บทที่ 1

บทนำ

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียหรือไข้จับสั่นนับเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในเขตร้อนทั่วโลก ประมาณว่าประชากรทั่วโลกกว่า 300 ถึง 400 ล้านคนต่อปีมีการติดเชื้อมาลาเรียและเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของประชากรโลกอย่างหนึ่ง ประมาณว่าเด็กในอาฟริกาตายจากการติดเชื้อมาลาเรียกว่า 1 ล้านคนต่อปี (UNDP, 1991)

สำหรับในประเทศไทยมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยมีอัตราการตายจากมาลาเรียสูงมากถึง 350 ต่อประชากร 100,000 คน และนับเป็นสาเหตุการตายอันดับแรกของประเทศ ในระยะต่อมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1951 เมื่อเริ่มมีโครงการควบคุมมาลาเรียในประเทศ อัตราผู้ป่วยและอัตราการตายจากการติดเชื้อมาลาเรียได้ลดลงจากเดิม แต่ก็ยังเป็นสาเหตุการเจ็บป่วยและการตายของประชากรที่สำคัญ โดยในปี ค.ศ. 1989 ถึง 1990 มีจำนวนผู้ติดเชื้อมาลาเรีย 273,880 ราย คิดเป็นอุบัติการติดเชื้อต่อปี (annual parasite incidence) เท่ากับ 5.2 ต่อประชากร 1,000 คนและมีผู้เสียชีวิต 1,386 ราย คิดเป็นอัตราการตาย 2.5 ต่อประชากร 100,000 คน นับเป็นสาเหตุการตายลำดับที่ 7 (กองสถิติ 2532)

ในประเทศไทยพบเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด โดยร้อยละ 64 เกิดจาก *Plasmodium falciparum* ร้อยละ 36 เกิดจาก *Plasmodium vivax* ร้อยละ 0.01 เกิดจาก *Plasmodium malariae* สำหรับ *Plasmodium ovale* พบน้อยมากเพียงปีละ 4 ถึง 5 ราย นอกจากนั้นยังพบการติดเชื้อร่วมกันหลายชนิด (mixed infection) ระหว่าง *P.falciparum* และ *P.vivax* ร้อยละ 0.37 (กองมาลาเรีย 2533)

เชื้อมาลาเรียทุกชนิดมีวงชีวิตในการเจริญเติบโต โดยมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ในยุงก้นปล่อง (anopheline

mosquito) และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ในเซลล์ตับ และในเม็ดเลือดแดงของคน หรือสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่ทำหน้าที่เป็นโฮสต์ (host) ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของมาลาเรียในเม็ดเลือดแดงของคนนั้นมีความแตกต่างกันตามชนิดของมาลาเรียและมีความสัมพันธ์กับอาการไข้หนาวสั่นเป็นระยะ ๆ (paroxysm) ในผู้ป่วย (Beaver et al., 1984)

แม้ว่ามาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่รักษาได้ แต่ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการรักษาป้องกันและควบคุมโรคคือ การดื้อต่อยาหลายชนิดของเชื้อมาลาเรียที่เคยรักษาได้ผล นอกจากนี้ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะของโรคยังเกิดการดื้อต่อยาฆ่าแมลงหลายชนิด ดังนั้นมาตรการอันหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของโรคมาลาเรียคือ การผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย (Wernsdorfer, 1991)

เนื่องจากเชื้อมาลาเรียมีระยะของการเจริญเติบโต (developmental stages) ในคนหลายระยะ โดยแต่ละระยะมีรูปร่างลักษณะตลอดจนโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบแตกต่างไปตามระยะที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นในคนต่อระยะต่าง ๆ จึงมีความจำเพาะ (stage-specific immune responses) ดังนั้นการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่ดีจึงควรมีองค์ประกอบของโปรตีนที่ได้มาจากหลายระยะในวงชีวิตของมาลาเรีย (Miller et al., 1986)

ระยะเมอร์โรซอยต์ (merozoite) ของมาลาเรียเป็นระยะที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดงโดยอยู่ในพลาสมาเป็นช่วงเวลาสั้นก่อนที่จะลุกลาม (invade) เข้าเม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป ระยะนี้จึงเป็นระยะที่มีโอกาสถูกทำลายได้โดยภูมิคุ้มกันของโฮสต์ โปรตีนที่สร้างโดยระยะนี้จึงน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรค บนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ประกอบด้วยโปรตีนที่เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการจดจำ (recognition) การเกาะติด (attachment) และการลุกลาม (invasion) เพื่อที่จะเจริญในเม็ดเลือดแดงใหม่ต่อไป โปรตีนที่สำคัญและมีปริมาณมากที่สุดบนผิวของเมอร์โรซอยต์ของ *P.falciparum* เป็น glycoprotein ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180 ถึง 220 KD เรียกว่า

merozoite surface protein 1 (MSP1) (Holder, 1988) ในการทดลองใช้ MSP1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified MSP1) เป็นอิมมูนโนเจน (immunogen) ฉีดเข้าลิง *Aotus* พบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *P.falciparum* ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศในเม็ดเลือดแดง (asexual erythrocytic stage) ได้เป็นผลสำเร็จ (Siddiqui et al., 1987) นอกจากนี้แอนติบอดีชนิด polyclonal และ monoclonal ต่อโปรตีนดังกล่าวยังสามารถป้องกันการลุกลามของเมอร์โรซอยต์ซึ่งจะเข้าเม็ดเลือดแดงใหม่ได้ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง (Cheung et al,. 1986; Blackman et al., 1990) ดังนั้น MSP1 จึงน่าจะเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการผลิตวัคซีนป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียที่ดีชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งในการนำโปรตีนชนิดนี้มาใช้เป็นองค์ประกอบหน่วยหนึ่ง (subunit) ของมาลาเรียวัคซีนเนื่องจาก MSP1 เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และมีความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจน (antigenic diversity) แตกต่างไปตามสายพันธุ์ (clone) ของเชื้อ (McBride et al., 1985) และเมื่อศึกษา MSP1 ในระดับลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence) โดยเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ พบว่าโปรตีนดังกล่าวถูกสร้างขึ้นจากยีน (gene) ที่มีลักษณะเป็นอัลลีล 2 รูปแบบ (dimorphic allele) กล่าวคือการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ที่ตำแหน่งหนึ่งตำแหน่งใดในโมเลกุลจะมีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ความรู้ดังกล่าวทำให้สามารถแบ่งยีน MSP1 ได้เป็นบริเวณต่าง ๆ (blocks) โดยอาศัยความคล้ายคลึงในลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ได้เป็น 17 บริเวณ ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่มีความคล้ายกันมากกว่าร้อยละ 87 เรียกว่า conserved block ซึ่งมีจำนวน 5 บริเวณ บริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันปานกลางระหว่างร้อยละ 65 ถึง 77 เรียกว่า semiconserved block ซึ่งมี 5 บริเวณ และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันน้อยกว่าร้อยละ 35 เรียกว่า variable block มีจำนวน 7 บริเวณ โดยมีพื้นฐานของยีนเพียง 2 รูปแบบ (allelic dimorphism)

(Tanabe et al., 1987) ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้สามารถอธิบายการเกิดความหลากหลายของแอนติเจน (antigenic diversity) ของ MSP1 ได้จากขบวนการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992; Kerr et al., 1994)

ที่ผิวเมอร์โรซอยต์ของ *P.vivax* ประกอบด้วยโปรตีนซึ่งมีคุณลักษณะคล้าย MSP1 ของ *P.falciparum* เช่นกัน โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 KD หรือเรียกว่า Pv200 (Del Portillo et al., 1988; Udagama et al., 1990) จากการศึกษาภาวะการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ *P.vivax* ในธรรมชาติพบว่ามีระดับ immunoglobulin G (IgG) และ immunoglobulin M (IgM) ต่อโปรตีนที่สร้างโดยการรวมตัวกับโปรตีนชนิดอื่น (recombinant protein) ของ Pv200 ในส่วน N-terminus แสดงว่าโมเลกุลดังกล่าวประกอบด้วย B cell epitope และยังพบว่าแอนติบอดี (antibodies) ดังกล่าวจะตอบสนองต่อส่วนของโปรตีนจากบริเวณที่มีหลายรูปแบบในมาลาเรียต่างชนิดกัน (interspecies polymorphic region) ดังนั้นความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนของ Pv200 จึงน่าจะมีความสำคัญอย่างมากเช่นเดียวกับ MSP1 ของ *P.falciparum* การทราบขอบเขตของความหลากหลายดังกล่าวนับเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P.vivax* เนื่องจาก *P.vivax* ไม่สามารถเลี้ยงในหลอดทดลองได้เช่นเดียวกับ *P.falciparum* ดังนั้นข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์จึงได้จากเชื้อซึ่งสามารถเจริญได้ในลิงทดลอง (*Saimiri* monkey) ได้แก่ Belem strain (del Portillo et al., 1991) และ Salvador-1 strain (Gibson et al., 1992) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถแบ่งยีนนี้ได้เป็น 13 บริเวณ ซึ่งประกอบด้วย 6 conserved blocks (มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าร้อยละ 90) 2 semi-conserved blocks (มีความคล้ายคลึงของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างร้อยละ 50 ถึง 90)

และ 5 variable blocks (มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าร้อยละ 50) จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ในบางส่วนของยีน Pv200 เพื่อวิเคราะห์เชื้อตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศบราซิล และศรีลังกา พบว่าบริเวณ block 5 มีความแตกต่างกันถึง 3 แบบ นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยบางรายมีการติดเชื้อ *P.vivax* ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์ที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับการติดเชื้อ *P.falciparum* (Premawansa et al., 1993)

เนื่องจากในประเทศไทยมีผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P.vivax* มากเป็นอันดับ 2 รองจาก *P.falciparum* จึงนับว่าเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งของประเทศ แม้ว่าการรักษามาลาเรียที่เกิดจาก *P.vivax* ยังไม่ประสบปัญหาเหมือน *P.falciparum* แต่เมื่อไม่นานมานี้เริ่มมีรายงานผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P.vivax* มีการดื้อต่อยาคลอโรควิน (chloroquine) ในหลายประเทศ (Rieckmann et al., 1989; Whitby et al., 1989; Garavelli and Corti., 1992; Schuurkamp et al., 1992) ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคในการรักษาและควบคุมโรคในอนาคต เนื่องจาก Pv200 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียสำหรับ *P.vivax* (Mertens et al., 1993; Levitus et al., 1994) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน การใช้ตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยดังกล่าวอาจนำไปสู่ความเข้าใจถึงพื้นฐานทางด้านพันธุกรรม (genetic basis) ของยีนที่สร้างโปรตีนชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังอาจให้ประโยชน์ทางด้านการศึกษาพันธุประชากร (population genetics) ของ *P.vivax* อีกด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย