

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การกระจายเชิงนิเวศวิทยา การระบุเชิงโมเลกุล และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพยาธิใบไม้ *Haplorchis taichui* และ *Haplorchoides* sp. โดยวิธี เอชเอที-อาร์เอฟดี พีซีอาร์

ผู้เขียน

นายสุษรรค์ ชูบุญ

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
(ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ชโลบล วงศ์สวัสดิ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Dr. Jong Yil Chai	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอแบบจำเพาะของพยาธิใบไม้ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. ด้วยวิธี PCR โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD และไพรเมอร์แบบคู่ความยาวขนาด 10 เบส 22 ชนิด (Operon Technologies) เพื่อทดสอบหาแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. โดยทดสอบร่วมกับตัวอย่างพยาธิชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาลักษณะของถิ่นที่อาศัยในธรรมชาติที่มีผลต่อจำนวนและการเปลี่ยนแปลงประชากรของหอยที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง ผลการทดสอบ พบว่า ไพรเมอร์ OPP-11 สามารถทำให้เกิด แถบดีเอ็นเอ ขนาด 224 bp ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิ *H. taichui* และไพรเมอร์ OPA-04 เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 341 bp ที่มีความจำเพาะกับพยาธิ *Haplorchoides* sp. หลังจากนั้นจึงนำชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ นี้เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (pGEM-T Easy vector) แล้วส่งถ่ายเข้าในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วจึงนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากข้อมูลลำดับ

นิวคลีโอไทด์ จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ที่มีความจำเพาะต่อพยาธิแต่ละชนิดที่ทำการศึกษา ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับพยาธิทั้งสองชนิดดังแสดงต่อไปนี้ (forward) HT_F (5'-AACGCGTCGGCCAACGCAAT-3') และไพรเมอร์ (reverse) HT_R (5'-AACGCGTCGGTTCGTA-3') สำหรับพยาธิ *H. taichui* โดยให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 224 bp ไพรเมอร์ HPC-F (5'-AATCGGGCTGCATATTGACCGAT-3') and HPC-R (5'-AATCGGGCTGACCAGCGTGA-3') สำหรับพยาธิ *Haplorchoides* sp. โดยมีผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาด 341 bp ตามลำดับ เมื่อนำ ไพรเมอร์แบบจำเพาะที่ออกแบบได้ ไปทดสอบกับตัวอย่างพยาธิ 10 ชนิด พบว่า สามารถเกิดแถบ ดีเอ็นเอ ขนาด 224 bp ในตัวอย่างพยาธิ *H. taichui* และ 341 bp ในตัวอย่างพยาธิ *Haplorchoides* sp. เพียงแถบเดียว และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างพยาธิชนิดอื่นๆ โดยมีเงื่อนไขในการทำพีซีอาร์เหมือนปกติ แต่ปรับอุณหภูมิในช่วง annealing เป็น 68 °C และใช้ แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.937 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ ดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่ต้องการสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ 200 พิโคกรัม เมื่อนำไพรเมอร์แบบจำเพาะ ทั้ง 2 คู่ ไปทดสอบร่วมกันในปฏิกิริยาพีซีอาร์เดียวกัน (multiplex reaction PCR) พบว่าสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 224 และ 341 bp ร่วมกันในตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอของพยาธิทั้ง 2 ชนิดปนกัน ทั้งในระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัย รวมทั้งตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอของโฮสต์กึ่งกลางที่เป็นหอย และปลารวมอยู่ด้วย ซึ่งสามารถยืนยันความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ในการศึกษาครั้งนี้

ผลการศึกษาทางนิเวศวิทยาของถิ่นที่อยู่อาศัยทั้ง 3 แบบ คือ 1) ลำธารธรรมชาติ 2) คลองชลประทาน 3) ทุ่งนา ที่มีผลต่อจำนวนประชากรของหอย *Tarebia granifera* พบว่าจำนวนประชากรของหอย *T. granifera* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.021$) โดยทในลำธารธรรมชาติ มีจำนวนหอยสูงที่สุด รองลงมาคือคลองชลประทานและทุ่งนาตามลำดับ ขณะที่คลองชลประทานและทุ่งนา ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จำนวนประชากรของหอยเฉลี่ยต่อหน่วยเวลาการเก็บ 15 นาที เท่ากับ 52.0, 22.0 และ 16.0 ตัวตามลำดับ ถิ่นที่อาศัยที่มีการติดตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียมากที่สุดคือลำธารธรรมชาติ รองลงมาคือคลองชลประทานและทุ่งนาซึ่งมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยมีค่าความชุกเท่ากับ

43.59% (68/156), 18.75% (9/66) และ 13.64% (9/48) มีค่าความชุกรวมของการติดพยาธิ จากจำนวนหอยทั้งหมด เท่ากับ 31.85% (86/270) การศึกษาครั้งนี้พบตัวอ่อนพยาธิใบไม้ ระยะเซอร์คาเรียทั้งหมด 3 types คือ pleurolophocercous cercariae, xiphidiocercous cercariae และ echinostome cercariae โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 25.56% (69/270), 9.26% (25/270) และ 3.33% (7/270) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการติดพยาธิร่วมกันระหว่าง pleurolophocercous cercariae และ xiphidiocercous cercariae โดยมีค่าความชุกเท่ากับ 5.56% (15/270) องค์ประกอบของเซอร์คาเรียที่พบในการศึกษาครั้งนี้จากจำนวนหอยที่ติด พยาธิ 86 ตัวพบว่า 62.79% (54 ตัว) ติดตัวอ่อนพยาธิใบไม้ pleurolophocercous cercariae เพียงอย่างเดียว 11.63% (10 ตัว) พบ xiphidiocercous cercariae เพียงอย่างเดียว และ 8.14% (7 ตัว) พบ echinostome cercariae เพียงอย่างเดียว ขณะที่ 17.44% (15 ตัว) พบการ ติดร่วมกันระหว่าง pleurolophocercous cercariae และ xiphidiocercous cercariae

จากผลการศึกษาที่ได้ สามารถนำไปใช้ในการติดตามตรวจสอบการระบาดของพยาธิ *H. taichui* และ *Haplorchoides* sp. ในโฮสต์กึ่งกลางได้อย่างสมบูรณ์ทั้งในหอยและในปลา และในพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิทั้ง 2 ชนิดร่วมกันโดยการทดสอบด้วย multiplex reaction PCR ซึ่งจะเป็ประโยชน์ในการวางแผนจัดการตรวจสอบ และป้องกันการระบาดของ พยาธิต่อไปได้ นอกจากนี้ ผลการศึกษาทางนิเวศวิทยาของถิ่นที่อาศัยของโฮสต์ ยังสามารถ เป็นประโยชน์ในการศึกษาและวางแผนจัดการการระบาดของพยาธิใบไม้ในลำดับต่อไป

Thesis Title Ecological Distribution, Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of Trematodes, *Haplorchis taichui* and *Haplorchoides* sp. Using HAT-RAPD PCR Method

Author Mr. Suksan Chuboon

Degree Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)

Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr.Chalobol Wongsawad	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai	Co-advisor
	Prof. Dr. Jong Yil Chai	Co-advisor

Abstract

Specific primers for the detection of minute intestinal fluke, *Haplorchis taichui* and its related species, *Haplorchoides* sp. were investigated using HAT-RAPD PCR method and 22 arbitrary primers (Operon Technologies) were used to generate the different polymorphic DNA profiles in such testing trematodes. A sensitive and specific detection of this parasite is required for better definition and epidemiological control program. Moreover, habitat preference and the availabilities of their intermediate host snails were also determined. For molecular study, the fragment of 224 base pairs generated from OPP-11 primer and the 341 base pairs produced from OPA-04 primer were seemed to be *H. taichui* and *Haplorchoides*

sp.-specific and then, they were cloned to pGEM-T Easy vector and transformed to *E. coli* for multiplication and appropriate for sequencing. From the sequence data, 2 pairs of specific primers (forward/reverses) were designed with Genetyx-MAC ver.11 software. The sequence of both primers were indicated as follows; (forward primer) HT_F (5'-AACGCGTCGGCCAACGCAAT-3') and (reverse primer) HT_R (5'-AACGCGTCGGTTCGTA-3') for *H. taichui* with expected product size of 224 bps; HPC-F (5'-AATCGGGCTGCATATTGACCGAT-3') and HPC-R (5'-AATCGGGCTGACCAGCGTGA-3') for *Haplorchoides* sp. with expected product size of 341 bp. For specifically proved, these specific primers were tested for efficacy and specific detection by applying to amplified with all 9 parasites DNA samples as described above. The result showed that, a 224 bp and 341 bp were generated as same as give positive result in only *H. taichui* and *Haplorchoides* sp. sample and there were no cross-reaction with any testing parasites. However, PCR conditions must be recommended by it should be taken at 68 °C annealing temperature and 0.937 mM magnesium chloride (MgCl₂). By the way, the minimum DNA template needed was 50 pg. These specific primers were attempted to test through multiplex PCR reaction and it was found that, 224 bp and 341 bp always generated in *H. taichui* and *Haplorchoides* sp. in both larvae and adult stages even they were mixed and including artificially spiked with host DNA. On the other hand, number of *T. granifera* snail collected in 3 different types of microhabitat, 1) natural stream 2) irrigation canal 3) paddy field were investigated to determine the effect of different microhabitat on intermediate host snail available. The result showed that there were significantly differences among number of *T. granifera* snail collected and prevalence of infection observed from each type of microhabitat ($P=0.00$) whereas no significantly different was detected between

irrigation canal and paddy field ($P>0.05$) at 95% confidence. Natural stream line represented highest number, followed by small irrigation canal and the last was from paddy field with the average number of snail collected per unit of time were 52.0, 22.0 and 16.0 respectively. Moreover, the highest prevalence of cercarial infection was also recorded from Natural stream line while paddy field and irrigation canal showed a little bit differences. The prevalence of cercarial infection observed in each microhabitat was 43.59% (68/156), 18.75% (9/66) and 13.64% (9/48) respectively. Based on infected snails, the overall prevalence observed in all habitats defined was 31.85% (86/270) and 3 cercarial types were identified; pleurolophocercous cercariae, xiphidiocercous cercariae and echinostome cercariae with the respective prevalence of 25.56% (69/270), 9.26% (25/270) and 3.33% (7/270). Mixed infection between pleurolophocercous cercariae and xiphidiocercous cercariae was also appeared with 5.56% (15/270). Moreover, the cercarial composition found in this study was also determined. Out of 86 infected snail, 54 (62.79%) were harbored with pleurolophocercous cercariae alone, 10 (11.63%) were infected with xiphidiocercous cercariae alone, 7 (8.14%) were contained with only echinostome cercariae, while 15 (17.44) were infected with both pleurolophocercous cercariae and xiphidiocercous cercariae.

The *H. taichui* and *Haplorchoides* sp.- specific primers with successfully developed in this study can be use in several applications base on epidemiological monitoring and detection in either intermediate host or definitive host which usefulness for preventing management and epidemiological control program. Furthermore, data of habitat preference obtained in this study will be useful for epidemiological study and management in further.