides มาออกแบบ probe

## 5.2. ตำแหน่งของ Taqman probe

### 28S rDNA sequence region for probe design



Hp: *H. pumilio*

NP: Nakorn Prathom Province,  
Thailand  
CP: Chumphorn Province, Thailand

Ht: *H. taichui*

Cs: Chachoengsao Province, Thailand

MS: Mae Hong Son Province, Thailand

Na: Nan Province, Thailand

Vt: Vientiane, Lao PDR

Ov: *O. viverrini*

SK: Sa Kaeo Province, Thailand

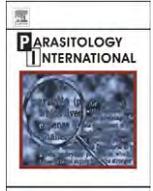
VT: Vientiane, Lao PDR

SV: Savannakhet Province, Lao PDR

CP: Champasak Rovince, Lao PDR

### Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. Urusa Thaenkham, Orawan Phuphisut, Wallop Pakdee, Nirundorn Homsuwan, Surapol Sa-nguankiat, Jitra Waikakul, Yukifumi Nawa, Do Trung Dung. Rapid and simple identification of human pathogenic heterophyid intestinal fluke metacercariae by PCR-RFLP. Parasitology International 2011, 60: 503-506.
2. Urusa Thaenkham, Wanlop Pakdee, Surapol Sa-nguankiet, Jitra Waikagul. Multiplex real-time quantitative PCR to detect *Opisthorchis viverrini* and other zoonotic trematode metacercariae in fish. กำลังอยู่ระหว่างขบวนการเพื่อการตีพิมพ์



## Rapid and simple identification of human pathogenic heterophyid intestinal fluke metacercariae by PCR-RFLP

Urusa Thaenkham<sup>a,\*</sup>, Orawan Phuphisut<sup>a</sup>, Wallop Pakdee<sup>a</sup>, Nirundorn Homsuwan<sup>a</sup>, Surapol Sa-nguankiat<sup>a</sup>, Jitra Waikagul<sup>a</sup>, Yukifumi Nawa<sup>b</sup>, Do Trung Dung<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 10400, Thailand

<sup>b</sup> The Research Affairs Division, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

<sup>c</sup> Parasitology Department, National Institute of Malariaology, Parasitology and Entomology, Ministry of Health, Hanoi, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 August 2011

Received in revised form 7 September 2011

Accepted 8 September 2011

Available online 17 September 2011

#### Keywords:

Molecular identification

Heterophyid intestinal flukes

PCR-RFLP

28S ribosomal RNA gene

### ABSTRACT

Six species of heterophyid intestinal flukes (HIFs) constitute the major endemic zoonotic fish-borne pathogens in Asia: *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *Procerovum varium*, *Stellantchasmus falcatus*, and *Centrocestus formosanus*. Several different species of these parasites are often found co-infecting the same second intermediate fish host. Because of their morphological similarities, differentiating between species of HIF metacercariae is difficult, time-consuming, and frequently results in misidentification. In this study, we aimed to develop an efficient and accurate method of identifying metacercariae of these 6 HIFs. Metacercariae were roughly grouped together, based on morphological characteristics seen under a stereomicroscope. Then, PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to identify the exact species of each metacercaria, using the 28S ribosomal RNA gene as the genetic marker and *Mbo*II as the restriction enzyme. Using a combination of morphological and molecular methods eliminates the need for DNA sequencing and infecting animal subjects to obtain adult worms, increases accuracy, and decreases the need for laborious morphological identification. Because the method is simple, rapid, and relatively cheap compared with PCR-sequencing, it may be an effective tool for epidemiological studies of HIFs in endemic areas.

Crown Copyright © 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Heterophyid intestinal flukes (HIFs) of the family Heterophyidae include several species pathogenic to humans, including *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *Procerovum varium*, *Stellantchasmus falcatus*, and *Centrocestus formosanus* which cause heterophyiasis [1,2]. *H. taichui* has been suggested as an etiological agent causing irritable bowel syndrome-like symptoms [3]. In addition, brain invasion by an *H. pumilio* adult worm has been reported, evidenced by encapsulated eggs in human brain tissues [4].

Human pathogenic HIFs are widely distributed across East and Southeast Asia. HIF infection is an emerging public health issue in the Lower Mekong Basin, such as Lao PDR, Vietnam, and Thailand [1,2]. Humans become infected with HIFs by consuming uncooked or improperly cooked fish [1,2,5,6]. Several families of fish, particularly certain species of the family Cyprinidae, harbor HIF metacercariae, the infective-stage larvae [7,8]. The fish then facilitate the transmission of parasites to definitive hosts in endemic areas [1,9]. As long as HIF cycles are maintained in the environment, and humans do

not change their eating behaviors, re-infections and chronic infections can occur [1].

Current estimations of HIF prevalence is mainly done through fish examination [10,11]. Metacercariae in or on the fish body are separated and then the parasite species is typically microscopically identified based on morphology [12]. Since the morphological criteria for classifying HIFs is difficult and complicated [13], misidentification often occurs if the method is performed by a novice.

PCR-based molecular identification has been used to confirm the identity of HIF metacercariae following morphological analysis [14,15]. Chuboon and Wangsawad [15] developed a method based on the High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. However, this method has only been tested for 4 species and shows inadequate sensitivity. The PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method is an alternative approach, used for the molecular identification of helminthes [16]. This method can provide specific band patterns of many species, using highly conserved regions, such as rDNA genes, as a genetic marker [17–19].

In this study, we aimed to develop an effective method to identify the metacercariae of the 6 human pathogenic HIFs common to East and Southeast Asia: *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *Procerovum varium*, *Stellantchasmus falcatus*, and *Centrocestus formosanus* [1,2].

\* Corresponding author at: 420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok, 10400, Thailand. Tel./fax: +66 2 6435600.

E-mail address: [tmurus@mahidol.ac.th](mailto:tmurus@mahidol.ac.th) (U. Thaenkham).

Mixed infections, involving two or more of these species, often occur in intermediate fish hosts, and also in humans [20]. As a first step, the metacercariae of these 6 HIFs were roughly identified morphologically under a stereomicroscope. Then, using a simple PCR-RFLP method with large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA; 28S rDNA) as the DNA marker, the exact species was determined. The 28S rDNA amplicons provided specific band patterns for each parasite after cleavage with the restriction enzyme, *Mbo*II. The combined morphological and molecular-assay methods provided an effective guideline for the identification of metacercariae of the 6 human pathogenic HIFs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection and identification of metacercariae

Samples of freshwater fish – of the species *Barbodes gonionotus*, *Anabas testudineus*, *Trichogaster trichopterus*, and *Mystus singaringan* – were collected from natural water sources in Thailand. Metacercariae were separated from the fish by pepsin digestion method [21] and identified under a light microscope, according to the Haplorchiinae morphological identification criteria [13]. Then, 100 metacercariae of each species were selected by the characteristics seen under a 60× magnification stereomicroscope. Since we could not obtain the metacercariae of *S. falcatus*, the rough characteristics of encysted metacercaria of this parasite were followed, as described by Chai et al. [22]. A photograph of an *S. falcatus* metacercaria was taken by one of the authors in Vietnam. For the molecular study, we used voucher specimens of adult *S. falcatus* worms from patients in Nam Binh Province, Vietnam.

### 2.2. PCR conditions

Genomic DNA was extracted from 10 metacercariae per species (~2 ng/μl) and from 5 adult worms of *S. falcatus* (~4 ng/μl) using tissue genomic DNA mini kits (Geneaid, Taiwan), according to the manufacturer's protocol. The concentrations of genomic DNAs were measured by NanoDrop® spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Delaware, USA). PCR primers were designed from 28S rDNA sequences of *H. taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *P. varium*, *S. falcatus*, and *C. formosanus* (GenBank accession nos. HM004181, HM004173, HM004177, HM004182, HM004174, and HQ874600, respectively). The PCR primers used were 28S-Het-RFLP F (5'CTA ACA AGG ATT CCC TYA GTA AC 3') and 28S-Het-RFLP R (5'TTC GAT TAG TCT TTC GCC C 3'). PCR amplicons were approximately 1290 bp in length. 50 μl of each PCR reaction was composed of the 1xTopTaq master mixed kit (1U TopTaq polymerase, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and TopTaq polymerase buffer), 20 pmol of each primer, and 1 μl of the DNA template. The genomic DNA of *H. taichui*, the representative species, was prepared as serial dilutions (1 ng/μl to 10<sup>-4</sup> ng/μl) to evaluate the sensitivity of the designed primers. The PCR reactions were adjusted to final volume by adding sterile double-distilled water. PCR reactions were carried out with initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 34 cycles of 95 °C for 45 s, 60 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min. The final extension was performed at 72 °C for 8 min.

### 2.3. PCR-RFLP

About 1290 bp of 28S rDNA sequences of each species were obtained from GenBank to draw the digestion sites of *Mbo*II and to determine the expected fragment sizes (Table 1). Genomic DNA was extracted from a single metacercaria (~0.2 ng/μl) of each species studied, and PCR was performed as described above. After purifying the PCR products with the Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taiwan), about 500 ng each of purified PCR product was digested with the restriction enzyme *Mbo*II (New England Biolab Inc., Massachusetts, USA) at 37 °C for 45 min. The enzymatic digestion

**Table 1**

Predicted 28S rDNA fragments of 6 human pathogenic-heterophyid intestinal flukes after *Mbo*II digestion in PCR-RFLP.

Species	PCR amplicons of 28S rDNA	<i>Mbo</i> II cleavage site (nucleotide position)	Predicted fragment size (base pair)
<i>Haplorchis taichui</i>	1290	356, 508	<b>152, 356, 782</b>
<i>H. pumilio</i>	1286	356	356, <b>930</b>
<i>H. yokogawai</i>	1290	356, 474, 1110	118, <b>180</b> , 356, <b>636</b> ,
<i>Procerovum varium</i>	1290	356, 474	118, 356, <b>816</b>
<i>Stellantchasmus falcatus</i>	1291	355, 473, 694	117, <b>221</b> , 355, <b>597</b> ,
<i>Centrocestus formosanus</i>	1286	356, 696	<b>340</b> , 356, 590

**Note:** bold face: fragments corresponding to species-specific bands.

was stopped by heating at 65 °C for 15 min. The final digested PCR amplicons were run on a 2% agarose gel at 50 V for 1 hour and the band patterns were visualized on a UV transilluminator. The PCR-RFLP figure was photographed with Gel Documentation (G-Box (HR); Syngene, UK).

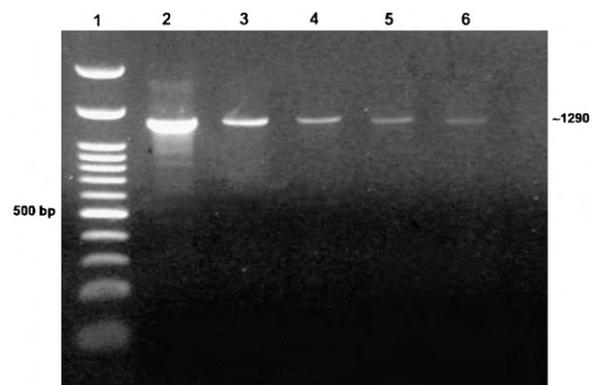
### 2.4. Identification of species-specific bands

Various combinations of extracted genomic DNA solution of each HIF (~0.2 ng/μl used for each species) were artificially mixed to see the resolutions of the mixed PCR-RFLP band patterns. PCR was carried out according to the condition described in Section 2.2. All possible two-species combinations were studied. In addition, the genomic DNA of all 6 species were combined together to determine band-pattern resolution.

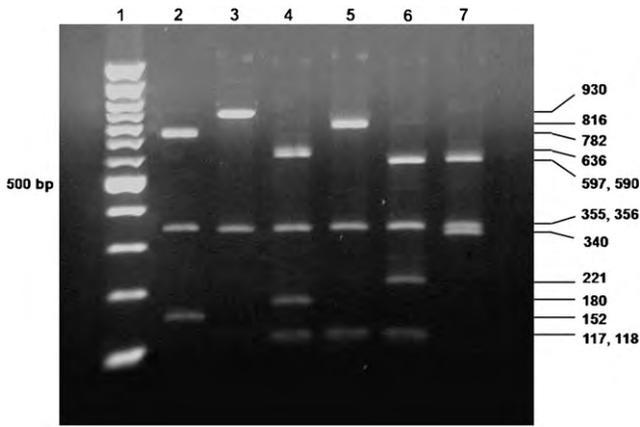
## 3. Results

### 3.1. Primer-set sensitivity and PCR-RFLP band patterns

Using the PCR primers described, partial 28S rDNA was amplified at all dilutions, from 1 ng to 10<sup>-4</sup> ng (Fig. 1). The PCR-RFLP band patterns of 6 HIFs were examined after the digestion of 28S rDNA amplicons with *Mbo*II (Fig. 2). As predicted by the *Mbo*II cleavage-site analysis (Table 1), species-specific bands were observed at the expected molecular-size positions (Fig. 2). In addition to the species-specific bands, all 6 species shared the ~356 bp band. The



**Fig. 1.** Sensitivity of the designed PCR primers. A serial genomic DNA dilution of *H. taichui* (representative of all species studied) was amplified by 28S-Het\_RFLP F&R primers. Lane 1: 100 bp ladder marker. Lanes 2 to 6: PCR products of serial genomic DNA dilution from 1 ng, 10<sup>-1</sup> ng, 10<sup>-2</sup> ng, 10<sup>-3</sup> ng, and 10<sup>-4</sup> ng, respectively.



**Fig. 2.** PCR-RFLP band patterns of 28S rDNA amplified amplicons from the 6 HIFs studied digested with *Mbo*II. Lane 1: 100 bp ladder marker. Lanes 2 to 7: band patterns of *H. taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *P. varium*, *S. falcatus*, and *C. formosanus*, respectively. The fragment size shows on the right of the figure.

118 bp band was shared by *H. yokogawai*, *P. varium* and *S. falcatus*, which was also predicted by the cleavage-site analysis (Table 1).

**3.2. PCR-RFLP band patterns of mixed metacercarial DNA**

To evaluate the resolution of the PCR-RFLP band patterns where > 1 specie’s DNA were present simultaneously in the same tube, the genomic DNA of multiple HIF species were mixed together artificially and examined by PCR-RFLP assay. According to the species-specific band patterns, the PCR-RFLP could distinguish between species for every pair of HIFs (Fig. 3). Even when all 6 species were present at the same time, the species-specific bands were still identifiable in gel-electrophoresis.

**4. Discussion**

The identification of heterophyid-intestinal-fluke (HIF) metacercariae, based on morphology alone, is difficult because subtle characteristic differences are sometimes hard to discern. This is true even under a light microscope, particularly for the modified ventral sucker. The accuracy of this method depends on investigators with vast knowledge and extensive experience. As surveying natural fish populations to determine parasite prevalence may result in a large number of samples, identifying all these metacercariae individually is laborious and time-consuming. Because of this, animal subjects are often infected

with metacercariae and subsequently euthanized to obtain adult worms, which are much easier to identify morphologically [12].

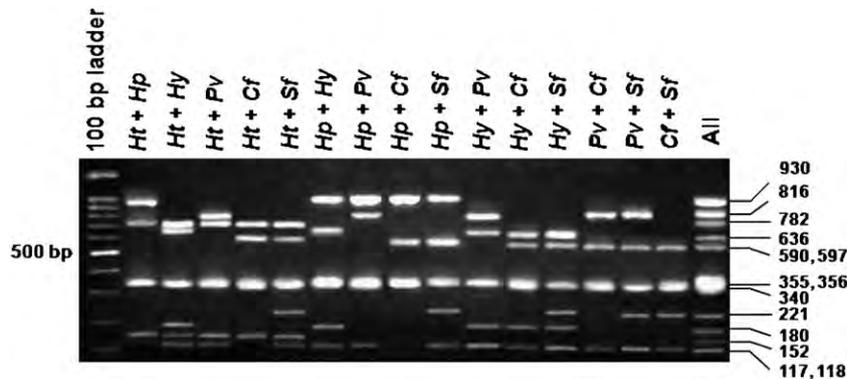
Nowadays, molecular identification by PCR-RFLP can be used effectively with a wide variety of phyla [18,23,24] to confirm species based on species-specific band patterns of the target gene, after digestion with restriction enzyme. The PCR-RFLP method can identify species quickly, without the need for expensive DNA sequencing-based assays. In this study, the PCR-RFLP method was used to differentiate 6 human pathogenic HIFs: *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai*, *Procerovum varium*, *Stellantchasmus falcatus*, and *Centrocestus formosanus*. We used the 28S rRNA gene as a DNA marker because it has enough fixed nucleotide differences among all 6 species studied. After digesting the PCR amplicons with *Mbo*II, all 6 parasites were clearly distinguishable from each other due to their respective species-specific band patterns (Fig. 2). Moreover, this gene has previously been used for studying their phylogenetic relationships with other species in the family Heterophyidae [25].

After roughly grouping the metacercariae by morphological characteristics (Table 2), each metacercarial species was confirmed by PCR-RFLP. The combination of morphological and molecular methods provides a simple approach to identifying the metacercariae of the 6 HIFs studied, without having to infect animal subjects or sequence DNA. Only a few morphological characteristics of the metacercariae are key to the preliminary separation of species. PCR-RFLP also requires only 1 metacercaria. As shown in Fig. 3, two co-incident metacercarial species can be clearly discriminated. Even when all 6 different types of suspected species were mixed together in the same PCR and digestion reactions, the species-specific bands were still identifiable.

As an alternative to PCR-RFLP, multiplex PCR could also have been used for the molecular identification of other helminths [26,27]. However, species-specific primers for each species would be necessary to avoid misidentification, which is rather costly compared with PCR-RFLP. The present results clearly showed species-specific bands in PCR-RFLP, even when the DNA of multiple species were mixed together (Fig. 3); therefore, it is unnecessary to employ more expensive multiplex PCR. PCR-RFLP is also more sensitive and specific than HAT-RAPD [15].

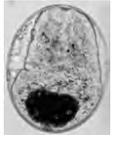
Since the PCR-RFLP developed here could detect very small amounts of genomic DNA ( $\approx 10^{-4}$  ng), it may also have useful applications in identifying the cercarial stages of the same 6 species from freshwater snails, and the molecular diagnosis of parasite eggs in human or animal fecal samples from HIF-endemic areas.

In this study, we specifically developed PCR-RFLP to identify 6 human pathogenic HIFs common to East and Southeast Asia. To apply this method to other species in the family Heterophyidae, 28S rDNA sequence data are required. Because the PCR-RFLP method



**Fig. 3.** PCR-RFLP band patterns of 28S rDNA amplified amplicons artificially mixed together to simulate co-infections, then digested with *Mbo*II. 0.2 ng of genomic DNA, was used for each species. Lane 1: ladder marker. Lanes 2 to 16: mixed genomic DNA between two species being possible. Lane 17: the band pattern of all species mixed together. *Ht*: *H. taichui*, *Hp*: *H. pumilio*, *Hy*: *H. yokogawai*, *Pv*: *P. varium*, *Cf*: *C. formosanus*, and *Sf*: *S. falcatus*.

**Table 2**  
Morphological characterization of HIF metacercariae pathogenic to humans. Images are 60× magnification and observed under a stereomicroscope.

Species/characters	<i>H. taichui</i>	<i>H. pumilio</i>	<i>H. yokogawai</i>	<i>P. varium</i>	<i>S. falcatus</i>	<i>C. formosanus</i>
Shape	Elliptical	Round	Elliptical	Elliptical	Elliptical	Elliptical
Color of parenchyma	Brownish	Yellowish with small dots of pigment scattered	Yellowish	Yellowish	Yellowish	Yellowish
Body in cyst space	Nearly full	Nearly full	Nearly full	Nearly full	Space ++	Space +
Oral sucker	Large	Large	Small	Small	Small	With circumoral spines
Ventral sucker	Crescentic group of sclerites	Never	Never	Never	Never	Ventral sucker-like
Excretory bladder	O- or V- shape	O-shape	O- or V-shape	O-shape (look like oil vacuole inside)	O-shape	X-shape
Metacercaria (×100) Scale bar = 50 μm						

described here is simple and relatively cheap, it can increase the accuracy of species identification and decrease time wastage. This will allow for more precise and efficient measurements of HIF prevalence in intermediate hosts, especially freshwater fish.

### Acknowledgements

Thanks to the Thailand Research Fund (MRG5480075) for financial support, and the Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University for facilities to complete this study. We also thank Mr. Paul Adams and Mr. Tim Jackson, Office of Research Service, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for their assistance in proofreading English language.

### References

- Chai JY, Murrell KD, Lymbery AJ. Fish-borne zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology* 2005;35:1233–54.
- Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2009;22:466–83.
- Wattanakulpanich D, Waikagul J, Maipanich W, Nuamtanong S, Sanguankiat S, Pubampen S, et al. *Haplorchis taichui* as a possible etiologic agent of irritable bowel syndrome-like symptoms. *The Korean Journal of Parasitology* 2010;48:225–9.
- Africa M, de Leon W, Garcia EY. Visceral complication in intestinal heterophyidiasis of man. *Acta Medica Philippina* 1940;1:1–132.
- Dung TD, De NV, Waikagul J, Dalsgaard A, Chai JY, Sohn WM, et al. Fishborne zoonotic intestinal trematodes, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:1828–33.
- Chuboon S, Wongsawad C, Ruamsuk A, Nithikathkul. Survival of *Haplorchis taichui* metacercariae in lab-pla, Thai traditional food preparation. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2005;36(suppl 4):110–1.
- Saenphet S, Wongsawad C, Saenphet K, Rojanapaibul A, Vanittanakom P, Chai JY. The occurrence of heterophyid metacercariae in cyprinoid fish in Chiang Mai province. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2008;39(suppl 1):56–61.
- Rim HJ, Sohn WM, Yong TS, Eom KS, Chai JY, Min DY, et al. Fishborne trematode metacercariae detected in freshwater fish from Vientiane Municipality and Savannakhet Province, Lao PDR. *The Korean Journal of Parasitology* 2008;46:253–60.
- Anantapahruti MT. Parasitic contaminations in food. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2001;32(Suppl 2):218–28.
- Thien PC, Dalsgaard A, Thanh BN, Olsen A, Murrell. Prevalence of fishborne zoonotic parasites in important cultured fish species in the Mekong Delta, Vietnam. *Parasitology Research* 2007;101:1277–84.
- Phan VT, Ersbøll AK, Nguyen TT, Nguyen KV, Ngugen HT, Murrell KD, et al. Freshwater aquaculture nurseries and infection of fish with zoonotic trematodes, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* 2010;16:1906–9.
- Sohn WM. Fish-borne zoonotic trematode metacercariae in the Republic of Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 2009;47:S103–13.
- Pearson J, Ow-Yang CK. New species of *Haplorchis* from Southeast Asia, together with keys to the *Haplorchis*-group of heterophyid trematodes of the region. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1982;13:35–59.
- Van KV, Dalsgaard A, Blair D, Le TH. *Haplorchis pumilio* and *H. taichui* in Vietnam discriminated using ITS-2 DNA sequence data from adults and larvae. *Experimental Parasitology* 2009;123:146–51.
- Chuboon S, Wongsawad C. Molecular identification of larval trematode in intermediate hosts from Chiang Mai, Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2009;40:1216–20.
- Huang WY, He B, Wang CR, Zhu XQ. Characterisation of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Veterinary Parasitology* 2004;120:75–83.
- Stothard JR, Brémond P, Andriamaro L, Sellin B, Sellin E, Rollinson D. *Bulinus* species on Madagascar: molecular evolution, genetic markers and compatibility with *Schistosoma haematobium*. *Parasitology* 2001;123:S261–75.
- Blank M, Laine AO, Jürss K, Bastrop R. Molecular identification key based on PCR/RFLP for three polychaete sibling species of the genus *Marenzelleria*, and the species' current distribution in the Baltic Sea. *Helgolander Marine Research* 2007;62:129–41.
- Dagar SS, Kumar S, Mudgil P, Singh R, Puniya AK. D1/D2 domain of large subunit rDNA for differentiation of *Orpinomyces* spp. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:6722–5.
- Chai JY, Park JH, Han ET, Guk SM, Shin EH, Lin A, et al. Mixed infections with *Opisthorchis viverrini* and intestinal flukes in residents of Vientiane Municipality and Saravane province in Laos. *Journal of Helminthology* 2005;79:283–9.
- World Health Organization. Control of foodborne trematode infection. Report of a WHO study group, vol. 849. World Health Organ Tech Rep Ser; 1995. p. 1–157.
- Chai JY, Sohn WM. Identification of *Stellantchasmus falcatus* metacercariae encysted in mullets in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 1988;26:65–8.
- Comesaña AS, Abella P, Sanjuan. Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003;83:752–9.
- Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Stevenson LA. Species identification of trichostrongyle nematodes by PCR-linked RFLP. *International Journal for Parasitology* 1994;24:291–3.
- Thaenkham U, Nawa Y, Blair D, Pakdee W. Confirmation of the paraphyletic relationship between Opisthorchiidae and Heterophyidae using small and large subunit ribosomal DNA sequences. *Parasitol Int* in press doi:10.1016/j.parint.2011.07.015.
- Higa Y, Toma T, Tsuda Y, Miyagi I. A multiplex PCR-based molecular identification of 5 morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* Mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010;63:312–6.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International* 2008;57:49–53.

Manuscript Number:

Title: Multiplex real-time quantitative PCR to detect *Opisthorchis viverrini* and other zoonotic trematode metacercariae in fish

Article Type: Regular Articles

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

Corresponding Author: Dr. Urusa Thaenkham, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

First Author: Urusa Thaenkham, Ph.D.

Order of Authors: Urusa Thaenkham, Ph.D.; Wanlop Pakdee, M.Sc.; Surapol Sa-nguankiat, B.Sc.; Jitra Waikagul, Ph.D.

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 < 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.

May 9, 2013

Dear Editor,  
Acta Tropica

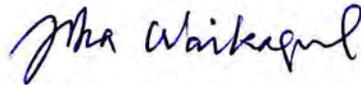
We would like to submit the manuscript, "**Multiplex real-time quantitative PCR to detect *Opisthorchis viverrini* and other zoonotic trematode metacercariae in fish**", to be considered in your journal as a research article.

This paper has not been submitted for publication to any journal until we receive your decision.

Sincerely,



Urusa Thaenkham, Ph.D.  
Department of Helminthology,  
Faculty of Tropical Medicine,  
Mahidol University,  
Bangkok, Thailand, 10400  
Tel: +662-6435600  
Fax: +662-6435600  
E-mail: [urusa.tha@mahidol.ac.th](mailto:urusa.tha@mahidol.ac.th)



Jitra Waikagul, Ph.D.  
Department of Helminthology,  
Faculty of Tropical Medicine,  
Mahidol University  
E-mail: [jitra.wai@mahidol.ac.th](mailto:jitra.wai@mahidol.ac.th)



Wanlop Pakdee, M.Sc.  
Department of Helminthology,  
Faculty of Tropical Medicine,  
Mahidol University  
E-mail: [wallop.pak@mahidol.ac.th](mailto:wallop.pak@mahidol.ac.th)



Surapol Sa-nguankiet, B.Sc.  
Department of Helminthology,  
Faculty of Tropical Medicine,  
Mahidol University  
E-mail: [surapol.san@mahidol.ac.th](mailto:surapol.san@mahidol.ac.th)

## Species discrimination and estimation of numbers of metacercariae detected with median cycle threshold value

Fluorophores for TaqMan probe-specific species	Numbers of metacercariae	Median Ct value
<i>H. taichui</i> (5'6FAM/ 3'BBQ), <i>H. pumilio</i> (5'YAK/ 3'BBQ), and <i>O. viverrini</i> (5'LC610/ 3'BBQ),	1	35 (34-36)
	2-10	30 (28-33)
	11-20	26 (24-28)
	>20	≤ 24



Scale bar = 50  $\mu$ M

## **Highlights**

- > New multiplex real-time quantitative PCR for detecting zoonotic trematode metacercariae in fish.
- > The developed method can distinguish and estimate the number of metacercariae from fish.
- > The method developed with a high degree of accuracy, saving both skilled manpower and time.

**\*Potential Reviewers**



1  
2  
3 **Multiplex real-time quantitative PCR to detect *Opisthorchis viverrini* and**  
4  
5  
6  
7  
8  
9 **other zoonotic trematode metacercariae in fish**

10 Urusa Thaenkham\*, Wanlop Pakdee, Surapol Sa-nguankiet, Jitra Waikagul

11 Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok,  
12  
13 Thailand

14 \* Corresponding author: Urusa Thaenkham, Ph.D.

15 Phone/Fax: +662-6435600

16 E-mail: [urusa.tha@mahidol.ac.th](mailto:urusa.tha@mahidol.ac.th)

17 Address: 420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok, 10400

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27 **ABSTRACT**

28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

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 ≤ 24). The method proved more effective than conventional methods, with a high degree of

1 accuracy, saving both skilled manpower and time for the study of FZT prevalence, especially  
2 in endemic areas. Therefore, it might serve as an alternative method for detecting and  
3  
4 quantifying metacercariae of *O. viverrini*, *H. taichui*, and *H. pumilio* in fish from endemic  
5  
6 areas with evidence of co-infection.  
7  
8  
9

10  
11 **Keywords:** Multiplex real-time quantitative PCR, *Opisthorchis viverrini*, *Haplorchis taichui*,  
12  
13 *H. pumilio*, 28S ribosomal DNA.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## INTRODUCTION

1  
2 Infections with fish-borne zoonotic trematodes (FZT), particularly *Opisthorchis*  
3  
4 *viverrini* and heterophyid intestinal flukes, have been a public health problem, especially in  
5  
6 Southeast Asia (Chai et al., 2005; Keiser and Utzinger, 2005). Around 67.3 million people are  
7  
8 at risk of *O. viverrini* infection, and it has been estimated that 10 million people have been  
9  
10 infected by this parasite (Keiser and Utzinger 2005, 2009). *O. viverrini* is a type 1 carcinogen  
11  
12 that can induce cholangiocarcinoma (Kaewpitoon et al., 2008; IARC, 2011). Although the  
13  
14 consumption of properly cooked fish has been encouraged for the more effective control of  
15  
16 FZT infections, traditional uncooked fish dishes, such as Koi-Pla, Pla-Som, and Pla-La,  
17  
18 remain popular, particularly in northeastern Thailand and Lao PDR (Kaewpitoon et al., 2008;  
19  
20 Rangsin et al., 2009). Therefore, infections with these parasites remain frequent.  
21  
22  
23  
24  
25

26  
27 There are several reports of metacercarial contamination of aquacultured fish in FZT-  
28  
29 endemic areas, such as southern China, Vietnam, and Thailand (Lun et al., 2005; Phan et al.,  
30  
31 2010; Saenphet et al., 2008). These findings reveal a potential transmission route for parasites  
32  
33 to non-endemic areas through the market chain (Phan et al., 2010a). In addition, the  
34  
35 aquaculture industry in FZT-endemic areas has expanded to supply an increasingly global  
36  
37 market (FAO, 2010). The ability to detect fish contaminated with infective-stage FZT is  
38  
39 important for prevention and control (Johansen et al., 2010). Knowing the prevalence of fish  
40  
41 contamination with metacercariae, especially in endemic areas, is important for evaluating the  
42  
43 risk of FZT infection, especially by *O. viverrini* (Phan et al., 2010b). Recently, two techniques  
44  
45 have been used, the compression and digestion methods. These conventional techniques have  
46  
47 limitations, largely in their being time-consuming not just in identifying species of  
48  
49 metacercariae which are found, but particularly in providing prevalence information of FZT in  
50  
51 endemic areas, where large numbers of fish need to be examined (Kumchoo et al., 2005).  
52  
53 Although more sensitive, specific and timesaving methods, such as techniques based on  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

polymerase chain reaction (PCR), have been developed, most aim to detect and discriminate different species of parasite eggs in stool (Sanpool et al., 2012; Sato et al., 2010; Lovis et al., 2009).

Among these PCR-based techniques, real-time PCR is the most powerful tool for small DNA template samples. This method can discriminate between 3-4 different pathogenic species, and can simultaneously evaluate amounts of DNA. Real-time quantitative PCR is also very useful in determining degrees of contamination of parasites from different sources (Basuni et al., 2011). The method has been used to detect and quantify pathogenic parasites contaminating a number of different sources, such as stool and the larvae of intermediate hosts (Basuni et al., 2011; Jarvi et al., 2012).

The present study aimed to develop an effective technique for discriminating between species of FZT (*O. viverrini*, *Haplorchis taichui*, and *H. pumilio*) that frequently co-infect the same fish intermediate host. This study also aimed to determine levels of metacercarial infection in fish, and to evaluate methods developed using conventional parasitological techniques.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection

Four species of barbs, *Barbonymus gonionotus* (silver barb), *Cyclocheilichthys enoplos* (soldier river barb), *Hampala dispar* (spotted hampala barb), and *Puntius orphoides* (red check barb) were selected among freshwater fish, because of their reportedly high prevalence of infection with FZT in endemic areas (Sithithaworn et al., 1997; Waikagul, 1998). Twenty fish of each species were collected from canals in Tambon Ban Khlong Nam Sai, Sa Kaeo Province, Thailand (Georeference coordinate 12° 35' 60"N 102° 4' 60"E) in March 2012 for detecting and determining the number of metacercariae in each fish. *H.*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

*taichui*, *H. pumilio*, and *O. viverrini* metacercariae, for optimization of real-time PCR conditions, was obtained from a sample stock collection at the Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University.

### **Compression and digestion methods**

Fish samples were preserved in ice and transported to the Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand within 5 hours. The fish were kept on ice during examination. The length and weight of each fish was recorded before the metacercaria-examination process began. Fish samples were about 15 cm in length and were < 200 g in weight. The whole body of each fish was examined using the compression method: first by grinding the body, then compressing the ground meat between thin glass plates (Sayasone et al., 1997; Vichasri et al., 1982). FZT metacercariae per fish were identified and their numbers estimated. Afterwards, each fish was digested in 1% pepsin to release metacercariae from muscle (WHO, 1995). Digested fish muscle was put on a sieve (1 mm x 0.5 mm) and washed in normal saline 3 times, until small particles flowed through the sieve holes. Normal saline containing the metacercariae was left for 15 min, then half of the solution was discarded, and all metacercariae collected from each fish. The potential inaccuracy of metacercarial recovery was considered by setting 3 replications, and the digested fish meat was found to contain 10 metacercariae. After the digestion process, the percentage of metacercariae recovered could be determined. Metacercariae recovered from each fish were identified under a stereo-microscope, and the number of metacercariae obtained from each species was counted. Metacercariae were identified based on the morphological characteristics described by Keawkes (2003) for *O. viverrini*, and Thaenkham et al. (2011) for heterophyid intestinal flukes (Keawkes, 2003; Thaenkham et al., 2011).

## Preparation of purified PCR target region for construction of standard curve

1  
2 Ten metacercariae of each parasite – *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, and *O. viverrini*  
3  
4 – were extracted using a Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan). Around 2 ng / $\mu$ l  
5  
6 (from 10 metacercariae) of genomic DNA of each species were obtained and used as DNA  
7  
8 template for preparing each PCR target region. PCR amplicons of 28S ribosomal RNA-  
9  
10 specific target were conducted using primers, as shown in Table 1. The PCR mixture (30  $\mu$ l)  
11  
12 contained TopTaq Master Mix (TopTaq DNA Polymerase, PCR buffer with 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
13  
14 and 200  $\mu$ M each dNTP), 20  $\mu$ mole of each specific primer, and 2 ng of genomic DNA from  
15  
16 each species. PCR amplification was performed by conventional PCR, consisting of 95°C for  
17  
18 3 min, followed by 34 cycles for 45 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, and 30 sec at 72°C. The final  
19  
20 extension was carried out at 72°C for 8 min. Around 185 bp PCR amplicon sizes were  
21  
22 obtained for each species, which were purified by isolating DNA-specific fragments from 1%  
23  
24 agarose gel using a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taipei City, Taiwan),  
25  
26 as per the manufacturer’s instructions. The purity of the PCR fragments was checked by  
27  
28 running on 2% agarose gel. Purified PCR products were aliquoted and sequenced by  
29  
30 BigDyeIM Terminator cycling, and run with Automatic Sequencer 3730xl (Macrogen, Seoul,  
31  
32 Korea). DNA sequences were checked manually by electropherogram comparison, using the  
33  
34 BioEdit version 7.0 program (Hall, 1999). Checked sequences were aligned with the available  
35  
36 sequences in GenBank via the BLAST program to confirm the PCR target as 28S ribosomal  
37  
38 DNA (McGinnis & Madden, 2004).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 Internal amplification control (both primers and probes for *Puntius* spp.) was  
50  
51 conducted as per the internal control system developed by Intapan et al. (2008). The probe  
52  
53 used was modified to TaqMan probe (5’ LC670-GAA GCT GCC GCC TGA TAC TGA CAC  
54  
55 TT-BBQ) using LC probe design software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).  
56  
57 Genus-specific primers for *Puntius* were used to amplify the 207-bp PCR amplicon from *P.*  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

*orphoides*. The PCR product was confirmed and analyzed by sequencing, using BLAST program and following the process described above.

### **Optimization of real-time multiplex PCR assay**

The primers and probes for *Haplorchis taichui*, *H. pumilio* and *Opisthorchis viverrini* were designed from 28S rDNA sequences by LC probe design software (Roche Applied Science) and synthesized for TaqMan based real-time PCR assay (Tib Molbiol, Berlin, Germany) (Table 1). One pair of specific primers was used for the three parasites in the same reaction. Optimal primer concentrations of the parasites studied and IAC were initially evaluated in the range 0.3-1.0  $\mu\text{M}$  with LightCycler<sup>®</sup>480 Probes Master Mix Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) containing FastStart Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix, and  $\text{MgCl}_2$ . 0.2 ng /  $\mu\text{l}$  genomic DNA from each parasite studied and from *P. orphoides* was used for amplification. The reactions were carried out in a LightCycler 420 System II using the following thermal protocol: denaturation at 95°C for 10 min, 65 cycles at 95°C for 10 sec, and 60°C for 45 sec. Primer concentration, giving a specific product without dimer formation, was selected for evaluating probe concentration. The probe concentration of each species was also evaluated in the range 0.05-0.1  $\mu\text{M}$ , with optimized PCR concentration in the same protocol. Subsequently, optimal primer and probe concentrations were determined separately, with serial 10-fold dilutions of purified PCR product of the DNA target region of each species. The number of copies of the PCR target was calculated using following the formula:  $[\text{DNA amount (ng)} \times 6.022 \times 10^{23}] / [\text{length} \times (1 \times 10^9) \times 650]$ .  $10^{-3}$ - $10^{-8}$  ng of PCR targets ( $5 \times 10^5$  –  $5 \times 10^1$  number of copies) and  $10^{-7}$  ng of IAC ( $4.5 \times 10^2$  numbers of copies) were also used for amplification with multiplex reactions, with and without the presence of IAC, to determine the presence of PCR inhibitors. Three (3) replications of each real-time PCR reaction and analysis were performed using a LightCycler 480 System II (Roche

1 Applied Science, Mannheim, Germany). Fluorescence was measured during the annealing  
2 step of each cycle at 510, 580, 610, and 660 nm for *H. taichui*, *H. pumilio*, *O. viverrini* and *P.*  
3  
4 *orphoides*, respectively. The cycle threshold (Ct) value was reported as the number of PCR  
5 cycles that could detect the amplified PCR fluorescence signal. Efficiency was calculated by  
6 plotting against the serial dilution series (refer to numbers of copies of DNA target) to create  
7 the standard curve. Standard curve estimations were performed for both single and multiple  
8 targets.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

### 19 **Real-time quantitative PCR amplification and species discrimination**

20

21 The probes shown in Table 1 tested specificity against the heterologous DNA control,  
22 which was derived from other Heterophyid intestinal flukes (*Haplorchis yokogawai*,  
23 *Procerovum varium*, *Stellantchasmus falcatus*, and *Haplorchoides* sp.) and *Clonorchis*  
24 *sinensis*. Optimized conditions were used for quantitative testing with different numbers of  
25 metacercariae of *H. taichui*, *H. pumilio*, and *O. viverrini*: from 1, 2 to 10, 11 to 20, and > 20  
26 (21 to 30) metacercariae. The genomic DNA of all the above samples was extracted using a  
27 Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd, Taipei City, Taiwan), as per the  
28 manufacturer's instructions. Afterwards, metacercariae from each fish (along with little fish  
29 flesh debris after digestion method) were extracted with a Genomic DNA Mini Kit, using the  
30 same approach. The genomic DNA of various numbers of metacercariae and genomic DNA  
31 of the pool metacercariae from each fish were processed by real-time multiplex PCR with  
32 optimized conditions. The amplification reaction mixture (20 µl) contained PCR buffer  
33 (LightCycler 480 Probe Master), 0.3 µM of each primer, 0.06 µM of each probe, and 1 µl of  
34 template DNA. Each reaction was performed together with a negative control (without DNA  
35 template) and positive control (10<sup>-6</sup> ng of purified PCR product of each parasite). To each  
36 reaction was added 10<sup>-7</sup> ng of purified PCR product of *P. orphoides* to ensure there was no  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 inhibition during the PCR reaction. Each PCR mixture reaction completed 3 replications.  
2 More than 39 in terms of Ct value, or no amplification at all, was considered a negative result.  
3  
4 In addition, reactions amplified with Ct values > 33 by IAC were considered inhibited by  
5  
6  
7 DNA extraction factors.  
8  
9

## 10 11 **Statistical analysis**

12  
13  
14 The accuracy of species discrimination, the number of metacercariae examined during  
15  
16  
17 classical and real-time PCR assays were analyzed by *Chi-square* test using SPSS software  
18  
19 (Version 18, SPSS Inc., Chicago, IL). A *P*-value < 0.05 was considered significant.  
20  
21  
22  
23

## 24 **RESULTS**

### 25 26 **Optimization of real-time PCR assay**

27  
28  
29 Standard curves of single and multiple targets for the parasites studied and IAC were  
30  
31  
32 constructed, based on optimized primer and probe concentrations. The efficiency of the real-  
33  
34 time reactions is reported in Table 2. The results indicated high sensitivity (50 copy numbers  
35  
36 of PCR target for parasites, and 45 copy numbers of PCR target for IAC) and efficiency for  
37  
38 each parasite to amplify and co-amplify in the same reaction. The Ct value obtained from  
39  
40 estimating the standard curve revealed that the sensitivity of both the single and multiplex  
41  
42 real- time PCR assays was similar. The presence and absence of IAC did not change the  
43  
44 results of the PCR assays.  
45  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 **Species discrimination and estimation of numbers of metacercariae detected with** 52 53 **median cycle threshold value**

54  
55  
56 The optimized reaction showed the specificity of the probes for *H. taichui*, *H. pumilio*  
57  
58 and *O. viverrini*. The results showed no amplification curve for heterologous DNA controls.  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

The numbers of metacercariae from the optimized reactions were then estimated for the 3 species studied, with AIC in each reaction. Single parasite metacercariae were detected at a Ct value of  $\approx 35$ . Between 2 and 10 metacercariae were detected at a Ct value of  $\approx 30$ , while between 11 and 20 metacercariae were detected at  $\approx 26$ . If the numbers of metacercariae were  $> 20$ , the Ct values detected were frequently  $> 24$  (Table 3).

### **Evaluation of potential between conventional methods and real-time PCR methods of fish examination**

In all PCR runs, the controls (negative, positive and IAC) showed an appropriate result; there was no amplification curve for negative controls, but there were for the positive controls. An amplification curve was seen in the internal amplification controls of all reactions. Table 4 shows the detection of metacercariae from 4 species of cyprinid fish, based on 3 different methods: compression; digestion, then identification using stereomicroscopy; and multiplex real-time quantitative PCR. After digestion, the metacercariae would be used to test in the real-time PCR reaction, during the digestion process, 100% of the metacercariae were recovered by testing 3 times. All metacercariae from the digestion method were amplified in the real-time PCR reaction.

The numbers of each parasite metacercaria were counted / estimated per fish. Based on the compression method, only 9% of fish were positive for *O. viverrini*, while no *Haplorchis* spp. metacercaria was seen. Based on the digestion method, 30% of the fish were positive for *O. viverrini*. A single metacercaria of *H. pumilio* was found in each of two *C. enoplos*. The numbers of metacercariae detected are shown in Table 4. By multiplex real-time quantitative PCR, the numbers of positive fish and metacercariae detected were similar to the digestion method, but differed about 16-fold in time consumed (Table 4). Comparing each

1 detection method, the results of the compression approach differed significantly from both  
2 digestion and real-time PCR ( $P \leq 0.05$ ;  $\chi^2$  test) (Table 5).  
3

## 4 **DISCUSSION**

5  
6  
7 In this study, the most effective approach for fish examination was multiplex real-time  
8 quantitative PCR method for discriminating the FZT species, *O. viverrini*, *H. taichui*, and *H.*  
9 *pumilio*. This was also used to estimate the number of metacercariae per fish. Infection with  
10 these parasites can easily occur among people who eat improperly cooked fish dishes, even  
11 though it is known to be one risk behavior for infection (Nithikethkul et al., 2004). However,  
12 the prevalence of metacercariae has reportedly been inconsistent during the year; this resulted  
13 from seasonal dependence (Noikong et al., 2011). The period from the end of the rainy season  
14 to the summer season is when, in areas of the Lower Mekong Basin, high prevalence of FZT  
15 is usually found, particularly *O. viverrini* (Noikong et al., 2011; Touch et al., 2009).  
16 Currently, the means used to examine metacercariae in fish are compression and digestion  
17 methods (Terres and Puga, 2011; WHO, 1995). In the compression method, fish muscle is  
18 compressed between two thin glass plates. Metacercariae contained in the muscle are then  
19 examined under a stereomicroscope and rough identification of species or groups of parasites  
20 is made. This method is suitable for the observation of metacercariae in field areas. However,  
21 the numbers of metacercariae can be underestimated. For the digestion method, metacercariae  
22 are separated from fish muscle before identification of the metacercariae. The advantage of  
23 this method is that all metacercariae recovered can be identified carefully under stereo- and/or  
24 light microscope. However, the limitation of this method is that it is time-consuming to  
25 identify all metacercariae accurately.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53 The advantages of multiplex real-time quantitative PCR over the two conventional  
54 methods are higher accuracy to discriminate species of metacercariae, even when there are  
55 large numbers of subjects, and speed when working manually (Table 4). This method is  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 sensitive enough to detect a metacercaria of *O. viverrini* and/or *H. taichui* / *H. pumilio* in the  
2 same reaction that contains the genomic DNA of other parasites. Based on the numbers of  
3  
4 metacercariae detected using the median cycle threshold value (Table 3), the numbers of  
5  
6 metacercariae of each parasite can be estimated more accurately when compared with the  
7  
8 results of metacercaria separation and identification using the digestion technique. However,  
9  
10 the real-time PCR method requires no special technical expertise to identify metacercariae.  
11  
12 The method developed can also be applied to examine large numbers of fish with high  
13  
14 accuracy over short periods of time.  
15  
16  
17  
18

19 The method developed was used to examine fish containing metacercariae from *O.*  
20  
21 *viverrini*-endemic areas in Sa Kaeo Province, Thailand, in March 2012. Four species of  
22  
23 cyprinoid fish with reportedly high degrees of infection were examined. It was found only *B.*  
24  
25 *gonionotus* and *C. enoplos* were infected with *O. viverrini*, at far higher levels than *H. dispar*  
26  
27 and *P. orphoides* (Table 4). The results obtained by digestion and real-time PCR methods  
28  
29 were similar. However, real-time PCR was more accurate when the numbers of metacercariae  
30  
31 were large, could contain many kinds of unknown and/or difficult to identify metacercariae,  
32  
33 and where it is difficult to separate each species manually under a stereomicroscope. Both  
34  
35 digestion and real-time PCR provided better results than the compression method (Tables 4  
36  
37 and 5). By real-time PCR, a single metacercaria of *H. pumilio* was detected in 4 *C. enoplos*,  
38  
39 while the digestion method could find a metacercaria from this species in only 2 fish.  
40  
41 However, no *Haplorchis* was found in any of the fish examined using the compression  
42  
43 method. This suggests that the number of metacercariae can be underestimated if the  
44  
45 examiner uses an inappropriate method, which, in turn, may affect the reporting of FZT  
46  
47 prevalence.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 A number of studies have successfully developed means of detecting metacercariae,  
56  
57 but they are still limited in the number of species they can detect (only one species in the PCR  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 reaction) and also in terms of their being unable to estimate large numbers of metacercariae  
2 accurately (Intapan et al., 2008; Cai et al., 2012). The advantage of the developed multiplex  
3  
4 real-time quantitative PCR over previous PCR-based methods is the increased ability of PCR  
5  
6 to detect the infective stage of *O. viverrini* and other *Haplorchis* at the same time. The new  
7  
8 method is also useful to quantify the number of infections in fish, which is important  
9  
10 information for *O. viverrini* control programs. The method developed is very expensive,  
11  
12 especially for the cost of probes labeled with fluorophores, but becomes cheap and effective  
13  
14 when it is used among larger samples, particularly during routine fish examinations. Another  
15  
16 limitation of the developed method is use of the real-time PCR operating system, which may  
17  
18 vary across different machines. Therefore, adjustment for optimizing conditions of real-time  
19  
20 PCR might be required before using the developed protocol.  
21  
22  
23  
24  
25

26 In conclusion, the multiplex real-time quantitative PCR assay developed in the present  
27  
28 study is an alternative method of detecting and quantifying numbers of metacercariae of *O.*  
29  
30 *viverrini*, *H. taichui* and *H. pumilio* in fish from endemic areas, where there is evidence of  
31  
32 parasite co-infection. The method developed may be a useful tool for detecting FZT  
33  
34 metacercariae in aquaculture fish in *O. viverrini*-endemic areas, and so contribute to the  
35  
36 effective control of opisthorchiasis.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Thailand Research Fund (TRF), Thailand (grant number MRG5380075) and the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand. Assistance with research equipment and facilities was provided by the Department of Helminthology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University. The authors thank Paul Adams and Gary Hutton for editing the English language of the manuscript.

## REFERENCES

- Chai, J.Y., Darwin, M.K., Lymbery, A.J., 2005. Fishborne parasitic zoonoses: status and issues. *Int. J. Parasitol.* 35, 1233-1254.
- Keiser, J., Utzinger, J., 2005. Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1507-1517.
- Keiser, J., Utzinger, J., 2009. Food-borne trematodiasis. *Clin. Micro. Rev.* 22, 466-483.
- Kaewpitoon, N., Kaewpitoon, S.J., Pengsaa, P., et al., 2008. *Opisthorchis viverrini*: The carcinogenic human liver fluke. *World J. Gastroenterol.* 14, 666-674.
- [IARC] World Health Organization International Agency Research on Cancer. A Review of Human Carcinogens. Volume 100. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2011. Available at: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=72&codcch=100>, accessed December 1, 2012.
- Rangsin, R., Mungthin, M., Taamasri, P., et al., 2009. Incidence and risk factors of *Opisthorchis viverrini* infections in a rural community in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 152-155.
- Lun, Z.R., Gasser, R.B., Lai, A.X., et al., 2005. Clonorchiasis: A key foodborne zoonosis in China. *Lancet Infect. Dis.* 5, 31-41.

- 1  
2 Phan, V.T., Ersboll, A.K., Nguyen, K.V., et al., 2010a. Farm-level risk factors for fishborne  
3 zoonotic trematode infection in integrated small-scale fish farms in northern Vietnam.  
4 PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e742.  
5  
6  
7 Phan, V.T., Ersbøll, A.K., Bui, T.Q., 2010b. Fish-borne zoonotic trematodes in cultured and  
8 wild-caught freshwater fish from the Red River Delta, Vietnam. Vector Borne  
9 Zoonotic Dis. 10, 861-866.  
10  
11  
12 Kumchoo, K., Wongsawad, C., Chai, J.Y., et al., 2005. High prevalence of *Haplorchis taichui*  
13 metacercariae in cyprinoid fish from Chiang Mai province, Thailand. Southeast Asia J.  
14 Trop. Med. Public Health 36, 451-455.  
15  
16  
17 Saenphet, S., Wongsawad, C., Saenphet, K., et al., 2008. The occurrence of heterophyid  
18 metacercariae in cyprinoid fish in Chiang Mai province. Southeast Asian J. Trop. Med. Public  
19 Health 39 (suppl 1), 56-61.  
20  
21  
22 [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World  
23 Fisheries and Aquaculture. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010.  
24 Available at: [www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm](http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm), accessed December 1,  
25 2012.  
26  
27  
28  
29 Johansen, M.V., Sithithaworn, P., Bergquist, R., et al., 2010. Towards improved diagnosis of  
30 zoonotic trematode infections in Southeast Asia. Adv. Parasitol. 73, 171-195.  
31  
32  
33  
34 Sanpool, O., Intapan, P.M., Thanchomnang, T., et al., 2012. Rapid detection and  
35 differentiation of *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* eggs in human fecal  
36 samples using a duplex real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and  
37 melting curve analysis. Parasitol. Res. 111, 89-96.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Lovis, L., Mak, T.K., Phongluxa, K., et al., 2009. PCR diagnosis of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* infections in Lao community in an area of endemic area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys. J. Clin. Microbiol. 47,1517-1523.
- Basuni, M., Muhi, J., Othman, N., et al.,2011. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. Am. J. Trop. Med. Hyg. 84, 338-343..
- Jarvi. S.I., Farias, M.E.M, Howe, K., et al.,2012. Quantitative PCR estimates *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm) infection levels in semi-slugs (*Paramarion martensi*). Mol. Biotech. Parasitol. 185, 174-176.
- Sithithaworn P., Pipitgool, V., Srisawangwong, T., et al., 1997. Seasonal variation of *Opisthorchis viverrini* infection in cyprinoid fish in north-east Thailand: implications for parasite control and food safety. Bull. World Health Organ. 75, 125-31.
- Waikagul, J., 1998. *Opisthorchis viverrini* metacercaria in Thai freshwater fish. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 29, 324-6.
- Keawkes, S., 2003. Taxonomy and biology of liver flukes. Acta Trop. 88,177-86
- Thaenkham, U., Phuphisut, O., Pakdee, W., et al., 2011. Rapid and simple identification of human pathogenic heterophyid intestinal fluke metacercariae by PCR-RFLP. Parasitol. Int. 60,503-6.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. Nucle. Acid. Symp. Ser. 41, 95-98.
- McGinnis, S., Madden, T.L., 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucle. Acid. Res. 32, w20-w25.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Intapan, P.M., Thanchomngang, T., Lulitanond, V., et al., 2008. Real-time fluorescence resonance energy transfer PCR with melting curve analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish intermediate hosts. *Vet. Parasitol.* 157, 65-71.
- Nithikethkul, C., Wichmann, O., Polseela, P., et al., 2004. Health behavior associated with *Opisthorchis viverrini* infection in Khukan District, Si Sa Ket Province, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 35, S309-312.
- Noikong, W., Wongsawad, C., Phalee, A., 2011. Seasonal variation of metacercariae in cyprinoid fish from Kwa Noi Bamroongdan Dam, Phitsanulok Province, northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 42,58-62.
- Touch, S., Komalamisra, C., Radomyos, P., 2009. Discovery of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in freshwater fish in southern Cambodia. *Acta Trop.* 111,108-13.
- Torres, P., Puga, S., 2011. Comparative efficacy of candling and glass plate compression for detection of diphyllobothriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) musculature. *Rev. Sci. Tech.* 30,831-7.
- Cai, X.Q., Yu, H.Q., Bai, J.S., et al., 2012. Development of a TaqMan based real-time PCR assay for detection of *Clonorchis sinensis* DNA in human stool samples and fishes. *Parasitol. Int.* 61, 183-186.

Table 1

**Table 1:** Real-time PCR primers & probes for 3 target FZTs & IAC

Target species	Probe	Sequence (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon size (bp)	Fluorophore
<i>H. taichui</i> (HM004185)	28S-F	GAAACCCAAAGGCGAAGTG	57.5	185	5'6FAM/ 3' BBQ
	28S-R	GGGTCTCAACATGTACGCTCAT	62.1		
	Taichui-P	CGGTGACGAACACCAAAAAATGTCACC	68.2		
<i>H. pumilio</i> (HM004186)	28S-F	GAAACCCAAAGGCGAAGTG	57.5	183	5'YAK/ 3' BBQ
	28S-R	GGGTCTCAACATGTACGCTCAT	62.1		
	Pumilio-P	CCGATGACGAACACTGAAGTGTCACCA	69.9		
<i>O. viverrini</i> (HM004188)	28S-F	GAAACCCAAAGGCGAAGTG	57.5	182	5'LC610/3' BBQ
	28S-R	GGGTCTCAACATGTACGCTCAT	62.1		
	Opis-P	CGATGACAAACTCTGAATAGGGTCATCACACC	72.5		
<i>P. ticto</i> (NC_008658)	PT-F	CATTTACAATTGCAGACGGAG	57.5	207	5'LC670/3' BBQ
	PT-R	CGT AAA GGA ATA GTC ATA CTA CGT C	62.5		
	IAC-P	GAAGCTGCCGCCTGATACTGACACTT	69.5		

**Table 2:** Efficiency and sensitivity of developed multiplex real-time PCR with single and multiple DNA target as described in the Methods section.

	Single target		Multiple target (without IAC)		Multiple target (with IAC)	
	Efficiency	Sensitivity (numbers of PCR copies)	Efficiency	Sensitivity (numbers of PCR copies)	Efficiency	Sensitivity (numbers of PCR copies)
<i>H. taichui</i>	99.5% $R^2 = 0.99$	50	104% $R^2 = 0.99$	50	102% $R^2 = 0.99$	50
<i>H. pumilio</i>	95.0% $R^2 = 0.99$	50	99.5% $R^2 = 0.99$	50	100% $R^2 = 0.99$	50
<i>O. viverrini</i>	99.5% $R^2 = 0.99$	50	105% $R^2 = 0.99$	50	104% $R^2 = 0.99$	50
IAC	95.0% $R^2 = 0.99$	45	n/a	n/a	99.5% $R^2 = 0.99$	45

**Table 3:** Numbers of metacercariae & median Ct values

Parasites	Numbers of metacercariae	Median Ct value
<i>H. taichui</i> , <i>H. pumilio</i> , and	1	35 (34-36)
<i>O. viverrini</i>	2-10	30 (28-33)
	11-20	26 (24-28)
	>20	≤ 24

Table 4

**Table 4:** Comparison of the detection of metacercariae from 4 species of cyprinid fish based on 3 different methods

Fish species	No. of fish	No. of metacercariae in fish (positive)											
		Compression (and identification under stereomicroscopy)				Digestion				Real-time PCR			
		<i>Ov</i>	<i>Ht</i>	<i>Hp</i>	<i>Unk</i>	<i>Ov</i>	<i>Ht</i>	<i>Hp</i>	<i>Unk</i>	<i>Ov</i>	<i>Ht</i>	<i>Hp</i>	<i>Unk</i>
<i>Barbonymus gonionotus</i>	20	0 (16)	0	0	>10 (20)	0 (9)	0	0	>10 (20)	0 (9)	0	0	n/a
		2-10 (4)				1 (6)				1 (6)			
						2-10 (5)				2-10 (4)			
										11-20 (1)			
<i>Cyclocheilichthys enoplos</i>	20	0 (15)	0	0	>10 (20)	0 (9)	0	0 (18)	>10 (20)	0 (9)	0	0 (16)	n/a
		1 (2)				1 (3)		1 (2)		1 (3)		1 (4)	
		2-10 (3)				2-10 (8)				2-10 (7)			
										11-20 (1)			
<i>Hampala dispar</i>	20	0	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	n/a
						2 (1)				2-10 (1)			
<i>Puntius orphoides</i>	20	0	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	>10 (20)	0 (19)	0	0	n/a
						2 (1)				2-10 (1)			
No. of fish positive		9	0	0	80	24		2	80	24	0	4	
% of fish positive		11.3	0	0	100	30	0	2.5	100	30	0	5	n/a
Time for manually work per 10 fish		50 min - 2.5 hrs				1 day				1.5 hrs			

**Table 5:** Statistical analysis

Examination method	<i>N</i>	Positive frequency (%)	Negative frequency (%)	<i>Chi-square</i> ( <i>df</i> )	<i>P</i> value
Compression	80	9 (11.25)	71 (88.75)	9.561 (1)	0.002
Digestion/ Real-time PCR		25 (31.25)	55 (68.75)		