231294

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในคนไทยทำให้ตระหนักถึงความสำคัญของลิงมาแคกในการเป็นรังโรคซึ่งมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาอุบัติการณ์และการกระจายของเชื้อมาลาเรียในลิงมาแคกจึงมีความสำคัญซึ่งอาจเป็นตัวสะท้อนให้เห็นถึงแนวโน้มของโรคในคน อย่างไรก็ตาม การจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียของลิงที่สามารถติดต่อสู่มนุษย์กับเชื้อมาลาเรียที่พบในมนุษย์ออกจากกันโดยสังเกตุลักษณะของเชื้อเพียงอย่างเดียวทำได้ยาก เนื่องจากการอุบัติของการติดเชื้อมาลาเรียของลิงที่พบในผู้ป่วยในประเทศไทยและมาเลเซียซึ่งถูกค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ นับเป็นความสำคัญที่ต้องคำนึงเกี่ยวกับศักยภาพของการติดเชื้อมาลาเรียจากสัตว์สู่มนุษย์ ด้วยเหตุที่การวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทัศน์ไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อมาลาเรียของลิงออกจากของมนุษย์ได้ชัดเจน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียเหล่านี้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสเพื่อตรวจสอบยีนสำหรับไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กที่มีความจำเพาะต่อเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารั่ม พลาสโมเดียม ไวแวกซ์ พลาสโมเดียม มาลาริอี พลาสโมเดียม โอวาเล่ พลาสโมเดียม โนวลิไซ พลาสโมเดียม อินุไอ พลาสโมเดียม ไซโนโมลจิ พลาสโมเดียม โคทนิไอ พลาสโมเดียม แฟรกไจล์ พลาสโมเดียม ซิมิโอวาเล่ และเฮพาโตซีสตีส วิธีวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูง สามารถตรวจพบเชื้อที่มีปริมาณต่ำถึงระดับ 1 ตัว จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในประชาการลิงในเขตจังหวัดนราธิวาสและบริเวณใกล้เคียงในปี ค.ศ. 2009 ในการสำรวจนี้ได้ทำการจับลิง 665 ตัว ประกอบด้วยลิงกัง 455 ตัว ลิงแสม 187 ตัว ลิงวอกภูเขา 4 ตัวและค่างแว่นถิ่นใต้จำนวน 7 ตัว ผลการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อมาลาเรียและ *Hepatocystis* 164 ตัวอย่าง ในขณะที่การตรวจโดยปฏิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสโดยใช้ยีน small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) เป็นเป้าหมายให้ผลบวก 190 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28.6) ทั้งนี้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบ *Plasmodium inui* 69 ตัวอย่าง *Plasmodium cynomolgi* 2 ตัวอย่าง *Plasmodium knowlesi* 2 ตัวอย่าง และ *Hepatocystis* จำนวน 67 ตัวอย่าง ในทางตรงข้ามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SSU rRNA และ mitochondrial cytochrom b (*Mtcytb*) พบการติดเชื้อมาลาเรียต่างชนิดร่วมกันมากถึงร้อยละ 36.3 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก ทั้งนี้ *Plasmodium inui* มีอุบัติการณ์สูงสุดโดยพบร้อยละ 36.3 ในลิงกังและร้อยละ 38.9 ในลิงแสม สำหรับ *Plasmodium knowlesi* พบจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยพบในลิงกัง 9 ตัวอย่าง ลิงแสม 2 ตัวอย่าง และค่างแว่นถิ่นใต้ 1 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้เป็นการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *Plasmodium knowlesi* กับเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น 10 ตัวอย่าง แม้ว่าการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียที่พบในการศึกษานี้ได้อย่างชัดเจน 7 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium inui*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium fieldi* และ *Plasmodium simiovale* รวมทั้ง *Hepatocystis* แต่จากการวิเคราะห์สายใยพันธุกรรมพบลำดับเบสของยีน *Mtcytb* 47 แบบ ที่ไม่สามารถจัดเข้ากับเชื้อมาลาเรียชนิดใด โดยแยกเป็น 2 แขนงใหม่ที่มีค่าระดับความเชื่อมั่นที่ค่อนข้างสูง แสดงว่าเชื้อมาลาเรีย

ดังกล่าวเป็นชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามการตรวจพบ *Plasmodium knowlesi* ในประชากรลิงในภาคใต้ของประเทศไทย บ่งบอกถึงการเป็นรังโรคของลิงเหล่านี้ ในขณะที่การพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อมาลาเรียชนิดดังกล่าวในลิงและในคนที่ต่ำอาจเนื่องจากคนได้รับเชื้อส่วนใหญ่จากลิงที่เป็นรังโรคโดยผ่านยุงก้นปล่องพาหะที่เหมาะสม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาโครงสร้างประชากรของเชื้อมาลาเรียในลิงมาแคกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนสำหรับโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยด์ชนิดที่ 1 และโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยด์ชนิดที่ 4 และ 5 พบว่าขอบเขตความหลากหลายของยีน PkMsp1 PcyMsp1 และ PiMsp1 จากการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์จาก ของแต่ละชนิด ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับยีน PvMsp1 คือมีส่วนที่มีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนสูงร้อยละ 90-95 และส่วนที่มีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนต่ำร้อยละ 22-68 การเปรียบเทียบระหว่าง PvMsp1 PcyMsp1 PiMsp1 และ PkMsp1 พบว่ามีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนร่วมกันร้อยละ 60-65 นอกจากนี้ประมาณร้อยละ 67 ของการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของกรดอะมิโนระหว่างโปรตีน 3 ชนิดนี้ยังคงคุณสมบัติของ hydrophobicity และ hydrophilicity กลไกที่ทำให้เกิดความหลากหลายในโปรตีน 3 ชนิดนี้เกิดจากการ point mutation การเกิด insertion/deletion และ slipped-strand misparing ของลำดับเบสที่ซ้ำกันใน variable blocks นอกจากนี้การศึกษานี้ยังนับเป็นครั้งแรกที่ได้มีการโคลนยีน PcyMsp4/5 PiMsp4 PcoMsp4 และ Pmsp4/5 การทราบถึงโครงสร้างของยีนเหล่านี้จะมีประโยชน์ต่อการออกแบบวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในอณาคต

Abstract

The presence of human infections caused by Plasmodium knowlesi in Thailand has highlighted the importance of macaque monkeys as reservoir hosts that are highly populated in southern Thailand. However, certain nonhuman primate malarias potentially causing human disease cannot unambiguously diagnosed based on their structural features per se. Meanwhile, the emergence of Plasmodium knowlesi infecting humans in Thailand and Malaysia has signified the importance of zoonotic malaria transmission in these regions. Because microscopic diagnosis of malaria cannot differentiate species of these malaria parasites, we have developed a species-specific PCR-based detection targeting the small subunit ribosomal RNA genes of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, Plasmodium knowlesi, Plasmodium inui, Plasmodium cynomolgi, Plasmodium coatneyi, Plasmodium fragile, Plasmodium simiovale and Hepatocystis spp. The sensitivity of this PCR detection is high, as minimal as 1 parasite can be diagnosed. To address the prevalence and distribution of malaria in nonhuman primates that may reflect the status of disease trend in humans, a survey of malaria in monkey populations in Narathiwat Province and nearby areas have been conducted in 2009. In total, 665 monkeys were captured that included *Macaca nemestrina* (n=455), *Macaca fascicularis* (n=187), *Macaca arctoides* (n=4), and *Semnopithecus obscurus* (n=7). Of these, microscopy detected malaria and *Hepatocystis* in 164 samples while nested PCR targeting the small subunit ribosomal RNA gene (*SSU rRNA*) yielded positive results in 190 isolates (28.6%). Microscopy could presumptively diagnose parasite species in 139 isolates comprising *Plasmodium inui* (n=69), *Plasmodium cynomolgi* (n=2), *Plasmodium knowlesi* (n=1) and *Hepatocystis* (67). On the other hand,, analysis of the SSU rRNA and mitochondrial cytochrome b sequences has revealed that mixed infections of different malaria species were found in 36.3% of all PCR positive isolates. Meanwhile, *Plasmodium inui* was the most prevalent species identified accounting for 36.3% and 38.9% of malaria infected *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*, respectively. Importantly, *Plasmodium knowlesi* was detected in 12 isolates (9 *Macaca nemestrina*, 2 *Macaca fascicularis* and 1 *Semnopithecus obscurus*) and 10 of these were co-infections with other malaria species and *Hepatocystis*. Although sequence analysis has unambiguously identified 7 *Plasmodium* species in this survey (*Plasmodium inui, Plasmodium knowlesi, Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium fieldi* and *Plasmodium simiovale*) and *Hepatocystis,* phylogenetic inference has placed 47 malarial mitochondrial sequences into 2 distinct clades with high bootstrap supports, suggesting that they belonged to novel *Plasmodium* species. The presence of *Plasmodium knowlesi* in southern Thailand macaque population could reflect that these monkeys could

serve as reservoir hosts for human infections while the low prevalence of this malaria in macaques and humans could suggest that humans mainly acquired infections from infected reservoirs through appropriate mosquito vectors. Furthermore, we analyzed the extent of sequence diversity in the genes encoding the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium knowlesi* (PkMsp1) and those of *Plasmodium cynomolgi* (PcyMsp1) and *Plasmodium inui* (PiMsp1). Sequence alignment of these genes with that of *Plasmodium vivax* (PvMsp1) has revealed that the Msp-1 genes of these malarias possess interspecies-conserved regions, showing 90-95% amino acid sequence similarity, and interspecies-variable regions with low level of sequence similarity, ranging from 22-68 %. The overall amino acid similarity among PvMsp1, PkMsp1 and PcyMsp1 was 60-65%. It is of note that 67% of the amino acid exchanges among these 3 genes retain their hydrophobicity-hydrophilicity profiles. Some possible genetic mechanisms underlying variation in these genes could involve point mutation, insertion/deletion and slipped-strand mispairing process in repetitive sequence within variable regions. In addition, we have cloned the merozoite surface protein-4/5 genes of *Plasmodium cynomolgi* (PcyMsp4/5), *Plasmodium inui* (PiMsp4), *Plasmodium coatneyi* (PcoMsp4) and *Plasmodium sp.* (Pmsp4/5) for the first time and compared with their homoloques in human malaria species. Characterization of vaccine candidate homologues of nonhuman primate malaria would form a basis for further malaria vaccine studies.