The Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique for Epidemic Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in Land Snails

Pannawich Siriwechviriya[1]

ABSTRACT

Angiostrongylus cantonensis is the most common cause of eosinophilic meningitis. This nematode is found in the pulmonary arteries of rats. The definitive hosts in nature are rodents, while intermediate hosts are several animals including snails. The aim of this study was to detect the epidemiology of *A. cantonensis* in land snails collected from Ban-Thun and Ban Mae Ka districts. A total of 336 land snails (*H. distincta*: 112 samples; *A. fulica*: 112 samples; and *C. siamensis*: 112 samples) were randomly selected and screened for the presence of *A. cantonensis* by microscopic examination and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). The results of microscopic examination showed 61/336 positive samples (18.15%) in which 24 (7.14%) and 37 (11.01%) samples were *A. fulica* and *C. siamensis*, respectively. None of *H. distincta* was positive for *A. cantonensis*. However, the LAMP technique showed higher sensitivity in detection of *A. cantonensis*. Using LAMP, 87/336 samples (25.89%) were positive for *A. cantonensis*, in which 40 (11.90%), 42 (12.50%), and 5 (1.49%) samples were *A. fulica*, *C. siamensis*, and *H. distincta*, respectively. So far, the LAMP technique allowed higher sensitivity in *A. cantonensis* detection, indicating its potential to be used as a tool for epidemiological investigation of this organism in various intermediate hosts which might contribute to the transmission of angiostrongyliasis to humans.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; Land snails; Epidemiology; Microscope; LAMP; Detection

THJPH 2020; 50(1): 37-46

Received: June 21, 2019; Revised: November 26, 2019; Accepted December 16, 2019

Correspondence: Pannawich Siriwechviriya Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000, THAILAND. E-mail: pannawich.si@gmail.com, Tel. 669-0659-3046

[1] Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao, THAILAND.

บทนำ

โรคพยาธิปอดหนูหรือโรคพยาธิหอยโข่งเกิดจากการติดเชื้อ *Angiostrongylus cantonensis* ซึ่งเป็นหนอนพยาธิตัวกลมที่มีการติดต่อและก่อโรคในคนได้ โดยมีหนูเป็นโฮสต์จำเพาะ (definitive host) พยาธิปอดหนูพบครั้งแรกจากเส้นเลือดแดงปอดของหนูที่มณฑลกวางตุ้ง ประเทศจีน โดย Chen ในปี ค.ศ. 1935 ต่อมามีรายงานพบพยาธิชนิดนี้ในน้ำไขสันหลังของคนเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1945 โดย Nomura และ Lin ได้ตรวจพบพยาธิในคนเป็นครั้งแรกในผู้ป่วยชาวไต้หวันที่มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ต่อมา Yokogawa ได้วินิจฉัยและจำแนกชนิดพยาธิเป็น *Haemostrongylus ratti* หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1946 Dougherty จัดพยาธิชนิดนี้อยู่ในสกุล *Angiostrongylus* และให้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *A. cantonensis* จากนั้นปี ค.ศ. 1955 Mackerras และ Sandars ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะทางชีววิทยาของพยาธิปอดหนูในห้องปฏิบัติการ และ Rosen ระบุว่า *A. cantonensis* เป็นสาเหตุการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในคน[1,2] สำหรับในประเทศไทยมีการรายงานพบพยาธิ *A. cantonensis* เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 และในปี ค.ศ. 1961 ในผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่มีประวัติการรับประทานหอยโข่งที่มีตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิ การระบาดของโรคนี้ส่วนมากพบแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หมู่เกาะแปซิฟิค อเมริกาใต้และหมู่เกาะคาริเบียน เช่น ประเทศไทย เวียดนาม ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย นิวคาลิโดเนีย ตาฮิติ ฮาวาย และตามหมู่เกาะโอเชี่ยนเนีย[3-5] สำหรับในประเทศไทยพบค่อนข้างชุกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยที่เป็นเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (eosinophilic meningitis) พยาธิชนิดนี้มีโฮสต์ตัวกลาง (intermediate host) ในธรรมชาติได้หลายชนิดได้แก่ หอยทากบก หอยโข่ง กุ้งฝอย และมีโฮสต์พาราเทนิค (paratenic host) หลากหลายชนิด เช่น กุ้งน้ำจืด กบ ลูกอ๊อด ปลาน้ำจืด ตะกวด นอกจากนี้ยังมีรายงานพบตัวอ่อนระยะติดต่อในสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน[6-8] ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของหอยทากบก และจากการรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี ค.ศ. 2015 พบว่าปัจจุบันมีประชากรมากถึง 3,000 มีการติดเชื้อพยาธิชนิดนี้ ผ่านการบริโภคอาหารที่ทำจากสัตว์พาหะนำโรคที่ไม่ผ่านการปรุงสุกหรือสุกไม่เพียงพอ รวมถึงการบริโภคพืชผักที่ปนเปื้อนตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิที่ถูกขับออกมาพร้อมกับเมือกในขณะหอยทากบกเคลื่อนที่ผ่านไปบนพืชผักเหล่านั้น[5] มีการคิดค้นวิธีการวินิจฉัยพยาธิ *A. cantonensis* ในหอยหลากหลาย และวิธีที่วินิจฉัยพยาธิชนิดนี้ได้ดีที่สุดคือวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิคพีซีอาร์ แต่เนื่องจากเทคนิคดังกล่าว ต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะต่องาน มีราคาแพงและใช้เวลานาน ในการแสดงข้อมูลจึงเกิดการพัฒนาเป็นเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ที่สะดวก ใช้เครื่องมือน้อย และใช้เวลาสั้นเหมาะกับการตรวจวินิจฉัยในภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือทันสมัย เพื่อให้รักษาได้ทันเวลา[9-14] ผู้วิจัยตระหนักถึงปัญหา จึงต้องการศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิชนิดดังกล่าวในหอยทากบกโดยประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP เพื่อใช้ข้อมูลในการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (eosinophilic meningitis) ที่เกิดจากเชื้อ *A. cantonensis* ในมนุษย์

วิธีการศึกษา

จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยพะเยา หนังสือรับรองเลขที่ 5901040036

การเก็บตัวอย่างหอยทากบก

การวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยเชิงสำรวจภาคตัดขวาง ขนาดของตัวอย่างการคำนวณเพื่องานสำรวจและไม่ทราบจำนวนประชากรจากสูตร

$$n \geq Z^2_{a/2} (p)(1 - p)/e^2$$

โดย n = จำนวนตัวอย่าง, Z = 1.96, p = 0.5 และ e = 0.1 จึงประมาณการณ์ขนาดตัวอย่างที่ต้องเก็บอย่างน้อยชนิดละ 97 ตัวอย่าง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยทากบกที่บริเวณจังหวัดพะเยา ช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนสิงหาคม 2561 ด้วยวิธี Quadrat sampling[15] ทำการบันทึกข้อมูลเบื้องต้น ได้แก่ สภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัย และชนิดของหอยทากบกตามวิธีการจัดจำแนกจากลักษณะภายนอกของหอยทากบกตามวิธีของ ธัมวงศ์ 1992[4] โดยเตรียมกล่องพลาสติกมีฝาปิดพร้อมเจาะรูไว้ใส่ตัวอย่าง โดยใส่ 1 ตัวอย่างต่อ 1 กล่อง นำใส่ลงกล่องโฟมเพื่อนำตัวอย่างไปตรวจยังห้องปฏิบัติการภายใน 1-2 ชั่วโมง และทำการตรวจหาการติดเชื้อของหอยทากบกทันที

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. cantonensis* จากตัวอย่างหอยทากบกด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำตัวอย่างหอยทากบกที่เก็บได้ล้างด้วยน้ำให้สะอาด แล้วใส่ในกล่องพลาสติกใสที่เจาะรูและเติมน้ำกลั่นลงไปในกล่อง 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สารคัดหลั่งชนิดเมือกจากหอยทากบก แล้วดูดน้ำในกล่องที่มีสารคัดหลั่งของหอยทากบกใส่ลงในหลอด Centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร (1 ตัวอย่าง : 1 หลอด) แล้วนำไปปั่นตกที่ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากปั่นเสร็จดูดเอาส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนใส หลังจากนั้น ดูดตะกอนในหลอดที่ผ่านการปั่นตกหยดลงในสไลด์ที่มีสารละลาย 0.85% NaCl 1 หยด จากนั้นทำการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X และ 40X โดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนระยะที่ 3 ซึ่งบริเวณปลายหัวของเชื้อจะมีโครงสร้างของไคตินเป็นรูปแท่ง 1 คู่ คล้ายลูกศร บริเวณหางมีลักษณะเป็นกรวย และปลายหางแหลม[7]

การสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างหอยทากบก โดยการนำหอยทากบกใส่ภาชนะพลาสติกปิดฝา ภาชนะละ 1 ตัวอย่างเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระและเมือกของหอยโดยการเติมน้ำกลั่นอีก 5 มิลลิลิตร จากนั้นกรองตะกอนด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปปั่นตกที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ชะล้างตะกอนให้ใสโดยเติม 0.85% NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที เสร็จแล้วเทส่วนใสทิ้งแล้วดูดตะกอนตัวอย่างใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร หลังจากนั้น ทำการเติม chelex 100 resin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเม็ด beads จำนวน 5 เม็ด แล้วเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลานาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งเป็นเวลานาน 3 นาที จึงนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที

เมื่อปั่นเสร็จแล้วทำการดูดส่วนใสของดีเอ็นเอปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจสอบดีเอ็นเอ

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. cantonensis* จากตัวอย่างหอยทากบกด้วยเทคนิค LAMP

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหอย *H. distincta*, *A. fulica* และ *C. siamensis* ไปตรวจหาความจำเพาะต่อเชื้อ *A. cantonensis* ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์ (primer) จากการศึกษาก่อนหน้านี้[12] (ตารางที่ 1) ส่วนผสมและความเข้มข้นของสารละลายต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยใช้จีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อ *A. cantonensis* ที่ได้มาจากพยาธิตัวเมียตัวเต็มวัยที่แยกได้จากปอดหนู เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในตัวอย่างควบคุมบวก (Positive control) และใช้น้ำกลั่นแทนจีโนมิคดีเอ็นเอในตัวอย่างควบคุมลบ (Negative control) จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis

Table 1 Sequences of LAMP primers for the amplification of the first internal transcribed spacer (ITS-1) of nuclear from *Angiostrongylus cantonensis*

Primer	Length (nt)	Sequence (5′–3′)
F3	19	CCACCACAAAACACAAACA
B3	18	GTGTTGAGCTCTAACGGT
FIP (F1c + F2)	41	CTCATCATCAACCACCCACCCCTAGCATCATCTACGTCGTC
BIP (B1c + B2)	44	AGAAACCACCAACACATATACACGTATACCACCAACTTTAGCGA
loop-F	20	GGGTGGTGATGTAGTAGCTA
loop-B	19	TCACCTAGTGTATGATGGT

Table 2 The components of LAMP reaction

Components	Final volume = 25 µl	Final concentration
10X ThermoPol Buffer	2.5	1X
$MgSO_4$ (100 mM)	1.5	6 mM
dNTP Mix (10 mM)	3.5	1.4 mM each
FIP/BIP Primers (25X)	1	1.6 µM
F3/B3 Primers (25X)	1	0.2 µM
LoopF/B Primers (25X)	1	0.4 µM
Bettain	3	
Bst DNAPolymerase	1	320 U/ml
DNA Sample	2	0.01 ng
Nuclease-free Water	To 25 µl	

การวิเคราะห์ผล LAMP โดยวิธี Gel electrophoresis

นำ LAMP product ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ ผสมกับ Loading buffer ในอัตราส่วน Lamp product:Loading buffer เท่ากับ 1:5 โหลดลงบน 2% agarose gel แล้วแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ตรวจสอบและบันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation system (BIRAD, Gel Doc^{TM} XR+) เพื่อสังเกตยีนที่เพิ่มจำนวนได้ซึ่งจะแสดงผลเป็นแถบดีเอ็นเอหลายๆ ขนาด โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมบวก (Positive control)

ผลการศึกษา

ชนิดของหอยทากบกและข้อมูล

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยทากบกด้วยวิธี Quadrat sampling จำนวนทั้งสิ้น 336 ตัวอย่าง จากจังหวัดพะเยาใน 2 พื้นที่ ได้แก่ ตำบลบ้านตุ่น และตำบลบ้านแม่กา ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 พบหอยทากบกทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *H. distincta* (112 ตัวอย่าง), *A. fulica* (112 ตัวอย่าง) และ *C. siamensis* (112 ตัวอย่าง) โดยสถานที่ที่พบตัวอย่างมีลักษณะเป็นดินที่มีความชื้นสูง ประกอบไปด้วยเศษซากของใบพืชที่มีการย่อยสลายเป็นส่วนใหญ่ และอยู่ในที่ร่ม มีใบไม้ใหญ่ปกคลุมดินอีกชั้นหนึ่ง ซึ่งหอยทากบกใช้เป็นที่หลบซ่อนตัว

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยทากบกด้วยวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยทากบกจำนวน 336 ตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบตัวอย่างหอยทากบกที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *A. cantonensis* จำนวน 61 ตัวอย่าง (ร้อยละ 18.15) โดยพบว่า หอยทากบกสายพันธุ์ *A. fulica* ให้ผลบวก 24 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.14) หอยทากบกสายพันธุ์ *C. siamensis* ให้ผลบวก 37 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.01) โดยตรวจไม่พบเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยทากบกสายพันธุ์ *H. distincta* (ตารางที่ 3)

Table 3 Number of positive samples for *A. cantonensis* detected by microscopic examination and LAMP technique

Land snails	No.	Microscopic test n (%)	LAMP n (%)
H. distincta	112	-	5 (1.49)
A. fulica	112	24 (7.14)	40 (11.90)
C. siamensis	112	37 (11.01)	42 (12.05)
Total	336	61 (18.15)	87 (25.89)

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยทากบกด้วยเทคนิค LAMP

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยทากบกทั้ง 3 ชนิด จำนวน 336 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค LAMP (รูปที่ 1) พบตัวอย่างหอยทากบกที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *A. cantonensis* จำนวน 87 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.89) โดยพบว่า หอยทากบกสายพันธุ์ *A. fulica* ให้ผลบวก 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.90) หอยทากบกสายพันธุ์ *C. siamensis* ให้ผลบวก 42 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.50) และหอยทากบกสายพันธุ์ *H. distincta* ให้ผลบวก 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.49) (ตารางที่ 3)

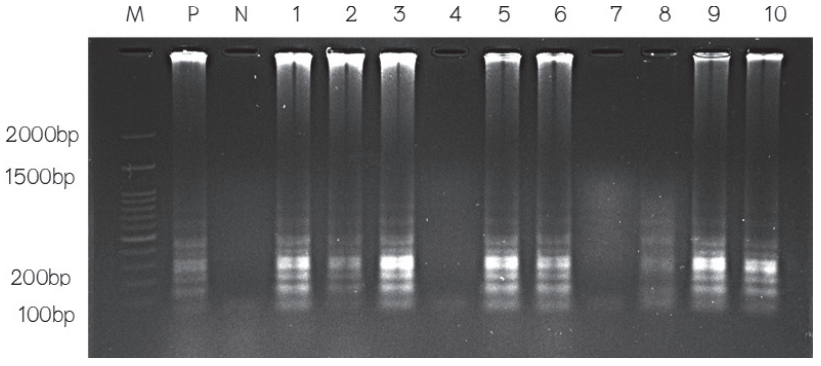

Figure 1 LAMP products detected by 2% agarose gel electrophoresis. M: 100 bp plus DNA marker (Invitrogen), P: Positive control (DNA of *A. cantonensis* extracted from adult female), N: Negative control (Distilled water), 1-10: DNA samples extracted from land snails no 1-10 of *A. fulica*

อภิปรายผล

เชื้อ *A. cantonensis* หรือพยาธิปอดหนูก่อให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในคน ทั่วโลกมีรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อพยาธิชนิดนี้มากขึ้น โดยในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมามีการแพร่ระบาดของพยาธิปอดหนูในประเทศจีนและสหรัฐอเมริกา คนติดเชื้อจากการรับประทานหอยหรือทากที่ปรุงไม่สุก หรือจากการรับประทานพาราเทนิกโฮสต์และผักที่ปนเปื้อนพยาธิระยะติดต่อ[7,13] ปัจจุบันประเทศไทยยังพบผู้ที่ติดเชื้อพยาธิปอดหนูในทุกภาคโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือในกลุ่มประชาชนที่ชอบรับประทานหอยน้ำจืดที่ปรุงไม่สุก[1] หลังจากการกินอาหารที่มีพยาธิระยะติดต่อประมาณ 1-4 สัปดาห์ จะมีอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ในรายที่มีอาการรุนแรงจะปวดศีรษะมาก คอแข็ง หลังแข็ง ชัก อาจเป็นอัมพาตได้ ถ้าพยาธิเข้าตาจะทำให้ตาอักเสบ มัวและบอด และบางรายอาจเสียชีวิต[16] การศึกษาการติดเชื้อ *A. cantonensis* ด้วยการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจากวิธีนี้จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญจึงไม่เหมาะสำหรับห้องตรวจวินิจฉัยโรคที่ขาดผู้เชี่ยวชาญ ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคการตรวจทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่มีต้นทุนในการตรวจที่สูงมาก[17-19] การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการใช้เทคนิค LAMP ในการ

ตรวจหาการระบาดของเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยทากบก เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สะดวกในการทดสอบและเหมาะสำหรับปฏิบัติการภาคสนามได้ดี มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สูงโดยใช้อุณหภูมิเดียวที่ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส รวมทั้งมีความไวสูงในการตรวจจับ DNA โดยพบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจจับ DNA ปริมาณน้อยๆ ได้[12-14] จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจหาเชื้อ *A. cantonensis* ในตัวอย่างหอยทากบกได้ไวกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยพบว่าเทคนิค LAMP ให้ผลตรวจที่จำเพาะและมีความไวต่อเชื้อกว่าเทคนิคการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยพบตัวอย่างหอยทากบกที่ให้ผลบวกต่อเชื้อมากขึ้น กล่าวคือ หอยทากบกสายพันธุ์ *A. fulica* เพิ่มขึ้น (ร้อยละ 4.76) หอยทากบกสายพันธุ์ *C. siamensis* ให้ผลบวกเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 1.49) และหอยทากบกสายพันธุ์ *H. distincta* ให้ผลบวกเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 1.49) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ตรวจหาเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยที่เป็นโฮสต์ตัวกลางในธรรมชาติโดยใช้เทคนิค LAMP[13] ซึ่งพบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อพยาธิปอดหนูที่ความเข้มข้นของ DNA ได้ถึงระดับความเจือจางที่ 0.01 นาโนกรัม หรือสามารถตรวจหาตัวอ่อนของพยาธิได้ 0.32 ตัวต่อตัวอย่างหอย 0.1 กรัม ที่น่าสนใจคือ งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทดสอบความไวและความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ (primers) ของ LAMP ในการตรวจหาเชื้อ *A. cantonensis* และพบว่ามีความไวสูงกว่าวิธีพีซีอาร์ถึง 10 เท่า และมีความจำเพาะสูงถึง 100% ที่ระดับความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อพยาธิปอดหนูเท่ากับ 1 ฟิโคกรัม และมีความจำเพาะของไพรเมอร์เท่ากับ 100% เมื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *A. simplex, T. trichiura, T. canis, T. spiralis* และ *A. lumbricoides*[12] จึงสามารถสรุปได้ว่า เทคนิค LAMP เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อ *A. cantonensis* ได้ด้วยความไวสูง จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการตรวจเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบโดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการที่ขาดเครื่องมือทันสมัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ เชื้อ *A. cantonensis* เพื่อใช้ DNA เป็น positive control รวมทั้งคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่สนับสนุนทุนวิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่พร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดโครงงานวิจัย

References

1. Barratt J, Chan D, Sandaradura I, Malik R, Spielman D, Lee R, et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. Parasitology 2016; 143(9): 1087-118.
2. Apichat V, Narongrit S, Jittranuch T, Anucha W, Wilaiwan P, Chamaiporn F, et al. Phylogeny of *Angiostrongylus Cantonensis* in Thailand based on cytochrome c oxidase subunit I gene sequence. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2016; 47(3): 377-86.

3. Nitidandhaprabhas P, Harnsomburana K, Thepsitthar P. *Angiostrongylus cantonensis* in the cerebrospinal fluid of an adult male patient with eosinophilic meningitis in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1975; 24(4): 711-2.
4. Chitramvong YP. The Bithyniidae (Gastropoda: Prosobranchia) of Thailand: comparative external morphology. Malacol Rev 1992; 25: 21-38.
5. Giannelli A, Cantacessi C, Colella V, Dantas-Torres F, Otranto D. Gastropod-borne helminths: A look at the snail-parasite interplay. Trends Parasitol 2016; 32(3): 255-64.
6. Tesana S, Srisawangwong T, Sithithaworn P, Laha T, Andrews R. Prevalence and intensity of infection with third stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks from Northeast Thailand. Am J Trop Med Hyg 2009; 80(6): 983-7.
7. Vitta A, Polseela R, Nateeworanart S, Tattiyapong M. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. Asian Pac J Trop Med 2011; 4(8): 597-9.
8. Vitta A, Polsut W, Fukruksa C, Yimthin T, Thanwisai A, Dekumyoy P. Levels of infection with the lungworm *Angiostrongylus cantonensis* in terrestrial snails from Thailand, with *Cryptozona siamensis* as a new intermediate host. J Helminthol 2016; 90(6): 737-41.
9. Chang JH, Yen CM, Chen ER, Chung LY, Wang JJ, Chye SM, et al. Detection of antibodies to surface antigens of *Angiostrongylus cantonensis* by ELISA. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89(5): 569-72.
10. Fang W, Wang J, Liu J, Xu C, Cai W, Luo D. PCR assay for the cell-free copro-DNA detection of *Angiostrongylus cantonensis* in rat faeces. Vet Parasitol 2012; 183(3-4): 299-304.
11. Qvarnstrom Y, Xayavong M, da Silva AC, Park SY, Whelen AC, Calimlim PS, et al. Real-time polymerase chain reaction detection of *Angiostrongylus cantonensis* DNA in cerebrospinal fluid from patients with eosinophilic meningitis. Am J Trop Med Hyg 2016; 94(1): 176-81.
12. Chen R, Tong Q, Zhang Y, Lou D, Kong Q, Lv S, et al. Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of *Angiostrongylus cantonensis* infection in Pomacea canaliculata. Parasit Vectors 2011; 4: 204.

13. Liu CY, Song HQ, Zhang RL, Chen MX, Xu MJ, Ai L, et al. Specific detection of *Angiostrongylus cantonensis* in the snail *Achatina fulica* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Mol Cell Probes 2011; 25(4): 164-7.
14. Radomyos P, Tungtrongchitr A, Praewanich R, Khewwatchan P, Kantangkul T, Junlananto P, et al. Occurrence of the infective stage of *Angiostrongylus cantonensis* in the yellow tree monitor (*Varanus bengalensis*) in five provinces of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1994; 25(3): 498-500.
15. Bradley JS, McKay RJ. A Monte Carlo study of tests on data originating from quadrat sampling. I: Data from a Poisson distribution. Math Biosci 1990; 100(1): 69-85.
16. Punyagupta S, Juttijudata P, Bunnag T. Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*. Am J Trop Med Hyg 1975; 24(6 Pt 1): 921-31.
17. Cross JH, Chi JC. ELISA for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* antibodies in patients with eosinophilic meningitis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1982; 13(1): 73-6.
18. Dusitsittipon S, Thaenkham U, Watthanakulpanich D, Adisakwattana P, Komalamisra C. Genetic differences in the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) in Thailand. J Helminthol 2015; 89(5): 545-51.
19. Yen CM, Chen ER. Detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis* in serum and cerebrospinal fluid of patients with eosinophilic meningitis. Int J Parasitol 1991; 21(1): 17-21.

การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification สำหรับตรวจสอบการระบาดของเชื้อ *Angiostrongylus cantonensis* ในหอยทากบก

ปัณณวิชญ์ สิริเวชวิริยะ[1]

บทคัดย่อ

เชื้อพยาธิปอดหนู หรือ *Angiostrongylus cantonensis* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิด Eosinophilic meningitis พยาธิตัวกลมชนิดนี้พบในเส้นเลือดแดงในปอดของหนู มีโฮสต์จำเพาะในธรรมชาติ ได้แก่ สัตว์ฟันแทะ ในขณะเดียวกันจะมีโฮสต์ตัวกลางเป็นสัตว์ในธรรมชาติได้หลายชนิด รวมถึงหอย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาระบาดวิทยาของเชื้อ *A. cantonensis* ในหอยทากบก โดยเก็บตัวอย่างในเขตตำบลบ้านตุ่นและตำบลแม่กา จำนวนทั้งสิ้น 336 ตัวอย่าง (*H. distincta*; 112 ตัวอย่าง, *A. fulica*; 112 ตัวอย่าง, และ *C. siamensis*; 112 ตัวอย่าง) โดยการสุ่มเก็บตัวอย่าง และทำการตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการใช้เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ผลตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบตัวอย่างให้ผลบวก 61/336 (18.15%) ตัวอย่าง โดยพบการติดเชื้อ 24 (7.14%) และ 37 (11.01%) ตัวอย่างจากหอยสายพันธุ์ *A. fulica* และ *C. siamensis* ตามลำดับ และไม่พบการติดเชื้อในหอยสายพันธุ์ *H. distincta* จากการตรวจด้วยเทคนิคดังกล่าว อย่างไรก็ตาม จากผลการตรวจด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ให้ผลการตรวจที่มีความไวในการตรวจพบเชื้อ *A. cantonensis* สูงกว่า โดยพบการติดเชื้อ 40 (11.90%), 42 (12.50%) และ 5 (1.49%) ตัวอย่างจากหอยสายพันธุ์ *A. fulica, C. siamensis* และ *H. distincta* ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า เทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบการติดเชื้อ *A. cantonensis* สูงกว่า จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ในงานระบาดวิทยาการตรวจหาเชื้อพยาธิปอดหนูในโฮสต์ตัวกลางได้หลากหลายชนิด ที่เป็นตัวการแพร่ระบาดของโรคสู่มนุษย์

คำสำคัญ: พยาธิปอดหนู หอยทากบก ระบาดวิทยา กล้องจุลทรรศน์ LAMP การตรวจ

THJPH 2020; 50(1): 37-46

[1] สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา