



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ลำไส้ echinostomes ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ใน
ประเทศไทย

Molecular diagnosis of medically important echinostomes in Thailand

โดย

ผศ.ดร.วีระชัย สายจันทา

เมษายน 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ลำไส้ echinostomes ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในประเทศไทย

Molecular diagnosis of medically important echinostomes in Thailand

คณะผู้วิจัย

- | | |
|------------------------------|-------------------|
| 1. ผศ.ดร.วีระชัย สายจันทา* | หัวหน้าโครงการ |
| 2. รศ.ดร.ไพบุลย์ สิทธิถาวร** | นักวิจัยที่ปรึกษา |

* สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

**ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำขอขอบคุณ

โครงการ “การตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลของพยาธิใบไม้ลำไส้ echinostomes ที่มีความสำคัญทาง การแพทย์ในประเทศไทย” ได้รับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ 2554 (สัญญาเลขที่ MRG5480009) สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพบุลย์ สิทธิถาวร ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ทำหน้าที่อาจารย์ที่ปรึกษา โครงการวิจัยชิ้นนี้และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ สถานที่และงบประมาณบางส่วนสำหรับงานวิจัย รวมทั้งให้ถึง คำปรึกษาแนะนำในการทำงานวิจัยชิ้นนี้จนบรรลุผลสำเร็จ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ Prof. Ross H Andrews ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ภาควิชา ปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, Dr. Trevor N Petney, Institute of Zoology 1: Ecology and Parasitology, Universtiy Karlsruhe และ ผศ.ดร.ชัยรัตน์ ตันทรวัดน์พันธ์ สาขาเซลล์วิทยา สถานวิทยาาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ช่วยกรุณาให้คำแนะนำในการ เขียนและแก้ไขบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.กัญญารัตน์ เตือนหงาย ดร.อัญชลี เตชะเสน และคุณสมณทา เทพดารา ที่ ช่วยเหลือในการสำรวจและเก็บตัวอย่างพยาธิ echinostomes สำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับสถานที่และเครื่องมือใน การทำวิจัย และสุดท้ายขอขอบคุณผู้ที่เกี่ยวข้องทั้งหมดที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้บรรลุผลสำเร็จตามเป้าหมาย

ผศ.ดร.วีระชัย สายจันทา
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
เมษายน 2557

สารบรรณ

	หน้า
สารบรรณ	i
รายชื่อตาราง	ii
รายชื่อรูปภาพ	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
บทคัดย่อภาษาไทย	v
1. Executive summary	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. วิธีทดลอง	
3.1 การเก็บตัวอย่างพยาธิ	2
3.2 การออกแบบ primer	3
3.3 การสกัด DNA และเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยวิธี multiplex PCR	4
3.4 การทดสอบความไวและความจำเพาะของ primer	4
4. ผลการทดลอง	
4.1 การทำ multiplex PCR	5
4.2 ความจำเพาะของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR	5
4.3 ความไวของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR	6
4.4 การทดสอบกับตัวอย่างอุจจาระผสมไข่	6
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	7
เอกสารอ้างอิง	9
Output การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการและผลงานตีพิมพ์	11
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก : Abstract และโปสเตอร์จากการนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ	14
ภาคผนวก ข : เอกสารผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ	19

รายชื่อตาราง

ตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงลำดับ oligonucleotide ของ primer แต่ละเส้น

3

รายชื่อรูปภาพ

รูปภาพ	หน้า
รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งบนยีน ND1 ที่ใช้ในการออกแบบ primer ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยวิธี PCR	3
รูปที่ 2 ผลการทดสอบ primer ด้วยวิธี multiplex PCR โดยการผสม DNA ของพยาธิ echinostomes ชนิดต่างๆ	5
รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบความไวของ primer กับพยาธิ echinostomes ชนิดต่างๆ	6
รูปที่ 4 แสดงผลการทดสอบ primer กับ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างอุจจาระ ที่มีการเติมไข่พยาธิ echinostomes ชนิดต่างๆ	7

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 ในคนมียูด้วยกันหลายชนิดที่พบในประเทศไทย 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

1. Executive summary

โรค Echinostomiasis เกิดจากการติดเชื้อพยาธิ *Echinostoma* spp. รวมทั้งพยาธิชนิดอื่นๆ ในกลุ่มว่าพยาธิ echinostomes ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ในลำไส้ที่มีการกระจายทั่วโลกมากกว่า 60 ชนิด โดยจะเป็นปรสิตของสัตว์ปีก สัตว์ฟันแทะ และสัตว์เลี้ยงลูก ด้วยนมชนิดต่างๆ รวมทั้งของคนด้วย (Sorensen et al., 1998) โดยมีพยาธิ echinostome กว่า 20 ชนิด ที่สามารถติดเชื้อในคนได้ (Chai, 2009) มีรายงานพบติดเชื้อในคนไทยจำนวน 6 ชนิด ซึ่ง 4 ชนิดเป็นพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดกลาง ได้แก่ *Echinostoma ilocanum*, *Echinostoma malayanum*, *Echinostoma revolutum* และ *Hypoderaeum conoideum* และอีก 2 ชนิดเป็นพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดเล็ก ได้แก่ *Echinochasmus japonicus* และ *Episthmium caninum* (Graczyk and Fried, 1998) มีรายงานการติดเชื้อพยาธิ echinostomes ในประเทศไทยตั้งแต่ปี 1969 โดยพบว่ามีอัตราการติดเชื้อในประชากรภาคเหนือกว่าร้อยละ 50 (Sornmani, 1969) และต่อมาอัตราการติดเชื้อลดลงไปเหลือเพียงร้อยละ 0.7 (Radomyos et al., 1998) อย่างไรก็ตามยังพบอัตราการติดเชื้อสูงอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบถึงร้อยละ 15 (Radomyos et al., 1994)

พยาธิ echinostomes มีระยะติดต่อ (metacercaria) อยู่ในหอยน้ำจืดหลายชนิด เช่น หอยโข่ง (*Pila* spp.) หอยเชอรี่ (*Pomacea* spp.) หอยขม (*Filopaludina* spp. และ *Viviparus* spp.) หอยชนิด *Gyraulus* spp. หอยคันชนิด *Indoplanorbis* spp. และ หอยคันชนิด *Lymnaea* spp. เป็นต้น รวมทั้งลูกออดและปลาน้ำจืดเกล็ดขาวบางชนิด (Huffman and Fried, 1990; Graczyk and Fried, 1998) ซึ่งเมื่อคนรับประทานสัตว์เหล่านั้นโดยที่ไม่ปรุงให้สุกดีก่อน ก็จะได้รับระยะติดต่อของพยาธิ echinostomes เข้าไป (Carney, 1991; Chai et al., 2005) และพยาธิจะไปเจริญเติบโตในลำไส้และสามารถทำลายชั้น mucosa ของลำไส้ ทำให้เกิดแผลและการอักเสบตรงบริเวณลำไส้ที่พยาธิเกาะอยู่ ทำให้เกิดพยาธิสภาพหลายอย่างตามมา โดยทั่วไปมักมีอาการปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ โลหิตจาง น้ำหนักลด ซึ่งอาการจะสัมพันธ์กับปริมาณการติดเชื้อ (Graczyk and Fried, 1998; Chai et al., 2009)

อย่างไรก็ตาม พยาธิ echinostomes จำนวนมากที่พบว่ามีรูปร่างลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน ยากต่อการจำแนก ยิ่งไปกว่าการเรียกชื่อพยาธิชนิดเดียวกันก็ยังมีสับสนและไม่ชัดเจน (Kostadinova et al., 2003) สำหรับการจำแนกชนิดของพยาธิกลุ่มนี้ในปัจจุบันยังใช้การดูจำนวนและการจัดเรียงตัวของ collar spines และรูปร่างของ testes ของพยาธิตัวเต็มวัย แต่ระยะที่ใช้ในการวินิจฉัยสำหรับการติดเชื้อพยาธินี้คือระยะไข่ที่ปนเปื้อนออกมาจากอุจจาระของผู้ป่วย ซึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดของพยาธิได้ เนื่องจากไข่พยาธิกลุ่ม echinostomes มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นหากตรวจพบไข่ในอุจจาระ ก็จะรายงานได้เพียงว่าเป็นไข่ของพยาธิกลุ่ม echinostomes ยิ่งไปกว่าไข่ของพยาธิ echinostomes ยังมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับพยาธิใบไม้ในลำไส้ขนาดใหญ่ *Fasciolopsis buski* และพยาธิใบไม้ตับวัวควาย *Fasciola* spp. เพื่อเป็นการช่วยให้การตรวจวินิจฉัยและจำแนกการติดเชื้อพยาธิ echinostomes มีความถูกต้อง

แม่นยำมากยิ่งขึ้น จึงจำเป็นที่ยังต้องมีการพัฒนาเทคนิคทางโมเลกุลที่สามารถนำไปใช้ตรวจจำแนกพยาธิกลุ่มนี้ได้อย่างจำเพาะและมีความไวสูง

รายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ายีน NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) ในไมโทคอนเดรีย นั้น สามารถที่จะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการจัดจำแนกและตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kostadinova et al., 2003; Detwiler et al., 2010) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะทำการพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกพยาธิ echinostomes โดยการออกแบบ primer เพื่อใช้เพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีน ND1 ด้วยวิธี multiplex PCR ให้มีความไวและความจำเพาะสูง เพื่อที่จะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาทั้งทางด้านการตรวจวินิจฉัย และระบาดวิทยาของพยาธิกลุ่มนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อทำการตรวจจำแนกพยาธิใบไม้ลำไส้ echinostomes ที่มีความสำคัญทางการแพทย์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma malayanum*, *Hypoderaeum conoideum* และ *Echinoparyphium recurvatum* โดยทำการออกแบบ primer ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีน ND1 ของพยาธิ echinostomes ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี multiplex PCR ให้มีความจำเพาะและความไวสูง

3. วิธีทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่างพยาธิ

3.1 การเก็บตัวอย่างพยาธิ

ทำการเก็บตัวอย่างพยาธิ echinostomes ระยะตัวเต็มวัย จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma ilocanum*, *Echinostoma malayanum*, *Hypoderaeum conoideum* และ *Echinoparyphium recurvatum* โดยทำการเก็บตัวแก่พยาธิชนิด *E. revolutum*, *H. conoideum* และ *E. recurvatum* จากลำไส้เปิด โดยติดต่อขอซื้อลำไส้เปิดจากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย เพื่อนำมาหาตัวแก่ของพยาธิทั้ง 3 ชนิด ส่วนตัวแก่ของพยาธิ *E. ilocanum* และ *E. malayanum* จะทำการเก็บจากลำไส้หนูนา อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างพยาธิ *E. ilocanum* จากลำไส้หนูนาได้ จึงยังไม่สามารถทดสอบพยาธิชนิดนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้

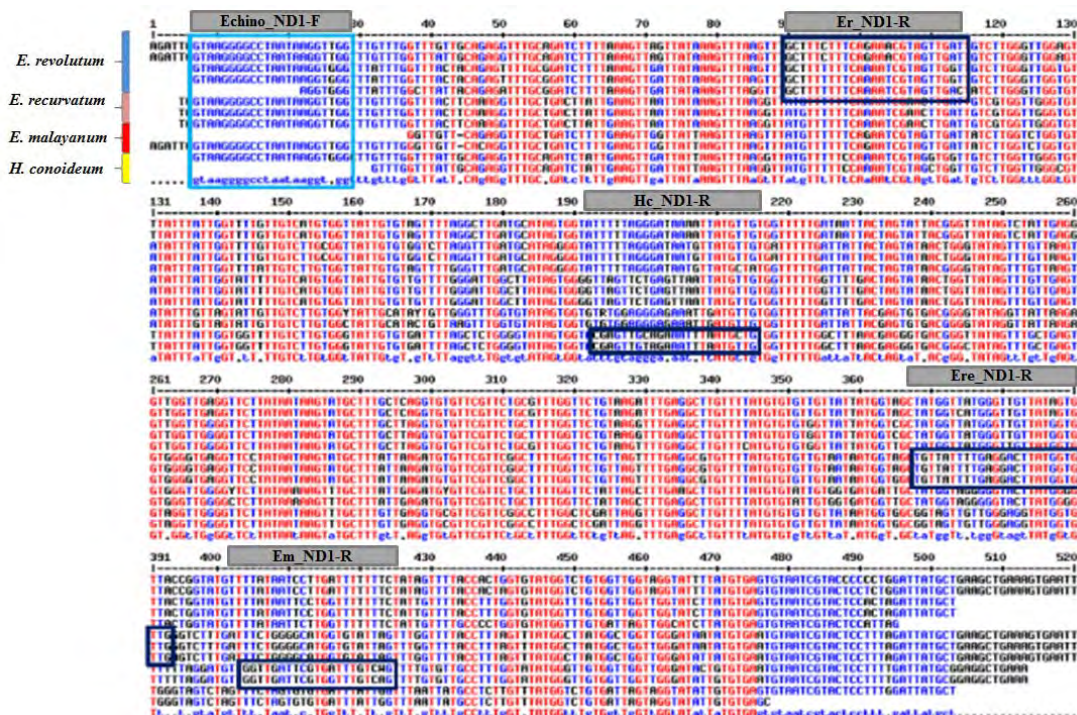
การเก็บไข่พยาธิเพื่อนำไปผสมในอุจจาระผู้ป่วย ทำได้โดย นำพยาธิตัวเต็มวัยมาฉีกได้ กล้องจุลทรรศน์ ใช้ pasture pipette ปลายแหลม ดูดไข่ให้ได้จำนวนตามที่ต้องการแล้วเก็บในหลอด microtube เติมน้ำเกลือให้ท่วม แล้วเก็บไว้ใน -20°C จนกว่าจะใช้

3.2 การออกแบบ primer

ทำการออกแบบ primer โดยการนำ DNA sequences ของพยาธิ echinostomes ที่ต้องการศึกษาในครั้งนี้ มาทำการเปรียบเทียบ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW เพื่อหาตำแหน่งที่แตกต่างกันและจำเพาะกับพยาธิแต่ละชนิด โดยการศึกษาครั้งนี้ เลือกที่จะใช้ ยีน NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) ในไมโทคอนเดรีย เป็นเครื่องหมายในการใช้ ตรวจจำแนกพยาธิ echinostomes เนื่องจากเป็นยีนที่พบว่ามีความแปรปรวนค่อนข้างสูงใน พยาธิกลุ่มนี้ จึงสามารถทำให้เลือกตำแหน่งที่จะใช้ออกแบบ primer ที่จำเพาะกับพยาธิ echinostomes แต่ละชนิด สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยวิธี PCR โดยตำแหน่งที่ใช้ ออกแบบ primer จำเพาะต่อพยาธิ echinosotmes ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และรูปภาพที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับ oligonucleotide ของ primer แต่ละเส้น

Primer code	Nucleotides sequence (5' → 3')
Echino_ND1-F	GTAAGGGGCCTAATAAGGTGGG
Er_ND1-R	ACCAACTACGTTTCTGAAAGAAA
Hc_ND1-R	CAGCATTAAATTTCTGCAACTCG
Ere_ND1-R	CAACATAAGTCCTCAAATAACA
Em_ND1-R	CTGACAAACCACGAATCAACC



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งบนยีน ND1 ที่ใช้ในการออกแบบ primer สำหรับเทคนิค multiplex PCR

3.3 การสกัด DNA และเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยวิธี multiplex PCR

ทำการสกัด DNA จากพยาธิ echinostomes ระยะตัวเต็มวัย ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ พยาธิ *E. malayanum*, *E. revolutum*, *E. recurvatum* และ *H. conoideum* โดยทำการสกัด DNA ตามขั้นตอนการแนะนำของชุด DNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) ในกรณีที่ป็นตัวอย่างอุจจาระ จะใช้อุจจาระปริมาตร 100 กรัม และเติมไข่พยาธิที่เตรียมไว้ใส่ไปตามจำนวนที่ต้องการ แล้วทำการสกัด DNA โดยใช้ชุด QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) เมื่อได้ genomic DNA แล้ว จะนำไปใช้เป็น DNA template ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน ND1 ด้วยเครื่อง PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) โดยใช้ primer ที่ออกแบบไว้ในข้อ 3.2

ทำส่วนผสมของ PCR (PCR mixture) ในปริมาตร reaction ละ 20 µl ซึ่งประกอบด้วย น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 13.375 µl, 10X Ex buffer ปริมาตร 2.5 µl, 10 µM dNTPs ปริมาตร 0.5 µl, forward primer (Echino_ND1-F) ความเข้มข้น 10 pM ปริมาตร 1 µl, reverse primers 4 เส้น ได้แก่ Er_ND1-R, Hc_ND1-R, Ere_ND1-R และ Em_ND1-R ที่มีความเข้มข้น 10 pM ปริมาตรอย่างละ 0.5 µl และ Ex Taq polymerase (Takara, Japan) ความเข้มข้น 5 U/µl ปริมาตร 0.125 µl และใช้ DNA template ความเข้มข้นตามที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 µl

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน ND1 โดยใช้ PCR condition เริ่มด้วย 94°C เป็นเวลา 4 นาที ก่อนแล้วตามด้วยอีก 35 รอบ; 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 59°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย 72°C นาน 5 นาที ซึ่งจะได้ PCR product ของพยาธิ echinostomes ขนาดต่างกัน

3.4 การทดสอบความไวและความจำเพาะของ primer

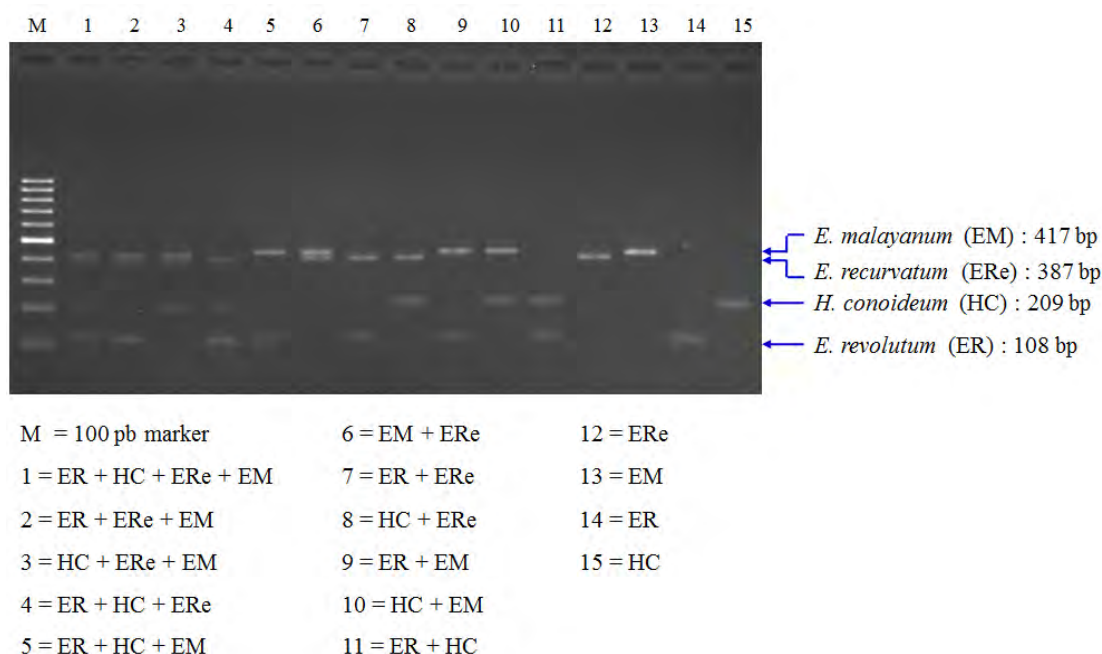
ทำการทดสอบหาความไวของ primer แต่ละคู่โดยการเจือจาง DNA เริ่มต้นในการทำ PCR เพื่อหาปริมาณน้อยที่สุดที่ primer แต่ละคู่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนชิ้นยีน ND1 ได้นอกจากนี้ยังทำการสกัด DNA จากไข่ของพยาธิ echinostomes แต่ละชนิด ที่ใส่ลงไปให้อูจจาระ ทำให้เปรียบเสมือนเป็นอุจจาระของผู้ติดเชื้อจริง โดยทำการใส่ไข่ลงไปจำนวนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 10, 8, 4, 2 และ 1 ไข่ แล้วทำการสกัด DNA เพื่อนำไปทดสอบหาความไวของ primer แต่ละคู่ กับตัวอย่างอุจจาระติดเชื้อเสมือนจริง

นำ primer แต่ละคู่ที่ทำการออกแบบให้จำเพาะกับพยาธิ echinostomes แต่ละชนิด ไปทดสอบหาความจำเพาะโดยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา PCR ข้าม (cross reaction) ระหว่างพยาธิ echinostomes ทั้ง 4 ชนิด รวมทั้งทดสอบกับหนอนพยาธิ โปรโตซัว และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สามารถตรวจเจอไข่หรือตัวอ่อนในอุจจาระ และมี DNA ที่สกัดและเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการแล้ว

4. ผลการทดลอง

4.1 การทำ multiplex PCR

จากการผสม primer ทุกเส้น (multiplex) ลงในส่วนผสมเพื่อทำ PCR (PCR mixture) โดยทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีน ND1 ของพยาธิ echinostome แต่ละชนิด รวมทั้ง DNA ที่ทำการผสมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งผลการทดสอบพบว่า primer ที่ออกแบบให้จำเพาะกับพยาธิ echinostomes แต่ละชนิด สามารถเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ได้ ผลผลิต PCR (PCR product) ที่มีขนาดแตกต่างกันดังนี้ *E. revolutum* ขนาด 108 bp, *H. conoideum* ขนาด 209 bp, *E. recurvatum* ขนาด 387 bp และ *E. malayanum* ขนาด 417 bp และผลการผสม DNA ตั้งแต่ 2 ชนิด ขึ้นไป ก็สามารถเพิ่มจำนวนและขนาดของ PCR product ได้อย่างจำเพาะและไม่พบการเกิดปฏิกิริยา PCR ข้ามระหว่างพยาธิ echinostomes ทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในรูปภาพที่ 2



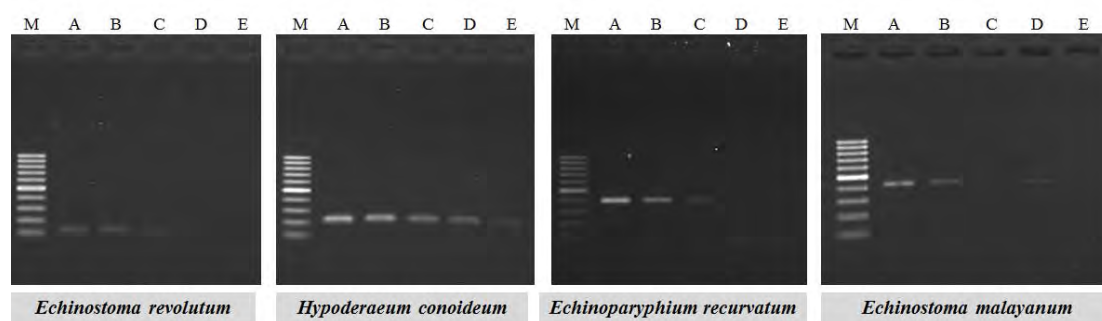
ภาพที่ 2 ผลการทดสอบ primer ด้วยวิธี multiplex PCR โดยการผสม DNA ของพยาธิ echinostomes ชนิดต่างๆ

4.2 ความจำเพาะของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer กับ DNA ของพยาธิชนิดต่างๆ ที่พบมีรายงานการระบาดในประเทศไทยดังนี้ พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*, *Fasciola* sp., *Paragonimus* sp., *Haplochis* sp., *Schistosoma* sp., พยาธิเม็ดและตัวกลมชนิดต่างๆ ได้แก่ *Taenia* spp., *strongyloides* และ hookworm รวมทั้งโปรโตซัวและแบคทีเรีย ได้แก่ *Entamoeba* sp., และ *E. coli* ผลการทดสอบ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยา PCR ข้ามระหว่าง primer ที่ออกแบบในการศึกษาครั้งนี้ กับพยาธิและโปรโตซัวหรือแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้

4.3 ความไวของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR

จากการทดสอบความไวโดยการเจือจาง DNA ที่สกัดได้จากพยาธิตัวเต็มวัย ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ 5, 1, 0.5, 0.1 และ 0.05 นาโนกรัม (ng) แล้วทำการทดสอบกับ primer ที่จำเพาะกับพยาธิแต่ละชนิด พบว่า primer แต่ละชนิดให้ความไวอยู่ในช่วงระหว่าง 0.1 – 0.05 ng โดย Hc_ND1-R สามารถเพิ่มจำนวนยีน ND1 ของพยาธิ *H. conodieu* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ความเข้มข้นของ DNA ต่ำสุดที่ 0.05 ng ขณะที่ primer Er_ND1-R, Em_ND1-R และ Ere_ND1-R สามารถเพิ่มจำนวนยีน ND1 ของ *E. revolutum*, *E. malayanum* และ *E. recurvatum* ตามลำดับ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.1 นาโนกรัม ดังแสดงในภาพที่ 3

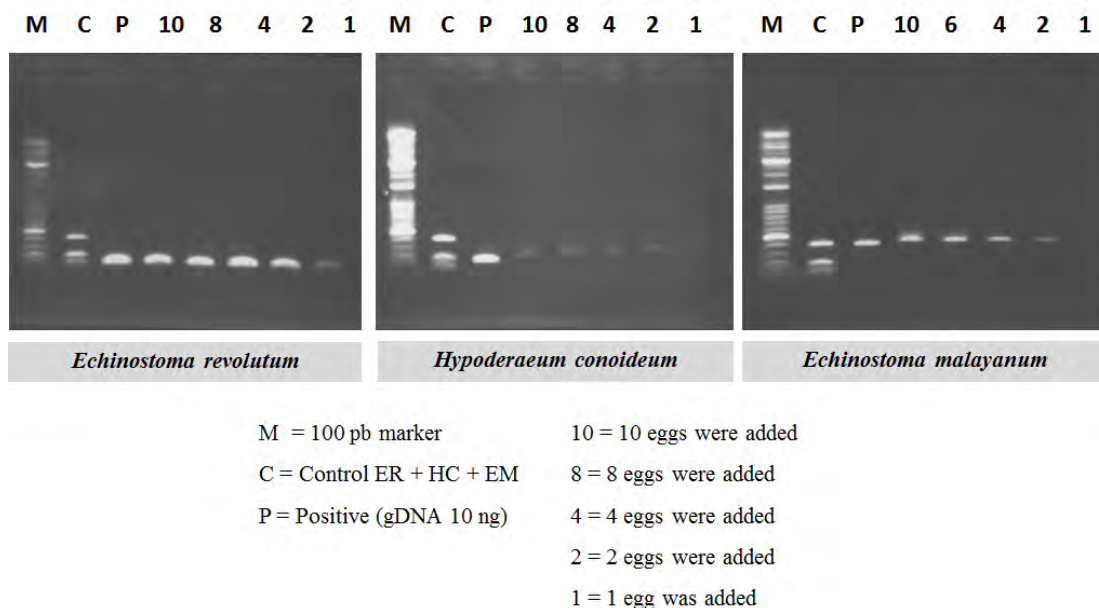


M = 100 bp marker, A = 5 ng, B = 1 ng, C = 0.5 ng, D = 0.1 ng, E = 0.05 ng

ภาพที่ 3 แสดงผลการทดสอบความไวของ primer กับพยาธิ echinostomes ชนิดต่างๆ

4.4 การทดสอบกับตัวอย่างอุจจาระผสมไข่

เนื่องจากยังไม่สามารถหาตัวอย่างอุจจาระของผู้ติดเชื้อจริงได้ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการผสมไข่พยาธิเข้าไปในอุจจาระ เสมือนอุจจาระของผู้ติดเชื้อจริง โดยเติมไข่ในจำนวนที่แตกต่างกันลงในอุจจาระปริมาตร 100 กรัม โดยใช้จำนวนไข่ 10, 8, 4, 2, และ 1 ไข่ แล้วทำการสกัด DNA จากอุจจาระนั้น เพื่อทดสอบความสามารถของ primer ในการเพิ่มจำนวนยีน ND1 จาก DNA ของไข่พยาธิที่อยู่ในตัวอย่างอุจจาระนั้น ผลการทดสอบพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนยีน DNA ในตัวอย่างที่เติมไข่พยาธิเข้าไปจำนวนอย่างน้อย 2 ถึง 1 ไข่ ดังแสดงในภาพที่ 4 อย่างไรก็ตาม การทดสอบการผสมไข่กับอุจจาระนั้น ไม่ได้ทำการทดสอบกับพยาธิ *E. recurvatum* เนื่องจากไม่สามารถเก็บไข่ของพยาธิชนิดนี้ได้



ภาพที่ 4 แสดงผลการทดสอบ primer กับ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างอุจจาระที่มีการเติมไข
พยาธิ echistomes ชนิดต่างๆ

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถออกแบบ primer ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้น DNA ของยีน ND1 ของพยาธิใบไม้ลำไส้ echinostomes ที่เคยมีรายงานการติดเชื้อในคนในเขตทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทยจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *E. malayanum*, *E. revolutum*, *E. recurvatum* และ *H. conoideum* ได้อย่างจำเพาะและมีความไวค่อนข้างสูง โดยสามารถตรวจจำแนกพยาธิได้โดยใช้ DNA ทั้งจากระยะตัวเต็มวัยและไข่ จากผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถที่จะนำ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะกับพยาธิ echinostomes เหล่านี้ ไปประยุกต์ในการจำแนกพยาธิ echinostomes ทั้งจากระยะอ่อนที่อวัยวะที่ใช้ในการจำแนกยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้จากลักษณะทางภายนอกได้ เช่นในรายงานการศึกษาที่ผ่านมา ต้องทำการจำแนกชนิดของพยาธิ echinostomes โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลเข้ามาช่วย ได้แก่ DNA sequencing หรือเทคนิค multilocus enzyme electrophoresis (Saijuntha et al., 2010; 2011; 2013) ซึ่งต้องใช้เวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ยกตัวอย่างการศึกษาการระบาดของพยาธิ echinostomes ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ 3 ชนิด ได้แก่ *E. revolutum*, *E. recurvatum* และ *H. conoideum* ที่ติดเชื้อในเปิดในประเทศไทย (Saijuntha et al., 2013) พบพยาธิหลายตัวที่ไม่สามารถทำการจำแนกชนิดด้วยสัณฐานภายนอกได้ จึงต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำแนกชนิดพยาธิ echinostomes ได้ โดยเทคนิค DNA sequencing เข้ามาช่วย แต่หากใช้ primer ที่ออกแบบได้จากการศึกษาครั้งนี้ น่าจะช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายลงได้อย่างมาก ดังนั้นหากนำเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นจากการศึกษานี้ ไปใช้ในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของพยาธิ echinostomes ที่มีความสำคัญทางการแพทย์เหล่านี้ ทั้งในคน สัตว์ที่เป็นพาหะกัก

เก็บโรค หรือโฮสต์ตัวกลาง จะช่วยให้ทำการศึกษาได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงขึ้นและทำให้ได้ผลการศึกษาที่ถูกต้องและแม่นยำสูงขึ้นด้วย

ยิ่งไปกว่านั้น เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นจากการศึกษาค้างนี้ สามารถใช้ในการตรวจจำแนกโดยใช้ DNA สกัดจากระยะไข่ของพยาธิที่ถูกเติมเข้าไปในอุจจาระ ทำให้เปรียบเสมือนตัวอย่างของผู้ติดเชื้อจริง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในอนาคตสามารถที่จะประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ ในการตรวจจำแนกชนิดของพยาธิ echinostomes ที่ติดเชื้อในคนได้ด้วยเช่นกัน ถึงแม้การติดเชื้อพยาธิกลุ่มนี้ จะให้ยาในการรักษาที่เหมือนกัน ไม่จำเป็นต้องจำแนกชนิดสำหรับการให้ยารักษา แต่ถ้าหากต้องการข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาของพยาธิแต่ละชนิดในคนนั้น จำเป็นจะต้องให้ยาถ่ายเอาพยาธิตัวเต็มวัยมาย้อมสีดูสัณฐานเพื่อจำแนกชนิด แต่จากการศึกษานี้ สามารถที่จะทำการจำแนกชนิดจาก DNA ของไข่ของพยาธิ โดยเทคนิค multiplex PCR ได้เช่นกัน

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะมีการรายงานอัตราการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ในคนไทยค่อนข้างต่ำ (Radomyos et al., 1994, 1998) แต่พบการติดเชื้อทั้งในสัตว์ป่า สัตว์เลี้ยง และโฮสต์พาหะตัวกลางอยู่เป็นจำนวนมาก (Huffman and Fried, 1990; Graczyk and Fried, 1998) เช่น รายงานการติดเชื้อพยาธิ echinostomes ในเป็ดในประเทศไทย พบมีอัตราการติดเชื้อสูงมากกว่าร้อยละ 50 (Saijuntha et al., 2013) ดังนั้น นอกจากจะประยุกต์เทคนิค multiplex PCR ในการตรวจจำแนกในคนแล้ว ยังน่าจะสามารถที่จะพัฒนาและประยุกต์เทคนิคนี้ ไปใช้ในการตรวจจำแนกการติดเชื้อพยาธิ echinostomes ในสัตว์ชนิดต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน ดังนั้น ในอนาคต เพื่อการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นจากการศึกษาค้างนี้ ควรทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระของทั้งคนและสัตว์ที่ตรวจพบการติดเชื้อจากการตรวจพบไข่ในอุจจาระ นำมาตรวจจำแนกชนิดด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ต่อไป

นอกจากนี้ ยังมีระยะไข่ของพยาธิชนิดอื่นๆ ที่ติดเชื้อในคนและมีสัณฐานของไข่คล้ายๆ กับพยาธิ echinostomes ด้วยเหมือนกัน เช่น พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* spp. พยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดใหญ่ *Fasciolopsis buski* หรือแม้แต่พยาธิใบไม้ปอด *Paragonimus* spp. ดังนั้น ควรทำการวิจัยต่อยอด เพื่อการตรวจจำแนกระหว่างพยาธิ echinostomes และพยาธิชนิดอื่นๆ เหล่านี้ โดยใช้เทคนิค multiplex PCR หรือเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ ได้ด้วยเหมือนกัน

เอกสารอ้างอิง

- Carney, W.P., 1991. Echinostomiasis - a snail-borne intestinal trematode zoonosis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 22, 206–211.
- Chai, J.Y., Murrell, K.D., Lymbery, A.J., 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. Int. J. Parasitol. 35, 1233-1254.
- Chai, J.Y., 2009. Echinostomes in humans in Toledo R. and Fried B. The Biology of Echinostomes: from the Molecular to the Community, Springer, New York.
- Chai, J.Y., Shin, E.H., Lee, S.H., Rim, H.J., 2009. Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia. Korean J. Parasitol. 47, S69-S102.
- Detwiler, J.T., Bos, D.H., Minchella, D.J., 2010. Revealing the secret lives of cryptic species: Examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. Mol. Phylogenet. Evol. First online, doi: 10.1016/j.ympev.2010.01.004.
- Graczyk, T.K., Fried, B., 1998. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, 501-504.
- Huffman, J.E., Fried, B., 1990. *Echinostoma* and echinostomiasis. Adv. Parasitol. 29, 215-269.
- Kostadinova, A., Herniou, E.A., Barrett, J., Littlewood, D.T., 2003. Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. Syst. Parasitol. 54, 159-176.
- Radomyos, P., Radomyos, B., Tungtrongchitr, A., 1994. Multi-infection with helminths in adults from northeast Thailand as determined by posttreatment fecal examination of adult worms. Trop. Med. Parasitol. 45, 133-135.
- Radomyos, B., Wongsaroj, T., Wilairatana, P., Radomyos, P., Praevanich, R., Meesomboon, V., Jongsuksuntikul, P., 1998. Opisthorchiasis and intestinal fluke infections in northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 29, 123-127.
- Saijuntha, W., Sithithaworn, P., Andrews, R.H., 2010. Genetic differentiation of *Echinostoma revolutum* and *Hypodereium conoideum* from domestic ducks in Thailand by multilocus enzyme electrophoresis. J. Helminthol. 84, 143-148.
- Saijuntha, W., Sithithaworn, P., Duengyai, K., Kiatsopit, N., Andrews, R.H., Petney, T.N., 2011. Genetic variation and relationships of four species of medically

- important echinostomes (Trematoda: Echinostomatidae) in South-East Asia. *Infect. Genet. Evol.* 11, 375-381.
- Saijuntha, W., Duenngai, K., Tantrawatpan, C., 2013. Zoonotic echinostome infections in free-grazing ducks in Thailand. *The Korean journal of parasitology.* 51, 663-667.
- Sorensen, R.E., Curtis, J., Minchella, D.J., 1998. Intraspecific variation in the rDNA its loci of 37-collar-spined echinostomes from North America: implications for sequence-based diagnoses and phylogenetics. *J. Parasitol.* 84, 992-997.
- Sornmani, S., 1969. Echinostomiasis in Thailand: a review. *Proceedings of the Fourth Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine: Schistosomiasis and Other Snail Transmitted Heminthiases.* *Southeast Asian J. Trop. Med. Hyg.* 1, 171–175.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 Tantrawatpan C., **Saijuntha W.**, Sithithaworn P., Andrews R.H., Petney T.N. (2013) Genetic differentiation of *Artyfechinostomum malayanum* and *A. sufrartylfex* (Trematoda: Echinostomatidae) based on the internal transcribed spacer sequences. *Parasitology Research* 112(1): 437-441.

1.2 **Saijuntha W.**, Deunngai K., Tantrawatpan C. (2013) Zoonotic echinostome infection in free-grazing ducks in Thailand. *Korean Journal of Parasitology* 51(6): 663-667.

1.3 Tantrawatpan C., **Saijuntha W.** (2013) Multiplex PCR for differential diagnosis of four medically important echinostomes in Southeast Asia. *Tropical Medicine & International Health* 18(Suppl 1): 174-174.

1.4 **Saijuntha W.**, Tantrawatpan C. (2013) Genetic structure of Southeast Asian *Echinostoma revolutum* based on mitochondrial CO1 sequence. *Tropical Medicine & International Health* 18(Suppl 1): 174-174.

1.5 **Saijuntha W.**, Jarilla B., Leonardo A.K., Sunico L.S., Leonardo L.R., Andrews R.H., Sithithaworn P., Petney T.N., Kirinoki M., Kato-Hayashi N., Kikuchi M., Chigusa Y., Agatsuma T. (2014) Genetic structure inferred from mitochondrial 12S rRNA sequence of *Oncomelania quadrasi*, the intermediate snail host of *Schistosoma japonicum* in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Public Health* 90(6): 1140-1145.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 ได้นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการ โดยใช้วิธีและขั้นตอนการทำวิจัยไปพัฒนาการเรียนการสอนในชั่วโมงปฏิบัติการและผลการวิจัยประกอบการบรรยายในรายวิชา “เทคนิคทางโมเลกุลสำหรับศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากร” ของหลักสูตรระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2.2 สร้างเครือข่ายความร่วมมือการทำวิจัยทางด้าน “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ หนอนพยาธิที่มีความสำคัญทางการแพทย์และหอยตัวกลาง” กับ Professor Takeshi Agatsuma ณ Kochi Medical School ประเทศญี่ปุ่น

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

3.1 นำเสนอโปสเตอร์ในการประชุม Joint International Tropical Medicine Meeting 2011 จัดประชุมเมื่อวันที่ 1 – 2 ธันวาคม 2554 ณ โรงแรม Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในหัวข้อเรื่อง “Molecular identification and infection rate of medically important echinostomes in free-grazing duck populations in Thailand”

3.2 นำเสนอโปสเตอร์ในการประชุม 8th European Congress on Tropical Medicine and International Health & 5th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology จัดประชุมเมื่อวันที่ 10-13 กันยายน 2556 ณ เมืองโคเปนเฮเกน ประเทศเดนมาร์ก จำนวน 2 หัวข้อ ได้แก่ “Multiplex PCR for differential diagnosis of four medically important echinostomes in Southeast Asia” และ “Genetic structure of Southeast Asian *Echinostoma revolutum* based on mitochondrial CO1 sequence”

3.3 นำเสนอโปสเตอร์ในการประชุม Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 จัดประชุมเมื่อวันที่ 12 – 14 ธันวาคม 2555 ณ โรงแรม Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในหัวข้อเรื่อง “Genetic structure of *Oncomelania hupensis*, the snail intermediate host of *Schistosoma japonicum*”

3.4 นำเสนอโปสเตอร์ในการประชุม Joint International Tropical Medicine Meeting 2013 จัดประชุมเมื่อวันที่ 11 – 13 ธันวาคม 2556 ณ โรงแรม Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ในหัวข้อเรื่อง “Evidence of a species complex and genetic structure of Southeast Asian *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR”

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Abstract และโปสเตอร์จากการนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Abstracts of the 8th ECTMIH and 5th CSBSP

intermittent fever, right upper quadrant abdominal pain, undefined lesions in liver, high eosinophilia (43.7%) and high activity of alkaline phosphatase (174 U/l). Our patient had a 3-months history of disease progression without a reliable diagnosis. We performed detailed diagnostic re-evaluation. Abdominal US showed a homogeneous liver of normal size, with no visible focal changes. Two enlarged periportal hilar lymph nodes with hypoechoic appearance were detected. Abdominal CT showed hypodense clustered lesions in a periphery of the right lobe of the liver and enlarged retroperitoneal lymph nodes. Based on clinical picture, abdominal sonography and CT findings, haematological and biochemical parameters and repeated investigation of liver biopsy she was appointed as suspected to the acute fasciolosis. Stool and duodenal aspirate exams were negative for *Fasciola* ova. In the absence of adequate serologic diagnostic for fasciolosis in Serbia, the diagnosis was confirmed using enzyme immunoassays and immunoblot at the Institute for Tropical Diseases in Hamburg. Soon after triclabendazole was administered, the symptoms disappeared and biochemical values returned to normal. **CONCLUSION** The diagnosis of human fasciolosis may be problematic and delayed, especially in non endemic areas, because physicians rarely encounter this disease and a long list of other diseases must be considered in the differential diagnosis. Unclear history does not rule out fasciolosis.

P.1.12.005 (B)

Multiplex PCR for differential diagnosis of four medically important echinostomes in Southeast AsiaC. Tantrawatpan¹ and W. Saijuntha²

¹Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani, Thailand; ²Walailak Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand

INTRODUCTION There are four species of echinostomes that commonly infect humans in Southeast Asia, namely *Echinostoma malayanum*, *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma ilocanum* 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. **MATERIALS AND METHODS** 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 fragments. Specificity was tested with others pathogenic helminths, protozoa and bacteria available in the laboratory. Sensitivity of each primer was also evaluated. **RESULT** The different PCR product sizes, namely 108, 209, 387 and 417 bp were amplified by species specific primer of *E. revolutum*, *H. conoideum*, *E. ilocanum*, 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 10^{-6} to 10^{-8} ng, respectively. When combined all primers together for mPCR reaction, sensitivity of primer to amplify *E. revolutum* was reduced to 10^{-4} ng. The assay system could detect each of a single echinostome egg in 100 mg of normal human feces. **CONCLUSION** The species specific primers developed in this study could be consequently 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.

This research was supported by TRF-CHE (grant no. MRG5480009 to Weerachai Saijuntha).

P.1.12.006 (B)

Genetic structure of Southeast Asian *Echinostoma revolutum* based on mitochondrial COI sequenceW. Saijuntha¹ and C. Tantrawatpan²

¹Walailak Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand; ²Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani, Thailand

INTRODUCTION *Echinostoma revolutum* is a foodborne zoonotic intestinal trematode, causative agents of human echinostomiasis and distributed worldwide. It is a member of the '37-collar-spined' or the 'revolutum' group. This group is a morphospecies and is considered to be a species complex. Previous molecular studies have demonstrated a high level of genetic diversity within a species, *E. revolutum*. Then this study aim to explore the genetic structure of *E. revolutum* in Southeast Asia and also compare to the American and European strain. **MATERIALS AND METHODS** Totals of 41 adult *E. revolutum* from Thailand and Lao PDR were collected from domestic ducks. Partial sequence of cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene was sequenced. Phylogenetic tree and haplotype network were constructed by Phylip and the Network program, respectively. Genetic structure parameters were calculated based by using Arlequin program.

RESULT The 28 variable positions of COI sequence were observed when compare among *E. revolutum* from Southeast Asia. The 11, 14 and one haplotypes of Southeast Asian, American and European strain were subsequently classified, respectively. Three genetic structure groups were demonstrated. Of these, the first group consists of four haplotypes of Southeast Asian strain and closely related with the second group of 14 haplotypes of American strain. The third group consists of seven haplotypes of Southeast Asian strain, which was clustered together with a haplotype of European strain.

CONCLUSION At least three genetic structure groups of *E. revolutum* have been distinguished. Of these, the Southeast Asian strains were classified into two distinct groups. This finding highlight the need for further analyses of intraspecific variation based on molecular and morphological evidence of *E. revolutum* for more understanding of their genetic relationships and genetic structure.

This research was supported by TRF-CHE (grant no. MRG5480009 to Weerachai Saijuntha).

Multiplex PCR for Differential Diagnosis of Four Medically Important Echinostomes in Southeast Asia



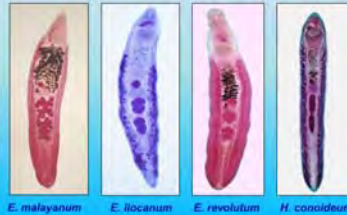
Chairat Tantrawatpan^a, Weerachai Saijuntha^b

^a Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand
^b Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand



1. Introduction

There are four species of echinostomes that commonly infect humans in Southeast Asia, namely *Echinostoma malayanum*, *Echinostoma ilocanum* and *Hypoderaeum conoideum*. It is difficult if not impossible to differentiate among the eggs or immature stages of echinostome species using morphological characters. The molecular technique is an alternative method to potentially differentiate those echinostome species.



Thus this study aims to develop species specific primers for differential diagnosis of those four medically important echinostomes by multiplex PCR (mPCR) technique.



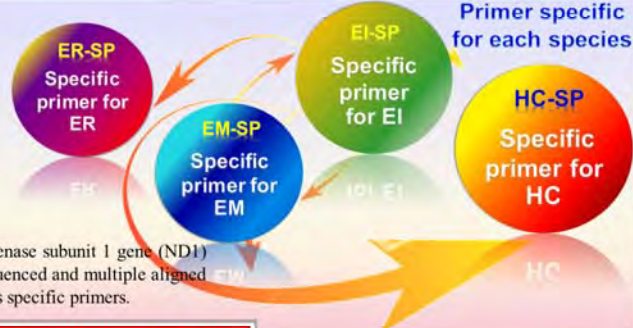
Sources of human infection



2. Materials & methods



◆ NADH dehydrogenase subunit 1 gene (ND1) of all species are sequenced and multiple aligned for design the species specific primers.



3. Results

◆ The different PCR product sizes, namely 108, 209, 387 and 417 bp were amplified by species specific primer of *E. revolutum*, *H. conoideum*, *E. ilocanum*, and *E. malayanum*, respectively.

◆ No cross amplification between each echinostome species was observed when multiplex PCR was analysed by combined all species specific primers (Fig. 1).

Multiplex PCR of four species specific primers



Fig. 1 Analysis of combined species specific primer by multiplex PCR

◆ No cross amplification between each species specific primer with other pathogenic agents, e.g. *O. viverrini*, *O. felinus*, *C. sinensis*, *Fasciola* spp., *Paragonimus* spp., *Haplochis* spp., *Prosthodendrium* spp., *Schistosoma* spp., *Taenia* spp., *Hymenolepis* spp., *Escherichia coli* and *Entamoeba histolytica*.

◆ Sensitivity of each primer to amplify gDNA of each echinostome species was 0.1 ng for ER, 0.05 ng for EM, 0.5 ng for EI and 0.1 ng for HC (Fig. 2).

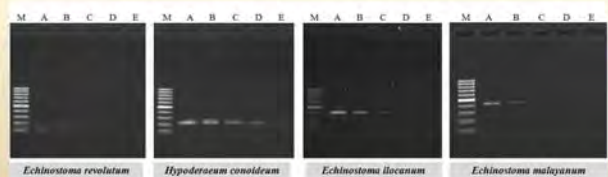


Fig. 2 Sensitivity test of each species specific primer

◆ The specific reverse primers of each species were designed from the variable regions of ND1 sequences.

◆ All species specific primers was tested for specificity with others pathogenic helminths, protozoa and bacteria available in laboratory.

◆ Sensitivity of all specific primers were tested by diluted genomic DNA of each species ranged from 5 – 0.5 ng.

◆ Multiplex PCR (mPCR) was analysed by combination all species specific primers to amplify mixed gDNA of each echinostome.

4. Conclusion

◆ According to the sensitivity and specificity of echinostome species specific primers developed in this study could be consequently used for potentially differential diagnosis of human echinostomiasis in Southeast Asia by mPCR.

◆ The mPCR method could be used for further application of molecular epidemiology of these medically important echinostomes infection in wild and domestic animals.

◆ Moreover, the mPCR will be consequently developed for differential diagnosis between these four medically important echinostomes and other trematodes like egg, i.e. *Paragonimus* spp., *Fasciola* spp. and *Fasciolopsis* spp.

Acknowledgements

This research was supported by TRF-CHE-MSU (grant no. MRG5480009).

Genetic Structure of Southeast Asian *Echinostoma revolutum* based on Mitochondrial CO1 Sequence

Weerachai Saijuntha^a, Chairat Tantrawatpan^b

^a Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

^b Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani 12120, Thailand

Introduction

★ *Echinostoma revolutum* is a foodborne zoonotic intestinal trematode, causative agents of human echinostomiasis and distributed worldwide. It is a member of the "37-collar-spined" or the "*revolutum*" group. This group is a morphospecies and is considered to be a species complex. Previous molecular studies have demonstrated a high level of genetic diversity within a species, *E. revolutum*.



★ The variation of some characteristic is observed, e.g. testes shape of adult worms recovered from ducks almost have multi-lobed shape testes (A), whereas some adult worms recovered from human has oval shape testes (B).

★ This study aims to explore the genetic structure of *E. revolutum* in Southeast Asia and also compare to the American and European strains.

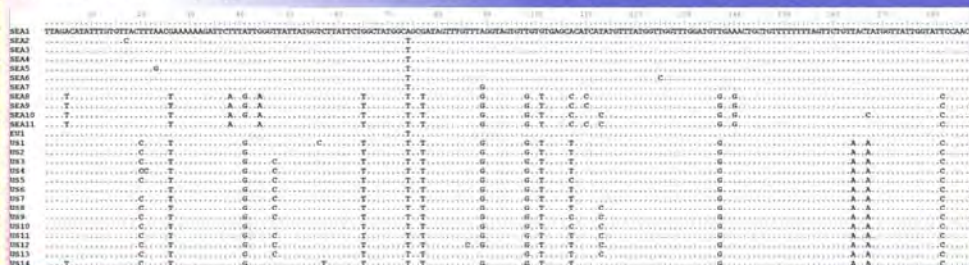
Materials and Methods

★ Totals of 41 adult *E. revolutum* from Thailand and Lao PDR were collected from domestic ducks.

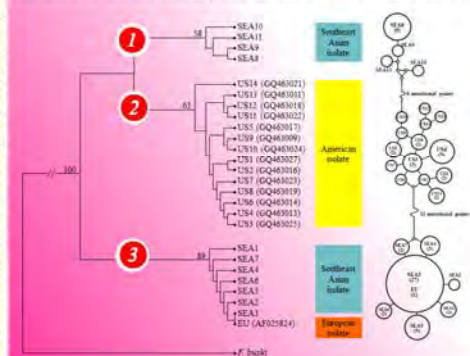


★ Partial sequence of cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) gene was sequenced. Phylogenetic tree and haplotype network were constructed by Phylip and the Network program, respectively. Genetic structure parameters were calculated based by using DnaSp and Arlequin program.

Results ★ The 28 variable positions of CO1 sequence were observed among *E. revolutum* from Southeast Asia. The 11, 14 and one haplotypes of Southeast Asian, American and European strains, respectively were classified.



★ Three genetic structure groups were demonstrated. Of these, the first group consists of four haplotypes of Southeast Asian strain and closely related with the second group of 14 haplotypes of American strain. The third group consists of seven haplotypes of Southeast Asian, which was clustered together with a haplotype of European strain.



Discussion and Conclusion

★ At least three genetic structure groups of *E. revolutum* have been distinguished. Of these, the Southeast Asian strain was classified into two distinct groups and genetically distinct from the American isolates. Then this observation probably suggested that *E. revolutum* from Southeast Asia and America may be different species.

★ This finding highlight the need for further analyses of intraspecific variation based on molecular markers and morphological evidence of *E. revolutum* for more understanding of their genetic relationships and structure.

Acknowledgements This research was supported by TRF-CHE-MSU grant no. MRG5480009 and Mahasarakham University.

Molecular identification and infection rate of medically important echinostomes in free-grazing duck populations in Thailand



WEERACHAI SAIJUNTHA¹, CHAIRAT TANTRAWATPAN²

¹ Walailak Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Maha Sarakham

² Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani



1. INTRODUCTION Nowadays, free-grazing ducks are the common domestic animal in Thailand, especially in the wetlands used for double-crop rice production in central and northeast regions, where the free-grazing duck can feed year round in rice paddies. These ducks are released on paddy fields after harvest, feed on leftover rice grains, wild rice, insects, and aquatic animals. Additionally, the variety of intermediate hosts of echinostomes were found in the rice field paddy, namely tadpoles, pond snails and small freshwater fishes. All of those animals are act as the 1st and 2nd intermediate hosts, which some of them is edible aquatic animals and contained infective stage of echinostomes. Although, these free-grazing ducks in Thailand are frequent movements of flocks in rice paddy field by translocation car that may play an important role in the life cycle maintenance and transmission of medically important echinostomes to human in Thailand.



2. OBJECTIVES

To survey the infection rate and identify species molecularly of medically important echinostomes, namely *Echinostoma revolutum*, *Hypoderaeum conoideum* and *Echinoparyphium recurvatum*, which naturally infected in the 13 free-grazing duck populations from 11 Provinces in north, central and northeast regions of Thailand.

3. MATERIALS AND METHODS

4. RESULTS

A population of free-grazing duck in Sukhothai Province



3.1 SAMPLE COLLECTION

The 76 ducks were collected from north, central and northeast regions of Thailand as the following table.

Code	No.	District	Province	Region
STn	5	Mueang	Sukhothai	North
STk	5	Kang Krathai	Sukhothai	North
PL	2	Mueang	Phitsanulok	North
PI	5	Buang Na Rang	Phichit	North
NW	5	Takli	Nakhon Sawan	Central
LB	5	Ban Mi	Lop Buri	Central
AV	5	Bang Ban	Ayutthaya	Central
PT	8	Khlong Luang	Pathum Thani	Central
NMc	5	Kham Thale So	Nakhon Ratchasima	North-East
NMc	5	Chum Phuang	Nakhon Ratchasima	North-East
KK	13	Mueang	Khon Kaen	North-East
MS	7	Mueang	Maha Sarakham	North-East
RE	8	Changhan	Buri E	North-East

The duck intestines were removed for searching the adult echinostomes.

3.2 SPECIES IDENTIFICATION

The species of all recovered adult worms were morphologically identified according to published key (Yamaguti, 1971).

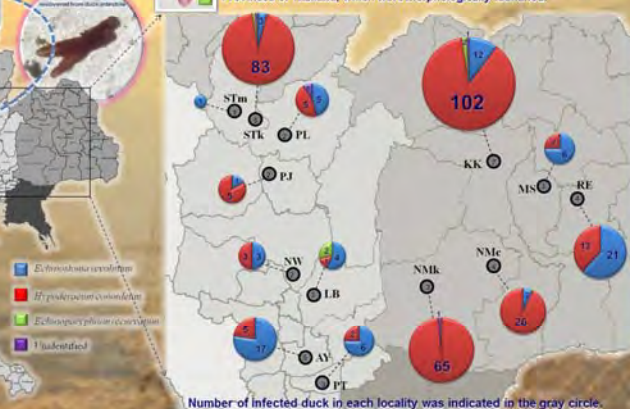
Several adult echinostomes that species identifiable by morphology and all species unidentifiable worms were consequent genetically identified by using partial sequence of 28S rRNA gene.



The recent survey found that rate of the medically important echinostomes infection in free-grazing duck populations in Thailand is relatively high, between 20–100%.

The intensity of echinostomes infection in individual duck was ranged between 1–72 worms/duck.

A map showed surveyed localities and number of each species of echinostomes infection in 13 populations of free-grazing duck from 11 Provinces of Thailand, which were morphologically identified.



The most common infections are *E. revolutum* and *H. conoideum*.

The partial sequences of 28S rRNA gene showed 6–28 (1–5%) nucleotide differences interspecifically, which could be potentially used to differentiate the three medically important echinostomes properly.

5. DISCUSSION AND CONCLUSION

These free-grazing ducks seem to be the important reservoir hosts of the medically important echinostomes, which high infection rate was observed in many regions.

The duck flocks have been moved frequently to many rice paddy fields. This appears to be the main reason why echinostomes were widespread and heavily infection in free-grazing duck populations in Thailand.

There are many second intermediate hosts, e.g. golden apple snails and tadpole, which may be contained the infective stage and can be transmitted to human by some partial cooked dish.



Source of human infection

Acknowledgements



Evidence of a Species Complex and Genetic Structure of Southeast Asian *Echinostoma revolutum* (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR



Weerachai Saijuntha^a, Chairat Tantrawatpan^b

^a Walailak Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Mahasarakham

^b Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani



Introduction

★ *Echinostoma revolutum* is a foodborne zoonotic intestinal trematode, causative agents of human echinostomiasis and distributed worldwide. It is a member of the "37-collar-spined" or the "revolutum" group. This group is a morphospecies and is considered to be a species complex. Previous molecular studies have demonstrated a high level of genetic diversity within a species of *E. revolutum*.



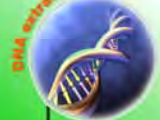
★ The variation of some characteristic is observed, e.g. testes shape of adult worms recovered from ducks almost have multi-lobed shape testes (A), whereas some adult worms recovered from human has oval shape testes (B).

★ This study aims to explore the genetic structure of *E. revolutum* in Southeast Asia and also compare to the American and European isolates.

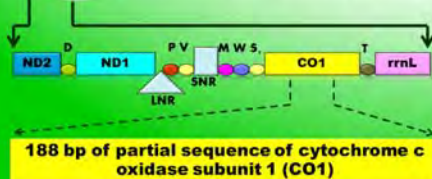
Materials and methods

★ Totals of 41 adult *E. revolutum* from Thailand and Lao PDR were collected from domestic ducks.

★ Partial sequence, 188 bp of cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) gene was sequenced. Phylogenetic tree and haplotype network were constructed by Phyip and the Network program, respectively. Genetic differentiation and genetic structure were calculated by Arlequin program.



★ CO1 sequences of the American and European isolates were retrieved from GenBank database.



Results

★ The 28 variable positions of CO1 sequence were observed among *E. revolutum* from Southeast Asia. The 11, 14 and one haplotypes of Southeast Asian, American and European isolates, respectively were classified.

★ Three genetic structure groups were demonstrated. Of these, group 1 [1] consists of four haplotypes of Southeast Asian isolates and closely related with group 2 [2] of 14 haplotypes of American isolates. Whereas group 3 [3] consists of seven haplotypes from Southeast Asia, which was clustered together with a haplotype of European isolate.

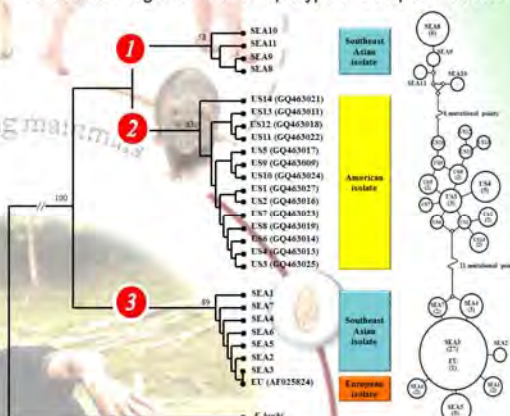


Figure showed phylogenetic tree and haplotype network of *E. revolutum* constructed from CO1 sequence.

★ High genetic differentiation among three genetic groups was observed. Group 1 vs 2 was significantly differed at $F_{ST} = 0.740$ ($P < 0.0001$), group 1 vs 3 was differed with an $F_{ST} = 0.528$ ($P < 0.0001$), and group 2 vs 3 was differed with an $F_{ST} = 0.850$ ($P < 0.0001$).

Discussion and Conclusion

★ At least three genetic structure groups of *E. revolutum* have been distinguished. Of these, the Southeast Asian isolate was classified into two distinct groups and genetically distinct from the American isolates. Then this observation strongly suggested that *E. revolutum* from Southeast Asia and America is cryptic species and there is a species complex within the Southeast Asian populations also.

★ This finding highlight the need for further analyses of intraspecific variation based on molecular markers and morphological evidence of *E. revolutum* for more understanding of their genetic relationships and structure.

Acknowledgements TRF-CHE-MSU and Thammasat University

ภาคผนวก ข
เอกสารผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

Genetic differentiation of *Artyfechinostomum malayanum* and *A. sufrartylfex* (Trematoda: Echinostomatidae) based on internal transcribed spacer sequences

Chairat Tantrawatpan · Weerachai Saijuntha ·
 Paiboon Sithithaworn · Ross H. Andrews ·
 Trevor N. Petney

Received: 17 July 2012 / Accepted: 24 July 2012 / Published online: 16 August 2012
 © Springer-Verlag 2012

Abstract Genetic differentiation between two synonymous echinostomes species, *Artyfechinostomum malayanum* and *Artyfechinostomum sufrartylfex* was determined by using the first and second internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2), the non-coding region of rDNA as genetic makers. Of the 699 bp of combined ITS1 and ITS2 sequences examined, 18 variable nucleotide positions (2.58 %) were observed. Of these, 17 positions could be used as diagnostic position between these two sibling species, whereas the

other one variation was intraspecific variation of *A. malayanum*. A clade of *A. malayanum* was closely aligned with *A. sufrartylfex* and clearly distance from the cluster of other echinostomes. Our results may sufficiently suggest that the current synonymy of these species is not valid.

Introduction

The genus *Artyfechinostomum* comprises intestinal and zoonotic food-borne trematodes. *Artyfechinostomum* spp. have a small head collar ranging between 39 and 45 collar spines arranged in two alternating rows along the dorsal side, two deeply lobed testes, and a large, long cirrus sac reaching beyond the ventral sucker (Premvati and Pande 1974). In Thailand, the first intermediate hosts of these parasites are the freshwater snails *Indoplanorbis exustus* and *Gyraulus convexiusculus* (Waikagul 1991; Radomyos et al. 1994). There is a broader second intermediate host range including a wide variety of aquatic animals, such as lymnaeid snails, *Pila* spp., *Pomacea* spp., and tadpoles (Huffman and Fried 1990; Waikagul 1991; Radomyos et al. 1994; Saijuntha et al. 2011a). Reservoirs of this parasite include many domesticated and wild mammals, and essentially all aquatic organisms that are the first and the second intermediate hosts in a particular endemic area (Huffman and Fried 1990).

A. malayanum was first described from a human in Malaysia under the name *Echinostoma malayanum* Leiper 1911 (Beaver et al. 1984), subsequently being reported from Singapore, Thailand, Indonesia, India, and the Philippines (Chai et al. 2009). More recently, *E. malayanum* is now considered to be a synonym of *A. malayanum* (Chai et al. 2009). A closely related species, *Artyfechinostomum sufrartylfex* is endemic in India (Chai et al. 2009) and has recently been reported from southern Vietnam (Ha Duy et al. 2011). There are several previous reports suggesting that *A.*

C. Tantrawatpan
 Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences,
 Faculty of Medicine, Thammasat University,
 Rangsit Campus,
 Pathum Thani 12121, Thailand

W. Saijuntha (✉)
 Walai Rukhvej Botanical Research Institute (WRBRI),
 Mahasarakham University,
 Maha Sarakham 44150, Thailand
 e-mail: weerachai.s@msu.ac.th

C. Tantrawatpan
 Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases,
 Khon Kaen University,
 Khon Kaen 40002, Thailand

P. Sithithaworn · R. H. Andrews
 Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
 Khon Kaen University,
 Khon Kaen 40002, Thailand

P. Sithithaworn
 Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center (LFCRC),
 Faculty of Medicine, Khon Kaen University,
 Khon Kaen 40002, Thailand

T. N. Petney
 Department of Ecology and Parasitology,
 Karlsruhe Institute of Technology,
 Komblumen Strasse 13,
 Karlsruhe, Germany

malayanum Leiper 1911 is synonymous with *A. sufraryfex* Lane 1915 (Lie 1963; Mukherjee and Ghosh 1968; Chai et al. 2009). However, more recent work shows that *A. malayanum* fits more closely to the generic features and is possibly conspecific with *A. sufraryfex* (Kostadinova et al. 2002). Moreover, *A. malayanum* (as *E. malayanum*) does not form a monophyletic clade with other species in the genus *Echinostoma*, i.e., *Echinostoma revolutum*, conforming to the new generic placement (Saijuntha et al. 2011a).

Several previous reports have shown that the genetic variation in echinostomes is correlated not only with geographical localities, but also that intermediate and/or reservoir hosts may influence the biological and genetic variation of these parasites (Maldonado et al. 2005; Saijuntha et al. 2011a). Moreover, Saijuntha et al. (2011a) showed that intraspecific variation in *A. malayanum* is associated with the snail and rodent host species based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequences. However, additional molecular genetic analysis is required to confirm whether snail and rodent hosts influence the intraspecific and/or sympatric variation of *A. malayanum*.

Then, genetic status of these two sibling species needs to be confirmed. In this study, the first and second internal transcribed spacer sequences, the non-coding region of rDNA are used as markers to differentiate the sibling species, *A. malayanum* and *A. sufraryfex*. In addition, the first and second internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) sequences of other echinostomes were retrieved from GenBank to construct a phylogenetic tree depicting their genetic relationships. Furthermore, sequences of *A. malayanum* derived from snails and rodent hosts were compared with those of *A. sufraryfex* from India.

Materials and methods

Sample collection

Metacercarial cysts of *A. malayanum* were obtained from three species of naturally infected freshwater snails, *I. exustus*, *Lymnaea rubiginosa*, and *Pomacea canaliculata*, which were collected from a pond in the Muang district, Khon Kaen Province, Thailand. Twenty to 100 snails of each species were pooled and digested by pepsin solution (Srisawangwong et al. 2004). Fifty to 100 metacercarial cysts from each snail species were then separately fed to hamsters by intragastric intubation. Thirty days after infection, the hamsters were euthanatized and intestines were removed to collect adult worms. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University (AEKKU 25/2552). Adult *A. malayanum* were also collected from the small intestine of rice field rats, *Rattus* sp., trapped in the Muang district, Khon Kaen Province. All adult worms were examined by light microscopy

and identified to species based on their morphological characteristics, i.e., small circumoral disk deep lobed and branched testes and 43 collar spines (Yamaguti 1958; Miliotis and Bier 2003). All specimens were washed thoroughly in physiological saline and stored at -80°C until required.

PCR and DNA sequencing

Five to 10 adult worms derived originally from the snails or the rats were separately pooled for genomic DNA (gDNA) extraction by using the DNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) for adult worms that had first been crushed using a tissue grinder and lysed with lysis buffer, proteinase K (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The ITS1 and ITS2 sequences were amplified by using primers BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') and BD2 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3'; Morgan and Blair 1995). PCRs were performed using a PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) and reaction volumes of 25 μl containing 200 ng of genomic DNA, 50 mM MgSO_4 , $1\times$ buffer, 2.5 mM dNTPs, and 0.25 U of *Taq* DNA polymerase (iNtRON Biotechnology, Korea). No gDNA was included in each run as negative control. The PCR condition used for ITS amplification was 35 cycles of 96°C for 30 s, 54°C for 1 min, 72°C for 1 min. Amplicons were sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method using Dye Primer and Dye Terminator Cycle sequencing kits (Applied Biosystem Inc., Foster City, CA, USA) and an ABI DNA sequencer 373A.

Sequencing data and phylogeny analysis

The nucleotide sequences obtained have been deposited in GenBank under accession numbers JF412723–JF412726 for 301 bp of partial ITS1 sequences, JF412727–JF412730 for 398 bp of partial ITS2 sequences. The DNA sequences of *A. sufraryfex* (Indian isolate) and other echinostome species/isolates were retrieved from the GenBank database. Sequence alignment was conducted using BioEdit version 5.0.6. Phylogenetic trees were constructed based on neighbor-joining (NJ) analysis using Phylip program version 3.6 (Felsenstein 2005). The relative support for clades in the NJ analyses was determined using 1,000 bootstrap replicates. The sequence of *Fasciolopsis buski* was included as an out group in the phylogenetic tree construction.

Results and discussion

Variation within the 699 bp ITS sequence was observed at 18 positions (2.58 %) when comparing *A. malayanum* and *A. sufraryfex*. Of these, two (0.29 %) and 16 (2.29 %) positions were observed in ITS1 and ITS2 sequences, respectively (Table 1). These variable positions could be used to

Table 1 Variable nucleotide positions in the nucleotide sequence alignments of the partial ITS1 (301 bp) and ITS2 (398 bp) of *A. malayanum* collected from different hosts

	Nucleotide positions																	
	ITS1									ITS2								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>A. malayanum</i> –Lr	T	G	G	T	A	G	G	G	G	G	T	G	A	T	A	G	G	C
<i>A. malayanum</i> –Ie	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. malayanum</i> –Pc	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. malayanum</i> –Ra	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. sufrartyfex</i> ^a	C	T	C	.	G	A	T	T	C	C	G	T	G	G	G	T	A	A

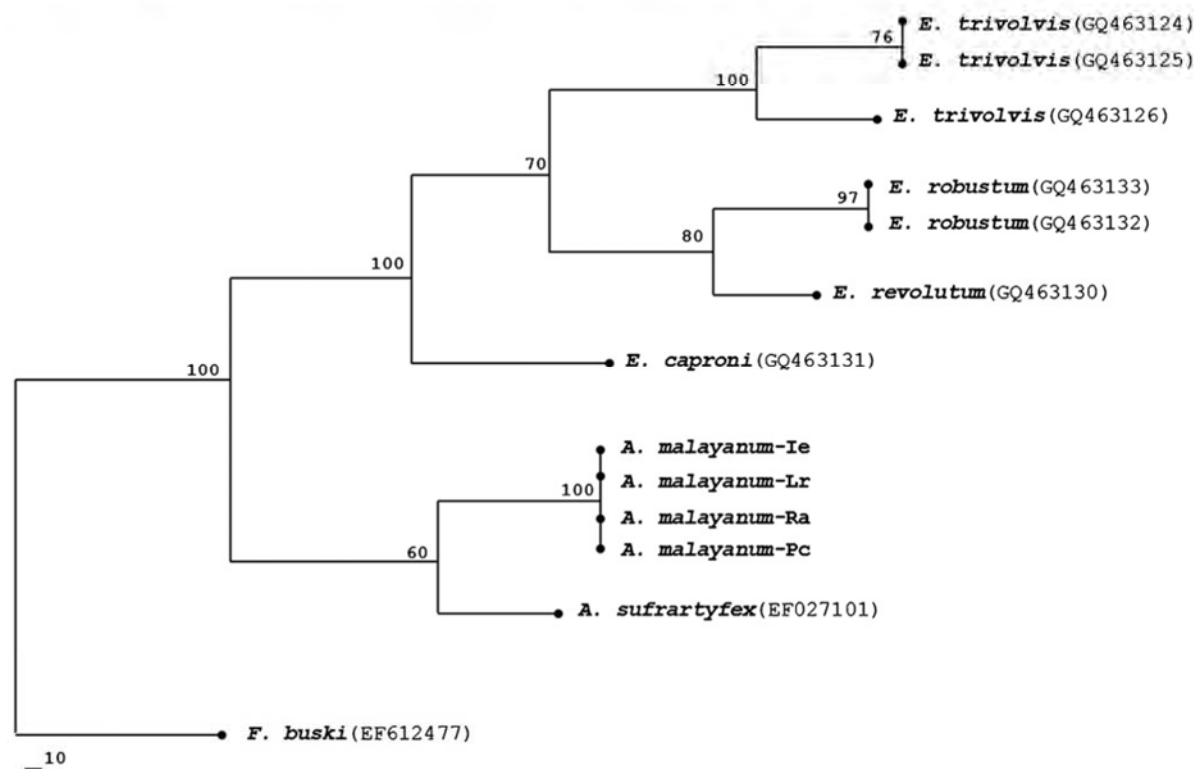
The sequences of a related species, *A. sufrartyfex* were retrieved from GenBank database. A dot represents an identical nucleotide to that in *A. malayanum* from *L. rubiginosa*

Lr, *L. rubiginosa*; Ie, *I. exustus*; Pc, *P. canaliculata*; Ra, *Rattus* sp

^a *A. sufrartyfex* retrieved from GenBank database under accession no. EF027101 for ITS1 and EF027100 for ITS2 sequences

differentiate *A. malayanum* and *A. sufrartyfex* except at position 101, which showed only intraspecific variation (0.25 %) in the ITS2 sequence for *A. malayanum* (Table 1). However, a

previous study by Morgan and Blair (1995) found that intra-specific variation in the *Echinostoma* (37-collar-spine group) isolates is problematic when considering the utility of the ITS

**Fig. 1** Strict consensus tree depicting relationships between *A. malayanum* and other related echinostomes inferred from 1,000 replicates of combined ITS1 and ITS2 sequences data based on neighbor-

joining by using *F. buski* as an out group. Bootstrap values (>50 %) are indicated above branches. Lr, *L. rubiginosa*; Ie, *I. exustus*; Pc, *P. canaliculata*; Ra, *Rattus* sp

sequences for taxonomic diagnosis. Our results are in concordance to the previous study that ITS sequences could be used to differentiate echinostome species, i.e., *E. revolutum* and *Echinostoma trivolvis* (Sorensen et al. 1998).

Our previous report (Saijuntha et al. 2011a) found intra-specific variation in the mitochondrial CO1 sequence within a population of *A. malayanum* (as *E. malayanum*) at 1.95 % of positions, which is higher than in the present study. This result supports of the proposition that the mitochondrial DNA mutates at a much faster rate than the nuclear DNA. The phylogenetic tree for echinostomes based on combined the ITS1 and ITS2 sequences in this study showed that the clustering at the genus/species level is in concordance with that reported previously (Saijuntha et al. 2011b). Moreover, a phylogenetic tree showed that *A. sufrartifex* is clustered as a monophyletic group with a clade of *A. malayanum*, and clearly separated from other clusters of other echinostomes with high bootstrap value (Fig. 1).

In this case, the results of our study suggest that the synonymy of *A. sufrartifex* with *A. malayanum* (Mukherjee and Ghosh 1968) is probably incorrect and that both are valid species. This would fit with the disjunct distribution of the two species, with *A. sufrartifex* being described from India (Lane 1915; Chai 2009) and *A. malayanum* from Southeast Asia (Leiper 1911; Chai 2009) with no records from the intervening Myanmar. However, *A. sufrartifex* has recently been reported infect mammals in southern Vietnam. These specimens were identified by morphology (Ha Duy et al. 2011). Thus, the genetic characterization of these parasites may be needed to confirm the species taxonomy in Southeast Asian countries.

Previous research indicates that morphological characteristics are insufficient to identify digenean trematode species, including echinostomes, due to the lack of adequate distinguishing characteristics, and that, therefore, genetically distinct cryptic species may be common (Saijuntha et al. 2007; Leung et al. 2009; Saijuntha et al. 2011a). The variable nucleotide positions between *A. malayanum* and *A. sufrartifex* in their ITS1 and ITS2 sequences found in this study could provide genetic markers for solving the taxonomy status of these closely related echinostomes. Our results indicate that the two sibling species, *A. malayanum* and *A. sufrartifex* are not synonymous, and that the further comprehensive analysis of their biology, morphology and genetics is needed.

Acknowledgments This research was supported by Thammasat University grant to C. Tantrawatpan and TRF-CHE-MSU (grant no. MRG5480009) to W. Saijuntha. We wish to acknowledge the Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Overseas Visiting Professor Program grant. We would like to thanks Dr. Yukifumi Nawa, hosted by Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Khon Kaen University for the comments and suggestions. We would like to thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (PE1611/1-3), the National Research Council of Thailand, the International Excellence

Fund of ASEAN-EU Year of Science, Technology and Innovation, 2012 for providing funding for cooperative workshops.

References

- Beaver PC, Jung RC, Cupp EW (1984) Clinical parasitology, 9th edn. Lea & Febiger, Philadelphia
- Chai JY (2009) Echinostomes in humans. In: Fried B, Toledo R (eds) The biology of echinostomes. Springer, Heidelberg
- Chai JY, Shin EH, Lee SH, Rim HJ (2009) Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia. Korean J Parasitol 47:S69–S102
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Ha Duy N, Ermolenko AV, Gerasev PI (2011) *Artyfechinostomum sufrartifex* Lane, 1915 (Trematoda: Echinostomatidae), a parasite of mammals in Southern Vietnam. Parazitologija 45:54–59
- Huffman JE, Fried B (1990) *Echinostoma* and echinostomiasis. Adv Parasit 29:215–269
- Kostadinova A, Vaucher C, Gibson DI (2002) Redescrptions of two echinostomes from birds in Paraguay, with comments on *Drepanocephalus* Diet, 1909 and *Paryphostomum* Diez, 1909 (Digenea: Echinostomatidae). Syst Parasitol 53:147–158
- Lane C (1915) *Artyfechinostomum sufrartifex*: a new parasitic echinostome of man. Indian J Med Res 2:977–983
- Leiper RT (1911) A new echinostome in man. The Journal of the London School of Tropical Medicine 1:27–28
- Leung TL, Keeney DB, Poulin R (2009) Cryptic species complexes in manipulative echinostomatid trematodes: when two become six. Parasitology 136:241–252
- Lie KJ (1963) Studies on echinostomatidae in Malaya. Z f Parasitenkunde 23:136–140
- Maldonado A Jr, Zeitone BK, Amado LA, Rosa IF, Machado-Silva JR, Lanfredi RM (2005) Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. J Helminthol 79:345–351
- Miliotis MD, Bier JW (2003) International handbook of foodborne pathogens. CRC, New York
- Morgan JA, Blair D (1995) Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. Parasitology 111: 609–615
- Mukherjee RP, Ghosh RK (1968) On the synonymy of the genus *Artyfechinostomum* Lane 1915 (Trematoda: Echinostomatidae). Proceedings: Plant Sciences 68:52–58
- Premvati G, Pande V (1974) On *Artyfechinostomum malayanum* (Leiper, 1911) Mendheim, 1943 (Trematoda: Echinostomatidae) with synonymy of allied species and genera. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 41:151–160
- Radomyos P, Radomyos B, Tungtrongchitr A (1994) Multi-infection with helminths in adults from northeast Thailand as determined by post-treatment fecal examination of adult worms. Trop Med Parasitol 45:133–135
- Saijuntha W, Sithithaworn P, Wongkham S, Laha T, Pipitgool V, Tesana S, Chilton NB, Petney TN, Andrews RH (2007) Evidence of a species complex within the food-borne trematode *Opisthorchis viverrini* and possible co-evolution with their first intermediate hosts. Int J Parasitol 37:695–703
- Saijuntha W, Sithithaworn P, Duenngai K, Kiatsopit N, Andrews RH, Petney TN (2011a) Genetic variation and relationships of four species of medically important echinostomes (Trematoda: Echinostomatidae) in South-East Asia. Infect Genet Evol 11:375–381
- Saijuntha W, Tantrawatpan C, Sithithaworn P, Andrews RH, Petney TN (2011b) Genetic characterization of *Echinostoma revolutum* and

- Echinoparyphium recurvatum* (Trematoda: Echinostomatidae) in Thailand and phylogenetic relationships with other isolates inferred by ITS1 sequence. *Parasitol Res* 108:751–755
- Sorensen RE, Curtis J, Minchella DJ (1998) Intraspecific variation in the rDNA its loci of 37-collar-spined echinostomes from North America: implications for sequence-based diagnoses and phylogenetics. *J Parasitol* 84:992–997
- Srisawangwong T, Chantaluk S, Sithithaworn P, Charoensiri D (2004) Infectivity, growth and fecundity of *Echinostoma malayanum* in mice. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35:302–305
- Waikagul J (1991) Intestinal fluke infections in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 22:158–162
- Yamaguti S (1958) Part I. The digenetic trematodes of vertebrates. In: *Systema Helminthum*, vol. I, Wiley: New York.

ORIGINAL ARTICLE

Zoonotic Echinostome Infections in Free-Grazing Ducks in Thailand

Weerachai Saijuntha¹, Kunyart Duenngai² and Chairat Tantrawatpan^{3,4,*}

¹Walai Rukhvej Botanical Research Institute (WRBRI), Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150, Thailand; ²Department of Public Health, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000, Thailand; ³Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120, Thailand; ⁴Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Abstract: Free-grazing ducks play a major role in the rural economy of Eastern Asia in the form of egg and meat production. In Thailand, the geographical location, tropical climate conditions and wetland areas of the country are suitable for their husbandry. These environmental factors also favor growth, multiplication, development, survival, and spread of duck parasites. In this study, a total of 90 free-grazing ducks from northern, central, and northeastern regions of Thailand were examined for intestinal helminth parasites, with special emphasis on zoonotic echinostomes. Of these, 51 (56.7%) were infected by one or more species of zoonotic echinostomes, *Echinostoma revolutum*, *Echinoparyphium recurvatum*, and *Hypoderaeum conoideum*. Echinostomes found were identified using morphological criteria when possible. ITS2 sequences were used to identify juvenile and incomplete worms. The prevalence of infection was relatively high in each region, namely, north, central, and northeast region was 63.2%, 54.5%, and 55.3%, respectively. The intensity of infection ranged up to 49 worms/infected duck. Free-grazing ducks clearly play an important role in the life cycle maintenance, spread, and transmission of these medically important echinostomes in Thailand.

Key words: *Echinostoma revolutum*, *Hypoderaeum conoideum*, *Echinoparyphium recurvatum*, echinostome, free-grazing duck, prevalence, Thailand

INTRODUCTION

Echinostomes comprise a group of at least 60 species of foodborne and zoonotic intestinal trematodes, and are endemic worldwide [1]. Human echinostomiasis has been reported, especially in Southeast Asia, caused by at least 20 species belonging to 8 genera, namely *Echinostoma*, *Echinochasmus*, *Acanthoparyphium*, *Artyfechinostomum*, *Episthmium*, *Himasthla*, *Hypoderaeum*, and *Isthmiophora* [2,3]. Asian countries from which human cases have been reported include India, the Philippines, China, Taiwan, Indonesia, Malaysia, the Republic of Korea, Japan, Cambodia, Lao PDR, and Thailand [4-7]. Seven species, i.e., *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma ilocanum*, *Echinostoma malayanum* (syn. *Artyfechinostomum malayanum*), *Echinochasmus japonicus*, *Episthmium caninum*, *Artyfechinostomum*

sp., and *Hypoderaeum conoideum* have been reported as medically important species in Thailand [8,9] and *Echinoparyphium recurvatum* has been reported to infect man in Taiwan, Indonesia, and Egypt [10]. In 1969, more than 50% of northern Thai residents were infected with echinostomes [11], but the prevalence had decreased to 0.7% by 1998 [12]. In addition to Thailand, there are also recent studies reporting the incidence of human echinostomiasis in other areas of Greater Mekong Subregion; 1.1% in riparian villages along the Mekong River in Khammouane Province, Lao PDR [13]; between 7.5-22.4% among schoolchildren in Pursat Province, Cambodia (eggs found were presumed to be those of *E. revolutum*) [14]; and a range of 0.7-1.8% in Oddar Meanchey Province, Cambodia, where the adult *E. ilocanum* were recovered from humans [15].

These medically important echinostomes infect a broad range of definitive hosts among wild, domestic, and peridomestic animals, e.g., cats, dogs, pigs, rodents, aquatic birds, chickens, and ducks [16]. Infection occurs by ingestion of aquatic second intermediate hosts, i.e., freshwater snails, bivalves, fish, and tadpoles. Among the snail genera, those which have been reported as the first intermediate hosts of echino-

*Received 30 May 2013, revised 7 August 2013, accepted 11 October 2013.

*Corresponding author (talent3003@yahoo.com)

© 2013, Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

stomes in Thailand are *Indoplanorbis* sp., *Gyraulus* sp., *Lymnaea* spp., *Pilas* sp., *Viviparus* sp., and *Filopaludina* sp. [17,18]. The morbidity of echinostome infections in humans may be not too severe, but is dependent on the number of worms present [5,16,19]. However, heavy infections with echinostomes, especially *E. revolutum*, may cause emaciation and catarrhal enteritis, and death may occur in young and non-healthy animals, including ducks [20]. Such birds and poultry act as major reservoirs of infection in both agricultural and natural settings. High prevalences of infection with zoonotic echinostomes *E. revolutum*, *E. recurvatum*, and *H. conoideum* have been reported in domestic ducks in Bangladesh [20], and *Echinostoma cinetorchis* and *H. conoideum* in Vietnam [21].

Nowadays, free-grazing domestic ducks are common in Southeast Asia particularly in Thailand. Rice paddy fields used for double-crop rice provide excellent year-round foraging for them. Ducks are released on paddy fields after harvest and feed on leftover rice grains, wild rice, insects, and aquatic animals including many intermediate hosts of echinostomes such as those listed above. Rotation of free-grazing ducks between rice paddy fields may play an important role in the life cycle maintenance, spread, and transmission of foodborne zoonotic parasites, particularly echinostomes. Rotation occurs at frequencies depending on the availability of food, but usually every few weeks.

Gastrointestinal parasites of poultry are common worldwide [20-23]. Very little is known about echinostome infections in free-grazing ducks in Thailand. Our survey provided significant information on this topic, aiding management and control programs for these zoonotic echinostomes.

MATERIALS AND METHODS

Sampling method

We purchased the intestines of ducks from local slaughterhouses in central, north, and northeast regions of Thailand. Those ducks were from flocks grazing rice paddy fields used for double-crop rice production. A total of 90 samples, consisting of 19 from 3 areas in northern Thailand, 33 from 4 areas in central Thailand, and 38 from 5 areas in northeastern Thailand were examined between May 2011 and February 2012 (Table 1; Fig. 1).

Parasite recovery and morphological identification

The intestines of ducks were opened and any visible trematodes were picked out and placed in a separate Petri-dish containing normal saline. After that, the intestines were washed to find any remaining worms. The worms recovered from an individual duck were pooled in a Petri-dish and washed several times using saline. For identification purposes, each adult worm was flattened between 2 glass slides, held apart by a small piece of filter paper, and then examined under a light microscope. Species identification was based on the testis shape, development of the circumoral disc, and number of collar spines [24]. Any worms that could not be identified in this way were subjected to molecular analysis. Ten worms of each morphologically identifiable species (*E. revolutum* and *H. conoideum*) were randomly selected and fixed in 10% formalin and subsequently washed in 70% ethanol several times to remove formalin, stained with carmine for 1 day, and destained with 1% HCl in distilled water until the flukes appeared pink in color. After that

Table 1. Survey localities for echinostomes infections in free-grazing ducks

Province (code)	District	Region	N ^a	No. infected	No. of worms recovered			
					<i>E. revolutum</i>	<i>H. conoideum</i>	<i>E. recurvatum</i>	Total
Sukhothai (ST)	Kong Krailat	North	10	6	5 (5.6%)	83 (93.3%)	1 (1.1%)	89
Phitsanulok (PL)	Mueang	North	4	4	5 (41.7%)	6 (50.0%)	1 (8.3%)	12
Phichit (PJ)	Bueng Na Rang	North	5	2	1 (16.7%)	5 (83.3%)	0	6
Nakhon Sawan (NW)	Takhli	Central	5	2	3 (50.0%)	3 (50.0%)	0	6
Lop Buri (LB)	Ban Mi	Central	5	3	6 (85.7%)	1 (14.3%)	0	7
Ayutthaya (AY)	Bang Ban	Central	15	10	23 (76.7%)	7 (23.3%)	0	30
Pathum Thani (PT)	Khlong Laung	Central	8	3	6 (75.0%)	2 (25.0%)	0	8
Nakhon Ratchasima (NMk)	Kham Thale Sor	North-East	5	3	1 (1.5%)	65 (98.5%)	0	67
Nakhon Ratchasima (NMc)	Chum Phuang	North-East	5	4	2 (7.1%)	26 (92.9%)	0	28
Roi Et (RE)	Changhan	North-East	8	4	21 (61.8%)	13 (38.2%)	0	34
Maha Sarakham (MS)	Mueang	North-East	7	3	6 (75.0%)	2 (25.0%)	0	8
Khon Kaen (KK)	Mueang	North-East	13	7	12 (10.3%)	103 (88.0%)	2 (1.7%)	117

^aNumber of free-grazing ducks examined.

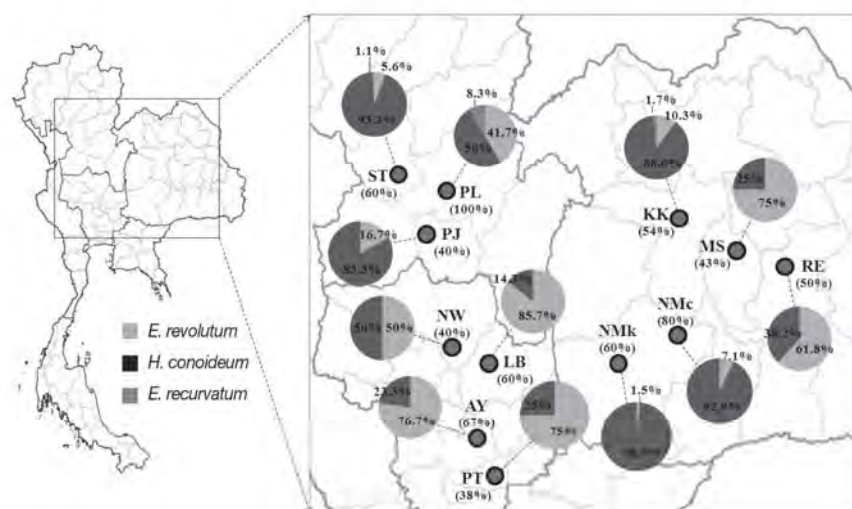


Fig. 1. Map showing the prevalence of infection in free-grazing ducks (in parentheses under the area code) and infection rates of each echinostome species (indicated in the pie-charts) in each sampled area (see more details in Table 1).

the flukes were dehydrated in 70%, 80%, 95%, and 100% ethanol, consecutively for 2 hr each. Finally, the dehydrated flukes were mounted with permount solution on glass slides and identified by morphological features following the published keys [8,24].

Molecular identification

Genomic DNA (gDNA) was individually extracted from each worm using the DNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. The ITS2 region was amplified using primers and PCR conditions following our previous report [25]. Amplicons were sequenced using the dideoxynucleotide chain termination method using Dye Primer and Dye Terminator Cycle sequencing kits (Applied Biosystem Inc., Foster City, California, USA) and an ABI DNA sequencer 373A. The ITS2 sequences obtained in this study were aligned with the sequences of known species retrieved from GenBank database using BioEdit program version 5.0.6.

RESULTS

Of the 90 free-grazing ducks examined, 51 (56.7%) were infected by 1 or more species of the 3 zoonotic echinostomes, *E. revolutum*, *E. recurvatum*, and *H. conoideum*. The prevalence of infection in each geographical area is relatively high, ranging between 38% and 100% (Fig. 1). Prevalences in general did

not differ greatly between regions, i.e., 63.2% in north (12/19), 54.5% in central (18/33), and 55.3% in northeast (21/38). In terms of the prevalences of each echinostome species, *E. revolutum* was the most common worm in the central region and Roi Et and Maha Sarakham Provinces of the northeast region. Elsewhere, *H. conoideum* was the most common species (Table 1; Fig. 1). Eight unidentified worms could be confirmed by ITS2 sequences as being 2 *H. conoideum* and 6 *E. recurvatum* (included in the data in Table 1 and Fig. 1).

The maximum number of worms in an infected duck was 49. *H. conoideum* was the highest in number (Fig. 2). Of the 51 infected ducks, 17 (33.3%) were infected by *E. revolutum* alone, 18 (35.3%) by *H. conoideum* alone, 13 ducks (25.5%) had mixed infections with *E. revolutum* and *H. conoideum*, 1 (2.0%) had mixed infections with *E. revolutum* and *E. recurvatum*, and 2 (3.9%) harbored all 3 echinostome species (Fig. 2).

DISCUSSION

Farmers in Southeast Asia use flocks of free-grazing ducks to help control invasive golden apple snails, *Pomacea canaliculata*, originally native to South America, which can cause extensive damage to rice paddies. The golden apple snails, other pond snails, e.g., *Lymnaea* sp., *Indoplanorbis* sp., *Filopaludina* sp., and even tadpoles, and small freshwater fish, all of which can act as the second intermediate hosts of echinostomes, are also eat-

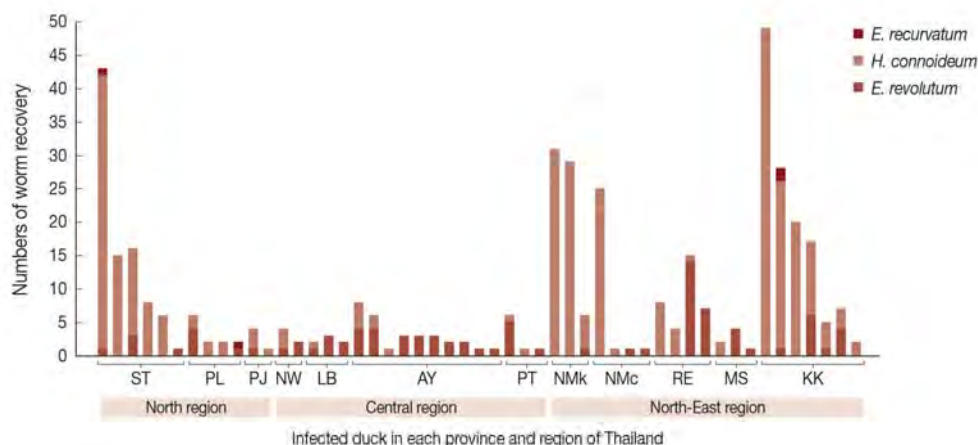


Fig. 2. Numbers of adult worms recovered per infected duck.

en by those ducks. Consequently, high rates of echinostome infection are found in free-grazing ducks in Thailand, as revealed in this study and previous reports from other countries, e.g., Bangladesh [20,26], Korea [23], and Vietnam [21]. However, the presence of echinostomes in free-grazing ducks is not entirely a bad thing. *E. revolutum* has proven to be an effective biological control agent of the highly pathogenic fluke species, *Fasciola gigantica*, when the 2 trematodes share the same snail intermediate host, *Lymnaea rubiginosa* [27].

The infectious prevalence of each echinostome species varied geographically and may reflect the differences in grazing system used by particular farmers. However, many factors may influence this phenomenon, previous work indicates that 2 sibling species of *E. revolutum* from Thailand and Laos probably exist [28,29]. Temporal factors cannot be excluded. Reports exist noting that high prevalences of helminths in poultry are usually found in winter and rainy seasons. This may be related to persistence of parasites in intermediate hosts in some seasons, and abundance of intermediate hosts in others [19,26]. Moreover, the prevalence of infection was probably correlated to the sex and age of ducks. It has been reported previously that female ducks and those over a year old have higher prevalences of echinostomes infections than male ducks and ducks under 1 year of age, respectively [20]. However, in our study, all ducks were females (for laying eggs) and above 1 year in age.

Ducks are usually rotated among several rice paddies within restricted geographical areas (within a province). This rotation within a province is controlled by local laws and the local department of livestock development. The frequency of translo-

cations is dependent on the food available at each site (rice grains, snails, and other small aquatic animals). Normally, the farmer will rotate the duck flock by vehicle every few weeks. The flocks are allowed to feed in rice paddies after the harvesting season but will be removed before the planting season. The high prevalence of these zoonotic echinostomes in free-grazing ducks suggests their role as reservoir hosts in Thailand. Therefore, the owners of ducks must be educated on the risks with this practice as a constituent of any incorporated food-borne zoonotic trematode prevention and control program.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Faculty of Medicine, Thammasat University grant to C. Tantrawatpan, TRF-CHE-MSU grant to W. Saijuntha (grant no. MRG5480009) and was also supported in part by TRF Senior Research Scholar Grant, Thailand Research Fund grant no. RTA5580004. We wish to thank the Institute Research and Development, Department of Public Health, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Thailand.

REFERENCES

1. Sorensen RE, Curtis J, Minchella DJ. Intraspecific variation in the rDNA ITS loci of 37-collar-spined echinostomes from North America: implications for sequence-based diagnoses and phylogenetics. *J Parasitol* 1998; 84: 992-997.
2. Chai JY, Murrell KD, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1233-1254.

3. Chai JY, Shin EH, Lee SH, Rim HJ. Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia. *Korean J Parasitol* 2009; 47(suppl): S69-S102.
4. Miliotis MD, Bier JW. *International Handbook of Foodborne Pathogens*. CRC Press, New York. 2003.
5. Graczyk TK, Fried B. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 501-504.
6. Fried B, Graczyk TK, Tamang L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitol Res* 2004; 93: 159-170.
7. Grover M, Dutta R, Kumar R, Aneja S, Mehta G. *Echinostoma ilocanum* infection. *Indian Pediatr* 1998; 35: 549-552.
8. Radomyos P, Krudsood S, Wilairatana P, Looareesuwan S. *Atlas of Medical Parasitology*. Bangkok, Thailand. Pappim Co. Ltd. 2003 (in Thai).
9. Joe LK, Nasemary S, Impand P. Five echinostome species from Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1973; 4: 96-101.
10. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. *Clinical Parasitology*. 9th ed. Philadelphia, USA. Lea & Febiger. 1984, p 460.
11. Sornmani S. Echinostomiasis in Thailand: a review. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1969; 1: 171-175.
12. Radomyos B, Wongsaroj T, Wilairatana P, Radomyos P, Praevanich R, Meesomboon V, Jongsuksuntikul P. Opisthorchiasis and intestinal fluke infections in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29: 123-127.
13. Chai JY, Sohn WM, Yong TS, Eom KS, Min DY, Hoang EH, Phammasack B, Insiengmay B, Rim HJ. Echinostome flukes recovered from humans in Khammouane Province, Lao PDR. *Korean J Parasitol* 2012; 50: 269-272.
14. Sohn WM, Chai JY, Yong TS, Eom KS, Yoon CH, Sinuon M, Socheat D, Lee SH. *Echinostoma revolutum* infection in children, Pursat Province, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 117-119.
15. Sohn WM, Kim HJ, Yong TS, Eom KS, Jeong HG, Kim JK, Kang AR, Kim MR, Park JM, Ji SH, Sinuon M, Socheat D, Chai JY. *Echinostoma ilocanum* infection in Oddar Meanchey Province, Cambodia. *Korean J Parasitol* 2011; 49: 187-190.
16. Huffman JE, Fried B. *Echinostoma* and echinostomiasis. *Adv Parasitol* 1990; 29: 215-269.
17. WHO. Control of food-borne trematode infections. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995.
18. Pariyanonda S, Tesana S. Edible mollusk, the intermediate host of helminthes in Khon Kaen Province, Thailand. *Srinagarind Hosp Med J* 1990; 5: 159-172.
19. Chai JY, Hong ST, Lee SH, Lee GC, Min YI. A case of echinostomiasis with ulcerative lesions in the duodenum. *Korean J Parasitol* 1994; 32: 201-204.
20. Yousuf MA, Das PM, Anisuzzaman, Banowary B. Gastro-intestinal helminths of ducks: Some epidemiologic and pathologic aspects. *J Bangladesh Agr Univ* 2009; 7: 91-97.
21. Anh NT, Madsen H, Dalsgaard A, Phuong NT, Thanh DT, Murrell KD. Poultry as reservoir hosts for fishborne zoonotic trematodes in Vietnamese fish farms. *Vet Parasitol* 2010; 169: 391-394.
22. Saijuntha W, Sithithaworn P, Andrews RH. Genetic differentiation of *Echinostoma revolutum* and *Hypodereum conoideum* from domestic ducks in Thailand by multilocus enzyme electrophoresis. *J Helminthol* 2010; 84: 143-148.
23. Eom KS, Rim HJ, Jang DH. A study on the parasitic helminths of domestic duck (*Anas platyrhynchos* var. *domestica* Linnaeus) in Korea. *Korean J Parasitol* 1984; 22: 215-221.
24. Kostadinova A. Family Echinostomatidae Looss, 1899. In Jones A, Bray RA, Gibson DI eds, *Keys to the Trematoda*, Vol. 2. London, UK. CABI Publishing and the Natural History Museum. 2005, p 9-64.
25. Tantrawatpan C, Saijuntha W, Sithithaworn P, Andrews RH, Petney TN. Genetic differentiation of *Artyfechinostomum malayanum* and *A. sufraryfex* (Trematoda: Echinostomatidae) based on internal transcribed spacer sequences. *Parasitol Res* 2013; 112: 437-441.
26. Anisuzzaman, Alim MA, Rahman MH, Mondal MMH. Helminth parasites in indigenous ducks: Seasonal dynamics and effects on production performance. *J Bangladesh Agr Univ* 2005; 3: 283-290.
27. Suhardono, Roberts JA, Copeman DB. Biological control of *Fasciola gigantica* with *Echinostoma revolutum*. *Vet Parasitol* 2006; 140: 166-170.
28. Saijuntha W, Sithithaworn P, Duenngai K, Kiatsopit N, Andrews RH, Petney TN. Genetic variation and relationships of four species of medically important echinostomes (Trematoda: Echinostomatidae) in South-East Asia. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 375-381.
29. Saijuntha W, Tantrawatpan C, Sithithaworn P, Andrews RH, Petney TN. Spatial and temporal genetic variation of *Echinostoma revolutum* (Trematoda: Echinostomatidae) from Thailand and the Lao PDR. *Acta Trop* 2011; 118: 105-109.

Genetic Structure Inferred from Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Sequence of *Oncomelania quadrasi*, the Intermediate Snail Host of *Schistosoma japonicum* in the Philippines

Weerachai Sajjuntha, Blanca Jarilla, Alvin K. Leonardo, Louie S. Sunico, Lydia R. Leonardo, Ross H. Andrews, Paiboon Sithithaworn, Trevor N. Petney, Masashi Kirinoki, Naoko Kato-Hayashi, Mihoko Kikuchi, Yuichi Chigusa, and Takeshi Agatsuma*

Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Maharakham University, Maha Sarakham, Thailand; Division of Environmental Health Sciences, Kochi Medical School, Nankoku, Japan; College of Public Health, University of the Philippines, Manila, Philippines; Municipal Health Office, Municipality of Gonzaga, Cagayan, Philippines; Department of Parasitology, and Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand; Department of Ecology and Parasitology, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany; Laboratory of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan; Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Abstract. Species and subspecies of the *Oncomelania hupensis* species complex are recognized as intermediate hosts of *Schistosoma japonicum*. Of these species and subspecies, *O. quadrasi* is distributed throughout the Philippines. This study used 12S ribosomal RNA sequences to explore the genetic structure of *O. quadrasi* populations in the Philippines. Three subspecies, *O. h. hupensis*, *O. h. formosana*, and *O. h. chiui* of this group were also examined. The phylogenetic tree and haplotypes network showed that *O. quadrasi* separated from the subspecies. Ten *O. quadrasi* haplotypes (Oq1–Oq10) clustered in relation to their geographic origin. Genetic differentiation (F_{ST}) and estimated gene flow (Nm) among populations showed significant differences, ranging from 0.556–1.000 to 0.00–0.74, respectively. Genetic differences among groups (F_{CT} = 0.466), populations within a group (F_{SC} = 0.727), and populations (F_{ST} = 0.854) were observed. These results indicate that the *O. quadrasi* populations in the Philippines have a substructure associated with their geographic origin.

INTRODUCTION

Snails of the *Oncomelania hupensis* group are recognized as the intermediate hosts of *Schistosoma japonicum*, a major causative agent of schistosomiasis in countries in Asia. There are many species and subspecies in the *O. hupensis* complex that act as the intermediate hosts of *S. japonicum*, i.e., *O. hupensis hupensis*, *O. h. tangi* and *O. h. robertsoni* in China, *O. h. nosophora* in Japan, *O. h. lindoensis* in the Indonesian islands, *O. h. formosana*, *O. h. chiui* in Taiwan, and *O. quadrasi* in the Philippines.^{1,2} During the 1970s, *S. japonicum* was still endemic to many areas in the Philippines. Currently 560,000 persons are estimated to be infected and more than 6.7 million are at risk of infection in 28 of the 79 provinces in the country, particularly among rice farmers and fishermen.^{1,2} Moreover, not only are humans infected, but there are many animals that act as final reservoir hosts of *S. japonicum* in the Philippines, including dogs, cats, pigs, rats, goats, cattle, and water buffalos.^{3,4}

The genetic diversity of *O. hupensis* complex, especially *O. h. hupensis*, *O. h. tangi*, and *O. h. robertsoni* from mainland China, has been intensively investigated.^{5,6} Evidence of close co-evolutionary relationships between *S. japonicum* and its intermediate snail host *O. hupensis* has been demonstrated. This finding has led to an increased interest in the phylogenetics and population genetic structure of the snail.^{5,7} Because there are co-evolutionary relationships and close genetic interactions between the snails and their parasites, a snail population may reflect population genetic parameters of the parasite and conversely.^{8,9} Genetically diverse snail populations appear to be more susceptible to infection with *S. japonicum* than homogeneous populations.¹⁰

In spite of a considerable amount of research on the genetic diversity within populations of *O. quadrasi*, only a limited assessment has been made on the significance of this diversity in a population structure or phylogenetic context. For instance, there are some reports of genetic diversity of *O. quadrasi* based on several genetic markers, including allozymes, nuclear DNA, and mitochondrial DNA sequences.^{11–13} These markers could be potentially used to demonstrate genetic diversity within *O. quadrasi* and its differentiation from other species and subspecies within the *O. hupensis* complex. However, knowledge of the genetic structure of *O. quadrasi* populations in the Philippines is virtually unknown.

The taxonomic status of variously designated subspecies of *O. hupensis* is controversial because some authors favor subspecies characterization while others consider certain previously designated subspecies, including *O. quadrasi*, to be full species based on morphologic (e.g., shell sculpture, operculum) and molecular characteristics and geographic distributions.^{14,15} Recent studies strongly support the specific status of *O. quadrasi*.^{13,14} For a better understanding of the population genetic structure of *O. quadrasi* in the Philippines, this study investigated 12S ribosomal RNA sequence variation from six localities in three provinces on three islands. Three subspecies, *O. h. hupensis* from China, and *O. h. formosana* and *O. h. chiui* from Taiwan, were also included in the analysis to determine the levels of interspecific genetic variation and phylogenetic relationships.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Snails were collected from the field from different countries: *O. quadrasi* from the Philippines, *O. h. hupensis* from China, *O. h. chiui*, and *O. h. formosana* from Taiwan (Table 1). Collections from the Philippines were from three provinces: Cagayan, Oriental Mindoro, and Leyte (Table 1), which are located on the islands of Luzon, Mindoro, and Leyte, respectively. Snails were washed in sterile 0.3%

AU1 *Address correspondence to Takeshi Agatsuma, Division of Environmental Health Sciences, Kochi Medical School, Oko, Nankoku 783-8505, Japan. E-mail: agatsuma@kochi-u.ac.jp

Sample code	Locality	Province*	Country	Subspecies	No.
AN	Aling Nene	Oriental Mindoro	Philippines	<i>O. quadrasi</i>	10
MB	Malabo	Oriental Mindoro	Philippines	<i>O. quadrasi</i>	10
DG	Dagami	Leyte	Philippines	<i>O. quadrasi</i>	10
MG	Magrafil	Cagayan	Philippines	<i>O. quadrasi</i>	10
SM	Sta. Maria	Cagayan	Philippines	<i>O. quadrasi</i>	10
TP	Tapel	Cagayan	Philippines	<i>O. quadrasi</i>	9
AH	Guichi	Anhui	China	<i>O. h. hupensis</i>	5
SC	Tianquan	Sichuan	China	<i>O. h. hupensis</i>	5
YN	Weishan	Yunnan	China	<i>O. h. hupensis</i>	5
KS	Yue-Mei	Kaohsiung	Taiwan	<i>O. h. formosana</i>	5
TA	Shimen	Taipei	Taiwan	<i>O. h. chiui</i>	5

NaCl and cracked to break their shells before being placed in individual vials containing 80% ethanol to transport to the laboratory for genetic investigation. Each snail was washed several times in sterile 0.3% NaCl, and the head-foot muscle dissected under a microscope and dried using a vacuum dryer. The tissues were then used for DNA extraction.

Total genomic DNA of each individual snail was extracted by using the E.Z.N.A.[®] Mollusc DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA) following the manufacturer's instructions. The 12S ribosomal RNA gene was amplified by using primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions as reported by Okamoto and others.¹² All PCR products were gel-purified using a GENECLEAN[®] II Kit (Q-BIO Gene, Carlsbad, CA). The purified PCR products were cycle-sequenced by using ABI BigDye v3.1 chemistry and run on an ABI Prism 377 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

version 5.0.6. Genetic differentiation (F_{ST}), gene flow estimation (Nm), and other parameters of DNA sequence polymorphism, including number of segregation site (S), haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (π), genetic diversity (θ_S), and the mismatch distribution under an expected population growth-decline model,¹⁶ were computed and generated by using DnaSP v5 software.¹⁷ Genetic structure, fixation indices, and evolutionary neutrality were calculated by using Arlequin 3.5.¹⁸ Minimum spanning haplotype network was constructed by using the Network 4.6.1.0 program based on median-joining algorithm.¹⁹ A phylogenetic tree was constructed based on an unweighted pair group method with arithmetic mean analysis by using Phylip program version 3.6.²⁰ The relative support for clades was determined by using 1,000 bootstrap replicates.

Interspecific analyses of *O. hupensis* ssp. and *O. quadrasi*. The 357 bp partial sequence of the mitochondrial 12S ribosomal

Variable positions of 12S ribosomal RNA sequences of *Oncomelania quadrasi* (Oq), *O. h. hupensis* (Ohh), *O. h. chiui* (Ohc) and *O. h. formosana* (Ohf) haplotypes, the Philippines*

Haplotype	Nucleotide sequence																																					
Qq1	3	4	5	6	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3				
Qq2	3	4	8	1	3	4	8	2	2	3	6	0	2	3	4	2	3	3	0	1	6	5	0	2	7	4	7	8	0	1	2	4	4	5	6	6		
Qq3	A	A	A	T	T	C	T	G	T	A	A	T	T	C	T	C	T	C	T	G	G	G	G	G	G	G	A	G	C	G	T	G	A	T	T	G		
Qq4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Qq5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Qq6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Qq7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Qq8	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Qq9	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Qq10	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Ohh1	.	G	.	C	.	T	.	A	.	.	G	.	C	T	.	C	.	C	G	.	A	A	.	T	.	.	.	A	A	A	A	.	.	.	.	C	.	
Ohh2	.	G	.	C	.	T	.	A	.	.	G	G	C	C	T	.	C	.	C	G	.	A	A	.	T	.	.	A	A	A	A	.	.	.	.	C	.	
Ohh3	.	G	.	C	.	T	.	A	.	G	G	C	C	T	.	C	.	C	.	A	A	.	T	.	C	.	.	A	A	A	A	.	.	G	.	C	.	
Ohh4	.	G	.	C	.	T	.	A	.	G	G	C	C	T	.	C	.	C	.	C	.	A	A	.	T	.	C	.	A	A	A	A	.	.	A	.	C	.
Ohh5	.	T	.	C	.	T	.	A	.	G	G	C	C	T	.	C	.	C	.	A	A	.	T	.	A	.	.	A	A	A	A	.	.	A	.	C	.	
Ohh6	.	G	.	C	C	T	.	A	.	G	G	C	C	T	.	C	.	C	.	A	A	.	T	.	A	.	.	A	A	A	A	.	.	T	.	A	.	
Ohh7	.	G	G	.	.	T	.	A	.	T	T	G	A	.	T	C	.	C	.	A	A	.	C	T	.	.	.	A	A	A	A	.	.	A	.	C	.	
Ohh8	.	G	G	.	.	T	.	A	.	T	T	G	A	.	T	C	.	C	.	A	A	.	C	T	.	.	.	A	A	A	A	.	.	A	.	C	.	
Ohc1	.	G	.	C	.	T	.	A	.	.	T	G	.	C	T	.	C	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	A	A	A	A	A	.	.	T	.	A	.
Ohf1	.	G	.	C	.	T	C	A	.	.	.	.	.	C	T	.	C	.	.	A	A	.	T	.	.	.	.	A	A	A	A	.	.	T	.	A	.	
Ohf2	.	G	.	C	.	T	C	A	.	.	.	.	.	C	T	.	C	.	.	A	A	.	T	.	.	.	.	A	A	A	A	.	.	G	.	T	.	

 $\ast_i = \text{identity}$

RNA gene was compared within and between populations of *O. quadrasi*, *O. h. hupensis*, *O. h. formosana*, and *O. h. chiui*. In total, 40 variable positions consisting of 34 transitions, 2 transversions, 1 insertion/deletion, and 3 multiple mutational changes were observed (Table 2). Of these positions, 1–16 (0.28–4.48%) variable positions were observed within each taxon, which were classified into 21 haplotypes: 10 haplotypes of *O. quadrasi* (Oq1–Oq10), 8 haplotypes of *O. h. hupensis* (Ohh1–Ohh8), 2 haplotypes of *O. h. formosana* (Ohf1–Ohf2), and 1 haplotype of *O. h. chiui* (Ohc1) (Table 2 and Figure 1). The nucleotide sequences of all haplotypes detected in this study were submitted to GenBank under the following accession numbers: KC763451–60 are haplotypes of *O. quadrasi*, KC763461–68 are *O. h. hupensis*, KC763470–71 are *O. h. formosana*, and KC763469 is *O. h. chiui*. A minimum spanning haplotype network showed that the network of 10 haplotypes of *O. quadrasi* was clearly separated from the other haplotypes at 13 mutational points (Figure 1). The haplotypes of subspecies *O. h. hupensis*, *O. h. formosana*, and *O. h. chiui* were grouped in the same network except the two haplotypes of *O. h. hupensis* from Yunnan, which were distinctly separated from the others at 10 mutational points (Figure 1). No common haplotype was shared among/between populations of the four subspecies. The phylogenetic tree also

showed that *O. quadrasi* formed a distinct cluster from the other subspecies, whereas *O. h. hupensis*, *O. h. chiui*, *O. h. formosana*, *O. h. nosophara*, and *O. h. lindoensis* were clustered as a monophyletic group (Figure 2).

Intraspecific analyses of *O. quadrasi*. Of the 10 haplotypes of *O. quadrasi*, 1–2 unique haplotypes existed in each population. Two haplotypes were shared between two populations: Oq3 and Oq10 shared between the populations MG with TP, and AN with MB, respectively (Table 2 and Figure 1). The haplotype, nucleotide, and genetic diversity were 0.859 ± 0.019 , 0.218 ± 0.012 , and 0.215 ± 0.087 , respectively. In the neutrality test, the observed values of both Tajima's D (0.034, $P = 0.721$) or Fu's F_s (-1.279 , $P = 0.100$) suggest that natural selection may have occurred (Table 3). Significant genetic differentiation (F_{ST}) and estimated gene flow (Nm) between populations ranged from 0.556 to 1.000 and from 0.00 to 0.74, respectively (Table 4). Substantial genetic subdivision and low gene flow existed among the six populations ($F_{ST} = 0.854$; $P < 0.001$ and $Nm = 0.06$, $P < 0.001$), respectively (Table 4). The network of *O. quadrasi* haplotypes shows a star-like pattern and is significantly separated into three groups according to three provinces/islands by $F_{CT} = 0.466$ ($P < 0.05$). A significant $F_{SC} = 0.727$ ($P < 0.001$) was also observed among populations within groups (Table 5). The mismatch distribution of 12S

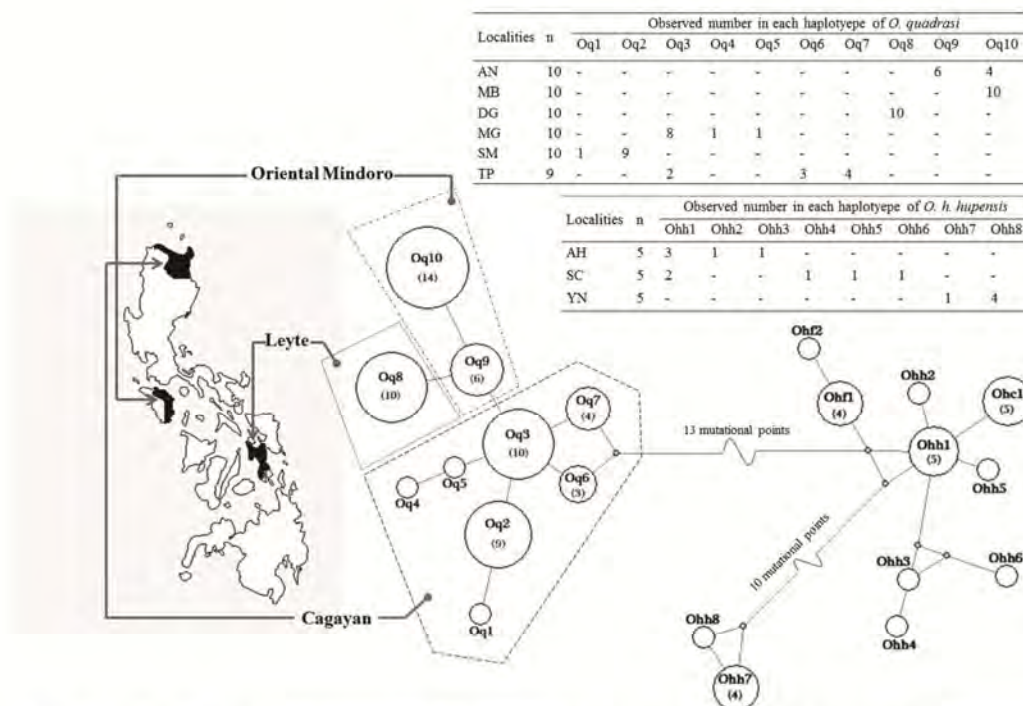


FIGURE 1. Minimum spanning haplotype network of the three subspecies of *Oncomelania hupensis* generated in based on 12S ribosomal RNA sequence. A network of *O. quadrasi* corresponds to their geographic localities in three provinces of the Philippines. The area of the circles represents the proportion of sample number (indicate in parentheses) found in each haplotype. Oq = *O. quadrasi*; Ohh = *O. h. hupensis*; Ohf = *O. h. formosana*; and Ohc = *O. h. chiui*.

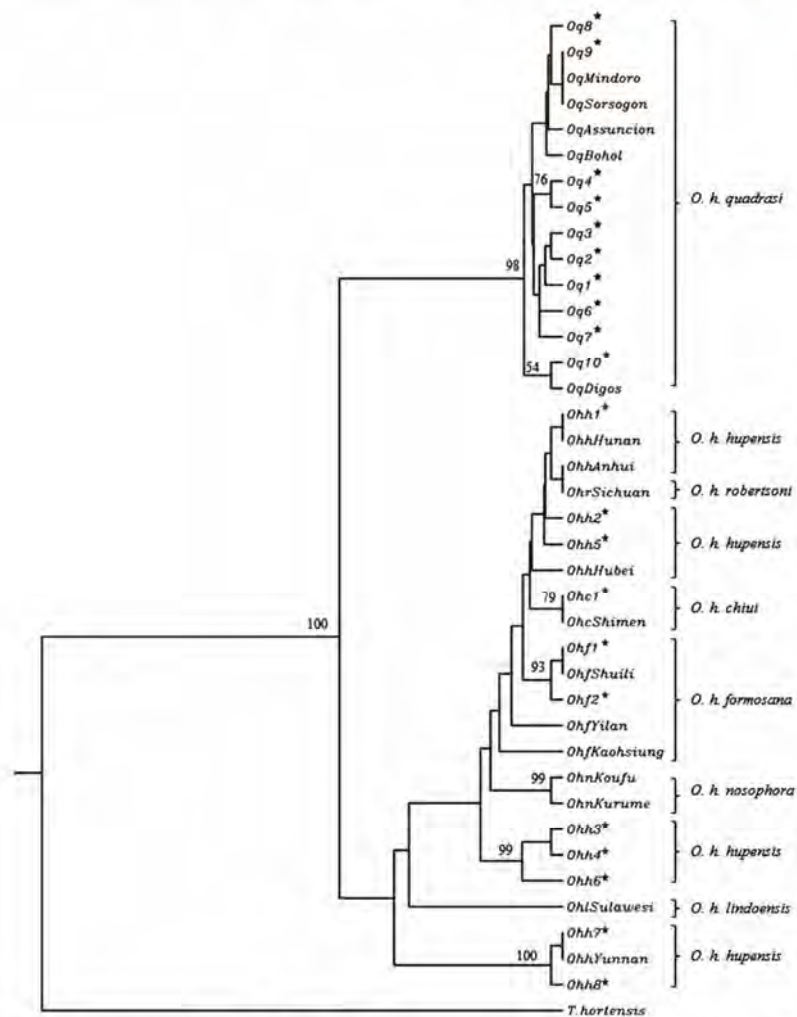


FIGURE 2. P phylogenetic tree generated from 12S ribosomal RNA sequences of *Oncomelania* snails. The star represents the haplotype samples examined in this study; other haplotype samples were obtained from Okamoto and others.¹² *Tricula hortensis* was obtained from GenBank under accession no. NC_013833 and used as an outgroup.

TABLE 3
Summary statistics of molecular variation and neutrality analysis in six populations of *Oncomelania quadrasi*, the Philippines*

Population	n	S	H	Uh	Hd	$\pi \pm SD$	$\theta_s \pm SD$	Tajima's D	Fu's Fs
AN	10	2	2	1	0.533 ± 0.095	0.107 ± 0.019	0.107 ± 0.054	1.641 (0.970)	2.338 (0.854)
MB	10	0	1	0	0.000 ± 0.000	NA	NA	NA	NA
DG	10	0	1	1	0.000 ± 0.000	NA	NA	NA	NA
MG	10	2	3	2	0.378 ± 0.181	0.056 ± 0.028	0.071 ± 0.054	-0.691 (0.218)	-0.594 (0.105)
SM	10	1	2	2	0.200 ± 0.154	0.020 ± 0.015	0.035 ± 0.035	-1.112 (0.179)	-0.339 (0.164)
TP	9	2	3	2	0.722 ± 0.097	0.106 ± 0.016	0.074 ± 0.056	1.494 (0.958)	0.453 (0.527)
All populations	59	10	10	8	0.859 ± 0.019	0.218 ± 0.012	0.215 ± 0.087	0.034 (0.721)	-1.279 (0.100)

*n = number of samples; S = number of segregating sites; H = number of haplotypes; Uh = unique haplotype; Hd = haplotype diversity; π = nucleotide diversity; θ_s = genetic diversity estimated from segregating sites; NA = not analyzed. P values are indicated in parentheses.

TABLE 4

Genetic differentiation (F_{ST}) (lower triangle) and estimated gene flow (Nm) (upper triangle) among *Oncomelania quadrasi* populations, the Philippines*

Population	AN	MB	DG	MG	SM	TP
AN	—	0.20‡	0.11	0.16	0.07	0.17
MB	0.556‡	—	0.00	0.02	0.01	0.04
DG	0.704	1.000	—	0.03	0.01	0.06
MG	0.614	0.916	0.879	—	0.09	0.74
SM	0.838	0.980	0.976	0.843	—	0.13
TP	0.588	0.868	0.820	0.258	0.789	—

* Among all populations, $F_{CT} = 0.854$ and $Nm = 0.06$ (significant at $P < 0.001$). Comparison values were significant at $P < 0.001$.

‡ $P < 0.01$.

ribosomal RNA sequences was unimodal and almost fitted the expected distribution (Figure 3).

DISCUSSION

We found that substructuring occurred between the six populations of *O. quadrasi* examined according to their geographic origin in the Philippines, similar to that described for the subspecies *O. h. hupensis* and *O. h. robertsoni* from mainland China.^{5,6} The genetic differences found for *O. quadrasi* populations from different localities in the Philippines islands may be caused by lack or low level of gene flow, especially between the three provinces located on separated islands. Furthermore, significant genetic differentiation was detected between populations within each province, e.g., example three populations in Cagayan and two populations in Oriental Mindoro Provinces, suggesting that the level of gene flow between these populations is currently low.

The mismatch distribution of the 12S ribosomal RNA haplotypes of *O. quadrasi* is markedly unimodal, which is observed when the genealogy of the sample resembles a star network, which in turn is observed during demographic expansions.¹⁶ A high level of haplotype and nucleotide diversity of *O. quadrasi* populations was observed in this study, in agreement with the results of previous studies of *O. hupensis* sp. in mainland China.^{5,6} Because of the short generation times and large effective population sizes, invertebrates, including snails, usually show a high level of genetic diversity.²¹ Moreover, in the case of *O. quadrasi*, the observed high genetic variability is also potentially related to the low mobility of the species, leading to population subdivision and potential increase global genetic diversity. Unique haplotypes for each population were found, except for MB, for which only one haplotype was observed, which was shared with an adjacent AN population from Oriental Mindoro Province. The results in this study strongly indicate that the *O. quadrasi* populations

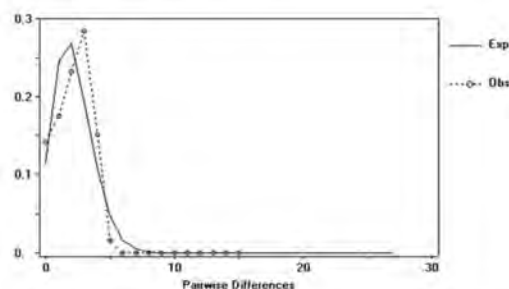


FIGURE 3. Mismatch distribution of the 59 partial 12S ribosomal RNA sequences (357 basepairs) of six *Oncomelania quadrasi* populations from the Philippines. The mismatch distribution is the distribution of the number of pairwise differences among sequences. The expected distribution under a model of expansion is given as a continuous line, and the observed distribution is given as a dashed line. Exp = experimental; Obs = observed.

in the Philippines have a substructure based on their geographical origin. However, a larger sample size from a wider range of geographic areas is needed to confirm that all unique haplotypes are specific to each particular geographic area.

Genetic differences between some *S. japonicum* isolates in the Philippines have also been noted; the isolate from Mindoro is moderately genetically differentiated from the Leyte and Luzon populations.²² We have now determined that the genetic structure of *O. quadrasi* populations from Leyte, Oriental Mindoro, and Cagayan also show significant genetic differences from each other, which was in concordance with findings of a previous report.¹³ This finding may be caused by reciprocal evolution between the parasite and its snail hosts, as indicated in several host-parasite systems, e.g., *O. viverrini* and its *Bithynia* snail hosts,^{23,24} and *S. mansoni* and its *Biomphalaria* snail hosts.⁹ Moreover, the three provinces, i.e., Cagayan, Oriental Mindoro, and Leyte, are located on separated islands so that gene flow is likely to be highly restricted, eventually resulting in high genetic differentiation between the different geographic areas. This conclusion is suggested by the significant F_{CT} differences. Such a situation has also been observed between populations of *O. h. hupensis* in mainland China, where the population genetic structure is related to geographic area and is correlated with differing shell characteristics.⁶

Another objective of our study was to establish whether *O. quadrasi* was genetically distinct from three subspecies of *O. hupensis* examined. A significant difference between *O. quadrasi* and the three subspecies was found by phylogenetic analysis of 12S ribosomal RNA. Our phylogenetic tree shows that *O. quadrasi* forms a distinct clade when compared with the *O. hupensis* ssp. Moreover, the genetic relationships of *O. h. hupensis* from Yunnan Province are distinct from the other subspecies, which is in concordance with findings of previous studies.^{6,12} Although previous morphologic and biogeographic studies of *O. hupensis* ssp. across mainland China indicate that *O. h. robertsoni* and *O. h. hupensis* have the same shell growth allometry, the shell length is on average different.²⁵ *Oncomelania h. robertsoni* has a patchy distribution in Sichuan and Yunnan Provinces above the Three Gorges, whereas *O. h. hupensis* occurs in the Yangtze River drainage below the Three Gorges.^{26,27} Both snails are probably different

TABLE 5

Analysis of molecular variance of six populations of *Oncomelania quadrasi* classified into three groups defined by island, i.e., groups of Luzon, Mindoro, and Leyte islands, the Philippines*

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	% Variation	Fixation indices
Among groups	2	40.057	0.75	46.60	$F_{CT} = 0.466†$
Among populations within group	3	19.012	0.62	38.83	$F_{SC} = 0.727‡$
Within population	53	12.422	0.23	14.57	

* Level of significance is based on 1,000 permutations. df = degrees of freedom.

† $P < 0.05$.

‡ $P < 0.001$.

at a specific level. In addition, *S. japonicum* from Yunnan also showed significant genetic differences from the other geographic isolates.²⁸ However, subspecies validity and the assignment of *O. hupensis* in mainland China and *O. quadrasi* in the Philippines remains controversial in these areas and needs to be further clarified by intensively analyzing snail morphology and using more powerful molecular markers.

Received May 14, 2013. Accepted for publication January 12, 2014.

Acknowledgments: We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (PE1611/1-3), the National Research Council of Thailand, and the International Excellence Fund of ASEAN-EU Year of Science, Technology and Innovation, 2012 for providing funding for cooperative workshops.

Financial support: This study was supported by the Japan Society for the Promotion of Science (grant no. L-11566) and TRF-CHE-MSU (grant no. MRG5480009) to Weerachai Saijuntha.

Authors' addresses: Weerachai Saijuntha, Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Maha Sarakham, Thailand, E-mail: weerachai.s@msu.ac.th, Blanca Jarilla and Takeshi Agatsuma, Division of Environmental Health Sciences, Kochi Medical School, Nankoku, Japan, E-mails: blancajarilla@yahoo.com and agatsuma@kochi-u.ac.jp, Alvin K. Leonardo and Lydia R. Leonardo, College of Public Health, University of the Philippines, Manila, Philippines, E-mail: leonardolydia7@gmail.com, Louie S. Sunico, Municipal Health Office, Municipality of Gonzaga, Cagayan, Philippines, E-mail: HRMO_gonzaga@yahoo.com, Ross H. Andrews and Paiboon Sithithaworn, Department of Parasitology, and Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, E-mails: rhandrews@gmail.com and paib.sit@hotmail.com, Trevor N. Petney, Department of Ecology and Parasitology, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany, E-mail: petney@kit.edu, Masashi Kirinoki, Naoko Kato-Hayashi, and Yuichi Chigusa, Laboratory of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan, E-mails: kirinok@dokkyomed.ac.jp, nkato@dokkyo.med.ac.jp, and ychigusa@dokkyomed.ac.jp, Mihoko Kikuchi, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki, Japan, E-mail: mkikuchi@nagasaki-u.ac.jp.

REFERENCES

- Berger SA. 2011. *Infectious Diseases of the Philippines*. Gideon e-books.
- Berger SA. 2011. *Schistosoma Japonicum: Global Status*. Gideon e-books.
- Fernandez TJ Jr, Tarafder MR, Balolong E Jr, Joseph L, Willingham AL 3rd, Belisle P, Webster JP, Olveda RM, McGarvey ST, Carabin H. 2007. Prevalence of *Schistosoma japonicum* infection among animals in fifty villages of Samar Province, the Philippines. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 147–155.
- Tarafder MR, Balolong E Jr, Carabin H, Belisle P, Tallo V, Joseph L, Alday P, Gonzales RO, Riley S, Olveda R, McGarvey ST. 2006. A cross-sectional study of the prevalence of intensity of infection with *Schistosoma japonicum* in 50 irrigated and rain-fed villages in Samar Province, the Philippines. *BMC Public Health* 6: 61.
- Hauswald AK, Remais JV, Xiao N, Davis GM, Lu D, Bale MJ, Wilke T. 2011. Stirred, not shaken: genetic structure of the intermediate snail host *Oncomelania hupensis robertsoni* in an historically endemic schistosomiasis area. *Parasit Vectors* 4: 206.
- Zhao QP, Jiang MS, Littlewood DT, Nie P. 2010. Distinct genetic diversity of *Oncomelania hupensis*, intermediate host of *Schistosoma japonicum* in mainland China as revealed by ITS sequences. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e611.
- Davis GM, Wilke T, Zhang Y, Xu XJ, Qiu CP, Spolsky CM, Oiu DC, Li Y, Xia MY, Feng Z. 1999. Snail-Schistosoma, *Paragonimus* interaction in China: population ecology, genetic diversity, coevolution and emerging diseases. *Malacologia* 41: 355–377.
- Webster JP, Davies CM. 2001. Coevolution and compatibility in the snail-schistosome system. *Parasitology* 123 (Suppl): S41–S56.
- Webster JP, Shrivastava J, Johnson PJ, Blair L. 2007. Is host-schistosome coevolution going anywhere? *BMC Evol Biol* 7: 91.
- Shi CH, Wilke T, Davis GM, Xia MY, Qiu CP. 2002. Population genetic, micro-phylogeography, ecology, and susceptibility to schistosome infection of Chinese *Oncomelania hupensis hupensis* (Gastropoda: Rissooidea: Pomatiopsidae) in the Miao river system. *Malacologia* 44: 333–347.
- Hope M, McManus DP. 1994. Genetic variation in geographically isolated populations and subspecies of *Oncomelania hupensis* determined by a PCR-based RFLP method. *Acta Trop* 57: 75–82.
- Okamoto M, Lo Chin Tson, Tiu WU, Qui Dong Chuan, Hadidjaja P, Upatham S, Sugiyama H, Taguchi T, Hirai H, Saitoh Y, Habe S, Kawanaka M, Hirata M, Agatsuma T. 2003. Phylogenetic relationships of snails of the genera *Oncomelania* and *Tricula* inferred from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Jpn J Trop Med Hyg* 31: 5–10.
- Woodruff DS, Staub KC, Upatham ES, Viyanant V, Yuan HC. 1998. Genetic variation in *Oncomelania hupensis*: *Schistosoma japonicum* transmitting snails in China and the Philippines are distinct species. *Malacologia* 29: 347–361.
- Viyanant V, Upatham ES, Blas BL, Yuan HC. 1987. Analysis of allozymes by electrofocusing in schistosome snail hosts (*Oncomelania hupensis*) from China and the Philippines. *Malacol Rev* 20: 91–96.
- Woodruff DS, Carpenter MP, Upatham ES, Viyanant V. 1999. Molecular phylogeography of *Oncomelania indoensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the intermediate host of *Schistosoma japonicum* in Sulawesi. *J Molluscan Stud* 65: 21–31.
- Slarkin M, Hudson RR. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555–562.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Excoffier L, Lischer HE. 2010. Arlequin suite ver.3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564–567.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37–48.
- Felsenstein J. 2005. *PHYMLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6*. Distributed by the author, Seattle, WA: Department of Genome Sciences, University of Washington.
- Thomas JA, Welch JJ, Lanfear R, Bromham L. 2010. A generation time effect on the rate of molecular evolution in invertebrates. *Mol Biol Evol* 27: 1173–1180.
- Woodruff DS, Merenlender AM, Upatham ES, Viyanant V. 1987. Genetic variation and differentiation of three *Schistosoma* species from the Philippines, Laos, and Peninsular Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 36: 345–354.
- Kiatsovit N, Sithithaworn P, Saijuntha W, Petney TN, Andrews RH. 2013. *Opisthorchis viverrini*: Implications of the systematics of first intermediate hosts, *Bithynia* snail species in Thailand and Lao PDR. *Infect Genet Evol* 14: 313–319.
- Saijuntha W, Sithithaworn P, Wongkham S, Laha T, Pipitgool V, Tesanu S, Chilton NB, Petney TN, Andrews RH. 2007. Evidence of a species complex within the food-borne trematode *Opisthorchis viverrini* and possible co-evolution with their first intermediate hosts. *Int J Parasitol* 37: 695–703.
- Davis GM, Zhang Y, Guo YH, Spolsky CM. 1995. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China. *Malacologia* 37: 133–156.
- Li SZ, Wang YX, Yang K, Liu Q, Wang Q, Zhang Y, Wu XH, Guo JG, Bergquist R, Zhou XN. 2009. Landscape genetics: the correlation of spatial and genetic distances of *Oncomelania hupensis*, the intermediate host snail of *Schistosoma japonicum* in mainland China. *Geospat Health* 3: 221–231.
- Zhou YB, Zhao GM, Jiang QW. 2008. Genetic variability of *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) intermediate hosts *Oncomelania hupensis* (Gredler, 1881) (Gastropoda: Rissooidea). *Annul Zool* 58: 881–889.
- Zhao QP, Jiang MS, Dong HF, Nie P. 2012. Diversification of *Schistosoma japonicum* in mainland China revealed by mitochondrial DNA. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1503.