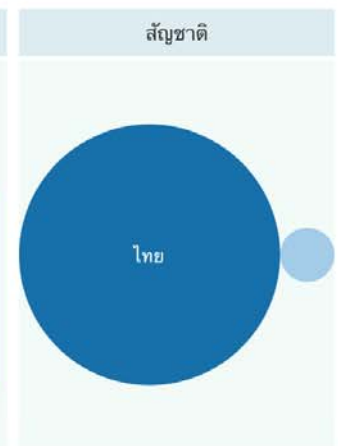
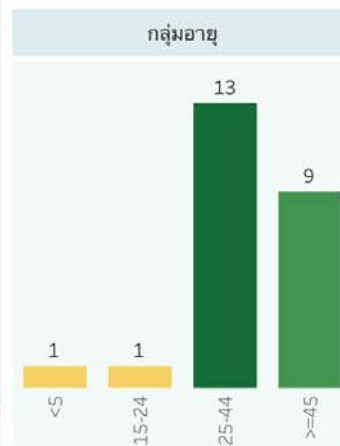


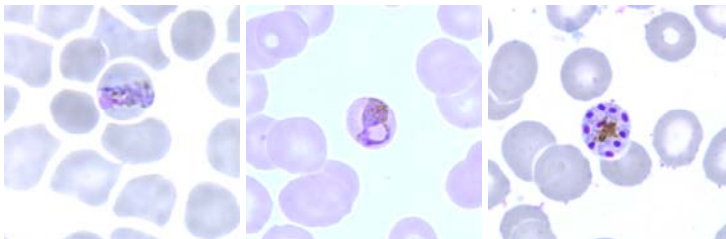
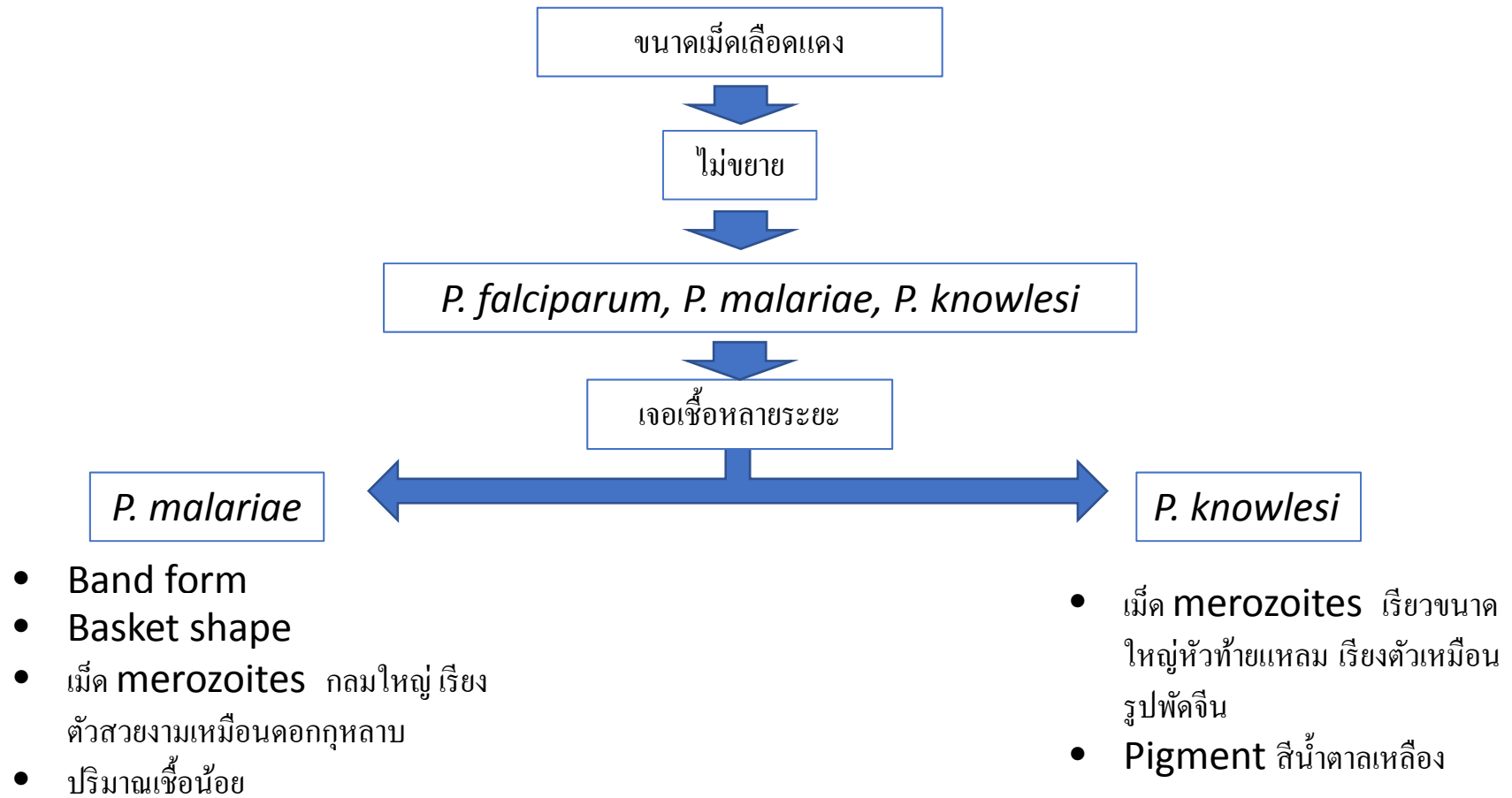
ผู้ป่วย *P. knowlesi* 24 คน ในปีงบประมาณ 2561



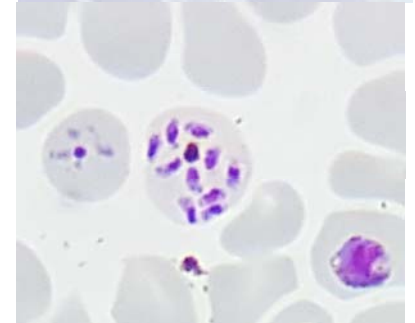
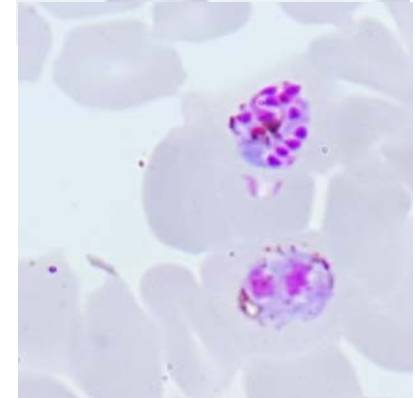
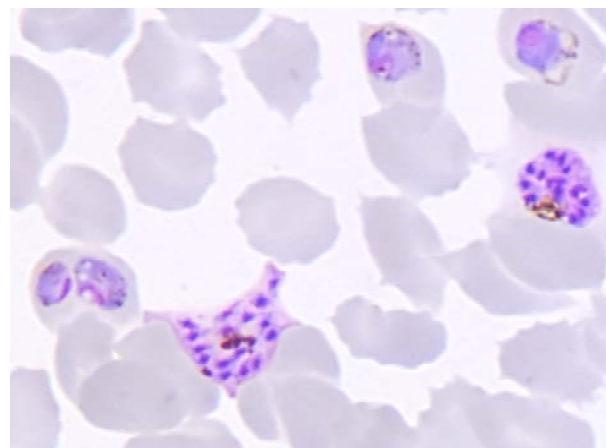
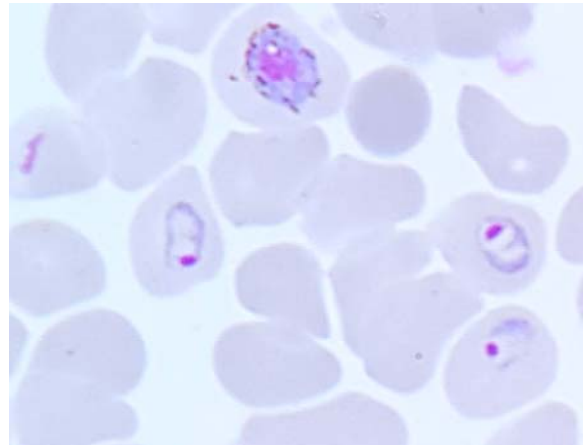
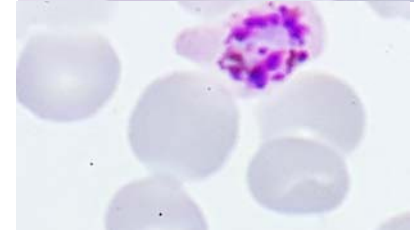
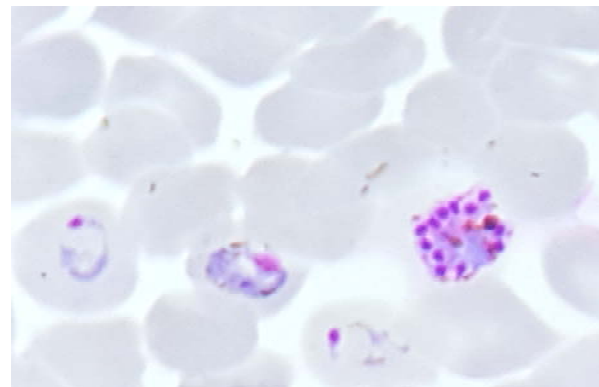
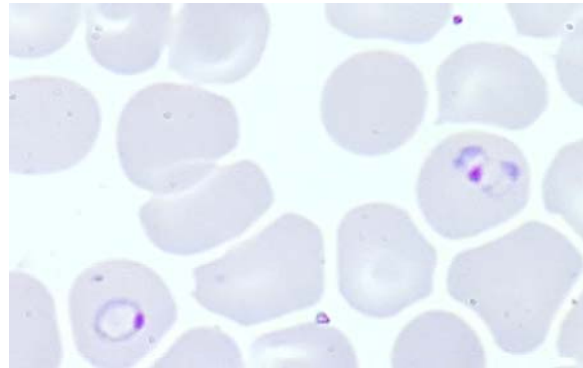
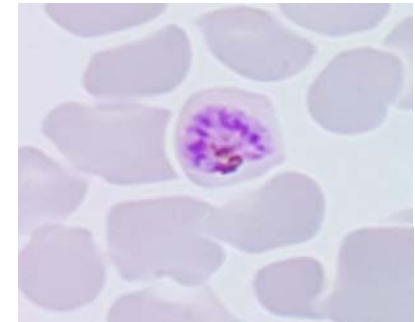
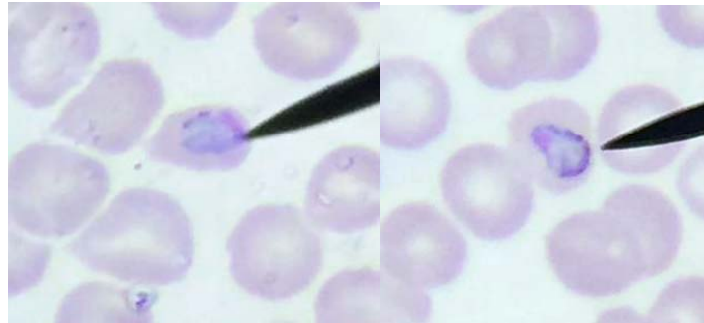
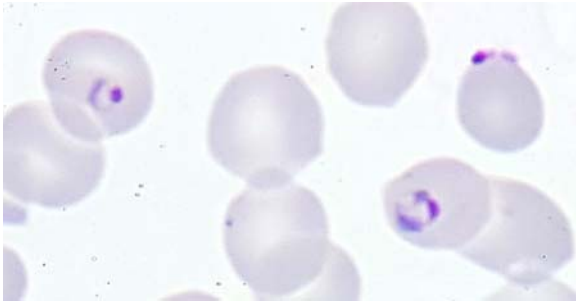
การวินิจฉัยเชื้อ *P. knowlesi* ด้วยกล้องจุลทรรศน์

	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovalae</i>
ขนาดเม็ดเลือดแดง ติดเชื้อ	ไม่ขยาย	ไม่ขยาย	ไม่ขยาย	ขยาย	ขยายเป็นลักษณะรูป ไข่ไม่มีปลายขอบหยัก
ลักษณะ dots ใน เม็ดเลือดแดงติดเชื้อ	ไม่มี	มีจำนวนน้อย ขนาดใหญ่ติดสีม่วง อมฟ้า เรียกว่า Maurer's dots	ไม่มี	มีจำนวนมาก ขนาดเล็กเท่ากัน กระจายทั่วเม็ดเลือด แดงติดเชื้อ มีสีชมพู เรียกว่า Schuffner's dots	มีจำนวนมาก ขนาดใหญ่กระจาย ทั่วเม็ดเลือดแดงติด เชื้อ มีสีน้ำตาลเข้ม เรียกว่า James's dots'
ระยะของเชื้อที่พบ	ทุกระยะ	Ring form และ gametocyte	ทุกระยะ	ทุกระยะ	ทุกระยะ
ปริมาณเชื้อ	โดยทั่วไป > 1%	โดยทั่วไป > 1%	โดยทั่วไป < 1%	โดยทั่วไป < 2%	โดยทั่วไป < 2%
Pigment	สีน้ำตาลเหลืองอ่อน	ดำ	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเหลืองเข้ม	น้ำตาลเหลืองเข้ม

การวินิจฉัยเชื้อ *P. knowlesi* ด้วยกล้องจุลทรรศน์



🦟 *P. knowlesi*



การตรวจเชื้อ *P. knowlesi* ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ขั้นตอนการตรวจเชื้อ

- 1) เพิ่มปริมาณ **DNA** ของเชื้อ **Pk** จากคนไข้ในหลอดทดลอง
- 2) ตรวจวัดว่ามี **DNA** ที่เพิ่มขึ้น (ว่ามีหรือไม่)

การเพิ่มปริมาณ **DNA** ของเชื้อจากคนไข้ในหลอดทดลอง มี **2** วิธีหลัก

1) **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Types of PCR

- normal PCR
- nested PCR
- qPCR

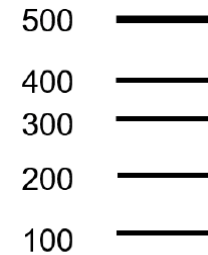
2) **Loop Mediate Isothermal Amplification (LAMP)**

- new LAMP-LFD recently developed
- commercial kits available

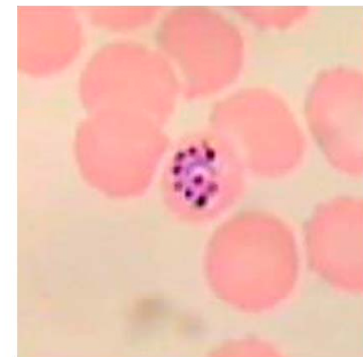
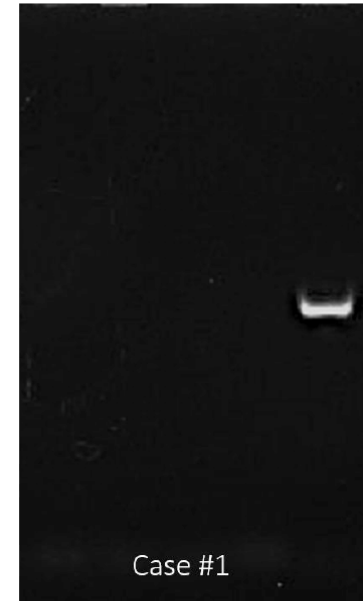
Nested PCR routine at Mahidol Vivax Research Unit, FTM

Nested PCR	Sequence (5' -> 3')
Plasmodium genus-specific outer primers	FW: ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT
	RV: GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT
Plasmodium species-specific inner primers	FW: ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT
<i>P. falciparum</i>	RV: CAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATG
<i>P. vivax</i>	RV: CAATCTAAGAATAAACTCCGAGAGGAAA
<i>P. ovale</i>	RV: ACTGAAGGAAGCAATCTAAGAAATTT
<i>P. malariae</i>	RV: AAGGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCAT
<i>P. knowlesi</i>	RV: CTGAAGGAAGCAATCTAAGAGTTC

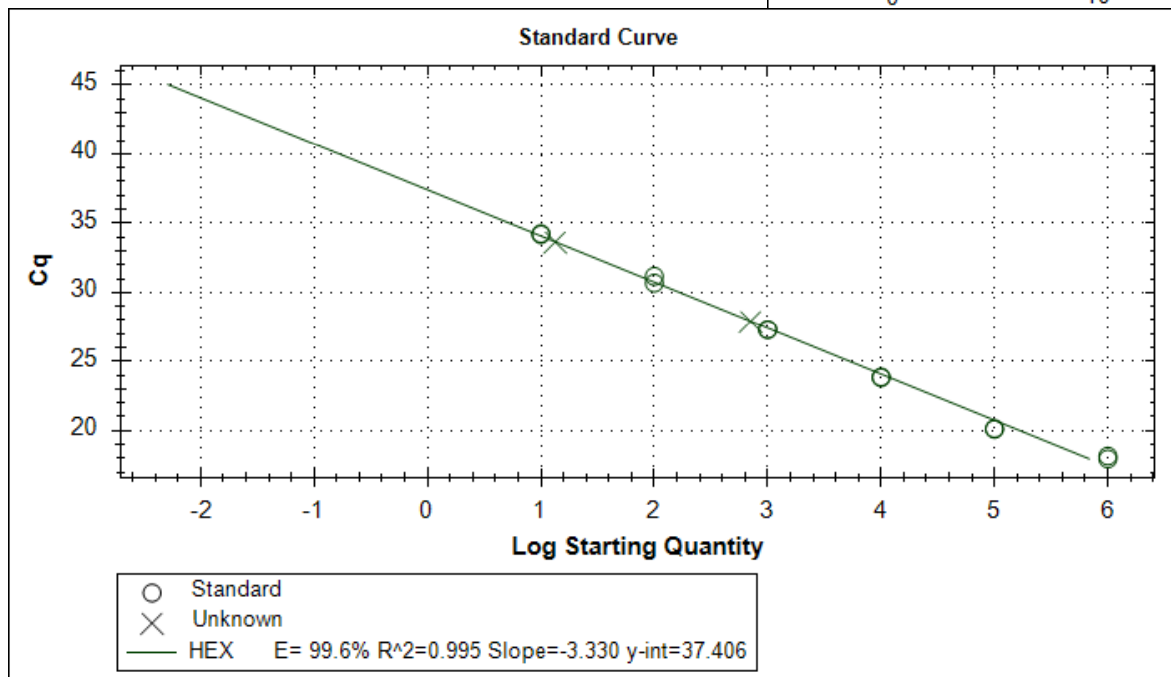
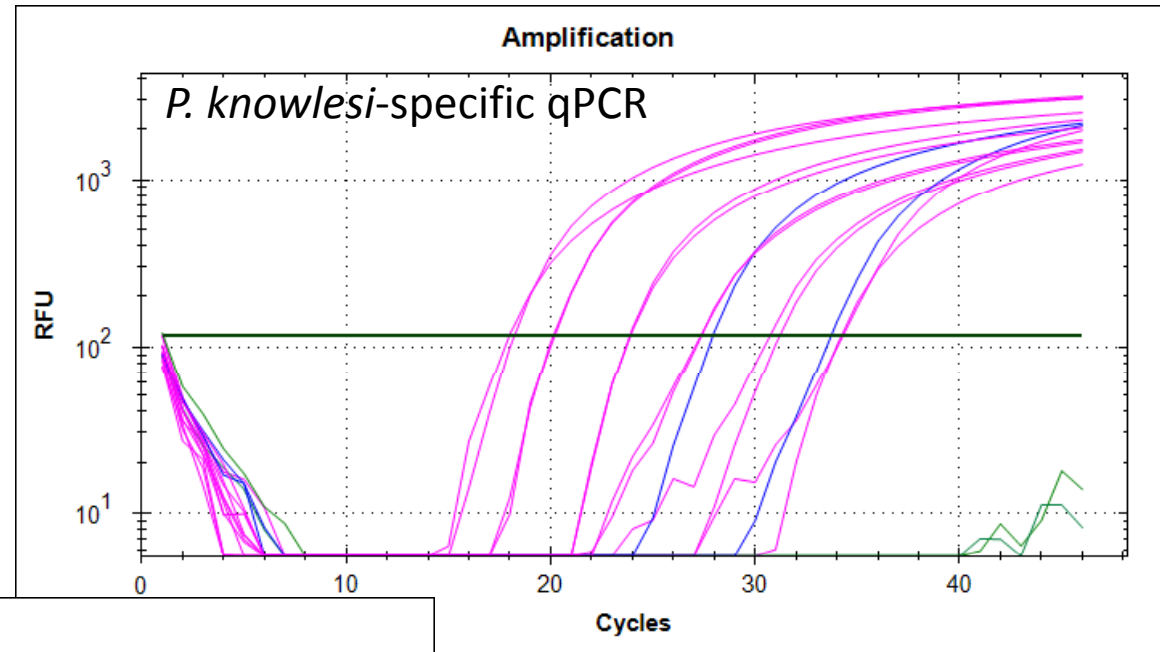
bp



Pf Pv Pm Po Pk



qPCR at Mahidol Vivax Research Unit



ตัวอย่างใบรายงานผลจาก MVRU

ส่งตัวอย่างเลือดได้ที่

วัดถาวรปสูง

หน่วยวิจัยมหิตลวแกวช คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

ม.มหิตล

420/6 ถ.ราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี

กรุงเทพ 10400

wanlapa.ros@mahidol.edu

สิ่งส่งตรวจ

Blood filter หรือ

EDTA blood



MVRU
Mahidol Vivax Research Unit

ใบรายงานผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยมหิตลวแกวช
(Mahidol Vivax Research Unit)

ชั้น 3 อาคารเฉลิมพระเกียรติ 50 ปีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิตล โทร.02-3549100 ต่อ 2020
เลขที่ 420/6 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร

<p style="text-align: center;">ข้อมูลผู้ส่งส่งตรวจ</p> <p>ชื่อผู้ป่วย..... HN.....</p> <p>ชื่อผู้ตรวจ.....โรงพยาบาลลานสัก.....</p> <p>ที่อยู่.....อุทัยธานี.....</p> <p>** กรุณาใส่เบอร์ติดต่อและ E-mail เพื่อจะได้ส่งใบรับผลให้กับท่าน</p> <p>เบอร์ติดต่อ:</p> <p>E-mail:@hotmail.com</p> <p style="text-align: center;">Specimen's Information (ข้อมูลส่งส่งตรวจ)</p> <p>ประเภทส่งส่งตรวจ: <u>EDTA blood</u></p> <p>วันที่เก็บส่งส่งตรวจ:N/A.....</p>	<p>รายการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี nested-PCR</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i></td> <td></td> </tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>	
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>						
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>						
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>							
<p style="text-align: center;">ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี nested-PCR</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i></td> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i></td> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i></td> <td></td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>	
<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>						
<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>						
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>							
<p>รับรองผลการตรวจโดย <i>Petrom Sathayath</i></p> <p style="text-align: center;">ดร.เจตสมน ประจำคร หัวหน้าหน่วยวิจัยมหิตลวแกวช คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิตล</p>							

วันที่.....5 ตุลาคม 2561.....



MVRU
Mahidol Vivax Research Unit

ใบรายงานผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยมหิตลวแกวช
(Mahidol Vivax Research Unit)

ชั้น 3 อาคารเฉลิมพระเกียรติ 50 ปีคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิตล โทร.02-3549100 ต่อ 2020
เลขที่ 420/6 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร

<p style="text-align: center;">ข้อมูลผู้ส่งส่งตรวจ</p> <p>ชื่อผู้ป่วย..... HN.....</p> <p>ชื่อผู้ตรวจ.....โรงพยาบาลลานสัก.....</p> <p>ที่อยู่.....อุทัยธานี.....</p> <p>** กรุณาใส่เบอร์ติดต่อและ E-mail เพื่อจะได้ส่งใบรับผลให้กับท่าน</p> <p>เบอร์ติดต่อ:</p> <p>E-mail:@hotmail.com</p> <p style="text-align: center;">Specimen's Information (ข้อมูลส่งส่งตรวจ)</p> <p>ประเภทส่งส่งตรวจ: <u>Blood filter</u></p> <p>วันที่เก็บส่งส่งตรวจ:21 สิงหาคม 2561.....</p>	<p>รายการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี nested-PCR</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i></td> <td></td> </tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>	
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>						
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>						
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>							
<p style="text-align: center;">ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี nested-PCR</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i></td> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i></td> <td><input type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i></td> <td></td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>	<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>	
<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium falciparum</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium vivax</i>						
<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium malariae</i>	<input type="checkbox"/> <i>Plasmodium ovalae</i>						
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Plasmodium knowlesi</i>							
<p>รับรองผลการตรวจโดย <i>Petrom Sathayath</i></p> <p style="text-align: center;">ดร.เจตสมน ประจำคร หัวหน้าหน่วยวิจัยมหิตลวแกวช คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิตล</p>							

วันที่.....28 สิงหาคม 2561.....

Poster 61: Case reports (สาร 12)



Case series of human *Plasmodium knowlesi* infection on the Southern border of Thailand



Sutharinee Ngernna¹, Nattawan Rachaphae², Pathomporn Prikchoo³, Opatt Kaewnah⁴, Khajohnpong Manopwisedjaroen², Kanit Phumchuea², Chayanut Suansomjit², Wanlapa Roobsoong², Jetsumon Sattabongkot², Suwich Thammapalo², Wang Nguitragool¹

¹ Department of Molecular Tropical Medicine and Genetics, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand
² Mahidol Vivax Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand
³ Office of Disease Prevention and Control Region 12 Songkhla, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Songkhla, Thailand
⁴ Vector-Borne Diseases Control Center 12.2, Songkhla, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Songkhla, Thailand

Abstract

Although *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*) infection in human can be found throughout the Southeast Asia, it has been restricted mainly to Malaysian Borneo. During November 2017 to April 2018, however, six cases of *P. knowlesi* malaria were identified in Songkhla (5) and Narathiwat (1), southern provinces of Thailand located near Peninsular Malaysia. Despite the early diagnosis of dengue, influenza, or *P. falciparum* or *P. vivax* malaria, all cases were confirmed to be positive for *P. knowlesi* by expert microscopy, nested PCR, and quantitative PCR. All patients received anti-malarial treatment and recovered without complications. This unprecedented number of *P. knowlesi* malaria, observed within six months, is a clear sign to the emerging threat of *P. knowlesi* in the affected and neighboring areas, including the jungle inhabited by the potential *P. knowlesi* simian host.

Introduction

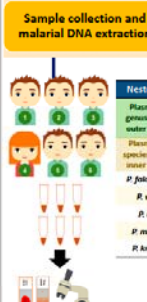
Besides the four well-known human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, and *P. ovale*), *P. knowlesi* is now recognized as a malaria species that causes infection in humans. The natural hosts of *P. knowlesi* are the Southeast Asian long-tailed (*Macaca fascicularis*) and pig-tailed (*Macaca nemestrina*) macaques. Transmission of *P. knowlesi* is generally believed to be from monkeys to humans via Anopheles mosquitoes. In 1965, the first natural infection of *P. knowlesi* was observed in an American traveler who returned from Malaysia. More recently, a large number of human *P. knowlesi* malaria cases were reported in Sarawak State of Malaysian Borneo during 2004–2008. Since then, more have been found throughout Southeast Asia. Several infections of *P. knowlesi* were reported in international travelers after returning from the countries in Southeast Asia.

In Thailand, *P. knowlesi* infections have been reported since 1996 when a retrospective study of blood samples from malaria patients in Northwester Thailand province identified 1 case of *P. knowlesi* infection with *P. vivax* and *P. knowlesi*. In 2000, a case of human *P. knowlesi* infection was identified in Prachuap Khiri Khan, a Southern province of Thailand. During October 2006 and September 2007, 10 *P. knowlesi* infected patients were demonstrated from Tak, Prachuap Khiri Khan, Chantaburi, Yala, and Narathiwat provinces. During October 2008 and September 2009, 23 human infected *P. knowlesi* cases were also described from several parts of the country. In June 2016, two cases of single *P. knowlesi* infections were detected in southern Ranong province, the patients were Thai and Myanmar who historically worked in Myanmar.

Recently, the Thai National Malaria Control Program (NMCP) reported total 23 *P. knowlesi* clinical cases, during October 2017 to September 2018. Here, six *P. knowlesi* infection cases from Songkhla and Narathiwat provinces of Southern Thailand are presented.

Method

Sample collection and malarial DNA extraction



Plasmodium species identification

Targeting 18S rRNA genes

Nested PCR	Sequence (5' → 3')
Plasmodium genus-specific outer primers	FW: ACATGATGAGCCGTCGATCTCT RV: GAGCCCAAGACTTATTTCTCAT
Plasmodium species-specific inner primers	FW: ACGATCAGATCCGCGTATCTCT RV: CAATCTTAAAGTACTGGAAGATG
<i>P. falciparum</i>	RV: CAATCTTAAAGTACTGGAAGATG
<i>P. vivax</i>	RV: CAATCTTAAAGTACTGGAAGATG
<i>P. ovale</i>	RV: AATGAGGAGGAGGATCTGAGAAATTT
<i>P. malariae</i>	RV: AAGGAGGATCTCTGAGAAAGACTGAT
<i>P. knowlesi</i>	RV: CTGAGGAGGAGGATCTGAGAAATTT

TagMan quantitative PCR

1) Primers: OTTAQCGAGAGCCCAAAAAAGCGAAT and ACTCAAGTAAGCAATCTTCGATA
2) Probe: HEX-TGGTCTTGTGCGGGATCGTCTACGTAAT-IB-Q

Results

Study sites

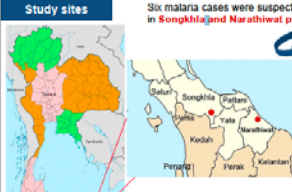


Figure 1. Map of Songkhla and Narathiwat Provinces of Southern Thailand on the Thai-Malaysian border.

Six malaria cases were suspected of *P. knowlesi* or *P. malariae* infection in Songkhla and Narathiwat provinces during 2017–2018:

- One from the Narathiwat Rajaganairindra Hospital, Narathiwat
- Two from the malaria clinic of the Vector-borne Diseases Control Center (VDCC) of Na Thawi, Songkhla
- Two from the Sadao Hospital and the malaria clinic of the VDCC of Sadao, Songkhla
- One from the malaria clinic of the VDCC of Saba Yoi, Songkhla

Case presentation

Case	Age (years)	Sex	Ethnic group	The local residence	Travelled to	PCR-based diagnosis			Months and Year	
						Microscopy-based diagnosis	Nested PCR	uPCR		
1	22	Male	Thai	Na Thawi, Songkhla	Baan Na Ka, The Kedah State of Malaysia	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	1.68	November 2017
2	45	Male	Thai	Jir Lerong, Narathiwat	Gorontoh, Malaysia	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	3.400	January 2018
3	50	Male	Thai	Na Thawi, Songkhla	Baan Keon Nam, The Kedah State of Malaysia	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	500	February 2018
4	48	Female	Thai	Sadao, Songkhla	Malaysian border	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	707	April 2018
5	32	Male	Thai	Sadon, Songkhla	Sadon, Thailand and Malaysian border	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	13.3	April 2018
6	35	Male	Thai	Saba Yoi, Songkhla	Baan Keon Nam, The Kedah State of Malaysia	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. knowlesi</i>	13,958.9	April 2018

Plasmodium species identification

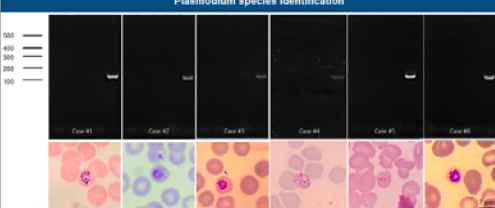


Figure 2. Diagnosis of *P. knowlesi* infection. Top, nested PCR demonstrating *P. knowlesi* infection using species-specific primers with the expected PCR product size of 110 base pairs. Bottom, parasites with characteristics of *P. knowlesi* from blood smear examined under light microscope.

Conclusions

- A series of six cases for human *P. knowlesi* infection was presented in Songkhla and Narathiwat provinces, Southern border of Thailand. This is the first report of *P. knowlesi* malaria in Songkhla province and also the first from the Thai-Malaysia border area with blood smear evidence.
- All patients have travelled to an area that populated with wild monkeys.
- These recent cases signal the potential emerging threat of *P. knowlesi* in Thailand. It is imperative that blood samples of all suspected *P. knowlesi* malaria in Thailand are confirmed by molecular diagnosis to closely track the disease burden in the future.

Acknowledgements

WN was supported by an Intermediate Fellowship to Public Health and Tropical Medicine from Wellcome Trust (1101073/13/2). SN received financial support from National Science and Technology Development Agency (NSTDA) under the Junior Science Talent Project (SCA-CD-2558-725-TH) and by a training grant (D43TW006571) from the National Institutes of Health, USA.