



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอย *Neotricula aperta*
ในแม่น้ำโขงจังหวัดหนองคายที่มีความไวต่อการติดเชื้อพยาธิ
ใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* แตกต่างกัน

โดย ดร.ญานิน ลิ้มปานนท์

เดือนพฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๘

สัญญาเลขที่ MRG5680085

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอย *Neotricula aperta* ในแม่น้ำโขงจังหวัดหนองคายที่มีความไวต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* แตกต่างกัน

ผู้วิจัย ดร.ญาณิน ลิ้มปานนท์

สังกัด คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5680085

ชื่อโครงการ: ความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอย *Neotricula aperta* ในแม่น้ำโขงจังหวัดหนองคาย ที่มีความไวต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi* แตกต่างกัน

ชื่อนักวิจัย: ดร.ญานิน ลิมปานนท์

สถาบัน: คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : yanin.lim@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

โรคพยาธิใบไม้เลือดซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อพยาธิ *Schistosoma mekongi* มีพาหะกึ่งกลางคือ หอยฝาเดียวชนิด *Neotricula aperta* ทำให้เกิดโรค schistosomiasis การศึกษาแหล่งอาศัยของหอยพาหะนำโรค *Schistosoma mekongi* พบว่าหอย *Neotricula aperta* สามารถพบได้ในแม่น้ำโขงตอนล่างและแม่น้ำสาขา โดยในประเทศไทยพบการรายงานของหอยชนิดนี้ สายพันธุ์ alpha และ gamma บริเวณแม่น้ำโขงที่บ้านขี้เหล็ก จังหวัดอุบลราชธานี และ สายพันธุ์ beta บริเวณแม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี แม้ว่าการเกิดโรคนี้จะไม่พบในประเทศไทย แต่เนื่องจากลักษณะการติดต่อของโรค ซึ่งคนสามารถติดโรคนี้ได้โดยการสัมผัสกับน้ำที่มีพยาธิระยะติดต่อ (cercaria) รวมถึงการที่ประเทศไทยมีหอยพาหะที่สามารถนำโรคพยาธิชนิดนี้ได้ ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังการเกิดโรค และต้องมีการสำรวจหอยพาหะอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่จะเริ่มมีการเปิดประเทศเข้าสู่ประชาคมอาเซียนในปี ค.ศ. 2015 ซึ่งอาจส่งผลให้มีการผ่านเข้าออกของประชากรจากประเทศเพื่อนบ้านเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะหากประชากรจากประเทศลาวหรือกัมพูชาที่มีการติดเชื้อเข้ามา และมีสุขลักษณะการขับถ่ายที่ไม่ดีเพียงพอ อาจเกิดการปนเปื้อนของไข่พยาธิลงสู่แม่น้ำโขงซึ่งมีหอยพาหะกึ่งกลางจำนวนมาก นำไปสู่การระบาดของโรคในประเทศได้ ในการศึกษานี้ได้รายงานแหล่งอาศัยของหอย *N. aperta* ในแม่น้ำโขงจังหวัดหนองคาย ซึ่งอยู่ต้นน้ำกว่าที่จังหวัดอุบลราชธานี โดยปกติลักษณะของหอยชนิดนี้จะเกาะอยู่ตามก้อนหินธรรมชาติตามแก่งในแม่น้ำ แต่หอยที่พบในจังหวัดหนองคายพบเกาะบนก้อนหินที่ใช้เป็นเขื่อนกันตลิ่ง ซึ่งอยู่บริเวณริมน้ำ หอยที่เก็บได้จากจังหวัดหนองคาย จำนวน 4 จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ จุดที่ 1 ตำบลบ้านหม้อ อำเภอศรีเชียงใหม่ จุดที่ 2 ตำบลโพนสา อำเภอท่าบ่อ จุดที่ 3 ตำบลเวียงคุก อำเภอเมือง และจุดที่ 4 ตำบลบ้านเตือ อำเภอเมือง เมื่อนำมาตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ *S. mekongi* โดยธรรมชาติด้วยวิธี Shedding method ไม่พบว่ามี การติดเชื้อ บันทึกขนาดความยาว

เปลือกของหอยแต่ละกลุ่ม เนื่องจากพบว่าประชากรหอยในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 มีขนาดรูปร่างแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ผลการศึกษาพบว่าหอย *N.aperta* จากจังหวัดหนองคาย มี %Susceptibility ต่อการติดพยาธิ *S.mekongi* แตกต่างกัน ระหว่าง 1.9-77.5% โดยพบว่าหอยจากตำบลบ้านหม้อ ขนาดเล็ก มีอัตราการติดพยาธิสูงสุด คือ 77.5% ตามด้วย หอยจากตำบลบ้านเดื่อ 70.5% ตำบลเวียงคุก 26% ตำบลโพนสา 16.5% และ หอยจากตำบลบ้านหม้อ ขนาดใหญ่ มีอัตราการติดพยาธิน้อยที่สุด คือ 1.9% โดยเมื่อเทียบอัตราการติดพยาธิ *S.mekongi* ของหอย *N.aperta* จากจังหวัดหนองคาย ในการศึกษาที่สูงกว่าที่เคยรายงานในหอย *N.aperta* จากจังหวัดอุบลราชธานี หอยที่ได้จากการศึกษา laboratory infection ของแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจะนำมาแบ่งเป็นกลุ่มที่ติดพยาธิ (มีความไวรับ) และกลุ่มที่ไม่ติดพยาธิ (มีความต้านทาน) และนำมาศึกษาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของ mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) gene ผลการศึกษาพบว่าหอยที่กลุ่มที่มีความไวรับและหอยกลุ่มที่มีความต้านทานต่อการติด *S.mekongi* ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของ mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) gene อย่างไรก็ตามพบว่าหอยจากตำบลโพนสาและหอยตำบลบ้านหม้อ ขนาดใหญ่ ซึ่งมีอัตราการติดพยาธิน้อยกว่า 20% และเป็นหอยที่มีขนาดใหญ่กว่าหอยกลุ่มอื่นๆ ได้ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกันแยกจากหอยกลุ่มอื่น ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจใช้ mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) gene ในการจำแนกหอย *N.aperta* เป็นสายพันธุ์ชนิดที่มีความไวรับสูงและความไวรับต่ำต่อ *S.mekongi* ได้

คำหลัก : หอย *Neotricular aperta*, แม่น้ำโขง, หนองคาย, พยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mekongi*

Abstract

Project Code : MRG5680085

Project Title : Genetic Variation of High Susceptible and Low Susceptible snail intermediate host *Neotricula aperta*, from Mekong River, Nong Khai to Blood Fluke *Schistosoma mekongi*

Investigator : Dr. Yanin Limpanont

Institute: Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

E-mail Address : yanin.lim@mahidol.ac.th

Project Period : 2 years

Mekong Schistosomiasis is caused by *Schistosoma mekongi* which the snail *Neotricula aperta* is the intermediate host. Thailand is not endemic area of Mekong schistosomiasis however, the snail intermediate host has been abundantly found. The habitats of *N.aperta* in Thailand were previously reported in Mun and Mekong River only in Ubon Ratchathani Province. This study reports new habitat of *N. aperta* (gamma strain) from Mekong River in Nong Khai Province, 130 km upstream from previous reported habitat in Ubon Ratchathani Province. While the habitats of *N.aperta* in Ubon Ratchathani Province are under the natural rocks located on the islet of the middle of Mekong River, *N.aperta* in Nong Khai inhabited under the rockfill dam used for river bank soil erosion prevention. The risk of schistosomiasis transmission may increase due to common daily activities of people like fishing, swimming and any other activity involving water contact occur in those area. Moreover, the transportation and migration of people from Laos where the prevalence of Mekong schistosomiasis was reported may be the potential role to introduce the disease especially if good sanitation practice of the migrants was not adequate. *N.aperta* collected from 4 districts ie. Ban Mo, Pone Sa, Viangkuk and Ban Daue, Nong Khai were checked for natural infection by shedding method. The tested snail did not shed any Schistosome cercaria. We concluded that there is no *S.mekongi* natural infection in *N.aperta* population from Nong Khai. The snails from each sampling site were measured for shell length. The susceptibility of *N. aperta* from Nong Khai to *Schistosoma mekongi* was tested in laboratory and the infection rate also reported. The snails from Ban Mo district were divided into 2 groups due to the different of their sizes (large and small). Therefore total 5 groups ie. 1. Ban Mo (small), 2. Ban Mo (large), 3. Pone Sa, 4. Viangkuk and 5. Ban Daue were infected with *S.mekongi* miracidium stage. %Susceptibility of *N.aperta* were calculated from the number of infected snails that release cercaria after exposed with light source divided

by the total number of infected snails. %Susceptibility was vary from 1.9-77.5%. The highest was found in the snails from Ban Mo (small) (77.5%) followed by Ban Daue (70.5%), Viangkuk (26%), Pone Sa (16.5%) and Ban Mo (large) (1.9%) respectively. The susceptibility of *N.aperta* from Nong Khai province in this study was higher than the report from Ubon Ratchathani Province. The *S.mekongi*-positive and negative snails from each sampling site will be grouped into susceptible and resistant groups. The genetic variation among susceptible and resistant groups from different sampling sites were evaluated by sequencing of Cytochrome oxidase subunit I (COI) genes. The susceptible snail (shedded cercaria) and the resistant snail (not shedded cercaria) did not show difference of COI. However the snails from Pone Sa and Ban Mo (large) which had lower infection rate (<20%) was grouped in same cluster apart from others. The COI gene and morphology may useful to identify the high and low susceptibility *N.aperta* strains to *S.mekongi* infection.

Keywords : *Neotricular aperta*, Mekong River, Nong Khai, Blood fluke *Schistosoma mekongi*

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้เลือดซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อพยาธิ *Schistosoma mekongi* มีพาหะกึ่งกลางคือ หอยฝาดียวชนิด *Neotricula aperta* ทำให้เกิดโรค schistosomiasis พบได้ในประเทศเพื่อนบ้านของไทย ได้แก่ กัมพูชา และลาว วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้เลือดกลุ่ม Schistosome เริ่มจากไข่พยาธิที่ปนเปื้อนมากับอุจจาระของคนหรือสัตว์ที่เป็นโรคเมื่อตกลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะฟักเป็นระยะ miracidium ซึ่งจะไชเข้าสู่หอยพาหะกึ่งกลาง เจริญเติบโตอยู่ในหอยพาหะ เข้าสู่ระยะ sporocyst แบ่งตัวและเจริญเป็นระยะ cercaria ซึ่งสามารถไชผ่านผิวหนังของคนหรือสัตว์ และไปเจริญเติบโตอยู่ในร่างกายและวางไข่บริเวณตับทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินอาหาร ตับและม้ามโต แม้ว่าการเกิดโรคนี้จะไม่พบในประเทศไทย แต่เนื่องจากลักษณะการติดต่อของโรค ซึ่งคนสามารถติดโรคนี้ได้โดยการสัมผัสกับน้ำที่มีพยาธิระยะติดต่อ (cercaria) รวมถึงการที่ประเทศไทยมีหอยพาหะที่สามารถนำโรคพยาธิชนิดนี้ได้ ทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังการเกิดโรค และต้องมีการสำรวจหอยพาหะอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่จะเริ่มมีการเปิดประเทศเข้าสู่ประชาคมอาเซียนในปีค.ศ. 2015 ซึ่งอาจส่งผลให้มีการผ่านเข้าออกของประชากรจากประเทศเพื่อนบ้านเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะหากประชากรจากประเทศลาวหรือกัมพูชาที่มีการติดเชื้อเข้ามา และมีสุขลักษณะการขับถ่ายที่ไม่ดีเพียงพอ อาจเกิดการปนเปื้อนของไข่พยาธิลงสู่แม่น้ำโขงซึ่งมีหอยพาหะกึ่งกลางจำนวนมาก นำไปสู่การระบาดของโรคในประเทศไทยได้

การศึกษาแหล่งอาศัยของหอยพาหะนำโรค *Schistosoma mekongi* พบว่าหอย *Neotricula aperta* สามารถพบได้ในแม่น้ำโขงตอนล่างและแม่น้ำสาขา โดยมีรายงานการพบหอยชนิดนี้ที่ Ban Sabouxai, Suvannakhet ประเทศลาว และพบที่บ้านด่าน จังหวัดอุบลราชธานี และที่ Kratie ประเทศกัมพูชา โดยในประเทศไทยพบการรายงานของหอยชนิดนี้ สายพันธุ์ alpha และ gamma บริเวณแม่น้ำโขงที่บ้านขี้เหล็ก จังหวัดอุบลราชธานี และ สายพันธุ์ beta บริเวณแม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 อย่างไรก็ตามจากการสำรวจหอยน้ำจืดของทีมนักวิจัยในปีที่ผ่านมาพบว่าที่แม่น้ำโขงในจังหวัดหนองคายซึ่งอยู่ต้นน้ำกว่าที่จังหวัดอุบลราชธานี เป็นแหล่งอาศัยของหอย *N. aperta* เช่นกัน โดยยังไม่เคยมีรายงานการพบหอยชนิดนี้ในบริเวณดังกล่าว ประกอบกับพื้นที่มีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรค เช่น ใกล้กับท่าเรือข้ามชายแดนไทย-ลาว หรือเป็นพื้นที่ที่ประชาชนมีโอกาสสัมผัสกับน้ำ (เข้ามาเล่นน้ำ จอดเรือ) เป็นต้น ทำให้ในการศึกษารั้งนี้ เลือกพื้นที่ศึกษาในจังหวัดหนองคาย เพื่อต้องการทราบถึงการแพร่กระจายของหอยในพื้นที่และความไวรับของหอย *N. aperta* ในจังหวัดหนองคายต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดชนิด *Schistosoma mekongi*

เนื่องจากการศึกษาการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดในห้องปฏิบัติการ ต้องใช้เวลาในการเลี้ยงหอยเป็นระยะเวลาเกือบ 2 เดือน ซึ่งเป็นเวลานาน และต้องมีห้องปฏิบัติการสำหรับผลิตไดอะตอมสำหรับเป็นอาหารให้กับหอย ซึ่งใช้เวลาและแรงงานมาก ในการศึกษานี้จึงต้องการหาความแตกต่างทางพันธุกรรม

ของหอยที่มีความไวรับและไม่มีความไวรับต่อเชื้อ *S. mekongi* เพื่ออาจนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการจำแนกหอยในการศึกษาการแพร่กระจายโรคพยาธิใบไม้เลือดในอนาคต ทดแทนการศึกษาการติดเชื้อพยาธิในหอยปฏิบัติการ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของ DNA sequence ของ mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) และ mitochondrial 16s rRNA gene ซึ่งมีรายงานว่า เป็นตำแหน่งยีนที่เหมาะสมต่อการศึกษา geographical pattern และ genetic subpopulation

2. วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาความไวรับของหอย *Neotricula aperta* (gamma strain) ที่อาศัยในแม่น้ำโขง จังหวัดหนองคายต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดชนิด *Schistosoma mekongi*
- เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอย *Neotricula aperta* (gamma strain) ที่มีความไวรับต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดชนิด *Schistosoma mekongi* แตกต่างกัน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

- การกำหนดพื้นที่ศึกษา
พื้นที่จังหวัดหนองคายที่ติดกับแม่น้ำโขง ได้แก่ อำเภอสังคม อำเภอศรีเชียงใหม่ อำเภอน้ำโสม อำเภอเมืองจังหวัดหนองคาย อำเภอโพนพิสัยและอำเภอรัตนวาปี ซึ่งคิดเป็นความยาวของแม่น้ำประมาณ 100 กิโลเมตร การสำรวจพื้นที่สำหรับเก็บตัวอย่างจะกระจายไปตลอดแม่น้ำโขง แต่เนื่องจากที่อยู่อาศัยของหอยชนิดนี้มีลักษณะจำเพาะ ทำให้ไม่สามารถอยู่ได้ตลอดลำน้ำ อาจพบได้จำกัดเป็นบางจุด ดังนั้นการเลือกพื้นที่เก็บตัวอย่างจะใช้เกณฑ์ดังนี้ (1) เป็นพื้นที่ที่มีลักษณะเหมาะสมในการเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของหอย *N.aperta* ได้แก่ บริเวณที่น้ำตื้น มีความลึกไม่เกิน 3 เมตร น้ำใส และมีก้อนหินกระจายอยู่บริเวณพื้นน้ำ หรือบริเวณเกาะ แก่ง กลางแม่น้ำ และ (2) เป็นบริเวณที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคพยาธิใบไม้เลือด เช่น บริเวณท่าเรือ ด้านข้ามชายแดนไทย-ลาว หรือบริเวณที่ประชาชนมีโอกาสสัมผัสกับน้ำสูง เช่น เล่นน้ำ หรือเป็นแหล่งท่องเที่ยว โดยหลังจากสำรวจพื้นที่แล้ว จะพยายามเลือกจุดเก็บตัวอย่างอย่างน้อย 3 จุด ให้กระจายในแต่ละอำเภอให้มากที่สุด เพื่อจะได้เห็นการกระจายของหอยชนิดนี้ในจังหวัดหนองคาย

- การเก็บตัวอย่างหอย

เก็บก้อนหินซึ่งเป็นที่ยึดเกาะของหอย *N.aperta* เก็บตัวอย่างโดยใช้แปรง บันทึกจุดเก็บตัวอย่างด้วยระบบ GIS นำหอยที่เก็บได้กลับมาศึกษาต่อที่ห้องปฏิบัติการภาควิทยาศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงในถาดเลี้ยง ให้อาหารด้วยไดอะตอม เปลี่ยนน้ำเป็นระยะ

- การตรวจการติดเชื้อ *S.mekongi* ในหอยจากธรรมชาติ (natural infection)
หลังจากเลี้ยงหอยปรับสภาพเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ นำหอยที่ได้มาตรวจหา furcocercous cercaria ชนิดไม่มี eye spot ซึ่งเป็นลักษณะของ *S.mekongi* โดยวิธีการ shedding method

- การทำให้หอย *N.aperta* ติดเชื้อ *S.mekongi* ในห้องปฏิบัติการ
เก็บไข่พยาธิไปไม่เลือกจากหนู ICR mice ที่ติดเชื้อ *S.mekongi* (รายละเอียดตั้งข้อเสนอโครงการวิจัย) นำมากระตุ้นด้วยแสงไฟให้ miracidia ออกจากไข่ นับจำนวน miracidia และนำมาใช้ในการ infect หอย *N.aperta* โดยการให้หอยสัมผัสกับพยาธิโดยตรงในน้ำ ใช้อัตรา 5 miracidia ต่อหอย 1 ตัว และใช้หอยในการทดลองกลุ่มละ 200 ตัว เลี้ยงหอยในที่มืด เป็นระยะเวลา 6-8 สัปดาห์ โดยนำหอยมาตรวจการติดพยาธิด้วยวิธี shedding method เป็นระยะ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง รายงานผลเป็น infection rate ของแต่ละ sampling site

- DNA amplification and sequencing
หอยที่ได้จากการศึกษา laboratory infection ของแต่ละ sampling site จะนำมาแบ่งเป็นกลุ่มที่ติดพยาธิ (มีความไวรับ) และกลุ่มที่ไม่ติดพยาธิ (มีความไวรับต่ำ) ทำการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) และ mitochondrial 16s rRNA gene เก็บรักษา Genomic DNA ที่ได้เพื่อใช้เป็น template สำหรับส่ง DNA sequencing โดย thermal cycle sequencing นำ sequence ที่ได้มาหาความแตกต่างระหว่างหอยที่มีความไวรับและไม่มีความไวรับโดยใช้ Clustal W program

3. ผลการศึกษา

จุดที่พบหอย *N.aperta* ในจังหวัดหนองคาย

การสำรวจบริเวณพื้นที่จังหวัดหนองคายที่ติดกับแม่น้ำโขง เพื่อเก็บตัวอย่างหอย *N.aperta* ซึ่งในการสำรวจครั้งแรกเดือน พฤษภาคม 2556 พบอุปสรรคเรื่องระดับน้ำที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของระดับน้ำแม่น้ำโขงปีอื่น กระแสน้ำแรงและขุ่น เนื่องจากปริมาณน้ำฝนมาก และส่วนหนึ่ง ตั้งข้อสันนิษฐานว่า อาจเกิดจากการปล่อยน้ำจากเขื่อนของประเทศจีน ทำให้การเข้าถึงแหล่งอาศัยของหอยเป็นไปด้วยความยากลำบาก และอาจเป็นอันตรายต่อผู้สำรวจ จึงต้องปรับแผนการดำเนินงาน จึงต้องออกเก็บตัวอย่างอีกครั้ง ในฤดูแล้ง เพื่อให้น้ำลดระดับลงจนสามารถลงไปเก็บก้อนหินที่เป็นแหล่งอาศัยของหอย *N.aperta* ได้

การสำรวจครั้งที่ 2 ในช่วงเดือนเมษายน 2557 สามารถเก็บตัวอย่างหอยได้ทั้งหมด 4 จุด จาก 1) ตำบลบ้านหม้อ อำเภอศรีเชียงใหม่ 2) ตำบลโพนสา อำเภอท่าบ่อ 3) ตำบลเวียงคุก อำเภอเมืองหนองคาย และ 4) ตำบลบ้านเดื่อ อำเภอเมืองหนองคาย

การตรวจการติดเชื้อ *S.mekongi* ในหอยจากธรรมชาติ (natural infection)

นำหอยที่ได้มาตรวจหา furcocercous cercaria ชนิดไม่มี eye spot ซึ่งเป็นลักษณะของ *S.mekongi* โดยการส่องตรวจหอยจากแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง จุดละ 30 ตัว ด้วยวิธีการ shedding method ไม่พบ cercaria

การศึกษาความไวรับของ *N.aperta* ต่อการติดเชื้อ *S.mekongi* ในห้องปฏิบัติการ

ตรวจสอบความไวรับของหอยแต่ละกลุ่มโดยวิธี Shedding method สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เริ่มตั้งแต่วันที่ 43 พบว่าหอยแต่ละกลุ่มมีอัตราการตายและมีความไวรับต่อการติดเชื้อ *S.mekongi* แตกต่างกัน โดยมี %susceptible อยู่ระหว่าง 1.9 – 77.5% โดยพบว่าหอยจากตำบลบ้านหม้อ ขนาดเล็ก มีอัตราการติดพยาธิสูงสุด คือ 77.5% ตามด้วย หอยจากตำบลบ้านเดื่อ 70.5% ตำบลเวียงคุก 26% ตำบลโพนสา 16.5% และ หอยจากตำบลบ้านหม้อ ขนาดใหญ่ มีอัตราการติดพยาธิน้อยที่สุด คือ 1.9% และมีระยะเวลาเริ่มปล่อย cercaria แตกต่างกัน โดยกลุ่มที่เริ่มพบ cercaria shedding เร็วที่สุดคือที่ 50 วัน (บ้านหม้อ, ขนาดเล็ก) และ กลุ่มที่เริ่มพบ cercaria shedding ช้าที่สุดคือที่ 169 วัน (บ้านหม้อ, ขนาดใหญ่)

การศึกษาความแปรผันของ mt cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) และ mt 16s rRNA gene

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ mt cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) และ mt 16s rRNA gene เบื้องต้นจากหอย *N.aperta* จากจังหวัดหนองคายพบว่า mt 16s rRNA gene ของแต่ละตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน จึงเลือกใช้ mt cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) ในการศึกษาความแตกต่างของหอยที่มีความไวรับและมีความต้านทานต่อการติดพยาธิ *S.mekongi* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI gene จำนวน 43 ตัวอย่าง มีความยาวอยู่ในช่วง 679-686 คู่เบส เมื่อปรับสาย DNA ด้วยโปรแกรม Bioedit ได้ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 678 คู่เบส นำไปวิเคราะห์และสร้าง Phylogenetic tree ไม่พบว่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mt cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) gene มีความสัมพันธ์กับความไวรับของหอยต่อพยาธิใบไม้เลือด *S.mekongi* อย่างไรก็ตามพบว่าหอยจากตำบลโพนสาและหอยตำบลบ้านหม้อ ขนาดใหญ่ ซึ่งมีอัตราการติดพยาธิน้อยกว่า 20% และเป็นหอยที่มีขนาดใหญ่กว่าหอยกลุ่มอื่นๆ ได้ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกันแยกจาก

หอยกลุ่มอื่น ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจใช้ mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) gene ร่วมกับลักษณะทาง morphology ในการจำแนกหอย *N.aperta* เป็นสายพันธุ์ชนิดที่มีความไวรับสูงและความไวรับต่ำต่อ *S.mekongi* ได้

4. วิจัยรณผลการศึกษา

การศึกษานี้พบว่าหอย *N.aperta* จากจังหวัดหนองคาย สามารถติดเชื้อพยาธิใบไม้ชนิด *Schistosoma mekongi* ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอัตราการติดเชื้อที่พบสูงกว่าที่เคยรายงานในหอยจากจังหวัดอุบลราชธานี ประกอบกับแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยที่พบ คือ ก้อนหินริมน้ำ เป็นการสนับสนุนว่าการเฝ้าระวังการเกิดโรคพยาธิใบไม้เลือด ต้องคำนึงถึงการเกิดโรคในจังหวัดหนองคายด้วย ซึ่งแต่เดิมการศึกษาจำกัดอยู่เพียงแม่น้ำโขงและแม่น้ำมูลบริเวณจังหวัดอุบลราชธานีเท่านั้น

แม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่พบความแตกต่างของ mt cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) gene ในหอยที่มีความไวรับและหอยที่มีความต้านทานต่อ *S.mekongi* แต่จากข้อมูล %susceptibility บ่งชี้ว่า หอยจากแหล่งที่อยู่อาศัยต่างกัน อาจมีความไวรับไม่เท่ากัน และขนาดอาจมีผลต่อการติดโรค ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงลักษณะทางพันธุกรรมของหอยที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรค

**Genetic Variation of High Susceptible and Low Susceptible snail intermediate host
Neotricula aperta, from Mekong River, Nong Khai to Blood Fluke *Schistosoma mekongi***

Introduction

Mekong Schistosomiasis is caused by *Schistosoma mekongi* which the snail *Neotricula aperta* is the intermediate host. Clinical signs and symptoms of Mekong schistosomiasis are cachexia, hepatosplenomegaly, stunting and retardation of puberty, decompensation of portal hypertension with ascites and rupture of esophageal varices. Esophageal bleeding is usually the cause of death (Urbani et al, 2002). All known endemic areas lie along the Mekong river and include Champassac Province, of southern Laos, and Cambodia north of Kratié (Attwood et al, 2001; Muth et al., 2011). Although the prevalence of Mekong schistosomiasis was not found in Thailand, the natural snail intermediate host, *Neotricula aperta* gamma strain, was known that inhabit in Mekong River Basin in Ubon Ratchathani. Moreover, Asian Economic Community (AEC) will start in 2015. Then, people movements across the border will be enormous. It is known that *S. mekongi* is reported in Laos PDR. Therefore the survey of *N.aperta* along Mekong River, especially Thai-Lao border is needed in order to develop monitoring strategy of Mekong schistosomiasis in Thailand.

From the review of Attwood and Upatham (2012), *N. aperta* is found only in shallow areas (typically 0.5 to 3 m deep) of the lower Mekong River and some of its tributaries ranging from Ban Sabouxai, Suvannakhet Province, Laos, to Ban Dan, Ubon Ratchathani Province, Thailand. However the recent annual snail survey of Department of Social and Environmental Medicine revealed that the habitats of *N. aperta* γ strains were also found in upstream of Mekong River Basin in Nong Khai where never been reported before. It is obvious that some of *N. aperta* habitats were disrupted area from human intervention or human activities which may

alter the ecological balance of intermediate host habitats. Some of *N. aperta* habitats found in the survey may be able to increase the risk of disease transmission because the common daily activities of people like fishing, swimming and any other activity involving water contact occur in those areas. Moreover, the transportation and migration of people from Laos where the prevalence of Mekong schistosomiasis was reported may be the potential role to introduce the disease especially if good sanitation practice of the migrants was not adequate.

Even though, the region of Thailand is not an endemic area of Mekong schistosomiasis but where the potential intermediate host has been abundantly found. The surveillance of the natural infection in snail intermediate host *N. aperta* together with the laboratory susceptibility to *S. mekongi* should be conducted to understand the potential of *N. aperta* inhabit in Thailand regions of Mekong River to act as an intermediate host of the disease.

There are several reports indicating the different susceptibility level of *N. aperta* to *Schistosoma mekongi* but most of them focus on the snail population in Mekong River Basin in Cambodia and Laos (Shimada et al, 2007; Attwood et al, 1997). The susceptibility of *N. aperta* was tested only by laboratory infection which took more than 1 month.

In this study, the natural and laboratory *S. mekongi* infection of *N. aperta* inhabit in Nong Khai will be evaluated to determine the susceptibility level and we also try to define the genetic variation between high susceptibility and low susceptibility of *N. aperta* population to *S. mekongi* by comparing DNA sequence of mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) and mitochondrial 16S rRNA gene of *N. aperta* which may be used as a marker for *S. mekongi* susceptibility in the future surveillance.

Objective

1. To examine the susceptibility of *Netricula aperta* gamma-strain collected from Nong Khai, along Mekong River to *S. mekongi*
2. To determine the informative loci as a marker for detection of susceptibility in *N. aperta* to *S. mekongi*

Methodology

1. Sampling site identification

Approximately three sampling sites of *N. aperta* will be chosen from the shore along Mekong River in Nong Khai. The criteria of sampling site selection will depend on:

- The characteristic of the suitable area for snail habitat. *N. aperta* is exclusively epilithic or epixylic (on rotting wood), found only in shallow areas (typically 0.5 to 3 m deep) of the Mekong River and some of its tributaries. The snails are restricted to areas where the current is moderate (around $2 \times 10^3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), clear and the bed rock forms (almost flat) platforms where algal aufwuchs is extensive. The islet on the middle of the river or the bank of the river are the good place for snail habitat.

- The area where the transmission of the disease might occur such as immigration at Thai-Laos border, area that has water contact activity (swimming, laundry areas) and boat mooring.

2. Collection of *N. aperta*

The stones or rotten wooden sticks will be picked up from the Mekong River and search for the colonies of *N. aperta*. Small brushes and forceps were used to remove snails from stones found in the river. The sampling areas will be recorded by GIS. The snails will be maintained in plastic thermos with 24 hr-aeration until sent to laboratory at the Department of Social and Environmental Medicine, Faculty of Tropical Medicine Mahidol University, Bangkok, Thailand.

3. Detection of *S. mekongi* natural infection in *N. aperta*

One week after collection, the snails will be examined for the natural infection of *S. mekongi*. The snails will be exposed to white light for 2 hr and examined for the shedding of furcocercous cercariae (lacking eye spot) which are judged as a sign of a patent infection with *S. mekongi*.

4. Laboratory infection of *N. aperta* with *S. mekongi*

S. mekongi originally isolated from a positive dog taken from Khong Island, Laos in 1970. *N. aperta* was maintained as an intermediate host and ICR mice as the definitive host in Applied Malacology Laboratory, Department of Social and Environmental Medicine, Faculty of Tropical Medicine. ICR mice were anesthetized by intraperitoneal injection with 5% pentobarbital sodium (Abbot Laboratories, USA) 40 mg/kg and cercariae were applied to the abdominal skin for 1 hr. Infected mice were maintained in the Laboratory for at least 8 weeks before dissection. To collect the miracidia for infect the snail, liver and intestine were excised from ICR mice and the organs were cut into pieces and homogenized in a Waring blender. Samples were suspended in normal saline, allowed to precipitate and then transferred to distilled water and exposed to fluorescent light. Hatched miracidia were collected with a micropipette, counted under a dissecting microscope. Then 200 *N. aperta* γ -strain snails from each sampling sites will be individual exposed with 5 miracidia. Exposed *N. aperta* were reared in aerated filtered water in the dark room. From week 6 until week 8, the snails were exposed to light for 2 h weekly for shedding of cercariae. The emerging cercariae were counted under a dissecting. The infective rate of each sampling sites will be recorded.

5. DNA amplification and sequencing

After the laboratory infection, the snails from each sampling sites will be divided into high susceptible (positive of infection) and low susceptibility (negative of infection). The snails were gently crushed and the body separated from the shell. The gut and digestive gland were

removed and DNA extracted from the remainder by standard methods. Selected DNA sequences were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Amplification of a section of the coding region of the mt cytochrome-c oxidase subunit 1 (CO1) was achieved with the universal primer (HCO-2198 and LCO-1490 primer pair) developed by Folmer et al (1994), following the recommended cycling conditions. Part of the mt 16s rRNA gene was amplified using the primers of Palumbi et al (1991).

Total genomic DNA was used as a template for PCR amplification using standard PCR condition. Sequences were determined directly from the PCR template by thermal cycle sequencing. Sequences from high susceptibility and low susceptibility snails were assembled and aligned using CLUSTAL W program.

Results

N.aperta habitat

The survey of *N.aperta* habitat performed in May 2013 was unable to collect any snails. The high level of Mekong River is the important obstacle for survey team to reach the snail's habitat which is under the rock in Mekong River (Figure 1A). The water level was higher than average water level recorded from Mekong commission. The current was strong and turbid which may caused by the high precipitation rate in that year and the water from Chinese dam.

The second attempt to collect the snails from Nong Khai was done in dry season during 21-25 April, 2014 (Figure 1B). The water level was 1.96-2.0 meters. In that time, the survey team was able to pick up the rock under the water and observed for *N. aperta*. *N.aperta* attached on the below side of the rock. The snails were collected by brush and kept in plastic bowl with aeration until went back to laboratory. The sampling site in May 2013 and in April 2014 is shown in table 1. We found total 4 locations (Table 2 & Figure 2) that could collect the snails for laboratory infection. The water quality of each sampling sites was shown in table 3.

Most of water quality parameter in April 2014 was similar to those in May 2013 except water turbidity. In May 2013 the turbidity was 48.5-60.5 NTU but decrease to 14.2-14.6 NTU in the second survey in April 2014.



Figure 1 Water level of Mekong River, Nong Khai on 17 May 2013 (1A) and 23 April 2014 (1B).

Table 1 Sampling site on May 2013 and April 2014

Sampling site	Sub district	District	May 2013	April 2014
1	Ban Mo	Si Chiang Mai	+ (N=4)	+
2	Ban Mo	Si Chiang Mai	-	-
3	Panprao	Si Chiang Mai	-	-
4	Pone Sa	Tha Bo	+ (N=10)	+
5	Wiang Kuk	Mueang Nong Khai	-	+
6	Ban Dua	Mueang Nong Khai	ND	+

+ *N.aperta* was found - *N.aperta* was not found ND not determined

Table 2 *Neotricula aperta* sampling sites.

Sampling site	Sub district	District	Province
1	Ban Mo	Si Chiang Mai	Nongkhai
2	Pone Sa	Tha Bo	Nongkhai
3	Wiang Kuk	Mueang Nong Khai	Nongkhai
4	Ban Dua	Mueang Nong Khai	Nongkhai

Figure 2 The location of *Neotricula aperta* habitat in Nong Khai, Thailand

- ❶ Ban Mo, Si Chiang Mai district
- ❷ Pone Sa, Tha Bo district
- ❸ Wiang Kuk, Mueang Nong Khai district
- ❹ Ban Dua, Mueang Nong Khai district

Table 3 Water quality of *Neotricula aperta* habitats

site	Water temp (°C)	salinity (%)	DO (mg/L)	pH	hardness (mg/L)	Turbidity (ntu)	Phosphorus (mg/L PO ₄ ³⁻)	Ammonia (mg/L NH ₃ -N)	nitrate (mg/L NO ₃ --N)	Nitrite (mg/L NO ₂ --N)	Velocity (m/s)	conductivity (S/m)
1	29.5	0.13	6.52	8.41	171	14.2	0.12	0.1	0.2	0.002	0.67	315
2	29.4	0.13	6.42	8.12	171	14.2	0.15	0.13	0.3	0.001	0.67	313
3	30	0.13	7.02	8.13	171	14.6	0.09	0.26	0.3	0.001	0.67	318
4	31.4	0.14	6.65	8.46	171	14.6	0.11	0.12	0.5	0.002	0.67	328

N.aperta in site 1 (Ban Mo, Si Chiang Mai district), 2 (Pone Sa, Tha Bo district) and 3 (Wiang Kuk, Mueang Nong Khai district) inhabited under the rockfill dam used for river bank soil erosion prevention. While *N.aperta* in site 4 (Ban Dua, Mueang Nong Khai district) were found under small natural rock near the river bank. Figure 3-6 showed the sampling sites of *N.aperta*.



Figure 3 Site ❶ Ban Mo, Si Chiang Mai district



Figure 4 Site ❷ Pone Sa, Tha Bo district



Figure 5 Site ③ Wiang Kuk, Mueang Nong Khai



Figure 6 Site ④ Ban Duae, Mueang Nong Khai

N.aperta characteristics

N.aperta collected from all sampling sites in Nong Khai were identified as gamma race based on their morphology and molecular identification. The unique character of gamma race is having 4 black pigment spots on the mantle which clearly seen. The average shell length of the snails varied in different sampling sites from 1.09 - 3.53 mm. The snails from Ban Mo (site 1) were divided into 2 types depended on their size and their color. The snail pictures were demonstrated in Figure 7-11.

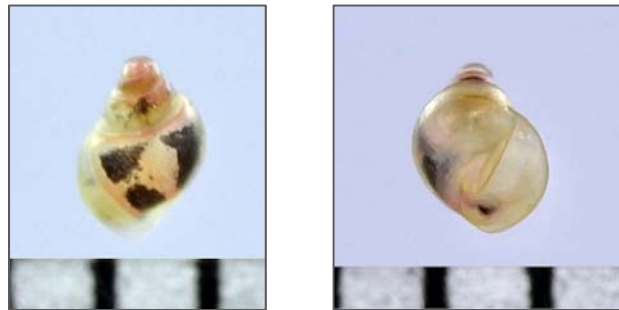


Figure 7 *Neotricula aperta* from Ban Mo Type 1 (small)

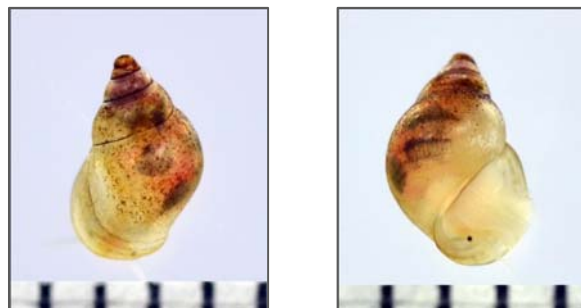


Figure 8 *Neotricula aperta* from Ban Mo Type 2 (large)

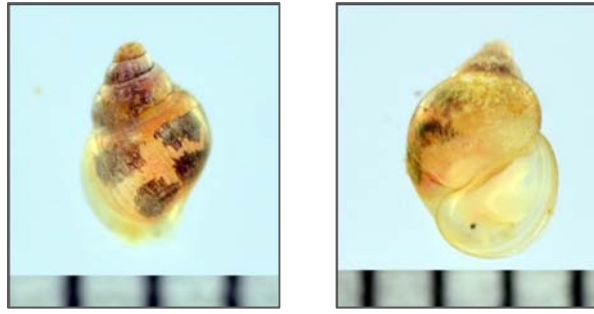


Figure 9 *Neotricula aperta* from Pone Sa



Figure 10 *Neotricula aperta* from Viangkuk

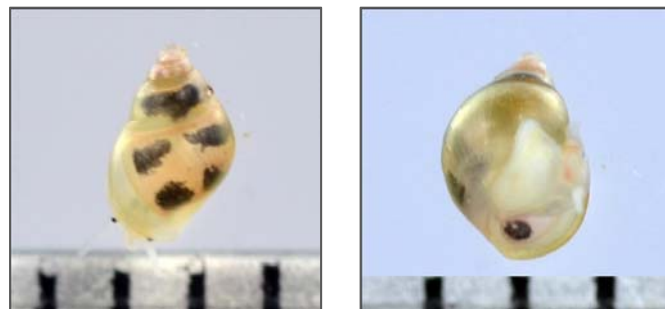


Figure 11 *Neotricula aperta* from Ban Duae

The average shell length of the snails in each group are significant different ($p < 0.05$). The smallest snail was from site 1 Ban Mo (small) (1.60 ± 0.23) mm followed by site 3 Viangkuk (1.90 ± 0.27), Site 4 Ban Duae (2.50 ± 0.28), site 1 Ban Mo (large) (2.69 ± 0.32) and site 2 Pone Sa (3.03 ± 0.34), respectively. Shell length of *N.aperta* was shown in Table 4 and Figure 12.

Table 4 Shell length (mm) of *N.aperta* collected from Nongkhai

Group	Mean	N	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Site 1 Ban Mo type 1	1.6027	100	.22706	1.09	2.35
Site 1 Ban Mo type 2	2.6905	100	.32002	2.02	3.44
Site 2 Pone Sa	3.0316	100	.33835	2.02	3.53
Site 3 Vieangkuk	1.8992	100	.27380	1.34	2.69
Site 4 Ban Daue	2.5015	100	.27759	1.68	3.11
Total	2.3451	500	.59745	1.09	3.53

Figure 12 Average shell length (mm) of *N.aperta* collected from Nongkhai.

Laboratory infection of *N. aperta* with *S. mekongi*

After the snails were infected with *S.mekongi* miracidium, the snails were stimulated for cercariae shedding every week after 43 days of infection. The snails from each sampling site showed different susceptibility to the infection and mortality. %Susceptibility of *N.aperta* were calculated from the number of infected snails that release cercaria after exposed with light source divided by the total number of infected snails. %Susceptibility varied from 1.9-77.5%. The highest was found in the snails from Ban Mo (small) (77.5%) followed by Ban Daue (70.5%), Viangkuk (26%), Pone Sa (16.5%) and Ban Mo (large) (1.9%) respectively (Table 5 & Figure 13). The earliest cercaria shedding was found within 50 days in the snail from site 1 (type 1, small) .While the snails from site 1 (type2, large) started releasing cercaria after 169 days (Figure 14). The onset and duration of cercaria shedding were shown in Figure 14. Mortality rate was shown in Table 5 and Figure 15.

Table 5 %Susceptibility of *N.aperta* from Mekong River, Nong Khai to *S.mekongi* infection compared with *N.aperta* from Ubon Ratchathani Province and %mortality of *N.aperta* after 180 days of infection

Strain	Location	%Mortality	% Susceptible
gamma	Ban Mo, Nongkhai,Type 1 (small)	9.5	77.5
gamma	Ban Mo, Nongkhai,Type 2 (large)	45.7	1.9
gamma	Pone-Sa, Nongkhai	47	16.5
gamma	Viangkuk, Nongkhai	37	26
gamma	Ban Daue, Nongkhai	21.5	70.5
*alpha	Khammarat, Ubon Ratchatani	-	2.7
*gamma	Khammarat, Ubon Ratchatani	-	20
*beta	Pibun Mungsahan, UR	-	58.5

* Upatham et al. 1980

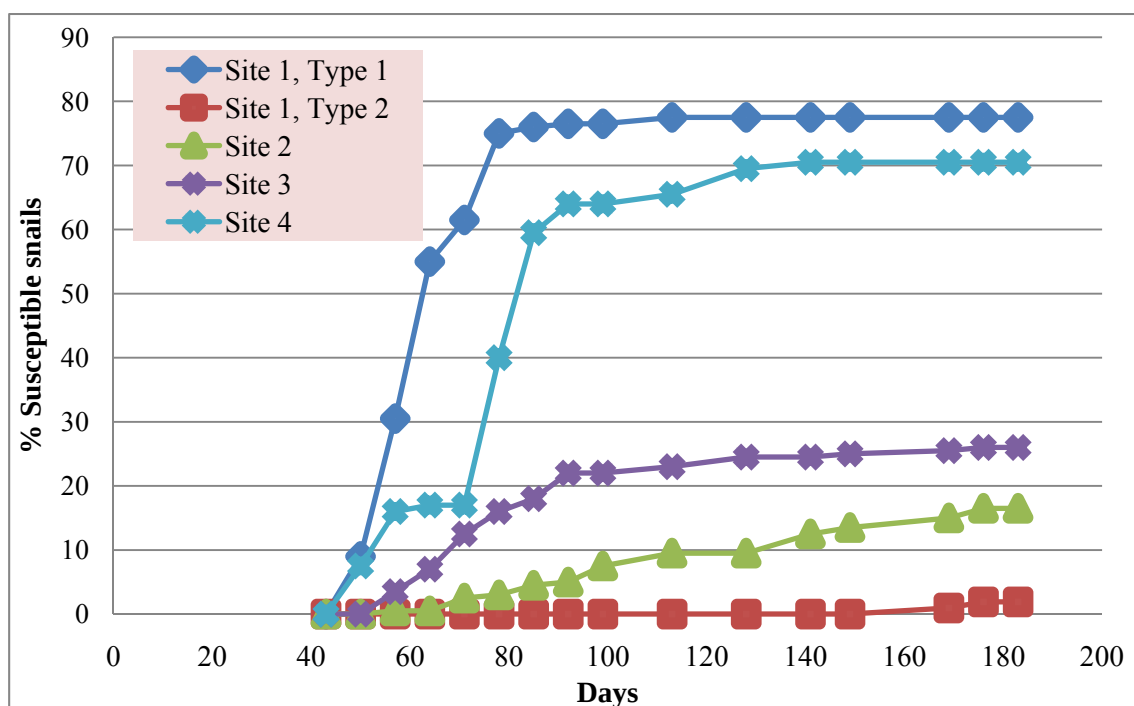


Figure 13 % Susceptible snail to *S.mekongi* miracidia infection

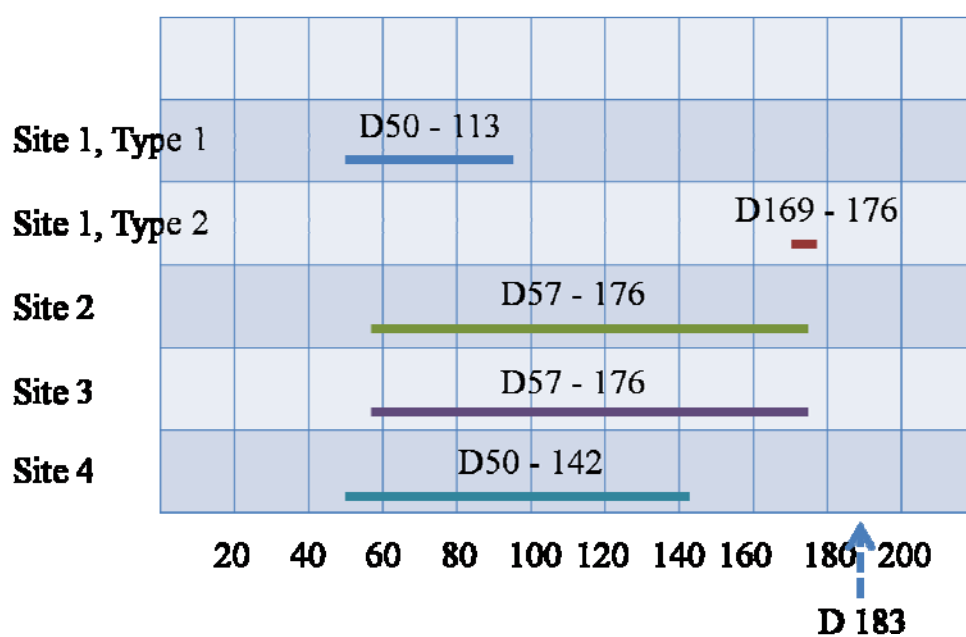


Figure 14 Onset and duration of cercaria shedding period

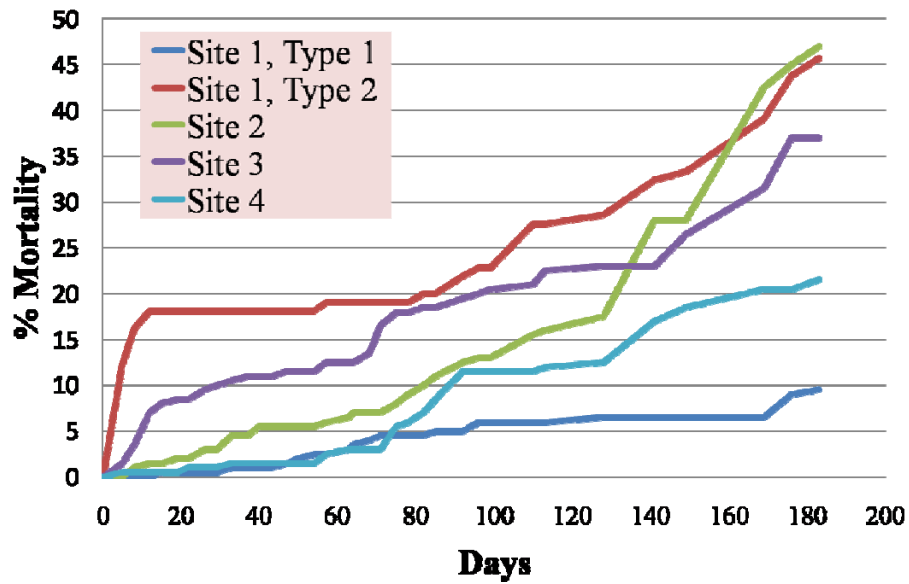
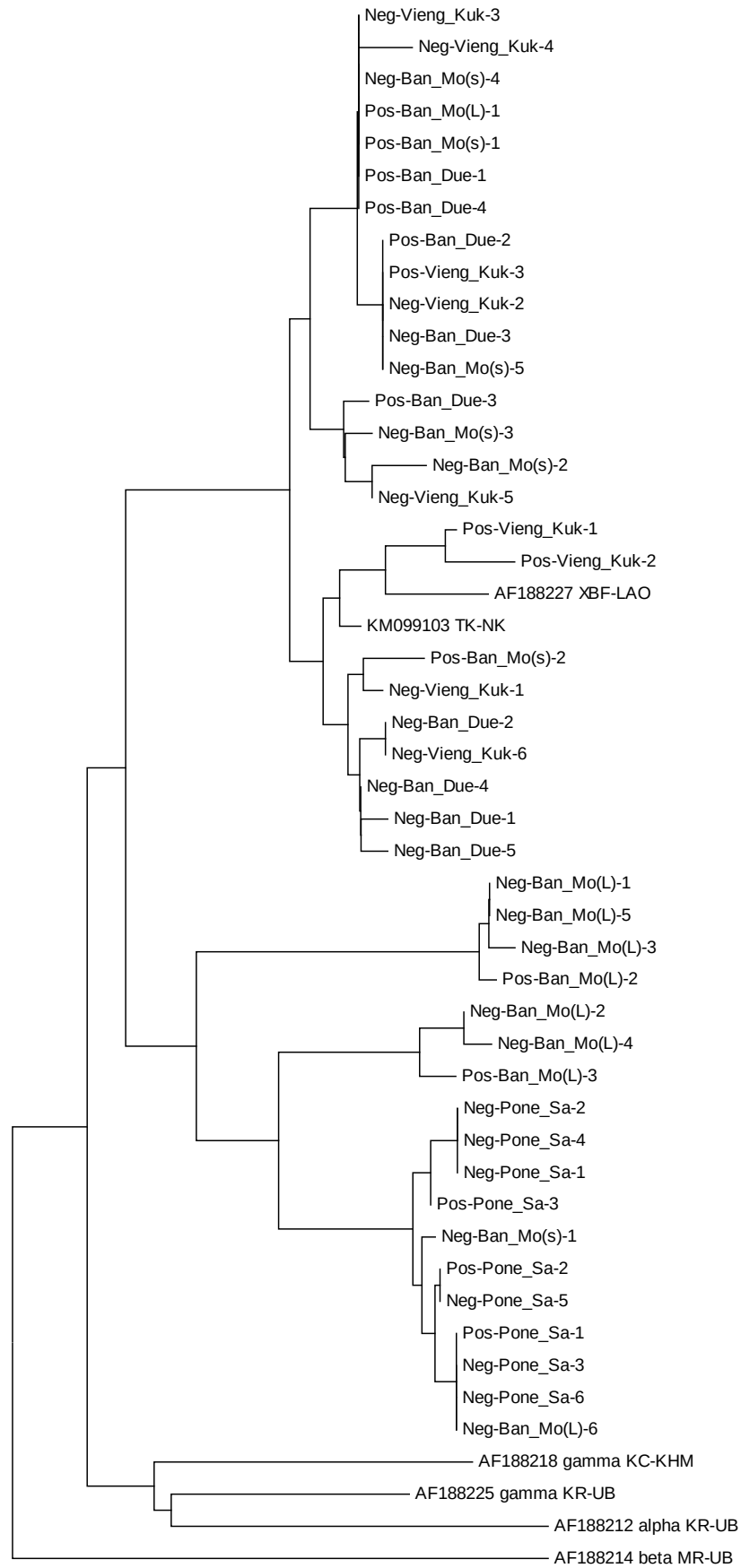


Figure 15 Mortality rate of the snails after infected with *S.mekongi* miracidia.

COI gene sequencing and phylogenetic analysis

Total 43 samples of *N.aperta* from Ban Mo Type 1 (small), Ban Mo Type 2 (large), Pone-Sa, Viangkuk and Ban Daue were grouped to positive or negative-cercaria shedding snail. The size of COI sequences ranged from 679-686 bp. Phylogenetic trees (Figure 16) were prepared by Neighbor-Joining method. The positive (susceptible) and negative (resistant) snails did not show the different of COI sequences. However the snails from Pone Sa and Ban Mo (large) which had lower infection rate (<20%) was grouped in same cluster apart from others.



0.005

Figure 16 Evolutionary relationships of *N.aperta* from Nong Khai

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length = 0.14883401 is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 49 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 553 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.

Discussion and Conclusion

We concluded that there is no *S.mekongi* natural infection in *N.aperta* population from Nong Khai. However, the susceptibility of *N. aperta* from Nong Khai to *Schistosoma mekongi* was proved in laboratory and also reported the infection rate range from 1.9-77.5%. The previous studies indicate the infection rate of *N.aperta* was highest in beta strain from Pibun Mungsahan, Ubon Ratchathani Province which is 58.5%. While the infection rate of alpha strain from Khammarat, Ubon Ratchathani is 2.7% and gamma strain from Khammarat, Ubon Ratchathani is 20%. The high infection rate of *N.aperta* from *Nong Khai* suggested that we should concern the possibility of disease transmission in Nong Khai in addition to only in Ubon Ratchathani. The *S.mekongi*-positive and negative snails from each sampling site will be grouped into susceptible and resistant groups. The genetic variation among susceptible and resistant groups from different sampling sites were evaluated by sequencing of Cytochrome oxidase subunit I (COI) genes. The susceptible snail (shedded cercaria) and the resistant snail (not shedded cercaria) did not show difference of COI. However the snails from Pone Sa and Ban Mo (large) which had lower infection rate (<20%) was grouped in same cluster apart from others. The COI gene and morphology may useful to identify the high and low susceptibility *N.aperta* strains to *S.mekongi* infection.

Recommendation for future research

The future studies on genetic variation of susceptible and resistant snails by compare other gene or other methods may useful for expand our knowledge on the informative loci as a marker for detection of susceptibility in *N. aperta* to *S. mekongi*

Output จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - Limpanont Y, Chusongsang P, Chusongsang Y, Limsomboon J, Sanpool O, Kaewkong W, Intapan PM, Janwan P, Sadaow L, Maleewong W: A new population and habitat for *Neotricula aperta* in the Mekong river of northeastern Thailand: a DNA sequence-based phylogenetic assessment confirms identifications and interpopulation relationships. *Am J Trop Med Hyg* 2015, 92(2):336-339.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ
นำผลงานใช้ในการปรับปรุงเนื้อหาการเรียนการสอนวิชา TMID 536 Host and Environmental Aspects in Tropical Disease หลักสูตร M.Sc. (Trop.Med.) หัวข้อ Medical Malacology
3. อื่นๆ
 - การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ (oral presentation) หัวข้อ Distribution of *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the snail host of Mekong schistosomiasis in the Mekong River Basin, Thailand and their susceptible to *Shistosoma mekongi* ในงานประชุมวิชาการ International Symposium on Waterborne Diseases and Emerging Parasitic Diseases ณ Sun Yat-sen University, Guangzhou, P. R. China

ภาคผนวก

1. บทคัดย่อการนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ หัวข้อ Distribution of *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the snail host of Mekong schistosomiasis in the Mekong River Basin, Thailand and their susceptible to *Shistosoma mekongi* ในงานประชุมวิชาการ International Symposium on Waterborne Diseases and Emerging Parasitic Diseases ณ Sun Yat-sen University, Guangzhou, P. R. China
2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสาร American Journal of Tropical Medicine & Hygiene เรื่อง A new population and habitat for *Neotricula aperta* in the Mekong River of northeastern Thailand: a DNA-sequence based phylogenetic assessment confirms identifications and inter-population relationships.

International Symposium on Waterborne Diseases and Emerging Parasitic Diseases

Conveners

Zhong-Dao Wu

*Department of Parasitology, School of Medicine, and Key Laboratory of
Tropical Diseases Control the Ministry of Education, Sun Yat-Sen (Zhongshan)
University, Guangzhou, China*

Heinz Mehlhorn

Department of Parasitology, Heinrich Heine University, D-40225 Düsseldorf, Germany

Administrators

Zhi-Yue Lv

Jie Wei

Jin-Yi Liang

Xiao-Ying Wu

Shi-Qi Luo

*Key Laboratory of Tropical Diseases Control the Ministry of Education, Sun Yat-Sen
(Zhongshan) University, Guangzhou, China*

*This symposium is supported by

1. The 111 Project of China(Grant No. B12003)
2. The National Basic Research Program of China (Grant No 2010CB530004)
3. National Nature Science Foundation of China (Grant No 81261160324) .

*This symposium was approved by the Ministry of Education, China 【No (2014) 1214】

Distribution of *Neotricula aperta* (Gastropoda Pomatiopsidae), the snail host of Mekong schistosomiasis in the Mekong River Basin, Thailand and their susceptible to *Shistosoma mekongi*

Yanin Limpanont¹, Kamolnetr Okanurak¹, Phiraphol Chusongsang¹, Yupa Chusongsang¹, Prasasana Charoenjai¹, Jareemate Limsomboon¹, Oranuch Sanpool², Worasak Kaewkong², Pewpan M. Intapan², Penchom Janwan³, Lakkhana Sadaow², Wanchai Maleewong²

1, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok Thailand

2, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

3, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University

Mekong Schistosomiasis is an important waterborne parasitic disease caused by blood fluke *Schistosoma mekongi*. *Neotricula aperta*, the snail intermediate host of *S. mekongi* are found in lower Mekong region in Cambodia, Laos and Thailand. The habitats of *N.aperta* in Thailand were previously reported in Mun and Mekong River only in Ubon Ratchathani Province. In this study *N.aperta* were obtained from Mekong River at 1) Khammarat district, 2) Kong Jeum district, Ubon Ratchathani Province, 3) Si Chiangmai district, Nong Khai Province and from Mun River at 4) Pibun Mungsahan district, Ubon Ratchathani Province during 2010-2012. Conventional morphological method and molecular method using partial DNA sequences of mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 1 (*cox1*) were used to identify *N.aperta*. *N. aperta* (beta strain) were found in the Mun River while *N. aperta* (gamma strain) were found in the Mekong River. This study reports new habitat of *N. aperta* (gamma strain) from Mekong River in Nong Khai Province, 130 km upstream from previous reported habitat in Ubon Ratchathani Province. While the habitats of *N.aperta* in Ubon Ratchathani Province are under the natural rocks located on the islet of the middle of Mekong River, *N.aperta* in Nong Khai inhabited under the rockfill dam used for river bank soil erosion prevention. The susceptibility of *N. aperta* from Nong Khai to *Schistosoma mekongi* was tested in laboratory and the infection rate also reported.

This research was funded by Thailand Research Fund grant number MRG5680085 and TRF Senior Research Scholar Grant number RTA5580004 and partially supported by the ICTM grant of the Faculty of Tropical Medicine.

A New Population and Habitat for *Neotricula aperta* in the Mekong River of Northeastern Thailand: A DNA Sequence-Based Phylogenetic Assessment Confirms Identifications and Interpopulation Relationships

Yanin Limpanont, Phiraphol Chusongsang, Yupa Chusongsang, Jareemate Limsomboon, Oranuch Sanpool, Worasak Kaewkong, Pewpan M. Intapan, Penchom Janwan, Lakkhana Sadaow, and Wanchai Maleewong*

Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand; Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand; Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand; School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand

Abstract. *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the snail intermediate host of *Schistosoma mekongi*, is found in Cambodia, Laos, and Thailand. We update information on the distribution of this species in the Mekong River and its tributary, the Mun River, in Thailand. DNA sequences of a portion of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 were obtained from *N. aperta* collected from different locations and used to confirm species and strain identities. Specimens of the β -strain were found in the Mun River, whereas specimens of the γ -strain were found in the Mekong River. The γ -strain (with molecular confirmation of identity) is newly reported from Nong Khai Province, where it occurred in a habitat novel for this species: under paving slabs instead of under natural bed rocks, where agal aufwuchs is extensively located on the islet in the middle of the Mekong River. The new location is approximate 400 km upstream from the nearest previously known site for this species.

INTRODUCTION

Mekong schistosomiasis is an important waterborne parasitic disease caused by the blood fluke *Schistosoma mekongi*. Focal transmission of this disease is known from Khong Island, Champassac Province, Lao People's Democratic Republic (PDR) and Kratié, Stung-Treng, and Rattanakiri Provinces, Cambodia.¹ *S. mekongi* uses the freshwater snail *Neotricula aperta* (family Pomatiopsidae, subfamily Triculinae) as an intermediate host to complete its lifecycle^{2,3}; α -, β -, and γ -strains of *N. aperta* can be differentiated by shell size, shape, sculpture, mantle pigment patterns, ecology, time of development, and minor aspects of anatomy. Of these, the γ -strain is the most important vector for *S. mekongi*. In 1986, the Tropmed Technical Group reported that the α - and γ -strains were found in the Mekong River ranging from Savannakhet, Lao PDR to Kratié in Cambodia.⁴ The β -strain of *N. aperta* occurred exclusively in the Mun River in Phibun Mangsahan District, Ubon Ratchathani Province (UB), Thailand. In 2008, the reported range of the α - and γ -strains was extended northward to the Nam Hinboun in Khammouanne Province, Lao PDR and a total of 31 localities spanning nine river systems in Cambodia, Lao PDR and Thailand.⁵

Although transmission of Mekong schistosomiasis is not known from Thailand, populations of the potential intermediate host have been found. Routine activities of villagers living near the habitats of *N. aperta* potentially expose them to the risk of infection. To date, the known habitats of *N. aperta* in Thailand are limited to the Mun and Mekong Rivers in UB.^{3,4,6} *N. aperta* has not yet been reported from upstream portions of the Mekong within Thailand.

Conventional identification methods may not be adequate for *N. aperta* because of its small size, high prevalence of convergent evolution, and relatively high degree of intraspecific variation among anatomical characters.³ There are some studies of genetic variation among different strains of *N. aperta*

based on allozyme differences,^{7–9} restriction fragment length polymorphism (RFLP),¹⁰ and nucleotide sequence differences.^{5,7,11,12} Attwood and others⁵ and Attwood and Johnston¹¹ investigated genetic variation and the phylogenetic relationships of mitochondrial DNA sequences among the different strains of *N. aperta* from six populations¹¹ and 31 sites⁵ of central and southern Lao PDR, eastern Cambodia, and northeast Thailand.

Here, we report molecular identification of *N. aperta* collected in northeastern Thailand in 2010–2012. The γ -strain was found at a new locality in the Mekong River, and the β -strain was found in the Mun River. DNA sequences of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) of these snails were used to place the newly found populations in a phylogenetic context with previously studied populations. These genetic data will be important for epidemiological investigations of Mekong schistosomiasis.

Wherever it has been reported, *N. aperta* has been found on natural substrates, such as under natural bed rocks where agal aufwuchs are located on islets in the middle of the Mekong River.¹ Here, we report a new non-natural substrate for *N. aperta* in the Mekong River in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Samples were collected from four localities in two provinces in northeastern Thailand (Nong Khai [NK] and UB) (Figure 1 and Table 1). Live snails were identified on the basis of general characteristics, conchology, and habitat.³ Samples were preserved in absolute ethanol until DNA extraction.

DNA amplification and sequencing. The whole-snail specimens (26 in total) were individually crushed, and DNA was extracted using the Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co, Duren, Germany). The DNA was eluted in 100 μ L distilled water, 5 μ L of which was used for the polymerase chain reaction (PCR). A PCR specific for the partial *cox1* gene sequence was conducted with primer set forward primer: 5' ATG ATC TGG GTT AGT AGG TAC TG 3' and reverse primer: 5' AGC AGG ATC AAA AAA AGC TGT A 3', resulting in an amplicon size of 598 base pairs (bp). The

*Address correspondence to Wanchai Maleewong, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. E-mail: wanchi_ma@kku.ac.th



FIGURE 1. Sampling localities of *N. aperta*. The stars indicate the sampling area in NK (TK) and UB (Ban Bung Khi Lek, KJ, and Kang Sapue).

primers were based on published sequences of *N. aperta* (AF188224).¹¹

Amplification was done using a GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore). The DNA template was initially denatured at 94°C for 5 minutes. The amplification procedure consisted of 35 cycles at 95°C for 30 seconds (denaturation), 53°C for 30 seconds (annealing),

and 72°C for 30 seconds (extension), with a final extension at 72°C for 10 minutes. The PCR product was run on a 1% agarose gel to confirm amplification and estimate product length and quantity. DNA direct sequencing was performed using the Applied Biosystems 3730×I DNA Analyzer and ABI Big Dye, version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in both directions with the same PCR primers. The *coxI*

TABLE 1
Sampling details and accession numbers of *N. aperta* in the Mekong River and the Mun River, Thailand

Species	Strain*	Localities	Number	Accession numbers	Sampling date
<i>N. aperta</i>	γ	Ban Bung Khi Lek, Mekong River, KR-UB†	6	KM099100–KM099102 and KM099109–KM099111	4/23/2010
<i>N. aperta</i>	γ	Mekong River, KJ-UB†	3 (KJL); 3 (KJH)	KM099096–KM099099, KM099112, and KM099113	4/24/2010
<i>N. aperta</i>	β	Kang Sapue, Mun River, UB†	2	KM099114 and KM099115	4/30/2010
<i>N. aperta</i>	β	Kang Sapue, Mun River, UB†	3	KM099116–KM099118	11/30/2012
<i>N. aperta</i>	β	Kang Sapue, Mun River, UB†	3	KM099119–KM099121	11/27/2010
<i>N. aperta</i>	γ	Mekong River, TK-NK†	6	KM099103–KM099108	12/1/2012
<i>N. aperta</i>	α	Mekong River, KR-UB‡	3	AF188210–AF188212	4/22/1997
<i>N. aperta</i>	β	Mun River, UB‡	4	AF188213–AF188216	4/24/1997
<i>N. aperta</i>	γ	Kracheh Province, Mekong River, Cambodia‡	3	AF188217–AF188219	5/2/1996
<i>N. aperta</i>	γ	Khong Island, Laos‡	2	AF188220 and AF188221	4/20/1997
<i>N. aperta</i>	γ	Mekong River, UB‡	5	AF188222–AF188226	4/22/1997
<i>N. aperta</i>	γ	Xé Bang Fai River, Khammoune Province, Laos‡	1	AF188227	3/27/1998

*Strain identified by morphology.

†Samples collected from this study.

‡Information from the GenBank database.¹¹

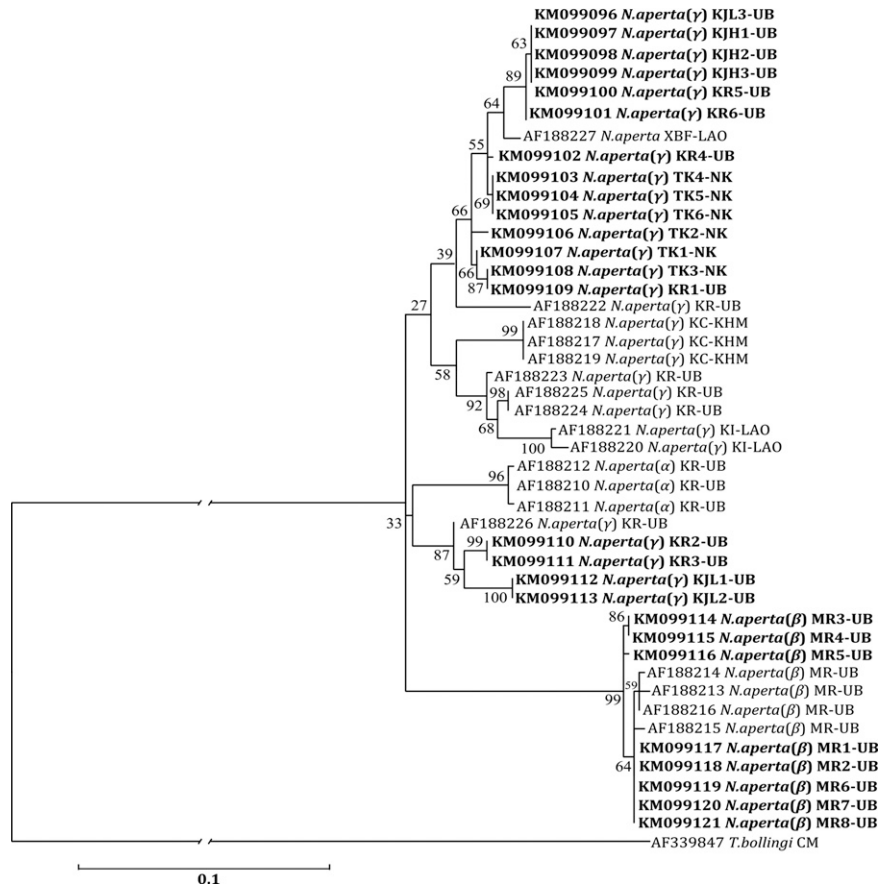


FIGURE 2. Maximum likelihood tree based on 18 published and 26 new partial *cox1* gene sequences of *N. aperta* α -, β -, and γ -races. Accession numbers are shown for sequences obtained from a public DNA database. Sequences newly obtained for this study are indicated in bold. A published sequence of *Tricula bollingi* from Chiang Mai (AF339847) was used as an outgroup. CM = Chiang Mai; KC = Kracheh Province; KHM = Cambodia; KI = Khong Island; LAO = Laos; MR = Mun River; XBF = Xé Bang Fai.

gene sequences of the *N. aperta* samples were analyzed using a standard nucleotide basic local alignment search tool (BLASTN) search through the National Center of Biotechnology Information. The sequences were also aligned and compared with the available sequence data for *N. aperta* in the GenBank Database using the multiple sequence alignment program ClustalW. A phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method with MEGA, version 5.¹³ The Hasegawa–Kishino–Yano model, with non-uniformity of evolutionary rates among sites modeled by using a discrete γ -distribution (+G), was found to be the best model.¹³ Support for groupings within the tree was evaluated by bootstrapping with 1,000 resamplings. All sequences were submitted to the GenBank database (Figure 2 and Table 1).

RESULTS

The partial *cox1* DNA sequences (553 bp excluding the primer sequences) of 26 specimens of *N. aperta* collected from four localities in the Mekong and Mun Rivers, Thailand have been deposited in GenBank under accession numbers KM099096–KM099121 (Figure 2 and Table 1). When aligned and compared with published data, 18 of our sequences proved to represent the γ -strain and 8 of our sequences proved to represent the β -strain (Figure 2 and Table 1). All

β -strain samples came from the Mun River, and all γ -strain representatives came from the Mekong River. Similarities between sequences ranged from 97% to 99%. Variation within sampling sites was found in Ban Bung Khi Lek, Khammarat District (KR) and Khong Jeum District (KJ), UB. It is also worth noting that the populations were paraphyletic and coincided with the KR clades for the snails sampled in this study but not so with the GenBank KR data, which formed a separate clade. As a consequence, only snails of the β -strain from the Mun River population formed a monophyletic clade (Figure 2).

Morphological examination of *N. aperta* from KJ revealed two different patterns of mantle pigmentation. Consequently, the KJ snails were coded as marked pigmentation (KJH) and reduced pigmentation (KJL). Phylogenetic analysis showed that KJH fell into a single clade but that KJL separated into two clades.

A new population of *N. aperta* (γ -strain) is described here from Ban Tha Kathin (TK), Sri Chiang Mai District, NK Province well upstream of previously known populations in the Mekong River. Although the habitats of *N. aperta* in KR and KJ are under natural rocks located on islets in the middle of the Mekong River, specimens of *N. aperta* at the TK-NK site were found under the rocks, which were used together with concrete paving for prevention of soil erosion along the river bank.

DISCUSSION

In northeast Thailand, three strains of *N. aperta* have been recognized (α , β , and γ) on the basis of shell size and body pigmentation.¹ However, the small size of triculine snails leads to problems in assessing character states and technical difficulties in their identification. These problems together with convergent evolution in the group and a relatively high degree of intraspecific variation in anatomical characters suggest that nucleotide sequence data will be useful in resolving relationships in cases where anatomy is ambiguous.¹¹ This is supported by our finding that *N. aperta* snails (γ -strain) from KJ-UB fell into two groups according to their mantle pigmentation; however, the molecular data failed to group the snails according to pigmentation.

DNA sequences of *N. aperta* γ -strain were examined for phylogenetic studies of triculine snails⁶ and evaluation of geographical patterns and to identify genetic subpopulations or clades.⁴ Mitochondrial genes were selected, because with their maternal pattern of inheritance and smaller effective population size, they were considered to represent potentially better records of phylogenetic events at the intraspecific level.

As in other studies on *N. aperta* phylogeny, the β -strain from the Mun River was clearly located in a different clade from the α - and γ -strains from the Mekong River. The genetic isolation of the β -strain appears to have a geographical basis.¹⁰ The Mun River populations seem more stable in these results than in the results of earlier studies,⁵ which might be because of the Pak-Mun Dam preventing dispersal of snails. The Pak-Mun Dam was opened in 1994 and may have affected our study more than earlier studies.¹¹ However, the effect on β -strain diversity and long-term popular trends may need to be monitored.

Samples of the *N. aperta* γ -strain from KJ-UB and those from KR-UB fell into several different places on the phylogenetic tree, whereas those from TK-NK occupied a single region on the tree. Such a genetic subdivision of the *N. aperta* γ -strain was also recorded in the study by Attwood.¹⁰ Attwood¹⁰ suggested that the *N. aperta* γ -strain from the KR-UB site may have originated in smaller rivers draining the highlands of central Laos and that it then colonized the Mekong River and became a part of the γ -strain population in UB. This hypothesis suggests that *N. aperta* populations in the Mekong River are not stable and exist as a metapopulation. The lack of genetic diversity among snails from the TK-NK site might be explained by an origin in highland streams and lack of dispersal of snails from the lowland reaches of the Mekong River.¹⁰

This is the first report of the *N. aperta* γ -strain from the Mekong River in NK Province, Thailand. The identification was supported by molecular evidence from the mitochondrial *cox1* gene. In addition, this is the first report of this snail from an anthropogenic habitat (i.e., paving slabs) rather than a natural substratum.

Received July 27, 2014. Accepted for publication November 9, 2014.
Published online December 8, 2014.

Acknowledgments: We acknowledge the support of the Khon Kaen University Publication Clinic, Research and Technology Transfer Affairs, Khon Kaen University for assistance. The authors also thank Dr. David Blair for valuable suggestions.

Financial support: This research was funded by Thailand Research Fund (TRF) Grant MRG5680085 (to Y.L.). O.S., W.K., P.M.I., P.J.,

L.S., and W.M. were supported by a TRF Senior Research Scholar Grant, TRF Grant RTA5580004, and Faculty of Medicine Grant, Khon Kaen University Grant TR57201.

Authors' addresses: Yanin Limpanont, Phiraphol Chusongsang, Yupa Chusongsang, and Jareemate Limsomboon, Southeast Asian Center for Medical Malacology, Department of Social and Environmental Medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand, E-mails: yanin.lim@mahidol.ac.th, phiraphol.chu@mahidol.ac.th, yupa.chu@mahidol.ac.th, and jareemate.lim@mahidol.ac.th. Oranuch Sanpool, Pewpan M. Intapan, Lakkhana Sadaow, and Wanchai Maleewong, Department of Parasitology, Faculty of Medicine and Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, E-mails: sanpoolor@yahoo.com, pewpan@kku.ac.th, sadaow1986@hotmail.com, and wanch_ma@kku.ac.th. Worasak Kaewkong, Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, E-mail: worasak_bc@hotmail.com. Penchom Janwan, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand, E-mail: pair_wu@yahoo.com.

REFERENCES

1. Attwood SW, Upatham ES, 2012. Observations on *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae) population densities in Thailand and central Laos: implications for the spread of Mekong schistosomiasis. *Parasit Vectors* 5: 126.
2. Urbani C, Sinoun M, Socheat D, Pholsena K, Strandgaard H, Odermatt P, Hatz C, 2002. Epidemiology and control of mekongi schistosomiasis. *Acta Trop* 82: 157–168.
3. Davis GM, Kitikoon V, Temcharoen P, 1976. Monograph on “*Lithoglyphopsis*” *aperta*, the snail host of Mekong River Schistosomiasis. *Malacologia* 15: 241–287.
4. Tropmed Technical Group, 1986. Snails of medical importance in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 17: 282–322.
5. Attwood SW, Fatih FA, Campbell I, Upatham ES, 2008. The distribution of Mekong schistosomiasis, past and future: preliminary indications from an analysis of genetic variation in the intermediate host. *Parasitol Int* 57: 256–270.
6. Attwood SW, 2010. Studies on the parasitology, phylogeography and the evolution of host-parasite interactions for the snail intermediate hosts of medically important trematode genera in Southeast Asia. *Adv Parasitol* 73: 405–440.
7. Attwood SW, Ambu S, Meng X-H, Upatham ES, Xu F-S, Southgate VR, 2003. The Phylogenetics of Triculine snails (Rissooidea: Pomatiopsidae) from South-east Asia and Southern China: historical biogeography and the transmission of human Schistosomiasis. *J Molluscan Stud* 69: 263–271.
8. Staub KC, Woodruff DS, Upatham ES, Viyanant V, 1990. Genetic variation in *Neotricula aperta*, the intermediate snail host of *Schistosoma mekongi*: allozyme differences reveal a group of sibling species. *Am Malacol Bull* 7: 93–103.
9. Attwood SW, Kitikoon V, Southgate VR, 1998. *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the intermediate host of *Schistosoma mekongi*: allozyme variation and relationships between Khmer, Lao and Thai populations. *J Zool (Lond)* 246: 309–324.
10. Attwood SW, 1999. Genetic variation in *Neotricula aperta*, the snail intermediate host of *Schistosoma mekongi* in the lower Mekong Basin. *J Zool (Lond)* 249: 153–164.
11. Attwood SW, Johnston DA, 2001. Nucleotide sequence differences reveal genetic variation on *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the snail host of Schistosomiasis in the lower Mekong Basin. *Biol J Linn Soc Lond* 73: 23–41.
12. Attwood SW, Upatham ES, Zhang Y-P, Yang ZQ, Southgate VR, 2004. A DNA-sequence based phylogeny for triculine snails (Gastropoda: Pomatiopsidae: Triculinae), intermediate hosts for *Schistosoma* (Trematode: Digenea): phylogeography and the origin of *Neotricula*. *J Zool (Lond)* 262: 47–56.
13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.