บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มาลาเรีย เป็นโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ทำให้เกิดโรคที่มีลักษณะเฉพาะตัว คือ มีไข้ หนาวสั่นเป็นระยะ ๆ อาจมีอาการไข้ทุกวันหรือวันเว้นสองวันก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ อาจพบอาการซีดตับโตและม้ามโตร่วมด้วย ในปัจจุบันสามารถจำแนกเชื้อมาลาเรียโดยใช้ความรู้ด้านอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Bruce-Chwatt et al., 1993)

kingdom: *Protista*

sub-kingdom: *Protozoa*

phylum: *Apicomplexa*

class: *Sporozoa*

sub-class: *Coccidia*

order: *Cocicdiida*

sub-order: *Haemosporidiidae*

family: *Plasmodiidae*

genus: *Plasmodium*

sub-genus: *Plasmodium*

group: *vivax* ประกอบด้วย *Plasmodium vivax*

Plasmodium cynomolgi

Plasmodium eylesi

Plasmodium gonderi

Plasmodium hylobati

Plasmodium jefferyi

Plasmodium pitheci

Plasmodium schwetzi

Plasmodium simium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

		Plasmodium sylvaticum
		Plasmodium youngi
group: *ovale*	ประกอบด้วย	*Plasmodium ovale*
		Plasmodium fieldi
		Plasmodium simiovale
group: *malariae*	ประกอบด้วย	*Plasmodium malariae*
		Plasmodium brasilianum
		Plasmodium inui
group: uncertain	ประกอบด้วย	*Plasmodium coatneyi*
		Plasmodium fragile
		Plasmodium knowlesi
sub-genus: *laverania*	ประกอบด้วย	*Plasmodium falciparum*
		Plasmodium reichenowi
sub-genus: *vinckeia*	ประกอบด้วย	เชื้อใน species อื่น ๆ ที่เหลือ ซึ่งไม่ทราบ ความชัดเจนในการก่อโรค

เมื่อจำแนกเชื้อมาลาเรียตามอนุกรมวิธาน สามารถแบ่งเชื้อใน genus *Plasmodium* ได้เป็น 120 species ในจำนวนนี้มีอย่างน้อย 22 species ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในสัตว์ ประเภทลิง 19 species เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในสัตว์ฟันแทะ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ 70 species สาเหตุของโรคมาลาเรียในนก และสัตว์เลื้อยคลาน และมี 4 species ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในมนุษย์ คือ (Bruce-Chwatt et al., 1993)

1. *P. malariae* (Laveran, 1881)
2. *P. vivax* (Grassi and Feletti, 1890)
3. *P. falciparum* Welch, 1897
4. *P. ovale* Stephens, 1922

ระบาดวิทยา

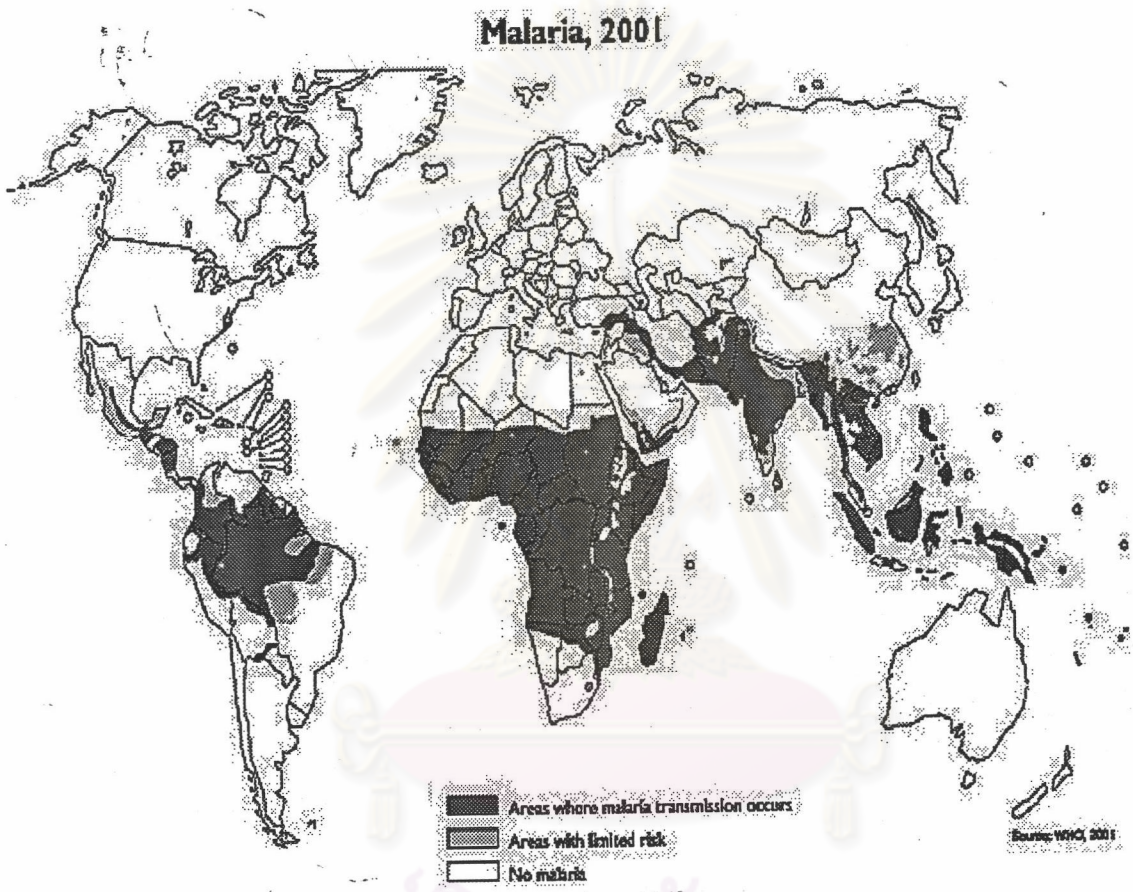
โรคมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่มีพื้นที่การแพร่กระจายกว้างขวางครอบคลุมตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 64 องศาเหนือ ถึงเส้นรุ้งที่ 32 องศาใต้ เป็นเขตร้อน (tropical zone) และเขตกึ่งร้อน (sub-tropical zone) ของโลก บริเวณที่มีการแพร่กระจายครอบคลุมตั้งแต่พื้นที่ที่อยู่ต่ำกว่าระดับน้ำทะเลถึง 400 เมตร เช่น บริเวณ dead sea จนถึงพื้นที่ที่อยู่สูงกว่าระดับน้ำทะเลถึง 2,600 เมตร เช่นประเทศ

เคนยา ซึ่งในปัจจุบันพื้นที่ดังกล่าวครอบคลุมประมาณ 100 ประเทศ มีประชากรรวมกันกว่า 2,600 ล้านคน *P. falciparum* เป็นเชื้อมาลาเรียที่มีความรุนแรงสูงมีแหล่งแพร่ระบาดอยู่ในประเทศที่มีภูมิอากาศร้อน และมีความชื้นสูง โดยพบในประเทศที่อยู่ตอนกลาง ตะวันออก และตะวันตกของทวีปแอฟริกา และประเทศที่อยู่ในทะเลคาริเบียนซึ่งอยู่ในอเมริกากลางและประเทศในอเมริกาใต้โดยเฉพาะแถบลุ่มน้ำอเมซอน นอกจากนี้ยังมีหลายประเทศในทวีปเอเชียที่เป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อชนิดนี้ได้แก่ บังคลาเทศ ปากีสถาน อินเดีย ไทย ลาว เมียนม่าร์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก สำหรับ *P. vivax* มีแหล่งแพร่ระบาดอยู่ในเขตร้อน และกึ่งร้อน โดยพบมากใน ประเทศตุรกี ปากีสถาน บังคลาเทศ อินเดีย ศรีลังกา และจีนตอนใต้ รวมทั้งประเทศแถบลาตินอเมริกา ส่วน *P. malariae* พบได้ทั่วไปในเขตร้อน เช่น ทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกาใต้ และทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศอินเดีย ศรีลังกา และ มาเลเซีย และ *P. ovale* มีการระบาดไม่รุนแรง พบได้ทั่วไปในทวีปแอฟริกายกเว้นตอนใต้ นอกจากนี้ยังพบในแถบอเมริกาใต้ซึ่งการแพร่-ระบาดของของเชื้อมาลาเรียในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกที่กล่าวมานี้ มักมีสาเหตุมาจากปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย คือ

1. การเพิ่มจำนวนของพาหะนำโรค ซึ่งได้แก่ยุงก้นปล่อง อันเนื่องมาจากมีแหล่งเพาะพันธุ์ที่ดี และการใช้ยาฆ่าแมลงที่ไม่ได้ผล
2. การเพิ่มจำนวนประชากรในแหล่งแพร่ระบาดของโรค ทำให้มีผู้ได้รับเชื้อมากขึ้น
3. ภาวะการขาดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อของประชากร
4. การมีสภาวะแวดล้อม และภูมิอากาศที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ และการแพร่กระจายของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีอุณหภูมิ 18-29 °C และมีความชื้นสูง (Maegraith, 1989)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 แสดงภูมิภาคต่าง ๆ ที่มีการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย แสดงโดยบริเวณพื้นที่สีเข้ม (http://www.who.org)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พาหะนำโรค

สัตว์ที่เป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียมาสู่มนุษย์คือยุงก้นปล่องตัวเมีย ในปัจจุบันพบว่ามียุงก้นปล่องมากกว่า 400 species ทั่วโลก แต่มี ประมาณ 67 species ที่พบ sporozoite ของเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติ ในปี ค.ศ. Ross เป็นคนแรกที่ค้นพบเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่อง ยุงก้นปล่องบางชนิดอาจเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียได้ดีในพื้นที่หนึ่ง แต่กลับไม่สามารถนำโรคมาลาเรียได้ในอีกพื้นที่หนึ่ง ยุงก้นปล่องชนิดใดสามารถนำโรคมาลาเรียได้ดีในพื้นที่ใดจะถือว่ายุงก้นปล่องชนิดนั้นเป็นพาหะหลักของพื้นที่นั้น (primary vector) สำหรับในประเทศไทยมียุงก้นปล่อง 3 ชนิดที่จัดว่าเป็นพาหะหลักในการนำโรคมาลาเรียที่สำคัญ ได้แก่ *Anopheles dirus* *Anopheles minimus* และ*Anopheles maculatus* ส่วนยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะรอง (secondary vector) ได้แก่ *Anopheles sundicus Anopheles aconitus* และ *Anopheles pseudowillmori* (Harrison et al., 1990)

An. dirus เป็นยุงพาหะที่มีความสามารถในการแพร่เชื้อมาลาเรียได้สูงที่สุด เดิมเข้าใจว่าเป็น species *balabacencis* แต่ต่อมาพบว่าเป็นคนละชนิดกัน เนื่องจากพบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ยุงชนิดนี้มีขนาดใหญ่ พบได้ทั่วไปในพื้นที่ที่ป่าเขา สวนยาง ท้องที่ขุดพลอยในภาคตะวันออก และสวนผลไม้ สามารถพบได้แม้บนดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งอยู่สูงจากระดับน้ำทะเลถึง 4,500 ฟุต (Scanlon and Esah, 1965) ชอบเพาะพันธุ์ในแอ่งน้ำขังที่มีร่มเงาในป่าเขา แอ่งน้ำขังขอบลำธาร แอ่งดิน แอ่งหิน และรอยเท้าสัตว์ที่มีน้ำขัง ไข่ของยุงชนิดนี้สามารถทนความแห้งแล้งได้หลายวัน *An. dirus* พบเป็นครั้งแรกว่าเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียในปี ค.ศ. 1956 เนื่องจากมีขนาดใหญ่จึงสามารถกินเลือดได้มากกว่า *An. minimus* ถึง 3 เท่า ทำให้มีโอกาสรับ gametocyte ได้มากกว่า สันนิฐานว่ายุงชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับการแพร่เชื้อ *P. falciparum* ชนิดที่ดื้อต่อยาคลอโรควินด้วย (Young et al., 1963) มีนิสัยชอบกินเลือดคน (Anthropophilic) และชอบเกาะพักนอกบ้าน (Exophilic) เวลากลางวันจะเกาะพักตามพุ่มไม้เตี้ย ๆ โพรงไม้ หรือที่สงบเงียบ มืด และมีความชื้นสูง ใกล้แหล่งเพาะพันธุ์ เวลาพลบค่ำจะบินเข้าสู่ที่อยู่อาศัยของคน แล้วเกาะพักอยู่ตามฝาบ้านก่อน จากนั้นจึงเข้ากัดคนระหว่างเวลา 22.00-02.00 น. (Scanlon and Esah, 1965) กัดคนได้ทั้งในบ้าน และนอกบ้าน ในธรรมชาติพบ sporozoite ในต่อมน้ำลายของยุงชนิดนี้สูงถึง 8.7% (*An. minimus* พบเพียง 2.5%) มีความชุกชุมสูงที่สุดในช่วงฤดูฝน บริเวณที่ห่างไกลจากป่า ปริมาณความหนาแน่นของยุงชนิดนี้จะลดน้อยลง ในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการแบ่งยุงใน species ออกเป็น 6 ชนิด ได้แก่ชนิด A B C D E และ F โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียด โดยชนิด A และ D มักพบตามท้องที่ป่าเขาติดชายแดนไทย-พม่า

ป่าทางภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก *An. dirus* ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นชนิดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายโรคได้สูงที่สุด เป็นยุงพาหะในท้องที่ป่าเขา ชนิด B พบเฉพาะภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดพังงาลงไป ชนิด F พบร่วมกับชนิด B บริเวณที่ติดกับชายแดน ไทย-มาเลเซีย ชนิด C พบในป่าจังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดสุราษฎร์ธานี และชนิด E พบเฉพาะในป่าทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอินเดีย

An. minimus เป็นยุงพาหะที่สำคัญของพื้นที่ป่าเชิงเขา มักเพาะพันธุ์ตามลำธารน้ำไหล และน้ำซับน้ำซึม พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศ พบเป็นครั้งแรกว่าเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยในปี ค.ศ.1935 โดยการพบ sporozoite ในต่อมน้ำลายยุงชนิดนี้จากอำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช (Payung-Vejjasastra, 1935) หลังจากมีการใช้สาร DDT อย่างแพร่หลายทั่วโลก ในปี ค.ศ.1949 ยุงชนิดนี้ได้หายไปจากภาคใต้ของประเทศไทย แต่ในปี ค.ศ.1974 เป็นต้นมา ยุงชนิดนี้กลับเพิ่มจำนวนขึ้นอีกครั้งในภาคใต้ บริเวณชายแดนไทย-มาเลเซีย ซึ่งสาเหตุของการกลับมาใหม่นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะมาจากประเทศข้างเคียง โดยติดมากับยานพาหนะต่าง ๆ ยุงชนิดนี้มีความชุกชุมสูงที่สุดในช่วงเดือน มิถุนายน-กรกฎาคม และกันยายน-พฤศจิกายน มักกัดคนเวลา 18.00–19.00 น. ในช่วงฤดูหนาว ส่วนฤดูร้อน และฤดูฝนมักเข้ากัดคนเวลา 21.00-22.00 น. หลังจากกัดคนแล้วมักจะเกาะพักภายในบ้าน ยุง *An. minimus* ในประเทศไทยมี 3 ชนิดคือ ชนิด A C และ D ชนิด A พบได้ทั่วไป ส่วนชนิด C และ D พบเฉพาะในบางพื้นที่ของจังหวัดตาก และกาญจนบุรีเท่านั้น (Green et al., 1991)

An. maculatus พบทั่วไปในท้องที่ป่าเขาทั่วประเทศ เพาะพันธุ์ในธารน้ำไหลที่มีแสงแดดส่องถึง เช่นเดียวกับยุง *An. minimus* เป็นพาหะสำคัญของโรคมาลาเรียในประเทศมาเลเซีย และภาคใต้ของประเทศไทย พบครั้งแรกว่าเป็นพาหะของโรคมาลาเรียในประเทศไทย โดยการพบ sporozoite ในต่อมน้ำลายยุงที่ได้จากอำเภอแว้ง จังหวัด นราธิวาส มีนิสัยชอบกัดสัตว์มากกว่าคน และชอบกัดนอกบ้าน มักกัดคนระหว่างเวลา 18.00-21.00 น. มีระยะบินไกลประมาณ 1.65 กิโลเมตรยุงชนิดนี้จัดเป็นพาหะหลักอีกชนิดหนึ่งของโรคมาลาเรียที่มีการแพร่ระบาดอยู่ในภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณเขตแดนติดต่อกับประเทศมาเลเซีย (Green et al., 1991)

นอกจากยุงก้นปล่องทั้ง 3 species ที่กล่าวข้างต้น ซึ่งเป็นพาหะหลักของโรคมาลาเรียในประเทศไทยแล้ว ยังมียุงก้นปล่องที่เป็นพาหะรองอีก 3 species ได้แก่

An. sundicus มักวางไข่ในน้ำกร่อย โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายทะเล

ขึ้น และมีแสงแดดส่องถึง ดูดเลือดทั้งคน และสัตว์ทั้งที่อาศัยอยู่ภายนอกและภายในบ้าน แต่หลังจากนั้นจะเกาะพักอยู่ในบ้าน ยุงชนิดนี้จัดเป็นพาหะหลักของโรคมาลาเรียที่แพร่ระบาดอยู่แถบชายฝั่งทะเลของประเทศไทย

An. aconitus อาศัยอยู่ตามพื้นที่ราบลุ่มที่เป็นพื้นที่การเกษตร เช่นนาข้าว ไร่ สวน และมักวางไข่ในน้ำไหลใสสะอาด และมีพืชน้ำขึ้น พบเกือบทุกภาคของประเทศไทย

An. pseudowillmori พบในท้องที่ป่าเขา และเชิงเขา มีลักษณะคล้ายคับยุง *An. maculatus* (Green et al., 1991)

ยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในประเทศไทยนั้นเป็นยุงที่อาศัยและวางไข่อยู่ตามแหล่งน้ำในป่าเขาเป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นเหตุให้การแพร่ระบาดของโรคมาลาเรียที่เกิดขึ้นในประไทย มักเกิดขึ้นบริเวณที่เป็นป่าเขามากกว่าในตัวเมือง

การติดต่อเข้าสู่ร่างกาย

เกิดจากยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ในต่อมน้ำลาย เมื่อมากัดคนก็จะถ่ายทอดเชื้อระยะ sporozoite ซึ่งเป็นระยะติดต่อเข้าสู่ร่างกายของผู้ถูกกัด นอกจากนั้นอาจติดต่อได้โดยวิธีอื่นเช่น ทางการถ่ายเลือด และจากมารดาสู่ทารกในครรภ์ เป็นต้น แต่มีโอกาสพบได้น้อยมาก (Bruce-chwatt et al., 1993)

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

วงจรชีวิตในยุง

เมื่อยุงก้นปล่องตัวเมียไปกัดคนที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ จะได้รับเชื้อระยะ gametocyte เข้าสู่กระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้น gametocyte จะแบ่งนิวเคลียส 3 ครั้ง พร้อมกับการสร้าง flagellum ทำให้มีขนาดความยาว 20-25 ไมครอน ดังนั้น gametocyte เพศผู้ 1 ตัวจะเปลี่ยนแปลงเป็น gamete เพศผู้ 8 ตัว ขบวนการนี้เรียกว่า exflagellation สำหรับ gametocyte เพศเมียจะเจริญเป็น gamete เพศเมีย โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแต่ไม่มีการแบ่งตัว จากนั้น gametocyte เพศผู้ และเพศเมียจะปฏิสนธิกันกลายเป็น zygote ซึ่งในระยะนี้จะยังไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ ต่อมาเมื่อเวลาผ่านไป 18-24 ชั่วโมง zygote จะมีรูปร่างรียาวมากขึ้น เพื่อให้เหมะสมในการเคลื่อนที่ เรียกระยะนี้ว่า ookinete และเคลื่อนที่ไปยังผนังกระเพาะอาหารของยุง และแทรกตัวผ่าน epithelial cell เข้าไปฝังตัวใต้ผนังชั้นนอกของกระเพาะอาหาร แล้วจึง

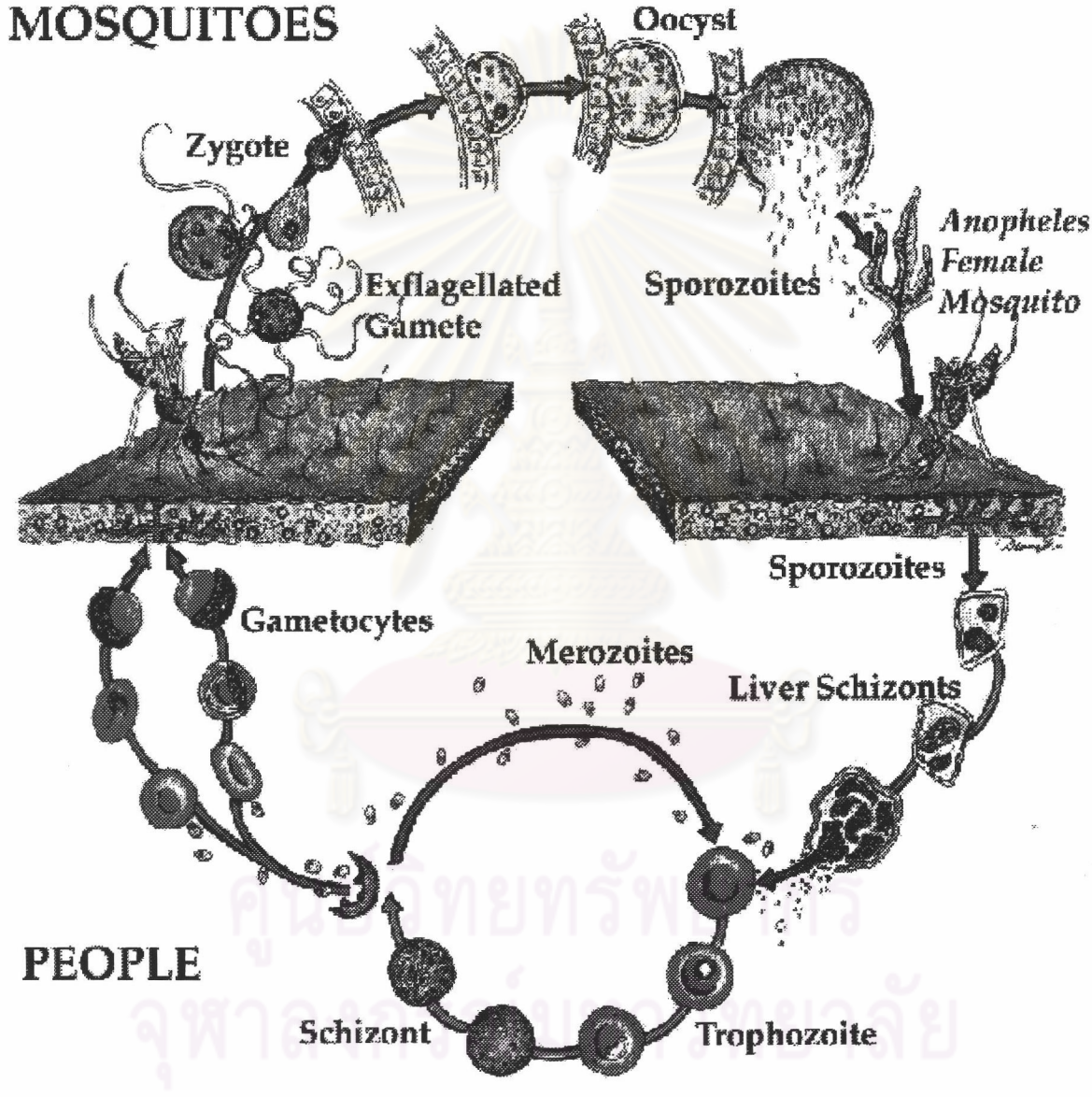
เปลี่ยนรูปร่างกลับมาเป็นค่อนข้างกลม เรียกว่า oocyst ระยะนี้จะเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อย ๆ จนมีขนาดประมาณ 40-80 ไมครอน ภายในผนังซีสต์จะประกอบด้วย pigment มากมายโดยสี และขนาดของ pigment เหล่านี้มีความแตกต่างกันในแต่ละ species ของเชื้อ ภายใน oocyst มี sporoblast ซึ่งจะเจริญไปเป็น sporozoite มากมาย sporozoite แต่ละตัวมีความยาวประมาณ 10-15 ไมครอน และ 1 oocyst จะมี sporozoite ประมาณ 1,000-2,000 ตัว เมื่อ oocyst เจริญเต็มที่จะแตกออกทำให้ sporozoite จำนวนมากกระจายตัวออกไปสู่ body cavity ของยุง แล้วเดินทางต่อไปยังต่อมน้ำลายเพื่อรอการติดต่อเข้าสู่ร่างกายของผู้ที่ถูกยุงกัดต่อไป กระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุงจนได้ sporozoite นี้เรียกว่า sporogony

นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตในวงชีวิตของเชื้อ เช่นเชื้อ *P. falciparum* ใช้เวลาในการเจริญเติบโต 22 วัน ที่อุณหภูมิ 20 °C ส่วนที่อุณหภูมิ 23 oCใช้เวลา 15-17 วัน และที่อุณหภูมิ 28 °C ใช้เวลา 9-10 วัน ซึ่งในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงวงชีวิตของเชื้อจะใช้เวลาสั้น จึงมีผลให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว (Bruce-chwatt et al., 1993)

วงจรชีวิตในคน

เริ่มต้นเมื่อยุงที่มีเชื้อมากัดคน sporozoite ในน้ำลายจะเข้าสู่ร่างกายคน และจะหายไปจากกระแสเลือดไปสู่ parenchymal cell ของตับอย่างรวดเร็ว ภายใน 30 นาที เพื่อรอการเจริญเติบโตต่อไป แต่ sporozoite บางส่วนอาจถูกทำลายไปโดยกระบวนการ phagocytosis ในช่วงนี้เรียกระยะเจริญของเชื้อก่อนเข้าสู่เม็ดเลือดแดงว่า pre-erythrocytic stage ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5-16 วัน ในกรณีของเชื้อ *P. vivax และ P. ovale* จะมีเชื้อบางส่วนที่ไม่เจริญต่อไปจากระยะนี้แต่ยังมีชีวิตอยู่ในสภาพหยุดพัก เพื่อรอการแสดงอาการอีกครั้งเรียกว่า hypnozoite ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดไข้กลับ (relapse) ในขณะที่เชื้ออีกส่วนหนึ่งจะเจริญไปเป็นระยะ pre-erythrocytic schizont ซึ่งการเจริญในระยะนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 6-16 วันขึ้นอยู่กับ species ของเชื้อ เมื่อระยะ schizont เจริญเต็มที่จนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-70 ไมครอนจะทำให้เซลล์ตับที่มีการติดเชื้อมีขนาดใหญ่ขึ้นตามไปด้วย schizont ที่เจริญเต็มที่ประกอบด้วย merozoite อยู่ภายในเป็นจำนวนมากประมาณ 10,000-30,000 ตัว แล้วแตกออกจากเซลล์ของโฮสต์ทำให้ระยะ merozoite เหล่านั้นเข้าสู่กระแสเลือด สำหรับจำนวนของ merozoite และช่วงเวลาที่ใช้ในระยะต่าง ๆ จะแตกต่างกันไปตาม species ของเชื้อ (Strickland, 2000) merozoite มีลักษณะเป็นรูปไข่ มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 1.5 x 1.0 ไมโครเมตร มีผนัง 2 ชั้น ชั้นนอกเรียกว่า plasma membrane มีความหนาประมาณ 7.5 นาโนเมตร และชั้นในเรียกว่า inner membrane มีความหนาประมาณ

ภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย ประกอบด้วยวงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในร่างกายของคน และวงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุงก้นปล่อง (http://www.malariatest.com/cycle.html)



15 นาโนเมตร ถัดจากผนังชั้น inner membrane เข้าไปจะมีท่อขนาดเล็กเรียกว่า subpellicular microtubule ซึ่งผนังชั้น inner membrane และ subpellicular microtubule นี้เป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้โครงสร้างของ merozoite คงรูปร่างอยู่ได้ (Aikawa, 1971) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะพบว่าบริเวณผิวด้านนอกมีลักษณะทึบ (electron dense) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีโปรตีนต่าง ๆ รวมกันอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดของโปรตีนเหล่านี้ แต่อย่างไรก็ตามเชื่อว่าโปรตีนเหล่านี้น่าจะสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ตอบสนองได้ (Miller et al., 1975) บริเวณด้านข้างของ merozoite มีอวัยวะอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า cytostome มีลักษณะเป็นรอยเว้ารูปร่างกลม นิวเคลียสของ merozoite มีขนาดใหญ่ ทรงกลม อยู่ตรงกลางเซลล์ ภายในมี chromatin ซึ่งจับกลุ่มกันแน่นเป็นกระจุก (clumping) (Aikawa, 1977) นอกจากนี้ยังพบ mitochrondria ในส่วนของ posterior ของ merozoite และสังเกตเห็น ribosome เป็นจำนวนมากแต่พบว่ามี endoplasmic reticulum เพียงเล็กน้อย ส่วนปลายสุดของ merozoite เรียกว่า apical end มีลักษณะนูนออกมาคล้ายกรวยปลายตัด ภายในปากกรวยมีถุง 2 ข้างเรียกว่า rhoptry และมี microneme กระจายอยู่รอบ ๆ rhoptry โดยปลายเปิดของ rhoptry จะไปเปิดที่ตำแหน่งของปลายของ apical end พอดี ซึ่งทั้ง rhoptry และ microneme เป็น organelle สำคัญที่มีบทบาทในกระบวนการเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ของ merozoite (Aikawa et al., 1978) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งถูกสร้างขึ้น และเก็บไว้ใน rhoptry จนเมื่อระยะ merozoite เจริญเต็มที่ และพร้อมจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โปรตีนชนิดนี้จะถูกย้ายมาอยู่บริเวณ apical end ของ merozoite โดยผ่านปลายเปิดของ rhoptry โปรตีนชนิดนี้คือ apical membrane antigen-1 หรือ AMA-1 (Peterson, 1989)

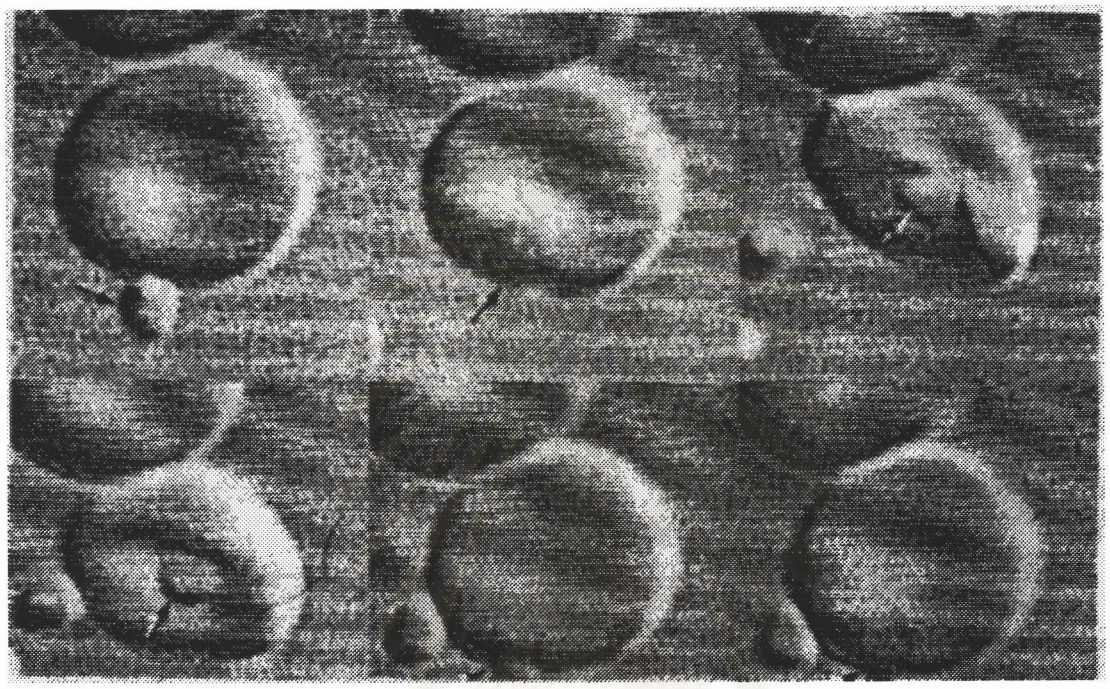
หลังจากออกจากเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว merozoite จำนวนหนึ่งจะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกัน merozoite ส่วนที่เหลือจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเพื่อเจริญต่อไปเรียกระยะเชื้อที่เข้าไปเจริญในเม็ดเลือดแดงว่าระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงสำหรับกระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของระยะ merozoite สามารถศึกษาได้อย่างชัดเจนโดยใช้ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน โดยเริ่มจากการที่ merozoite ใช้ส่วนที่เรียกว่า apical end ซึ่งมีลักษณะค่อนข้างแหลมกว่าส่วนอื่น เข้าสัมผัสกับผนังของเม็ดเลือดแดงจากนั้นจะค่อย ๆ แทรกตัวผ่านผนังของเม็ดเลือดแดงเข้าไปภายใน โดยกระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดงนี้ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 2-3 นาที แบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอนคือ (Miller et al., 1977)

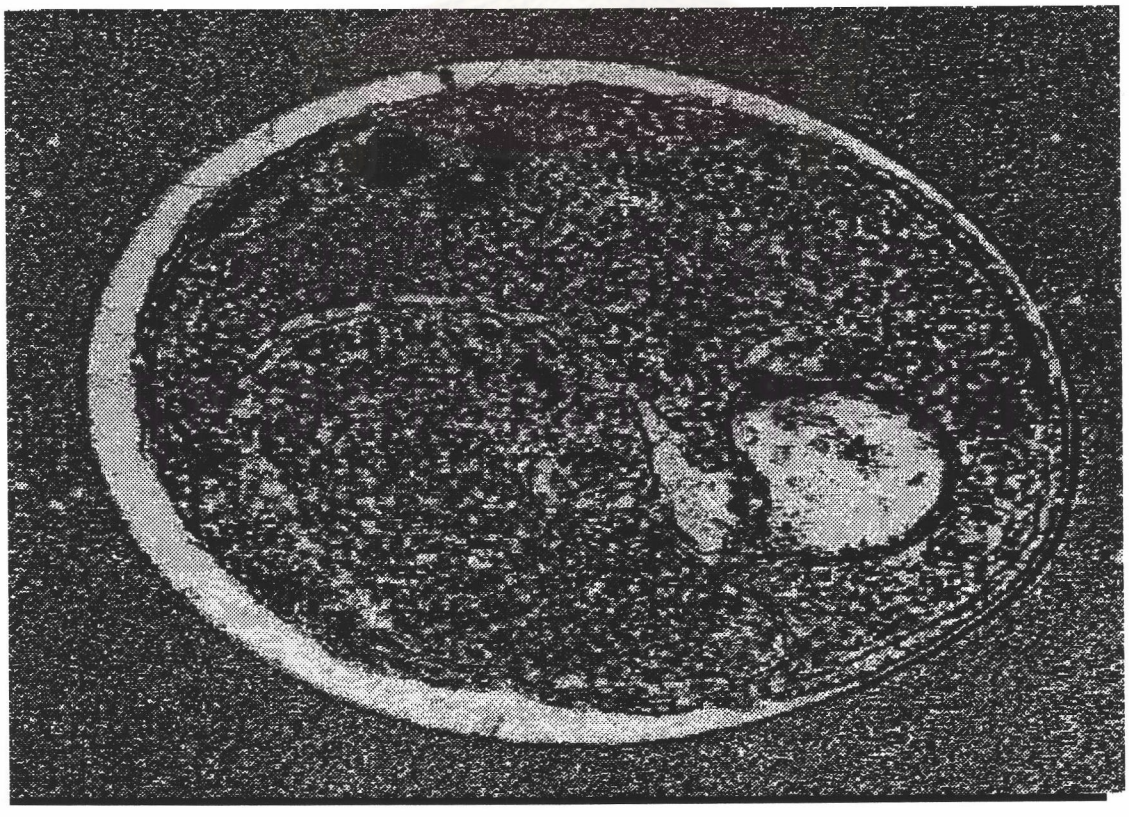
1. การเข้าเกาะติดกับเม็ดเลือดแดง (initial recognition and attachment)
2. การสร้างบริเวณเชื่อมต่อกับผนังเม็ดเลือดแดง (formation of a junction)
3. การผ่านเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (penetration)

4. การปิดบริเวณเชื่อมต่อ หลังจากผ่านเข้าสู่ภายในเม็ดเลือดแดงแล้ว (sealing)

หลังจากที่ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้ว vacuole ที่อยู่ใน merozoite จะมีขนาดใหญ่ขึ้น จนเบียด cytoplasm ของ merozoite ให้เคลื่อนไปชิดกับด้านใดด้านหนึ่ง เมื่อดูเชื้อจากฟิล์มเลือดที่มีผ่านการย้อมสีด้วยวิธียิมซาจะสังเกตเห็นลักษณะของเชื้อในเม็ดเลือดแดงมีลักษณะคล้ายเรือนแหวน โดยบริเวณที่เป็นวงแหวนไม่ติดสีคือส่วนของ vacuole และส่วนของหัวแหวนซึ่งติดสีเข้มคือ chromatin ที่ถูกเบียดค่อนไปด้านใดด้านหนึ่ง จึงเรียกระยะนี้ว่า ring form ซึ่งเป็นระยะ trophozoite ในเชื้อ *P. falciparum* จะพบ ring form ที่มีลักษณะเป็นแหวนที่มีหัวแหวน 2 หัว หรือ double chromatin เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะดังกล่าวนี้มักพบในเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งน่าจะเป็นลักษณะบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ (Strickland, 2000) เชื้อในระยะ trophozoite ดำรงชีวิตอยู่ในเม็ดเลือดแดงโดยใช้ haemoglobin เป็นแหล่งอาหาร และผ่านเข้าสู่ตัวเชื้อโดยอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายปากเรียกว่า cytostome จากนั้น haemoglobin จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ของเชื้อมาลาเรียเช่น cysteine proteinase ผลิตผลที่เหลือจากกระบวนการดังกล่าวจะเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงเกิดกระบวนการ polymerization ให้อยู่ในรูปของ hemozoin หรือ malarial pigment ซึ่งจะเห็นเป็น pigment ของ parasite เมื่อดูจากฟิล์ม จากนั้นเชื้อจะเจริญต่อไปโดย มีลักษณะกลมมากขึ้น มีการเพิ่มขึ้นของ malarial pigment ตลอดจนมีการขยายตัวของ vacuole's membrane ทำให้เนื้อที่ภายในเม็ดเลือดแดงเหลือน้อยลง ต่อจากนั้น trophozoite จะมีการแบ่ง nucleus 3-5 ครั้ง โดยที่ cytoplasm ยังไม่มีการแบ่ง ระยะนี้เรียกว่าระยะ schizont หลังจากเสร็จสิ้นการแบ่งตัวของ cytoplasm แล้วจะเจริญต่อไปเป็น merozoite ชุดใหม่ ซึ่งมีขอบเขตแยกจากกันอย่างชัดเจน เรียกระยะ schizont ที่มี merozoite ที่เจริญเต็มที่แล้วอยู่ภายในว่า mature schizont จำนวน merozoite ขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งในการแบ่ง nucleus โดยมีความแตกต่างกันไปตาม species ของเชื้อ โดย mature schizont ของ *P. falciparum* มีจำนวนประมาณ 8-24 ตัว สำหรับ *P. vivax* มีประมาณ 12-24 ตัว ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* มีประมาณ 8-12 ตัว เมื่อถึงระยะนี้เม็ดเลือดแดงจะแตกออก และปลดปล่อย merozoite ชุดใหม่สู่กระแสโลหิตเพื่อเข้าสู่เม็ดเลือดแดงอื่นต่อไป ซึ่งช่วงที่เม็ดเลือดแดงแตกนี้จะเป็นช่วงที่ผู้ติดเชื้อมีอาการไข้ เมื่อเม็ดเลือดแดงที่มี merozoite อยู่ภายในแตกจนหมดแล้ว อาการไข้จะหายไปจนเมื่อถึงเวลาที่มีการปลดปล่อย merozoite ครั้งใหม่ผู้ป่วยจะมีอาการไข้อีกครั้ง วงจรที่เชื้อเริ่มเข้าสู่เม็ดเลือดแดงจนถึงการปลดปล่อย merozoite ออกจากเม็ดเลือดแดงนี้เรียกว่า erythrocytic cycle (Warrell et al., 1990)

ภาพที่ 3 แสดงการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของ merozoite ตั้งแต่ขั้นตอนการเข้าเกาะติดกับเม็ดเลือดแดง จนถึงการปิดบริเวณที่เชื่อมต่อหลังจากผ่านเข้าสู่ภายในเม็ดเลือดแดงแล้ว (Aikawa, 1981)





trophozoite บางส่วนที่ไม่เจริญเป็นระยะ schizont จะเจริญต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศคือ gametocyte ทั้งเพศผู้ และเมีย เพื่อติดต่อกลับเข้าสู่ยุงก้นปล่องที่มากัดผู้ป่วย gametocyte ของเชื้อ *P. falciparum* ในระยะแรก ๆ มักมีรูปร่างยาวรี ต่อมาเมื่อเจริญขึ้นจะมีรูปร่างคล้ายกระสวย และเมื่อเจริญเต็มที่จะมีลักษณะที่โค้งงอเล็กน้อยคล้ายเคียว ส่วน gametocyte ของเชื้อ *P. vivax P. malariae* และ *P. ovale* จะมีรูปร่างกลมตั้งแต่ระยะแรก สำหรับเชื้อ *P. falciparum* ในระยะนี้ gametocyte เพศเมียจะมีรูปร่างผอมกว่า gametocyte เพศผู้ ในส่วนของ cytoplasm ของ gametocyte เพศเมียจะติดสีฟ้าเข้มมากกว่าเมื่อย้อมด้วยสี Romanowsky หรือสียิมซา และ nucleus ของ gametocyte ทั้งสองชนิดจะมีขนาดเล็ก แน่น และติดสีแดงเข้ม โดย nucleus ของ gametocyte เพศผู้ จะมีความกว้าง และมีการกระจายตัวมากกว่า nucleus ของ gametocyte เพศเมีย ซึ่งจากการดูฟิล์มเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถพบระยะ gametocyte ได้เร็วที่สุดที่พบเชื้อในกระแสเลือดประมาณ 8-15 วันหลังการได้รับเชื้อ สำหรับเชื้อ *P. falciparum* ส่วนเชื้อ *P. malariae* พบระยะ gametocyte ได้หลังเวลาผ่านไป 5-23 วัน ส่วนเชื้อ *P. vivax* และ *P. ovale* พบ gametocyte ได้หลังเวลาผ่านไป 5 วัน ซึ่งวงจรชีวิตทั้งหมดตั้งแต่เชื้อเข้าสู่ร่างกายคนจนถึงระยะที่พร้อมจะติดต่อกลับเข้าสู่ยุงก้นปล่องเรียกว่า schizogony (Strickland, 2000)

อาการของโรคมาลาเรีย

หลังการได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อ *P. falciparum* มีระยะฟักตัวประมาณ 8-12 วัน ส่วนเชื้อ *P. vivax* มีระยะฟักตัวนานกว่าเล็กน้อยคือ 10-15 วันซึ่งเท่ากับเชื้อ *P. ovale* และเชื้อ *P. malariae* มีระยะฟักตัวยาวนานที่สุดคือ 15-30 วัน โรคมาลาเรียที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. falciparum* ผู้ป่วยจะมีอาการไข้หนาวสั่นทุกวันซึ่งเป็นชนิดที่มีอันตรายมากที่สุดเพราะสามารถทำให้เสียชีวิตเนื่องจากก่อให้เกิดภาวะมาลาเรียขึ้นสมองได้ นอกจากนี้ยังมีอาการแทรกซ้อนอื่น ๆ อีกเช่น ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะที่เลือดเป็นกรดสูงกว่าปกติ (acidosis) ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) ภาวะน้ำท่วมปอดที่ไม่ได้เกิดจากหัวใจวาย (noncardiac pulmonary edema) ภาวะความดันโลหิตต่ำจนเกิดอาการช็อค (algid malaria) ภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory insufficiency) และภาวะดีซ่าน (jaundice) เป็นต้น (Warrell et al.,1990; Miller et al.,1994; Marsh et al.,1996 ; Imbert et al.,1997; Crawley et al ., 1998) อาการนำก่อนจะมีไข้คือ ปวดศีรษะ รู้สึก

ไม่สบายตัว ปวดตามแขนขา ปวดหลัง เบื่ออาหาร คลื่นไส้ และอาเจียน จากนั้นจึงเริ่มมีอาการไข้ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียที่มีอาการไข้ในระยะแรกจะมีรูปแบบที่ไม่แน่นอน มีไข้ไม่เป็นเวลา อาจมีไข้ทั้งวัน มีไข้วันละหลายครั้ง กินเวลาประมาณ 2-3 วัน เนื่องจากวงจรชีวิตของเชื้อแต่ละรุ่นจะดำเนินไปโดยไม่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน จึงทำให้การคาดเดาอาการของผู้ป่วยจากรูปแบบของการมีไข้ยังกระทำได้ยาก หลังจากนั้นจะเริ่มมีไข้ที่มีระยะเวลาค่อนข้างแน่นอน ตาม species ของเชื้อที่ได้รับดังนี้

P. falciparum	มีไข้ทุก ๆ	36-48	ชั่วโมง แต่ส่วนใหญ่มักมีไข้ได้ทุกวัน
P. vivax	มีไข้ทุก ๆ	48	ชั่วโมง
P. malariae	มีไข้ทุก ๆ	72	ชั่วโมง
P. ovale	มีไข้ทุก ๆ	36	ชั่วโมง

ซึ่งอาการไข้ดังกล่าวเรียกว่า paroxysm สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 ระยะหนาวสั่น (cold stage) มีระยะเวลา 15-60 นาที เริ่มด้วยมีอาการหนาว สั่นเกร็ง อุณหภูมิร่างกายสูงขึ้น ชีพจรเร็ว และเบา ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น ผิวหนังเย็น คลื่นไส้ และอาเจียน

ระยะที่ 2 ระยะที่มีไข้ (hot stage) มีระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง อุณหภูมิร่างกายเพิ่มสูงขึ้น ชีพจรเต้นแรง หน้า และผิวหนังแดง แห้ง คลื่นไส้ อาเจียน กระหายน้ำ กระสับกระส่าย และปวดศีรษะแบบลึกเข้าไปในกระบอกตา

ระยะที่ 3 ระยะเหงื่อออก (sweating stage) มีระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงระยะนี้จะเริ่มมีเหงื่อออก ทั่วร่างกาย อุณหภูมิ ชีพจร และความดันเลือดกลับสู่ภาวะปกติผู้ป่วยจะรู้สึกเพลีย เหนื่อย และหลับไป ระยะนี้ไม่มีไข้

ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย

1. ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (natural immunity)

คือภูมิคุ้มกันที่มีอยู่แล้วแต่กำเนิดได้แก่การมี hemoglobin F ในเม็ดเลือดแดงสูงกว่าปกติ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ได้ไม่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงโดยทางพันธุกรรมเช่น heterozygous haemoglobin S ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ glucose 6 phosphate dehydrogenase และ โรค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

thalassemia เป็นต้น ผู้ที่มีอาการดังกล่าวจะมีอาการของโรคมาลาเรียที่ไม่รุนแรงเนื่องจากเชื้อมาลาเรียเจริญในเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ได้ไม่ดี (Pasvol and Wilson, 1982) หลักฐานที่ชัดเจนอีกอย่างหนึ่งคือในคนที่มีหมู่เลือด Duffy negative (Fy^a-Fy^b) จะไม่เป็นโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *P. vivax* แต่ยังสามารถเป็นโรคมาลาเรียที่เกิดจากมาลาเรียชนิดอื่น ๆ ได้ (Miller et al., 1976)

2. ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากการได้รับเชื้อมาลาเรีย (acquired immunity)

ภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดภายหลังจากการได้รับเชื้อมาลาเรียบ่อย ๆ และเป็นเวลานานหลายปี แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าถึงแม้จะมีภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดขึ้นแต่ก็ไม่สามารถให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในครั้งต่อไปได้ และภูมิคุ้มกันนี้จะลดลงหากไม่ได้รับการกระตุ้นโดยการติดเชื้อมาลาเรียซ้ำอีก ภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะลดลงในภาวะอื่น ๆ ได้อีกด้วยเช่น การตั้งครรภ์ การได้รับยากดภูมิคุ้มกัน การได้รับยาต้านมะเร็ง การปลูกถ่ายอวัยวะ และการถูกตัดม้ามเป็นต้น เช่นในเด็กชาวแอฟริกันที่เกิดอยู่ในถิ่นที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย และเป็นโรคมาลาเรียบ่อย ๆ โดยไม่ได้รับการรักษาให้หายขาดหลังจากอายุเกิน 6 เดือน เมื่อโตเป็นผู้ใหญ่จะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย แต่ยังเป็นโรคมาลาเรียได้เพียงแต่อาการจะไม่รุนแรงเท่ากับครั้งก่อน ๆ หรืออาจไม่แสดงอาการเลยเพราะมีภูมิคุ้มกัน เรียกภาวะนี้ว่า tolerance หรือ asymptomatic parasitemia (Playfair, 1982) ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากการได้รับเชื้อมาลาเรียแบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ

2.1 แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immunity)

ในร่างกายของคนหรือสัตว์ทดลองที่ได้รับเชื้อมาลาเรียพบว่า macrophage phagocyte และ natural killer cell ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียเองและสารบางชนิดเช่น tumor necrosis factor (TNF) ทำให้เซลล์เหล่านี้กำจัดเชื้อมาลาเรียออกไปได้ส่วนหนึ่ง ซึ่งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้มีลักษณะเดียวกันกับการตอบสนองต่อโรคติดเชื้ออื่น ๆ (Brasseur, 1985)

2.2 แบบจำเพาะเจาะจง (specific immunity)

ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อมาลาเรียจะมีระดับ IgG IgM และ IgA สูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย แต่มีเพียง IgG เท่านั้นที่สามารถให้ผลในการต่อต้านเชื้อได้ดีที่สุด ส่วน IgM และ IgA จะมีระดับสูงขึ้นก่อน IgG เล็กน้อยแต่หลังจากนั้นจะลดระดับลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงนี้จะมีความจำเพาะต่อ species ของเชื้อ และจำเพาะต่อระยะของเชื้อที่ได้รับ (species and stage specific) ซึ่งจากการทดลองฉีดวัคซีนที่ทำจากระยะ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์เข้าไปในหนู แล้วทดสอบด้วยการฉีดระยะ sporozoite ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ตามปกติพบว่าหนูไม่เป็นมาลาเรีย แต่เมื่อทดสอบด้วยการฉีดระยะ blood stage พบว่าหนูเป็นโรคมาลาเรีย (Nussenzweig et al., 1969)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าภูมิคุ้มกันทั้งชนิดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและชนิดที่เกิดขึ้นหลังจากการได้รับเชื้อมาลาเรีย ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นทางเลือกใหม่ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อและป้องกันโรคให้มีมากขึ้น ซึ่งก็คือการพัฒนาวัคซีน

วัคซีนป้องกันมาลาเรีย

ในอดีตที่ผ่านมามีการศึกษาเกี่ยวกับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียในบริเวณพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรียที่ไม่รุนแรงแต่ระบาดอย่างสม่ำเสมอ พบว่าจะมีอัตราตายของประชากรด้วยโรคดังกล่าวสูง โดยผู้ที่มีอาการรุนแรง และเสียชีวิตส่วนใหญ่มักจะเป็นทารกแรกเกิด ส่วนเด็กโต และผู้ใหญ่จะมีความรุนแรงของโรคลดน้อยลง ในทางตรงกันข้าม เมื่อทำการศึกษาในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียอย่างรุนแรง โดยศึกษาในทารกที่เกิดมาจากมารดาที่เป็นมาลาเรียขณะตั้งครรภ์ และถ่ายทอดเชื้อนั้นสู่ลูก พบว่าเมื่อตรวจเลือดจากสายสะดือของทารกที่คลอดในช่วงที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียอย่างรุนแรง พบว่ามีทารกจำนวนไม่น้อยมีเชื้ออยู่ในระดับต่ำ ๆ แต่ทารกเหล่านั้นกลับไม่แสดงอาการของการติดเชื้อมาลาเรีย ทั้งนี้เนื่องจากทารกแรกเกิดได้รับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียที่ถ่ายทอดมาจากมารดาซึ่งเป็นมาลาเรียมาสู่ทารกตั้งแต่ยังอยู่ในครรภ์ ภูมิคุ้มกันที่ได้รับจากมารดานี้สามารถให้ผลในการป้องกันเชื้อมาลาเรียไปได้ระยะเวลาหนึ่งประมาณ 3-6 เดือนหลังคลอด หากทารกได้รับเชื้อในช่วงเวลาดังกล่าวมักมีอาการแสดงออกเพียงเล็กน้อย เช่นมีไข้ แต่ไม่พบทารกที่แสดงอาการของโรคมาลาเรียอย่างรุนแรง ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้คล้ายกับการตอบสนองต่อเชื้อมาลาเรียในผู้ใหญ่ที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแล้ว (Strickland, 2000) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า เด็กที่ไม่ได้อาศัยอยู่ในเขตที่มีการระบาดของมาลาเรียอย่างรุนแรง จะไม่ได้รับภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติที่ถ่ายทอดมาจากมารดาจึงมีโอกาสที่จะเสียชีวิตตั้งแต่อายุต่ำกว่า 5 ปีสูงหากเป็นโรคดังกล่าว นอกจากนั้นในกรณีของผู้ใหญ่ ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียที่เกิดขึ้นตามธรรมชาตินั้นเกิดจากการอาศัยอยู่ในเขตปรากฏโรคมาลาเรีย และรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเป็นเวลานาน ๆ และหลาย ๆ ครั้ง ดังนั้นจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวัคซีนคือ การสร้างเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อให้เกิดขึ้น และคงอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน โดยที่ไม่ต้องเป็นโรคหรือได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกาย

การพัฒนาวัคซีนเพื่อต่อต้านเชื้อมาลาเรียได้เริ่มมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1910 เมื่อ Sergent และคณะ ได้ทดลองฉีดเชื้อในระยะ sporozoite เข้าไปในนก เพื่อให้ร่างกายของนกสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียดังกล่าว ซึ่งการพัฒนาวัคซีนส่วนใหญ่ในช่วงเวลานั้นยังเน้นไปที่

ระยะที่เชื้ออยู่ภายนอกเซลล์ได้แก่ sporozoite และ merozoite เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากในปัจจุบันทิศทางในการพัฒนาวัคซีนได้เปลี่ยนมามุ่งเน้นในการทำให้วัคซีนที่ได้นั้นออกฤทธิ์ต่อเชื้อได้หลายระยะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำความรู้ด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) ของเชื้อมาใช้ในการพัฒนาวัคซีนที่จำเพาะต่อเชื้อในระยะต่าง ๆ ทำให้วัคซีนที่ถูกพัฒนาขึ้นมาในปัจจุบันมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้สูง ซึ่งในการพัฒนาวัคซีนนั้นต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับชนิดและโครงสร้างของแอนติเจน ของเชื้อในแต่ละระยะ เพื่อใช้ในการออกแบบวัคซีน

วัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage vaccines)

เป็นวัคซีนที่ออกฤทธิ์เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายยุงแล้ว โดยการทำให้ระยะ gamete เกิดการจับตัวกัน (agglutination) ของ gamete ทั้ง 2 เพศ ไม่ให้เกิดการปฏิสนธิกันได้ ทำให้วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในระยะที่อยู่ในยุงขาดไป เชื้อจึงไม่แพร่กระจายสู่ผู้ที่ถูกยุงกัด (Kaslow et al., 1988) ในปี ค.ศ.1979 มีการทดลองใช้วัคซีนที่ทำจากเชื้อในระยะ gametocyte ในการยับยั้งการสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในระยะมีเพศของสัตว์ปีก และลิง ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อในสัตว์ทดลองทั้ง 2 ชนิดได้ดี (Gwadz et al., 1979) ซึ่งต่อมาได้มีผู้ทำการทดลองเพิ่มเติมกับเชื้อมาลาเรียจากสัตว์ฟันแทะพบว่าให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าวัคซีนชนิดนี้มีคุณสมบัติ stage-specific คือความจำเพาะต่อระยะ gamete เท่านั้น ไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อในระยะอื่น ๆ เมื่อใช้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Mendis & Targett, 1981)

ในส่วนของ *P. falciparum* การพัฒนาวัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อระยะ gametocyte ของเชื้อชนิดนี้ได้มุ่งเน้นไปในด้านการศึกษาเกี่ยวกับ monoclonal antibody ที่ออกฤทธิ์ต่อแอนติเจนซึ่งอยู่บนผิวของ gametocyte เพศผู้ และ gametocyte เพศเมีย (Rener et al., 1980) แต่อย่างไรก็ตามปัญหา และอุปสรรคที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อระยะ sexual stage คือ เทคนิคที่ใช้ในการแยกเชื้อในระยะ gamete นอกจากนั้นการทำให้ระยะ gamete มีความบริสุทธิ์ ยังมีความยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าการแยกเชื้อในระยะอื่น ๆ และเนื่องจากวัคซีนดังกล่าวไม่สามารถป้องกันให้ผู้ที่ได้รับวัคซีนปลอดจากการติดเชื้อได้ เพียงแต่ป้องกันไม่ให้เชื้อมาลาเรียแพร่สู่ผู้อื่นเท่านั้น จึงเรียกวัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อในระยะนี้ว่า transmission blocking

วัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อในระยะก่อนเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (exoerythrocytic stage vaccines)

ระยะเป้าหมายสำหรับวัคซีนชนิดนี้คือระยะ sporozoite ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยผ่านการทำให้หมดความสามารถในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพโดยผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ เช่น การ

ฉายรังสีเอ็กซ์ การใช้ฟอร์มาลิน และการทำให้ sporozoite แตกเป็นต้น (Mulligant et al., 1941) วิธีที่ได้รับความนิยมอย่างสูงวิธีหนึ่งคือ การเพาะเลี้ยงเชื้อในตัวยุง แล้วนำยุงนั้นมาผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ ต่อจากนั้นอีก 17 วันนำยุงมาแยกเฉพาะต่อมน้ำลายซึ่งมีระยะ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีแล้ว นำ sporozoite ที่ได้ดังกล่าวมาฉีดเข้าสัตว์ฟันแทะ ซึ่งผลจากการกระตุ้นดังกล่าวทำให้สัตว์ฟันแทะนั้นสามารถยับยั้งเชื้อในระยะ sporozoite ไม่ให้เจริญต่อไปได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวัคซีนที่ทำจากระยะ sporozoite ที่ผ่านการฉายรังสีแล้วของเชื้อ *P. berghei* โดยได้ทดลองฉีด sporozoite ของเชื้อดังกล่าวในหนูที่โตเต็มที่แล้วจำนวน 3 ครั้ง พบว่าหนูร้อยละ 90 มีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อระยะ sporozoite แต่ภูมิคุ้มกันดังกล่าวอยู่ต่อไปเป็นระยะเวลาเพียง 2 เดือนเท่านั้น หลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Nussenzweig et al., 1972) ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยระยะ sporozoite ในหนูเป็นภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจำเพาะเจาะจงต่อระยะ sporozoite ทำให้ระยะดังกล่าวไม่สามารถเจริญต่อไปเป็นระยะ blood stage ได้ ซึ่งวัคซีนที่ทำจากเชื้อในระยะนี้สามารถให้ผลที่ดีโดยไม่ต้องอาศัย adjuvant แต่อย่างใด แต่เมื่อได้นำวัคซีนดังกล่าวมาทดลองในลิงกลับไม่ให้ผลในการต่อต้านเชื้อ จึงสรุปว่าการกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันในคน และลิงต้องอาศัย sporozoite จำนวนมาก จึงต้องใช้ยุงที่ผ่านการฉายรังสีเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้จำนวนครั้งที่ใช้ในการกระตุ้นก็ต้องมากกว่าการทดลองในหนูเช่นกัน (Rieckmann et al., 1974; Clyde, 1975) ต่อมาได้มีการทดลองฉีดระยะ sporozoite ของเชื้อ *P. falciparum* เข้าไปในอาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ใหญ่จำนวน 5 ราย พบว่าอาสาสมัครจำนวน 3 ราย สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อระยะดังกล่าวของเชื้อ *P. falciparum* ได้เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือนหลังการฉีดเชื้อครั้งแรก แต่ภูมิคุ้มกันดังกล่าวไม่สามารถป้องกันอาสาสมัครจากการติดเชื้อ species อื่นได้ ดังนั้นภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยระยะ sporozoite จึงเป็นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ species (species specific immunity)

ต่อมาเมื่อการศึกษาด้านอณูชีววิทยาของเชื้อมากขึ้นทำให้พบแอนติเจนชนิดหนึ่งซึ่งมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและอยู่บนผิวของ sporozoite เรียกว่า circumsporozoite protein (CSP) เป็นองค์ประกอบ โดยการสังเคราะห์เปปไทด์ของแอนติเจนดังกล่าว ทำให้แอนติเจนที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ในขั้นแรกได้ใช้ CSP ของเชื้อ *P. knowlesi* ขึ้นแล้วฉีดเข้าไปในลิง พบว่าร่างกายของลิงมีการสร้างแอนติบอดีต่อ CSP และสามารถทำลายระยะ sporozoite ได้ (Gysin et al., 1984)

จากการศึกษายีนที่สร้างโปรตีนดังกล่าวในส่วนกลางประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงซ้ำกันเป็นชุด 4 ตัว ซึ่งเป็นบริเวณส่วนของ B-cell epitope ที่สำคัญ ตลอดจนการพบว่าผู้ที่

ติดเชื้อมาลาเรียในธรรมชาติแม้จะมีแอนติบอดีต่อ CSP ในระดับที่สูง แต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้

วัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage vaccines)

อาการแสดงของโรคมาลาเรียตลอดจนพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อมาลาเรียล้วนเกิดจากระยะที่เชื้อมาลาเรียเจริญ และเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดแดงโดยไม่อาศัยเพศ ภายหลังจากระยะ merozoite ออกจากเซลล์ตับหรือออกจากเม็ดเลือดแดงเพื่อลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่แม้จะเป็นช่วงระยะเวลาสั้น ๆ แต่ก็มีโอกาสถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ ดังนั้นระยะ merozoite จึงเป็นระยะเป้าหมายที่สำคัญระยะหนึ่งในการพัฒนาวัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง

การพัฒนาวัคซีนที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงเริ่มขึ้นในปี ค.ศ.1977 โดยเริ่มทดลองในหนู (Cohen et al., 1979) สิ่งที่ฉีดเข้าไปในร่างกายของสัตว์ทดลองเพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมีทั้งเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ภายใน และระยะ merozoite ที่ถูกทำให้หมดความสามารถในการก่อโรคด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การใช้ความร้อน และการทำให้แตก เป็นต้น ซึ่งหนูทดลองสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อระยะ merozoite ได้ ผลที่เกิดขึ้นนี้ชี้ให้เห็นว่า non-living vaccine หรือวัคซีนที่ไม่ได้ทำจากเชื้อก็สามารถให้ผลในการต่อต้านเชื้อในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงได้เช่นกัน นอกจากนี้ได้มีการทดลองนำชิ้นส่วนของเชื้อมาลาเรีย (parasite fraction) ในระยะ merozoite มาฉีดเข้าไปในร่างกายของสัตว์ฟันแทะ พบว่าสัตว์ฟันแทะสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียได้ และเมื่อทำการทดลองในลักษณะเดียวกันในลิงยังพบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นสามารถป้องกันลิงจากเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงได้อีกด้วย การใช้วัคซีนที่ทำจากระยะ merozoite ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นทางเลือกที่มีความเหมาะสมและให้ผลในการป้องกันโรคได้ดี (Long et al,1994)

เมื่อมีการศึกษาอย่างลึกซึ้งเกี่ยวกับกระบวนการเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงของระยะ merozoite พบว่ากระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยหลายขั้นตอนซึ่งต้องอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวตอบรับ (receptor) บนผิวเม็ดเลือดแดงกับโปรตีนบนผิวของ merozoite จากการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของ merozoite พบว่ามีโปรตีนที่มีส่วนสำคัญในการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของระยะ merozoite อยู่หลายชนิด เช่น merozoite surface protein-1 (MSP-1)(Holder et al., 1988) merozoite surface protein-2 (MSP-2)

(Smythe et al., 1988) erythrocyte binding protein-175 (EBP-175) (Camus and Hadley, 1985) และ AMA-1 (Peterson et al., 1989) เป็นต้น โดยเฉพาะ MSP-1 เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการเข้าสู่เม็ดเลือดแดง ในปีค.ศ. 1997 ได้มีการทดลองใช้แอนติบอดีต่อส่วน C-terminus ของโปรตีน MSP-1 เพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ ซึ่งผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของระยะ merozoite ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นยังพบว่า MSP-1 มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี โดยได้มีการทดลองฉีดเปปไทด์ที่สังเคราะห์จาก MSP-1 ของเชื้อ *P. falciparum* เข้าไปในลิง *Aotus* แล้วทดสอบด้วยการฉีดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์เดียวกัน ปรากฏว่าไม่พบเชื้อมาลาเรียในร่างกายสัตว์ทดลองแต่อย่างใด (Siddiqui et al., 1987) และเมื่อทดสอบโดยการฉีดเชื้อต่างสายพันธุ์กัน พบว่าสัตว์ทดลองติดเชื้อมาลาเรีย แต่มีจำนวนเชื้อไม่มาก มีอาการไม่รุนแรง และหายจากโรคเองในที่สุด (Herrera et al., 1990)

Apical membrane antigen-1 (AMA-1)

เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นในระยะ merozoite มีชื่อเดิมว่า pf83 เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุล 83 kDa มีจำนวนกรดอมิโนทั้งสิ้น 622 ตัว หรือประกอบด้วยลำดับคู่เบสในนิวคลีโอไทด์ 1,866 ตัว (Peterson et al., 1989) หลังจากที่โปรตีนชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นแล้ว จะถูกเก็บไว้ใน rhoptry แล้วจึงถูกขนส่งไปทั่วผิวของระยะ merozoite พบมากที่สุดบริเวณ apical end ของระยะดังกล่าว และปรากฏในลักษณะของ integral membrane protein โดยมีส่วน C-terminus ประกอบด้วย hydrophobic transmembrane domain (Peterson et al.,1989) จากการศึกษายีนที่สร้าง AMA-1 ของ *P. falciparum* ที่ได้จากสายพันธุ์ที่ปรับตัวให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และบางสายพันธุ์จากผู้ป่วย เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถแบ่งยีนดังกล่าวเป็นบริเวณโดยใช้ระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (homology) เป็นเกณฑ์ พบว่าบริเวณที่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (conserved block) มี 6 บริเวณ คือบริเวณที่ 1 3 5 7 9 และ 11 บริเวณที่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ปานกลาง (semiconserved block) มี 5 บริเวณ คือบริเวณที่ 2 6 8 10 และ 12 และบริเวณที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง หรือมีความคล้ายคลึงน้อยมี 1 บริเวณ คือบริเวณที่ 4 (Oliveira et al., 1996) ซึ่งแสดงในภาพที่ 5 นอกจากนี้ยังพบว่ากลไกประการหนึ่งที่ทำให้เกิดความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน AMA-1 คือการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม

(intragenic recombination) ระหว่างยีน AMA-1 ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกันซึ่งน่าจะเกิดขึ้นในระหว่างที่เชื้อมาลาเรียสืบพันธุ์แบบใช้เพศในยุงก้นปล่อง (Eisen et al., 1999) จากการเปรียบเทียบข้อมูลได้จากการศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *P. falciparum* ที่ได้จากภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *P. falciparum* ที่เก็บได้จากต่างภูมิภาคกันจะมีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน โดยเชื้อที่ได้จากประเทศในแถบแอฟริกา จะมีความหลากหลายของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าเชื้อที่ได้จากประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเชื้อที่ได้จากประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะมีความหลากหลายของการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าเชื้อจากประเทศในแถบอเมริกาใต้ (Escalante et al., 2001) การแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่ในโครงสร้างของ AMA-1 มักจะเป็นการแทนที่ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปเป็นส่วนใหญ่ (non-synonymous substitution) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เองถือเป็นลักษณะเฉพาะที่ทำให้ AMA-1 แตกต่างจากแอนติเจนชนิดอื่น ๆ (Verra & Hughes, 2000) นอกจากนี้ยังไม่พบกรดอะมิโนที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด ๆ (repetitive amino acid sequence) ในโครงสร้างของ AMA-1 และเนื่องจากสาเหตุที่โครงสร้างของ AMA-1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน cysteine มากถึง 16 ตัว ดังนั้นจึงเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ได้หลายตำแหน่ง ทำให้เกิดโครงสร้างสามมิติของ AMA-1 ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างของ AMA-1 จึงมีความสำคัญของโปรตีนในระยะ merozoite (Crewther et al., 1996)

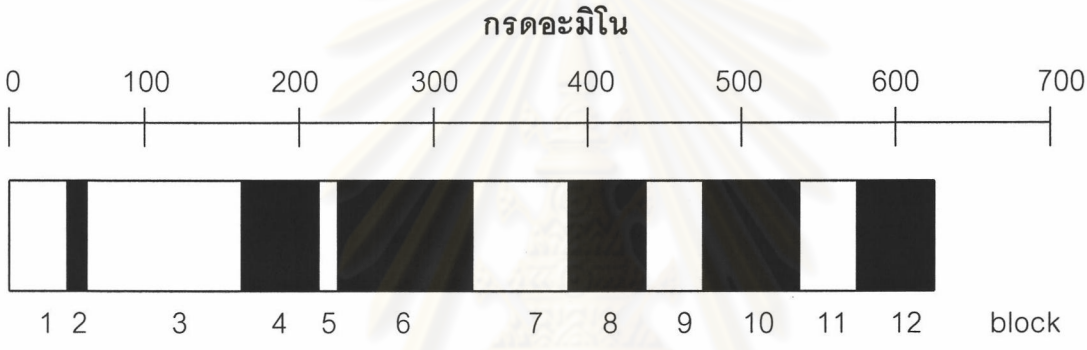
สำหรับหน้าที่ของ AMA-1 นั้นเนื่องจากมีการสะสมของโปรตีนดังกล่าวอยู่เป็นจำนวนมากบริเวณ apical end ของ merozoite ซึ่งเป็นส่วนแรกที่สัมผัสกับผนังของเม็ดเลือดแดงในกระบวนการเข้าสู่เซลของ merozoite (Aikawa et al., 1978) จึงคาดว่าผลที่เกิดจาก AMA-1 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังของเม็ดเลือดแดงในบริเวณจุดสัมผัส ทำให้ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ง่ายขึ้น

สำหรับบทบาทของ AMA-1 ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนนั้น เนื่องจากพบว่าแอนติบอดีต่อ AMA-1 สามารถยับยั้งการลุกลามของระยะ merozoite เข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ (Deans et al., 1982) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อนำแอนติบอดี ต่อ AMA-1 ของเชื้อ *P. chabaudi* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียของหนู เมื่อถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในกระต่าย มาฉีดเข้าไปในหนูปรากฏว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียหรือลดระดับ parasitemia ของเชื้อ *P. chabaudi* ในหนูทุกตัวที่ได้รับการฉีดแอนติบอดีต่อ AMA-1 ซึ่งสร้างขึ้นจากกระต่ายได้ (Crewther et al., 1996) ตลอดจนพบว่า AMA-1 ของ *P. knowlesi* และ *P. fragile* มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคมาลาเรียจากมาลาเรียชนิดดังกล่าวในลิงได้เช่นกัน โดยได้ทดลองฉีด AMA-1 ของ *P. fragile* จำนวน 3 ครั้งเข้าไปในลิง จากนั้นจึงทำให้ลิงติดเชื้อชนิดดังกล่าว

ภาพที่ 4 diagram และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแสดงลักษณะภายในของ merozoite จะเห็นตำแหน่งของ apical end (ลูกศรชี้) ซึ่งมีลักษณะเป็น electron dense ซึ่งเป็นบริเวณมีโปรตีน AMA-1 อยู่เป็นจำนวนมาก (Aikawa et al., 1981)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 5 แสดงบริเวณต่าง ๆ บนยีน AMA-1 ที่มีระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันออกไป บริเวณที่ไม่มีสีคือบริเวณที่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง ส่วนบริเวณที่มีสีทึบคือบริเวณที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่าสามารถยืดเวลาการเพิ่มจำนวนของเชื้อในร่างกายลิงให้ช้าลง ต่อมาจึงฉีดเชื้อ *P. falciparum* เข้าไปในลิงกลุ่มเดิม พบว่าเมื่อทำการตรวจเชื้อในเลือด ไม่ปรากฏการติดเชื้อ *P. falciparum* เลย (Collins et al., 1994) หลังจากนั้นจึงมีผู้ทำการศึกษาโดยแยกแอนติบอดีต่อ AMA-1จากกระต่ายที่ได้รับการฉีด AMA-1ของเชื้อ *P. falciparum* สายพันธุ์ 3D7 และแยกแอนติบอดีต่อ AMA-1 จากคนที่อาศัยอยู่ในปาปัวนิวกินี ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการระบาดของเชื้อ แล้วนำแอนติบอดีทั้งสองชนิดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของคนพบว่าแอนติบอดีต่อ AMA-1 ที่ได้จากทั้งคนและกระต่ายสามารถให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีทั้งต่อสายพันธุ์ 3D7 เอง รวมทั้งต่อสายพันธุ์ D10 และ HB3 ด้วย (Hodder, Crewther and Anders, 2001) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวัคซีนที่ประกอบด้วย เปปไทด์จากระยะต่าง ๆ ของเชื้อเพื่อให้วัคซีนดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกระยะโดยการตัดต่อยีนหรือเปปไทด์ของโปรตีนและใส่เข้าไปใน vaccinia virus ชื่อ NYVAC7 ซึ่งวัคซีนดังกล่าวกำลังอยู่ในขั้นทดลอง phase III หรือ clinical trial วัคซีนชนิดนี้มีเปปไทด์จากโปรตีน 7 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ liver stage antigen-1 (LSA-1) sporozoite surface protein-2 (SSP-2) serine repeat antigen (SERA) 25-kDa sexual-stage antigen (Pfs-25) CSP MSP-1 และ AMA-1 (Tine et al., 1996)

สำหรับกลไกการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียนอกจากเป็นผลของแอนติบอดีโดยตรงแล้ว พบว่า CD4+ T cell มีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมาก เนื่องจาก AMA-1 ยังคงความสามารถในการกระตุ้นให้ร่างกายของหนูสร้างแอนติบอดีต่อต้านเชื้อ *P. chabaudi* ได้แม้จะอยู่ในภาวะที่ขาด CD4+ T cell แต่แอนติบอดีดังกล่าวกลับไม่สามารถให้ผลในการต่อต้านเชื้อได้ แม้ว่าระดับแอนติบอดีในหนูดังกล่าวจะไม่ลดลงก็ตาม แสดงว่ากลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดจาก CD4+ T cell ไม่ได้อาศัยแอนติบอดี (antibody-independent T cell-mediated immunity) อย่างไรก็ตาม พบว่าหนูที่ถูกทำให้ปราศจาก B cell แต่มี CD4+ T cell ไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อดังกล่าวได้ แสดงว่าผลของแอนติบอดีมีส่วนสนับสนุนให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันเสริมกับ CD4+ T cell (Xu et al 2000) การศึกษาองค์ประกอบของ T-cell epitope ใน AMA-1 ของ *P. falciparum* โดยอาศัยการสังเคราะห์เปปไทด์เพื่อกระตุ้นลิมโฟซัยต์ของผู้ที่อาศัยในประเทศเคนยาซึ่งได้รับเชื้อมาลาเรียอย่างสม่ำเสมอพบว่า AMA-1 ประกอบด้วย T-cell epitope หลายตำแหน่ง (Lal et al., 1996) และมีบาง epitope อยู่ในบริเวณที่มีความผันแปรของกรดอะมิโนที่ปรากฏในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคที่สำคัญของการผลิตวัคซีนป้องกันมาลาเรียดังเช่นที่ปรากฏใน T-cell epitope ของโปรตีน CSP ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดบนผิวของระยะ sporozoite จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ T-cell epitope ของ CSP พบว่าการแทนที่ของ

ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างสามมิติ และตำแหน่ง disulfide bond ของ AMA-1 ของ *P. falciparum* วงกลมทึบแสดงตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ (Crewther et al., 1996)

นิวคลีโอไทด์ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงเสมอ (absolute nonsynonymous substitution) ซึ่งเป็นผลมา จากการที่เชื้อได้รับภาวะกดดันจากระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (host immune pressure) (Jongwutiwes et al., 1994) ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงพยายามหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์โดยการเปลี่ยน epitope ที่ไม่กระตุ้นให้เกิดภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

แม้ว่าจะมีผู้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AMA-1 ของ *P. falciparum* แต่การศึกษาดังกล่าวยังจำกัดอยู่เฉพาะในตัวอย่างเชื้อที่ปรับตัวให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยโดยตรงจำนวนไม่มาก (Oliveira et al, 1996; Eisen et al., 1999) ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนกลางของยีนซึ่งพบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่งจึงมีความสำคัญในการทราบขอบเขตของความหลากหลายของยีนดังกล่าวมากขึ้น นอกจากนี้บริเวณส่วนกลางของ AMA-1 ยังประกอบด้วย T-cell epitope ที่สำคัญอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง (Lal et al., 1996) การศึกษาดังกล่าวนอกจากจะเป็นพื้นฐานสำคัญของการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียโดยอาศัย AMA-1 เป็นองค์ประกอบแล้ว ยังจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาพันธุประชากร (population genetics) ของเชื้อมาลาเรียในเขตปรากฏโรคในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีปัญหาในการควบคุมโรคต่อไปในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย