

Abstract

Project Code: BRG5180005

Project Title: Genetic variation and population structure studies of fish-borne trematodes for increasing control impact of opisthorchiasis and cholangiocarcinoma

Investigator: Associate Professor Jitra Waikagul

E-mail Address: tmjwk@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years

This research project aimed to investigate morphological and genetic variations, population structures, and trends in population migration and gene flow, of opisthorchiid liver flukes (OLFs), *Opisthorchis viverrini*, and heterophyid intestinal flukes (HIFs), to strengthen opisthorchiasis surveillance in endemic areas of the Greater Mekong Sub-region (GMS). The study also aimed to gather public-health information on genetic variations among *O. viverrini*, for use in analyzing the relationship between opisthorchiasis and cholangiocarcinoma (CCA). The research project was divided into 7 sub-projects: 1) OLF and HIF metacercariae distributed in the GMS, 2) *Opisthorchis lobatus* in Lao PDR, 3) Variations in *O. viverrini* metacercarial infections among cyprinid fish, 4) population-genetics study of *O. viverrini* in the lower Mekong basin, 5) population-genetics study of *Haplorchis taichui* in the GMS, 6) molecular systematics of heterophyid minute intestinal flukes in the Subfamily Haplorchiinae (Trematoda:

Heterophyidae), based on the nuclear ribosomal DNA gene and ITS2 region, 7) molecular diagnosis of OLFs and HIFs, based on ribosomal ITS region. Freshwater fish were collected in Cambodia, Lao PDR, Thailand, and Vietnam during the period 2008-2011. We determined the prevalence of OLFs and HIFs, and also discovered a new species of *Opisthorchis*, *O. lobatus*, in the Mekong Basin. Using the samples collected, we studied the population structure of *O. viverrini* and *H. taichui*, and found that different dynamics drive the population structures of these two species. In the lower Mekong Basin, the *O. viverrini* populations showed low genetic differentiation between various geographical localities, while among the *H. taichui* populations, it was high. When studying HIFs, it is very difficult to classify parasites in the Heterophyidae by morphology alone. In the current study, we used morphology related to the genetic background of the worms, to reduce disagreement among taxonomists and obviate the need for molecular identification. We also developed a diagnostic method for patients' stool samples in areas of co-infection with *O. viverrini* and HIFs. The results showed high sensitivity and specificity.

Based on these seven research studies, we published five papers in international journals and at least 2 papers are in preparation for journal submission. The study was completed in 2011; however, the results of fish collection in 2010 were unsatisfactory, due to the unpredictability of the seasons in many GMS countries, especially Thailand. Climate change seems to be having an effect on the prevalence of OLF and HIF infections, so that the periods of high parasite prevalence in fish might change. Fish in the same endemic area should be collected continually over at least 4-

5 years, to amass reliable information for the construction of a mathematical model to predict periods of high parasite prevalence in fish.

Keywords: Opisthorchiid liver flukes, Heterophyid intestinal flukes, Greater Mekong Sub-region, Prevalence, Genetic variation.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: **BRG5180005**

ชื่อโครงการ: การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของพยาธิใบไม้ติดต่อด้านปลาเพื่อเพิ่มผลสัมฤทธิ์ในวางแผนการควบคุมโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์จิตรา ไวกุล

E-mail Address: tmjwk@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแปรผันทางสัณฐานรูปร่างและพันธุกรรมโครงสร้างประชากร และแนวโน้มการแพร่กระจายยีนโดยกระบวนการยีนโฟว์ (gene flow) ของพยาธิใบไม้ตับ (opisthorchiid liver flukes; OLFs) โดยเฉพาะ *Opisthorchis viverrini* และพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (heterophyid intestinal flukes; HIFs) เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนเฝ้าระวังการแพร่กระจายของพยาธิกลุ่มเหล่านี้ในเขตลุ่มน้ำโขง จุดประสงค์ของงานวิจัยยังรวมถึงการวิเคราะห์ผลความเกี่ยวข้องสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันทางพันธุกรรมของพยาธิ *O. viverrini* กับพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อพยาธิ opisthorchiasis และ มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma; CCA) โดยงานวิจัยแบ่งเป็นทั้งหมด 7 โครงการย่อย ได้แก่ 1) การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อระยะติดต่อดังของพยาธิใบไม้ปอดและลำไส้ขนาดเล็กในปลาน้ำจืดในเขตลุ่มน้ำโขง 2) การศึกษาสัณฐานวิทยาแลพันธุกรรมของพยาธิใบไม้ตับ

Opisthorchis lobatus ที่ได้ค้นพบครั้งแรกในเขตลุ่มน้ำโขง 3) การศึกษาความแปรผันของการติดเชื้อในปลาจำพวกปลาไน้จืดจำพวก cyprinid 4) การศึกษาโครงสร้างประชากรของพยาธิใบไม้ตับในเขตลุ่มน้ำโขงตอนล่าง 5) การศึกษาโครงสร้างประชากรของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก *Haplorchis taichui* ในเขตลุ่มน้ำโขง 6) การศึกษาระเบียบวิธานของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กใน subfamily Haplorchiinae ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล 7) เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเพื่อการตรวจหาเพื่อการตรวจหาพยาธิใบไม้ติดต่อผ่านปลาในอุจจาระผู้ป่วย

ในงานวิจัยนี้ ปลาถูกเก็บจากท้องที่ในประเทศกัมพูชา ลาว ไทย และเวียดนาม ในระหว่างปี 2551 ถึง 2554 จากการเก็บตัวอย่างทำให้พบพยาธิใบไม้ตับชนิด *O. lobatus* ที่ไม่เคยมีรายงานในเขตลุ่มน้ำโขง และจากการศึกษาโครงสร้างประชากรของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* และลำไส้ขนาดเล็ก *H. taichui* ทำให้พบว่า โครงสร้างประชากรของ *O. viverrini* มีการแพร่กระจายโดยอิทธิพลจากกระบวนการ gene flow ในขณะที่โครงสร้างประชากรของ *H. taichui* มีลักษณะโครงสร้างประชากรที่มีพันธุกรรมแตกต่างชัดเจนระหว่างกลุ่มประชากรในแต่ละพื้นที่ นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษาพัฒนาองค์ความรู้ในการศึกษาระบบวิธานในกลุ่มพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก HIFs เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการปรับปรุงการศึกษาทางสัณฐานวิทยาในพยาธิกลุ่มนี้ซึ่งมีลักษณะรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกันมากและมักสร้างความสับสนแก่ผู้ศึกษาสัณฐานวิทยาอยู่เนืองๆ โครงการวิจัยยังครอบคลุมและพัฒนาเทคนิคการตรวจหาพยาธิใบไม้ติดต่อผ่านปลาในอุจจาระของผู้ป่วย ทำให้ได้เทคนิคที่สามารถตรวจการติดเชื้อในผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้น

จากงานวิจัยทั้งหมด คณะผู้วิจัยสามารถทำการตีพิมพ์ผลงานได้เป็นที่แล้วเสร็จจำนวน 5 ฉบับ ในวารสารวิชาการนานาชาติ และคาดว่าจะสามารถตีพิมพ์ผลงานต่อเนื่องได้อีกอย่างน้อย 2 ฉบับ อย่างไรก็ดี ในการทำวิจัยนี้พบปัญหาอุปสรรคในการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างจากปลาในท้องที่ โดยเฉพาะในปี 2553 ซึ่งมีปัญหาความแปรผันของสภาพภูมิอากาศและปริมาณน้ำที่ไม่สามารถคาดเดาได้ ทำให้ผลจากการศึกษาการแพร่กระจายและการติดเชื้อของพยาธิใน

ปลาที่มีความคลาดเคลื่อนไปบ้าง โดยผู้วิจัยเสนอแนะว่า เนื่องจากสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงรุนแรง การเก็บผลการติดเชื้อและแพร่กระจายของเชื้อพยาธิใบไม้ติดต่อกันปลา จำเป็นต้องทำอย่างต่อเนื่องอีก 4 ถึง 5 ปีเพื่อให้ได้ข้อมูลซึ่งเป็นประโยชน์อย่างแท้จริงในการสร้างสมการเพื่อทำนายช่วงระยะเวลาที่พยาธิมีการติดเชื้อในปลาสูงสุดและต่ำสุดหรือความชุกในการติดเชื้อเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการเฝ้าระวังการติดเชื้อในคนซึ่งไม่สามารถปรับพฤติกรรม การกินปลาดิบๆสุกๆ ได้โดยง่าย

คำหลัก: พยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiid liver flukes) พยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็ก (Heterophyid intestinal flukes) ลุ่มน้ำโขง ความชุก ความแปรผันทางพันธุกรรม