

การตรวจพบสารพันธุกรรมและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ
Plasmodium inui และ *Hepatocystis* spp. ในลิงแม็กแคกในประเทศไทย

Molecular detection and phylogenetic analysis of
Plasmodium inui and *Hepatocystis* spp. in macaques in Thailand

รุ่งรัตน์ ไสยสมบัติ* ศศิวิมล สัจจงพงษ์ สุภาวรรณ งามจิตต์เอื้อ มยุรี ไวยครุฑ มณฑกานต์ จิระจันทร์
Rungrat Saiyasombat* Sasiwimon Sajjapongse Supawan Ngamjituea Mayuree Waiyakroot Montakan Jiratanh

Abstract

Backgrounds: *Plasmodium inui* is a malaria parasite in non-human primates that has been reported to be experimentally transmitted to humans. Therefore, it is considered to be a potentially zoonotic parasite. In Thailand, macaques are abundance and living near human settlements. This study, we reported the genetic and evolutionary relationships of *P. inui* and *Hepatocystis* spp., a close relative of *Plasmodium* spp., found in macaques in Thailand.

Methods: Fifty seven macaque blood samples, from three collecting groups from either different sites or different timing of collection with at least 1 microscopically positive sample by Giemsa-stained blood smears, were tested by PCR targeting small subunit ribosomal RNA gene. Amplified PCR products were cloned and sent for Sanger sequencing. Obtained sequences were analyzed and a phylogenetic tree was constructed.

Results: Parasite DNA of the genus *Plasmodium* and *Hepatocystis* were detected in four macaque blood samples. Sequence analysis indicated that one sample from long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*) from central Thailand was *P. inui* and the other three samples from pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*) (one sample from central region and two samples from southern region) were *Hepatocystis* spp. The *P. inui* isolate was closely related to the isolate from long-tailed macaque in southern Thailand in 2008 with more than 99% nucleotide sequence identity. This *P. inui* isolate was also closely related to *P. inui* strain Taiwan II and *P. inui* strain South China. Three isolates of *Hepatocystis* spp. possessed 94-96% nucleotide sequence identity to *Hepatocystis* sp. isolate from a long-tailed macaque in southern Thailand in 2008 and they were grouped together in *Hepatocystis* spp. lineage.

Conclusions: These results indicate that the genetic diversity of *P. inui* and *Hepatocystis* spp. infecting macaques in Thailand is still limited. Further studies should be conducted on genes in other parts as well as vectors that play a role in parasites transmission in order to monitor simian malaria that have potential to infect humans.

Keywords: *Plasmodium inui*, *Hepatocystis* spp., SSU rRNA, macaques, Thailand

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8911 โทรสาร 0-2579-8918-19 e-mail: rungrat.s@dld.go.th

National Institute of Animal Health, Latyao, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author Tel. 0-2579-8911 Fax. 0-2579-8918-19 e-mail: rungrat.s@dld.go.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อ *Plasmodium inui* เป็นเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ มีรายงานว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อสู่คนได้จากการทดลอง จึงถือว่ามีศักยภาพในการเป็นโรคที่รับจากสัตว์ เชื้อ *P. inui* มีลิงแม็กแคเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติที่พบได้ในประเทศไทย และมีความใกล้เคียงกับมนุษย์ การศึกษานี้รายงานลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *P. inui* และเชื้อ *Hepatocystis* spp. ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Plasmodium* spp. ที่พบในลิงแม็กแคในประเทศไทย

วิธีการ: ตัวอย่างเลือดลิงแม็กแคจำนวน 57 ตัวอย่าง จาก 3 กลุ่มตัวอย่าง ที่เก็บจากต่างพื้นที่หรือต่างช่วงเวลา ซึ่งมีอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง ในกลุ่มที่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี Giemsa-stained blood smears นำมาตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อในสกุล *Plasmodium* และ *Hepatocystis* โดยวิธี PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย small subunit ribosomal RNA ทำการโคลนผลผลิต PCR ที่ได้และนำไปหาลำดับสารพันธุกรรม วิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม และสร้างแผนภูมิเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ผล: ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อในสกุล *Plasmodium* และ *Hepatocystis* จากตัวอย่างเลือดลิงแม็กแค 4 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรม พบว่าเป็นเชื้อ *P. inui* จากเลือดลิงแสม (*Macaca fascicularis*) จากภาคกลางของประเทศไทย 1 ตัวอย่าง และเชื้อ *Hepatocystis* spp. จากตัวอย่างเลือดลิงกัง (*Macaca nemestrina*) 3 ตัวอย่าง (จากภาคกลาง 1 ตัวอย่าง และจากภาคใต้ 2 ตัวอย่าง) เชื้อ *P. inui* ที่พบมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเชื้อจากลิงแสมในภาคใต้ของประเทศไทยที่พบในปี พ.ศ. 2551 โดยมีความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรมมากกว่า 99% เชื้อ *P. inui* ที่พบนี้ยังใกล้ชิดกับสายพันธุ์ได้วัน II และสายพันธุ์ภาคใต้ของจีน ส่วนเชื้อ *Hepatocystis* spp. ที่พบทั้ง 3 ตัวอย่าง มีความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรม 94-96% กับเชื้อที่มีรายงานก่อนหน้านี้ในลิงแสมในภาคใต้ของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2551 และถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันในเชื้อสาย *Hepatocystis* spp.

สรุป: การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. inui* และ *Hepatocystis* spp. ที่พบในลิงแม็กแคในประเทศไทย ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างจำกัด ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงยีนในส่วนอื่น และแมลงพาหะที่มีบทบาทในการถ่ายทอดเชื้อเพื่อเป็นการเฝ้าระวังเชื้อมาลาเรียในลิงที่มีโอกาสติดต่อมาสู่คนได้

คำสำคัญ: *Plasmodium inui*, *Hepatocystis* spp., SSU rRNA, ลิงแม็กแค, ประเทศไทย

บทนำ

การติดเชื้อโปรโตซัวในสกุล *Plasmodium* spp. เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในคนและสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ มีพาหะนำเชื้อที่สำคัญคือ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) การติดเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรังและไม่แสดงอาการ (Voller, 1972) โดยจะพบการแสดงอาการในสัตว์ที่ติดมามีสัตว์ที่อยู่ในภาวะกดภูมิคุ้มกัน และสัตว์ที่มีภาวะเครียด นอกจากเชื้อ *Plasmodium knowlesi* และ *P. cynomolgi* ที่สามารถถ่ายทอดโดยยุงตามธรรมชาติระหว่างคนและลิงแม็กแคแล้ว เชื้อ *P. inui* เป็นเชื้อมาลาเรียที่สามารถก่อโรคในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์อีกชนิดหนึ่ง ที่ถือว่ามีศักยภาพในการก่อโรคที่รับจากสัตว์ (zoonotic potential) เนื่องจากมีรายงานว่าเชื้อ *P. inui* สามารถก่อโรคในคนได้จากการทดลองฉีดเลือดลิงแสมที่มีเชื้อเข้ากล้ามเนื้อคนที่เป็นอาสาสมัคร โดยพบเชื้อในกระแสเลือดหลังได้รับเชื้อ 23 วัน และคงอยู่ในกระแสเลือดนาน 1 สัปดาห์ (Das Gupta, 1938) ส่วนอีกหนึ่งการทดลองเป็นการให้ยุงที่มีเชื้อ *P. inui* คุดเลือดอาสาสมัคร ซึ่งพบเชื้อในกระแสเลือดหลังได้รับเชื้อ 31 และ 56 วัน และเชื้อยังคงอยู่ในกระแสเลือดได้นาน 21 และ 23 วันตามลำดับ นอกจากนี้จากการฉีดเลือดที่มีเชื้อ *P. inui* เข้ากล้ามเนื้ออาสาสมัครโดยตรง พบเชื้อในกระแสเลือดหลังได้รับเชื้อ 10 ถึง 26 วัน (Coatney et al., 1966) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีรายงานคนที่ติดเชื้อ *P. inui* โดยธรรมชาติจากลิง และความเสี่ยงของการติดเชื้อ *P. inui* ข้ามระหว่างลิงแม็กแคและคนยังมีข้อมูลอย่างจำกัด

เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อ *P. inui* มีลิงแม็กแคเป็นโฮสต์ตามธรรมชาติเช่นเดียวกับ *P. knowlesi* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ที่สามารถติดมาสู่คนโดยธรรมชาติ เชื้อ *P. knowlesi* นี้พบได้ประปรายทางภาคใต้ของประเทศไทย (Jongwutiwes *et al.*, 2004) และพบการติดเชื้อในคนจำนวนมากในรัฐซาราวัก ประเทศมาเลเซีย (Vythilingam *et al.*, 2008) ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้นมีรายงานการติดเชื้อ *P. inui* ตามธรรมชาติในลิงแม็กแค เช่น ลิงแสม (*Macaca fascicularis*) และลิงกัง (*M. nemestrina*) เป็นต้น (Seethamchai *et al.*, 2008; Putaporntip *et al.*, 2010) ซึ่งมีรายงานว่าทำให้ลิงแสมเกิดภาวะโลหิตจาง ตับและม้ามโต ซึม อ่อนเพลีย เบื่ออาหารและน้ำหนักลด (Strokes *et al.*, 1983)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการใช้วิธีมาตรฐานคือ Giemsa-stained blood smears (Mathison and Pritt, 2017) แต่หลายครั้งที่วิธีนี้ไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียและเชื้อบางชนิดที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกัน เช่น เชื้อ *Hepatocystis* spp. ทั้งนี้เชื้อ *Hepatocystis* spp. เป็นเชื้อโปรโตซัวที่พบได้ทั่วไปในลิงแม็กแค (Garnham *et al.*, 1961; Seethamchai *et al.*, 2008) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Plasmodium* spp. และถูกจัดอยู่ในวงศ์เดียวกันคือ Plasmodiidae เชื้อ *Hepatocystis* spp. ถ่ายทอดโดยยุง *Culicoides* spp. (Garnham *et al.*, 1961) สามารถพบเชื้อได้ในกระแสเลือดของไพรเมตโฮสต์นานถึง 15 เดือน โดยที่โฮสต์ไม่แสดงอาการใด ๆ (Vickerman, 2005) แต่มีรายงานว่าพบโลหิตจางและแผลเป็นที่ตับได้ (Garnham, 1966) ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์สามารถติดเชื้อนี้ได้ซ้ำ ๆ และพบความชุกเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น (Vickerman, 2005) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. ในคน ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *Hepatocystis* spp. หมุนเวียนอยู่ในประชากรลิงแม็กแค (Seethamchai *et al.*, 2008; Putaporntip *et al.*, 2010) การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR) และการตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมสามารถนำมาช่วยในการวินิจฉัยจำแนกชนิดของเชื้อมาลาเรียและเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรียได้ (Johnston *et al.*, 2006; Putaporntip *et al.*, 2010) และยังทำให้ได้ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้ออันจะเป็นประโยชน์ต่อการติดตาม

และเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ เนื่องจากในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ในประเทศไทยยังมีรายงานอย่างจำกัด (Seethamchai *et al.*, 2008; Putaporntip *et al.*, 2010) และในประเทศไทยมีลิงแม็กแคจำนวนมากที่มีโอกาสสัมผัสกับมนุษย์ (Aggimarangsee, 1992; Malaivijitnond *et al.*, 2005) การศึกษาในครั้งนี้เพื่อยืนยันและรายงานการตรวจพบเชื้อ *P. inui* และเชื้อ *Hepatocystis* spp. ในลิงแม็กแครวมถึงลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เพื่อเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่อุบัติซ้ำจากสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ซึ่งเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ตัวอย่างเลือดของลิงแม็กแค ได้แก่ ลิงแสมและลิงกัง ที่ส่งมาตรวจยังสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างเดือนมกราคม 2558 ถึง พฤษภาคม 2560 เฉพาะกลุ่มที่มีตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมาลาเรียและเชื้อที่มีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรีย ด้วยวิธี Giemsa-stained blood smears จำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) ตัวอย่างจากพื้นที่ภาคกลาง ในเดือนมกราคม 2558 จำนวน 31 ตัวอย่าง 2) ตัวอย่างจากพื้นที่ภาคกลาง ในเดือนพฤษภาคม 2558 จำนวน 9 ตัวอย่าง 3) ตัวอย่างจากพื้นที่ภาคใต้ ในเดือนพฤษภาคม 2560 จำนวน 17 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 57 ตัวอย่าง

การสกัด DNA และการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วน SSU rRNA

สกัด DNA จากตัวอย่างเลือดลิง จำนวน 200 µl ที่เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว EDTA จำนวน 57 ตัวอย่าง โดยใช้ Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ เก็บรักษาตัวอย่างสารสกัด DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -30 °C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาเชื้อในสกุล *Plasmodium* และ *Hepatocystis* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer rPLU1 (5'-TCAAAGATTAAG-CCATGCAAGTGA-3') และ reverse primer rPLU5 (5'-CCTGTTGTTGCCCTTAACTTC-3') ที่จำเพาะต่อยีน

small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) (Singh *et al.*, 1999) ปฏิบัติ PCR ปริมาตรสุทธิ 25 µl ประกอบด้วย 10X PCR buffer (Invitrogen, USA), dNTP (New England Biolabs, USA) 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, forward และ reverse primers อย่างละ 0.2 µM, Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) 0.5 units และ DNA ต้นแบบที่สกัดได้จากตัวอย่าง 2 µl โดยใช้ Dnase/Rnase-free water (Invitrogen, USA) ในการปรับปริมาตร ขั้นตอนของ PCR ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 94 °C 2 นาที ตามด้วยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจำนวน 35 รอบ โดย denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที annealing ที่ 50 °C 30 วินาที extension ที่ 72 °C 2 นาที ตามด้วย final extension ที่ 72 °C 15 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,600-1,700 bp บน 0.8% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย RedSafe nucleic acid solution (iNtRON Biotechnology, South Korea) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ DNA ของ *P. gallinaceum* เป็นตัวควบคุมบวกและ Dnase/Rnase-free water เป็นตัวควบคุมลบ และ 100 bp DNA Ladder (biotechrabbit™, Germany) เป็น DNA marker

การโคลนผลผลิต PCR และการตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม

โคลนผลผลิต PCR ที่เป็นสารพันธุกรรมเป้าหมาย ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) เข้าในพลาสมิดโดยใช้ TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA) ตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตระบุไว้ โดยเพิ่มจำนวนพลาสมิดด้วย TOP10 *Escherichia coli* ตรวจหาพลาสมิดที่มีสารพันธุกรรมเป้าหมายด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer M13F (5'-GTAAAACGACGG-CCAG-3') และ reverse primer M13R (5'-CAGGAAA-CAGCTATGAC-3') ปฏิบัติ PCR ปริมาตรสุทธิ 12.5 µl ประกอบด้วย 10X PCR buffer (Qiagen, USA), dNTP (New England Biolabs, USA) 0.2 mM, forward และ reverse primers อย่างละ 0.2 µM, HotStarTaq DNA

Polymerase (Qiagen, USA) 0.3125 units และ DNA ต้นแบบ จาก *E.coli* โคโลนีเดี่ยวที่เจือจางใน Dnase/Rnase-free water (Invitrogen, USA) 1 µl ขั้นตอนของปฏิกิริยา ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 95 °C 5 นาที ตามด้วยการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจำนวน 35 รอบ โดย denaturation ที่ 95 °C 30 วินาที annealing ที่ 50 °C 1 นาที extension ที่ 68 °C 2 นาที ตามด้วย final extension ที่ 68 °C 5 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,800-1,900 bp บน 0.8% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย RedSafe nucleic acid solution (iNtRON Biotechnology, South Korea) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA) นำไปตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม ด้วยวิธี Sanger sequencing (Macrogen, South Korea)

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมและการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ได้ในแต่ละส่วนมา ประกอบรวมกันโดยใช้โปรแกรม SEQMAN ใน DNASTar Lasergene software version 7.1.0 แล้วนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank เพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อ โดยใช้ Basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) ทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับสารพันธุกรรม บริเวณ SSU rRNA ขนาดประมาณ 1,600-1,700 bp (nucleotide identity) โดยใช้โปรแกรม MegAlign ใน DNASTar Lasergene software version 7.1.0 จัดเรียงข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อที่พบในการศึกษาครั้งนี้และเชื้ออื่นในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 1) โดยใช้โปรแกรม MUSCLE ใน MEGA software, version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โมเดล Tamura 3-parameter และวิเคราะห์ bootstrap 1,000 รอบ ด้วย MEGA software, version 7.0 โดยมีข้อมูลสารพันธุกรรมของ *Babesia microti* เป็น outgroup

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ *Plasmodium* spp. และ *Hepaticystis* spp. ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ รวมถึง *Babesia microti* ที่ใช้เป็น outgroup

ชนิดของเชื้อปรสิต	ชนิดของโฮสต์	พื้นที่ที่พบ	GenBank accession no.
<i>P. inui</i>	<i>Macaca fascicularis</i>	Central Thailand	MK078095, MK078096
<i>P. inui</i>	<i>M. fascicularis</i>	Thailand	EU400385
<i>P. inui</i>	<i>M. fascicularis</i>	South China	HM032051
<i>P. inui</i>	<i>M. cyclopis</i>	Taiwan	FN430725
<i>P. fieldi</i>	<i>M. fascicularis</i>	Malaysia	FJ619064
<i>P. cynomolgi</i>	<i>M. mulatta</i>	-	L08241
<i>P. hylobati</i>	<i>Hylobati moloch</i>	Malaysia (Borneo)	AB287280
<i>P. fragile</i>	-	-	M61722
<i>P. coatneyi</i>	<i>M. fascicularis</i>	Thailand	EU400393
<i>P. knowlesi</i>	<i>M. mulatta</i>	-	L07560
<i>P. knowlesi</i>	<i>Homo sapiens</i>	Malaysia	AY327553
<i>P. vivax</i>	<i>H. sapiens</i>	-	U03079
<i>P. falciparum</i>	-	-	M19172
<i>P. malariae</i>	-	-	M54897
<i>Hepaticystis</i> spp.	<i>M. nemestrina</i>	Central Thailand	MK078097, MK078098
<i>Hepaticystis</i> spp.	<i>M. nemestrina</i>	Southern Thailand	MK078099
<i>Hepaticystis</i> spp.	<i>M. nemestrina</i>	Southern Thailand	MK078100
<i>Hepaticystis</i> spp.	<i>M. fascicularis</i>	Thailand	EU400394
<i>Hepaticystis</i> spp.	<i>Callosiurus notatus</i>	Malaysia (Borneo)	JX090231
<i>Hepaticystis</i> spp.	<i>Cynopterus brachyotis</i>	Malaysia (Borneo)	DQ396541
<i>Babesia microti</i>	<i>H. sapiens</i>	China	KF410824

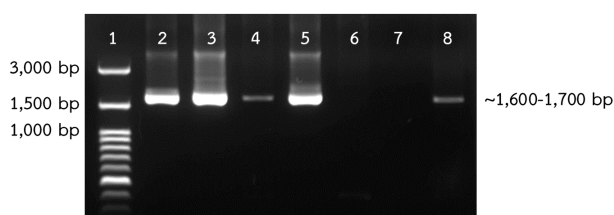
หมายเหตุ: เชื้อที่รายงานในการศึกษานี้แสดงเป็นตัวหนา, “-” คือ ไม่มีข้อมูล

ผลและวิจารณ์

การศึกษานี้ครั้งนี้ตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อในสกุล *Plasmodium* และ *Hepaticystis* ด้วยวิธี PCR ในตัวอย่างเลือดลิงแสม 4 ตัวอย่าง (รหัสตัวอย่าง 162, 166, 52511 และ 52517) จากจำนวน 57 ตัวอย่าง โดยให้ผลบวกสอดคล้องกับทุกตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี Giemsa-stained blood smears (ตารางที่ 2) ผลผลิต PCR ในส่วน SSU rRNA ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,600-1,700 bp (รูปที่ 1) จากการเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมกับฐานข้อมูล GenBank โดยการ BLAST พบว่าตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 162 ให้ผลใกล้เคียงที่สุดกับสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. inui* โดยพบว่ามีค่าความเหมือน 98-99% กับ *P. inui* isolates ต่าง ๆ ส่วนตัวอย่างเลือดลิงแสม จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัสตัวอย่าง 166, 52511 และ 52517 ให้ผลใกล้เคียงที่สุดกับสารพันธุกรรมของเชื้อ *Hepaticystis* spp. โดยพบว่ามีค่าความเหมือน 88-96% กับ *Hepaticystis* spp. isolates ต่าง ๆ ทั้งนี้ไม่พบการติดเชื่อร่วมกันของเชื้อ *Plasmodium* spp. มากกว่า 1 ชนิด และไม่พบการติดเชื่อมาลาเรียร่วมกับเชื้อ *Hepaticystis* spp.

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Giemsa-stained blood smears และ PCR และผลการ sequencing

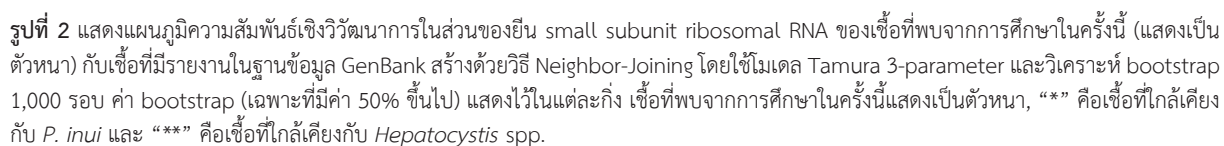
กลุ่มตัวอย่าง	เดือนและปีที่รับตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างส่งตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Giemsa-stained blood smears (รหัสตัวอย่าง)	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR (รหัสตัวอย่าง)	ผลการ sequencing
1	มกราคม 2558	31	1 (166)	1 (166)	<i>Hepaticystis</i> spp.
2	พฤษภาคม 2558	9	1 (162)	1 (162)	<i>Plasmodium inui</i>
3	พฤษภาคม 2560	17	2 (52511 และ 52517)	2 (52511 และ 52517)	<i>Hepaticystis</i> spp.
รวม		57	4	4	



รูปที่ 1 Gel electrophoresis แสดงผลผลิต PCR ของยีน SSU rRNA ขนาดประมาณ 1,600-1,700 bp; lane 1: 100 bp DNA Ladder (biotech rabbit™, Germany), lane 2-5: ตัวอย่างที่ให้ผลบวก (2: ตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 162, 3: ตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 166, 4: ตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 52511, 5: ตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 52517), lane 6: ตัวอย่างที่ให้ผลลบ, lane 7: ตัวควบคุมลบ (Dnase/Rnase-free water), lane 8: ตัวควบคุมบวก (*P. gallinaceum*)

ผลการโคลนผลผลิต PCR จากตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 162 และตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 166 ได้จำนวนตัวอย่างละ 2 โคลน คือ โคลน A และ B และจากตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัสตัวอย่าง 52511 และ 52517 ตัวอย่างละ 1 โคลน การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. inui* ที่พบในตัวอย่างเลือดลิงแสม จากภาคกลางของประเทศไทยในเดือนพฤษภาคม 2558 รหัสตัวอย่าง 162 ของทั้งโคลน A (MK078095) และ โคลน B (MK078096) พบว่ามีค่าความเหมือน 99.5 และ 99.6% ตามลำดับ กับเชื้อ *P. inui* ที่รายงานโดย Seethamchai *et al.* (2008) ซึ่งพบในลิงแสมทางภาคใต้ของประเทศไทย (EU400385) (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิด้วยวิธี Neighbor-Joining (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ใกล้เคียงที่สุดกับเชื้อ *P. inui* ที่รายงานโดย Seethamchai *et al.* (2008) เช่นเดียวกันและยังใกล้เคียงกับสายพันธุ์ไต้หวัน II (FN430725) ซึ่งพบในลิงแสมแห่งฟอร์โมซา (*M. cyclopis*)

	Percent Identity																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23				
Divergence	1	█	96.6	83.2	99.0	96.1	79.7	97.8	98.8	98.8	79.2	79.3	96.6	97.9	88.7	87.5	97.2	98.8	98.9	78.4	79.3	80.2	79.3	97.2	1	AB287280	
	2	3.5	█	83.1	96.6	96.6	79.9	96.4	96.5	96.5	78.1	77.6	99.5	96.4	86.7	86.0	96.3	96.5	96.7	78.6	79.3	80.5	79.4	95.9	2	AY327553	
	3	19.1	19.2	█	83.4	83.1	81.7	83.6	83.6	83.5	77.1	76.1	83.1	83.4	83.6	82.0	83.7	83.5	83.3	81.3	81.4	82.4	82.0	83.3	3	DQ396541	
	4	1.0	3.5	18.8	█	96.3	78.7	98.0	97.7	99.7	77.0	78.8	96.5	98.2	89.4	87.2	97.0	99.5	99.6	79.2	80.0	81.0	80.2	97.2	4	EU400385	
	5	4.0	3.5	19.2	3.8	█	78.6	95.9	95.8	96.1	76.6	78.0	96.4	96.3	88.4	86.5	95.6	96.1	96.7	78.9	79.4	80.6	79.8	95.9	5	EU400393	
	6	23.7	23.5	21.1	25.2	25.3	█	79.9	80.5	78.7	73.0	74.8	79.0	78.2	78.4	77.2	78.5	80.5	80.3	97.1	96.6	94.2	94.2	78.4	6	EU400394	
	7	2.3	3.7	18.6	2.1	4.2	23.6	█	97.9	97.7	79.0	78.5	96.5	98.8	87.2	86.7	97.5	97.8	97.9	79.0	79.6	80.3	79.4	97.9	7	FJ619064	
	8	1.2	3.6	18.6	0.3	4.3	22.7	2.2	█	99.6	78.1	78.6	96.6	97.8	88.2	87.1	97.1	99.3	99.4	79.4	80.1	81.2	80.3	96.9	8	FN430725	
	9	1.2	3.6	18.7	0.3	4.0	25.2	2.3	4.0	█	77.1	78.6	96.3	98.0	89.4	87.2	96.8	99.2	99.3	79.2	80.0	81.0	80.2	97.0	9	HMO32051	
	10	24.4	26.0	27.4	27.6	28.2	33.6	24.7	0.4	26.1	27.5	█	71.7	78.6	76.1	75.7	73.3	76.8	78.0	77.9	72.9	73.4	73.9	73.3	77.2	10	JX090231
	11	24.6	27.0	29.3	25.3	26.5	31.1	25.7	25.5	25.6	36.2	█	78.1	78.5	78.3	78.4	78.5	78.5	78.7	74.7	74.9	74.8	74.9	78.6	11	KF410824	
	12	3.5	0.5	19.2	3.6	3.7	24.7	3.6	3.5	3.8	28.2	26.3	█	96.4	88.6	86.1	96.0	96.6	96.7	78.9	79.8	80.9	79.9	95.8	12	L07560	
	13	2.1	3.7	18.8	1.9	3.8	25.9	1.2	2.2	2.1	28.9	25.7	3.7	█	88.8	82.6	97.1	97.8	98.0	79.0	79.8	80.7	79.8	95.5	13	L08241	
	14	12.3	14.7	18.6	11.5	12.7	25.5	14.1	12.9	11.5	29.4	26.0	12.4	12.2	█	86.7	88.5	87.9	87.9	78.7	79.8	81.0	80.0	88.4	14	M19172	
	15	13.7	15.5	20.6	14.1	14.9	27.2	14.6	14.2	14.0	33.0	25.9	15.4	19.8	14.6	█	86.3	87.3	87.2	77.8	78.9	79.3	78.7	86.5	15	M54897	
	16	2.9	3.8	18.5	3.1																						



(Huang *et al.*, 2010) และสายพันธุ์ภาคใต้ของจีน (HM032051) ที่พบในลิงแสม (Huang *et al.*, 2011) การที่เชื้อ *P. inui* ที่พบในการศึกษานี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่พบในลิงแสมแตกต่างชนิดกัน สอดคล้องกับที่ผ่านมามีรายงานการพบเชื้อ *P. inui* ในลิงแสมอีกหลายชนิด ได้แก่ *M. fascicularis*, *M. nemestrina*, *M. mulatta*, *M. radiata* และ *M. cyclopis* ซึ่งอาจถือได้ว่าเชื้อ *P. inui* เป็นเชื้อมาลาเรียในลิงที่มีการแพร่หลายมากที่สุดในลิงโลกเก่า (Eyles, 1963; Coatney *et al.*, 2003)

เชื้อมาลาเรียสามารถแบ่งกลุ่มตามรูปแบบอาการไข้หรือระยะที่เชื้ออยู่ในเนื้อเยื่อของโฮสต์ (asexual erythrocytic schizogony) ได้เป็นกลุ่ม Tertian คือเป็นไข้ทุก 3 วัน กลุ่ม Quartan คือเป็นไข้ทุก 4 วัน และกลุ่ม Quotidian คือเป็นไข้ทุกวัน โดยเชื้อ *P. inui* จัดอยู่ในกลุ่ม Quartan ร่วมกับเชื้อ *P. malariae* อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. inui* ที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้เฉพาะกับเชื้อมาลาเรียที่พบในคนเป็นหลักพบว่า มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. vivax* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม Tertian มากที่สุด โดยพบว่ามีความเหมือน 97% (ตารางที่ 3) และพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับ *P. vivax* มากกว่า *P. malariae* (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในยีน SSU rRNA (Kissinger *et al.*, 1998; Seethamchai *et al.* 2008) และยีน cytochrome *b* (Perkins *et al.*, 2002; Putapornthip *et al.* 2010) ที่พบว่าเชื้อ *P. inui* มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. vivax* มากกว่า เชื้อ *P. malariae* นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *P. inui* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับเชื้อในกลุ่ม Tertian ตัวอื่น ๆ เช่น *P. fragile*, และ *P. coatneyi* รวมถึงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม Quotidian มากกว่าด้วยเช่นเดียวกัน (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรีย ไม่ได้สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มเชื้อมาลาเรียตามรูปแบบอาการไข้

ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของตัวอย่างเลือดลิงกัง รหัสตัวอย่าง 166, 52511 และ 52517 กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าเกี่ยวข้องมากที่สุดกับเชื้อ *Hepatocystis* spp. โดยตัวอย่าง 166 โคลน A (MK078097) โคลน B (MK078098) จากลิงกังในภาคกลางเมื่อเดือนมกราคม 2558 โคลน A ของตัวอย่าง 52511 (MK078099) และโคลน A ของตัวอย่าง 52517 (MK078100) จากลิงกัง

ในภาคใต้เมื่อเดือนพฤษภาคม 2560 พบว่าเหมือนกับเชื้อ *Hepatocystis* sp. ซึ่งพบในลิงแสมทางภาคใต้ของประเทศไทย (EU400394) 97.1, 96.6, 94.2 และ 94.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Hepatocystis* sp. (EU400394) เช่นกัน (รูปที่ 2) และถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันในเชื้อสาย *Hepatocystis* spp. ด้วยค่า bootstrap สนับสนุน 91% จะเห็นได้ว่าเชื้อที่พบใน 2 กลุ่มตัวอย่างมีความใกล้เคียงกันมากแม้ว่าจะได้รับมาในเวลาที่แตกต่างกันถึง 2 ปี และมาจากต่างพื้นที่กัน สอดคล้องกับการศึกษาในยีนส่วน cytochrome *b* ที่รายงานว่าเชื้อที่พบในลิงกังและลิงแสมมีความใกล้เคียงกันและน่าจะมีการถ่ายทอดระหว่างประชากรลิงทั้งสองชนิดนี้อิสระ แตกต่างจากเชื้อ *P. inui* ที่พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของกลุ่มเชื้อที่พบในลิงกังและกลุ่มเชื้อที่พบในลิงแสมมีความแตกต่างกันแยกตามชนิดของโฮสต์ (Putapornthip *et al.*, 2010) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้รายงานยีนส่วน SSU rRNA ซึ่งเป็น marker ที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยูคาริโอตและมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากเชื้อมาลาเรียหลากหลายชนิดจำนวนมากในฐานข้อมูล ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนนี้จึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการวิเคราะห์และจำแนกเชื้อมาลาเรียชนิดใหม่ ตลอดจนใช้เปรียบเทียบกับเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรีย (Nishimoto *et al.*, 2008) นอกจากนี้รายงานครั้งนี้เป็นการพบเชื้อ *Hepatocystis* spp. เพียงชนิดเดียวในลิงกังโดยไม่มีการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วย อาจเป็นไปได้ว่าในสิ่งแวดล้อมที่ประชากรลิงที่ทำการศึกษายังอาศัยอยู่นั้นไม่มีเชื้อมาลาเรีย หรืออาจเป็นไปได้ตามข้อสันนิษฐานที่ว่า การติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. ในลิงกังอาจช่วยลดโอกาสการติดเชื้อมาลาเรียและในทางกลับกันการติดเชื้อมาลาเรียอาจช่วยลดโอกาสในการติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. (competitive exclusion) เนื่องจากพบว่าการติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. และเชื้อมาลาเรีย เช่น *P. inui* ในลิงกังมักเป็นการติดเชื้อชนิดเดียวมากกว่าการติดเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Putapornthip *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. จะส่งผลต่อโฮสต์ทำให้ไวรัสหรือต้านทานต่อการได้รับเชื้อมาลาเรียนั้นมีข้อมูลอย่างจำกัด จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาในครั้งนี้รายงานการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. inui* ในลิงแสม แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการหมุนเวียนอยู่ในประชากรลิงแสมแคคในในประเทศไทย แม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่มีรายงานการติดเชื้อ *P. inui* สู่คนโดยธรรมชาติ และที่ผ่านมาพบเพียงการติดเชื้อสู่คนจากการทำการทดลอง อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ *P. inui* เจริญได้ดีในยุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อ และพบได้ทั่วไปในลิงแสมแคคซึ่งเป็นโฮสต์หลักตามธรรมชาติ อาจกล่าวได้ว่าในพื้นที่ที่มีทั้งโฮสต์ธรรมชาติและยุงพาหะนำเชื้อเป็นจำนวนมาก อีกทั้งมีความใกล้ชิดของสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์กับมนุษย์นั้น เชื้อ *P. inui* อาจมีโอกาสที่จะเกิดเป็นสาเหตุของโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนได้ จากรายงานที่พบว่าเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* มีต้นกำเนิดจากการแพร่กระจายข้ามสายพันธุ์จากเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์กลายเป็นเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ (Liu *et al.*, 2010; Prugnolle *et al.*, 2013) และเมื่อไม่นานมานี้เชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ได้มีรายงานการพบเชื้อในคนจำนวนมากในประเทศมาเลเซีย (Vythilingam *et al.*, 2014) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียในคนกับเชื้อมาลาเรียที่พบในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์เป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยให้เกิดความรู้ความเข้าใจที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับแหล่งที่มาและวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียในคน เพื่อเป็นการเฝ้าระวังเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ที่มีโอกาสเกิดการข้ามสายพันธุ์กลายเป็นเชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนได้

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ยืนยันการตรวจพบสารพันธุกรรมของ *P. inui* ในลิงแสม จำนวน 1 ตัวอย่าง และสารพันธุกรรมของ *Hepaticystis* spp. ในลิงกัง จำนวน 3 ตัวอย่าง ในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมและแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนส่วน

SSU rRNA ของเชื้อ *P. inui* และ *Hepaticystis* spp. ที่ทำการศึกษามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. inui* และ เชื้อ *Hepaticystis* spp. ที่พบในประเทศไทยที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ และเชื้อ *P. inui* ที่พบไม่ได้สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มเชื้อมาลาเรียตามรูปแบบอาการไข้ นอกจากนี้วิธีทางอณูชีวโมเลกุลสามารถนำมาช่วยวินิจฉัยแยกแยะเชื้อมาลาเรียและเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรีย เช่น เชื้อ *Hepaticystis* spp. ได้

อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นการรายงานการพบเชื้อ *P. inui* ในตัวอย่างเลือดที่ส่งมาตรวจซึ่งมาจากลิงแสมที่ได้รับการดูแลอยู่ในศูนย์ดูแลสัตว์ป่าแห่งหนึ่ง โดยที่ไม่ได้สุ่มหรือเก็บตัวอย่างมาจากประชากรลิงในพื้นที่ทั้งหมด ผลที่ได้จึงไม่สามารถบ่งบอกถึงความชุกหรืออุบัติการณ์ที่แท้จริงของโรคในขณะนั้นได้ ทั้งนี้การพบอุบัติการณ์ของเชื้อ *P. inui* ในลิงแสมแคคในประเทศไทย จะส่งผลอันตรายหรือเพิ่มโอกาสในการติดเชื้อ *P. inui* สู่คนหรือไม่คงต้องทำการศึกษากันต่อไป นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในยีนส่วนอื่น ๆ และแหล่งพาหะที่มีบทบาทในการถ่ายทอดเชื้อ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงแหล่งที่มา ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และการถ่ายทอดเชื้อของเชื้อมาลาเรียในคนที่มีต้นกำเนิดมาจากเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ที่มีโอกาสติดต่อมาสู่คนได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่นำส่งตัวอย่าง และขอขอบคุณ คุณอุบลรัตน์ แทนกลาง ที่ช่วยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับการโคลนยีนเป้าหมาย ขอขอบคุณ สพ.ญ.ดร. มัญชรี ทัดติยพงศ์ และ สพ.ญ. จันทรา วัฒนเมธานนท์ ที่ให้คำปรึกษาทางด้านเทคนิค และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มปรสิตวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ทำการศึกษากัน

เอกสารอ้างอิง

- Aggimarangsee, N. 1992. Survey for semi-tame colonies of macaques in Thailand. *Nat Hist Bull Siam Soc.* 40: 103-166.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215 (3): 403-410.
- Coatney, G., Chin, W., Contacos, P. and King, H. 1966. *Plasmodium inui*, a quartan-type malaria parasite of old world monkeys transmissible to man. *J Parasitol.* 52: 660-663.
- Coatney, G.R., Collins, W.E., Warren, M. and Contacos, P.G. 2003. The primate malarias. (original book published in 1971). (CDROM). Version 1.0. Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention.
- Das Gupta, B.M. 1938. Transmission of *P. inui* to man. *Proc Natl Inst Sci India.* 4: 241-244.
- Eyles, D.E. 1963. The species of simian malaria: taxonomy, morphology, life cycle, and geographical distribution of the monkey species. *J Parasitol.* 49: 866-887.
- Garnham, P.C. 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell scientific. Oxford, United Kingdom. p. 1132
- Garnham, P.C., Heisch, R.B. and Minter, D.M. 1961. *Culicoides adersi* Ingram and Macfie, 1923, a presumed vector of *Hepaticocystis* (= *Plasmodium*) *kochi* (Laveran, 1899). *Nature.* 190: 737-741.
- Huang, C.C., Ji, D.-D., Chiang, Y.C., Teng, H.J., Liu, H.J., Chang, C.D. and Wu, Y.H. 2010. Prevalence and molecular characterization of *Plasmodium inui* among Formosan macaques (*Macaca cyclopis*) in Taiwan. *J Parasitol.* 96 (1): 8-15.
- Huang, Y., Yang, Z., Putaporntip, C., Miao, M., Wei, H., Zou, C. and Cui, L. 2011. Isolation and identification of a South China strain of *Plasmodium inui* from *Macaca fascicularis*. *Vet Parasitol.* 176 (1): 9-15.
- Johnston, S.P., Pieniazek, N.J., Xayavong, M.V., Slemenda, S.B., Wilkins, P.P. and da Silva, A.J. 2006. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol.* 44 (3): 1087-1089.
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T. and Kanbara, H. 2004. Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 10 (12): 2211-2213.
- Kissinger, J.C., Collinst, W.E., Li, J. and McCutchan, T.F. 1998. *Plasmodium inui* is not closely related to other quartan *Plasmodium* species. *J Parasitol.* 84 (2): 278-282.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1879-1874.
- Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Rudicell, R.S., Robertson, J.D., Keele, B.F. and Hahn, B.H. 2010. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature.* 467 (7314): 420-425.
- Malaivijitnond, S., Hamada, Y., Varavudchi, P. and Takenaka, O. 2005. The current distribution and status of macaques in Thailand. *Nat Hist J Chulalongkorn Univ.* 1: 35-45.
- Mathison, B.A. and Pritt, B.S. 2017. Update on malaria diagnostics and test utilization. *J Clin Microbiol.* 55 (7): 2009-2017.
- Nishimoto, Y., Arisue, N., Kawai, S., Escalante, A.A., Horii, T., Tanabe, K. and Hashimoto, T. 2008. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol Phylogenet Evol.* 47 (1): 45-53.
- Perkins, S.L. and Schall, J.J. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J Parasitol.* 88 (5): 972-978.
- Prugnotte, F., Rougeron, V., Becquart, P., Berry, A., Makanga, B., Rahola, N. and Renaud, F. 2013. Diversity, host switching and evolution of *Plasmodium vivax* infecting African great apes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110 (20): 8123-8128.
- Putaporntip, C., Jongwutiwes, S., Thongaree, S., Seethamchai, S., Grynberg, P. and Hughes, A. L. 2010. Ecology of malaria parasites infecting southeast Asian macaques: evidence from cytochrome b sequences. *Mol Ecol.* 19 (16): 3466-3476.
- Seethamchai, S., Putaporntip, C., Malaivijitnond, S., Cui, L. and Jongwutiwes, S. 2008. Malaria and *Hepaticocystis* Species in Wild Macaques, Southern Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 78 (4): 646-653.
- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M.S. and Rahman, H.A. 1999. A genus and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 60: 687-692.
- Strokes, W.S., Donovan, J.C., Montrey, R.D., Thompson, W.L., Wannemacher, R.W. Jr. and Rozmiarek H. 1983. Acute clinical malaria (*Plasmodium inui*) in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Lab Anim Sci.* 33(1): 81-85.
- Vickerman, K. 2005. The lure of life cycles: Cyril Garnham and the malaria parasites of primates. *Protist.* 156: 433-449.
- Voller, A. 1972. *Plasmodium* and *Hepaticocystis*. In: Pathology of simian primates. Part II. Infectious and parasitic diseases. R.N. T-W-Fiennes. editor. S Karger, New York, USA. pp. 57-73.
- Vythilingam, I., Lim, Y.A., Venugopalan, B., Ngui, R., Leong, C.S., Wong, M.L. and Mahmud, R. 2014. *Plasmodium knowlesi* malaria an emerging public health problem in Hulu Selangor, Selangor, Malaysia (2009-2013): epidemiologic and entomologic analysis. *Parasit Vectors.* 7: 436
- Vythilingam, I., Noorazian, Y. M., Huat, T. C., Jiram, A. I., Yusri, Y. M., Azahari, A. H., NorParina, I., NoorRain, A. and Lokmanhakim, S. 2008. *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. *Parasit Vectors.* 1 (1): 26.

ภาคผนวก

การตรวจพบสารพันธุกรรมและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Plasmodium inui* และ *Hepatocystis* spp. ในลิงแม็กแคในในประเทศไทย

การศึกษาในครั้งนี้ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Hepatocystis* spp. จากตัวอย่างเลือดลิงกัง 3 ตัวอย่าง (รหัสตัวอย่าง 166, 52511 และ 52517) ผลการโคลน ผลผลิต PCR จากตัวอย่างเลือดลิงกัง รหัส 166 ได้จำนวน 2 โคลน คือ โคลน A และ B และจากตัวอย่างเลือดลิงกัง รหัส 52511 และ 52517 ตัวอย่างละ 1 โคลน รวมเป็น 4 โคลนตัวอย่าง ซึ่งพบว่ามีความเหมือนของลำดับสารพันธุกรรม 94-97% กับเชื้อ *Hepatocystis* sp. ซึ่งพบในลิงแสมทางภาคใต้ของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551 (EU400394) โดยมีความเหมือน 97.1, 96.6, 94.2 และ 94.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการโคลนผลผลิต PCR จากตัวอย่างเลือดลิงแสม รหัส 162 และตัวอย่างเลือดลิงกัง รหัส 166 ได้จำนวน ตัวอย่างละ 2 โคลน คือ โคลน A และ โคลน B นั้น โคลน A และ โคลน B มาจากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อจากตัวอย่างเลือดตัวอย่างเดียวกัน แต่พบว่าให้ข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่แตกต่างกันในการศึกษาครั้งนี้ จึงรายงานข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมแยกเป็น โคลน A และ B อย่างไรก็ตามควรนำข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของโคลนที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์อีกครั้งหนึ่งเพื่อหาลำดับเบสจำเพาะร่วม (consensus sequence) เพื่อรายงานข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่ถูกต้องที่สุดเพียงข้อมูลเดียวจาก 1 ตัวอย่าง

จากการศึกษาโดย Putapornthip et al. (2010) พบว่าการติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. และเชื้อ *P. inui* ในลิงกัง เป็นการติดเชื้อชนิดเดียวมากกว่าการติดเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสันนิษฐาน

ได้ว่าการติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. อาจช่วยลดโอกาสการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. และในทางกลับกันการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. อาจช่วยลดโอกาสในการติดเชื้อ *Hepatocystis* spp. การศึกษาในครั้งนี้ที่รายงานการตรวจพบเชื้อ *P. inui* ในลิงแสม จำนวน 1 ตัว และเชื้อ *Hepatocystis* spp. ในลิงกัง จำนวน 3 ตัว นั้น พบว่าเป็นการติดเชื้อแบบเดี่ยว ๆ โดยไม่พบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อ *Plasmodium* spp. มากกว่า 1 ชนิด และไม่พบการติดเชื้อ *Plasmodium* spp. ร่วมกับเชื้อ *Hepatocystis* spp. การศึกษาในครั้งนี้จึงอาจเป็นไปตามข้อสันนิษฐานของ Putapornthip et al. (2010) ดังกล่าวข้างต้นหรืออาจเป็นไปได้ว่าในสิ่งแวดล้อมที่ประชากรลิงที่ทำการศึกษาศอยุ่มีเพียงเชื้อ *Hepatocystis* spp. หรือเชื้อ *Plasmodium* spp. ชนิดใดชนิดหนึ่งอยู่ในสิ่งแวดล้อม จึงตรวจพบเพียงเชื้อชนิดนั้นชนิดเดียว

การศึกษาในครั้งนี้รายงานการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *P. inui* ในลิงแสม และเชื้อ *Hepatocystis* spp. ในลิงกัง เชื้อที่พบมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. inui* และ *Hepatocystis* spp. ที่พบในประเทศไทยที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้คือ EU400385 และ EU400394 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างจำกัด และพบว่าวิธีทางอนุชีวโมเลกุลสามารถนำมาช่วยวินิจฉัยแยกแยะเชื้อมาลาเรียและเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรีย เช่น เชื้อ *Hepatocystis* spp. ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ทางการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล เพื่อเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรียในสัตว์ไพรเมตที่ไม่ใช่มนุษย์ที่มีโอกาสติดต่อกันได้