การใช้พีซีอาร์อาร์เอฟแอลพีในการตรวจหนอนพยาธิฟิลาเรียในแมว

นางสาว อลิสา จันทรัปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4185-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF FILARIAL NEMATODES IN DOMESTIC CATS BY USING PCR-RFLP

Miss Alisa Junpee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4185-5

Thesis Title	DETECTION OF FILARIAL NEMATODES IN DOMESTIC CATS BY USING PCR-RFLP
By	Miss Alisa Junpee
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Associate Professor Surang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Surang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)

..... Member

(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

..... Member

(Associate Professor Suwannee Nithiuthai, D.V.M., M.V. Sc., Ph..D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อลิสา จันทร์ปี : การใช้พีซีอาร์อาร์เอฟแอลพีในการตรวจหนอนพยาธิฟิลาเรียในแมว (Detection of Filarial Nematodes in Domestic Cats by Using PCR-RFLP) อ.ที่ปรึกษา: รศ.พญ.ดร. สุรางค์ นุชประยูร. หน้า 62. ISBN: 974-17-4185-5.

โรคเท้าช้างเป็นโรคที่องค์การอนามัยโลกได้ประกาศจะกำจัดให้หมดไปในปี พ.ศ. 2563 โรคเท้าช้างที่เกิดจากหนอนพยาธิฟิลาเรีย *Brugia malayi* พบมากในจังหวัดสุราษฎร์ธานี และนราธิวาสของประเทศไทย เนื่องจากมีแมวเป็นสัตว์รังโรค นอกจากแมวจะเป็นรังโรคของ *B. malayi* แมวยังมีการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรีย *B. pahangi*, *Dirofilaria immitis* และ *D. repens* ซึ่งจำแนกสปีชีส์ออกจากกันได้ยากโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในการบรรลุเป้าหมายในการกำจัดโรคเท้าช้างให้หมดไปนั้น การประเมินสถานการณ์โรคตามความเป็นจริงจำเป็นในการกำจัดโรค การศึกษาครั้งนี้ได้หาความชุกของหนอนพยาธิฟิลาเรียในแมวบริเวณเขตโรคชุมชุม ใน อ. พระแสง จ. สุราษฎร์ธานี ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยทำการเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของหนอนพยาธิฟิลาเรีย ซึ่งเมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ase* I จะทำให้สามารถจำแนกสปีชีส์หนอนพยาธิฟิลาเรียได้ ผลที่ได้จากวิธีนี้นำไปเปรียบเทียบกับการตรวจเลือดแมวด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังจากย้อมสี Giemsa และการตรวจ acid phosphatase activity ผลการเปรียบเทียบพบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน จากแมวจำนวน 52 ตัว การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแมวมีการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียจำนวน 3 ตัว (5.7%) ซึ่งแบ่งออกเป็นการติดเชื้อ *B. pahangi* จำนวน 2 ตัว (3.8%) และ *D. immitis* จำนวน 1 ตัว (1.9%) และจากการตรวจด้วยวิธี PCR-RFLP พบการติดเชื้อ *B. pahangi* เพิ่มในแมวอีก 2 ตัวทำให้เพิ่มความชุกของหนอนพยาธิฟิลาเรียทั้งหมดเป็น 9.5% จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าแมวไม่ได้เป็นรังโรคของ *B. malayi* ในพื้นที่ที่ทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการเกิดโรคในคนจาก *D. immitis* และ *B. pahangi* ซึ่งเป็นหนอนพยาธิฟิลาเรียของสัตว์ จึงควรมีการเฝ้าระวังการเกิดโรคดังกล่าว จากการที่ PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ และรวดเร็วสูง ดังนั้นจึงมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของหนอนพยาธิฟิลาเรียทั้งในสัตว์รังโรค คน และยุงพาหะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

447 52883 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: DOMESTIC CATS / FILARIAL NEMATODES / ITS1/ PCR-RFLP/ THAILAND

ALISA JUNPEE: DETECTION OF FILARIAL NEMATODES IN DOMESTIC CATS BY USING PCR-RFLP. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SURANG NUCHPRAYOON. 62 pp. ISBN. 974-17-4185-5.

Lymphatic filariasis has been targeted by the World Health Organization to be eliminated by the year 2020. Malayan filariasis, caused by *Brugia malayi*, is endemic in India, Indonesia, Malaysia, Philippines, Sri Lanka, and the Southern Thailand where domestic cats serve as a major reservoir host. However, in nature, domestic cats also carry *B. pahangi*, *Dirofilaria immitis* and *D. repens* infections. In order to assess the burden of filarial nematodes in domestic cats, we studied domestic cats in an endemic area of malayan filariasis at Pra-sang district, Surat-thani, a province in Southern Thailand. Together with Giemsa stain and acid phosphatase activity studies, we performed PCR-RFLP analysis of the first internal transcribed spacer (ITS1) region of ribosomal DNA (rDNA). The PCR-RFLP of ITS1 with *Ase* I could differentiate *B. malayi*, *B. pahangi*, *D. immitis* and *D. repens*. Out of the 52 study cats, filarial parasites were identified in 3 (5.7%) cats, of which 2 (3.8%) were *B. pahangi*, and 1 (1.9%) *D. immitis*. The PCR-RFLP technique could detect two more blood samples with *B. pahangi*, increasing the total prevalence of filarial parasites to 9.5%. Our data suggest that the domestic cats are not an important host of *B. malayi* in this region of Thailand. However, *D. immitis* and *D. repens*, can cause dirofilariasis in human, a zoonotic infection. Therefore, it should be of public health concern.

The high sensitivity and specificity of this PCR-RFLP method makes it valuable for large-scale epidemiological studies of filarial parasites in animal reservoir hosts, and can be applied for studies in human, as well as mosquito vectors.

Field of study Medical Science Student' s signature.....Alisa Junpee.....
Academic year 2003 Advisor' s signature.....Surang Nuch.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude and profound appreciation to Associate Professor Dr. Surang Nuchprayoon, my advisor for her valuable advice, guidance, helpfulness, understanding, and intelligential motivation throughout my study.

My grateful appreciation is extended to Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangura, Associate Professor Dr. Suwannee Nithiuthai, and Professor Yong Poovorawan, my thesis committees, for their valuable discussion and suggestions.

This study was supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the Molecular Biology Funds, Research Affairs, Faculty of Medicine, and the Affairs Thesis grants for graduate students in public universities, Graduate school, and Chulalongkorn University.

I would like to thank Dr. Saravudh Suvannadabba, Dr. Suwich Thammapalo, Mr. Surapong Chumpong, and officers at Filariasis Division and regional officers for their support during specimen collections. I also appreciate all staffs at Parasitology Unit, Department of Pathology, Faculty of Veterinary, and staffs at Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their technical help.

I am also really thankful to Mr. Arkhom Saingam, Ms. Songpun sangprakarn, members in Filariasis Unit, and the Snake Venom Unit, my friends for their encouragement, sincerity and friendship.

Finally, I am deeply grateful to my parents and every member in my family for their kindness, understanding and cheerfulness.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....xi

LIST OF ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Question.....5
- Objective of the Study.....5
- Hypothesis.....5
- Key Words.....5
- Conceptual Framework.....6
- Expected Benefits and Applications.....7

II LITERATURE REVIEW

- Life Cycle of filariae Parasite.....8
- Malayan Filariasis.....10
- Zoonotic filariae.....10
- Filarial nematodes in animal reservoirs in Thailand 13
- Species differentiation of filarial parasites.....14
- Species differentiation by PCR-RFLP of ITS1 of Ribosomal DNA.....15

TABLE OF CONTENTS (Continued)

CHAPTER page

III MATERIALS AND METHODS

- Study area 19
- Specimen collection 19
- Giemsa stain.....20
- Histochemical stain.....20
- Extraction of filarial DNA from blood samples.....20
- DNA purification.....21
- Semi-nested PCR amplification.....22
- Single PCR amplification for ITS1 with ITS1-F and ITS1-R primers 23
- Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....23
- Agarose gel electrophoresis.....23
- DNA purification from gel slice.....24
- Ligation of PCR products into plasmid vector.....25
- Preparation of *E. coli* competent cells by $CaCl_2$ method.....25
- Transformation of *E. coli* competent cells.....26
- Plasmid DNA extraction by alkaline lysis method.....26
- Digestion of restriction endonucleases and analysis.....27
- DNA Sequencing.....27
- Sequences analysis.....28

IV RESULTS

1. PCR-RFLP of ITS1 for filarial nematodess identification

- Cloning and sequencing of ITS1.....31
- Nucleotide sequence alignment and primers design.....32
- PCR-RFLP of filarial ITS1.....34

TABLE OF CONTENTS (Continued)

CHAPTER page

2. Epidemiology studies

- Description of the studied area and specimen collection.....37

- Species identification by morphology.....39

- Species identification by PCR-RFLP of ITS1 digested with *Ase* I 42

V CONCLUSION AND DISCUSSION.....43

REFFERENCES.....46

APPENDIX.....56

BIOGRAPHY.....61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Detection of filarial nematodes infections in domestic cats by microscopic methods and PCR-RFLP in 2 villages of Pra-sang district, Surat-thani province, Thailand.....42
2. Restriction enzyme *Ase* I with it recognition site, recommended buffer and manufacturer.....60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Endemic areas of lymphatic filariasis in Thailand.....2
2. Life cycle of lymphatic filarial parasites.....9
3. Diagram of a eukaryotic ribosomal RNA gene family.....16
4. Semi-nested PCR of ITS1 of filarial parasites.....30
5. Digested recombinant ITS1/pGem®-T.....31
6. Alignment of rDNA from *B. malayi*, *B. pahangi*, *W. bancrofti*, *D. immitis*, *O. volvulus*, *M. ozzardi*, and *D. reconditum*.....33
7. PCR product of filarial ITS1.....34
8. Sensivity of the PCR for detection of *B. malayi* ITS1 35
9. PCR-RFLP analysis of filarial ITS1 digested with *Ase* I.....36
10. The study area at Pra-sang district, Surat-thani province.....38
11. Giemsa and acid phosphatase stain of *B. pahangi* microfilariae from cats.....40
12. Giemsa and acid phosphatase stain of *D. immitis* microfilariae from cats.....41

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pairs
^{o}C	degree Celsius
cm	centimeter
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
E. coli	*Escherichia coli*
g	gram (s)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani media
M	molar
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
N	normal
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit
pmol	picomole
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNase	ribonuclease

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulphate
sec	second
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	ultraviolet
μg	microgram
μl	microlitre
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
WHO	world health organization

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย