

ABSTRACT

The vectors for *Plasmodium knowlesi*, a significant cause of human malaria in Southeast Asia, identified previously in nature all belong to the *Anopheles Leucosphyrus* Group. Only one study has been previously undertaken in Sarawak, Malaysian Borneo, to identify vectors of *P. knowlesi*, where *Anopheles latens* was incriminated as the vector in Kapit, central Sarawak. A study was therefore undertaken to identify malaria vectors in the Betong Division and Lawas District in Sarawak. A total of 2,287 mosquitoes were collected from Betong and Lawas in the duration of this study. Using the simian malaria parasite species-specific PCR assays, five *An. barbirostris*, two *An. collessi*, three *An. roperi*, which do not belong to the *Leucosphyrus* Group and nine *An. balabacensis*, five *An. latens* which are members of the *Leucosphyrus* Group were shown to harbour at least one of the five simian malaria parasites tested. Three of these *An. roperi* and one *An. collessi* were collected before 0900 hr. On the other hand, *P. knowlesi* DNA was also detected in the head and thorax of *Culex* spp. and the salivary glands of *Armigeres* spp.; *Culex* spp. therefore could not be confirmed as a vector as the evidence is insufficient to prove its role in the transmission of *P. knowlesi*. The ML and NJ trees constructed with a total of 108 plasmodial SSUrDNA isolated from mosquitoes showed that *An. barbirostris* and *Armigeres* spp. were only susceptible to *P. knowlesi* while the other vectors were infected with a variety of both identifiable and unidentifiable parasites. *Plasmodium coatneyi* was found only in *An. roperi* while *P. cynomolgi* was detected in the salivary glands of two members of the *Leucosphyrus* Group; *An. balabacensis* and *An. latens*. Parasites closely related to *P. simiovale*, is found in Betong to be transmitted by *An. collessi*, *An. roperi*, and *An. latens*. Phylogenetic analyses of the SSUrRNA gene have uncovered a large number of unidentified parasites which appeared to be closely related to *P. hylobati* and *P. inui*. When these unidentified sequences

were aligned to a wide range of parasitic protozoans found in different hosts, they still clustered around the simian malaria parasites, suggesting that these parasites originated from simian hosts. In terms of the identity of vectors, the size of the ITS2 region of *An. barbirostris* from this study and the phylogenetic trees constructed using the region suggest that the *An. barbirostris* collected in the current study and those from a separate study in Selangor are probably the same species of mosquito but formed a distinct clade, which we have termed Clade VI. ML and NJ trees constructed with the CO1 gene showed that *An. barbirostris* Clade VI is significantly distinct from the other members of the *Barbirostris* Group from Thailand and Indonesia. Phylogenetic analyses of the CO1 gene of morphologically identified *An. balabacensis* from Lawas have shown that they formed a clade with the same species from Sabah and South Kalimantan while *An. latens* from Betong have separated into two distinct clades. Three of the *An. latens* formed a clade with *An. introlatus* and *An. nemophilous* while the other three formed a distinct clade. Incidentally, the ones which clustered with *An. introlatus* and *An. nemophilous* were shown by PCR and sequencing results to have multiple malaria parasite infections while those that formed a clade by themselves were only infected by *P. knowlesi*. The overall findings of the current study show that vectors of *P. knowlesi* and other simian malaria parasites are not restricted only to the *Leucosphyrus* Group. Further intensive studies of the bionomics of each of these novel vectors will be crucial to inform the implementation of efficient vector control methods.

Keywords: *Plasmodium knowlesi*, vector, malaria

Identifikasi Vector-Vektor bagi Plasmodium knowlesi dan Parasit Malaria yang Lain di Sarawak

ABSTRAK

Plasmodium knowlesi adalah penyebab utama manusia dijangkiti malaria di Asia Tenggara. Vektor-vektor yang telahpun dikenalpasti semuanya berasal dari Kumpulan Anopheles Leucosphyrus. Hanya satu kajian sahaja pernah dilaksanakan di Sarawak, Borneo, untuk mencari vektor P. knowlesi, di mana Anopheles latens ditemui sebagai vektor di Kapit. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk mengenal pasti vektor malaria di Bahagian Betong dan Daerah Lawas di Sarawak. Sejumlah 2,287 nyamuk telah dikumpulkan dari Betong dan Lawas dalam tempoh kajian ini. Pengujian PCR yang spesifik untuk spesies parasit malaria simian menunjukkan bahawa lima An. barbirostris, dua An. collessi, tiga An. roperi, yang tidak tergolong dalam Kumpulan Leucosphyrus dan sembilan An. balabacensis, lima An. latens yang merupakan anggota Kumpulan Leucosphyrus didapati mempunyai sekurang-kurangnya satu daripada lima parasit malaria simian yang diuji. Tiga daripada An. roperi tersebut dan satu An. collessi dikumpulkan sebelum jam 0900. Selain itu, DNA P. knowlesi juga dikesan di bahagian kepala dan toraks Culex spp. dan kelenjar air liur Armigeres spp. Oleh itu, Culex spp. tersebut tidak dapat disahkan sebagai vektor kerana bukti tidak mencukupi untuk membuktikan peranannya dalam penyebaran P. knowlesi. Pokok ML dan NJ yang dibentuk dengan sejumlah 108 SSUrDNA Plasmodium yang diasingkan daripada nyamuk menunjukkan bahawa An. barbirostris dan Armigeres spp. hanya dijangkiti dengan P. knowlesi manakala vektor-vektor lain dijangkiti dengan pelbagai parasit yang boleh dan juga tidak boleh dikenal pasti. Plasmodium coatneyi hanya dikesan daripada An. roperi manakala P. cynomolgi dikesan di dalam kelenjar air liur dua anggota Kumpulan Leucosphyrus: An. balabacensis dan An. latens. Parasit yang berkait rapat dengan P. simiovale, didapati disebar oleh An. collessi, An. roperi, dan An. latens di Betong. Analisis

filogeni gen SSUrRNA telah menemui sebilangan besar parasit yang tidak dikenali yang kelihatan berkait rapat dengan *P. hylobati* dan *P. inui*. Apabila DNA yang tidak dikenali diselaraskan dengan pelbagai parasit protozoa yang berasal daripada perumah yang berbeza, mereka tetap berkumpul dekat dengan parasit malaria simian, mencadangkan bahawa parasit ini berasal daripada perumah simian. Dari segi identiti vektor, saiz ITS2 *An. barbirostris* dan pokok filogeni yang dibentuk menggunakan ITS2 menunjukkan bahawa *An. barbirostris* yang dikumpul dari kajian ini dan yang dari Selangor berkemungkinan adalah spesies nyamuk yang sama tetapi membentuk klad yang berbeza, yang dinamakan Klad VI. Pokok ML dan NJ yang dibina dengan gen CO1 menunjukkan bahawa *Anopheles barbirostris* Klad VI adalah berbeza berbanding ahli-ahli Kumpulan *Barbirostris* dari Thailand dan Indonesia. Analisis filogeni dengan gen CO1 *An. balabacensis* dari Lawas yang dikenal pasti secara morfologi menunjukkan bahawa mereka membentuk satu klad dengan spesies yang sama dari Sabah dan Kalimantan Selatan sementara *An. latens* dari Betong terpisah menjadi dua klad yang berbeza. Tiga daripada *An. latens* membentuk klad yang sama dengan *An. introlatus* dan *An. nemophilous* manakala tiga yang lain membentuk satu lagi klad yang berbeza. Secara kebetulan, kumpulan yang berkelompok dengan *An. introlatus* dan *An. nemophilous* telah ditunjukkan oleh PCR dan filogeni membawa pelbagai spesies parasit malaria manakala yang membentuk klad tersendiri hanya dijangkiti oleh *P. knowlesi*. Secara keseluruhan, kajian ini menunjukkan bahawa vektor *P. knowlesi* dan parasit malaria simian lain tidak hanya terhad kepada Kumpulan *Leucosphyrus*. Kajian intensif mengenai bionomik setiap vektor yang baru akan bermanfaat kepada pelaksanaan kaedah kawalan vektor yang efektif.

Kata kunci: *Plasmodium knowlesi*, vektor, malaria