

Abstract

Project Code : MRG5580044

Project Title : Molecular identification and phylogeny of *Angiostrongylus* from Thailand based on cytochrom c oxidase subunit I (COI) sequence

Investigator : Apichat Vitta, Faculty of Medical Science, Naresuan University

E-mail Address : apichatv@nu.ac.th

Project Period : July 2012 –July 2015

Since the basic problem of identification of *Angiostrongylus* into species level is the ambiguity of morphological characters, therefore alternative methods are needed. Molecular techniques provide a useful alternative approach for identifying nematodes that can be applied to both adult and juvenile worms. The objective of this research was to identify and study phylogeny of *Angiostrongylus* collected from natural hosts in Thailand. A total of 14,032 mollusks, namely, *Filopaludina* sp., *Pomacea canaliculata*, *Achatina fulica*, *Cryptozona siamensis*, *Cyclophorus* sp. and *Megaustenia siamensis*, were collected from 19 provinces of Thailand. The larvae of *Angiostrongylus* were isolated by artificial digestion methods following Bearmann's techniques. The genomic DNA of larvae was extracted and partial sequence of cytochrome c oxidase subunit I (COI) was amplified by polymerase chain reaction. It was found that 11 isolates of *Angiostrongylus* from 5 provinces were identical to *Angiostrongylus cantonensis* ranging from 92-99% of identity. Phylogenetic analysis separated 11 isolates of *Angiostrongylus* into 3 groups. Group I contained 1 isolate of *Angiostrongylus* isolated from *A. fulica* of Tak province and included sequence belonging to *A. cantonensis* from Bangkok, Thailand. Group II contained 5 isolates of *Angiostrongylus* from Phetchabun and Kamphaeng Phet Provinces and a reference sequence of *A. cantonensis* from Zhejiang Wenzhou, China. Group III contained 5 isolates of *Angiostrongylus* from Kalasin, Tak, and Phitsanulok Provinces and no reference sequence. This is the first record of *C. siamensis* as natural intermediate hosts for *A. cantonensis* in Thailand. The prevalence of *Angiostrongylus* in intermediate hosts will be useful for surveillance of angiostrongyliasis in Thailand.

Keywords : *Angiostrongylus*, Phylogenetic tree, Cytochrome c oxidase subunit I

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580044

ชื่อโครงการ : การจำแนกทางอนุวิทยาและสายวิวัฒนาการของพยาธิ *Angiostrongylus* ในประเทศไทย
ด้วยการใช้ลำดับเบสของยีน cytochrome c oxidase subunit I

ชื่อนักวิจัย : อภิชาติ วิทย์ตะ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

E-mail Address : apichatv@nu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : กรกฎาคม 2012 – กรกฎาคม 2015

ปัญหาพื้นฐานของการจำแนกชนิดของพยาธิ *Angiostrongylus* คือ การมีรูปร่างลักษณะที่เหมือนกัน จึงจำเป็นต้องหาวิธีการอื่นเป็นทางเลือก ซึ่งเทคนิคทางด้านอนุวิทยาที่มีประโยชน์มากในการจำแนกชนิดของหนอนตัวกลมโดยสามารถจำแนกได้ทั้งในระยะตัวเต็มวัยและระยะตัวอ่อน วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือ จำแนกชนิดและศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพยาธิ *Angiostrongylus* ที่เก็บจากโฮสต์ในธรรมชาติในประเทศไทย จากการเก็บตัวอย่างหอยทั้งหมด 14,032 ตัว จาก 19 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ *Filopaludina* sp., *Pomacea canaliculata*, *Achatina fulica*, *Cryptozonia siamensis*, *Cyclophorus* sp. และ *Megaustenia siamensis* ระยะตัวอ่อนของพยาธิ *Angiostrongylus* ถูกแยกออกด้วยวิธีย่อยด้วยน้ำย่อยเอนไซม์และวิธี Bearmann แล้วแยกสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อน เพื่อเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ด้วยวิธี polymerase chain reaction พบว่าพยาธิ *Angiostrongylus* จำนวน 11 ไอโซเลตที่แยกได้จาก 5 จังหวัดมีความเหมือนกับพยาธิปอดหนู *Angiostrongylus cantonensis* มากถึง 92-99% การวิเคราะห์ทางสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกพยาธิ *Angiostrongylus* จาก 11 ไอโซเลตเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Angiostrongylus* 1 ไอโซเลต ที่แยกได้จากหอย *A. fulica* จากจังหวัดตาก มีความใกล้ชิดกับพยาธิ *A. cantonensis* จากกรุงเทพฯ ของประเทศไทย ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Angiostrongylus* 5 ไอโซเลต ที่แยกได้จากจังหวัดเพชรบูรณ์และกำแพงเพชร มีความใกล้ชิดกับพยาธิ *A. cantonensis* จากเมือง Zhejiang Wenzhou ในประเทศจีน สำหรับกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Angiostrongylus* 5 ไอโซเลต จากจังหวัดกาฬสินธุ์ ตาก และพิษณุโลก ไม่มีความใกล้ชิดกับ *A. cantonensis* ที่เป็นอ้างอิง งานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบ *C. siamensis* เป็นโฮสต์ตัวกลางในธรรมชาติของ *A. cantonensis* ในประเทศไทย ความชุกของพยาธิปอดหนูในโฮสต์ตัวกลางมีประโยชน์สำหรับการวางแผนควบคุมโรคพยาธิปอดหนูในประเทศไทย

Keywords : พยาธิปอดหนู, สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ, Cytochrome c oxidase subunit I