Thesis Title Isolation and Characterization of *Orientia tsutsugamushi* from Rodents, Chiggers and Humans in Some Regions of Thailand

Author Lt. Col. Wuttikon Rodkvamtook

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Chaiwat Jatisatienr	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Araya Jatisatienr	Member
Col. Dr. Jariyanart Gaywee	Member

ABSTRACT

Orientia tsutsugamushi (OT), an obligate intracellular gram-negative bacterium, is known to be the causative agent of scrub typhus, a vector-borne disease transmitted by infected chiggers, larval stage of trombiculid mites in the genus *Leptotrombidium*. Rodents, particularly rats, serve as principal reservoir hosts for OT. In this study OT were isolated from rodents, chiggers, and humans. Rodents were trapped from 4 provinces of Thailand i.e. Phang Nga, Chonburi, Tak and Chiang Mai and their blood were collected for immunological test against OT by indirect fluorescence assay. OT were isolated from liver and spleen by consecutive multiplication in mice and irradiated L-929 cell culture. In addition, OT were isolated from chiggers and from the blood of scrub typhus patients. Nucleotide sequence of the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

56-kDa protein gene of all the OT isolates obtained were determined and compared with standard sequences already deposited with GenBank. Dendrograms were constructed using neighbor-joining (NJ) and maximum pasimony (MP) methods of PAUP 4.0b10 software. Moreover, OT from patients in the northern region of Thailand were also examined on the nucleotide sequence of the 56-kDa protein gene and evolutionary relationship with those OT in this study as well as those of Gilliam, Karp and Kato prototype strains, using NJ and MP methods of PAUP 4.0b10 software.

It was found that 320 rodents were trapped from the four provinces. Only the sera of rats were examined. The sera from 159 out of 300 rats (53.0%) showed positive antibody titer to OT. Thirteen OT isolates were obtained from those rodents, 6 from chiggers and 4 from humans. Study on the nucleotide sequencing of 56-kDa protein gene and the evolutionary relationship of the 23 isolates indicated that they could be grouped into 5 different clusters: Cluster 1 comprised CM2, CM3, CM4 and PH3 and shared 92.2-94.6% identity with Gilliam type. Cluster 2 was only CG3 sharing 96.6% identity with Karp type. Cluster 3 comprised CB52, CB62, CM5, CM6, PH6, PH9 and shared 89.2-91.2% identity with LA1 type and 86.2-92.6% with Karp type, respectively. Cluster 4, were TK1 and PH8 sharing 88.0% identity with Kato type. Cluster 5 comprised CB19, CB35, CB41, CB49, CG1, CG2, CG4, CG5, CG6 and CM1 formed a major cluster sharing 73.1-84.3% identity with only TA type.

Genetic diversity of 44 OT from patients in the northern region showed that they could be grouped into 4 clusters. Cluster 1 (n = 11) was related to Gilliam strain. Cluster 2 (n = 28) was the major group related to LA1. Cluster 3 (n = 3) was closely

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

related to Kato type. Cluster 4 (n = 2) was closely related to those previously isolated in Thailand i.e. TA686 and TA763.

Study on the relationship between 44 OT from blood patients in the northern region and 23 isolates in this study as well as the prototype strains: Gilliam, Karp, and Kato indicated that many OT isolates from the patients were closely related to those isolated from the present study i.e. Cluster 1, CMP10, 13, 18, 26, 28, 33, 35, 39, 40, 41 and 43 shared 94.1-100% identity with CM2, CM3, CM4, PH3 and 93.6-95.3% identity with Gilliam strain. Cluster 2, CMP01, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 12, 11, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 42 and 44 shared 96.7-100% identity with CM5, PH9, CB52 and CB62 and 83.9-85.6% identity with Karp strain. Only CMP04, CMP24 and CMP20 OT from patients of Cluster 3 shared 84.8-100% identity with TK1 and PH8 and also shared 84.8-99.8% identity with Kato strain. Cluster 4 CMP23 and CMP25 shared 82.9-100% identity with CG1, CG2, CG4, CG5, CG6, CB19, CB35, CB41, CB49 and CM1 and shared 65.0-69.7% identity with Kato strain. Correlation study among the isolates showed that the local OT isolates from this study should be used to develop specific and sensitive diagnostic tool for scrub typhus as well as vaccine program in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกเชื้อและการจำแนกสายพันธุ์ *Orientia tsutsugamushi* จากสัตว์ฟันแทะ ตัวไรอ่อนและมนุษย์ ในบางพื้นที่ ของประเทศไทย

ผู้เขียน พ.ท. วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ชัยวัฒน์ จาติเสถียร ประธานกรรมการ
รศ. ดร. อารยา จาติเสถียร กรรมการ
พ.อ.หญิง ดร. จริยาณาฏ เกวี กรรมการ

บทคัดย่อ

Orientia tsutsugamushi (OT) จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีคุณสมบัติเป็น obligate intracellular bacteria เป็นสาเหตุของโรคสครับไทฟัส ซึ่งเป็น โรคที่มีไรอ่อน (Chigger) ซึ่งเป็นตัวอ่อนของตัวไรในจีนัส *Leptotrombidium* เป็นพาหะนำโรค และมีสัตว์ฟันแทะโดยเฉพาะหนูเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ การศึกษานี้ได้แยกเชื้อ OT จาก สัตว์ฟันแทะ ตัวไรอ่อนและมนุษย์ โดยจับสัตว์ฟันแทะจาก 4 จังหวัดของประเทศไทย คือ พังงา ชลบุรี ตาก และ เชียงใหม่ เก็บเลือดเพื่อตรวจหาภูมิต้านทานต่อ OT ด้วยวิธี indirect fluorescence assay นำตับและม้ามมาแยก OT ด้วยวิธีการฉีดเข้าหนูทดลองและเพิ่มจำนวนเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ L-929 ที่ฉายรังสี นอกจากสัตว์ฟันแทะแล้ว ยังได้แยก OT จากตัวไรอ่อนและจากเลือดผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส นำ OT ที่แยกได้ทั้งหมดไปศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56-kDa โปรตีน และศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่าง OT ที่แยกได้และสายพันธุ์ที่ถูกค้นพบมาก่อนหน้านี้ซึ่งถูกเก็บไว้ในธนาคารพันธุกรรมโดยใช้หลักการของ neighbor-joining (NJ) และ maximum parsimony (MP) ของโปรแกรม PAUP 4.0b10 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ OT ที่พบในผู้ป่วยในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย โดยนำมาศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56-kDa โปรตีน และศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการกับเชื้อ OT สายพันธุ์ที่เก็บไว้ในธนาคารพันธุกรรม นอกจากนั้นยังได้นำ OT ที่พบในผู้ป่วยในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการกับ OT ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้และ OT สายพันธุ์ต้นแบบ Gilliam, Karp และ Kato โดยใช้หลักการของ NJ และ MP ของโปรแกรม PAUP 4.0b10

จากการศึกษาสามารถจับสัตว์ฟันแทะได้ทั้งหมด 320 ตัว ตรวจน้ำเหลืองเฉพาะของหนู 300 ตัว พบให้ผลบวกต่อ OT 159 ตัว (53.0%) สามารถแยก OT จากสัตว์ฟันแทะได้ 13 ไอโซเลต จากตัวไรอ่อน 6 ไอโซเลต และจากเลือดผู้ป่วย 4 ไอโซเลต การศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56-kDa และความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของ OT ที่แยกได้ ทั้งหมด 23 ไอโซเลต สามารถจำแนก OT ที่แยกได้ ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย CM2, CM3, CM4 และ PH3 มีลักษณะของยีน 56-kDa ใกล้เคียง กับ Gilliam โดยมีค่า identity เท่ากับ 92.2-94.6% กลุ่มที่ 2 มีเพียง CG3 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Karp มีค่า identity เท่ากับ 96.6% กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย CB52, CB62, CM5, CM6, PH6 และ PH9 มีความสัมพันธ์ของกลุ่มอิสระจาก LA1 และ Karp โดยมีค่า identity เท่ากับ 89.2-91.2% กับ LA1 และ 86.2-92.6% กับ Karp กลุ่มที่ 4 คือ TK1 และ PH8 มีความสัมพันธ์ของกลุ่มแยกจาก Kato มีค่า identity เพียง 88.0% กับ Kato กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มใหญ่ ประกอบด้วย CB19, CB35, CB41, CB49, CG1, CG2, CG4, CG5, CG6 และ CM1 ซึ่งเป็นกลุ่มที่แยกออกมาอย่างอิสระจากเชื้อกลุ่มอื่นโดย มีค่า identity เพียง 73.1-84.3% กับกลุ่ม TA

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ OT ที่พบในผู้ป่วยในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 44 ตัวอย่าง พบว่า OT ดังกล่าว แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะของยีน 56-kDa กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 11 ตัวอย่าง มีสายสัมพันธ์ ใกล้เคียงกับ Gilliam กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มใหญ่ มีจำนวนมากถึง 28 ตัวอย่าง ที่มีสายสัมพันธ์ ใกล้เคียงกับ LA1 กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 3 ตัวอย่าง มีลักษณะใกล้เคียงกับ Kato และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มเล็ก มีจำนวน 2 ตัวอย่าง จัดเป็นกลุ่มที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทยก่อนหน้านี้ คือ TA686 และ TA763

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง OT ที่พบในผู้ป่วยในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 44 ตัวอย่าง กับเชื้อที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 23 ไอโซเลต และเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ Gilliam, Karp และ Kato พบว่า OT ที่พบในผู้ป่วยในพื้นที่ภาคเหนือ จำนวนมากมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิด กับ OT ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้ คือ กลุ่มที่ 1 CMP10, 13, 18, 26, 28, 33, 35, 39, 40, 41 และ 43 มีค่า identity เท่ากับ 94.1-100% กับ OT ที่แยกได้ CM2, CM3, CM4; PH3 และมีค่า identity เท่ากับ 93.6-95.3% ต่อ OT สายพันธุ์ต้นแบบ Gilliam กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย CMP01, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 42 และ 44 มีค่า identity เท่ากับ 96.7-100% กับ OT ที่แยกได้ CM5, PH9, CB52 และ CB62 และมีค่า identity เท่ากับ 83.9-85.6% กับ OT สายพันธุ์ต้นแบบ Karp กลุ่มที่ 3 CMP04, CMP24 และ CMP20 ที่มีค่า identity เท่ากับ 84.8-100% กับ OT ที่แยกได้ TK1 และ PH8 และมีค่า identity

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เท่ากับ 84.8-99.8% กับ OT สายพันธุ์ต้นแบบ Kato กลุ่มที่ 4 CMP23 และ CMP25 มีค่า identity เท่ากับ 82.9-100% กับ OT ที่แยกได้ CG1, CG2, CG4, CG5, CG6, CB19, CB35, CB41, CB49 และ CM1 และมีค่า identity เท่ากับ 65.0-69.7% กับ OT สายพันธุ์ต้นแบบ Kato

จากการศึกษาลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธ์แสดงให้เห็นว่าเชื้อ OT ที่แยกได้จากการศึกษานี้ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นของประเทศไทยมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัสและวัคซีนของประเทศไทยในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved