ABSTRACT

Previous studies have shown that small mammals are natural hosts to two genera of haemosporidian parasites, *Hepatocystis* and *Plasmodium*. In Peninsular Malaysia, 2 *Hepatocystis* spp. and 3 *Plasmodium* spp. have been described in small mammals. Early description and classification of these parasites was solely based on morphology of infected RBCs, life history traits and species of host infected. These conventional ways to identify and classify these haemosporidian parasites had obscured the evolutionary relationship and mislead terminology of malaria parasites. When DNA technology improved and molecular data became available in the 20th century, *Hepatocystis* spp. was described in flying foxes from Peninsular Malaysia and another study done in Sarawak revealed that fruit bats and flying foxes were infected with *Hepatocystis* spp. The main objective of this study was to characterize haemosporidian parasites in non-volant small mammals in Sarawak using molecular and morphological methods. Forty-seven blood samples were collected from squirrels (16 *Callosciurus notatus* and 1 *Lariscus insignis*), rats (16 *Sundamys muelleri*, 3 *Maxomys whiteheadi*, 2 *Niviventer rapit*, 2 *Niviventer cremoriventer*, 1 *Rattus tiomanicus* and 1 *Maxomys rajah*), treeshrews (2 *Tupaia minor*, 1 *Tupaia glis* and 1 *Tupaia tana*) and one mousedeer (*Tragulus javanicus*) from 4 sampling sites in Sarawak. These samples were examined by nested PCR assays and 5 of 17 (29.4%) plantain squirrels (*Callosciurus notatus*) were positive using "*Hepatocystis* and *Plasmodium*-specific"primers. The small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) and cytochrome *b* (cyt *b*) genes were amplified, cloned and sequenced from the 5 PCR-positive plantain squirrels (K1, K2, K6, K12 and K27). Similar topology of phylogenetic trees were obtained when twenty sequences generated from each gene were analyzed using the neighbor-joining, maximum likelihood, maximum parsimony

and Bayesian methods. Phylogenetic analysis based on the SSU rRNA genes showed the presence of 3 different clades suggesting that there are at least 3 species of haemosporidian parasites infecting the plantain squirrels. Clade 1 was closely related to *Plasmodiun* spp. while Clade 2 and 3 were closely related to *Hepatocystis* spp. The first clade formed by sequences derived from plantain squirrels K1 and K6 indicated that both of the plantain squirrels were infected by the same species of haemosporidian parasite. Monophyletic Clade 2 was formed by sequences derived from plantain squirrel K27 indicating that there is only 1 species of haemosporidian parasite in this plantain squirrel. Sequences derived from plantain squirrels K2 and K12 formed Clade 3 suggesting that these two plantain squirrels are infected with the same species of haemosporidian parasites. The cyt *b* gene sequences formed two monophyletic groups which fall within the *Hepatocystis* clade. Clade 1 with two sub-clades (1a and 1b) is paraphyletic to the clade formed by *Hepatocystis* spp. in macaques. Sequences in sub-clade 1a and 1b displayed differences in length and polymorphism suggesting 2 different species of *Hepatocystis*, one infecting plantain squirrel K2 and K12 while another species in plantain squirrel K27. Cyt *b* gene sequences derived from other clones of plantain squirrel K2 formed Clade 2 with sequences from plantain squirrels K1 and K6. These findings suggest that there are at least 2 different species infecting plantain squirrel K2 with one closely related with *Hepatocystis* spp. in macaques. Another species infecting plantain squirrels K2, K1 and K6 are closely related to *Hepatocystis* spp. of flying foxes and fruit bats. Molecular data of SSU rRNA and cyt *b* genes sequences showed that *Hepatocystis* spp. and *Plasmodium* spp. tend to be host specific. Based on thin blood films, plantain squirrel K1 had the highest parasitemia of 7.3% followed by plantain squirrel K6 (1.4%), plantain squirrel K2 (1.1%) and plantain squirrel K12 (0.1%). By microscopy, the two common stages observed in the blood films of plantain squirrels K1, K2, K6 and K12 were ring forms and gametocytes.

In addition, multiple infections in a single RBC were also observed in the blood films of plantain squirrels K1 and K6. Ring forms and multiple infections in a single RBC in the blood films of plantain squirrels K1 and K6 are similar to *Hepatocystis vassali malayensis* from Peninsular Malaysia. These support the molecular data that these 2 plantain squirrels are infected with the same species of haemosporidian parasites. The morphology of ring forms in plantain squirrel K2 is different than those in plantain squirrel K1 and K6 with absence of multiple infections in a single RBC suggesting that the species infecting plantain squirrel K2 is different from those infecting plantain squirrels K1 and K6. However, the characteristics of gametocytes in blood films of plantain squirrels K1 and K2 were similar to *H. vassali malayensis* in plantain squirrel described previously in 1950. Based on molecular and morphology data, there at least 2 different species of haemosporidian parasites infecting plantain squirrel K2, one which is closely related to plantain squirrels K1 and K6 and another which is closely related to plantain squirrel K12. Only gametocytes stages were observed in the blood films of plantains squirrel K12 and the morphology is similar to *H. vassali malayensis* described in plantain squirrels from Peninsular Malaysia. It can be concluded from the molecular and morphological data that haemosporidian parasites infecting plantain squirrels from Sarawak belong to genus *Hepatocystis*. However, to identify accurately species of *Hepatocystis* infecting these plantain squirrels, analysis of more genes or perhaps the mitochondrial genomes with a larger number of samples is crucial. A larger sample size of each host species would also enable the accurate determination of the prevalence of each of the haemosporidian parasites in each mammalian host. The information would also indicate whether there are differences in the prevalence of haemosporidian parasites in each host between 2 or more different habitats.

ABSTRAK

Kajian dahulu telah menunjukkan bahawa haiwan mammalia kecil merupakan hos kepada dua genera parasit haemosporida, *Hepatocystis* dan *Plasmodium*. Di Semenanjung Malaysia, 2 spesies *Hepatocystis* dan 3 spesies *Plasmodium* telah diterangkan dalam haiwan mamalia kecil. Penerangan dan klasifikasi awal parasit ini adalah berdasarkan kepada morfologi sel darah merah yang telah dijangkiti, ciri sejarah kitar hidup (life history traits) dan spesies hos yang dijangkiti. Cara konvensional untuk mengenalpasti dan mengelaskan parasit haemosporida ini telah mengaburkan hubungan evolusi dan mengelirukan terminologi parasit malaria. Apabila teknologi DNA berkembang dan data molekular boleh didapati pada abad ke-20, spesies *Hepatocystis* telah diterangkan dalam kelawar dari Semenanjung Malaysia dan suatu kajian dibuat di Sarawak telah mendedahkan bahawa kelawar buah dan *flying foxes* dijangkiti dengan spesies *Hepatocystis*. Objektif utama kajian ini adalah untuk mencirikan parasit haemosporida dalam haiwan mamalia kecil yang lain di Sarawak dengan menggunakan kaedah molekul dan morfologi. Empat puluh tujuh sampel darah telah dikumpulkan daripada tupai (16 *Callosciurus notatus* dan 1 *Lariscus insignis*), tikus (16 *Sundamys muelleri*, 3 *Maxomys whiteheadi*, 2 *Niviventer rapit*, 2 *Niviventer cremoriventer*, 1 *Rattus tiomanicus* dan 1 *Maxomys rajah*), tupai muncung besar (2 *Tupaia minor*, 1 *Tupaia glis* dan 1 *Tupaia tana*) dan seekor kancil (*Tragulus javanicus*) dari 4 tapak pensampelan di Sarawak. Sampel – sampel ini telah diperiksa dengan asai PCR tersarang dan 5 daripada 17 (29.4%) tupai plantain (*Callosciurus notatus*) didapati positif dengan menggunakan "*Hepatocystis* dan *Plasmodium*-spesifik" primers. Jujukan gen-gen subunit kecil RNA ribosom (SSU rRNA) dan cytochrome *b* (cyt *b*) telah diganda, diklon dan dijujuk daripada 5 PCR-positif tupai plantain (K1, K2, K6, K12 dan K27). Topologi pokok filogenetik yang

sama telah diperolehi apabila dua puluh jujukan yang diperolehi daripada setiap gen dianalisis dengan menggunakan kaedah *neighbor-joining*, *maximum likelihood*, *maximum parsimony* dan *Bayesian*. Analisis filogenetik berdasarkan jujukan gen-gen SSU rRNA menunjukkan kehadiran 3 klad berbeza yang mencadangkan terdapat sekurang – kurangnya 3 spesies parasit haemosporidia yang menjangkiti tupai plantain. Klad 1 berkait rapat dengan spesies *Plasmodium* manakala Klad 2 dan 3 berkait rapat dengan spesies *Hepatocystis*. Klad pertama dibentuk oleh jujukan yang diperolehi daripada tupai plantain K1 dan K6 menunjukkan bahawa kedua – dua tupai plantain dijangkiti dengan spesies parasit haemosporida yang sama. Monofiletik Klad 2 yang dibentuk daripada tupai plantain K27 menunjukkan bahawa hanya terdapat 1 spesies parasit haemosporida dalam tupai plantain ini. Jujukan daripada tupai plantain K2 and K12 yang membentuk Klad 3 mencadangkan bahawa kedua – dua tupai plantain telah dijangkiti dengan spesies parasit haemosporida yang sama. Jujukan gen cyt *b* membentuk dua kumpulan monofiletik yang berada di dalam klad *Hepatocystis*. Klad 1 dengan dua sub-klad (1a dan 1b) adalah parafiletik kepada klad yang dibentuk daripada spesies *Hepatocystis* dalam monyet. Jujukan di dalam sub-klad 1a dan 1b memaparkan perbezaan dari segi panjang dan polimorfism mencadangkan 2 spesies *Hepatocystis* yang berbeza, satu yang menjangkiti tupai plantain K2 and K12 manakala yang satu lagi dalam tupai plantain K27. Jujukan gen cyt *b* yang diperolehi daripada klon tupai plantain K2 yang lain membentuk Klad 2 dengan jujukan daripada tupai plantain K1 dan K6. Penemuan ini mencadangkan bahawa terdapat sekurang – kurangnya 2 spesies berbeza yang menjangkiti tupai plantain K2 dengan satu yang berkait rapat dengan spesies *Hepatocystis* dalam monyet. Spesies lain yang menjangkiti tupai plantain K2, K1 dan K6 berkait rapat dengan spesies *Hepatocystis* daripada kelawar buah dan *flying foxes*. Data molekular daripada jujukan gen SSU rRNA dan cyt *b* menunjukkan bahawa spesies *Hepatocystis* dan *Plasmodium* adalah hos

spesifik. Berdasarkan filem darah nipis, tupai plantain K1 mempunyai parasitemia tertinggi iaitu 7.3% diikuti dengan tupai plantain K6 (1.4%), tupai plantain K2 (1.1%) dan tupai plantain K12 (0.2%). Menerusi mikroskop, dua peringkat biasa yang diperhatikan dalam filem darah tupai plantain K1, K2, K6 dan K12 adalah bentuk cincin dan *gametocytes*. Tambahan pula, jangkitan pelbagai dalam sel darah merah tunggal juga diperhatikan dalam filem darah tupai plantain K1 dan K6. Bentuk cincin dan pelbagai jangkitan dalam sel darah merah tunggal daripada filem darah nipis tupai plantain K1 dan K6 adalah sama dengan spesies *Hepatocystis vassali malayensis* dari Semenanjung Malaysia. Ini menyokong data molekular bahawa kedua – dua tupai plantain dijangkiti dengan spesies parasit haemosporida yang sama. Morfologi bentuk cincin dalam tupai plantain K2 adalah berbeza dengan yang di dalam tupai plantain K1 dan K6 dengan ketiadaan pelbagai jangkitan dalam sel darah merah tunggal mencadangkan bahawa spesies yang menjangkiti tupai plantain K2 adalah berbeza dangan yang menjangkiti tupai plantain K1 dan K6. Akan tetapi, ciri *gametocytes* dalam filem darah tupai plantain K1 dan K2 adalah sama dengan *H. vassali malayensis* dalam tupai plantain yang diterangkan pada 1950. Berdasarkan data molekular dan morfologi, terdapat sekurang – kurangnya 2 spesies parasit haemosporida yang menjangkiti tupai plantain K2, satu yang berkait rapat dengan tupai plantain K1 dan K6 dan yang satu lagi berkait rapat dengan tupai plantain K12. Hanya peringkat *gametocytes* diperhatikan dalam filem darah tupai plantain K12 dan morfologinya adalah serupa dengan *H. vassali malayensis* yang diterangkan dalam tupai plantain dari Semenanjung Malaysia. Kesimpulan boleh dibuat daripada data molekular dan morfologi bahawa parasit haemosporida yang menjangkiti tupai plantain dari Sarawak berasal daripada genus *Hepatocystis*. Akan tetapi, untuk mengenal pasti dengan tepat spesies *Hepatocystis* yang menjangkiti tupai plantain ini, analisis gen yang lain atau genom mitokondrial dengan jumlah sampel yang lebih besar adalah penting. Sampel saiz

yang lebih besar untuk setiap spesies hos membolehkan penentuan yang tepat kelaziman setiap spesies parasit haemosporidian dalam setiap hos mammalia. Maklumat yang diperolehi juga akan menunjukkan bahawa terdapat perbezaan dalam kelaziman parasit haemosporida dalam setiap hos di antara dua atau lebih habitat yang berbeza.