

Abstract

Project Code : MRG5480009

Project Title : Molecular diagnosis of medically important echinostomes in Thailand

Investigator : Weerachai Saijuntha

Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University

E-mail Address : weerachai.s@msu.ac.th

Project Period : May 1st 2011 – April 30th 2014

Abstract

There are several species of echinostomes that commonly infect humans in Thailand, e.g. *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma malayanum*, *Echinoparyphium recurvatum* and *Hypoderaeum conoideum*. It is difficult if not impossible to differentiate among the eggs or immature stages of echinostome species using morphological characters. The variety of DNA sequences have been used effectively to differentiate among echinostome species. Thus this study aims to develop species specific primer for differential diagnosis of those four medically important echinostomes by multiplex PCR technique. The specific reverse primers of each species were designed from the variable regions of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1 gene. All four reverse primers together with a forward primer were used to amplify ND1 fragment. Specificity was tested with others pathogenic helminths, protozoa and bacteria available in the laboratory. Sensitivity of each primer was also evaluated. The different PCR product sizes, namely 108, 209, 387 and 417 bp were amplified by species specific primer of *E. revolutum*, *H. conoideum*, *E. recurvatum* and *E. malayanum*, respectively. No cross amplification between each species was observed. The specificity and sensitivity of each primer was very high at 100% and 0.1 to 0.05 ng, respectively. The assay system could detect each of a single echinostome egg in 100 mg of normal human feces for *E. revolutum* and *H. conoideum*, whereas *E. malayanum* could detect of two eggs. The species specific primers developed in this study could be consequently developed and used for potentially differential diagnosis of human echinostomiasis in Southeast Asia. Moreover, this multiplex PCR diagnosis could be fruitfully applied for epidemiology study in wild and domestic animals.

Keywords: echinostomes, multiplex PCR, NADH dehydrogenase subunit 1, genetic differentiation

บทคัดย่อ

(รหัสโครงการ) : MRG5480009

ชื่อโครงการ : การตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ลำไส้ echinostomes ที่มีความสำคัญ
ทางการแพทย์ในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย : วีระชัย สายจันทา

สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

E-mail Address : weerachai.s@msu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 พฤษภาคม 2555 – 30 เมษายน 2557

บทคัดย่อ:

จากรายงานการติดเชื้อพยาธิ echinostomes ในคนมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดที่พบในประเทศไทย เช่น *Echinostoma malayanum*, *Echinostoma revolutum*, *Echinoparyphium recurvatum* และ *Hypoderaeum conoideum* ซึ่งการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อพยาธิกลุ่มนี้ คือการเจาะระยะไข่ ในอุจจาระของผู้ป่วย ไข่ของพยาธิกลุ่มนี้จะมีลักษณะคล้ายกันมาก ไม่สามารถใช้จำแนกชนิดได้ อย่างไรก็ตามพบมีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพยาธิ echinostomes แต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาการตรวจจำแนกด้วยวิธี multiplex PCR โดยทำการออกแบบ reverse primer ให้จำเพาะกับพยาธิ echinostomes ทั้ง 4 ชนิด โดยอาศัยตำแหน่งที่มีแตกต่างกันในพยาธิแต่ละชนิดของยีน NADH dehydrogenase subunit 1 เป็นตัวกำหนด ทำการทดสอบหาความจำเพาะของ primer กับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ ทั้งหนอนพยาธิ โปรโตซัวและแบคทีเรีย รวมทั้งทำการทดสอบความไวด้วย ผลการศึกษาพบว่า การทำ multiplex PCR จะให้ผลผลิต PCR ขนาดต่างๆ กัน ได้แก่ *E. revolutum* มีขนาด 108 คู่เบส *H. conoideum* มีขนาด 209 คู่เบส *E. recurvatum* มีขนาด 378 คู่เบส และ *E. malayanum* มีขนาด 417 คู่เบส ผลการทดสอบความจำเพาะพบว่า primer มีความจำเพาะสูงร้อยละ 100 และมีความไวในการเพิ่มจำนวนปริมาณ DNA ตั้งต้นที่ 0.1 ถึง 0.05 นาโนกรัม และยังสามารถตรวจสอบไข่พยาธิที่เติมไปในตัวอย่างอุจจาระ 100 กรัม ได้ในจำนวนเพียง 1 ไข่ ของพยาธิ *E. revolutum* และ *H. conoideum* ส่วนพยาธิ *E. malayanum* นั้นจะตรวจได้จำนวนตั้งแต่ 2 ไข่ขึ้นไป เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจจำแนกการติดเชื้อพยาธิ echinostomes ในเขตพื้นที่การระบาดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ยิ่งไปกว่านั้น ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิกลุ่มนี้ทั้งในสัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยง

คำหลัก: พยาธิใบไม้ลำไส้เอคโคโนสโตม, มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์, ไมโทคอนเดรียลเอ็นเอดีเอชดีไฮโดรจีเนส, การจำแนกทางพันธุกรรม