บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งมีองค์ประกอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nucleus membrane) แยกนิวเคลียสออกจากไซโตปลาสซึมอย่างชัดเจน สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรียได้ดังนี้

Kingdom	Protista
Subkingdom	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Class	Sporozoa
Subclass	Coccidia
Order	Eucoccidiida
Suborder	Haemosporina
Family	Plasmodiidae
Genus	Plasmodium

เชื้อมาลาเรียจัดอยู่ใน genus *Plasmodium* ประกอบด้วย species ต่าง ๆ ประมาณ 120 ชนิด ใน primate พบ 22 ชนิด ในหนู ค้างคาวและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบ 19 ชนิดในสัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลานพบมากกว่า 70 ชนิด แต่มีเพียง 4 ชนิดเท่านั้นที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในคนซึ่งได้แก่ *P. falciparum* *P. vivax* *P. malariae* และ *P. ovale* (Spencer, 1986)

วงชีวิต (life cycle)

วงชีวิตของมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วยการเจริญเติบโตแบบอาศัยเพศในยุงก้นปล่องเพศเมีย (sexual development) และการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศในคน (asexual development) ซึ่งประกอบด้วยการเจริญในเซลล์ตับและการเจริญในเม็ดเลือดแดงตามลำดับ

วงชีวิตการเจริญเติบโตในยุง (sporogony)

เมื่อยุงก้นปล่องดูดเลือดคนที่มีเชื้อมาลาเรียระยะแกมมีโตไซต์ที่เจริญเต็มที่ (mature gametocyte) ทั้งเพศผู้ (microgametocyte) และเพศเมีย (macrogametocyte) เข้าไปอยู่ในช่องว่างกระเพาะอาหาร (lumen) ของยุง แกมมีโตไซต์จะเจริญเป็นแกมมีต (gamete) โดยแกมมี โตไซต์เพศผู้จะมีการแบ่งนิวเคลียสเป็น 3 ครั้งและมีการสร้างแฟลกเจลลา (flagella) กระบวนการที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า exflagellation ซึ่งจะได้เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgametes) จำนวน 8 ตัว มีลักษณะยาวรีคล้ายเส้นด้าย มีนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ การเจริญดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ส่วน macrogametocyte จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogramete) เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียแล้วจะเจริญเป็นไซโกต (zygote) มีขนาดประมาณ 6 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลม ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นภายในช่องว่างกระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้นประมาณ 20 นาที ไซโกตจะเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยมีการยืดตัวยาวขึ้นและเจริญเป็นโอโอไคนีต (ookinete) ซึ่งมีขนาดประมาณ 15–19 ไมโครเมตร กว้าง 1 - 2.7 ไมโครเมตร บางส่วนของไซโตปลาสซึมจะเปลี่ยนเป็นเท้าเทียม (pseudopod) เพื่อการเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหารของยุง จากนั้นจะเคลื่อนที่ไซผ่านเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารแล้วเจริญอยู่ที่ผิวด้านนอกกระเพาะอาหารของยุง โดยมีเยื่อบุกระเพาะอาหารด้านนอกปกคลุมอยู่ เรียกระยะนี้ว่า โอโอซีสต์ (oocyst) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมโครเมตร และภายในมีสปอร์โรบลาส (sporoblast) เมื่อโอโอซีสต์เจริญต่อไป สปอร์โรบลาสจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นสปอร์โรซอยต์ (sporozoite) จำนวนประมาณ 1 ถึง 2 พันตัวใน 1 โอโอซีสต์ (Rosenberg and Rungsiwongse, 1991) เมื่อสปอร์โรซอยต์เจริญเต็มที่ ส่วนกลางสปอร์โรบลาสจะมีขนาดเล็กลงและสลายไปในที่สุดแล้วโอโอซีสต์จะแตก ทำให้สปอร์โรซอยต์กระจายไปทั่วลำตัวของยุง รวมทั้งช่องว่างในทรวงอกและต่อมน้ำลาย สปอร์โรซอยต์มีความยาวประมาณ 11 ไมโครเมตรและความกว้าง 1 ไมโครเมตร ซึ่งจะปะปนอยู่ในน้ำลายยุง หลังจากนั้นเมื่อยุงไปกัดคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลังเชื้อมาลาเรียจะเข้าสู่ร่างกายและเจริญต่อไป สำหรับระยะเวลาของวงชีวิตที่เชื้อมาลาเรียเจริญในยุงมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิด โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 8-35 วัน นอกจากนี้ยังขึ้นกับอุณหภูมิของสภาวะแวดล้อมกล่าวคือ อุณหภูมิสูงเชื้อมาลาเรียจะเจริญได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำ แต่ทั้งนี้อุณหภูมิต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสม

วงชีวิตการเจริญเติบโตในคน (schizogony)

ระยะการเจริญเติบโตที่อยู่ในตับ (liver stage)

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคนจะปล่อยเชื้อระยะสปอร์โรซอยต์เข้าสู่กระแสเลือดภายในเวลาประมาณ 30 นาที สปอร์โรซอยต์จะเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นแบบไม่อาศัยเพศ เรียกระยะต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์ตับนี้ว่า exo-erythrocytic stage หรือ hepatic stage หรือ pre-erythrocytic stage ระยะนี้จะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งก่อนที่ไซโตปลาสซึมจะแบ่งตัว เรียกระยะนี้ว่า ระยะไซซอนต์ (schizont) เมื่อระยะไซซอนต์เจริญเต็มที่ไซโตปลาสซึมจะถูกแยกไปอยู่กับแต่ละนิวเคลียส ทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียว เรียกว่า เมอร์โรซอยต์ (merozoite) ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร จำนวนเมอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ตับจากสปอร์โรซอยต์ตัวเดียวจะมีจำนวนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของมาลาเรีย โดย *P. falciparum* มีจำนวนเมอร์โรซอยต์สูงสุดประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัว ในขณะที่ *P. vivax* *P. malariae* และ *P. ovale* มีเมอร์โรซอยต์ประมาณ 10,000 ถึง 15,000 ตัว สำหรับระยะเวลาในการเจริญของระยะสปอร์โรซอยต์จนถึงเป็นระยะเมอร์โรซอยต์ใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อมาลาเรียเช่นกันกล่าวคือ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 5.5 ถึง 7 วัน ส่วน *P. vivax* ใช้เวลาประมาณ 8 วัน สำหรับ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 9 วัน และ *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 14 ถึง 15 วัน (Spencer, 1986)

สปอร์โรซอยต์ของ *P. vivax* และ *P. ovale* เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับ นอกจากจะมีการเจริญเติบโตดังกล่าวแล้วมีบางส่วนที่เข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการหยุดพักการเจริญชั่วขณะและสามารถกลับมาเจริญต่อไปเป็นระยะต่าง ๆ ดังกล่าวได้อีก ซึ่งจะใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย โดยอาจใช้เวลายาวนานเพียงไม่กี่เดือนหรืออาจจะนานเป็นปี ซึ่งระยะดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดไข้กลับ (relapse) เรียกระยะที่เชื้อมาลาเรียหยุดการเจริญเติบโตในตับนี้ว่า ระยะ hypnozoite (Krotoski et al., 1980; Krotoski et al., 1982)

ระยะการเจริญเติบโตที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage)

ระยะการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงของคนเรียกว่า asexual erythrocytic stage หลังจากที่เมอร์โรซอยต์แตกออกจากเซลล์ตับจะออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ในกระแสเลือดในระยะเวลาเพียงชั่วขณะแล้วจะบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดง โดยอยู่ในช่องว่างภายในเม็ดเลือดแดงที่เรียกว่า parasitophorous vacuole (Aikawa et al., 1978) และจะเจริญเติบโตเป็นระยะต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ เมอร์โรซอยต์ในเม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างคล้ายวงแหวน ซึ่งมีไซโตปลาสซึมเป็นเรือนแหวนและนิวเคลียสเป็นหัวแหวนเรียก

ระยะนี้ว่า ระยะวงแหวน (ring form หรือ early trophozoite) เมื่อเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตต่อไป ไซโตปลาสซึมจะมีการขยายตัวออกแต่ยังไม่มีการแบ่งตัว ทำให้มีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน อาจพบลักษณะคล้ายเท้าเทียมและส่วนของ vacuole มีขนาดเล็กลง เรียกระยะนี้ว่า ระยะโทรโฟซอยต์ที่กำลังเจริญเติบโต (growing trophozoite) โดย *P. vivax* จะมีลักษณะรูปร่างคล้ายอะมีบา (amoeboid form) และ *P. malariae* จะมีลักษณะรูปร่างคล้ายแถบคาด (band form) ในระยะนี้เชื้อที่กำลังเจริญเติบโตจะอาศัยสารต่าง ๆ ในเม็ดเลือดแดงเป็นหลัก โดยส่วนใหญ่อาศัยฮีโมโกลบินที่อยู่ในไซโตปลาสซึมของเม็ดเลือดแดงเป็นอาหารฮีโมโกลบินจะถูกย่อยสลายเป็นฮีม (heme) และโกลบิน (globin) แต่เชื้อมาลาเรียไม่สามารถย่อยฮีมให้สมบูรณ์ โดยสิ้นสุดการย่อยสลายฮีมให้เป็น ferriprotoporphyrin IX ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นมาลาเรียจึงมีกระบวนการกำจัดสารดังกล่าวในรูปกากอาหาร ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลถึงสีดำกระจายอยู่ในไซโตปลาสซึมของเชื้อ เรียกว่า hemozoin หรือ malarial pigment ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของฮีมและไม่มีพิษ ในระยะโทรโฟซอยต์นี้มาลาเรียจะปลดปล่อยโปรตีนหลายชนิดสู่เม็ดเลือดแดง อาจจะอยู่ในรูปของ caveola–vesicle complex ซึ่งสามารถพบได้ในไซโตปลาสซึมของเม็ดเลือดแดงโดยอยู่ติดกับด้านในของเซลล์เม็มเบรน (Aikawa et al., 1986) เมื่อย้อมด้วยสียิมซาและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นจุดสีชมพู มีลักษณะรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของมาลาเรีย โดยที่ *P. falciparum* จะพบ Maurer's dots มีลักษณะรูปร่างเป็นจุดใหญ่หรือแท่งสั้น ๆ ส่วน *P. vivax* และ *P. ovale* จะพบ Schuffner's dost มีรูปร่างเป็นจุดเล็ก ๆ ขนาดที่เท่ากันกระจายทั่วไปและ *P. malariae* จะพบ Ziemann's dots เห็นเป็นจุดละเอียดกระจายทั่วไป

เมื่อระยะโทรโฟซอยต์เจริญเติบโตเต็มที่ นิวเคลียสจะเกิดการแบ่งตัวหลาย ๆ ครั้งภายในไซโตปลาสซึมเดียวกันทำให้มีหลายนิวเคลียส เรียกระยะนี้ว่า ไซซอนต์ระยะแรก (early schizont) และเมื่อไซซอนต์เจริญเต็มที่จะมีการแบ่งไซโตปลาสซึมทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียว การแบ่งตัวนี้เรียกว่า ไซซอนต์ระยะหลัง (late schizont) และภายในประกอบด้วยเมอร์โรซอยต์ (merozoite) ในช่วงนี้ malarial pigment จะถูกกำจัดออกนอกเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งจะกระจายไปตามกระแสโลหิตและถูกจับกินโดย phagocyte เช่น Kupffer's cell ในตับ เป็นต้น จำนวนเมอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นภายในเม็ดเลือดแดงจะมีจำนวนแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของมาลาเรีย โดย *P. falciparum* มีจำนวนเมอร์โรซอยต์ประมาณ 8 ถึง 30 เมอร์โรซอยต์ ส่วน *P. vivax* มีประมาณ 12 ถึง 24 เมอร์โรซอยต์ สำหรับ *P. malariae* และ *P. ovale* มีประมาณ 6 ถึง 12 เมอร์โรซอยต์ เมื่อเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) เมอร์โรซอยต์ในไซซอนต์ระยะหลังจะออกมาอยู่ในกระแสเลือดและเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ แล้วจะเจริญเติบโตต่อไปเป็นวงจรลักษณะเช่นนี้ซ้ำ ๆ กัน สำหรับเมอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดมักจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่มีอายุต่างกัน โดยที่เมอร์โรซอยต์ของ *P. vivax* และ *P. ovale* มักจะเข้าสู่

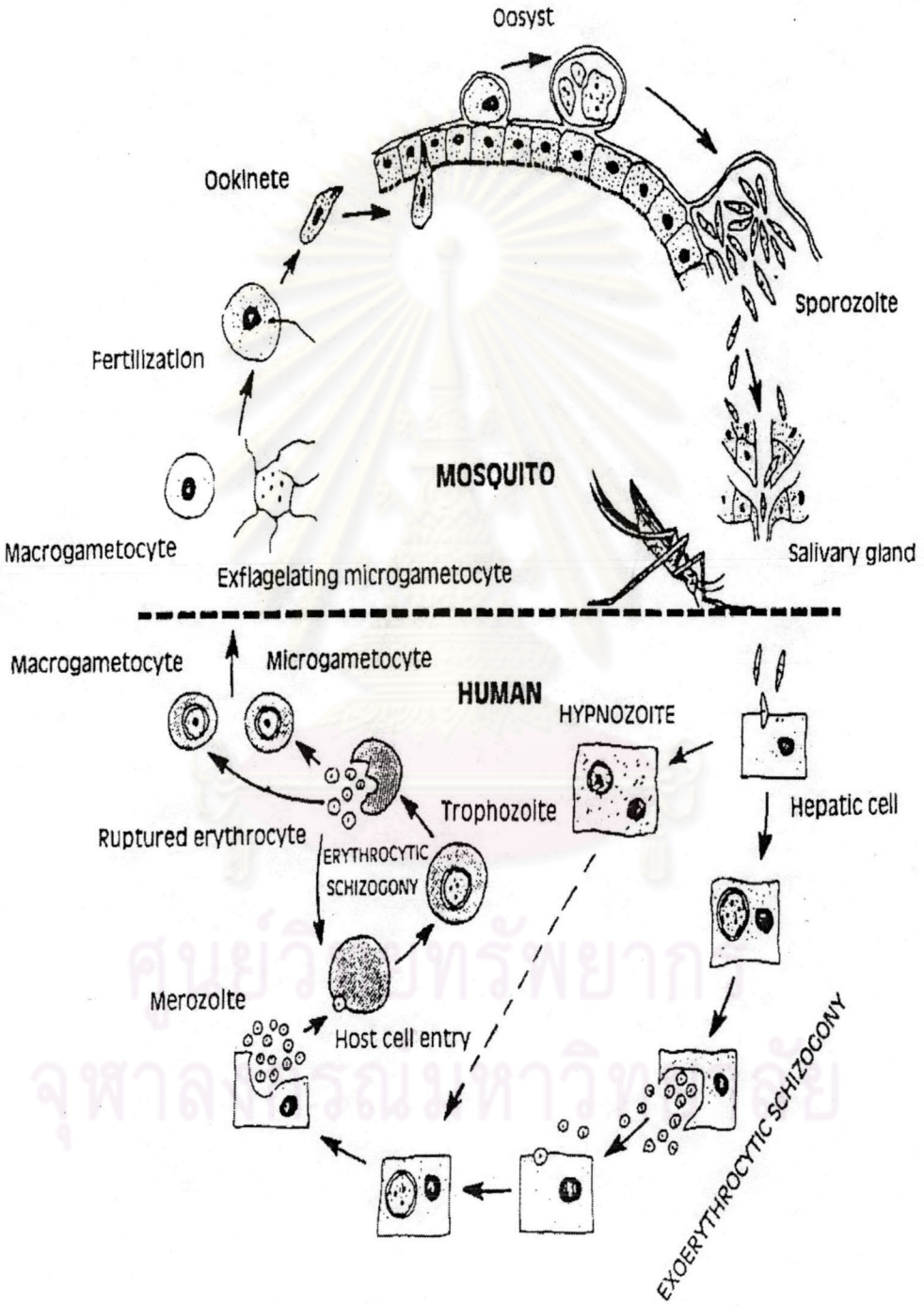
เม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย (reticulocyte) ส่วนเมอร์โรซอยต์ของ *P. malariae* มักจะเข้าเม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก สำหรับเมอร์โรซอยต์ของ *P. falciparum* สามารถเข้าสู่เม็ดเลือดแดงทั้งที่มีอายุมากหรือน้อยได้ ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ระยะวงแหวนจนถึงระยะเมอร์โรซอยต์จะแตกต่างกัน กล่าวคือ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 36 ถึง 48 ชั่วโมง *P. vivax* และ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ส่วน *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ช่วงเวลาที่เมอร์โรซอยต์แตกออกจากเม็ดเลือดแดงจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการแสดงของโรคในผู้ป่วยมาลาเรีย โดยทำให้เกิดมีอาการไข้หนาวสั่น

เมื่อเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงและเจริญเติบโตต่อไปหลาย ๆ รอบ จะมีเมอร์โรซอยต์บางตัวไม่เข้าสู่วงจรการเจริญเติบโตแบ่งตัว แต่จะเจริญเป็นระยะแกมมีโตไซต์ ซึ่งประกอบด้วยแกมมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมีย รูปร่างลักษณะของแกมมีโตไซต์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันไป กล่าวคือแกมมีโตไซต์ของ *P. falciparum* มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) แกมมีโตไซต์เพศผู้มีลักษณะอ้วนและสั้นกว่าแกมมีโตไซต์เพศเมีย ในขณะที่แกมมีโตไซต์ของ *P. vivax* *P. malariae* และ *P. ovale* จะมีรูปร่างกลมรี (oval shape) เมื่อย้อมสียิมซาพบว่าแกมมีโตไซต์เพศเมียจะมีขนาดใหญ่ติดสีเข้ม ส่วนแกมมีโตไซต์เพศผู้มีขนาดเล็กและติดสีอ่อนกว่า เนื่องจากจำนวนไรโบโซมของแกมมีโตไซต์เพศเมียมีมากกว่า สำหรับระยะเวลาที่แกมมีโตไซต์เริ่มปรากฏในกระแสเลือดนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อมาลาเรียเช่นกันกล่าวคือ *P. falciparum* เริ่มพบได้ประมาณวันที่ 8 ถึง 15 ส่วน *P. vivax* และ *P. ovale* พบประมาณวันที่ 5 ถึง 10 และ *P. malariae* พบได้ประมาณวันที่ 5 ถึง 23 หลังจากที่ยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อระยะแกมมีโตไซต์เข้าไป เชื้อมาลาเรียจะเจริญเติบโตในกระเพาะอาหารของยุงต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 1

การกระจายทางภูมิศาสตร์

การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งทางเศรษฐกิจ สังคม และลักษณะทางภูมิศาสตร์ การแพร่กระจายของเชื้อพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและเขตอบอุ่นประมาณ 90 ประเทศ พบการกระจายของโรคมากกว่าบริเวณอื่น ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งในแต่ละปีพบผู้ติดเชื้อมาลาเรีย ประมาณ 200 ล้าน ถึง 500 ล้านคน มีผู้ที่เสียชีวิตจากโรคมาลาเรียประมาณ 1.5 ล้าน ถึง 2.7 ล้านคนและประเทศในทวีปอัฟริกามีผู้ติดเชื้อมาลาเรียสูงมากที่สุด โดยพบอัตราการติดเชื้อสูงมากกว่าร้อยละ 50 ของประชากรทั้งประเทศ (WHO, 1997)

รูปที่ 1 แผนภาพวงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย แสดงวงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยในยุงก้นปล่องเพศเมียและวงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในคน ซึ่งประกอบด้วยการเจริญในเซลล์ตับและการเจริญในเม็ดเลือดแดง (Fujioka and Aikawa, 1999)



สำหรับการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดในพื้นที่ต่าง ๆ พบว่าเชื้อมาลาเรียที่เป็นสาเหตุของโรคส่วนใหญ่เกิดจาก *P. falciparum* และ *P. vivax* โดย *P. falciparum* พบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่นในทวีปอัฟริกา อเมริกาและเอเชีย ส่วน *P. vivax* พบมากในประเทศแถบลาตินอเมริกา จีน ตุรกี และอินเดีย แต่ในทวีปอัฟริกาตะวันตก จะพบผู้ติดเชื้อชนิดนี้น้อยมาก เนื่องจากการติดเชื้อ *P. vivax* เกี่ยวข้องกับ Duffy บนผิวเม็ดเลือดแดง (Chaudhuri et al., 1994) สำหรับ *P. malariae* พบการแพร่กระจายได้ทั่วไปแม้จะมีอุบัติการพบเชื้อต่ำและ *P. ovale* พบได้น้อยเช่นกันแต่มักพบมากในทวีปอัฟริกามากกว่าบริเวณอื่น

สำหรับสถานการณ์มาลาเรียในประเทศไทย พบผู้ป่วยมาลาเรียในบางพื้นที่ โดยเฉพาะจังหวัดที่ติดกับชายแดนของประเทศเมียนมาร์ ลาว มาเลเซีย และกัมพูชา จังหวัดที่พบผู้ป่วยมาลาเรียสูงสุด 10 อันดับแรกได้แก่ จังหวัดตาก สุราษฎร์ธานี กาญจนบุรี ยะลา จันทบุรี แม่ฮ่องสอน นครศรีธรรมราช กระบี่ ประจวบคีรีขันธ์และสระแก้ว พบผู้ป่วยในปี พ.ศ. 2541 จำนวน 86,973 ราย คิดเป็นเป็นร้อยละ 69.57 ของผู้ป่วยมาลาเรียทั้งประเทศ นอกจากนี้ยังพบว่ามี 14 จังหวัดที่ปลอดเชื้อมาลาเรียได้แก่ ปทุมธานี กรุงเทพมหานคร นนทบุรี อ่างทอง พิจิตร พระนครศรีอยุธยา สิงห์บุรี นครปฐม สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชัยนาท มหาสารคาม และภูเก็ต (กองมาลาเรีย , 2542)

ยุงพาหะนำเชื้อมาลาเรีย

ยุงพาหะที่สำคัญของเชื้อมาลาเรียคือ ยุงก้นปล่องเพศเมีย ในประเทศไทยมียุงอยู่ประมาณ 490 ชนิดเป็นยุงก้นปล่องประมาณ 72 ชนิด จากการศึกษาโดยการตรวจต่อมน้ำลายยุงและวิธี ELISA เพื่อตรวจหาสปอร์โรซอยต์ พบว่ายุงก้นปล่องหลายชนิดเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรียสู่คน ยุงพาหะที่สำคัญเช่น *Anopheles dirus* *Anopheles minimus* และ *Anopheles maculatus* เป็นต้น ยุงในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่เชื้อมาลาเรียในพื้นที่ที่มีภูมิประเทศเป็นป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้ ปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการแพร่เชื้อมาลาเรียในธรรมชาติได้แก่ การแพร่กระจายชนิดของยุง นิสัยการกัด อายุขัยของยุงและความหนาแน่นในแต่ละฤดูกาล

ชนิดของยุงพาหะนำเชื้อมาลาเรียที่พบได้ในประเทศไทย (จันทชุม, 2534) ได้แก่

1. *An. dirus* เป็นยุงพาหะที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการแพร่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทย พบได้ทั่วไปในท้องที่ป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้ ชอบเพาะพันธุ์ในแอ่งน้ำขังในบริเวณที่มีร่มเงา ลักษณะน้ำใสและมีใบไม้ทับถม จะออกหา

รูปที่ 2 แสดงแผนที่เขตปรากฏโรคมาลาเรีย โดยในบริเวณพื้นที่ระบายสีดำแสดงเขตปรากฏโรคมาลาเรีย (WHO, 1997)

อาหารในช่วงเวลา 18.00 น. ถึง 04.00 น. ยุงชนิดนี้สามารถแพร่เชื้อทั้ง *P. falciparum* และ *P. vivax* ได้ดีและเชื่อว่ามีความเกี่ยวข้องกับการแพร่เชื้อ *P. falciparum* ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน

2. *An. minimus* เป็นยุงพาหะที่มีความสำคัญเช่นเดียวกับชนิดแรกพบได้มากตามบริเวณชายป่าเชิงเขา ชอบเพาะพันธุ์ตามลำธารน้ำใส ไหลช้า มีแสงแดดส่องถึง อาจพบตามน้ำพุ น้ำซับ พบมากตอนปลายฤดูฝน ออกหาอาหารในช่วงเวลา 18.00 น. ถึง 22.00 น.
3. *An. maculatus* เป็นยุงพาหะที่พบได้ทั่วประเทศ แต่พบมากในพื้นที่ภาคใต้ สามารถแหล่งเพาะพันธุ์ได้ในแอ่งน้ำขัง น้ำไหลใสสะอาด ทั้งป่าทึบและป่าโปร่ง ลำธารมีต้นไม้ปกคลุมริมฝั่งมีแสงแดดส่องถึง ออกหาอาหารตั้งแต่เวลา 18.00 น. ถึง 21.00 น.
4. *An. sundaicus* เป็นยุงพาหะอยู่ในแถบชายทะเล โดยเฉพาะบริเวณฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย ตลอดจนเกาะต่าง ๆ แหล่งเพาะพันธุ์ในน้ำกร่อยใกล้ทะเล มีแสงแดดส่องถึง
5. *An. aconitus* เป็นยุงพาหะที่พบได้เกือบทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ราบลุ่ม เพาะพันธุ์ตามร่องสวน น้ำในนาข้าว หลุมบ่อที่มีน้ำขังและลำธารที่มีน้ำใสไหลสะอาดมีพืชน้ำขึ้น

อาการแสดงของโรคมาลาเรีย

อาการของโรคมาลาเรียที่สำคัญ คือ การมีไข้หนาวสั่น ซึ่งมักแสดงอาการเป็นช่วงระยะค่อนข้างสม่ำเสมอ ซึ่งประกอบด้วย 3 ระยะ ได้แก่

1. ระยะหนาวสั่น (cold stage) ผู้ป่วยมีอุณหภูมิร่างกายลดลง มีอาการหนาวสั่นนานประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง
2. ระยะไข้ตัวร้อน (hot stage) มีไข้สูง เป็นเวลาประมาณ 1-4 ชั่วโมง
3. ระยะเหงื่อออก (sweating stage) ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่มีอาการไข้ มีเหงื่อออก ผู้ป่วยมักจะอ่อนเพลียและมักจะนอนพักในระยะนี้

การเกิดอาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ กันไป โดยเว้นช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งเรียกว่า paroxysm ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับระยะที่เมอร์โรซอยต์แตกตัวออกจากเม็ดเลือดแดง (Warrell et al., 1990) ดังนั้นเมื่อครบรอบการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง

แล้วจะทำให้มีอาการไข้หนาวสั่นเกิดขึ้น โดยที่เชื้อชนิด *P. falciparum* จะทำให้เกิดอาการไข้ทุก ๆ 36 ถึง 48 ชั่วโมง *P. vivax* และ *P. ovale* ทำให้เกิดอาการไข้ทุก ๆ 48 ชั่วโมงหรือมีไข้วันเว้นวัน ส่วน *P. malariae* จะทำให้เกิดอาการไข้ทุก ๆ 72 ชั่วโมงหรือมีไข้วันเว้นสองวัน เชื่อว่าอาการที่เกิดขึ้นมีสาเหตุจากการปลดปล่อยสารพิษของเชื้อมาลาเรียกระตุ้นให้ macrophage หลั่ง tumor necrosis factor-α (TNE-α) และ interleukin

ถึงแม้ว่าเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ทำให้เกิดอาการไข้หนาวสั่นคล้ายกัน แต่เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทำให้เกิดพยาธิสภาพและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงมากที่สุดและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ สำหรับอาการแทรกซ้อนที่พบได้แก่ ภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะดีซ่าน (jaundice) ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) ภาวะน้ำท่วมปอดที่ไม่ได้เกิดจากหัวใจวาย (noncardiac pulmonary edema) ภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory insufficiency) ภาวะความดันโลหิตต่ำจนเกิดอาการช็อค (algid malaria) ภาวะที่เลือดเป็นกรดสูงกว่าปกติ (acidosis) เป็นต้น (Warrell et al.,1990; Miller et al.,1994; Marsh et al.,1996 ; Imbert et al.,1997; Crawley et al ., 1998)

อย่างไรก็ตามหลังจากที่อาการไข้มาลาเรียหายไปแล้ว แต่ถ้ายังมีเชื้อมาลาเรียอยู่ในร่างกายโดยอาจมีระดับที่ต่ำเกินกว่าจะตรวจพบได้หรือมีเชื้อหลบซ่อนอยู่ในเซลล์ตับจะทำให้มีโอกาสที่จะกลับมาเป็นไข้ได้อีก ถึงแม้ไม่ได้รับเชื้อมาลาเรียใหม่ก็ตาม การเกิดอาการไข้กลับแท้ (true relapse) เกิดจากเชื้อมาลาเรียมีระยะพักตัวในตับหรือระยะ hypnozoite และเชื้อสามารถจะออกสู่กระแสเลือดได้อีกครั้ง ไข้กลับชนิดนี้สามารถพบได้ใน *P. vivax* และ *P. ovale* สำหรับไข้กลับชนิด recrudescence เกิดจากมีเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดในระดับที่ต่ำกว่าจะตรวจพบได้จากการตรวจฟิล์มเลือด ไข้กลับชนิดนี้สามารถพบได้ในเชื้อมาลาเรียทุกชนิดแต่มักพบในกรณีที่ติดเชื้อ *P. falciparum* ที่มีการดื้อต่อยาที่ใช้รักษา (Etting et al., 1989)

พันธุกรรมของเชื้อมาลาเรีย

สายวิวัฒนาการ

การศึกษาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในระยะแรกมีการจัดสายวิวัฒนาการ genus *Plasmodium* โดยอาศัยหลักเกณฑ์ทางด้านชีววิทยาสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์กับโฮสต์ ในการศึกษาดังกล่าวสามารถที่จะแสดงถึงความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการได้ในระดับหนึ่ง ต่อมาการศึกษาวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล (molecular evolution) โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อมาลาเรีย

และเปรียบเทียบระหว่างแต่ละชนิด เช่นจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) พบว่า *P. falciparum* มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับเชื้อมาลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในนกมากกว่าชนิดอื่น ๆ (Waters et al., 1991; Waters et al., 1993) แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาของการแยกสายวิวัฒนาการ (divergence) ของ *P. falciparum* ออกจากเชื้อมาลาเรียของนกมีความแตกต่างกันมากกว่าหลายสิบล้านปี (Ayala and Fitch, 1997) นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ SSU rRNA และ circumsporozoite protein (CSP) จากเชื้อมาลาเรียหลายชนิด พบว่าสายวิวัฒนาการของ *P. falciparum* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อมาลาเรียที่เกิดโรคในลิงซิมเปนซีคือ *P. reichenowi* โดยมีระยะเวลาของการแยกสายวิวัฒนาการแตกต่างกันประมาณ 8-12 ล้านปี สำหรับ *P. vivax* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในลิงได้แก่ *P. simium* *P. fragile* *P. knowlesi* และ *P. cynomolgi* ส่วน *P. malariae* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. brasilianum* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในลิง (Escalante and Ayala, 1994; Escalante and Ayala, 1995; Escalante et al., 1995; Ayala and Rich, 2000; Rich and Ayala, 2000)

จากการศึกษาดังกล่าวได้แสดงความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดในคน พบว่าในแต่ละชนิดมีอายุสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน โดย *P. vivax* และ *P. malariae* มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันมากกว่า *P. falciparum* สำหรับ *P. ovale* แม้ว่าจะมีต้นกำเนิดของสายวิวัฒนาการแตกต่างจากทั้ง 3 ชนิด แต่มีระยะเวลาของวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับ *P. vivax* มากกว่า *P. falciparum* และ *P. malariae* สำหรับ *P. falciparum* มีช่วงอายุสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *P. reichenowi* มากกว่าสายพันธุ์อื่น (Escalante and Ayala, 1994; Escalante and Ayala, 1995; Qari et al., 1996)

โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอ

จีโนมของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ A+T สูงถึงร้อยละ 70 ถึง 80 สำหรับ *P. falciparum* มีองค์ประกอบ A+T อยู่มากถึงร้อยละ 82 (Goman et al., 1982; Pollack et al., 1982; McCutchan et al., 1984) เมื่อเปรียบเทียบ A+T ที่เป็นองค์ประกอบดีเอ็นเอของ *Escherichai coli* *Mycobacterium tuberculosis* และคน พบว่ามี A+T อยู่ประมาณร้อยละ 50 67 และ 37 ตามลำดับ โดยองค์ประกอบของ A+T พบได้มากในบริเวณที่ไม่ได้สร้างโปรตีน (noncoding region) และในส่วน intron ดังนั้นคุณลักษณะดังกล่าวอาจแสดงให้ทราบว่าบริเวณใดเป็นบริเวณที่มีการสร้างโปรตีนและยังมีผลต่อการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายใน (restriction endonucleases) ตัดดีเอ็นเอของมาลาเรียได้แตกต่างจากดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่น

การศึกษาโครโมโซมของเชื้อมาลาเรีย โดยใช้เทคนิคการแยกโดยใช้สนามไฟฟ้าเป็นห้วง (pulsed field gel electrophoresis; PFGE) พบว่าเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ประกอบด้วย 14 โครโมโซม และการวัดขนาดจีโนมของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และ *P. berghei* ด้วยวิธี cytofluorimetry, reassociation kinetics และ purification yield pluse field electrophoresis พบว่ามีขนาดจีโนมประมาณ 2-4 x 10^7 bp ต่อจีโนม haploid (Weber, 1988) โดยแต่ละโครโมโซมมีขนาดที่แตกต่างกันและโครโมโซมเดียวกันในสายพันธุ์ที่ต่างกันก็จะมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 800 ถึง 3500 kb สำหรับโครโมโซมในสายพันธุ์เดียวกัน ถึงแม้ว่าระยะการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันแต่จำนวนโครโมโซมมีขนาดที่เท่ากัน โดยจำนวนโครโมโซมในเกือบทุกระยะของการเจริญเติบโตส่วนใหญ่จะมีเพียงชุดเดียว (haploid) ยกเว้นระยะที่มีการเจริญเติบโตในยุง ซึ่งเป็นระยะที่มีการปฏิสนธิและเจริญไปเป็น ookinete โดยเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ (Goman et al., 1982; Prensier and Slomianny, 1986; Kemp et al., 1987; Wellems et al., 1987; Triglia et al., 1992)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างแอนติเจนต่าง ๆ พบว่าส่วนใหญ่มีองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกันเป็นชุด ๆ (tandem DNA repeat) โดยองค์ประกอบและจำนวนนิวคลีโอไทด์ก็จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ เช่นลักษณะโครงสร้างในบริเวณปลายสุดของโครโมโซมทั้ง 2 ข้าง (telomere) มีองค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกันเป็นชุด ๆ ติดต่อกัน ประกอบด้วย GGG TT (T/C) A หรือเรียกว่า G-rich tandem repeats (Corcoran et al., 1986; Vernick and McCutchan, 1988; Dolan et al., 1993; Pace et al., 1995) ซึ่งเชื่อว่าบริเวณดังกล่าวมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในขณะที่เซลล์แบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiotic recombination) ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเรียงซ้ำกันจึงมีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงมากกว่าบริเวณที่ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกัน (Corcoran et al., 1988) สันนิษฐานว่าบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของเชื้อมาลาเรียอาจมีส่วนในการสร้างแอนติเจนที่สามารถหลีกเลี่ยงการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ทำให้เชื้อมาลาเรียไม่ถูกทำลายจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวมักกระตุ้น B lymphocyte โดยไม่จำเป็นต้องผ่าน T lymphocyte

วัคซีนป้องกันมาลาเรีย

การประสบปัญหาในการควบคุมโรคมาลาเรียจากการใช้ยาฆ่าแมลงเพื่อกำจัดยุงพาหะและการใช้ยารักษาโรค พบว่ายุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะนำโรคเกิดการดื้อฆ่าแมลงและเชื้อมาลาเรียมีการดื้อต่อยาที่ใช้รักษาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*

เกิดการดื้อยามากกว่าเชื้อมาลาเรียชนิดอื่น (Wernsdorfer et al., 1991) ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพ ถือได้ว่าเป็นมาตรการที่มีบทบาทมากที่สุดประการหนึ่ง

การศึกษาชีววิทยาของเชื้อมาลาเรียซึ่งมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนและประกอบด้วยแอนติเจนที่มีความหลากหลาย ดังนั้นบทบาทวัคซีนป้องกันมาลาเรียในวงจรชีวิตมาลาเรียระยะใดระยะหนึ่งต้องเกิดประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อเจริญเป็นระยะอื่นต่อไป ซึ่งแอนติเจนที่ปรากฏในระยะอื่น ๆ ก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน อาจทำให้วัคซีนไม่เกิดผลเช่น การศึกษาการใช้วัคซีนป้องกันมาลาเรียในระยะสปอร์โรซอยต์ สามารถป้องกันการติดเชื้อในระยะสปอร์โรซอยต์ได้ แต่ไม่สามารถลดการติดเชื้อในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของคนได้ (Nussenzweig and Nussenzweig, 1989)

ในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดมาลาเรีย (endemic area) โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีอัตราการแพร่เชื้อที่สูง (hyperendemic area) พบว่ามีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ แต่ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ เช่น ประเทศอัฟริกาพบอัตราการเสียชีวิตเนื่องจากสาเหตุการเจ็บป่วยด้วยโรคมาลาเรียในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 5 ปีมากกว่าผู้ใหญ่ เนื่องจากว่าผู้ใหญ่มีภูมิต้านทานเกิดขึ้นจากการติดเชื้อในธรรมชาติ โดยภูมิต้านทานนี้มักมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้บางส่วน (partial protection) และอยู่ได้ในระยะเวลาสั้น ๆ ดังนั้นในกลุ่มประชากรดังกล่าวจึงจำเป็นที่จะต้องได้รับเชื้อต่อเนื่องกันหลาย ๆ ครั้ง จึงจะสามารถมีภูมิต้านทานมาลาเรียได้ เพราะฉะนั้นการพัฒนาค้นคว้าวัคซีนที่มีประสิทธิภาพจึงมุ่งหวังที่จะทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการติดเชื้อในธรรมชาติ รวมทั้งระยะเวลาที่ภูมิคุ้มกันคงอยู่ได้ในระยะเวลาที่ยาวนานและสามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (complete protection) (Nussenzweig and Long, 1994)

การแสวงหาแอนติเจนที่น่าจะมีคุณสมบัติในการนำมาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรีย จากการศึกษาโปรตีนหลายชนิดในระยะต่าง ๆ พบว่าในระยะที่เชื้อมาลาเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงของคนเป็นระยะที่สำคัญมากที่สุดระยะหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ (Berzins and Anders, 1999)

1. **โปรตีนที่ปรากฏในเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียอยู่ภายใน**

<u>โปรตีนที่ปรากฏบนผิวเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ</u> ประกอบด้วย erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) ขนาดประมาณ 200-400 kDa (Baruch et al., 1996) pf332 ขนาดประมาณ 750 kDa (Wiesner et al., 1998) the sparagine and aspartate–rich protein 1 (PfAARP1) ขนาดประมาณ 700 kDa (Barale et al., 1997) rosettins มีขนาดประมาณ 22 kDa และ 28 kDa เชื่อว่าโปรตีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับ endothelium ของ

หลอดเลือดดำขนาดเล็ก (endothelial adherence) และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการที่ทำให้เชื้อมาลาเรียไม่ถูกภูมิต้านทานของโฮสต์ทำลาย

โปรตีนที่พบใน parasitophorous vacuole ประกอบด้วย merozoite surface protein 3 (MSP 3) ขนาด 50 kDa (McColl et al., 1994) glutamate-rich protein (GLURP) ขนาด 220 kDa (Borre et al., 1991) serine repeat antigen (SERA) ขนาด 126 kDa acidic basic repeat antigen (ABRA) ขนาด 101 kDa (Weber et al., 1988) S-antigen (Culvenor and Crewther., 1990) โปรตีนเหล่านี้พบได้ใน parasitophorous vacuole ในระยะไซซอนต์ระยะหลังและหลังจากที่เม็ดเลือดแดงแตก โปรตีนจะออกมาปรากฏอยู่ในกระแสเลือด

2. **โปรตีนที่ปรากฏในระยะเมอร์โรซอยต์**

โปรตีนบนผิวระยะเมอร์โรซอยต์ ประกอบด้วย merozoite surface protein 1 (MSP1) ขนาด 185-200 kDa (Holder et al., 1988) merozoite surface protein 2 (MSP2) ขนาด 45-55 kDa (Smythe et al., 1988; Clark et al., 1989) merozoite surface protein 4 (MSP4) ขนาด 40 kDa (Marshall et al., 1997) เชื่อว่าโปรตีน ดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเกาะติดของเมอร์โรซอยต์กับเม็ดเลือดแดงและการบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดง

โปรตีนที่พบภายในโครงสร้างระยะเมอร์โรซอยต์ ประกอบด้วย โปรตีนที่พบบนส่วนยอด (apical organelles) ของเมอร์โรซอยต์ ซึ่งบริเวณนี้ประกอบด้วย organelle ต่าง ๆ เช่น ส่วน rhoptry เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่มีหลายขนาด ได้แก่ Rhop-H ประกอบด้วยโปรตีน rhop-1 ขนาด 140 kDa rhop-2 ขนาด 130 kDa และ rhop-3 ขนาด 110 kDa (Cooper et al., 1988; Sam-Yellowe et al., 1995) Rhop-L ประกอบด้วยโปรตีน rap-1 ขนาด 86 kDa rap-2 ขนาด 39 kDa rap-3 ขนาด 37 kDa (Howard et al., 1998b) apical membrane antigen (AMA-1) ขนาด 80 kDa (Peterson et al., 1989) พบที่บริเวณรอยคอด (neck) ของ rhoptries (Crewther et al., 1990) สำหรับส่วน dense granules (microspheres) ประกอบด้วยโปรตีน ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) ขนาด 155 kDa (Perlman et al., 1984) และโปรตีนนี้ที่สร้างจาก microneme ได้แก่ erythrocyte binding antigen 175 (EBA-175) ขนาด 175 kDa (Camus and Hadley, 1985)

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่ปรากฏในระยะอื่น ๆ ที่มีความสำคัญได้แก่

โปรตีนที่พบในระยะการเจริญในตับ ได้แก่ liver stage antigen 1 (LSA1) ขนาด 200 kDa (Zhu and Hollingdale, 1991) liver stage antigen 2 (LSA2) (Guerin-Marchand et al., 1987) พบเฉพาะในระยะที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในตับเท่านั้น *P. falciparum* exported protein1 (PfExp-1) ขนาด 17 kDa (Doolan et al., 1996) Pfs16 ขนาด 16 kDa ปรากฏที่ผิวของสปอร์โรซอยต์ ในระยะที่เชื้อมาลาเรียอยู่ในตับและระยะแกมมีโตไซต์ (Moelans et

al., 1991) นอกจากนี้ยังมี sporozoite threonine and asparagine rich protein (STARP) ขนาด 78 kDa (Fidock et al., 1994) Liver stage antigen 3 (LSA-3) ขนาด 205 kDa (Benmohamed et al., 1997) sporozoite and live stage antigen (SALSA) ขนาด 70 kDa (Bottius et al., 1996) สำหรับโปรตีนที่พบในระยะสปอร์โรซอยต์เช่น circumsporozoite protein (CSP) (Yoshida et al., 1980) โปรตีนที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งได้แก่ throbospondin related anonymous protein (TRAP) หรือ sporozoite surface protein 2 (PfSSP2) (Rogers et al., 1992)

โปรตีนที่พบในระยะที่มีการสืบพันธุ์อาศัยเพศในยุง ได้แก่ *P. falciparum* sexual stage surface (Pfs16) ขนาด 16 kDa *P. falciparum* sexual stage surface 25 (Pfs25) ขนาด 25 kDa (Fries et al., 1990) Pf230 ขนาด 310 kDa (Williamson et al., 1996) Pf48/45 (Quakyi et al., 1989) และ Pfs2400 (Feng et al., 1993) เชื่อว่าโปรตีนนี้มีบทบาทในการเคลื่อนที่และเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ โดยพบโปรตีนเหล่านี้ในต่อมน้ำลายยุงและตับของสัตว์ที่เป็นโฮสต์

ทิศทางการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

การพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรีย สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มตามระยะการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียและความสามารถในการป้องกันโรค ได้แก่

1. **วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะก่อนเข้าสู่เม็ดเลือดแดง** (pre-erythrocytic stage vaccine)

วัตถุประสงค์เพื่อป้องกันสปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับ จากการทดลองประสิทธิภาพวัคซีนโดยใช้สปอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ที่ผ่านการฉายรังสี (irradiated sporozoites) ฉีดกระตุ้นภูมิต้านทานในอาสาสมัคร พบว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้อาสาสมัครมีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียกล่าวคือ ไม่พบการติดเชื้อในภายหลังเมื่อฉีดสปอร์โรซอยต์ที่ปกติเข้าสู่อาสาสมัคร (Herrington et al., 1991; Egan et al., 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อมาลาเรียมีระดับแอนติบอดีต่อ CSP ในระดับที่สูงด้วย สำหรับการใช้เพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทดลองประสิทธิภาพวัคซีนในสัตว์ทดลอง สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียมากถึงร้อยละ 80 (Tam et al., 1990) ถึงแม้ว่าวัคซีนชนิดนี้สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานในสัตว์ทดลองได้สูง แต่ตรงกันข้ามภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นในคนจะมีการตอบสนองในระดับที่ต่ำ (Stoute et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อทำลาย สปอร์โรซอยต์ที่เจริญในตับได้แก่ LSA1 และ LSA2 (Doolan et al., 1997)

2. วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดง

(Blood stage **หรือ** asexual erythrocytic stage vaccine)

วัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียและป้องกันการบุกรุกของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดง นอกจากนี้อาจมีบทบาทช่วยในการยับยั้งการสร้างสารพิษของเชื้อได้ (Miller et al., 1986) ในระยะนี้จะมีการสร้างโปรตีนหลายชนิดเช่น MSP1 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญและจากการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าวัคซีนนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียและสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Holder et al., 1982; Cheung et al., 1986; Hui et al., 1987; Etlinger et al., 1991; Kumar et al., 1995; Egan et al; 1996) นอกจากนี้ AMA-1 เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีต่อการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยฉีดเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเข้าสัตว์ทดลองและกระตุ้นด้วยเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน พบว่าทำให้สัตว์ทดลองเกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้ โดยระดับการป้องกันจะสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดีที่เพิ่มสูงขึ้น (Collins et al., 1994; Anders et al., 1998) และถ้าฉีด AMA1 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีนต่างกับ AMA1 สายพันธุ์ที่กระตุ้นจะทำให้สัตว์ทดลองไม่มีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย (Crewther et al., 1996) และนอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่อาจมีส่วนสำคัญสำหรับการเป็นองค์ประกอบวัคซีนเช่น MSP2, MSP4, rhoptry protein, SERA, EBA-175

นอกจากนี้วัคซีนที่มีองค์ประกอบหลายระยะ (combined vaccine) ซึ่งเป็นการทดสอบวัคซีน โดยใช้พื้นฐานการรวมระหว่างแอนติเจนของระยะก่อนเข้าสู่เม็ดเลือดแดงและระยะการเจริญที่ไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง หรือที่เรียกว่า SPf66 โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์จากบางส่วนของ PfMSP1 เชื่อมกับ CSP ในส่วนที่กรดอะมิโน 4 ตัวเรียงซ้ำกัน (tetrapeptide repeats) คือ Asparagine-Alanine-Asparagene-Proline (NANP) และเชื่อมกับโปรตีนอีก 2 ชนิดของเชื้อมาลาเรีย (Patarroyo et al., 1988) และได้มีผู้ศึกษาวัคซีนดังกล่าวในอาสาสมัครหลายพื้นที่ที่ต่างกันไป พบว่าอาสาสมัครทั้งเด็กและผู้ใหญ่ในประเทศโคลัมเบีย (Valero et al., 1993; Valero et al., 1996) และทานซาเนีย (Alonso et al., 1996; Alonso et al., 1998) มีระดับแอนติบอดีตอบสนองต่อการติดเชื้อมาลาเรียในระดับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในทางตรงกันข้ามการศึกษาวัคซีนชนิดเดียวกันนี้ในประเทศไทย (Nosten et al., 1996) และแกมเบีย (D' Alessandro et al., 1995) กลับพบว่าการตอบสนองของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อมาลาเรียในอาสาสมัครมีประสิทธิภาพในระดับที่ต่ำ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของวัคซีน นอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแอนติเจนที่นำมาใช้เป็นวัคซีน ยังมีความสัมพันธ์กับเชื้อชาติ อายุและมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร

3. วัคซีนป้องกันการแพร่กระจายเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ (sexual stage vaccine หรือ transmission blocking vaccine)

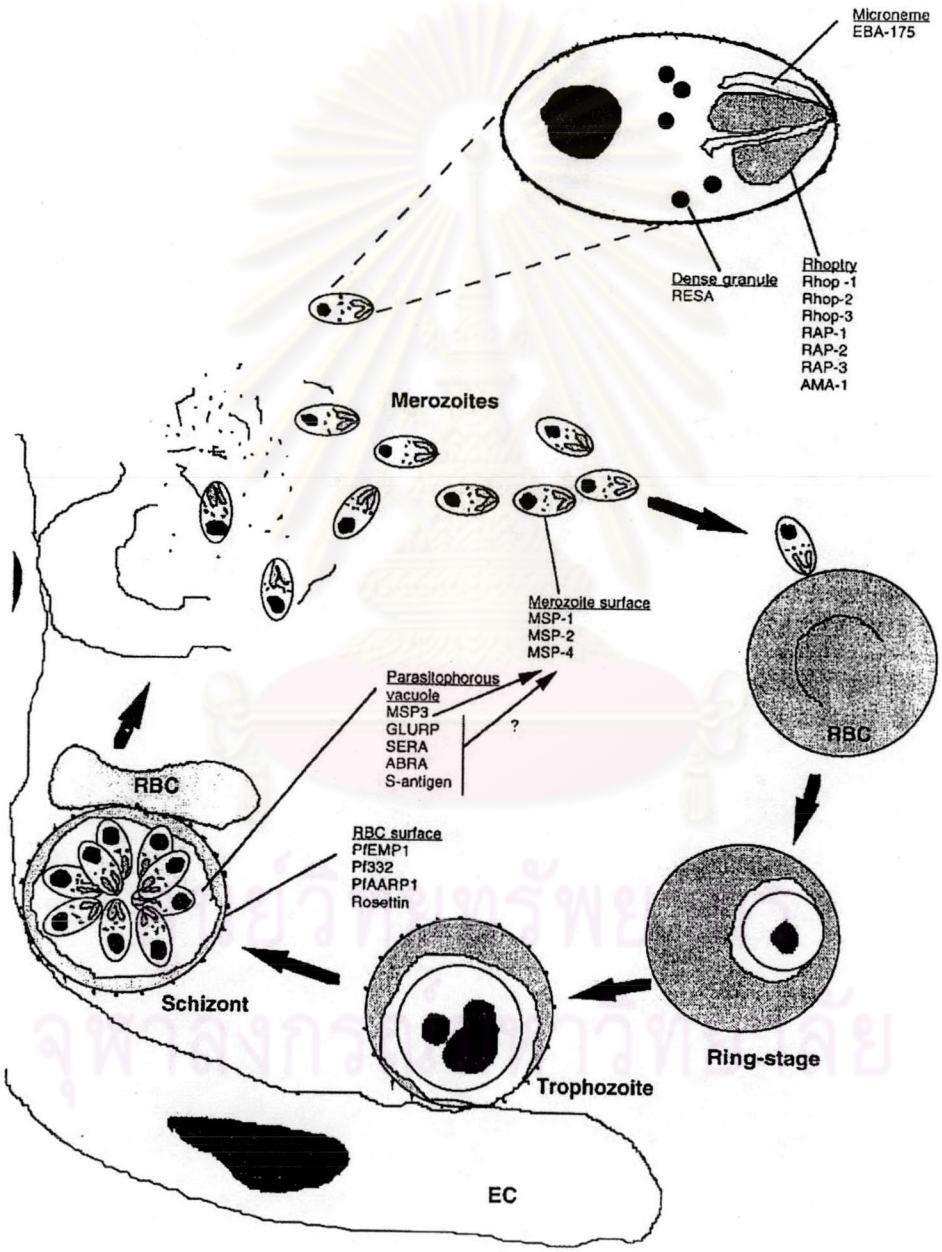
วัตถุประสงค์เพื่อสร้างภูมิต้านทานยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในยุงพาหะกล่าวคือผู้ที่ได้รับวัคซีนจะไม่มีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรีย แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในยุงพาหะ โดยผู้ที่ได้รับวัคซีนร่างกายจะมีการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อเชื้อมาลาเรียในระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นยุงที่กัดผู้ได้รับวัคซีนจะไม่สามารถกระจายเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้ (Kaslow et al., 1988)

อย่างไรก็ตาม วัคซีนป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพจึงควรครอบคลุมเชื้อในหลาย ๆ ระยะพร้อมกัน เพื่อป้องกันการหลุดรอดจากการทำลายของภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงระยะของการเจริญเติบโต สำหรับโปรตีนในระยะที่เชื้อมาลาเรียสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงที่มีบทบาทมากที่สุดชนิดหนึ่งในการพิจารณาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนคือโปรตีนบนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์

Merozoite surface protein 1 (MSP1)

บนผิวของระยะเมอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิด แต่โปรตีนที่พบมากที่สุดมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 180 ถึง 200 kDa (Holder, 1988) โปรตีนชนิดนี้มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปได้แก่ 195 kDa glycoprotein (gp195) precursor to the major merozoite surface antigen (PMMSA) polymorphic schizont antigen (PSA) P190 pf195 และ pf200 จากการศึกษาโปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ของมาลาเรียชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ PfMSP1 พบว่า โปรตีนบนผิวเมอร์โรซอยต์ของ *P. vivax* และ *P. yoelii* (Lewis et al., 1989) ขนาดประมาณ 200 kDa หรือเรียกว่า Pv200 และ Py200 ตามลำดับ สำหรับโปรตีนของ *P. chabaudi* เรียก p199 (Delersnijder et al., 1990) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่สำคัญชนิดอื่นที่ปรากฏบนผิวเมอร์โรซอยต์ ได้แก่ โปรตีนขนาด 45 ถึง 55 kDa เรียกว่า merozoite surface protein 2 (MSP2) หรือ merozoite surface antigen 2 (MSA2) (Smythe et al., 1991; Clark et al., 1989) และโปรตีนขนาด 40 kDa เรียกว่า merozoite surface protein 4 (MSP4) (Marshall et al., 1997)

รูปที่ 3 แสดงโปรตีนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรียที่ปรากฏในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงที่มีความสำคัญในการพัฒนาเพื่อนำมาเป็นองค์ประกอบวัคซีนป้องกันมาลาเรีย (RBC = red blood cell, EC= endothelial cell)
(Berzins and Anders, 1999)



โครงสร้างของ MSP1

ลักษณะโครงสร้าง MSP1 ของ *P. falciparum* มีองค์ประกอบหลายส่วน โดยส่วนทางด้าน N-terminus ประกอบด้วยเพปไทด์สัญญาณ (signal peptide) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้ม endoplasmic reticulum ในส่วนนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) จำนวน 20 ตัว และเป็นบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันหรือเหมือนกัน (conserved) ในระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย บริเวณที่ต่อจากเพปไทด์สัญญาณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนเรียงซ้ำกันเป็นชุดหรือที่เรียกว่า tripeptide repeats สำหรับในส่วน C-terminus ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำจำนวน 20 ตัว และมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะของ glycosylphosphatidyl inositol (GPI) anchor (Smythe et al., 1988) และ epidermal growth factor (EGF) like domain (Blackman et al., 1991; Jongwutiwes et al., 1993) บริเวณนี้มีองค์ประกอบของ cysteine residue จำนวนมากเชื่อมกันด้วยพันธะ disulfide นอกจากนี้ MSP1 ของ *P. falciparum* ประกอบด้วย EGF-like domain สองชุดคือ EGF-like domian 1 และ EGF-like domian 2 ซึ่งเชื้อมาลาเรียที่ต่างชนิดกันจะมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนนี้มีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้น EGF-like domian อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ (cell to cell interactions) (Engel, 1989) สำหรับโครงสร้างในส่วนอื่น ๆ ของ MSP1 ไม่ปรากฏกรดอะมิโนชนิด hydrophobic จำนวนมากเช่นเดียวกับในส่วน N-terminus และ C-terminus

MSP1 เป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายในคุณลักษณะของแอนติเจน (antigenic diversity) ในการศึกษาโครงสร้างของยีนที่สร้าง MSP1 ของ *P. falciparum* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า MSP1 มีองค์ประกอบของยีนจากยีนพื้นฐานเพียง 2 รูปแบบ (allelic dimorphism) ซึ่งจะพบการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ในตำแหน่งหนึ่ง ๆ เพียง 2 แบบเท่านั้น ได้แก่ กลุ่มอัลลีล MAD20 และกลุ่มอัลลีล K1 จากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 กลุ่มทำให้เกิดความแตกต่างหรือคล้ายคลึงกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยสามารถแบ่งยีน PfMSP1 ได้เป็นบริเวณต่าง ๆ 17 บริเวณ ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันสูงมาก ร้อยละ 87-97 เรียกว่า conserved blocks ซึ่งมี 5 บริเวณ ได้แก่บริเวณที่ 1 3 5 12 17 สำหรับบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันปานกลาง ร้อยละ 65-77 เรียกว่า semi-consered blocks มี 5 บริเวณ ได้แก่ บริเวณที่ 7 9 11 13 15 และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันน้อย ร้อยละ 10-38 เรียกว่า variable blocks มีจำนวน 7 บริเวณ ได้แก่บริเวณที่ 2 4 6 8 10 14 16 โดยทั้ง 17 บริเวณนี้พื้นฐานของยีน 2 รูปแบบ แต่ยกเว้นในบริเวณที่ 2 (variable block 2) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสร้างกรดอะมิโนสามตัวที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด ๆ (tripeptide repeats) แบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดย 2 กลุ่มประกอบด้วย

บริเวณที่มีการสร้างกรดอะมิโนซ้ำกันดังกล่าว (tripeptide repeats) ได้แก่ MAD20 และ K1 ซึ่งองค์ประกอบและจำนวนของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ tripeptide repeats มีความแตกต่างกัน ดังนั้นทั้ง 2 กลุ่มจึงมีความหลากหลายสูง สำหรับกลุ่มที่ 3 ไม่มีการสร้างกรดอะมิโนสามตัวที่เรียงซ้ำกันเป็นชุด ๆ คือ RO33 (Certa et al., 1987; Peterson et al., 1988; Jongwutiwes et al., 1992; Jiang et al., 2000) ดังนั้นผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้สามารถอธิบายการเกิดความหลากหลายของแอนติเจนของ MSP1 ในแต่ละสายพันธุ์เกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic recombination) ระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992; Jongwutiwes et al., 1993; Kerr et al.,1994)

การย่อยขนาดของ MSP-1 ให้ได้ชิ้นส่วนที่เล็กลง (proteolytic cleavage)

MSP 1 ที่ถูกสร้างขึ้นมามีลักษณะเป็นโปรตีนตั้งต้น (precursor protein) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูง เชื้อมาลาเรียมีเอ็นไซม์ที่ย่อยให้โปรตีนดังกล่าวมีขนาดเล็กลง (proteolytic enzymes) (processing) โดยเกิดขึ้นก่อนที่โปรตีนนี้จะปรากฏอยู่บนผิวของเมอร์โรซอย์ที่เจริญเต็มที่ โดยขั้นตอนการตัดโปรตีนมี 2 ขั้นตอน ทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกันหลายขนาด (fragment) การตัดโปรตีนออกเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ จะเกิดขึ้นในตำแหน่งที่เฉพาะ (Lyon et al., 1986; Holder et al., 1987; Blackman et al., 1991) ในการตัดขั้นแรก (primary processing) จะย่อยโปรตีนขนาด 180 หรือ 200 kDa ทำให้ได้โปรตีนขนาดแตกต่างกัน 4 ส่วน ได้แก่ 80/83 kDa 42/45 kDa 36/38 kDa และ 28/50 kDa (Holder et al.,1985) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในระยะไซซอนต์ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงและในเซลล์ตับ (Lyon et al.,1986; Holder et al.,1987; Szarfman et al., 1988; Suhrbier et al., 1989) สำหรับการตัดย่อยโปรตีนในขั้นที่ 2 (secondary processing) จะตัดในส่วน C-terminus จากชิ้นส่วนโปรตีนขนาด 42/45 kDa ในขั้นตอนแรกให้มีขนาดเล็กลงเป็น 30/33 kDa และ 19 kDa ก่อนที่เมอร์โรซอยต์จะออกสู่ระบบไหลเวียนเลือดและก่อนการบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (invasion) ซึ่งเชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (Holder and Blackman,1994) และสามารถตรวจพบโปรตีนขนาด 19 kDa ก่อนหรือขณะที่กำลังบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดงและไปจนถึงระยะวงแหวนตอนต้น (Blackman et al., 1990; Cooper et al., 1992) ในขณะที่โปรตีนส่วนอื่น ๆ จะถูกปลดปล่อยออกจากผิวของเมอร์โรซอยต์สู่กระแสเลือด และสามารถตรวจพบได้ในพลาสมา (Blackman et al., 1990; Blackman and Holder, 1992)

ความหลากหลายของยีน MSP1

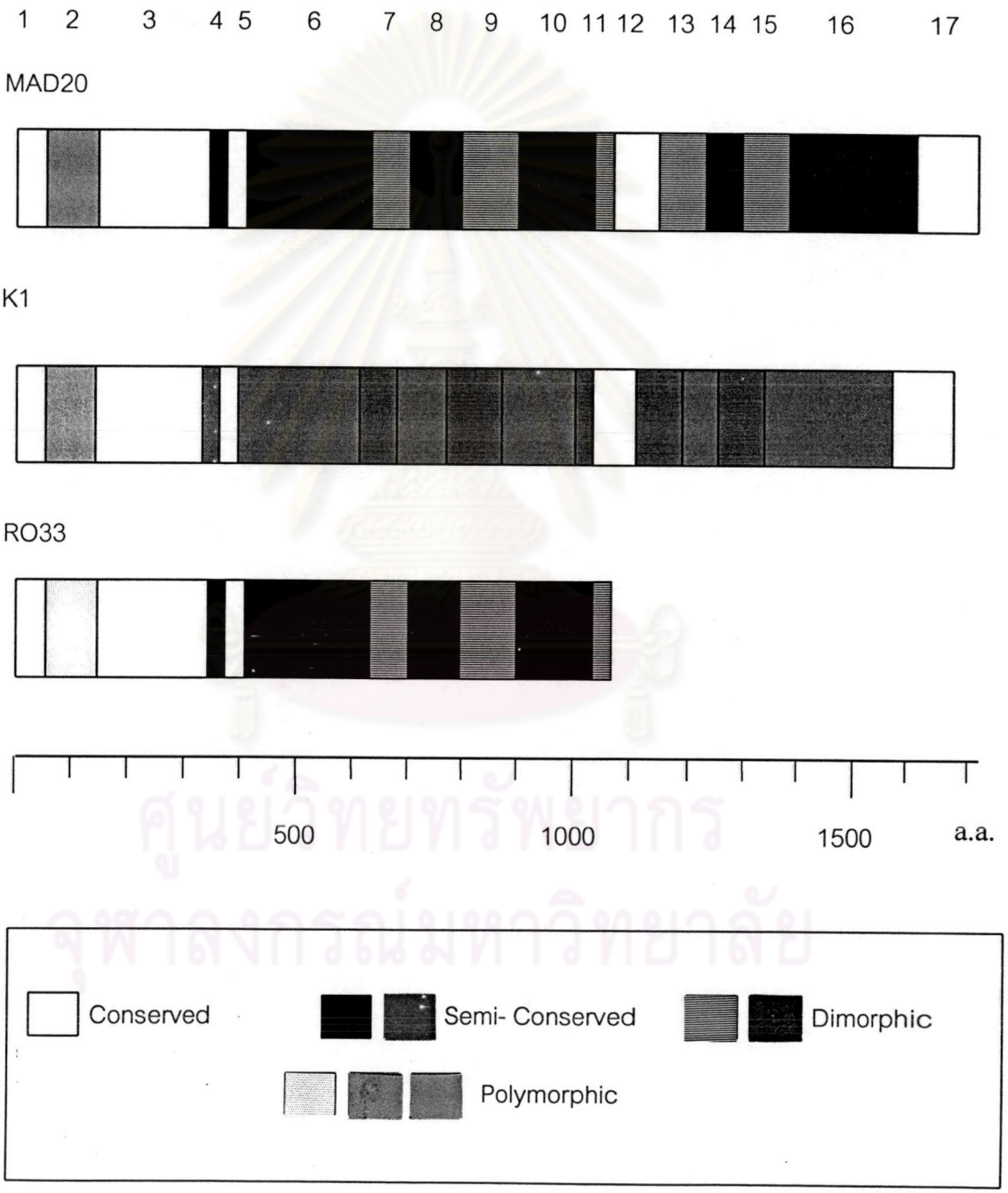
การศึกษาความหลากหลายของ MSP1 ของมาลาเรียชนิดต่าง ๆ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้าง MSP1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างน้อยในมาลาเรียที่ต่างชนิดกันคือ ประมาณร้อยละ 30 ถึง 40 แต่สำหรับมาลาเรียชนิดเดียวกันจะมีความคล้ายคลึงกันสูง โดยที่ *P. falciparum* ต่างสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันประมาณร้อยละ 58 และ *P. vivax* มีความคล้ายคลึงประมาณร้อยละ 81 แต่พบว่า MSP1 ของ *P. yoelii* และ *P. chabaudi* มีความคล้ายคลึงกันสูงถึงร้อยละ 69 (Del Portillo et al., 1991; Gibson et al., 1992; McCutchan et al., 1984)

MSP 1 เป็นโปรตีนที่ความหลากหลายในคุณลักษณะของแอนติเจน ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าในบริเวณ conserved block และบริเวณ variable block มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดความหลากหลายของแอนติเจน เนื่องจาก variable block หนึ่งอาจมีอัลลีลเป็น MAD20 ในขณะที่ variable block อื่นมีอัลลีลเป็น K1 เป็นต้น ซึ่งน่าจะเกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมในยีน MSP1 (intragenic recombination) ที่เกิดขึ้นในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุง พบว่ามีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมเกิดขึ้นในส่วน 5' ของด้าน N-terminus ของบริเวณที่ 1 ถึงบริเวณที่ 5 โดยมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างอัลลีล MAD20 และ K1 (Jongwutiwes et al., 1992) การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดความหลากหลายในบริเวณต่าง ๆ สำหรับในบริเวณที่ 4 พบความหลากหลาย 4 รูปแบบคือ MAD20/MAD20 MAD20/K1 K1/K1 และ K1/MAD20 เมื่อใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะภายในตัดในบริเวณที่ 4 ทำให้สามารถแยกอัลลีลกลุ่ม MAD20 และอัลลีลกลุ่ม K1 ได้อย่างชัดเจน ส่วนบริเวณที่ 6 ถึง 17 จะพบว่ารูปแบบของอัลลีลมีความคงที่เสมอ กล่าวคือไม่พบการแลกเปลี่ยนอัลลีลในบริเวณดังกล่าว แต่จะพบรูปแบบอัลลีลใดอัลลีลหนึ่ง (Jongwutiwes et al., 1992)

ลักษณะโครงสร้างของ MSP-1 ในบริเวณที่ 2

ในบริเวณที่ 2 เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงและมีลักษณะของการเรียงลำดับของกรดอะมิโน 3 ตัวซ้ำกันเป็นชุดเรียกว่า tripeptide repeats สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างและความหลากหลายของยีน MSP1 ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* สายพันธุ์ MAD20 K1 และ RO33 ประกอบด้วย 17 บริเวณ โดยบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันสูงมากได้แก่บริเวณที่ 1 3 5 12 17 ส่วนบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันปานกลางได้แก่บริเวณที่ 7 9 11 13 15 และบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันน้อยได้แก่บริเวณที่ 2 4 6 8 10 14 16 (Tanabe et al., 1987)



กลุ่มอัลลีล MAD20

กลุ่มอัลลีล MAD20 นั้น ในบริเวณของ tripeptide repeats ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงซ้ำกันตั้งแต่ 5-15 ชุด ซึ่งจะมีองค์ประกอบของลำดับกรดอะมิโนพื้นฐาน (consensus sequence) คือ Serine-x-x โดยที่ x เป็นชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ องค์ประกอบส่วนใหญ่ที่พบมักเป็น Serine-Lysine-Glycine (SKG) Serine-Glycine-Glycine (SGG) Serine-Glycine-Alanine (SGA) Serine-Valine-Alanine (SVA) Serine-Valine-Threonine (SVT) และ Serine-Serine-Glycine (SSG) สำหรับ tripeptide repeats ในชุดสุดท้ายของแต่ละสายพันธุ์ที่ได้มีการศึกษาพบว่ามีลักษณะองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่เหมือนกันเสมอ คือ Serine-Glycine-Glycine (SGG) นอกจากนี้สายพันธุ์ที่มี tripeptide repeats มากกว่า 8 ชุด จะมีองค์ประกอบของ repeat ในชุดที่ 3 ส่วนใหญ่ประกอบด้วย Serine-Glycine-Glycine (SGG) สำหรับองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ tripeptide repeats ของอัลลีล MAD20 มีลำดับนิวคลีโอไทด์พื้นฐานที่เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน (codon) ตัวแรกของแต่ละชุดมีความคงที่ในแต่ละ tripeptide เป็น Thymine-Cytocine-Adenine (TCA) ยกเว้น tripeptide ในชุดที่ 6 ของสายพันธุ์ Bandia เป็น TCG(Serine) (Scherf et al., 1989) ลำดับนิวคลีโอไทด์พื้นฐานของ tripeptide repeats มีลักษณะเป็น TCA A(G)A(G/T)A(G/T) G(A)G(C)T(C) (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992; Jiang et al., 2000)

กลุ่มอัลลีล K1

กรดอะมิโนในบริเวณ tripeptide repeats ของ K1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เรียงซ้ำกันตั้งแต่ 5-25 ชุด โดยมีลำดับกรดอะมิโนพื้นฐานมีลักษณะเช่นเดียวกันกับกลุ่ม MAD20 คือ Serine-x-x แต่องค์ประกอบจะแตกต่างกันไป สำหรับองค์ประกอบในชุดแรกเป็น Serine-Alanine-Glutamine (SAQ) และชุดสุดท้ายเป็น Serine-Glycine-Glycine (SGG) ปรากฏในทุกสายพันธุ์ที่ได้มีการศึกษามาก่อนเสมอ องค์ประกอบของ tripeptide ส่วนใหญ่ประกอบด้วย Serine-Glycine-Threonine (SGT) Serine-Glycine-Proline (SGP) Serine-Glycine-Alanine (SGA) และ Serine-Alanine-Threonine (SAT) อย่างไรก็ตามแม้ว่ากรดอะมิโนตำแหน่งแรกของ MAD20 และ K1 ประกอบด้วย Serine เหมือนกันแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันกล่าวคือ K1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ AGT เสมอ เช่นเดียวกับ กลุ่ม MAD20 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแรกเป็น TCA สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์พื้นฐานในแต่ละ repeat มีองค์ประกอบคือ AGT GC(G) NA(C)A สำหรับ N หมายถึงนิวคลีโอไทด์ใด ๆ ใน 4 ชนิด (Tanabe et al., 1987; Jongwutiwes et al., 1992; Jiang et al., 2000)

อัลลีลกลุ่ม RO33

กรดอะมิโนในบริเวณที่ 2 ของ RO33 ไม่ปรากฏลักษณะ tripeptide repeats เป็น องค์ประกอบชัดเจน แต่พบว่าส่วนใหญ่ในช่วงห่างทุก ๆ 9 นิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ 2 นี้ มีนิวคลีโอไทด์ชนิด Adenine Cytosine และ Thymine ซ้ำกันอยู่ สำหรับจำนวนนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้มีความคงที่ แต่จะมีการสับเปลี่ยนแทนที่ (substituition) ของนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งเท่านั้นในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (Certa et al., 1987; Peterson et al., 1988; Jongwutiwes et al.,1992)

สำหรับ tripeptide repeats ในบริเวณที่ 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูง จากการศึกษาการกระจายความถี่ของอัลลีล (allele frequency) ในบริเวณที่ 2 จากตัวอย่างผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในหลายประเทศพบว่า การกระจายความถี่ของอัลลีลที่แตกต่างกันไป โดยอัลลีลกลุ่ม MAD20 พบมากที่สุดในประเทศไทย เวียดนาม จีน สำหรับประเทศที่พบการกระจายของอัลลีล K1 มากที่สุดคือ ประเทศแกมเบีย ไนจีเรีย กาบอง ซูดาน ทานซาเนีย และอัฟริกาใต้ ส่วนการกระจายของอัลลีล R033 พบมากในประเทศเซเนกาล โคลัมเบีย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอุบัติการการกระจายความถี่ของอัลลีลในส่วน tripeptide repeats ของบริเวณที่ 2 ของยีน PfMSP1

ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง	อัลลีล			ปีที่ศึกษา	เอกสารอ้างอิง
		MAD20	K1	RO33		
โคลัมเบีย	31	0.06	0.10	0.84	1983	Snewin et al., 1991
ไทย	25	0.64	0.20	0.16	1988-1989	Jongwutiwes et al., 1992
เวเนสุ	120	0.36	0.21	0.42	1992-1994	Maitland et al., 2000
เวียดนาม	368	0.64	0.23	0.13	1995	Tanabe et al., 2000
บราซิล	49	0.19	0.42	0.39	1995	Ferreira et al., 1998
ซูดาน	66	0.33	0.36	0.31	1992-1995	Conway et al., 2000
แกมเบีย	91	0.33	0.51	0.16	1995	
ไนจีเรีย	107	0.29	0.52	0.19	1996	
กาบอง	124	0.37	0.54	0.09	1996	
ทานซาเนีย	86	0.26	0.53	0.21	1995	
แอฟริกาใต้	73	0.27	0.59	0.14	1996	

บทบาทของ MSP1 สำหรับเป็นองค์ประกอบของวัคซีน

การศึกษาบทบาทของ MSP1 ในหลอดทดลอง

แม้ว่าบทบาทหน้าที่ของ MSP1 ยังไม่ทราบชัดเจน แต่เชื่อว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดง เนื่องจากได้มีการศึกษาบทบาท MSP1 ของ *P. falciparum* โดยใช้แอนติบอดีชนิดโคลนเดียว (monoclonal antibody) ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ MSP1 ส่ว C-terminus ขนาด 19 kDa (MSP_{19}) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญและการบุกรุกของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดงในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Blackman et al., 1990; Cappel and Holder,1993; Egan et al., 1999) นอกจากนี้แอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ (naturally acquired human antibody) มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อส่วน EGF-like domain แต่เมื่อนำแอนติบอดีนี้มาทดลองประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง ปรากฏว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แต่ถ้าใช้ monoclonal antibody ทำปฏิกิริยาทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Chappel et al., 1994; Guevara Patino et al., 1997) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาบทบาท MSP1 ส่วน N-terminus จากการใช้ monoclonal antibody ที่ได้จากหนูทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อบริเวณที่ 2 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณ tripeptide repeats พบว่าสามารถยับยั้งการบุกรุกของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้สูงมากกว่าร้อยละ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Locher et al., 1996) นอกจากนี้การทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้ monoclonal antibody ต่อส่วน N-terminus ในบริเวณที่ 2 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเมอร์โรซอยต์ในหลอดทดลองได้ (McBride et al., 1985; Peterson et al., 1988) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าในบริเวณ tripeptide repeats มีบทบาทที่สำคัญสำหรับการนำมาเป็นองค์ประกอบวัคซีน โดยอาจเป็นไปได้ที่แอนติบอดีสามารถยับยั้งกระบวนการการย่อยขนาดของ MSP1 ไม่ให้เกิดขึ้น จึงทำให้เมอร์โรซอยต์ไม่สามารถบุกรุกเข้าสู่เม็ดเลือดแดงได้ (Blackman et al., 1994)

การศึกษาบทบาทของ MSP1 ในสัตว์ทดลอง

การศึกษาบทบาทโดยใช้โปรตีนขนาด 230 kDa ของ *P. yoelii* หรือ *P. chabaudi* ฉีดกระตุ้นในหนูทดลองพบว่าหนูทดลองสามารถสร้างภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อได้ (Holder and Freeman, 1981; Lew and Black, 1990) และเมื่อนำแอนติบอดีที่เกิดขึ้นนี้ฉีดเข้าหนูตัวอื่นที่ยังไม่เคยมีการติดเชื้อมาลาเรียหรือไม่ได้รับวัคซีนมาก่อน พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ (passive immunity) (Holder, 1988; Majarian et al., 1984) สำหรับการศึกษาบทบาทของ MSP1 ของ *P. falciparum* โดยใช้ recombinant peptide ของ MSP1 ฉีดในหนูทดลองพบว่า

ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นสามารถตอบสนองต่อส่วนเพปไทด์ของ MSP1 อย่างจำเพาะต่อแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Cavanagh and McBride, 1997) จากการศึกษาของ Jouin และคณะ (2001) ได้ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งเพปไทด์ในบริเวณที่ 2 ของ MSP1 ของ *P. falciparum* ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานในหนูได้ โดยใช้ recombinant peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 15 ตัวในแต่ละ 1 ช่วงความยาวที่ใช้ศึกษาและเลื่อนตำแหน่งให้เหลื่อมซ้อนกันต่อไปเรื่อย ๆ (overlapping sequences) ตั้งแต่ส่วน C-terminus ของบริเวณที่ 1 จนถึงส่วน N-terminus ของบริเวณที่ 3 จากสายพันธุ์ Wellcome ซึ่งเป็นอัลลีลกลุ่ม MAD20 สายพันธุ์ Palo Alto ซึ่งเป็นอัลลีลกลุ่ม K1 และสายพันธุ์ RO33 พบว่า recombinant peptide เฉพาะที่มีส่วนประกอบของ tripeptide repeats ในบริเวณที่ 2 ของอัลลีลกลุ่ม MAD20 และ K1 สามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีในระดับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอัลลีล RO33 พบการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ recombinant peptide ดังกล่าวได้บางตำแหน่ง นอกจากนี้การตอบสนองแอนติบอดียังมีความจำเพาะต่อแต่ละอัลลีลด้วย (allele specific)

บทบาทของ MSP1 ในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียนั้นเริ่มต้นจากการศึกษาโดยใช้โปรตีนหรือเพปไทด์ที่สังเคราะห์ที่ได้จากบางส่วนของ PfMSP1 ฉีดเข้าในลิง ทดลองพบว่า ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ จากการทดลองวัคซีนในลิง *Aotus* โดยฉีด MSP1 ที่บริสุทธิ์ (purified MSP1) ในครั้งแรก หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ทำการฉีดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์เดียวกับการฉีดครั้งแรก (homologus challenge) พบว่าลิงทดลองไม่ปรากฏอาการของการติดเชื้อมาลาเรีย และตรวจไม่พบเชื้อในกระแสเลือดเลย แสดงว่าภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ (complete protection) (Siddiqui et al., 1987) นอกจากนี้ถ้าฉีด MSP1 ที่เป็นวัคซีนต่างกับ MSP1 ของเชื้อที่ฉีดเข้าไป (heterologous challenge) ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นสามารถที่จะป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้บางส่วน (partial protection) กล่าวคือลิงทดลองมีการติดเชื้อมาลาเรีย โดยอาการที่เกิดขึ้นมักไม่รุนแรงและสามารถหายได้เอง เมื่อตรวจเลือดพบเชื้อในระดับที่ต่ำ (Perrin et al., 1984; Cheung et al., 1986; Herrera et al., 1990; Chang et al., 1991; Hui et al., 1991; Kumar et al., 1992) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวยังมีอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งคือ การนำเอาแอนติเจนจาก MSP1 ทั้งโมเลกุลหรือแอนติเจนบางส่วนที่มีขนาดใหญ่มาทำการทดลอง ทำให้ไม่ทราบชัดเจนว่าในบริเวณใดของ MSP1 ที่มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรีย ดังนั้นการศึกษา บทบาทการเป็นวัคซีนของ MSP1 ในส่วนต่าง ๆ ที่มีขนาดเล็กลง น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปสู่การพัฒนาออกแบบวัคซีนที่มีประสิทธิภาพ จากการทดลองวัคซีนในลิงโดยฉีดโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์เพปไทด์จากส่วน variable block ในบริเวณ N-terminus และส่วน conserved block ในบริเวณ C-terminus ของ MSP1 พบว่าสามารถชักนำให้ลิงเกิด

ภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Etlinger et al., 1991; Holder, 1988; Herrera et al., 1992; Kumar et al., 1995; Chang et al., 1996) แสดงว่าบริเวณดังกล่าวมีความสำคัญต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในประชากรที่อาศัยในเขตปรากฏโรคมาลาเรีย

การศึกษาชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin class) ที่ตอบสนองจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญเติบโตในเม็ดเลือดแดง จากผู้ป่วยในพื้นที่เขตปรากฏโรคโดยวิธี ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ส่วนใหญ่พบแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG (Aribot et al., 1996; Branch et al., 1998) และเมื่อวิเคราะห์ IgG subclass ที่จำเพาะต่อบริเวณที่ 2 ของ PfMSP1 พบว่า การตอบสนองส่วนใหญ่เกิดจาก IgG3 ซึ่งจำเพาะต่อทั้ง 3 อัลลีลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ IgG1 สามารถตอบสนองจำเพาะต่อส่วน C-terminus ได้สูง แต่ IgG2 และ IgG4 พบการตอบสนองค่อนข้างต่ำหรือน้อยมาก (Kumar et al., 1995; Kitua et al., 1999; Cavanagh et al., 2001; Locher et al., 2001; Jouin et al., 2001)

จากการศึกษาในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตที่มีการระบาดของโรค (endemic area) พบว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อมาลาเรียมีความจำเพาะต่อ PfMSP1 (type specific antibody) ในส่วน variable block ของ N-terminus โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณ tripeptide repeats ของบริเวณที่ 2 ระดับแอนติบอดีที่เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ติดเชื้อมาลาเรีย (Muller et al., 1989; Fruh et al., 1991; Brown et al., 1991; Tolle et al., 1993; Konate et al., 1999; Jouin et al., 2001; Ekala et al., 2002) นอกจากนี้แอนติบอดีสามารถตอบสนองต่อส่วน variable block ในระดับที่สูงและสามารถคงอยู่ได้นาน แต่ระดับแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อส่วน conserved block จะลดลงอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ที่มีแอนติบอดีต่อ PfMSP1 ในส่วน 83 kDa และ 42 kDa มีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* (Riley et al., 1992) การศึกษาในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคต่ำ (hypoendemic area) ในประเทศซูดาน พบว่าผู้ติดเชื้อมาลาเรียมีแอนติบอดีตอบสนองต่อบริเวณที่ 2 ในระดับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การตอบสนองที่เกิดขึ้นนั้นคงอยู่ได้ในระยะหนึ่งแล้วจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งการตอบสนองดังกล่าวยังมีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ของ *P. falciparum* (Cavanagh et al., 1998) นอกจากนี้การศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อบริเวณ tripeptide repeats ในบริเวณที่ 2 ของ PfMSP1 ในกลุ่มประชากรจำนวนมากที่อาศัยอยู่ในเขตปรากฏโรคหลายพื้นที่ พบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเกิดอาการของโรคมาลาเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแอนติบอดีที่ตอบสนองจะมีความจำเพาะต่ออัลลีล (allele-specific) โดยพบว่าการตอบสนองของแอนติบอดีต่ออัลลีล MAD20 และ K1

อยู่ในระดับที่สูง แต่อัลลีล R033 ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติ (Conway et al., 2000) เช่นเดียวกับการตอบสนองของแอนติบอดีต่อบริเวณที่ 1 (Cavangh et al., 1998) และ MSP1 ขนาด 19 kDa ในบริเวณที่ 17 (Locher et al., 2001) ซึ่งพบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อน้อยมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย