

การผลิตโปรตีนลูกผสมของสปอร์โรซอยด์ทรีโอฟีนแอสปาราจีนิซโปรตีน
ของพลาสโมเดียม พัลซิพารัม เพื่องานทางด้านชีวรีโมเดดิฟิเคชัน



นายจิตรกุล สุวรรณเจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF RECOMBINANT *Plasmodium falciparum*
SPOROZOITE THREONINE-ASPARAGINE-RICH PROTEIN
FOR SEROEPIDEMIOLOGIC STUDY

Mr. Chittakun Suwancharoen



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Parasitology

Department of Parasitology

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตโปรตีนลูกผสมของสไปโรออยด์ทรีไอนีนแอสปาราจีน
รีไซโคลของพลาสโมเดียม ฟัลซิพาร์ม เพื่องานทางด้านชีวรั
มบาดวิทยา

โดย

นายจิตรกุล สุวรรณเจริญ

สาขาวิชา

ปรสดีวิทยาทางการแพทย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้แนบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อดิศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ธีรยุทธ จันทร์ชุม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมชาย จงวุฒิเวศย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ธนาภรณ์ รุ่งเรือง)

จิตรกุล สุวรรณเจริญ : การผลิตโปรตีนลูกผสมของสปอโรไซทอไรโอไนน์แอสปาราจีนริชโปรตีนของ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เพื่องานทางด้านชีวโมเลกุลวิทยา. (PRODUCTION OF RECOMBINANT *Plasmodium falciparum* SPOOROZOITE THREONINE-ASPARAGINE-RICH PROTEIN FOR SEROEPIDEMIOLOGIC STUDY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. นพ. ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. ดร. จตุรงค์ พุทธิพิทย, 109หน้า.

โปรตีนบนผิวของสปอโรไซทอไรโอไนน์ของเชื้อมาลาเรียเป็นเป้าหมายสำคัญในการทำปฏิกิริยากับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ แม้ว่า circumsporozoite protein (CSP) จะเป็นโปรตีนหลักและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในคนและสัตว์ทดลองได้ แต่ยังมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ บนผิวของสปอโรไซทอไรโอไนน์ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน นอกเหนือจาก thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) แล้ว ยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีขนาด 78 กิโลดาลตัน ซึ่งพบบนผิวของสปอโรไซทอไรโอไนน์ของ พลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เรียกว่า sporozoite threonine-asparagine-rich protein (STARP) ซึ่งมีศักยภาพในการนำมาเป็น องค์ประกอบของวัคซีนป้องกันมาลาเรียต่อระยะก่อนการเจริญในเม็ดเลือดแดงเพราะแอนติบอดีจากเปปไทด์สังเคราะห์จากส่วนของ STARP สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอโรไซทอไรโอไนน์เข้าสู่เซลล์ตับ โครงสร้างของ STARP ในส่วนกลางมีบริเวณซ้ำกันของ กรดอะมิโน 45 ตัวและมีการกระจายของกรดอะมิโนซ้ำกันเป็นชุด ๆ ละ 10 ตัว ส่วนทางด้าน N- และ C-terminus ไม่มีการซ้ำกันของกรดอะมิโน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาตัวอย่างพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมจากทั่วโลก พบว่าความหลากหลายของลำดับเบส มีอย่างจำกัดในยีน STARP โดยบริเวณ C-terminus ของโปรตีนนี้อยู่ภายใต้อิทธิพลของการคัดเลือกในเชิงบวก ซึ่งอาจเป็นผล จากแรงกดดันของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อโปรตีนดังกล่าว เนื่องจากองค์ความรู้เกี่ยวกับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อ STARP จากการติดตามธรรมชาติของผู้อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาดมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการผลิตโปรตีน ลูกผสมขนาด 17 กิโลดาลตัน จากบริเวณ C-terminus ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 146 ตัวและทำการทดสอบหาปฏิกิริยาที่ ให้ผลบวกกับซีรัมของผู้ป่วยพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (10 ตัวอย่าง) และทดสอบปฏิกิริยาที่ให้ผลลบกับซีรัมของคนสุขภาพดีที่ อาศัยในพื้นที่ที่ไม่มีภาวะระบาดของมาลาเรีย (10 ตัวอย่าง) เมื่อทำการวิเคราะห์แอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี Western blot โดยใช้ ตัวอย่างซีรัม 101 ตัวอย่าง จากผู้ติดเชื้อมาลาเรียในจังหวัดตาก ซึ่งแบ่งเป็นผู้ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม (54 ตัวอย่าง) ผู้ติดเชื้อพลาสโมเดียม ไวกัวร์ (20 ตัวอย่าง) และผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อแต่อาศัยอยู่ในพื้นที่ระบาด (27 ตัวอย่าง) พบว่ามีแอนติบอดี ต่อ STARP ในตัวอย่างซีรัมของผู้ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม จำนวน 23 ตัวอย่างจาก 54 ตัวอย่าง (ร้อยละ 42.6) ในขณะที่ตัวอย่างซีรัมจากผู้ติดเชื้อพลาสโมเดียม ไวกัวร์และผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้ออาศัยอยู่ในเขตปรากฏโรมาลาเรียให้ผลลบทุกตัวอย่าง แสดงว่าการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ต่อบริเวณ C-terminus ของ STARP จากการติดตามธรรมชาติมี ความจำเพาะกับเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัม เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิ พารัมกับปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดง ว่าแอนติบอดีต่อ STARP ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อมาลาเรียระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงน่าจะเป็นไปได้ที่วัคซีน ป้องกันมาลาเรียที่มีองค์ประกอบจากบริเวณ C-terminus ของ STARP จะเสริมการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ จากการ ติดเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิพารัมตามธรรมชาติ

ภาควิชา.....ปรสิตวิทยา.....
 สาขาวิชา.....ปรสิตวิทยาทางสัตวแพทย์.....
 ปีการศึกษา.....2552.....

ลายมือชื่อนิสิต.....จิตรกุล สุวรรณเจริญ.....
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5074758730 : MAJOR MEDICAL PARASITOLOGY

KEYWORDS : SPOROZOITE / SPOROZOITE-THREONINE-ASPARAGINE-RICH PROTEIN / *Plasmodium falciparum*

CHITTAKUN SUWANCHAROEN : PRODUCTION OF RECOMBINANT *Plasmodium falciparum*
SPOROZOITE THREONINE-ASPARAGINE-RICH PROTEIN FOR SEROEPIDEMIOLOGIC STUDY.
THESIS ADVISOR : PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES, M.D, Ph.D, THESIS CO-ADVISOR :
ASST. PROF. CHATURONG PUTAPORNTIP, Ph.D., 109 pp.

Surface proteins of the invasive sporozoite stage of malaria parasites are targets of host immune recognition. Although the circumsporozoite protein (CSP) is the major component of sporozoite coat that elicits protective immune responses upon immunization trials in humans and experimental animals, other proteins on the sporozoite surface could additively exert immunoprotective effect. Besides thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), another protein with a molecular weight of 78 kDa found on the surface of *Plasmodium falciparum* sporozoite, designated sporozoite threonine-asparagine-rich protein (STARP), has been considered to be a potential pre-erythrocytic vaccine candidate because synthetic peptide derived from short segments of STARP and affinity-purified human antibodies directed against this protein could inhibit sporozoite invasion into hepatocytes. One of the remarkable features of STARP is the presence of 45-amino acid repeats and multiple interspersed motifs of decapeptide repeats located at the central portion of the protein flanked by N- and C- terminal non-repeats regions. Despite limited sequence diversity at the STARP locus of *P. falciparum* from worldwide isolates, the C-terminal part of this protein has been evolved under positive selection, probably driven by host immune pressure. Because little is known about naturally acquired immune responses against STARP among individuals living in malaria endemic areas, we produced a recombinant 17 kDa peptide derived from the C-terminal part spanning 146 amino acids and tested for its positive reactivity with pooled sera from patients infected with *P. falciparum* (n = 10) and immunonegativity with sera from 10 healthy subjects living in an area without malaria transmission. Determination of IgG antibody recognition was performed by Western blot analysis of 101 sera from individuals living in Tak Province who were infected, by the time of blood sample collection, with *P. falciparum* (n = 54), *P. vivax* (n = 20) and uninfected individuals living in the same endemic area (n = 27). Results have shown that 23 of 54 sera samples (42.6%) from *P. falciparum*-infected individuals yielded positive reactivity whereas all sera samples belonging to *P. vivax*-infected cases and non-infected individuals living in the same malaria endemic area gave negative tests, suggesting that naturally acquired IgG antibody response against the C-terminal part of STARP is species-specific. However, there is no significant relationship between *P. falciparum* parasite density and IgG antibody reactivity against the C-terminal part of STARP ($p > 0.05$). Provided that antibodies against STARP could confer protection, this finding suggests that anti-STARP antibody has no cross-reactive effect on blood stage parasites. Therefore, it is likely that malaria vaccine derived from the C-terminal part of STARP could be boosted upon natural *P. falciparum* infection.

Department : ..Parasitology.....	Student's Signature ..Chittakun Suwancharoen.....
Field of Study : ..Medical Parasitology.....	Advisor's Signature ..Somchai Jongwutiwes.....
Academic Year : ..2009.....	Co-Advisor's Signature ..Chaturong PutapornTip.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. สมชาย จงวุฒิเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ในการศึกษาวิจัยและดูแลเอาใจใส่ต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างดี ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ เสนอแนะเทคนิคและความคิดเห็นต่างๆ ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ มาด้วยดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ณัฐรอส จันทชุม ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์ ดร. ธนาภรณ์ รุ่งเรือง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณอรุสยา พัฒนวงศ์ คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย คุณธงชัย หงส์ศรีเมือง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ ความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือต่างๆ ตลอดจนความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ คำปรึกษาและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฏ
สารบัญกราฟ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ประวัติของโรคมาลาเรีย.....	6
อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย.....	7
การกระจายทางภูมิศาสตร์.....	8
วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย.....	8
อาการแสดงของโรคมาลาเรีย.....	17
การป้องกันโรคมาลาเรีย.....	18
ชีววิทยาของสปอร์โรซอยต์.....	19
สปอร์โรซอยต์ในยุงพาหะ.....	21
สปอร์โรซอยต์ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง.....	21
รูปแบบการเคลื่อนที่ของสปอร์โรซอยต์.....	22
การลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับของสปอร์โรซอยต์ (Hepatocyte invasion).....	24
ระบบภูมิคุ้มกันต่อ Pre-erythrocytic stage.....	26
วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย.....	28
แนวทางในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย.....	36
อุปสรรคของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย.....	39

บทที่	หน้า
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	43
รูปแบบการวิจัย.....	43
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	43
ระเบียบวิธีวิจัย.....	44
ขนาดของตัวอย่าง (sample size).....	44
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	45
การเก็บตัวอย่างเลือดและซีรัม.....	49
การนับจำนวนเชื้อมาลาเรีย.....	49
การสกัดดีเอ็นเอ.....	51
การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR primers.....	52
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส.....	52
การตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis.....	53
การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์.....	53
การตกตะกอนดีเอ็นเอ (ethanol precipitation).....	54
การเชื่อมผลผลิต PCR กับ pQE-30xa.....	54
การทำทรานสฟอร์มเมชัน (transformation).....	57
การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA.....	58
การเตรียมเชื้อ <i>E. coli</i> และเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน (growth of expression culture).....	58
การสกัดโปรตีนและทำให้บริสุทธิ์ (protein extraction and purification).....	60
การวัดปริมาณโปรตีน.....	61
การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE).....	62
การทำ western blot.....	64
การย้อมสีโปรตีนด้วย coomassie brilliant blue solution.....	64
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	65
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	66
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ 3'non-repeat ของยีน STARP.....	70
ผลการผลิตโปรตีนจากบริเวณ 3'non-repeat ของยีน STARP.....	71

บทที่	หน้า
ผลการทดสอบ 6x His-tag fusion protein กับตัวอย่างซีรัม.....	73
ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย (parasitemia) กับ anti-STARP 3' non repeat antibody.....	75
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	77
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	109



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงการประมาณค่าประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย.....	11
2.	แสดงจำนวนตัวอย่างซีรัมสำหรับการศึกษาจำนวน 111 ตัวอย่าง จากการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2552.....	67
3.	แสดงความสามารถในการเป็นแอนติเจนของ 6x His-tag fusion protein กับตัวอย่างซีรัมทั้ง 4 กลุ่ม.....	73
4.	ตารางขนาด 2x2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า parasitemia กับจำนวนตัวอย่างที่พบหรือไม่พบ anti-STRAP 3'non-repeat antibody เพื่อทดสอบไคสแคร์.....	75
5.	แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i> และตัวอย่างที่ทดสอบพบ anti-STARP 3'non-repeat antibody.....	97

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการกระจายตัวของเชื้อมาลาเรีย.....	9
2. แสดงจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2550.....	10
3. แสดงวงชีวิตของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่องและในคน.....	16
4. แสดงโครงสร้างของสปอร์โรซอยต์และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง.....	20
5. แสดงโครงสร้างของยีน STARP ใน <i>P. falciparum</i>	33
6. แสดงการเชื่อมระหว่างดีเอ็นเอ STARP 3' non-repeat จากผลผลิต PCR และ pQE-30Xa โดยอาศัยปลายที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III.....	59
7. แสดงการถ่ายโปรตีนลงบน PVDF member โดยวิธี semi-dry transfer.....	63
8. แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	70
9. แสดงโปรตีนของ STARP 3'non-repeat มีขนาด 17 kDa.....	72
10. แสดง 6X his-tag fusion protein ทำปฏิกิริยากับซีรัมของกลุ่มตัวอย่าง.....	74
11. A) แสดงแผนที่ยีนของดีเอ็นเอพาหะ pQE-30Xa ขนาด 3.5 kb และ B) แสดง บริเวณของ RGS-His epitope และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	100
12. แสดงแผนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	101
13. แสดงแผนที่ยีนของ pREP-4 ขนาด 3,740 bp.....	102

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1.	แสดงข้อมูลทั่วไปของเพศชายและเพศหญิงในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i>	68
2.	แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มอายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i>	68
3.	แสดงข้อมูลทั่วไปของความหนาแน่นของเชื้อ <i>P. falciparum</i> (parasitemia : parasites/ μ l) ของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด <i>P. falciparum</i>	69



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญกราฟ

กราฟที่		หน้า
1.	กราฟเส้นตรงแสดงค่าความขุ่นที่ 595 นาโนเมตร ของ bovine serum albumin.....	61



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ความเจ็บป่วยและการตายของประชากรโลกที่มีสาเหตุมาจากโรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสำคัญ โดยเฉพาะประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่กึ่งโรค ซึ่งเป็นแหล่งระบาดของเชื้อมาลาเรียอย่างหนาแน่นและอีกหลายประเทศในเขตร้อนทั่วโลก แม้ว่าองค์การอนามัยโลกจะพยายามควบคุมสถานการณ์ของโรคมาลาเรีย แต่ในทุก ๆ ปียังคงมีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมากกว่า 350 ถึง 500 ล้านคน และพบอัตราการเสียชีวิตโดยรวมมากกว่า 2 ล้านคนต่อปี ซึ่งผู้ป่วยที่เสียชีวิตประมาณ 8 แสนรายเป็นเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี (WHO, 2007) สำหรับประเทศไทย โรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่ต้องเฝ้าระวัง ซึ่งในแต่ละปีพบผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรียมากกว่าร้อยละ 70 อาศัยอยู่ในจังหวัดพื้นที่ชายแดนไทยกับพม่า เช่น ตาก แม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี พื้นที่ชายแดนไทยกับกัมพูชา เช่น ตราด จันทบุรี ปราชญ์บุรี รวมถึงพื้นที่ทางภาคใต้ เช่น ยะลา นราธิวาส และปัตตานี เป็นต้น (Thimasan et al., 1995) เนื่องจากผู้ติดเชื้อมาลาเรียส่วนใหญ่อยู่ในวัยทำงาน โดยเฉพาะผู้ที่ใช้แรงงาน จึงนับว่าเป็นการสูญเสียทรัพยากรแรงงานอันส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและการพัฒนาประเทศ

มาลาเรียหรือไข้จับสั่นเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวชนิดหนึ่งใน phylum Apicomplexa, class Sporozoa, genus *Plasmodium* โดยมียุงก้นปล่องเพศเมีย (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะนำโรค ในธรรมชาติพบเชื้อมาลาเรียมากกว่า 120 สปีชีส์ในโฮสต์ที่แตกต่างกัน แต่เชื้อมาลาเรียที่ก่อโรคในคนมี 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียต้องอาศัยโฮสต์ 2 ชนิด คือยุงและคน โดยการเจริญสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) เกิดขึ้นในยุงก้นปล่อง เรียกกระบวนการนี้ว่า sporogony และการเจริญสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) เกิดขึ้นในคน เรียกกระบวนการนี้ว่า schizogony (Garcia, 2007) ซึ่งเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 สปีชีส์ที่สามารถติดเชื้อในคนนั้น พบว่า *P. falciparum* ก่อให้เกิดความรุนแรงและพบได้มากที่สุด อีกทั้งยังทำให้ผู้ติดเชื้อถึงแก่ชีวิตได้ นอกจากนี้การดื้อยาหลายชนิดของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ *P. falciparum* ในเขตพื้นที่ปรากฏโรคและความต้านทานต่อยาฆ่าแมลงที่มากขึ้นของยุงก้นปล่องเป็นปัจจัยสำคัญที่เป็นอุปสรรคและส่งผลกระทบต่อ การป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรีย ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดความรุนแรงและมีประโยชน์ในการควบคุมการ

แพร่ระบาดของโรคมาลาเรียคือ การพัฒนาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย (Wernsdorfer, 1991)

ในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียจะมีรูปร่างลักษณะตลอดจนโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันตามระยะที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ผิวของเชื้อมาลาเรียมีความจำเพาะต่อระยะของเชื้อ ดังนั้นหลักการของการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่ดีคือ ความต้องการโปรตีนหลายชนิดมาเป็นองค์ประกอบร่วมของวัคซีน ซึ่งควรได้มาจากหลายระยะในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียและต้องมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้ (Miller et al., 1986) ซึ่งในปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียได้ถูกพัฒนาขึ้นมาหลายชนิด โดยแบ่งตามเป้าหมายในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อมาลาเรียตามระยะในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย ได้แก่

- วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในระยะก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccines) เช่น RTS,S recombinant vaccine, CS102 vaccine หรือ ME-TRAP vaccine เป็นต้น (Bojang, 2006; Roggero et al., 1995; Gillbert et al., 1997)
- วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะที่เจริญในเม็ดเลือดแดง (asexual erythrocytic stage vaccines) เช่น SPf66 vaccine หรือ MSP-1/AMA-1 combination vaccine เป็นต้น (Graves et al., 2006; Zhang et al., 2005)
- วัคซีนป้องกันการแพร่กระจายเชื้อมาลาเรียระยะที่มีการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ (sexual stage vaccine) เช่น Pfs25 vaccine เป็นต้น (Akarawa et al., 2005)

Pre-erythrocytic vaccine มีเป้าหมายสำคัญในการยับยั้งการลุกลามของสปอโรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับหรือทำลายสปอโรซอยต์ในระบบไหลเวียนเลือดและในเซลล์ตับ ซึ่งระยะสปอโรซอยต์เป็นระยะหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากสปอโรซอยต์เป็นระยะติดต่อและอยู่เป็นอิสระในกระแสเลือดเป็นช่วงเวลาสั้น ๆ ก่อนที่จะลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ ดังนั้นจึงมีโอกาสที่สปอโรซอยต์จะถูกทำลายได้โดยแอนติบอดี ระยะดังกล่าวจึงน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียได้ หากวัคซีนจากระยะนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ที่ได้รับวัคซีนจะไม่เกิดการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดง ทำให้ไม่มีอาการของโรคมาลาเรียเลย นักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงเชื่อว่าวัคซีนจากระยะนี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรียได้ดีที่สุด (Druilhe, 2007) ซึ่งมีหลักฐานที่แสดงถึงบทบาทของ pre-erythrocytic vaccine โดยเริ่มต้นจากการทดลองใช้สปอโรซอยต์ของ *P. gallinaceum* ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตฉีดเข้าไปในสัตว์ปีก พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้ (Mulligan et al., 1941)

ต่อมาภายหลังมีการทดลองใช้สปอโรซอยต์ของ *P. berghei* ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ (X-irradiated sporozoites) ฉีดเข้าไปในหลอดเลือดดำของหนู พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้ป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ และยังให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อทำการทดลองในอาสาสมัคร (Nussenzweig et al., 1969)

โปรตีนหลักที่ใช้เป็นองค์ประกอบของ pre-erythrocytic vaccine คือ *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein (PfCSP) ที่มีน้ำหนักประมาณ 54 กิโลดาลตัน ซึ่งบริเวณส่วนกลางของ CSP มีกรดอะมิโน 4 ตัวเรียงซ้ำกันเป็นชุด (central tetrapeptide repeat region) ได้แก่ asparagine, alanine, asparagine, proline (NANP) และ asparagine, valine, glutamic acid, proline (NVDP) โดยบริเวณ repeat นี้ประกอบด้วย B-cell epitope ซึ่งแอนติบอดีต่อบริเวณดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอโรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับได้ (Hughes, 1991) จากการศึกษาบริเวณ C-terminus ใน CSP ของ *P. falciparum* พบว่าประกอบด้วย T-cell epitope อย่างน้อย 2 ตำแหน่งคือ Th2R และ Th3R ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของลำดับเบสสูง (Good et al., 1987) โดยบริเวณดังกล่าวนี้มีรูปแบบการแทนที่ของเบสใน codon ของ epitope แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อ และการแทนที่ของเบสใน Th2R และ Th3R ทำให้กรดอะมิโนของ codon นั้นเปลี่ยนชนิดเสมอ (Lockyer et al., 1989; Jongwutiwes et al., 1994) การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนี้ทำให้การตอบสนองของ T cell ต่อบริเวณดังกล่าวลดลงหรือไม่ตอบสนองเลย ดังนั้นความหลากหลายในลำดับเบสที่เกิดขึ้นจึงสามารถอธิบายการหลบหลีกของเชื้อมาลาเรียต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (Plebanski et al., 1999) ด้วยเหตุนี้จึงมีประเด็นที่น่าสังเกตว่าประสิทธิภาพในการป้องกันโรคมาลาเรียของ CSP-derived vaccine ให้ประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า irradiated sporozoite vaccine ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของโปรตีนชนิดอื่น ๆ ของระยะสปอโรซอยต์สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ จึงเริ่มมีการหาโปรตีนชนิดใหม่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้กับ pre-erythrocytic vaccine โดยการทดลองใช้ CSP ร่วมกับ Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) ของ *P. yoelii* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียของหนู พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้มีภูมิต้านทานต่อการเปลี่ยนระยะของเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์และให้ประสิทธิภาพที่สมบูรณ์กว่าการเลือกใช้โปรตีนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น จึงแสดงให้เห็นว่าภูมิต้านทานที่ให้ประสิทธิภาพสมบูรณ์สำหรับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในระยะก่อนที่เชื้อจะลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ (pre-erythrocytic stage) ควรเป็นผลรวมจากการกระตุ้นด้วยโปรตีนบนผิวของสปอโรซอยต์มากกว่า 1 ชนิด (Khusmith et al., 1991)

นอกจาก CSP และ TRAP ที่จัดว่าเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการพัฒนา pre-erythrocytic vaccine แล้ว ยังมีการศึกษาโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่แสดงออกในระยะสปอโรซอยต์และระยะที่เชื้อ มาลาเรียเริ่มเจริญในเซลล์ตับ ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาด 78 กิโลดาลตัน เรียกโปรตีนชนิดนี้ว่า Sporozoite threonine and asparagine-rich protein (STARP) (Fidock et al., 1994a) จาก การศึกษาโครงสร้างของยีน STARP พบว่ามีความยาวประมาณ 2.7 กิโลเบส มีองค์ประกอบของ threonine และ asparagine 604 ตัว และประกอบด้วยบริเวณ intron คั่นกลางระหว่าง 5' miniexon และ 3' large exon โดยโครงสร้างทางด้านปลาย 5' และ 3' เป็นส่วน non-repetitive region ในส่วนกลางเป็น repetitive region ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ Mosaic (M), Rp45 region เป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนซ้ำกัน 2 ชุด ชุดละ 45 ตัว และ Rp10 region เป็นบริเวณที่มี กรดอะมิโนซ้ำกัน 26 ชุด ชุดละ 10 ตัว และยังพบว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในบริเวณ ส่วนกลางของ STARP ส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนชนิดชอบน้ำ (hydrophilic) (Fidock et al., 1994b) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจากประเทศบราซิล เคนย่า ไทย และแอฟริกาฝั่งตะวันตก ด้วย วิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP) แสดงให้เห็นถึง STARP มีความ หลากหลายของยีนต่ำมาก จึงเหมาะสมที่จะนำ STARP มาพัฒนาเป็นองค์ประกอบของ pre-erythrocytic vaccine (Fidock et al., 1994b; Jongwutiwes et al., 2008)

สิ่งสำคัญจากการศึกษาโปรตีน STARP คือสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบ natural infection หรือ immunization จากการให้ synthetic peptides ในบริเวณส่วนกลางและ ปลายด้าน 3' ของยีน STARP พบว่าซีรัมของผู้ป่วยชาวแอฟริกันมีแอนติบอดีต่อ synthetic peptides นี้ โดยเฉพาะส่วนของ Rp10 (specific Rp10 antibodies) สามารถยับยั้งการลุกลาม ของสปอโรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับอย่างมีประสิทธิภาพถึงร้อยละ 90 ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลของแอนติบอดี ต่อ CSP และยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการลุกลามดังกล่าวของแอนติบอดีต่อ STARP มีความแปรผันโดยตรงกับปริมาณของแอนติบอดี (Pasquetto et al., 1997) ต่อมาภายหลังมีการ ทดลองใช้ synthetic peptides จาก *P. falciparum* pre-erythrocytic antigen 4 ชนิด ได้แก่ Liver stage specific antigen 1, 3 (LSA 1,3), Sporozoite and liver stage antigen (SALSA) และ STARP พบว่า synthetic peptide จากบริเวณ Rp10 ของ STARP สามารถกระตุ้นระบบ ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ให้ตอบสนองได้ดีใน B cell (Lalvani et al., 1998) ทั้งในกรณีที่ศึกษาโดยใช้ลิง *Aotus lemurinus* (Perlaza et al., 1998) และลิง chimpanzee (BenMohamed et al., 2004)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงศักยภาพของ STARP โดยการทดลองใช้ synthetic peptides จากส่วนต่าง ๆ ของโปรตีน STARP เพื่อทำการเกาะติดกับเซลล์ตับในหลอดทดลอง พบว่ามี synthetic peptides อย่างน้อย 12 ชนิด ทั้งในส่วนของ N-terminus บริเวณส่วนกลางที่มีการซ้ำกันและทางด้าน C-terminus สามารถเกาะติดกับเซลล์ตับในหลอดทดลองได้ดีมาก (Lopez et al., 2003) ถึงแม้ว่าหน้าที่ของ STARP ใน *P. falciparum* ต่อระยะสปอโรซอยต์ยังไม่ทราบชัดเจน แต่องค์ความรู้ที่ได้กล่าวไปข้างต้นนั้นเป็นการสนับสนุนว่า STARP มีส่วนสำคัญในการเกาะติดของสปอโรซอยต์กับเซลล์ตับในขั้นตอนการลูกกลมเข้าสู่เซลล์ตับ และพบหลาย ๆ epitopes บนโปรตีน STARP เป็นส่วนสำคัญที่จะสามารถพัฒนาเป็นองค์ประกอบของ pre-erythrocytic vaccine เพื่อป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรียต่อไป

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับ STARP ในปัจจุบันยังมีอยู่อย่างจำกัด อีกทั้งนักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกต่างพยายามศึกษาค้นคว้าหา pre-erythrocytic vaccine เพื่อนำมาป้องกันโรคมาลาเรีย ไม่ว่าจะเป็น RTS,S vaccine, CS102 vaccine หรือ ME-TRAP vaccine เป็นต้น ซึ่งวัคซีนที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเหล่านี้ ยังไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ให้ป้องกันโรคมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องหาแอนติเจนที่สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์เกิดการตอบสนองได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาความสามารถของ STARP ในการเป็นแอนติเจนจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนในอนาคตสำหรับประเทศไทยและเขตปรากฏโรคอื่น ๆ หากวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียประสบผลสำเร็จ ก็นับได้ว่าเป็นความสำเร็จต่อมวลมนุษยชาติในการป้องกันโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุของความเจ็บป่วยและการตายปีละหลายร้อยล้านคนอีกด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติของโรคมาลาเรีย

โรคมาลาเรียมีมาแต่โบราณกาล โดยมีคำจารึกในอินเดีย จีน อียิปต์และญี่ปุ่น ซึ่งความเชื่อของชาวจีนโบราณและชนชาติอื่น ๆ ต่างเพ่งไปยังภูติผีปีศาจหรือเหตุการณ์เหนือธรรมชาติ ในสมัยเมื่อ 1,500 ปีก่อน แพทย์ชาวกรีกชื่อ Hippocrates เชื่อกันว่าเป็นนักมาลาเรียวิทยาคนแรก เพราะเขาไม่เชื่อในสิ่งดังกล่าวและเขาเป็นคนแรกที่ได้บรรยายถึงอาการไข้ได้อย่างสมบูรณ์ โดยแยกเป็นไข้ทุกวัน (quotidian), ไข้วันเว้นวัน (tertian) และไข้วันเว้นสองวัน (quartan) นอกจากนี้เขายังได้วิจารณ์ถึงลักษณะพิเศษหลายประการของอาการไข้ ได้แก่ ปวดหัว หนาวสั่น และมีไข้กลับ ก่อนหน้าที่จะมีการค้นพบสาเหตุที่แท้จริง ก็มีความเชื่อว่าแบคทีเรียเป็นสาเหตุ ในปี ค.ศ. 1849 Virchow สังเกตเห็นเม็ดสีในเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยเรียกภาวะนี้ว่า melanemia (เลือดมีสีดำ) ซึ่งศาสตราจารย์ Achillies Kelsch ที่โรงพยาบาล Val-de-Grace ในปารีสก็ศึกษาอยู่แต่หาผู้ป่วยไม่ค่อยได้ ต่อมานายแพทย์ Charles Louis Alphonse Laveran จากประเทศเยอรมนี ซึ่งได้รับการฝึกฝนทางด้านจุลทรรศน์ศาสตร์มาเป็นอย่างดี ได้รับมอบหมายไปทำงานที่ Val-de-Grace เป็นเวลา 5 ปี โดยศึกษา melanemia กับ Kelsch ต่อมาได้รับมอบหมายให้ไปประจำที่ประเทศแอลจีเรีย เพื่อศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังกล่าว โดยเขาตรวจเลือดสด ๆ จากคนไข้และสังเกตเห็น "pigment bodies" โดยเห็นเป็นเส้นเรียวยาวเล็กสะบัดอยู่รอบนอกของก้อนดังกล่าว (คือ exflagellation ของ *P. falciparum*) Laveran ได้ศึกษาต่อและรวบรวมผลการศึกษาของผู้ป่วย 432 ราย ตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 1884 ซึ่งต่อมาผลการค้นคว้าของเขาก็ได้รับการเชื่อถือและยอมรับและได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1907

ความเชื่อที่ว่ายุงเป็นพาหะของโรคมาลาเรียมีมานานแล้วและทฤษฎีที่ว่ายุงเป็นตัวแพร่เชื้อโรคมาลาเรียนี้ได้รับการผลักดันมากที่สุดจาก Patrick Manson ผู้ค้นพบไมโครฟิลาเรียเจริญเป็นระยะติดต่อยุงได้ ในปี ค.ศ. 1897 Ronald Ross แพทย์ชาวอังกฤษ ทำการทดลองในยุงก้นปล่องก็พบซิสต์ฝังอยู่ที่กระเพาะอาหารของยุง ในปีเดียวกัน William George MacCallum ที่ Johns Hopkins พบการผสมระหว่าง gamete โดย Ross ได้ศึกษามาลาเรียของนกจนครบวงจรชีวิตในยุงและได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1902 ซึ่งวงชีวิตของมาลาเรียในยุงก้นปล่องได้รับการค้นพบอย่างสมบูรณ์จากการศึกษาของ Amigo Bignami และ Giovanni Grassi ในปี ค.ศ. 1898

การเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในตับ พบโดย Shortt และ Garnham ในปี ค.ศ. 1948 และเป็นพื้นฐานสำคัญในการตั้งทฤษฎี “sequential schizont hypothesis” หรือ “secondary exoerythrocytic schizogony” เพื่ออธิบายไข้กลับในมาลาเรีย (Russel, 1955; Smith et al., 1985)

อนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งมีองค์ประกอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) แยกนิวเคลียสออกจากไซโตพลาสซึมอย่างชัดเจน สามารถจัดหมวดหมู่ในอนุกรมวิธานของเชื้อมาลาเรียได้ดังนี้

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

เชื้อมาลาเรียใน genus *Plasmodium* ประกอบด้วย species ประมาณ 120 ชนิด ซึ่งมีทั้งที่พบในสัตว์ปีก สัตว์ฟันแทะหรือในลิง แต่เชื้อมาลาเรียชนิดที่พบและทำให้เกิดโรคในคนมี 4 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* และ *Plasmodium ovale* ซึ่งในจำนวนเชื้อมาลาเรียทั้งหมดนี้ *Plasmodium falciparum* มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดเพราะเป็นชนิดที่ก่อความรุนแรงในคนมากที่สุด รองลงมาคือ *Plasmodium vivax* นอกจากนี้ยังพบว่า *Plasmodium* ที่พบในลิง primate หลายชนิดสามารถติดต่อสู่คนเช่น *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* และ *Plasmodium simium* เป็นต้น (Knowles and Das Gupta, 1932; Coatney et al., 1961; Deane et al., 1966)

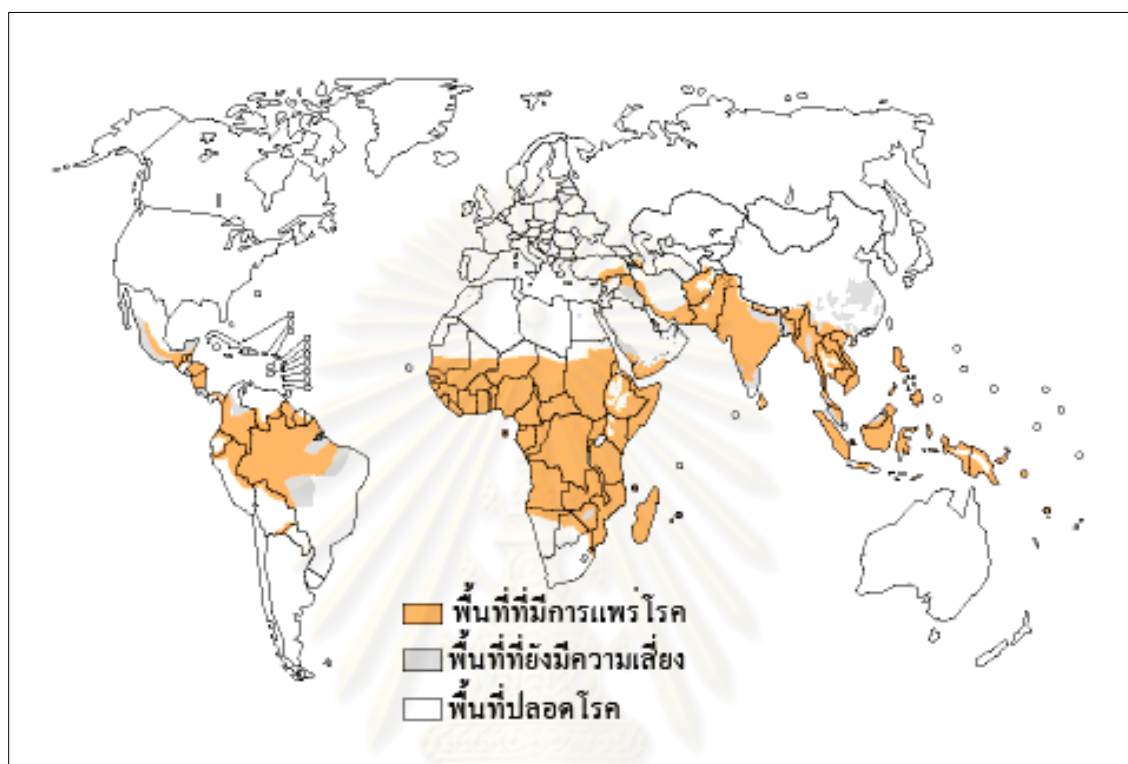
การกระจายทางภูมิศาสตร์

การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งทางเศรษฐกิจ สังคม และลักษณะทางภูมิศาสตร์ การแพร่กระจายของเชื้อพบได้ทั่วโลกระหว่างเส้นรุ้งที่ 64 องศาเหนือ ถึง 32 องศาใต้ โดยเฉพาะประเทศที่อยู่ในบริเวณเขตร้อนและเขตอบอุ่น ประมาณ 90 ประเทศจะมีการกระจายของโรคมากกว่าบริเวณอื่นได้แก่ประเทศในทวีปเอเชีย อเมริกากลางและตอนใต้ ยุโรปและแอฟริกา ดังแสดงในภาพที่ 1 ในแต่ละปีจะพบประชากรทั่วโลกติดเชื้อมาลาเรียกว่า 300 ถึง 500 ล้านคน และมีอัตราการเสียชีวิตประมาณ 1 ถึง 2 ล้านคนต่อปี โดยร้อยละ 60 ของผู้ป่วย และร้อยละ 80 ของการตายจากโรคมาลาเรียทั้งหมดเกิดขึ้นในทวีปแอฟริกา (WHO, 2005) ซึ่งการประมาณค่าประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียในทวีปแอฟริกาที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูงแสดงในตารางที่ 1

สถานการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทย พบผู้ป่วยจากการติดเชื้อมาลาเรียทุกชุมชนในบางบริเวณของประเทศโดยเฉพาะจังหวัดที่ติดกับชายแดนของประเทศพม่า มาเลเซียและกัมพูชา ได้แก่ พื้นที่ในจังหวัด ตาก แม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี จันทบุรี นครศรีธรรมราช ยะลา ชุมพร ระนอง นราธิวาส และประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในปี พ.ศ. 2550 ในประเทศไทย 10 อันดับแสดงดังภาพที่ 2 ในปัจจุบันการติดเชื้อมาลาเรียมีแนวโน้มลดลงมากจากที่เคยพบผู้ป่วยชาวไทยจำนวน 168,370 คน ในปี พ.ศ. 2535 เหลือเพียง 30,612 คน ในปี พ.ศ. 2547 คิดเป็นอัตราป่วยหรือมีอุบัติการณ์ของโรคมาลาเรีย 0.51 ต่อประชากร 1,000 คนและมีผู้ป่วยตายจากโรคมาลาเรีย 230 คน แม้ว่าจำนวนผู้ป่วยจะลดลงอย่างมากโดยลำดับแต่โรคมาลาเรียยังถือเป็นโรคประจำท้องถิ่นที่ต้องเฝ้าระวังของประเทศไทย ซึ่งการระบาดของโรคมาลาเรียในประเทศไทยปรากฏมากใน 2 ช่วงของปี ได้แก่ ในช่วงฤดูฝน คือเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม และฤดูหนาว คือเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม โดยมาตรการควบคุมและป้องกันโรคมาลาเรียดำเนินงานโดยกองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข (Thimasarn, et al. 1995)

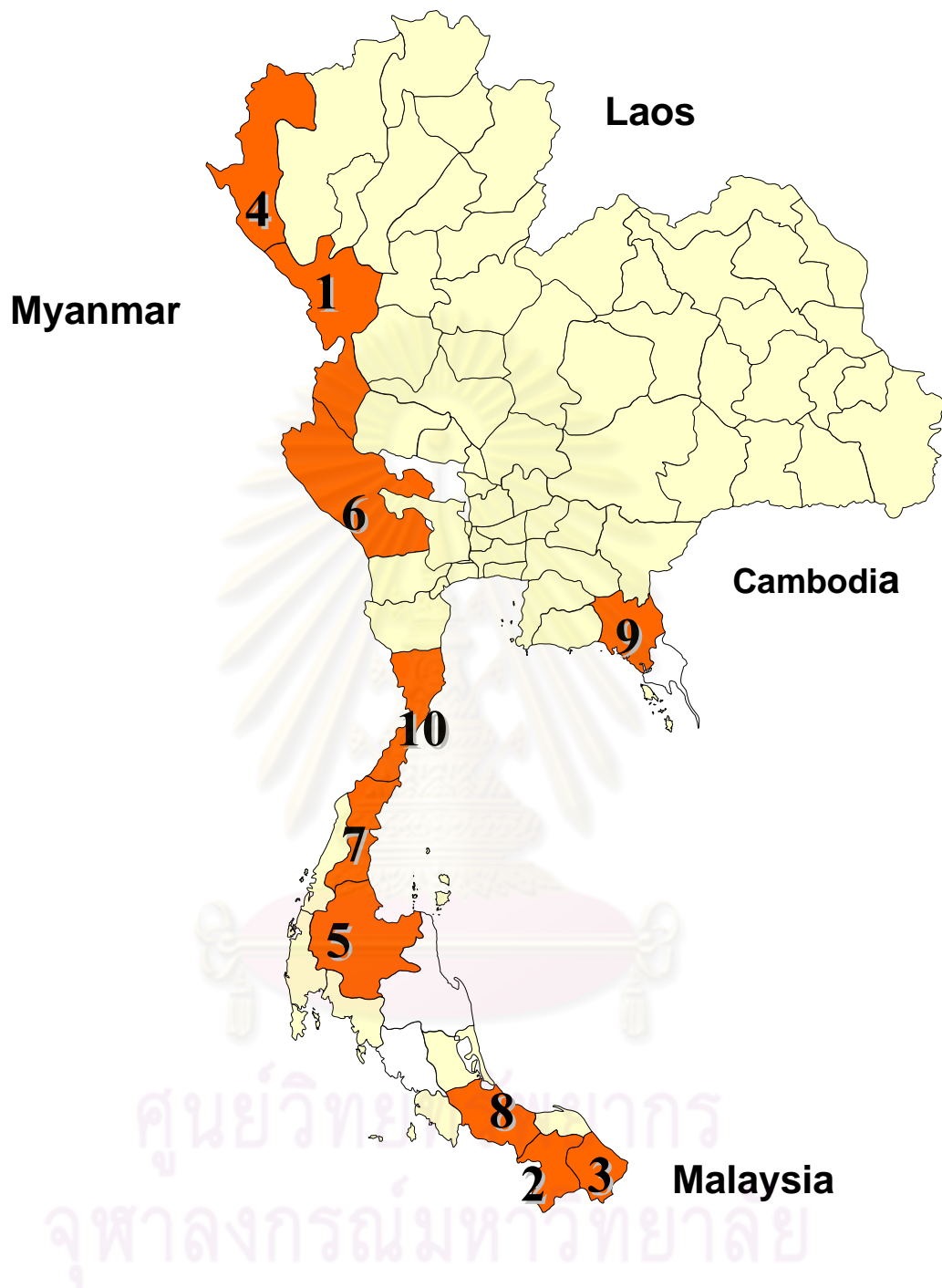
วงชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

วงชีวิตของเชื้อมาลาเรียเป็นแบบเชิงซ้อน โดยสลับระหว่างโฮสต์ 2 ชนิด ได้แก่คนและยุงก้นปล่อง ซึ่งการเจริญเติบโตในยุงเป็นแบบอาศัยเพศ เรียกว่า sporogony ส่วนการเจริญเติบโตในคนเป็นแบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า schizogony ประกอบด้วยการเจริญในเซลล์ตับและการเจริญในเม็ดเลือดแดงตามลำดับ



ภาพที่ 1 แสดงการกระจายตัวของเชื้อมาลาเรีย (www.med.cmu.ac.th)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงจังหวัดที่มีอัตราการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยในประเทศไทยปี พ.ศ. 2551 ได้แก่ 1) ตาก 2) ยะลา 3) นราธิวาส 4) แม่ฮ่องสอน 5) ระนอง 6) กาญจนบุรี 7) ชุมพร 8) สงขลา 9) จันทบุรี และ 10) ประจวบคีรีขันธ์ (สำนักโรคติดต่ออันตราย โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข)

ตารางที่ 1 แสดงการประมาณค่าประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมาลาเรียในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย (ดัดแปลงจาก Worrall et al., 2004)

Estimated population at risk of malaria epidemics			
Country	total population	Estimated percentage of population at risk for epidemics	Estimated number of people at risk for malaria epidemics
Angola	13,527,000	35	4,734,450
Botswana	1,553,000	40	621,200
Burundi	6,501,000	50	3,250,500
Cape Verde	436,000	50	218,000
Chad	8,134,000	15	1,220,100
DR* Congo	52,521,000	10	5,252,100
Eritrea	3,815,000	60	2,289,000
Ethiopia	64,458,000	50	32,229,000
Kenya	31,292,000	25	7,823,000
Madagascar	16,436,000	50	8,218,000
Mali	11,676,000	20	2,335,200
Mauritania	2,746,000	40	1,098,400
Mauritius	1,170,000	40	468,000
Mozambique	18,644,000	20	3,728,800
Namibia	1,787,000	40	714,800
Niger	11,226,000	20	2,245,200
Rwanda	7,948,000	50	3,974,000
Senegal	9,661,000	10	966,100
Somalia	9,156,000	50	4,578,000
South Africa	43,791,000	5	2,189,550
Sudan	31,809,000	50	15,904,500
Swaziland	937,000	40	374,800
Tanzania	35,964,000	25	8,991,000
Uganda	24,022,000	10	2,402,200
Zambia	10,648,000	50	5,324,000
Zimbabwe	12,851,000	28	3,598,280
Total	432,709,000		124,748,180

* DR = Democratic Republic

วงชีวิตการเจริญเติบโตในยุง (sporogony)

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อมาลาเรียระยะแกมมีโตไซต์ที่เจริญเต็มที่ (mature gametocyte) ทั้งเพศผู้ (male gametocyte หรือ microgametocyte) และเพศเมีย (female gametocyte หรือ macrogametocyte) เข้าไปอยู่ในกระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้นประมาณ 10 นาที แกมมีโตไซต์เพศเมียจะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (female gamete หรือ macrogamete) ส่วนแกมมีโตไซต์เพศผู้จะมีการแบ่งนิวเคลียส 3 ครั้ง พร้อมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทำให้เกิดเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gamete หรือ microgamete) จำนวน 8 ตัวที่มีแฟลกเจลลา กระบวนการที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า exflagellation โดยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มีลักษณะยาวรีคล้ายเส้นด้าย นิวเคลียสมีลักษณะอัดแน่นอยู่ตรงกลางเซลล์ ซึ่งการเจริญดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเจริญเป็นไซโกต (zygote) ที่มีขนาดประมาณ 6 ไมโครเมตร รูปร่างกลม ซึ่งจะยังคงอยู่ในช่องว่างของกระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้นประมาณ 20 นาที ไซโกตจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยมีส่วนที่คล้ายเท้าเทียม (pseudopod) ยึดยาวออกแล้วเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหารของยุงและเจริญเป็นโอโอไคไนต์ (ookinete) ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากยุงดูดเลือดคนประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ที่ปลายข้างหนึ่งของโอโอไคไนต์จะมี apical organelle ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เยื่อผนังกระเพาะอาหารของยุงก้นปล่อง แล้วจึงเคลื่อนที่ไซผ่านผนังกระเพาะอาหารไปยัง basal membrane ของเซลล์เยื่อผนังด้านนอกของกระเพาะอาหาร เรียกกระยะนี้ว่า โอโอซิสต์ (oocyst) จากนั้นโอโอซิสต์จะมีการเพิ่มขนาดของไซโตพลาสซึมอย่างรวดเร็ว รวมทั้งนิวเคลียสจะมีการเพิ่มจำนวนอย่างมาก ทำให้ภายในโอโอซิสต์มีหลายนิวเคลียส (polyploid) ในระยะนี้ apical organelle จะสลายตัวไป โดยทั่วไปเส้นผ่านศูนย์กลางของโอโอซิสต์มีขนาดประมาณ 40 ถึง 55 ไมโครเมตร และเรียกกระยะที่เชื้อมาลาเรียอยู่ในโอโอซิสต์นี้ว่า สปอโรโรบลาส (sporoblast) จากนั้นจะเกิดลักษณะคล้ายกับการแตกหน่อออกจากแกนของสปอโรโรบลาสเกิดเป็นสปอโรโรซอยต์ (sporozoite) จำนวนประมาณ 1 ถึง 2 พันตัวต่อ 1 โอโอซิสต์ (Rosenberg and Rungsiwongse, 1991) แต่ละสปอโรโรซอยต์จะมีนิวเคลียส ไมโตรคอนเดรีย และ apicoplast อย่างละอัน เมื่อสปอโรโรซอยต์เจริญเต็มที่ แกนของสปอโรโรบลาสจะมีขนาดเล็กและสลายไปในที่สุด แล้วผนังของโอโอซิสต์ก็จะแตกออก ทำให้สปอโรโรซอยต์กระจายไปทั่วลำตัวของยุง รวมทั้งช่องว่างในทรวงอกและต่อมน้ำลาย ระยะสปอโรโรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียมีรูปร่างคล้ายหนอนขนาดเล็ก มีความยาวประมาณ 10 ถึง 15 ไมโครเมตรและกว้าง 1 ไมโครเมตรที่ปลายด้านหนึ่งมี apical organelle เพื่อใช้ในการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ เมื่อยุงไปกัดคนหรือสัตว์มีกระดูกสันหลัง เชื้อมาลาเรียจะเข้าสู่ร่างกายและเจริญต่อไป สำหรับระยะเวลาดังแต่การเจริญ

จากระยะแกมมาโตไซต์จนถึงสปอร์โรรอยด์จะใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นกับอุณหภูมิและชนิดของเชื้อ มาลาเรีย

วงชีวิตการเจริญเติบโตในคน (schizogony)

- **ระยะการเจริญเติบโตที่อยู่ในตับ (liver stage)**

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคน จะปล่อยเชื้อระยะสปอร์โรรอยด์เข้าสู่กระแสเลือด ภายในเวลา 30 นาที สปอร์โรรอยด์จะเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นแบบไม่อาศัยเพศ เรียกระยะต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์ตับนี้ว่า exo-erythrocytic stage หรือ hepatic stage หรือ pre-erythrocytic stage ระยะนี้จะมีการแบ่งนิวเคลียสหลายครั้งก่อนที่ไซโตพลาสซึมจะแบ่งตัว เรียกระยะนี้ว่าระยะไซซอนต์ (schizont) เมื่อระยะไซซอนต์เจริญเต็มที่ไซโตพลาสซึมจะถูกแยกไปอยู่กับแต่ละนิวเคลียส ทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเดียว เรียกว่า เมอร์โรซอยต์ (merozoite) ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร จำนวนเมอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ตับจากสปอร์โรรอยด์ตัวเดียว จะมีจำนวนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กัชนิดเชื้อมาลาเรีย 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 สำหรับระยะเวลาในการเจริญของสปอร์โรรอยด์จนถึงเป็นระยะเมอร์โรซอยต์ใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กัชนิดของเชื้อมาลาเรียเช่นกัน กล่าวคือ *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) ส่วนสปอร์โรรอยด์ของ *P. vivax* และ *P. ovale* เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับนอกจากจะมีการเจริญเติบโตดังกล่าวแล้ว จะมีบางส่วนที่เข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการหยุดพักการเจริญชั่วคราวและสามารถกลับมาเจริญต่อไปเป็นระยะต่าง ๆ ดังกล่าวได้อีก ซึ่งจะใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กัสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย โดยอาจใช้เวลายาวนานเพียงไม่กี่เดือนหรืออาจจะนานเป็นปี ซึ่งระยะดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยเกิดไข้กลับ (relapse) เรียกระยะที่เชื้อมาลาเรียหยุดการเจริญเติบโตในเซลล์ตับนี้ว่า ระยะ hypnozoite (Krotoski et al., 1980; Krotoski et al., 1982)

- **ระยะการเจริญเติบโตที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง (erythrocytic stage)**

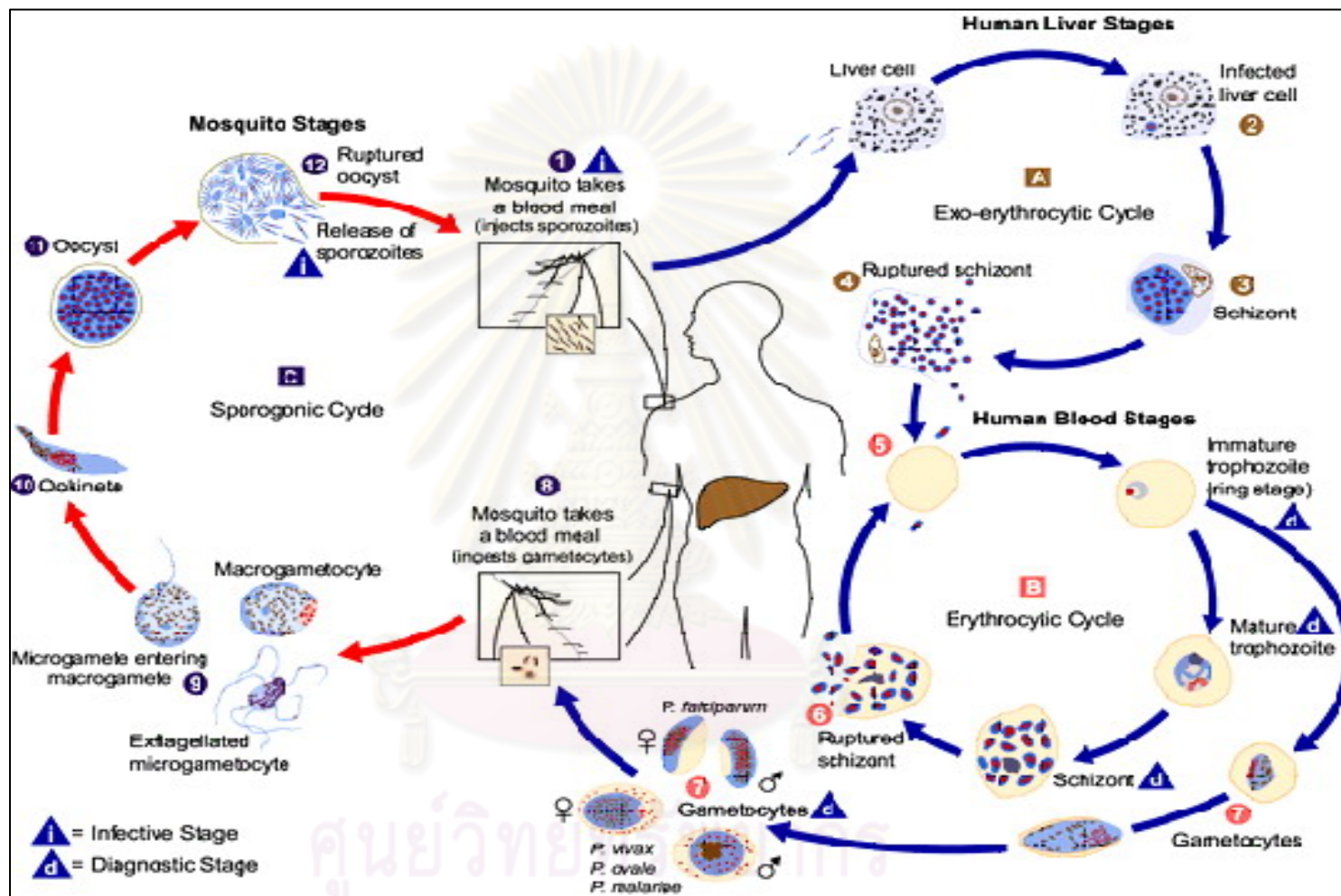
ระยะการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงของคน เรียกว่า asexual erythrocytic stage หลังจากที่เมอร์โรซอยต์แตกออกจากเซลล์ตับจะออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ในกระแสเลือดในระยะเวลาเพียงชั่วขณะแล้วจะบุกรุกเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยอยู่ในช่องว่างภายในเม็ดเลือดแดงที่เรียกว่า parasitophorous vacuole และจะเจริญเติบโตเป็นระยะต่าง ๆ

ตามลำดับดังนี้ เมอร์โรซอยต์ในเม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างคล้ายวงแหวน ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นเว็อนแหวนและนิวเคลียสเป็นหัวแหวนเรียกกระยะนี้ว่า ระยะวงแหวน (ring form หรือ early trophozoite) เมื่อเชื้อมาลาเรียเจริญเติบโตต่อไป ไซโตพลาสซึมจะมีการขยายตัว ออกแต่ยังไม่มีการแบ่งตัว ทำให้มีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน อาจพบลักษณะทำเทียมและส่วนของ vacuole มีขนาดเล็กกลวง เรียกว่าระยะโทรโฟซอยต์ที่กำลังเจริญเติบโต (growing trophozoite) โดย *P. vivax* จะมีลักษณะคล้ายอะมีบา (amoeboid form) และ *P. malariae* จะมีรูปร่างคล้าย แถบคาด (band form) ในระยะนี้เชื้อที่กำลังเจริญเติบโตจะอาศัยสารต่าง ๆ ในเม็ดเลือดแดงเป็นหลัก โดยส่วนใหญ่อาศัยฮีโมโกลบินที่อยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงเป็นอาหาร ฮีโมโกลบิน จะถูกย่อยสลายเป็นฮีม (heme) และโกลบิน (globin) แต่เชื้อมาลาเรียไม่สามารถย่อยฮีมได้ สมบูรณ์ โดยสิ้นสุดการย่อยสลายฮีมให้เป็น ferriprotoporphyrin IX ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเชื้อ มาลาเรีย ดังนั้นเชื้อมาลาเรียจึงมีกระบวนการกำจัดสารดังกล่าวในรูปของกากอาหาร ซึ่งมี ลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลหรือสีดำกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมของเชื้อ เรียกว่า hemozoin หรือ malarial pigment ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของฮีมและไม่มีพิษ ในระยะโทรโฟซอยต์นี้มาลาเรียจะ ปลดปล่อยโปรตีนหลายชนิดสู่เม็ดเลือดแดง อาจอยู่ในรูปของ caveola-vesicle complex ซึ่งสามารถพบได้ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง โดยอยู่ติดกับด้านในของเมมเบรน (Aikawa et al., 1975) เมื่อย้อมด้วยสีอีมีซาลและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นจุดสีชมพู มีลักษณะรูปร่าง แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อมาลาเรีย โดยที่ *P. falciparum* จะพบ Maurer's dots มีลักษณะ รูปร่างเป็นจุดใหญ่หรือแท่งสั้นๆ ส่วน *P. vivax* และ *P. ovale* จะพบ Schuffner's dots มีรูปร่าง เป็นจุดเล็ก ๆ ขนาดเท่ากันกระจายทั่วไป และ *P. malariae* จะพบ Ziemann's dots เห็นเป็นจุด ละเอียดกระจายทั่วไป เมื่อระยะโทรโฟซอยต์เจริญเติบโตเต็มที่ นิวเคลียสจะเกิดการแบ่งตัวหลาย ครั้งภายในไซโตพลาสซึมเดียวกัน ทำให้มีหลายนิวเคลียสเรียกกระยะนี้ว่า ไชซอนต์ระยะแรก (early schizont) และเมื่อไชซอนต์เจริญเต็มที่ จะมีการแบ่งไซโตพลาสซึม ทำให้แต่ละเซลล์มีนิวเคลียส เดียว การแบ่งตัวนี้เรียกว่าไชซอนต์ระยะหลัง (late schizont) ภายในประกอบด้วยเมอร์โรซอยต์ (merozoite) ในช่วงนี้ malarial pigment จะถูกกำจัดออกนอกเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งจะ กระจายไปตามกระแสโลหิตและถูกจับกินโดย phagocyte เช่น Kupffer's cell ในตับ เป็นต้น จำนวนเมอร์โรซอยต์ที่เกิดขึ้นภายในเม็ดเลือดแดงจะมีจำนวนแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของ มาลาเรีย 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) เมอร์โรซอยต์ในไชซอนต์ระยะหลังจะออกมา อยู่ในกระแสเลือดและเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่ แล้วเจริญเติบโตต่อไปเป็นวงจรลักษณะนี้ซ้ำ ๆ กัน

สำหรับเมอริโซซอยต์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดมักจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่มีอายุต่างกัน โดยที่เมอริโซซอยต์ของ *P. vivax* และ *P. ovale* มักจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่มีอายุน้อย (reticulocyte) ส่วนเมอริโซซอยต์ของ *P. malariae* มักจะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก สำหรับเมอริโซซอยต์ของ *P. falciparum* สามารถเข้าสู่เม็ดเลือดแดงทั้งที่มีอายุมากหรือน้อยได้ ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงตั้งแต่ระยะวงแหวนจนถึงระยะเมอริโซซอยต์จะแตกต่างกันกล่าวคือ *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 36 ถึง 48 ชั่วโมง *P. vivax* และ *P. ovale* ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ส่วน *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ช่วงเวลาที่เมอริโซซอยต์แตกออกจากเม็ดเลือดแดงจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการแสดงของโรคในผู้ป่วยมาลาเรีย โดยทำให้เกิดอาการไข้หนาวสั่น

เมื่อเมอริโซซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงและเจริญเติบโตต่อไปหลาย ๆ รอบ จะมีเมอริโซซอยต์บางตัวไม่เข้าสู่วงจรการเจริญเติบโตแบ่งตัว แต่จะเจริญเป็นระยะแกมมีโตไซต์ ซึ่งประกอบด้วยแกมมีโตไซต์เพศผู้และเพศเมีย รูปร่างลักษณะของแกมมีโตไซต์ของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันไป กล่าวคือแกมมีโตไซต์ของ *P. falciparum* มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (crescent form) แกมมีโตไซต์เพศผู้มีลักษณะอ้วนและสั้นกว่าแกมมีโตไซต์เพศเมีย ในขณะที่แกมมีโตไซต์ของ *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* จะมีรูปร่างกลมรี (oval shape) เมื่อย้อมด้วยสียิมซาพบว่าแกมมีโตไซต์เพศเมียจะมีขนาดใหญ่ติดสีเข้ม ส่วนแกมมีโตไซต์เพศผู้มีขนาดเล็กและติดสีอ่อนกว่าเพราะจำนวนไรโบโซมของแกมมีโตไซต์เพศเมียมีมากกว่า สำหรับระยะเวลาที่แกมมีโตไซต์เริ่มปรากฏในกระแสเลือดนั้น มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อมาลาเรีย เช่นกันกล่าวคือ *P. falciparum* เริ่มพบได้วันที่ 8 ถึง 15 ส่วน *P. vivax* และ *P. ovale* พบประมาณวันที่ 5 ถึง 10 และ *P. malariae* เริ่มพบได้ประมาณวันที่ 5 ถึง 23 หลังจากที่ยุงก้นปล่องเพศเมียดูดเลือดคนที่มีเชื้อระยะแกมมีโตไซต์เข้าไป เชื้อมาลาเรียจะเจริญเติบโตในกระเพาะอาหารของยุงต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียในยุงก้นปล่องและในคน (www.dpd.cdc.gov)

อาการแสดงของโรคมาลาเรีย

ช่วงเวลาระยะระหว่างยุงกัดจนถึงพบเชื้อในเม็ดเลือดแดง เรียกว่า prepatent period (ระยะก่อนเชื้อปรากฏ) ซึ่งจะนานกว่าระยะเวลา pre-erythrocytic schizogony ประมาณ 2-3 วัน และจะสั้นกว่าช่วงเวลาที่ตั้งแต่มียุงกัดจนถึงมีอาการไข้ (incubation period หรือระยะฟักตัว) ประมาณ 2 วัน โดยเฉลี่ยแล้วระยะก่อนเชื้อปรากฏของ *P. falciparum*, *P. ovale* และ *P. vivax* ประมาณ 1.5 ถึง 2 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับจำนวนสปอร์โรซอยต์ สายพันธุ์ของเชื้อ ชนิดพันธุ์ของคนและภาวะภูมิคุ้มกันของคน เช่น ระยะก่อนเชื้อปรากฏของ *P. falciparum* กินเวลานานกว่า 2 สัปดาห์ ถ้าได้รับสปอร์โรซอยต์ในจำนวนน้อย

อาการของโรคมาลาเรียที่สำคัญคืออาการไข้เป็นช่วงระยะอย่างสม่ำเสมอ และมักจะเริ่มในตอนบ่าย ซึ่งในแต่ละช่วงแบ่งเป็น 3 ระยะ ได้แก่

1. ระยะหนาวสั่น (cold stage) ผู้ป่วยมีอุณหภูมิร่างกายลดลง มีอาการหนาวสั่น กินเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง อาการหนาวสั่นไม่รุนแรงใน *P. falciparum* แต่รุนแรงมากใน *P. vivax*
2. ระยะไข้ตัวร้อน (hot stage) ผู้ป่วยมีไข้สูง 40 – 41 °C เป็นเวลาประมาณ 1-4 ชั่วโมง
3. ระยะเหงื่อออก (sweating stage) กินเวลาประมาณ 1 – 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่มีอาการไข้ ผู้ป่วยมักจะอ่อนเพลียและมักจะนอนพักในระยะนี้

การเกิดอาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ กันไป โดยเว้นช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า paroxysm ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กันกับระยะที่เมอริโรซอยต์แตกตัวออกจากเม็ดเลือดแดง ดังนั้นเมื่อครบวงจรการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดงแล้วจะทำให้มีอาการไข้หนาวสั่นเกิดขึ้น โดยที่เชื้อชนิด *P. falciparum* จะทำให้เกิดอาการไข้ทุก ๆ 36 ถึง 48 ชั่วโมง *P. vivax* และ *P. ovale* ทำให้เกิดอาการไข้ทุก ๆ 48 ชั่วโมง ส่วน *P. malariae* จะทำให้เกิดอาการไข้ทุก ๆ 72 ชั่วโมง หรือมีไข้วันเว้นสองวัน เชื่อว่าอาการที่เกิดขึ้นมีสาเหตุจากการปลดปล่อยสารพิษของเชื้อมาลาเรียกระตุ้นให้ macrophage หลั่ง tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin (Warrell et al., 1990) ถึงแม้ว่าเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ทำให้เกิดอาการไข้หนาวสั่นคล้ายกันแต่เชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทำให้เกิดพยาธิสภาพและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงมากที่สุดและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ สำหรับอาการแทรกซ้อนที่พบ ได้แก่ ภาวะมาลาเรียขั้นสมอง (cerebral malaria) ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) ภาวะดีซ่าน (jaundice) ภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemia) ภาวะน้ำท่วมปอดที่ไม่ได้เกิดจากหัวใจวาย (noncardiac pulmonary edema) ภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน (acute respiratory

insufficiency) ภาวะความดันโลหิตต่ำจนเกิดอาการช็อค (algid malaria) ภาวะที่เลือดเป็นกรดสูงกว่าปกติ (acidosis) เป็นต้น (Marsh et al., 1996; Imbert et al., 1997; Crawley et al., 1998)

อย่างไรก็ตามหลังจากที่อาการไข้มาลาเรียหายไปแล้ว แต่ถ้ายังมีเชื้อมาลาเรียอยู่ในร่างกาย โดยอาจมีระดับที่ต่ำเกินกว่าจะตรวจพบได้หรือมีเชื้อหลบซ่อนอยู่ในเซลล์ตับจะทำให้มีโอกาสที่จะกลับมาเป็นไข้ได้อีก ถึงแม้ไม่ได้รับเชื้อใหม่ก็ตาม การเกิดอาการไข้กลับแท้ (true relapse) เกิดจากเชื้อมาลาเรียมีระยะพักตัวในตับหรือระยะ hypnozoite และเชื้อสามารถที่จะออกสู่กระแสเลือดได้อีกครั้ง ไข้กลับชนิดนี้สามารถพบได้ใน *P. vivax* และ *P. ovale* ปัจจุบันพบว่าสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงและมาลาเรียมะเร็งขึ้นสมองคือ sequestration หรือการที่เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียระยะที่เจริญมากกว่าระยะวงแหวนหลบซ่อนอยู่ในหลอดเลือดที่หล่อเลี้ยงอวัยวะภายใน เนื่องจากเม็ดเลือดแดงดังกล่าวมีคุณสมบัติเกาะติดเป็นกลุ่มก้อนและเกาะติดผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดการอุดตันภายในหลอดเลือด (microvascular obstruction) ดังนั้นสารอาหารและออกซิเจนจึงไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ได้ไม่เพียงพอ อย่างไรก็ตามหลังจากที่อาการไข้มาลาเรียหายไปแล้ว แต่ถ้ายังมีเชื้อมาลาเรียเหลืออยู่ในร่างกาย ซึ่งอาจจะลดลงจากการได้รับยารักษาโรคมาลาเรียจนตรวจไม่พบได้ด้วยวิธีการตรวจฟิล์มเลือด แต่หลังจากนั้นเชื้อมาลาเรียที่ติดยาหรือหลงเหลืออยู่ในร่างกาย เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนตรวจพบได้อีกครั้งพร้อมกับอาการไข้กลับ เรียกกระบวนการนี้ว่า recrudescence (Miller et al., 1994; Etting et al., 1989)

การป้องกันโรคมาลาเรีย

1. เมื่อต้องเดินทางเข้าไปในเขตป่าเขาควรป้องกันไม่ให้ยุงกัด โดยการนอนกางมุ้งและใช้ยากันยุง
2. ยาที่ใช้ป้องกันตามที่เคยแนะนำในอดีตนั้น พบว่าไม่ได้ผลมากนัก ยาส่วนใหญ่ที่ใช้เช่น
 - 2.1 คลอโรควิน ผู้ใหญ่ให้ 1 เม็ด ทุกสัปดาห์ ป้องกันชนิดเชื้อ *P. falciparum* ไม่ได้ผลและแม้จะป้องกันเชื้อมาลาเรีย *P. vivax* ได้ ก็เป็นการกดอาการไว้ชั่วคราว เมื่อหยุดกินยานี้แล้วผู้ป่วยก็ยังมีอาการกำเริบได้ ภายใน 2-6 เดือน เนื่องจากเชื้อที่หลบซ่อนอยู่ในตับจะออกมาสู่กระแสเลือด
 - 2.2 ซัลฟาดอกซิน-ไพริเมทามีน เช่น "แฟนซีดาร์" ผู้ใหญ่ให้ 1 เม็ดทุกสัปดาห์ หรือ 2 เม็ดทุก 2 สัปดาห์ได้ผลน้อย เพราะทั้ง *P. falciparum* และ *P. vivax* ติดต่อยาชนิดนี้
 - 2.3 ดอกซีไซคลิน ผู้ใหญ่ให้วันละ 100 มก.ทุกวัน ป้องกันมาลาเรียชนิด *P. vivax* ไม่ได้ ส่วนประสิทธิผลในการป้องกันมาลาเรียชนิด *P. falciparum* นั้นยังบอกไม่ได้ชัดเจนว่าสูงเพียงใด

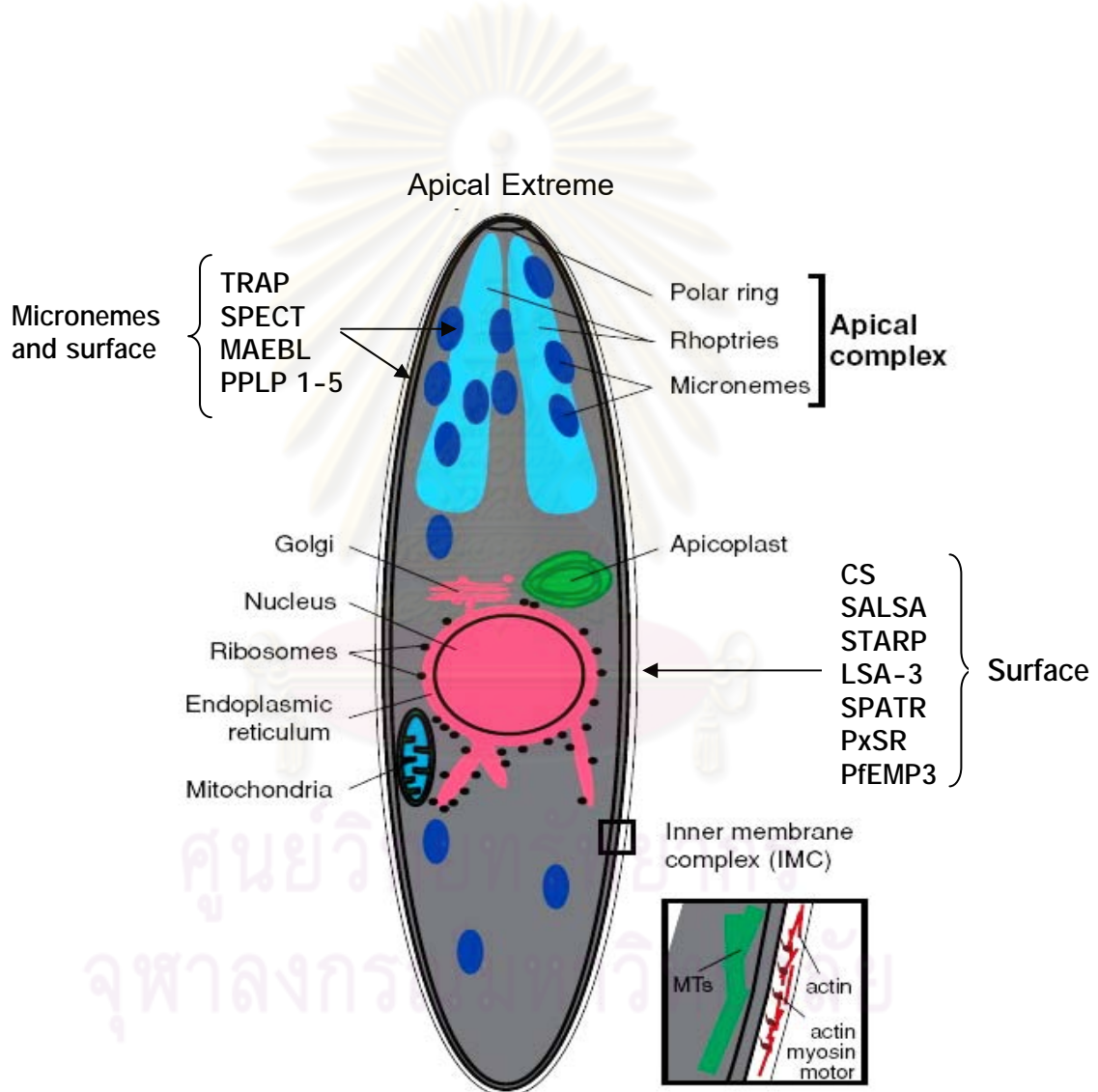
2.4 เมโฟลควิน ผู้ใหญ่ให้ 1 เม็ด ทุกสัปดาห์ แม้จะได้ผลต่อทั้งชนิด *P. vivax* และ *P. falciparum* แต่ก็พบว่ามียาบางรายที่ดื้อยาจึงป้องกันไม่ได้ 100% ดังนั้นในปัจจุบันจึงไม่แนะนำให้กินยาป้องกันล่วงหน้า แต่แนะนำว่าถ้าออกจากป่าแล้วมีอาการไข้หรือมีอาการสงสัยเป็นมาลาเรีย ให้รีบทำการตรวจรักษา หรือในกรณีที่ต้องเข้าไปอยู่ในป่าที่เป็นถิ่นที่มีเชื้อมาลาเรีย คือต่อยาหลายชนิด เป็นเวลานานเกิน 2 สัปดาห์ (ระยะพักตัวของโรค) ก็ควรพกยารักษามาลาเรีย (ได้แก่ ควินิน เมโฟลควิน หรือ อาร์ทีซูเนต) ไว้สำรองใช้ในยามฉุกเฉิน เมื่อไม่สามารถตรวจเลือดได้ โดยใช้ในขนาดที่ใช้รักษามาลาเรีย

ชีววิทยาของสปอโรซอยต์

เชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium* spp.) จัดอยู่ใน phylum Apicomplexa ซึ่งมีเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่สามารถติดเชื้อภายในเซลล์ (intracellular pathogens) เช่น *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* และ *Theileria* โดยเชื้อทั้งหมดใน phylum นี้ มีการเจริญเติบโตและจำลองตัวภายใน nonphagosomal parasitophorous vacuole เมื่อมีการเจริญเติบโตจะมีการสร้างอวัยวะต่าง ๆ เช่น rhoptries, microneme, apical polar ring และ conoid (ภาพที่ 4) โดย rhoptries และ microneme เป็นอวัยวะที่ใช้หลังและบรรจุสารที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ การเกาะติด การลุกลามเข้าสู่โฮสต์เซลล์และการสร้าง parasitophorous vacuole (Ngo et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการสร้างโครงสร้างที่เฉพาะเรียกว่า apicoplast (คล้ายกับ chloroplast) ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีความจำเป็นในการดำรงชีวิตของเชื้อปรสิต ผิวชั้นนอกของสปอริซอยต์จะถูกปกคลุมด้วยเยื่อหุ้มบาง ๆ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีการจำลองตัวโดย plasma membrane และ internal membrane complex (IMC) โครงสร้างนี้มีความสัมพันธ์กับสารใน cytoskeleton หลายชนิด เช่น actin, myosin, microtubules และ filament-like protein เป็นต้น อีกทั้งยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของสปอริซอยต์อีกด้วย (Morrisettes and Sibley, 2002)

การแพร่พันธุ์ของ Apicomplexan จะเกิดขึ้นระหว่างการลุกลามเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ จากนั้นจะมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเชื้อจนกระทั่งเซลล์แตก เชื้อปรสิตจะออกมาภายนอกเซลล์เป็นอิสระแต่ไม่มีการเจริญเติบโตภายนอกเซลล์ จนกว่าจะลุกลามเข้าสู่เซลล์ใหม่ได้ Apicomplexan มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) เป็นส่วนใหญ่ในวงจรชีวิต เมื่อมีการลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อและเซลล์ของโฮสต์จะเกิดกระบวนการแบ่งตัว (differentiation) และเพิ่มจำนวน (proliferation) มีการขยายพันธุ์โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย เมื่อเกิดการปฏิสนธิ จะได้เป็น diploid zygote แล้วจึงเกิดการแบ่งตัวแบบ meiosis ได้เซลล์ที่เป็น haploid อีกครั้ง กลายเป็นระยะติดต่อก้าวเข้าสู่โฮสต์อื่น ๆ ต่อไป (Bannister and Mitchell, 2003)

ระยะสปอโรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียมีรูปร่างคล้ายหนอนขนาดเล็ก มีความยาวประมาณ 10 ถึง 15 ไมโครเมตรและกว้างประมาณ 1 ไมโครเมตร ที่ปลายด้านหนึ่งมี apical organelle เพื่อใช้ในการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ ส่วนกลางของสปอโรซอยต์ประกอบด้วยนิวเคลียส ไมโตรคอนเดรีย และ apicoplast ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งมีไรโบโซมและ endoplasmic reticulum อยู่เป็นจำนวนมาก บนผิวของระยะสปอโรซอยต์ประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ เช่น circumsporozoite protein (CSP) และ thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) เป็นต้น (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของสปอโรซอยต์และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

(ดัดแปลงจาก Kappe et al., 2004)

สปอโรซอยต์ในยุงพาหะ

ในระหว่างการดูดเลือดของยุงก้นปล่องเพศเมียจะมีแกมีโตไซต์ (gametocytes) ทั้งเพศผู้และเพศเมียเข้าสู่กระเพาะของยุง เมื่อมีปัจจัยหรือสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (macrogametocyte) จะกลายเป็นแมโครแกมีต (macrogamete) ซึ่งลักษณะทั่วไปไม่แตกต่างไปจากเดิม ในทางตรงข้ามเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microgametocyte) จะมีการจำลองตัวเกิดการสร้างแฟลกเจลลา (flagella) จำนวน 8 เส้น งอกออกมาจากไซโตพลาสซึม (Kappe et al., 2004; Sinnis et al., 1994) โดยแต่ละเส้นคือไมโครแกมีต (microgamete) เรียกกระบวนการนี้ว่า exflagellation จากนั้นไมโครแกมีตจะเกิดการสับหลุดออกจากเซลล์ไปรวมตัวกับแมโครแกมีตกลายเป็นไซโกต (zygote) ลักษณะลำตัวยาวคล้ายหนอน เรียกว่า โอโอไคเนต (ookinete) ซึ่งจะไชผ่านสูติเซลล์เยื่อบุกระเพาะของยุงทะลุเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างฐานเซลล์ (basal lamina) กับ basement membrane และหลังสารมาหุ้มตัวกลายเป็นโอโอซิสต์ (oocyst) แล้วนิวเคลียสภายในโอโอซิสต์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนสร้างสปอโรซอยต์จำนวนมากมาย เมื่อโอโอซิสต์แตก สปอโรซอยต์จะเข้าสู่เซลล์ต่อมน้ำลาย ซึ่งกลไกในการเจาะผ่าน basal lamina ยังไม่ทราบชัดเจน แต่มีการตรวจพบ circumsporozoite protein (CSP) ในระหว่างที่สปอโรซอยต์เคลื่อนที่ผ่านทะลุไปยัง basal lamina (Pimmenta et al., 1994; Ghosh et al., 2001) สปอโรซอยต์ส่วนใหญ่เมื่อเข้าสู่เซลล์ต่อมน้ำลายจะไปอาศัยอยู่ใน secretory cavity ซึ่งมีคุณลักษณะคือ 1) เป็นระยะติดต่อ 2) สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกิดการตอบสนองได้ 3) แสดงรูปแบบการเคลื่อนที่และความเร็วที่แตกต่างกันในหลอดทดลอง (Frischknecht et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนบนผิวของสปอโรซอยต์อย่างน้อย 3 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการถูกลามของสปอโรซอยต์เข้าสู่ต่อมน้ำลายยุง คือ CSP, TRAP และ membrane apical erythrocyte binding-like surface protein (MAEBL) แต่เมื่อทำการศึกษา TRAP จากสปอโรซอยต์ของ *P. berghei* โดยทำให้กลายพันธุ์ด้วยวิธี homologous recombination พบว่าสปอโรซอยต์ไม่มีความสามารถในการถูกลามเข้าสู่ต่อมน้ำลายยุง อีกทั้งไม่พบการแสดงออกของ MAEBL จึงเป็นการบ่งชี้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิด อาจจะไม่มีความจำเป็นสำหรับสปอโรซอยต์ในการถูกลามเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุง (Myung et al., 2004)

สปอโรซอยต์ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

การติดเชื้อมาลาเรียในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เริ่มต้นจากยุงก้นปล่องเพศเมียไปกัดคน จะมีสปอโรซอยต์ประมาณ 20 ถึง 200 ตัว เข้าสู่ร่างกายผ่านทางผิวหนังแล้วเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือด

โดยใช้ช่วงเวลาสั้น ๆ (Kappe et al., 2003) หลาย ๆ งานวิจัยได้เสนอว่าจำนวนของสปอโรซอइटกับการติดเชื้อมาลาเรียไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนของสปอโรซอइटที่อาศัยอยู่ในต่อมน้ำลายของยุงก้นปล่อง แต่จะขึ้นอยู่กับความสามารถของ salivary channel มากกว่า (Frischknecht et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสปอโรซอइटจะมีความสามารถเป็นระยะติดต่อกจากการกัดของยุงมากกว่าการรีดหรือสกัดเอาสปอโรซอइटจากต่อมน้ำลายยุง (Kappe et al., 2004) เมื่อยุงก้นปล่องกัดคนจะมีการปล่อยสารหลายชนิดในระหว่างการกัด เช่น antihistamines, vasolidators (tachykinin), anticoagulants (thrombin), platelet aggregation inhibitors และ immunomodulator สารเหล่านี้ช่วยให้ง่ายต่อการกัดและดูดเลือด อีกทั้งช่วยให้การกระจายและการรอดชีวิตของสปอโรซอइटมีมากขึ้นอีกด้วย (Baldacci and Menard, 2004; Sidjanski et al., 1997)

รูปแบบการเคลื่อนที่ของสปอโรซอइट

การเคลื่อนที่ของสปอโรซอइटแบ่งออกเป็น 3 ประเภท มีจุดมุ่งหมายเพื่อลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ

1) Sporozoite mobility due to gliding

การเคลื่อนที่แบบลื่นไถลของสปอโรซอइट คือการเคลื่อนที่ของสปอโรซอइटเป็นวงกลมบนพื้นผิวที่เป็นกระจกเมื่ออยู่ในซีรัม การเคลื่อนที่ลักษณะนี้จะอาศัย extracellular locomotion-like migration ที่อยู่บนผิวเซลล์ของสปอโรซอइट ทำให้สามารถเคลื่อนที่ผ่าน subcutaneous tissue และหลอดเลือด (blood vessels) ในขณะที่ยุงมากัดผู้ป่วย (Yuda and Ishino, 2004) ซึ่งการเคลื่อนที่ของสปอโรซอइटในรูปแบบนี้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หรือไม่ขึ้นกับแฟลกเจลลา (flagella) หรือซิเลีย (cilia) (Morrisette and Sibley, 2002) นอกจากนี้ micronemes ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ในระหว่างการเกาะติดของโปรตีนที่หลังมาจาก apical pole โดยโปรตีนนี้ก็จะแพร่กระจายปกคลุมไปทั่ว ๆ ผิวของสปอโรซอइट ซึ่งการเคลื่อนที่เปลี่ยนตำแหน่งของสปอโรซอइटจะเกิดขึ้นเมื่อการเกาะติดมีปฏิสัมพันธ์กับสารเคมีจากภายนอกที่เป็นตัวดึงดูดให้สปอโรซอइटเคลื่อนที่เข้าไปหา จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าเพราะเหตุใดการเคลื่อนที่ของสปอโรซอइटจึงขึ้นอยู่กับ substrates จากภายนอก (Heintzelman, 2003; Sibley et al., 1998) ซึ่งรูปแบบการเคลื่อนที่ในลักษณะนี้มีความจำเป็นสำหรับสปอโรซอइटในการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ จากการศึกษาการยับยั้งการเคลื่อนที่แบบลื่นไถล โดยใช้ actin-depolymerizing substance (cytochalasin) พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการลุกลามของสปอโรซอइटเข้าสู่

เซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบผลกระทบของ cytochalasin ในระหว่างการยับยั้งการเคลื่อนที่และไม่ทราบผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นกับโฮสต์เซลล์ (Mota and Rodriguez, 2002a; Mota et al., 2001)

การเคลื่อนที่ของสปอร์โรซอยต์ในแบบเส้นไถลของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จะมีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่อยู่บนผิวของสปอร์โรซอยต์ จากการศึกษา CSP ด้วยวิธี immunostaining ที่หึ่งมาจากส่วนของ apical extreme และเคลือบอยู่รอบ ๆ ผิวของสปอร์โรซอยต์โดยกระบวนการ actin-dependent จะสะสมไว้ที่ส่วนปลายของสปอร์โรซอยต์ พบว่าการเคลื่อนที่ของสปอร์โรซอยต์ในสิ่งแวดล้อมจะมีการเหนี่ยวนำให้โปรตีนบนผิวของสปอร์โรซอยต์จับกับ substrate ทำให้เกิดลักษณะการเคลื่อนที่เป็นเกลียว (Silvie et al., 2004) ซึ่งการเคลื่อนที่เป็นเกลียวจะถูกยับยั้งเมื่อสปอร์โรซอยต์ถูกบ่มกับ monoclonal antibodies ต่อ CSP ซึ่งการยับยั้งนี้ จะไม่มีการทำลายการหึ่งของโปรตีนแต่การหึ่งโปรตีนจะถูกยับยั้งด้วย calcium chelators หรือ secretion inhibitors จึงจะทำให้สปอร์โรซอยต์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Mota and Rodriguez 2002a) Thrombospondin related adhesive protein (TRAP) เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีการหึ่งในระหว่างการเคลื่อนที่ของสปอร์โรซอยต์ ซึ่งเมื่อทำให้เชื้อมาลาเรีย *Plasmodium* กลายพันธุ์ในส่วนของโปรตีน TRAP พบว่าไม่มีการแสดงออกของ TRAP ในระหว่างการเคลื่อนที่และไม่สามารถดูกลูกลามเข้าสู่เซลล์ได้ จึงมีการเสนอว่าการเคลื่อนที่แบบเส้นไถลนี้มีปัจจัยที่สัมพันธ์กับการดูกลูกลามเข้าสู่เซลล์ของสปอร์โรซอยต์ (Kappe et al., 1999; Sultan et al., 1997) จากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมบ่งชี้ว่าการดูกลูกลามเข้าสู่เซลล์และการเคลื่อนที่ของสปอร์โรซอยต์มีความต้องการสารประกอบจากภายนอกที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะมีการเปลี่ยนบริเวณการเกาะติดแต่ไม่มีผลกระทบต่อเคลื่อนที่ นอกจากนี้ยังมีการเสนอว่า TRAP ทำหน้าที่เสมือนเป็นสะพานเชื่อมระหว่างผิวโครงสร้างของเชื้อมาลาเรียกับตัวรับ (receptors) ที่อยู่บนเซลล์เป้าหมายหรือสารประกอบภายนอกเซลล์ (Buscaglia et al., 2003)

การดูกลูกลามของเชื้อใน Phylum Apicomplexa โดยทั่วไปจะมีการเคลื่อนที่ไปรอบ ๆ โดยอาศัย microtubules และเยื่อหุ้มเซลล์ 3 ชั้นคือ external, central และ internal membranes การเคลื่อนที่แบบเส้นไถลของสปอร์โรซอยต์จะปรากฏเมื่อ actin-myosin motor อยู่ในช่องว่างระหว่าง plasma membrane และ inner membrane complex (IMC) ซึ่ง myosin สามารถจับกับ IMC ได้โดยโปรตีนที่เรียกว่า myosin A tail domain-interacting protein (MTIP) (Bergman et al., 2003) นอกจากนี้ TRAP intracytoplasmic domain สามารถจับกับ F-actin complex โดย glycolytic enzyme aldolase ในขณะที่ intracellular motor ย้าย TRAP ย้อนกลับหลัง ทำให้สปอร์โรซอยต์มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้

2) Mobility for traversing cells

เป็นรูปแบบการเคลื่อนที่ของสปอร์โรรอยด์ข้ามเซลล์ที่เกิดขวางอยู่ข้างหน้า โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เกิดขวางนั้นให้แตก (Yuda and Ishino, 2004) เรียกกระบวนการนี้ว่า active transcytosis ซึ่ง Mota และคณะ (Mota et al., 2001) พบว่าสปอร์โรรอยด์สามารถเคลื่อนที่ข้าม HepG2 cells จากการทำให้ cellular membrane แตกแล้วจึงมีการซ่อมแซมในภายหลัง โดยสปอร์โรรอยด์สามารถเคลื่อนที่ข้ามเซลล์เกิดขวางที่ต่างชนิดกัน เป็นการเตรียมการให้สปอร์โรรอยด์สามารถกลุกลามเข้าสู่เซลล์อื่น ๆ ได้

3) Mobility for invasion

เป็นการเคลื่อนที่เพื่อกลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ การเคลื่อนที่รูปแบบนี้ต้องอาศัยการสร้าง parasitophorous vacuole และอาศัยการเคลื่อนที่แบบลื่นไถล (gliding mobility) ซึ่งตรงข้ามกับการเคลื่อนที่แบบ traversing cells คือไม่มีการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์เซลล์แตก เพียงแค่เกิดการสัมผัสของโฮสต์เซลล์กับ parasitophorous vacuole's membrane เท่านั้น ซึ่งการสัมผัสนี้ทำให้เกิดการกลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงและมีการเจริญเติบโตภายในเม็ดเลือดแดง (Yuda and Ishino, 2004)

การกลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับของสปอร์โรรอยด์ (Hepatocyte invasion)

สปอร์โรรอยด์จะเคลื่อนที่ผ่านหลาย ๆ เซลล์ตับ ก่อนที่จะบุกรุกเข้าสู่เซลล์และพัฒนาไปเป็นระยะ schizont และ merozoite ซึ่งกระบวนการกลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับจะต้องเกิดการจดจำที่จำเพาะระหว่างตัวรับ (receptor) บนผิวของโฮสต์เซลล์กับสปอร์โรรอยด์ แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีปัจจัยอื่น ๆ ของโฮสต์เซลล์ที่มีความจำเป็นต่อการกลุกลามเข้าสู่เซลล์ของเชื้อมาลาเรีย จากการศึกษาของ Mota และคณะบ่งชี้ว่าสปอร์โรรอยด์สามารถเคลื่อนที่ผ่าน Hep 1-6 cells ได้อย่างรวดเร็ว โดยอาศัยกระบวนการซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์เรียกว่า sporozoite transcytosis ซึ่งการเคลื่อนที่ทะลุผ่านเซลล์ลักษณะนี้ ทำให้ง่ายต่อการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ตับของเชื้อมาลาเรีย (Mota and Rodriguez, 2002a) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าทั้งสปอร์โรรอยด์อิสระที่อยู่ในส่วนของของเหลวในไซโตพลาสซึม (cytosol) และสปอร์โรรอยด์ที่อยู่รอบ ๆ parasitophorous vacuole สามารถเคลื่อนที่ข้ามผ่านเซลล์ตับได้ แม้จะมีการโต้เถียงว่าสามารถพบสปอร์โรรอยด์อิสระอาศัยอยู่ใน cytosol ได้จริงหรือไม่ แต่ก็ไม่สามารถปฏิเสธได้ถึง

ความสามารถของสปอร์โรรอยต์ในการเคลื่อนที่ข้ามผ่านเซลล์ตับก่อนที่จะบุกรุกเข้าสู่เซลล์ตับ (Mota et al., 2002b)

นอกจากนี้มีการพิจารณาว่าการเคลื่อนที่ของสปอร์โรรอยต์ในการติดเชื้อ จะมีความสามารถไปกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารต่าง ๆ ภายใน parasitophorous vacuole จึงมีการนำเสนอข้อคิดเห็นว่าสปอร์โรรอยต์จะกลายเป็นตัวกระตุ้นให้มีการปรากฏของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในไซโตพลาสซึม ซึ่งการเคลื่อนที่ของสปอร์โรรอยต์ผ่านเซลล์ตับ ทำให้เซลล์ตับหลั่งสาร hepatocyte growth factor แล้วทำการกระตุ้น hepatocyte growth factor receptors ส่งผลให้เชื้อมาลาเรียไวต่อการติดเชื้อมากขึ้น (Carrolo et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีการแสดงความคิดเห็นว่าการเคลื่อนที่ผ่าน Kuffer cells ของสปอร์โรรอยต์ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการติดเชื้อในเซลล์ตับ ซึ่งสปอร์โรรอยต์ของ *P. berghei* ที่บกพร่องในส่วน SPECT1 และ SPECT2 เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำของหนูพบว่าอัตราการติดเชื้อในเซลล์ตับจะลดลงอย่างมาก แต่อย่างไรก็ดีสปอร์โรรอยต์ก็ยังคงสามารถติดเชื้อในเซลล์ตับในหลอดทดลองได้ (Kappe et al., 2004)

สำหรับการสร้าง parasitophorous vacuole ต้องอาศัยการสนับสนุนจากอวัยวะต่าง ๆ ของสปอร์โรรอยต์ ได้แก่ apical organelle, rhoptries และ micronemes จากการศึกษานี้ในหลอดทดลองโดยการบ่มสปอร์โรรอยต์กับเซลล์ตับ พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบ เรียกว่ากระบวนการนี้ว่า excytosis โดยส่วน apical organelle จะประกอบไปด้วย CSP, TRAP และ erythrocyte binding antigen (EBA175) protein และยังอาศัยความร่วมมือจาก Ca^{2+} ionophores ที่ช่วยทำให้เกิดการหลั่งสารต่าง ๆ บนผิวของสปอร์โรรอยต์ ทำให้สปอร์โรรอยต์เคลื่อนที่แบบลื่นไถลได้ (gliding mobility) (Mota et al., 2002a) หลังจาก micronemes ปลดปล่อยสารต่าง ๆ ไปยัง apical organelle (รวมทั้ง TRAP ในปริมาณมาก) บริเวณของ extracellular domains จะไปจับกับ ligand บนผิวของเซลล์ตับ ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกัน จึงเป็นการช่วยสนับสนุนให้เกิดการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ตับได้ เมื่อเชื้อมาลาเรียเจริญเต็มที่ภายในเซลล์ตับและมีขนาดใหญ่กว่านิวเคลียสของโฮสต์เซลล์ก็จะปรากฏ CSP บนผิวรอบนอกของเชื้อมาลาเรีย (Kappe et al., 2004)

เมื่อสปอร์โรรอยต์ของ *P. berghei* บุกเข้าสู่ HepG2 cells จากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้ง irradiated และ non-irradiated sporozoites สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น rounded trophozoites แล้ว 48 ชั่วโมงต่อมา irradiated sporozoites ส่วนใหญ่ไม่สามารถเพิ่มขนาด ในขณะที่ non-irradiated sporozoites จะเกิดการเพิ่มขนาดได้มากที่สุดถึง 4 ครั้ง และ irradiated sporozoites เพียง 5% เท่านั้นที่มีการพัฒนาไปสู่ระยะ schizont หลังจากนั้นอีก 72 ชั่วโมงจะปรากฏระยะ merozoite จาก non-irradiated sporozoites เท่านั้น ซึ่งจากข้อมูลนี้แสดง

ให้เห็นว่า irradiated sporozoites สามารถถูกกลืนเข้าสู่เซลล์ตับในหลอดทดลองและพัฒนาเข้าสู่ระยะ schizont ได้ แต่ไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ ดังนั้น irradiated sporozoites น่าจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า dead sporozoites หรือชิ้นส่วนของสปอร์โรซอยต์ (Sigler et al., 1984)

ระบบภูมิคุ้มกันต่อ Pre-erythrocytic stage

ระบบภูมิคุ้มกันต่อระยะ pre-erythrocytic ของเชื้อมาลาเรียมีผลโดยตรงจากสปอร์โรซอยต์ที่ติดเชื้อมาทางผิวหนังเข้าสู่เซลล์ตับ แม้ว่าประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ก่อโรคจะมีการแสดงออกต่อระยะสปอร์โรซอยต์เป็นปกติ แต่กลไกของระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ (naturally acquired immunity) ก็ยังคงไม่ชัดเจนมากนัก อย่างไรก็ตาม T-cell epitopes ต่อ CSP ก็แสดงให้เห็นถึงรูปแบบความหลากหลายของโปรตีนของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งมีหลักฐานแสดงให้เห็นว่า T-cell epitopes ที่ถูกคัดเลือกจากโฮสต์เซลล์มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอัตราการเพิ่มของการเกิดโรคมาลาเรียซ้ำ หลังจากรักษาหายแล้ว (re-infection) ในผู้ใหญ่และเด็ก (Owusu-Agyei et al., 2001; Sokhna et al., 2000) โดยมีการนำเสนอว่าการวิเคราะห์ข้อมูลจากขนาดน้ำหนักตัวและความแตกต่างของความไวในการถูกยุงกัดบ่งชี้ให้เห็นถึงความมีนัยสำคัญของ naturally acquired immunity ต่อระยะ pre-erythrocytic แต่การพัฒนาในวงชีวิตจะช้ากว่าการตอบสนองในระยะ blood stage อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ สิ่งที่น่าสนใจคือการเกิด re-infection ในระยะเวลาอันสั้นและชี้ให้เห็นถึงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันให้ผลที่ไม่จำเพาะ แต่เมื่อทำการศึกษาในระยะ blood stage พบว่าระบบภูมิคุ้มกันในผู้ใหญ่ยังคงมีภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ แม้จะผ่านระยะ pre-erythrocytic ไปแล้วก็ตาม ในทางตรงกันข้ามเมื่อทำการฉีดสปอร์โรซอยต์ที่ทำให้อ่อนแรง (attenuated sporozoites) ในคนและในสัตว์ทดลอง พบว่าเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างสมบูรณ์ สามารถป้องกันการติดเชื้อในภายหลังได้ (Nardin et al., 1999) ซึ่งรูปแบบการทดลองที่เกิดขึ้นนี้เป็นพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในระยะ pre-erythrocytic และในปัจจุบันยังไม่ทราบเหตุผลที่ชัดเจนว่าทำไมวัคซีนจาก attenuated sporozoites สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับ การติดเชื้อตามธรรมชาติ (natural infection) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้จำเป็นต้องใช้สปอร์โรซอยต์จำนวนมาก (100 ถึง 1,000 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการกัดของยุง 1 ถึง 100 ครั้งของการติดเชื้อตามธรรมชาติ) (Beier et al., 1991) เพื่อสามารถทำให้เกิดการต่อต้านสปอร์โรซอยต์ในเซลล์ตับและช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis (Scheller and Azad, 1995) จึงจะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันเกิดการตอบสนองต่อ sporozoite antigens ได้

แอนติบอดีต่อสปอร์โซออยต์มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ opsonization ก่อนที่สปอร์โซออยต์จะถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์ตับหรือสามารถไปรบกวนกระบวนการทำงานของสปอร์โซออยต์ในการถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์ตับ มีการนำเสนอว่าแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อสปอร์โซออยต์จะมีเป้าหมายไปที่ circumsporozoite protein (CSP) ที่เคลือบอยู่บนผิวของสปอร์โซออยต์ โดยเฉพาะบริเวณ immunodominant region ที่แสดงรูปแบบความหลากหลายของ tetra-peptide repeat (NANP) (Esposito et al., 1988) แต่อย่างไรก็ตามการติดเชื้อตามธรรมชาติของมนุษย์มีค่าเฉลี่ยที่กว้างต่อความจำเพาะต่อ CSP และยังมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ บนผิวของสปอร์โซออยต์ เช่น LSA-1 และ TRAP และแอนติเจนที่อาจพบได้ในระยะ blood stage แต่มีการหลั่งของโปรตีนซ้ำและอาจจะพบในระยะ sexual stage เช่น STARP และ AMA-1 ซึ่งแอนติบอดีต่อโปรตีนทั้งหมดนี้มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการถูกลำเลียงของสปอร์โซออยต์เข้าสู่เซลล์ตับในหลอดทดลองได้ (Pasquetto et al., 1997) ในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานที่เด่นชัดถึงระดับแอนติบอดีต่อสปอร์โซออยต์ที่มีความสัมพันธ์กับการป้องกันการติดเชื้อหรือการเกิดโรคหรือไม่ โดยมีเพียงการอภิปรายถึงผลของแอนติบอดีต่อ AMA-1 และโดยส่วนใหญ่จะใช้ในการต่อต้านระยะเมอโรซออยต์ (merozoite) แต่ในความเป็นจริงเป้าหมายอยู่ที่ระยะสปอร์โซออยต์ (Polley et al., 2004) โดยทั่วไปในการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีน ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของแอนติบอดีต่อสปอร์โซออยต์กับการป้องกันการติดเชื้อมักจะไม่ชัดเจน แต่ก็มีรายงานว่ากระตุ้นให้เกิดกระบวนการ opsonocytotoxic activity ต่อระยะสปอร์โซออยต์มีแอนติบอดีในซีรัมปริมาณมากจากการใช้ RTS,S vaccine (Schwenk et al., 2003)

นอกจากนี้ Doolan และ Hoffman ทำการศึกษาเป้าหมายของ pre-erythrocytic immunity โดยการเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานของ cell-mediated อย่างน้อย 5 กลไก เพื่อป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์จากหนู ซึ่งจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูสามารถพบ CD4+ cells และ NK cells อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่างซึ่งในความเป็นจริงแล้วในระบบภูมิคุ้มกันควรจะพบ CD8+ cells (Doolan and Hoffman, 2000)

วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อมากกว่า 20 ชนิด สามารถป้องกันได้โดยการใช้วัคซีน ซึ่งวัคซีนเหล่านี้ใช้ป้องกันโรคติดเชื้อมากกว่า 20 ชนิดที่เกิดจากแบคทีเรียและไวรัสเท่านั้น แต่วัคซีนที่ใช้สำหรับป้องกันโรคติดเชื้อมากกว่า 20 ชนิดยังไม่ได้ได้รับการพัฒนาจนสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม การประสบปัญหาในการควบคุมโรคมาลาเรียจากการดื้อยาฆ่าแมลงของยุงพาหะนำโรคหรือเกิดภาวะของการที่เชื้อมาลาเรียคือต่อยาก็ใช้ในการรักษาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ตลอดจนปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้โรคมาลาเรียมีอุบัติการณ์สูงมากขึ้นในหลายภูมิภาคของโลก ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพ จึงถือได้ว่าเป็นมาตรการที่มีบทบาทมากที่สุดประการหนึ่งสำหรับควบคุมโรคมาลาเรีย (Breman et al. 2004; Tongren et al. 2004)

การศึกษาชีววิทยาของเชื้อมาลาเรีย ซึ่งมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนและในแต่ละระยะประกอบด้วยแอนติเจนที่มีความหลากหลาย ดังนั้นบทบาทของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในวงชีวิตมาลาเรียระยะใดระยะหนึ่งต้องเกิดประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์ เพื่อป้องกันเจริญเติบโตของเชื้อเจริญเป็นระยะอื่นต่อไป ซึ่งแอนติเจนที่ปรากฏในระยะอื่นก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกันไป อาจทำให้วัคซีนไม่เกิดผลเช่น การศึกษาการใช้วัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในระยะสปอร์โรซอยต์ สามารถป้องกันการติดเชื้อในระยะสปอร์โรซอยต์ได้ แต่ไม่สามารถลดการติดเชื้อในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงของคนได้ ดังนั้นแนวทางในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจึงต้องคำนึงถึงลักษณะดังกล่าวด้วย ในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย (endemic area) โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีอัตราการแพร่เชื้อที่สูง (hyperendemic area) พบว่ามีภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อการติดเชื้อที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ แต่ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ เช่น ประเทศอัฟริกาพบอัตราการเสียชีวิตเนื่องจากสาเหตุการเจ็บป่วยด้วยโรคมาลาเรียในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปีมากกว่าในผู้ใหญ่ เนื่องจากผู้ใหญ่มีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นจากการติดเชื้อในธรรมชาติ โดยภูมิคุ้มกันนี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้บางส่วน (partial protection) และอยู่ได้ในระยะเวลาสั้น ๆ ดังนั้นในกลุ่มประชากรดังกล่าวจึงจำเป็นที่จะต้องได้รับเชื้อต่อเนื่องกันหลาย ๆ ครั้ง จึงจะสามารถมีภูมิคุ้มกันมาลาเรียได้ เพราะฉะนั้นการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพจึงมุ่งหวังที่จะทำให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการติดเชื้อในธรรมชาติ รวมทั้งระยะเวลาที่ภูมิคุ้มกันคงอยู่ได้ในระยะเวลาที่ยาวนานและสามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (complete protection)

แม้ว่าในปัจจุบันวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจะยังไม่ประสบความสำเร็จจนสามารถนำมาใช้ได้กับประชากรทั่วไป แต่ความพยายามดังกล่าวได้ส่งผลให้เกิดความเข้าใจและนำไปสู่การแสวงหาแนวทางใหม่ ๆ ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีการแสวงหาแอนติเจนที่น่าจะมีคุณสมบัติในการนำมาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. Pre-erythrocytic Antigens

1.1 circumsporozoite protein

circumsporozoite protein (CSP) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดบนผิวของสปอริโซซอยต์ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสปอริโซซอยต์ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้ CSP หลุดลอกออกจากผิวของสปอริโซซอยต์ ทำให้สปอริโซซอยต์ตายไปในที่สุด (Nussenaweg et al. 1969) ซึ่งบริเวณ repeats ใน CSP ของ *P. falciparum* ประกอบด้วย B cell epitope ที่แอนติบอดีต่อบริเวณดังกล่าวสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอริโซซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับในหลอดทดลองได้ (Hollingdale et al., 1984) และยับยั้งความสามารถในการเป็นระยะติดต่อของสปอริโซซอยต์ของ *P. falciparum* และ *P. vivax* (Nardin et al., 1982) นอกจากนี้ monoclonal antibodies ต่อบริเวณ repeats ของ CSP ของ *P. berghei* เมื่อฉีดเข้าหนูทดลองพบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียชนิดเดียวกันได้ (Potocnjak et al., 1980) จากการศึกษา T-cell epitope ใน CSP ของ *P. falciparum* พบ epitopes ที่สำคัญในบริเวณ C-terminus ประกอบด้วย T-cell epitope อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ CD4+ lymphocyte (Good et al., 1987)

แม้ว่าแอนติบอดีต่อบริเวณ tetrapeptide repeats ใน CSP ของ *P. falciparum* สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอริโซซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับและสามารถเกิดภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรียจากการทดลองในอาสาสมัคร แต่ในธรรมชาติกลับพบว่าผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียส่วนใหญ่มีแอนติบอดีต่อบริเวณ repeats นี้ยังคงติดเชื้อมาลาเรียได้เช่นเดียวกับผู้ที่ไม่แอนติบอดี แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีดังกล่าวไม่เพียงพอต่อการป้องกันโรคมาลาเรียได้ตามธรรมชาติ (Hoffman et al. 1987)

1.2 Thrombospondin-related adhesive protein

Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) หรือ sporozoite surface protein 2 (SSP2) จากการศึกษาด้วยวิธี immunofluorescence พบว่าทั้ง CSP และ TRAP ถูก

เก็บไว้ใน microneme แต่การกระจายตัวของ TRAP บนผิวของสปอโรไซตมีลักษณะเป็นหย่อม ๆ ในขณะที่ CSP มีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอ (Charoenvit et al. 1991) ซึ่งบทบาทของ CSP และ TRAP นั้นมีหลักฐานสนับสนุนว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของสปอโรไซตจากการทดลองใช้ CSP ร่วมกับ TRAP ใน *P. yoelli* ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียของหนู พบว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้มีภูมิคุ้มกันต่อการเปลี่ยนระยะของเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งให้ประสิทธิภาพที่สมบูรณ์กว่าการเลือกใช้โปรตีนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น จึงแสดงให้เห็นว่าภูมิคุ้มกันที่ให้ประสิทธิภาพสมบูรณ์สำหรับวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียในระยะก่อนที่เชื้อจะลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ (pre-erythrocytic stage) ควรเป็นผลรวมจากการกระตุ้นด้วยโปรตีนบนผิวของสปอโรไซตมากกว่า 1 ชนิด (Khusmith et al. 1991)

นอกจาก CSP และ TRAP ที่จัดว่าเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนต่อระยะ pre-erythrocytic stage แล้วยังมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่พบในระยะดังกล่าวและน่าจะมีส่วนในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนได้ เช่น sporozoite threonine and asparagines-rich protein (STARP) (Fidock et al. 1994a), sporozoite and liver stage antigen (SALSA) (Bottius et al. 1996) และ liver-stage-specific antigens 1, 2 และ 3 (LSA 1, 2, 3) (Guerin-Marchand et al. 1987)

1.3 Liver stage-specific antigen 1

Liver stage-specific antigen 1 (LSA-1) เป็นโปรตีนตัวแรกที่แสดงออกบนผิวของสปอโรไซตเมื่อเกิดการลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับ ซึ่งมีขนาดประมาณ 230 kDa จากการศึกษาค้นคว้าใช้ LSA-1 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของชาวแอฟริกันตะวันตก พบว่าสามารถกระตุ้น HLA-restricted cytotoxic T cells โดยเกี่ยวข้องกับ HLA Bw53 ซึ่งการปรากฏของ HLA Bw53 มีความสัมพันธ์กับการป้องกันโรคมาลาเรียภาวะรุนแรง (severe malaria) (Hill et al., 1991; Hill et al., 1992)

1.4 Sporozoite threonine asparagine rich protein

Sporozoite threonine asparagines rich protein (STARP) เป็นโมเลกุลที่แสดงออกบนผิวของสปอโรไซต ถูกจำแนกและทำการโคลนครั้งแรกในเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ใน field isolates (Fidock et al., 1994a) จากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย (โปรตีนชนิดนี้ยังปรากฏใน *Plasmodium* สปีชีส์อื่น ๆ ด้วยและเป็น highly conserved structure) (Fidock et al., 1994b) จากการศึกษาดังวิธี immunofluorescence และ immunoelectron microscopy โดย

ใช้ซีรัมต่อต้านบริเวณส่วนกลางของโปรตีนและบริเวณ C-terminus แสดงให้เห็นถึง STARP ถูกแสดงออกบนผิวของสปอร์โรรอยต์ในระหว่าง intrahepatic stage และ early ring stage (Bozdech et al., 2003) จากการทดลองด้วยวิธี reverse PCR และ Northern blot hybridization พบว่า STARP มีขนาดความยาวของยีนประมาณ 2.7 กิโลเบส สามารถแปลรหัสได้ 604 residues และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 78 กิโลดาลตัน โดยมีโครงสร้างประกอบด้วยบริเวณ exon และมีบริเวณ intron คั่นกลางขนาด 175 bp ทางด้านปลาย 5' และ 3' เป็นส่วน non-repetitive region และในส่วนกลางเป็นส่วน repetitive region ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 บริเวณ คือ mosaic (M) region, Rp45 region เป็นบริเวณกรดอะมิโนซ้ำกันชุดละ 45 ตัว จำนวน 2 ชุด และ Rp10 region เป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนเรียงซ้ำกัน 10 ตัว ประมาณ 26 ชุด (Fidock et al., 1994a) ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยในบริเวณส่วนกลางจะมีความหลากหลายของยีนต่ำ สำหรับลำดับเบสของยีน STARP ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด asparagine ร้อยละ 25.2 และ threonine ร้อยละ 19.3 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในการแปลรหัสของยีน STARP เนื่องจากส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโนดังกล่าวทำให้โปรตีนนี้มีจำนวนของ N-linked glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) site ปริมาณสูงมากถึง 38 พันธะจากทั้งหมด นอกจากนี้ลำดับของกรดอะมิโนจากปลาย N-terminus จะมีส่วนไร้ประจุและไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และยังมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอีกส่วนหนึ่งอยู่ที่ปลาย C-terminus อีกด้วย

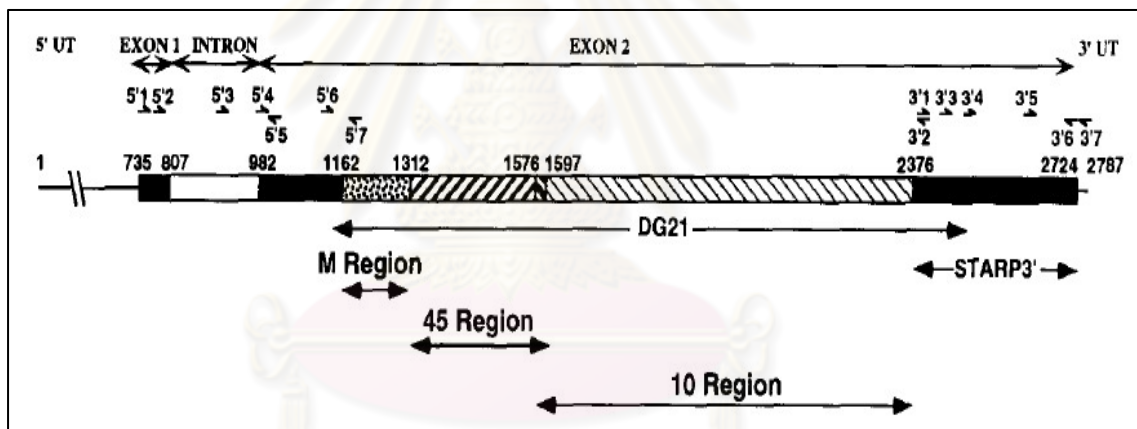
ในส่วนกลางบริเวณ Rp45 region และ Rp10 region จะมีส่วนเชื่อมล้ากันอยู่ ซึ่งบริเวณ Rp45 region นั้นส่วนที่ซ้ำกันทั้งสองชุดจะถูกรักษาสภาพไว้ได้อย่างสมบูรณ์ในระดับกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ ในทางตรงกันข้ามส่วนซ้ำของบริเวณ Rp10 region จะมีความยาวแตกต่างกันและมีการแทนที่และขาดหายของลำดับกรดอะมิโน ทำให้มี 24 ถึง 26 ส่วนซ้ำ ทั้ง ๆ ที่มีการแทนที่และขาดหายไปของกรดอะมิโน แต่ส่วนใหญ่บริเวณ Rp10 นั้นก็ยังคงโครงสร้าง β -turn structure ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงข้อจำกัดทางโครงสร้างมากกว่าที่เป็นโครงสร้างขั้นปฐมภูมิ ที่อาจจะเกิดกระบวนการต่าง ๆ ได้บนบริเวณนี้ เช่นเดียวกับ CSP ซึ่งมี repeat variant ที่เหมาะกับการคงโครงสร้าง β -turn structure ซึ่งมีอยู่เป็นปกติใน NANP repeats จากการศึกษาโดยใช้แอนติบอดีของหนูและมนุษย์มาตรวจสอบ STARP พบว่ามีการกระจายตัวของโปรตีนที่ผิวผิดปกติไป ซึ่งต่างจากการกระจายตัวของ CSP และ sporozoite antigen อื่น ๆ ที่มักจะอยู่แยกจากกันบนพื้นผิวอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม STARP ก็ยังแตกต่างจาก TRAP ตรงที่ให้ผลบวกจากวิธี IFA โดยใช้ anti-STARP antibodies (Roger et al., 1992) ดังนั้นการแสดงออกของ STARP อย่างคงที่อาจจะให้เป้าหมายที่มีประสิทธิภาพสำหรับ sporozoite-specific antibodies

สำหรับหน้าที่ของโปรตีน STARP ต่อระยะสปอร์โรซอยต์นั้นยังไม่ทราบชัดเจน แต่มีการรายงานว่าเกิดความซุกสูงของ anti-STARP antibodies โดยเฉพาะบริเวณ Rp10 จากการใช้ เปปไทด์ STNNNTKTISTDNNNTKI พบว่าสามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรซอยต์เข้าสู่ เซลล์ตับได้ แม้จะใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็ตาม (Pasquetto et al., 1997) ในบริเวณของ Rp10 เชื่อว่าจะมีบริเวณที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ จากการศึกษาการใช้ซีรัมที่มี IgG antibody titer ในปริมาณสูงต่อ STARP ซึ่งได้มาจากผู้ป่วยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียสูงและต่ำ พบว่าซีรัมจากผู้ป่วยชาวแอฟริกัน (ผู้ป่วยติดเชื้อ *P. falciparum*) ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ผลิต synthetic peptide จากบริเวณ Rp10 สามารถยับยั้งการลุกลามของ สปอร์โรซอยต์ได้ถึง 48 – 90% ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับซีรัมและ STARP peptide นอกจากนี้มีการศึกษาด้าน ภูมิคุ้มกันวิทยาจากแอนติเจนจำนวน 4 ชนิดของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* จากระยะ pre-erythrocytic (STARP เป็น 1 ใน 4 แอนติเจนที่ทำการศึกษา) ทำการทดลองโดยการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ B และ T cells โดยการใช้ลิง *Aotus lemurinus* ทำการ immunized ด้วย synthetic peptides จากส่วนต่าง ๆ ของ native protein พบว่าไม่เกิดการตอบสนองของ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) ต่อบริเวณ Rp10 ซึ่งก็ให้ผลการทดลองตรงกันเมื่อทำการทดลอง ในลิง chimpanzee (BenMohamed et al., 2004)

จากการศึกษาการจำแนก Hep G2 cells HABPs ใน STARP โดยใช้วิธี receptor-ligand binding assay แสดงให้เห็นถึงมีเปปไทด์อย่างน้อย 12 ชนิด ที่เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อเซลล์ เป้าหมาย (Lopez et al., 2003) โดย HABPs 20546 (⁴¹VIKIINRFLSEYQSNFLGGY⁶⁰), 20547 (⁶¹SAALKLVNSKSGTENVNTKY⁸⁰) และ 20548 (⁸¹NSENTNTNNNIPESSTYTN¹⁰⁰) จะอยู่ บริเวณ N-terminal non-repeat region และ HABPs 20557, 20559, 20560, 20563, 20564 และ 20565 จะครอบคลุมบริเวณส่วนกลาง รวมทั้งบริเวณ Rp10 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสำคัญ ที่ว่าแอนติบอดีต่อบริเวณ Rp10 นี้สามารถยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เข้าสู่เซลล์ตับได้ (Pasquetto et al., 1997) นอกจากนี้ยังมี HABPs 20569 (⁵⁰¹TSDDELNKDSCDYSEEKENI⁵²⁰) และ 20570 (⁵²¹KSMINAYLDKLDLETVRKIH⁵⁴⁰) จะอยู่ บริเวณ C-terminal non-repeat region จากการศึกษาด้วยวิธี cross-linking assay พบว่ามี เปปไทด์อย่างน้อย 2 ชนิดที่มีปฏิกิริยาต่อโปรตีนขนาด 38 kDa และ 44 kDa บนผิวของเซลล์ตับ (Lopez R., et al. 2003) นอกจากนี้ HABPs 20570 (⁵²¹KSMINAYLDKLDLETVRKIH⁵⁴⁰) จาก บริเวณ C-terminal non-repeat region ซึ่งบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นบริเวณที่มี epitope ที่สามารถ กระตุ้น cytotoxic T-lymphocyte ให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และ HABPs 20546 และ 20570 ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตแอนติบอดีในปริมาณสูง เพื่อต่อต้านสปอร์โรซอยต์

โดยที่เริ่มจากลิง *Aotus* ที่ immunized ด้วย HABPs 20546 และ 20570 มีแอนติบอดีที่จดจำต่อโปรตีนบนเซลล์ผิวของสปอร์โรซอยต์ด้วยวิธี immunofluorescence (Lopez et al., 2003)

หน้าที่ของ STARP ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ในมนุษย์ยังไม่ทราบชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองและหลักฐานต่าง ๆ ที่กล่าวไปข้างต้น ได้สนับสนุนความคิดที่ว่าโปรตีนชนิดนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในกลไกการลบล้างเข้าสู่เซลล์ตับของสปอร์โรซอยต์และหลาย ๆ epitopes ของ STARP อาจจะสามารถใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนในการป้องกันโรคมาลาเรียได้



ภาพที่ 5 แสดงของโครงสร้างของยีน STARP ใน *P. falciparum* (Fidock et al., 1994a)

2. Merozoite and Erythrocytic Antigens

2.1 Erythrocyte binding antigen 175

Erythrocyte binding antigen 175 (EBA-175) เป็นโปรตีนที่แสดงออกบนผิวของ เมอร์โรซอइट มีขนาด 175 kDa ซึ่งบริเวณ ligand ของโปรตีนนี้สามารถเกาะติดกับตัวรับที่จำเพาะ บนผิวของเมอร์โรซอइटและเม็ดเลือดแดงได้ (Camus and Hadley, 1985) จากการศึกษาลำดับ เบสของยีน พบว่าในบางส่วนเมื่อสังเคราะห์ได้เป็นโปรตีนมีบริเวณที่จำเพาะกับ B-cell epitopes และเมื่อทำการทดลองกับกระต่ายก็พบการสร้างแอนติบอดีในปริมาณสูง จากการใช้ซีรัมความเจือจาง 1:5 พบว่าสามารถลดการลุกลามของเมอร์โรซอइटเข้าสู่เม็ดเลือดแดงในห้องปฏิบัติการได้ถึง 80% และยังสามารถยับยั้งการเกาะของโปรตีน EBA-175 กับผิวของเม็ดเลือดแดงได้อีกด้วย (Sim et al., 1990)

2.2 Merozoite surface protein 1

Merozoite surface protein 1 (MSP-1) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า MSA-1 เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียเข้าสู่ระยะ schizont มีขนาด 195 kDa ซีรัมของผู้ป่วยมาลาเรียมีแอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดนี้ MSP-1 เป็นโปรตีนที่มีความซับซ้อนเมื่อแสดงออกบนผิวของเมอร์โรซอइट แม้ว่าจะมีบางส่วนของโปรตีนที่ถูกกำจัดออกไปด้วยกระบวนการ proteolysis (Holder et al., 1982) แต่มีชิ้นส่วนของโปรตีนขนาด 19 kDa (MSP-1₁₉) ที่ยังคงรูปแบบไว้ได้ในระหว่างการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของเมอร์โรซอइटและยังปรากฏอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงใหม่ที่ติดเชื้อมากขึ้น นอกจากนี้ Monoclonal antibodies ต่อ *P. falciparum* และ *P. yoelii* MSP-1₁₉ ก็สามารถลดประสิทธิภาพในการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของเมอร์โรซอइट (Blackman et al., 1990; Burns et al., 1989) เช่นเดียวกันกับการศึกษาใน *P. vivax* (del Portillo et al., 1991) จากการศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย *P. falciparum* MSP-1 พบว่าสามารถป้องกันลิง *Saimiri* (Etlinger et al., 1991; Perrin et al., 1984) และ *Aotus* (Siddiqui et al., 1987) จากการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังค้นพบโปรตีนขนาด 15 kDa ของ *P. yoelii* MSP-1 ที่สามารถป้องกันการติดเชื้อและอัตราการตายในหนูได้ (Daly and Long, 1993)

2.3 Merozoite surface protein 2

Merozoite surface protein 2 (MSP-2) เป็นโปรตีนที่เกาะติดอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของ เมอร์โรซอइट มีขนาด 45 kDa (Ramasamy, 1987; Smythe et al., 1988) ในโมเลกุลจะมีบริเวณ central repeat เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจากเชื้อ *P. falciparum* บ่งชี้ว่าความหลากหลายของ

กรดอะมิโนพบถึงประมาณ 50% แต่ทางด้าน N- และ C-terminal คงรูปแบบของกรดอะมิโนไว้ได้ (Smythe et al., 1990) การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลิง *Saimiri* โดยใช้ recombinant vaccine virus ที่ประกอบด้วยส่วนของยีน MSP-2 ในระยะแรกพบปริมาณของแอนติบอดีในปริมาณต่ำและจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัตว์ทดลองติดเชื้อเข้าสู่ระยะเมอร์โรซอยต์ แต่สัตว์ทดลองก็ยังคงติดเชื้อและหาค่า parasitemia ได้ (Pye et al., 1991)

2.4 Ring-infected erythrocyte surface antigen

Ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Pf155 มีขนาด 155 kDa เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยเชื้อ *P. falciparum* ในระหว่างระยะ late schizont และแสดงออกบนผิวของเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อในระยะวงแหวน (ring stage) (Coppel et al., 1984; Perlmann et al., 1984) โปรตีนนี้จะถูกเก็บไว้ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงเมื่อเกิดการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง RESA ประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนเรียงซ้ำ ๆ กันและในซีรัมของผู้ป่วยมาลาเรียพบแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งการลุกลามของเมอร์โรซอยต์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงในห้องปฏิบัติการได้ (Wahlin et al., 1984) จากการศึกษากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลิง *Aotus* ด้วยโปรตีน 2 บริเวณที่เรียงซ้ำ ๆ กันพบว่าลิงไม่มีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ (Collins et al., 1986)

2.5 Serine repeat antigen

Serine repeat antigen (SERA) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า serine protein I และ p126 เป็นโปรตีนที่ปรากฏอยู่ใน parasitophorous vacuole ในเชื้อ *P. falciparum* มีขนาด 111 ถึง 113 kDa และประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด serine ประมาณ 11% (Bzik et al., 1992; Knapp et al., 1989) จากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลิง *Saimiri* ด้วย SERA พบว่าลิงสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียในภายหลังได้ และเมื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลิง *Aotus* โดยใช้โปรตีนลูกผสม 2 ชนิด คือ SERA เชื่อมกับ histidine-rich protein II และ SERA เชื่อมกับ MSP-1 พบว่าลิงสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ในภายหลังเช่นเดียวกัน (Knapp et al., 1992)

3. Transmission-Blocking and Pathogenicity Antigens

3.1 Pfs25

Pfs25 เป็นแอนติเจนที่สำคัญที่ถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย มีขนาด 25 kDa พบบนผิวของ zygotes และ ookinete ของเชื้อ *P. falciparum* ซึ่ง monoclonal antibodies ของแอนติเจนนี้สามารถหยุดการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรีย โดยไปรบกวนการพัฒนาเป็นระยะสืบพันธุ์ (sexual stage) ของเชื้อมาลาเรียภายในยุงก้นปล่อง (Vermeulen et al., 1985) จากการศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในหนู โดยใช้ infected vaccine virus พบว่า polyclonal antibody ที่ผลิตขึ้นสามารถยับยั้งการพัฒนาเป็นระยะสืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียได้ (Kaslow et al., 1991) และจากการใช้ yeast-expressed recombinant Pfs25 พบว่า polyclonal antibody สามารถหยุดการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียได้ทั้งในหนูและลิง (Barr et al., 1991)

แนวทางในการพัฒนาการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

การผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ตามระยะการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียและเป้าหมายในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อมาลาเรีย ได้แก่

1. วัคซีนป้องกันมาลาเรียระยะก่อนการเจริญในเม็ดเลือดแดง (pre-erythrocytic stage vaccines)

เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียที่มีเชื้อมาลาเรียกัดคน ระยะสปอโรไซทอยต์จากต่อมน้ำลายยุงจะเข้าสู่กระแสเลือด หลังจากนั้นระยะสปอโรไซทอยต์จะลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับและเจริญเป็นระยะโทรโฟไซทอยต์ ระยะไซซอนต์และระยะเมอริไซทอยต์ตามลำดับ ตั้งแต่สปอโรไซทอยต์เจริญในเซลล์ตับจนเกิดระยะเมอริไซทอยต์นั้น เชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ซึ่งระยะสปอโรไซทอยต์จำนวน 1 ตัวสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนจนเป็นเมอริไซทอยต์ได้ประมาณ 30,000 ถึง 40,000 ตัว ซึ่งเมอริไซทอยต์จากเซลล์ตับจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนพร้อมที่จะเข้าสู่เม็ดเลือดแดงต่อไป

วัตถุประสงค์ของ pre-erythrocytic vaccines คือป้องกันการลุกลามของสปอโรไซทอยต์เข้าสู่ตับและยับยั้งหรือทำลายการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับ (liver stage) ถ้าการพัฒนาวัคซีนในระยะนี้ประสบผลสำเร็จ ผู้ที่ได้รับวัคซีนจะไม่เกิดการติดเชื้อมาลาเรียในเม็ดเลือดแดง ทำให้ไม่มีอาการของโรคมาลาเรียเลย จากการทดลองประสิทธิภาพของวัคซีนเริ่มต้นจากการใช้สปอโรไซทอยต์ของ *P. gallinaceum* ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตแล้วฉีด

เข้าไปในสัตว์ปีก พบว่าสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันเกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อ มาลาเรียได้ (Mulligan et al., 1941; Russell et al., 1942) ซึ่งในเวลาต่อมา Nussenzweig และ Vanderberg ประสบผลสำเร็จในการทดลองการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนู โดยการฉีด สปอร์โรซอยต์ของเชื้อ *P. berghei* ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์ (X-irradiated sporozoite) เข้าสู่หลอด เลือดดำของหนู หลังจากนั้นได้ทำการฉีดสปอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรียที่สามารถก่อโรครุนแรงใน หนูอีกครั้งหนึ่ง พบว่าภูมิคุ้มกันของหนูที่เกิดขึ้นสามารถป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวได้อย่าง สมบูรณ์ (complete protection) (Nussenzweig et al., 1969; Vanderberg et al., 1969) ต่อมา Clyde และคณะได้ทำการศึกษากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของอาสาสมัคร โดยการให้ยุงจำนวนมากที่มีระยะสปอร์โรซอยต์ของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์แล้วกัด อาสาสมัครหลาย ๆ ครั้ง พบว่าภูมิคุ้มกันของอาสาสมัครสามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อ *P. falciparum* จากการถูกยุงที่มีสปอร์โรซอยต์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีกัดในภายหลังได้ อย่างไรก็ตามภูมิคุ้มกันดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ *P. vivax* และไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อจากการฉีด asexual blood stage ของ *P. falciparum* จึงสรุปว่าภูมิคุ้มกันต่อการ ติดเชื้อมาลาเรียมีความจำเพาะต่อระยะ (stage-specific) และจำเพาะต่อชนิด (species-specific) ของเชื้อมาลาเรีย (Clyde et al., 1973; Clyde, 1975)

แม้ว่าระยะสปอร์โรซอยต์ที่ผ่านการฉายรังสีเอ็กซ์จะให้ประสิทธิภาพที่ป้องกันโรคมาลาเรีย ได้ดี แต่ในทางปฏิบัติแล้วไม่สามารถผลิตสปอร์โรซอยต์จำนวนมากเพื่อนำมาใช้เป็นวัคซีน อีกทั้ง ประสิทธิภาพของวัคซีนยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรีย จึงไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ มาลาเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ในธรรมชาติ ดังนั้นการใช้วิธีทางอนุชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมจึงมี ประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีน

2. วัคซีนป้องกันมาลาเรียที่เจริญแบบไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง

(asexual blood-stage vaccines)

วัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย และป้องกันการบุกรุกของเชื้อ มาลาเรียเข้าสู่เม็ดเลือดแดง นอกจากนี้อาจมีบทบาทช่วยในการยับยั้งการสร้างพิษของเชื้อได้ ในระยะนี้จะมีการสร้างโปรตีนหลายชนิดเช่น MSP1 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญและจากการทดสอบ ประสิทธิภาพของวัคซีนทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าวัคซีนนี้สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้อมาลาเรีย และสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ AMA-1 เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีต่อการกระตุ้นให้สร้าง แอนติบอดี จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยการฉีดเปปไทด์สังเคราะห์เข้าสู่เส้นเลือดของสัตว์และ

กระตุ้นด้วยสายพันธุ์เดียวกัน พบว่าทำให้สัตว์ทดลองเกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้ โดยระดับการป้องกันจะสัมพันธ์กันกับระดับแอนติบอดีที่เพิ่มสูงขึ้น และถ้าฉีด AMA-1 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นวัคซีนต่างกับ AMA-1 สายพันธุ์ที่กระตุ้น ทำให้สัตว์ทดลองไม่มีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย และนอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่อาจมีส่วนสำคัญสำหรับการเป็นองค์ประกอบวัคซีน เช่น MSP2, MSP4, rhoptry protein, SERA และ EBA-175 (Narum et al., 1994)

นอกจากนี้วัคซีนที่มีองค์ประกอบหลายระยะ (combine vaccine) ซึ่งเป็นการทดสอบวัคซีน โดยใช้พื้นฐานการรวมระหว่างแอนติเจนของระยะก่อนเข้าสู่เม็ดเลือดแดงและระยะการเจริญที่ไม่อาศัยเพศในเม็ดเลือดแดง หรือที่เรียกว่า SPf66 โดยใช้เปปไทด์สังเคราะห์จากบางส่วนของ PfMSP1 เชื่อมกับ CSP ในส่วนที่กรดอะมิโน 4 ตัวเรียงซ้ำกัน (tetrapeptide repeats) คือ Asparagine-Alanine-Asparagine-Proline (NANP) และเชื่อมกับโปรตีนอีก 2 ชนิดของเชื้อมาลาเรีย และได้มีผู้ศึกษาโปรตีนดังกล่าวในอาสาสมัครหลายพื้นที่ที่ต่างกันไป พบว่าอาสาสมัครทั้งเด็กและผู้ใหญ่ในประเทศโคลัมเบียและแทนซาเนีย มีระดับแอนติบอดีตอบสนองต่อการติดเชื้อมาลาเรียในระดับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในทางตรงกันข้ามการศึกษาวัคซีนชนิดเดียวกันนี้ในประเทศไทยและกัมพูชา กลับพบว่าการตอบสนองของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อมาลาเรียในอาสาสมัครมีประสิทธิภาพในระดับที่ต่ำ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของวัคซีนนอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแอนติเจนที่นำมาใช้เป็นวัคซีนยังมีความสัมพันธ์กับเชื้อชาติ อายุและมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร

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

วัตถุประสงค์เพื่อสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียในยุงพาหะกล่าวคือ ผู้ที่ได้รับวัคซีนจะไม่มีภูมิคุ้มกันต้านทานต่อการติดเชื้อมาลาเรียแต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในยุงพาหะ โดยผู้ที่ได้รับวัคซีนร่างกายจะมีการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อเชื้อมาลาเรียในระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นยุงที่กัดผู้ที่ได้รับวัคซีนจะไม่สามารถกระจายเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้

อย่างไรก็ตาม วัคซีนป้องกันมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพจึงควรครอบคลุมเชื้อในหลาย ๆ ระยะหรือมกกัน เพื่อป้องกันหลุดรอดจากการทำลายของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงระยะการเจริญเติบโต (Duffy et al., 1997)

อุปสรรคของการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย

1. ความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย

เนื่องจากในวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียมีช่วงชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยุง ก้นปล่อง ในขณะที่เกิดการปฏิสนธิจะมีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่าง gamete เพศผู้และเพศเมีย ทำให้เชื้อมาลาเรียรุ่นถัดไปอาจมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ทำให้เกิดความหลากหลายในรูปแบบของโปรตีน รวมทั้งแอนติเจน กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า intragenic recombination (Tanabe et al., 1987) นอกจากการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียจะเกิดขึ้นในช่วงสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแล้ว ส่วนของยีนที่มีลำดับเบสเรียงซ้ำกันเป็นชุดนั้นสามารถเพิ่มหรือลดจำนวนชุดได้ในระหว่างที่เชื้อแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ แม้จะเกิดไม่บ่อยในแต่ละช่วงชีวิตที่เชื้อมาลาเรียเจริญในเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้กลไกทางพันธุกรรมดังกล่าวเกิดจากกระบวนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมแบบ unequal crossing-over หรือกลไก slipped-strand mispairing ระหว่างส่วนของยีนที่มีลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุด (Hughes, 2004; Ferreira et al., 2003)

นอกจากนี้เชื้อมาลาเรียยังประกอบด้วยแอนติเจนที่มีความผันแปร (antigenic variation) โดยไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิด recombination เช่นในกรณีของ erythrocyte membrane protein 1 ของ *P. falciparum* หรือ PfEMP1 ซึ่งเป็นโปรตีนของเชื้อมาลาเรียที่พบบนผิวของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อเจริญตั้งแต่ระยะ growing trophozoite เป็นต้นไป ทั้งนี้บทบาทของ PfEMP1 ที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ทำให้เชื้อมาลาเรียที่เจริญอยู่ภายในเม็ดเลือดแดงที่มีผิวเป็นตุ่มขนาดเล็ก (knob) สามารถเกาะติดกับผนังหลอดเลือด ดังนั้นจึงเกิดการหลบซ่อนตัวของเชื้อระยะดังกล่าวอยู่ในหลอดเลือดที่หล่อเลี้ยงอวัยวะภายใน กระบวนการนี้เรียกว่า sequestration การเปลี่ยนแปลงที่ผิวเม็ดเลือดแดงนี้ทำให้ง่ายต่อการที่เชื้อมาลาเรียจะถูกทำลายโดยม้าม กลไกดังกล่าวจึงช่วยให้ *P. falciparum* อยู่รอดในร่างกายได้ดีขึ้น สำหรับตัวรับบนผนังหลอดเลือดมีหลายชนิด โดยบทบาทของตัวรับต่างชนิดกันจะมีความสำคัญต่างกันตามอวัยวะ (Smith et al., 1995)

สำหรับผลกระทบของความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์นั้นเกิดขึ้นได้ทั้งกับปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีและการตอบสนองของ T lymphocyte เช่น การที่ CSP ของ *Plasmodium vivax* มี repeat ที่ต่างกัน 2 กลุ่ม ได้แก่ repeat ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน glycine, aspartic acid, arginine, alanine, alanine หรือ aspartic acid, glycine, glutamine, proline และ alanine [GDRA(A/D)GQPA] ส่วน repeat แบบที่ 2 ประกอบด้วยกรดอะมิโน alanine, asparagines, alanine, glycine, asparagines,

glutamine, praline และ glycine (ANGAGNQP) ทั้งนี้แอนติบอดีต่อ repeat แบบหนึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับอีกแบบหนึ่ง เป็นต้น (Rosenberg et al., 1989)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบางตำแหน่งของ T cell epitope อาจทำให้ epitope ที่เปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถกระตุ้น T cell ได้หรืออาจจับกับบางส่วนของ T cell receptor ในลักษณะที่ไม่สามารถให้เกิดการตอบสนองของ T cell แล้วยังไปบดบังโอกาสที่ receptor ดังกล่าวจะไปจับกับ T cell epitope อื่นที่สามารถกระตุ้น T cell เรียกกลไกดังกล่าวว่า altered peptide ligand antagonism ซึ่งพบได้ในกรณีของ T cell epitope ใน CSP (Plebanski et al., 1999) นอกจากนี้ความหลากหลายในรูปแบบแอนติเจนใน AMA1 ยังมีผลต่อการตอบสนองของแอนติบอดีและ T cell เช่นกัน แม้ว่าจะมีการเสนอแนวทางการพัฒนาวัคซีน เพื่อให้ปราศจากอุปสรรคจากความจำเพาะของการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่อ epitope หนึ่ง ๆ โดยการรวม epitope ที่ต่างไปจากโปรตีนเดียวกันเข้ามาเป็นองค์ประกอบของวัคซีน แต่การปรากฏของ epitope เดียวกันที่มีหลายรูปแบบหรือหลายอัลลีล จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีหรือไม่นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป ในทางตรงกันข้ามการพัฒนาวัคซีนอาจเลือกใช้ epitope ที่มีความคงที่ของลำดับกรดอะมิโนหรือมีความหลากหลายต่ำเพื่อเลี่ยงปัญหาดังกล่าว แต่ epitope ที่มีลักษณะนี้มักจะเป็นส่วนของโปรตีนที่ไม่ถูกนำเสนอต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ หรืออีกนัยหนึ่งอาจเป็น epitope ที่อยู่ด้านในของโครง สร้างสามมิติของโปรตีน จึงไม่อยู่ภายใต้แรงกดดันจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้บริเวณดังกล่าวไม่มีการแทนที่ของกรดอะมิโนมากเหมือนกับบริเวณอื่น (Amante et al., 1997)

ความหลากหลายในรูปแบบของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะแอนติเจนที่ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อแต่ละรูปแบบของแอนติเจน จึงเป็นอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งของการพัฒนาวัคซีนป้องกันมาลาเรีย เนื่องจากการติดเชื้อมาลาเรียที่มีรูปแบบของแอนติเจนต่างจากที่มีในวัคซีนย่อมทำให้ผลของวัคซีนต่อการป้องกันโรคด้อยประสิทธิภาพ

2. การประเมินผลของวัคซีนในห้องปฏิบัติการ

ในกระบวนการผลิตวัคซีนนั้นถ้ามีระบบทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่ให้ผลสอดคล้องหรือสามารถใช้บ่งชี้ถึงผลสัมฤทธิ์ของวัคซีนย่อมช่วยลดระยะเวลาตลอดจนความสิ้นเปลืองของการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนอย่างมาก นอกจากนี้การขาดความเข้าใจเกี่ยวกับปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการทำลายเชื้อมาลาเรียอย่างถูกต้องและมีลักษณะเป็นองค์รวม ทำให้การพัฒนาวัคซีนหนึ่ง ๆ มักมุ่งหวังเฉพาะการตอบสนองที่คาดคะเนจากผลการศึกษาในอดีต ซึ่งอาจจะยังขาดปัจจัยอื่น ๆ ที่ยังไม่ทราบ เป็นต้น การทดสอบทางห้องปฏิบัติการบางชนิดอาจมี

ความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถทำลายเชื้อมาลาเรียได้ เช่น ปฏิกริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (red blood cell agglutination) (Marsh and Howard, 1986) และ antibody-dependent cellular inhibition (Bouharoun-Tayoun et al., 1990) เป็นต้น ในทางตรงกันข้าม การศึกษาผลการยับยั้ง merozoite ไม่ให้ลูกกลมเข้าเม็ดเลือดแดง (merozoite invasion inhibition) (Phillips et al., 1972) นั้นอาจไม่มีความสัมพันธ์กับผลของวัคซีน เช่น การศึกษาผลของ PfMsp1 ส่วน 19 กิโลดาลตัน ซึ่งอยู่ทางด้าน C-terminus ของโปรตีน หรือ PfMsp1 ส่วน 42 กิโลดาลตันซึ่งครอบคลุมส่วน 19 กิโลดาลตัน โดยทดสอบในลิง พบว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคมาลาเรียได้ แต่เมื่อนำน้ำเหลืองของลิงมาทดสอบโดยปฏิกริยา merozoite invasion inhibition พบว่าให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน (Chang et al., 1996)

3. การผลิตโปรตีนที่บริสุทธิ์จำนวนมาก

เนื่องจากวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียมีความซับซ้อนและอาจไม่ประสบผลกำไรจากการลงทุน ดังนั้นจึงไม่ได้รับความสนใจจากการลงทุนในเชิงธุรกิจ นอกจากนี้การผลิต recombinant peptide เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเหมือนโปรตีนในสภาพธรรมชาติ ต้องเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสม เช่น ถ้าโปรตีนที่ต้องการผลิตมีขนาดสั้นและไม่มีโครงสร้างสามมิติที่ซับซ้อน อาจเลือกวิธีการผลิตโดยอาศัยแบคทีเรีย ส่วนในกรณีที่โปรตีนมีขนาดใหญ่และมีการสร้างพันธะ disulfide ตลอดจนโปรตีนที่ต้องการ posttranslational modification อาจต้องใช้เซลล์ยูคาริโอต เป็นต้น แต่ในกรณีโปรตีนที่สร้างจาก apical organelles เช่น rhoptries และ micronemes ซึ่งเป็น organelles ที่ไม่พบในเซลล์ทั่วไป (Narum and Thomas, 1994) อาจประสบปัญหาการผลิตโปรตีนเหล่านี้ ที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงหลังการสร้างโปรตีนให้เหมาะสมต่อไป

4. Adjuvant

การเสริมสร้างให้วัคซีนมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต้องอาศัย adjuvant หรือ immunopotentiator เนื่องจากการพัฒนาวัคซีนสำหรับป้องกันโรคมาลาเรียนั้นไม่สามารถผลิตตัวเชื้อระยะ sporozoite จำนวนมากพอที่จะใช้สำหรับประชากรหลายล้านคนในเขตปรากฏโรคได้ เป็นที่น่าสังเกตว่า tetanus toxoid หรือ aluminum hydroxide ที่ใช้เป็น adjuvant ในการประเมินประสิทธิภาพของ tetrapeptide repeats จาก CSP ของ *Plasmodium falciparum* มีผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนได้ไม่ดี ดังนั้นผลของวัคซีน RTS,S/ASO2 นั้นส่วนหนึ่งเกิดจากการรวมส่วน C-terminus ของ CSP ซึ่ง T cell epitope อย่างน้อย 3 epitope ร่วมกับการใช้ hepatitis

B surface antigen และ adjuvant ซึ่งเป็น monophosphoryl lipid A ร่วมกับ QS21 และ oil in water emulsion ทั้งนี้ adjuvant ที่ต่างกันจะให้ผลการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพในการสร้างแอนติบอดีและการป้องกันโรคมาลาเรียได้ต่างกัน (Ballou et al., 1987)

แม้ว่าวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อมักถูกพัฒนาขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพหลายชนิดแต่องค์ความรู้เกี่ยวกับหลักการพัฒนาวัคซีนที่สำคัญยังไม่ทราบชัดเจน เช่น กลไกที่วัคซีนกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอย่างไรจริง วิธีการให้วัคซีนที่เหมาะสมสำหรับวัคซีนแต่ละชนิด ตลอดจนการหา adjuvant ที่มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับ Freud's complete adjuvant และสามารถใช้ได้กับคน

5. การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในอาสาสมัคร

อาสาสมัครแต่ละรายย่อมมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ดังนั้นการตอบสนองของวัคซีนมักมีความแตกต่างกัน ปัญหาสำคัญประการหนึ่งคือการกำหนดเป้าหมายของวัคซีน ซึ่งมีความแตกต่างตามชนิดของวัคซีน เช่น pre-erythrocytic vaccines มีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายและยับยั้งเชื้อมาลาเรียระยะสปอโรซอइट และระยะที่เจริญในเซลล์ตับก่อนการลุกลามเข้าสู่เม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถติดตามโดยการตรวจหาเชื้อในเม็ดเลือดแดง ถ้าวัคซีนสามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อในช่วงก่อนที่จะลุกลามเข้าสู่เซลล์ตับหรือภายหลังเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะไม่พบการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดง แต่กรณีของ asexual blood stage vaccine การติดตามประสิทธิภาพของวัคซีนอาจต้องคำนึงถึงความสามารถในการลดความรุนแรงของโรคมาลาเรียหรือลดอัตราการตาย ซึ่งการติดตามเช่นนี้ย่อมกระทำได้ยาก และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีอุปสรรคอื่น ๆ เช่นความคุ้มทุนของการผลิต เนื่องจากการคาดผลของวัคซีนแต่ละชนิดยังไม่สามารถสร้างแรงจูงใจในการลงทุนจากบริษัทผลิตยาและเวชภัณฑ์โดยทั่วไป การจำหน่ายวัคซีนในกลุ่มประเทศที่เป็นเขตปรากฏโรคอาจไม่คุ้มทุน เนื่องจากปัญหาของสถานะทางเศรษฐกิจของกลุ่มประเทศดังกล่าว (Greenwood, 2005)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การศึกษาเชิงพรรณนา (descriptive study)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสมจากยีน STARP ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ในแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการเป็นแอนติเจนของโปรตีนลูกผสม เพื่อใช้ในงานระบาดวิทยา

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (target population) คือ ผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอาการไข้มาเข้ารับการรักษา ณ หน่วยควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง อ.ท่าสองยาง และอ.อุ้มผาง จ.ตาก

ประชากรตัวอย่าง (population sample) คือ กลุ่มตัวอย่างเลือดและซีรัม (serum) ที่เก็บมาจากประชากรเป้าหมาย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) หมายถึง วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การตรวจฟิล์มเลือดหนา (thick blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ การย้อมลักษณะนี้จะไม่เห็นเม็ดเลือดแดง ทำให้พบเชื้อมาลาเรียได้ง่ายกว่าแต่บางครั้งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อมาลาเรียชนิดใด จำเป็นที่จะต้องเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจฟิล์มเลือดบาง

การตรวจฟิล์มเลือดบาง (thin blood film) คือ การตรวจวินิจฉัยด้วยการย้อมสีเลือดบนกระจกสไลด์ การย้อมลักษณะนี้จะมีการตรึงด้วย absolute methanol ก่อนที่จะนำไปย้อมสี เพื่อที่จะให้เห็นเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงสามารถวินิจฉัยโดยใช้ลักษณะของเม็ดเลือดแดงและตัวเชื้อมาลาเรียเปรียบเทียบกันได้

ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

ตัวอย่างเลือดและซีรัมจากผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และชนิดอื่น ๆ รวมทั้งคนปกติที่ไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ก่อโรค

Inclusion criteria

คือกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และชนิดอื่น ๆ รวมทั้งคนปกติที่ไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ก่อโรค

Exclusion criteria

คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง

ขนาดของตัวอย่าง (Sample size)

การคำนวณตัวอย่างอาศัยข้อมูลด้านระบาดวิทยาจากรายงานประจำปี พ.ศ. 2549 ของสำนักงานโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทยร้อยละ 1.33 ดังนั้นจึงกำหนดให้

ผู้ป่วยมีอัตราการติดเชื้อมาลาเรียในประเทศไทย 1.33% ($P = 0.0133$)

และกำหนดให้มีค่าความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 5% ($d = 0.05$)

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล 95%

$$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96 \text{ (two tail)}$$

$$P = \text{อัตราการเกิดโรค} = 0.0133$$

$$Q = 1 - 0.0133 = 0.9867$$

$$d = \text{acceptable error} = 0.05$$

n = ขนาดตัวอย่าง

$$\text{สูตร } n = Z_{\alpha/2}^2 PQ/d^2$$

$$n = (1.96)^2 (0.0133)(0.9867)/(0.05)^2$$

$$n = 21 \text{ คน}$$

ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้มีความถูกต้องมากขึ้น จึงทำการศึกษาตัวอย่างประชากรไม่ต่ำกว่า 50 ตัวอย่าง

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ : ชนิดเครื่องมือและบริษัทผู้ผลิต

ชนิดเครื่องมือ

เครื่องให้ความร้อน (heat block) รุ่น dry thermo unit

เครื่องปั่นตกสาร (spin down)

ไมโครปิเปต ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

เครื่องควบคุมอุณหภูมิและเวลาอัตโนมัติ

(PCR cycle รุ่น TP650)

เครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifuge) รุ่น MX-301

เครื่องซั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น FY-300

ตู้ปลอดเชื้อ (lamina flow)

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอโดยกระแสไฟฟ้า

ตู้เลี้ยงเชื้อพร้อมเครื่องเขย่า

รุ่น Bio-shaker BR-300L

หม้อนึ่งปลอดเชื้อภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง

(high pressure steam sterilizer รุ่น ES-315)

เครื่อง Molecular Image Gel Doc XR &

ChemiDoc XRS system

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

(powerPac HC Power Supply)

ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

ตู้อบลเครื่องแก้ว (hot air oven)

เครื่อง Trans-Blot SD semi-dry transfer cell

เครื่องให้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

กล้องจุลทรรศน์

เครื่องไมโครเวฟและแหล่งกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต

บริษัทผู้ผลิต

JAPAN

Prouge 6K, KOREA

EPPENDORF, U.S.A.

TAKARA, JAPAN

TOMY, JAPAN

DIETHELM&CO.,LTD, JAPAN

ENGLAND

MUPID-EXU, JAPAN

TAITEC, JAPAN

TOMY, JAPAN

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

BRANDT, ENGLAND

PUFFER HUBBARD, U.S.A.

MEMMERT, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

SONIC, U.S.A.

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

SCHOTT, GERMANY

วัสดุและอุปกรณ์

ปิเกตอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200, 500, 1000 มิลลิลิตร

ปิเปตต์ทิพ (pipette tip) ขนาด 10, 100, 1000 ไมโครลิตร

กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร

หลอดทดลองขนาดเล็กชนิดมีฝาปิด (microtube) ขนาด 0.1, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร

กระจกสไลด์ ขนาด 2.5 x 7.5 เซนติเมตร

ที่วางหลอดทดลอง สำหรับหลอดขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

หลอดทดลองพลาสติก (ficoll tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก

แท่งแก้วรูปตัววี สำหรับ spread plate

กระบอกฉีดน้ำ

กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง

กระดาดติดฉลาก

กล่องพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง

ขวดสำหรับใส่สารเคมี

ที่คีบ (forceps)

ถุงมือยางไม่มีแป้ง

ถุงพลาสติก

แท่งแก้วสำหรับคนสาร

พาราฟิล์ม

ไม้จิ้มฟัน

แผ่นพลาสติกอบบาง

ไบมิดสำหรับตัดเจล

สำลีและหนังยาง

ปากกาเขียนเครื่องแก้ว

ข้อตักสารเคมีและกระดาดขังสาร

หน้ากากกันแสงอัลตราไวโอเล็ต

แม่เหล็ก (magnetic) สำหรับผสมสาร

loop สำหรับเขี่ยเชื้อ

needle สำหรับเขี่ยเชื้อ

**เคมีภัณฑ์ : รายชื่อสารเคมีและแหล่งที่มา
ชื่อสารเคมี**

30% Acrylamide/Bis solution

Agar powder

Agarose powder

Ammonium persulfate (APS)

Ampicillin

Anti-His HRP conjugate

Anti-human IgG antibody HRP conjugate

*Bam*HI enzyme

100 bp DNA ladder (Maker VI)

Boric acid (molecular biology grade)

Bromophenol blue dye

Calcium chloride (molecular biology grade)

Coomassie brilliant blue R-350

Dithiothreitol (DTT)

E. coli M15

Ethanol (absolute)

Ethidium bromide solution

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

Giemsa stain

Glacial acetic acid

Glycine

*Hind*III enzyme

บริษัทผู้ผลิต

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

ACCUMIX, BELGIUM

1st BASE, SINGAPORE

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

M&H MANUFACTURING

CO.,LTD THAILAND

QIAGEN, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

FERMENTAS LIFE SCIENCE,
U.S.A.

FERMENTAS LIFE SCIENCE,
U.S.A.

SIGMA, GERMANY

PHARMACIA BIOTECH,
SEWEDEN

SIGMA, U.S.A.

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

QIAGEN, GERMANY

MERCK, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

PROMEGA, U.S.A.

MERCK, GERMANY

MERCK, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

FERMENTAS LIFE SCIENCE,
U.S.A.

ชื่อสารเคมี

λ Hind III marker

Hydrochloric acid concentration

Immun-Star WesternC Chemiluminescent kit

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

Kanamycin

Luria-Bertani powder

Low melting Agarose powder

Methanol (absolute)

N,N,N',N'-Tetramethylethylene-diamine (TEMED)

Ni-NTA spin column

Non-fat dry milk (NFDM)

Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane

pQE-30xa vector

Proteinase K enzyme

Precision Plus Protein WesternC Standard

QIA DNA mini kit

QIAquick gel extraction kit

QIAquick PCR purification kit

Quick Start Bradford Protein Assay

Sodium acetate solution

Sodium Chloride

Sodium dodecyl sulfate (electrophoresis grade)

Taq DNA polymerase

Tris Base (molecular biology grade)

Trisma-HCl

Tris-EDTA buffer solution

Triton-X 100

บริษัทผู้ผลิต

FERMENTAS LIFE SCIENCE,
U.S.A.

MERCK, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

M&H MANUFACTURING
CO.,LTD THAILAND

DIFCO, U.S.A.

PROMEGA, U.S.A.

MERCK, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

QIAGEN, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

QIAGEN, GERMANY

QIAGEN, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

QIAGEN, GERMANY

QIAGEN, GERMANY

QIAGEN, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

SIGMA, GERMANY

SIGMA, GERMANY

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

TAKARA, JAPAN

PROMEGA, U.S.A.

SIGMA, GERMANY

FLUKA, SWITZERLAND

SIGMA, GERMANY

ชื่อสารเคมี

T4 DNA ligase

Tween-20

Ultra pure glycerol

Whatman 3M paper

Xylene cyanol FF

บริษัทผู้ผลิต

FERMENTAS LIFE SCIENCE,

U.S.A.

SIGMA, GERMANY

BIO BASIC INC., CANADA

BIO-RAD LABORATORIES, U.S.A.

FLUKA, U.S.A.

การเก็บตัวอย่างเลือดและซีรัม

ตัวอย่างเลือดได้จากผู้ป่วยมาลาเรียที่มารับการตรวจรักษาที่ศูนย์มาลาเรีย อำเภอท่าสองยางและอำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก จำนวน 50 ตัวอย่าง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้วิธีเจาะจากหลอดเลือดดำที่แขนของผู้ป่วยปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวคือ ethylene diamine tetracetic acid (EDTA) นำแต่ละตัวอย่างมาทำการตรวจวินิจฉัยโดยการย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนาและบางด้วยสียิมซ้า เพื่อตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนที่เป็นซีรัมแยกใส่หลอดใหม่ นำตัวอย่างเลือดและซีรัมดังกล่าวเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก ได้แก่ เพศ อายุ เชื้อชาติ ภูมิลำเนา อุณหภูมิร่างกาย และอาการของผู้ป่วย

การนับจำนวนเชื้อมาลาเรีย**วิธีการทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง (thin blood film)**

หยดเลือดลงบนกระจกสไลด์ที่แห้งและสะอาดประมาณ 1-2 ไมโครลิตร โดยหยดเลือดอยู่บริเวณปลายด้านหนึ่งของสไลด์ ทำการเกล็ดเลือดที่หยดไว้ด้วยปลายสไลด์อีกแผ่นหนึ่งที่มีขอบเรียบ โดยแตะปลายดังกล่าวกับหยดเลือดทำมุมเอียงกับแผ่นสไลด์ประมาณ 30-45 องศา เลื่อนขอบกระจกสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางด้านปลายอีกข้างหนึ่งของแผ่นสไลด์ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ เลือดจะแผ่เป็นฟิล์มบางบนแผ่นกระจก รอให้ฟิล์มเลือดแห้งสนิท จากนั้นนำไป fix ด้วย absolute methanol เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท แล้วจึงนำไปย้อมสีในอัตราส่วนสียิมซ้า 1 ส่วนต่อบัฟเฟอร์ 20 ส่วน โดยหยดสีให้ท่วมบริเวณฟิล์มเลือด ทิ้งไว้นาน 30 นาที จึงล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำไปวินิจฉัยและนับจำนวนเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

วิธีการนับจำนวนเชื้อจากฟิล์มเลือดชนิดบาง

ปรับกล้องจุลทรรศน์ตรง objective lens ด้วยกำลังขยาย 40x เลื่อนหาบริเวณที่เม็ดเลือดแดงมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว โดยปกติแล้วจะพบในบริเวณส่วนปลายของฟิล์มเลือดบาง จากนั้นเปลี่ยน objective lens เป็นกำลังขยาย 100x นับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่พบใน 1 วงกล้อง (ให้ถือเป็นค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงต่อ 1 วงกล้อง) จากนั้นนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียให้ได้ประมาณ 100 วงกล้อง ทำการคำนวณจำนวนเชื้อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ค่าที่ได้จากการนับจำนวนเชื้อแบบฟิล์มเลือดบางจะเป็น % parasitemia ยกตัวอย่างเช่น นับจำนวนเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยใน 1 วงกล้องได้ 250 เซลล์ ต้องนับจำนวนเชื้อทั้งหมด 100 วงกล้อง คิดเป็นเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 250×100 เท่ากับ 25,000 เซลล์ และสมมุติว่า นับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียจำนวน 100 วงกล้องได้ 50 เซลล์ ดังนั้นคิดเป็น % parasitemia ได้เท่ากับ $50 \times 100 / 25,000$ เท่ากับ 0.2

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงต่อ 1 วงกล้อง} \times \text{จำนวนวงกล้อง}}$$

วิธีการทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนา (thick blood film)

การย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนาคคล้ายกับวิธีการย้อมฟิล์มเลือดชนิดบาง ยกเว้นขั้นตอนการตรึงด้วย absolute methanol ซึ่งไม่ต้องใช้สำหรับการย้อมฟิล์มเลือดชนิดหนา เพราะฟิล์มเลือดชนิดหนาต้องการให้เม็ดเลือดแดงแตกในระหว่างขั้นตอนการย้อม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ หยดเลือดประมาณ 3-5 ไมโครลิตร ลงบนที่จุดศูนย์กลางของสไลด์ที่แห้งและสะอาด ทำการเกลี่ยเลือดให้เป็นวงโดยใช้มุมของสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง เกลี่ยเลือดให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร เมื่อเลือดแห้งสนิทแล้วจึงนำไปย้อมด้วยสีิมซ่านในอัตราส่วนเช่นเดียวกับวิธีการย้อมสีชนิดบาง ซึ่งต้องระวังไม่ให้ฟิล์มเลือดนั้นหนามากจนเกินไปเพราะจะทำให้การติดสีไม่ดีอาจหลุดลอกออกจากสไลด์ในขั้นตอนการย้อมสี ในทางตรงข้ามถ้าฟิล์มเลือดบางเกินไปจะทำให้เสียเวลาในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการนับจำนวนเชื้อจากฟิล์มเลือดชนิดหนา

ปรับกล้องจุลทรรศน์ objective lens ด้วยกำลังขยาย 40x เลื่อนหาเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แล้วเปลี่ยน objective lens เป็นกำลังขยาย 100x นับจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว แล้วคำนวณหาเชื้อต่อเลือด 1 ไมโครลิตร โดยค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 8,000 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ค่าที่ได้จากการนับเชื้อแผ่นฟิล์มเลือดชนิดหนา คือ จำนวนเชื้อมาลาเรียต่อไมโครลิตร (parasite/ μ l) ยกตัวอย่างเช่น นับจำนวนเชื้อมาลาเรียได้ 50 ตัวต่อเม็ดเลือดขาว 200 ตัว ถ้าประมาณว่าเลือด 1 ไมโครลิตร มีเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยประมาณ 8,000 ตัว ดังนั้นความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรียในเลือด มีจำนวนประมาณ 2,000 parasite/ μ l

$$\text{ความหนาแน่นของเชื้อ (parasite}/\mu\text{l)} = \frac{\text{จำนวนเชื้อมาลาเรีย} \times \text{ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาวในเลือด } 1 \mu\text{l}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับ}}$$

การสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ QIA DNA mini kit ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

1. นำเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเติม AL บัฟเฟอร์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
2. เติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยผสมทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 20 นาที หรือจนกว่าเม็ดเลือดจะแตกตัว
3. เติมเอทานอล (95-100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
4. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทั้งหมดจากข้อ 3 ใส่ลงใน QIAamp Spin Column
5. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงนำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่
6. เติม AW1 บัฟเฟอร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

7. นำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่ เดิม AW2 บัฟเฟอร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
8. นำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
9. นำ QIAamp Spin Column มาใส่ใน collection tube หลอดใหม่ เดิม AE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเอาดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
10. ดูดีเอ็นเอที่เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดกลาง 0.5 มิลลิลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแม่แบบ สำหรับทำ PCR ต่อไป

การออกแบบ oligonucleotides สำหรับใช้เป็น PCR primers

การออกแบบ Primer โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน sporozoite threonine asparagines rich protein หรือ STARP เป็นต้นแบบ ซึ่งใช้ข้อมูลอ้างอิงจาก www.ncbi.nlm.nih.gov หมายเลข Z 26314 ของ *P. falciparum* (clone T9/96) ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณ STARP 3' non-repeat หรือที่ตำแหน่ง 1468 ถึง 1815 ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ PCR primers คือ STARP-CTF และ STARP-CTR โดย STARP-CTF ประกอบด้วย oligonucleotides 28 mers มีลำดับเบสดังนี้ 5'-GGG ATC CAC AAA CCA ATA TGT CTT TGC T-3' ตรงกับตำแหน่งที่ 1462 ถึง 1482 เบสที่ขีดเส้นใต้เป็นการทำ mismatch เพื่อให้เกิด artificial restriction site สำหรับ *Bam*HI ส่วน STARP-CTR ประกอบด้วย oligonucleotides 31 mers มีลำดับเบสดังนี้ 5'-GAA GCT ITT AAT TAA TTA ACA TAT ATA AAG C-3' ตรงกับตำแหน่งที่ 1792 ถึง 1815 เบสที่ขีดเส้นใต้เป็นการทำ mismatch เพื่อให้เกิด artificial restriction site สำหรับ *Hind*III

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยจะต้องใช้องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาต่อ 1 ตัวอย่าง ในปริมาณสารละลายสุทธิ 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

ดีเอ็นเอแม่แบบ	2.00	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ทั้ง forward และ reverse อย่างละ	0.26	ไมโครลิตร
10X PCR Buffer	3.00	ไมโครลิตร

MgCl ₂	3.00	ไมโครลิตร
dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์	4.80	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.30	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	16.34	ไมโครลิตร

นำหลอดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของการทำ PCR เข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และเวลาอัตโนมัติ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือ ทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย (DNA denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที การทำให้ primer จับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ (primer-template annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.4 นาที และการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (primer extension) ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำ PCR products ที่ได้นำไปตรวจหาผลผลิต PCR

การตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี gel electrophoresis

ทำการเตรียมเจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยชั่งผงอะกาโรส 2 กรัม ละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดแล้วเขย่าให้อะกาโรสเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 ถึง 60 °C จากนั้นนำอะกาโรสไปเทลงใน gel chamber ที่เตรียมไว้ ใส่ comb แล้วทิ้งไว้จนอะกาโรสแข็งตัว ค่อย ๆ ดึง comb ออก โดยดึงปลายทั้งสองข้างออกพร้อมกัน ระวังอย่าให้เจลแตกหรือฉีกขาด ทำการเติม 1X TBE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใน electrophoresis chamber นำผลผลิต PCR ที่ได้ผสมกับ loading dye ปริมาตรประมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุมเจล และใช้ marker VI เป็นดีเอ็นเอบอกขนาด เพื่อใช้เปรียบเทียบกับขนาดของผลผลิต PCR ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 ถึง 40 นาที หลังจากนั้นนำเจลอะกาโรสไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 ถึง 15 นาที นำไปตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพไว้เพื่อวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบอกขนาด

การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR purification kit ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

1. เติม 5 เท่าของ PB บัฟเฟอร์ ต่อปริมาตร 1 เท่าของผลผลิต PCR แล้วผสมให้เข้ากัน
2. ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

3. ทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column และใส่กลับที่เดิม
4. เติม PE บัฟเฟอร์ปริมาตร 730 ไมโครลิตรใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
5. ทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอดข้างล่าง column และใส่หลอดกลับที่เดิม ปั่นแห้ง spin column ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
6. จากนั้นทิ้งหลอดที่อยู่ด้านล่าง column ไป นำหลอด 1.5 มิลลิลิตรมาใส่แทน
7. เติม EB บัฟเฟอร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรงกลาง membrane ของ spin column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
8. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
9. เก็บผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่ -20 องศาเซลเซียส

การตกตะกอนดีเอ็นเอ (ethanol precipitation)

เติมสารละลาย 3M sodium acetate pH 5.2 และ absolute ethanol ลงในสารละลายที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการตกตะกอนในปริมาตร 1 ใน 10 เท่า และ 2 เท่าของสารละลายที่มีดีเอ็นเอตามลำดับ ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายทิ้ง จะเห็นตะกอนสีขาวสะอาด ซึ่งมีดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอด ทำการล้างเกลือที่ปะปนอยู่กับตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ร้อยละ 70 ที่แช่เย็นไว้ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วเท่าเดิมเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง จะได้ตะกอนของดีเอ็นเอเกาะแน่นที่ก้นหลอด ทดลอง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

การเชื่อมผลผลิต PCR กับ pQE-30xa

1. การตัดดีเอ็นเอและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อทำให้เกิดปลายเหนียว

นำผลผลิต PCR ทั้งหมด นำมาตกตะกอนด้วยวิธี Ethanol precipitation เมื่อดีเอ็นเอแห้งให้ทำ reaction mixture โดยเติมส่วนประกอบต่อไปนี้ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่วางบนน้ำแข็ง สำหรับการย่อยดังนี้

ดีเอ็นเอละลายน้ำบริสุทธิ์	16	ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์	2	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	2	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	20	ไมโครลิตร

ย่อยปลาย 5' ของผลผลิต PCR ด้วย *Bam*HI ซึ่งบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1mM 2-mercaptoethanol, 0.02% Triton-X 100 และ 0.1 mg/ml BSA ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วทำการย่อยปลายด้าน 3' ด้วย *Hind*III ซึ่งบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl และ 0.1 mg/ml BSA ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปลายนิ้วเคาะที่ก้นหลอดเบา ๆ นำไปปั่นตก (spin down) เพื่อให้สารทั้งหมดตกมาอยู่ที่ก้นหลอด แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตกตะกอนดีเอ็นเอและทำให้แห้งอีกครั้ง

ในส่วนของ pQE-30Xa ทำการย่อยส่วน multiple cloning site ด้วย *Bam*HI และ *Hind*III เช่นเดียวกับการย่อยดีเอ็นเอตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

2. การแยกส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการและทำให้บริสุทธิ์

นำผลผลิต PCR และ pQE-30Xa ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว นำมาละลายด้วย TE buffer ปริมาตร 20 µl เติม loading dye 5 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปแยกแถบดีเอ็นเอโดยวิธี เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ด้วย low melting agarose ร้อยละ 1 หลังจากย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) ทำการตัดแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการด้วยใบมีด โดยให้มีปริมาตรของเจลน้อยที่สุด ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล ซึ่งวิธีการสกัดโดยใช้ QIAquick gel extraction kit ได้ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

1. ตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการออกจากเจลด้วยมีดที่สะอาด
2. ชั่งน้ำหนักของเจลที่ตัดได้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม QC บัฟเฟอร์ ต่อน้ำหนักเจลในอัตราส่วน 3 : 1 โดยน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัมมีค่าประมาณ 100 ไมโครลิตร
3. นำไปปั่นใน heat box ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายจนหมด และเพื่อช่วยให้การละลายของเจลดีขึ้นควรเขย่าหลอดทุก ๆ 2 นาที

4. เมื่อเจลละลายหมดแล้วสังเกตสีของสารละลายว่ายังเป็นสีเหลืองของ QC บัฟเฟอร์ ก่อนที่จะละลายเจลหรือไม่ ถ้าสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือม่วง ให้เติม 3 M sodium acetate (pH 5.0) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันจนสารละลาย กลับเป็นสีเหลือง
5. วาง QIAquick spin column บน collection tube ขนาด 2 มิลลิเมตร ดูดสารละลาย จากข้อ 4 ใส่ลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อจับดีเอ็นเอไว้บน column
6. เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง แล้วเติม QC บัฟเฟอร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 1 นาที เพื่อล้างเอาเจลอะกาโรสออก
7. เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง แล้วเติม PE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 1 นาที เพื่อล้างเอาเกลือออก
8. เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง แล้ววาง QIAquick spin column กลับไปบน collection tube เดิม นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เพื่อดึงเอา ethanol ที่เหลือตกค้างจากสารละลาย PE ออก
9. นำ QIAquick spin column ไปวางบนหลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตร หลอดใหม่
10. เติม EB บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ QIAquick membrane ตั้ง ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
11. เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเชื่อมผลผลิต PCR เข้าสู่ pQE-30Xa

นำผลผลิต PCR กับ pQE-30Xa ที่ได้จากการตัดเจล มาเตรียม ligation buffer โดยเติม

ส่วน ประกอบต่อไปนี้ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตรที่วางบนน้ำแข็ง ตามลำดับ

Nuclease-free water	12	ไมโครลิตร
10X ligation buffer	2	ไมโครลิตร
(ประกอบด้วย 400 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT และ 5 mM dATP)		
pQE-30xa vector	2	ไมโครลิตร

ดีเอ็นเอ	3	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	20	ไมโครลิตร

เมื่อผสมให้เข้ากันโดยใช้ปลายนิ้วเคาะที่ก้นหลอดเบา ๆ นำไปปั่นตก (spin down) เพื่อให้สารทั้งหมดตกมาอยู่ที่ก้นหลอด แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แผนภาพแสดงการเชื่อมระหว่างดีเอ็นเอ STARP 3' non-repeat จากผลผลิต PCR และ pQE-30Xa โดยอาศัยปลายที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังแสดงในภาพที่ 6

การทำทรานสฟอร์เมชัน (transformation)

แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* strain M15

โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์

ทำการ subculture เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB pH 6.8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่ overnight culture ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตรอยู่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงหรือจนวัดค่าที่ OD₆₀₀ ได้ค่าประมาณ 0.3-0.4 จากนั้นนำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่แช่เย็นไว้แล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไป ผสมเซลล์และสารละลายให้เข้ากัน แล้วแช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนทิ้งแล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเซลล์และสารละลายให้เข้ากัน ดูด competent cell ที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วแช่ไว้ในน้ำแข็ง นำไปใช้ในการทำทรานสฟอร์เมชันต่อไป

2. การนำดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* (transformation)

ดูด competent cell ใส่ลงใน eppendorf tube ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม recombinant DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน แช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 40 นาที ทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำออกมาแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป

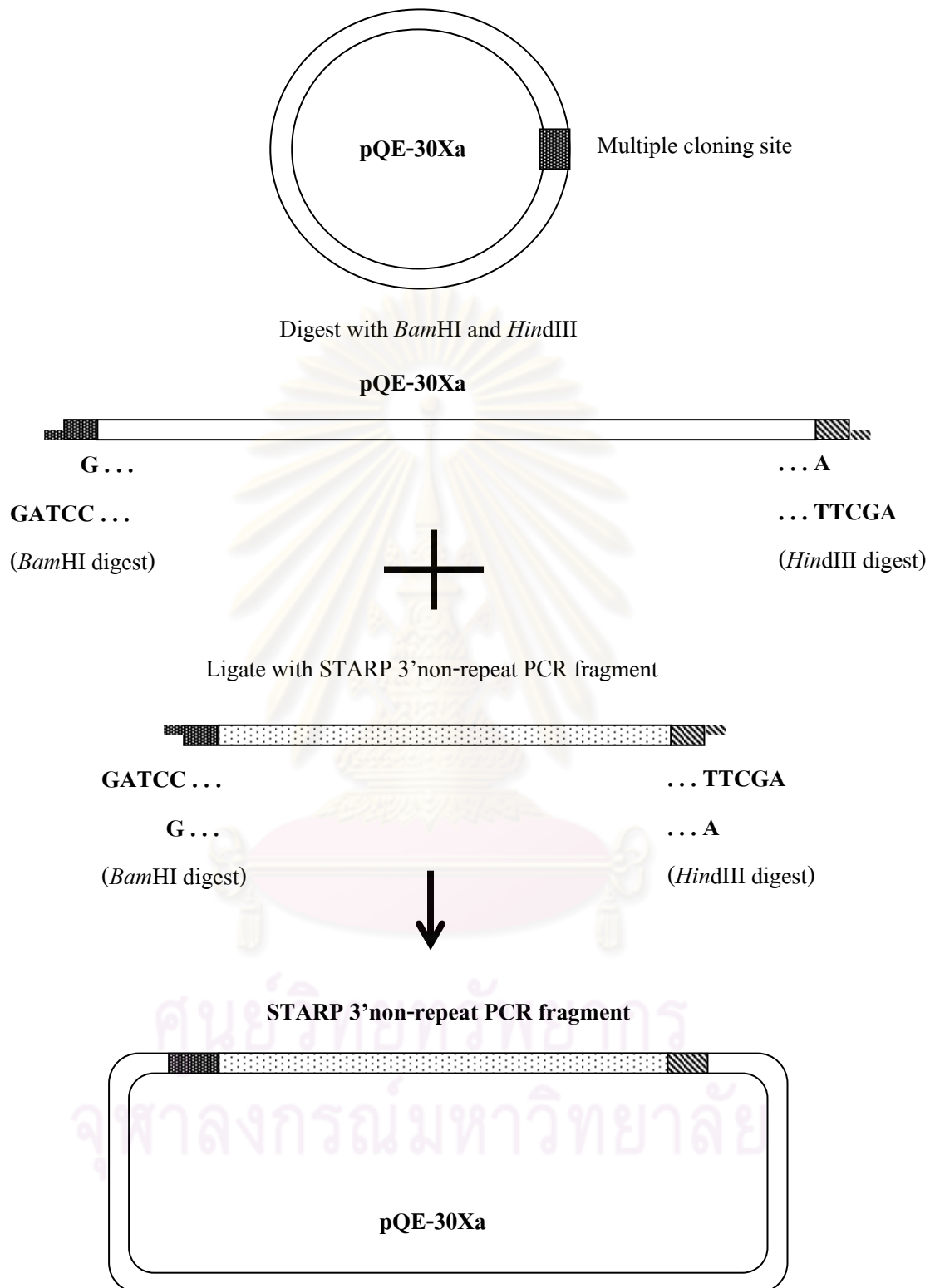
เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาแบ่ง spread ปริมาณ 200 และ 300 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ug/ml และยาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 25 ug/ml ผสมอยู่ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีที่ได้ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะตามข้างต้น เพื่อคัดเลือก transformant ที่มี recombinant DNA ด้วยการทำโคลนี PCR

การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA

เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (automated DNA sequencing) เป็นวิธีการหาลำดับเบสของ DNA โดยอาศัยหลักการของ dideoxy chain termination แตกต่างกันตรงที่การติดฉลาก DNA จะใช้สารเรืองแสง เช่น dRhodamine dye terminator แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี โดยอาศัยการติดตามการเรืองแสงของสีต่างๆ กัน 4 ชนิด สำหรับเบส 4 ตัว คือ A C G T สีที่ใช้ในการติดฉลากแต่ละตัว เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะเรืองแสงในช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกัน และแสงที่ปรากฏจะแตกต่างกัน โดยจะเห็นเป็นสีเขียว สีดำ สีน้ำเงิน และสีแดง ตามลำดับ ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer

การเตรียมเชื้อ *E. coli* และเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน (Growth of expression culture)

นำโคลนที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วว่ามียีนที่เชื่อมกับพลาสมิดและวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอแล้วว่าถูกต้อง ทำการ subculture โคลนนั้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ug/ml และคานามัยซินความเข้มข้น 25 ug/ml ผสมอยู่ บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าสารด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง วัดค่า OD₆₀₀ ได้ประมาณ 1-2 จากนั้นนำ overnight culture มาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ใหม่ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ug/ml และคานามัยซินความเข้มข้น 25 ug/ml ผสมอยู่ ด้วยอัตราส่วน 1:50 บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าสารด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที จนกระทั่งวัดค่า OD₆₀₀ ได้ประมาณ 0.4 ถึง 0.6 แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงมาเติม Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อเป็นการเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตโปรตีนบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าสารด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษา pellet ที่ -70 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 แสดงการเชื่อมระหว่างดีเอ็นเอ STARP 3' non-repeat จากผลผลิต PCR และ pQE-30Xa โดยอาศัยปลายที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III

การสกัดโปรตีนและทำให้บริสุทธิ์ (protein extraction and purification)

1. การสกัดโปรตีน (protein extraction)

ทำการละลาย pellet โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้ว resuspend ด้วย lysis buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใช้ micropipette ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นเติม lysozyme ความเข้มข้น 10 mg/ml และเติมสารยับยั้งการทำลายโปรตีน (protease inhibitor) ด้วยอัตราส่วน 1:100 แล้วจึงแช่เซลล์ *E. coli* ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ทำการ sonicate โดยต้องแช่ในน้ำแข็งทั้งหมด 6 รอบ ๆ ละ 10 วินาที ในแต่ละรอบหยุดพัก 5 วินาที และต้องระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บแยกส่วนของ supernatant และ pellet ที่ -70 องศาเซลเซียส

2. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (protein purification)

การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA spin kit (QIAGEN) ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

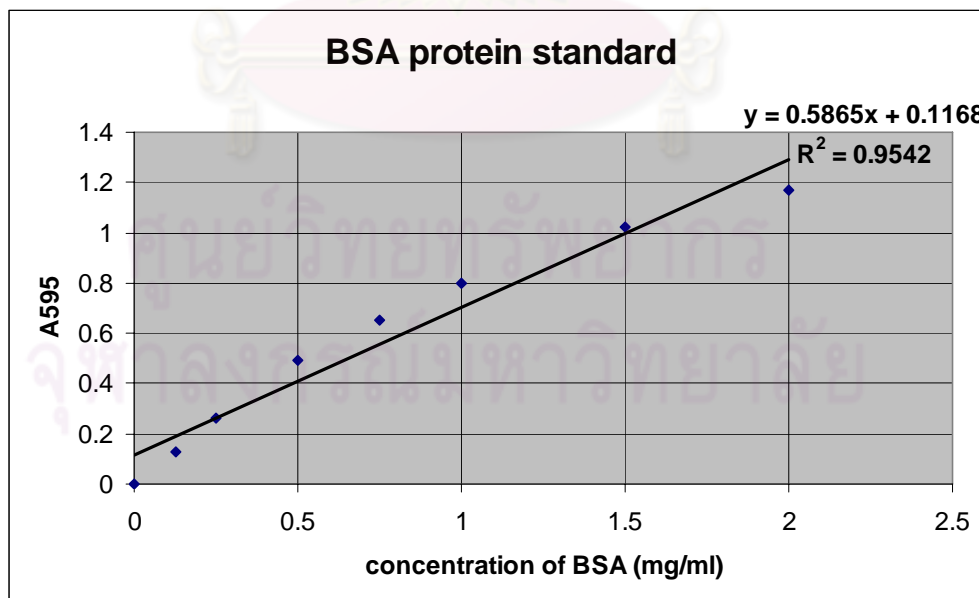
1. เติม lysis buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน Ni-NTA spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 700 g เป็นเวลา 2 นาที ที่ส่วนของสารละลายที่ไหลผ่าน column
2. เติมส่วนของ supernatant ที่ได้จากการสกัดโปรตีน ลงใน Ni-NTA spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 700 g เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษาส่วนของสารละลายที่ไหลผ่าน column
3. ล้าง Ni-NTA spin column จำนวน 2 รอบ ด้วย wash buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตรรอบละ 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 700 g เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษาส่วนของสารละลายที่ล้างผ่าน column
4. ทำการชะล้างโปรตีนออกจาก Ni-Nta spin column จำนวน 2 รอบ ด้วย elution buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตรรอบละ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 700 g เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษาโปรตีนที่ -70 องศาเซลเซียส

เนื่องจากในแต่ละขั้นตอน ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำ จึงต้องเปิดฝา Ni-NTA spin column ทุกครั้งในขณะที่ปั่นเหวี่ยง เพื่อให้บัฟเฟอร์ทั้งหมดไหลผ่าน column ได้อย่างสมบูรณ์

การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีน โดยใช้ Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-rad) ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ดังต่อไปนี้

1. นำ 1X dye reagent จากที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น 4 °C มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะนำไปใช้
2. ดูดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ 1X dye reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex หรือการ invert
4. บ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที ห้ามทิ้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเกินกว่า 1 ชั่วโมง
5. วัดตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 595 นาโนเมตร ซ้ำ 3 รอบ
6. หาค่าปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟ BSA protein standard (กราฟที่ 1)



กราฟที่ 1 กราฟเส้นตรงแสดงค่าความขุ่นที่ 595 นาโนเมตร ของ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE)

การเตรียมเจล

1. ทำการประกอบชุดแผ่นแก้วเข้าด้วยกันด้วย spacer ล็อคให้แนบติดกันด้วย clamp แล้ววางลงใน casting stand
2. เตรียม resolving gel ความเข้มข้น 15% ปริมาตร 5 มิลลิลิตรโดยผสมสารต่อไปนี้ตามลำดับ เขย่าวนเบา ๆ ให้เข้ากัน แต่ยังไม่ต้องเติม TEMED กับ ammonium persulfate

น้ำปราศจากไอออน	1.1	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-Cl	2.5	มิลลิลิตร
30% bis/acrylamide solution	1.3	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
10% APS	50	ไมโครลิตร
TEMED	2	ไมโครลิตร
3. เติม TEMED กับ ammonium persulfate แล้วเขย่าวนเบา ๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
4. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจลใส่ลงในช่องที่มุมแผ่นแก้ว จากนั้นค่อย ๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
5. เตรียม stacking gel ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร โดยผสมสารต่อไปนี้ตามลำดับ

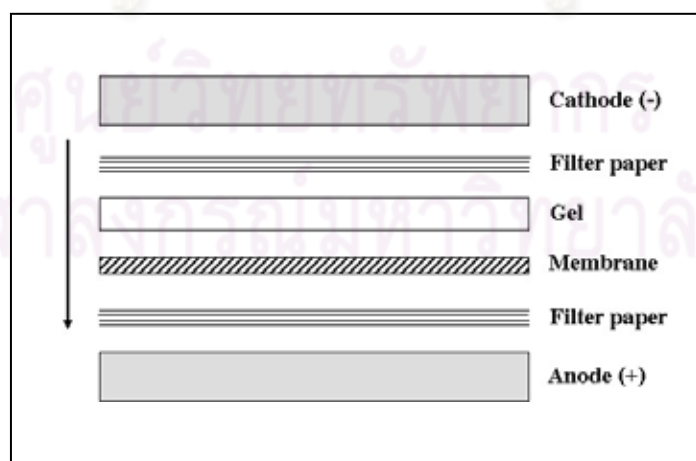
น้ำปราศจากไอออน	2.7	มิลลิลิตร
1 M Tris-Cl	0.5	มิลลิลิตร
30% bis/acrylamide solution	0.67	มิลลิลิตร
10% SDS	40	ไมโครลิตร
10% APS	40	ไมโครลิตร
TEMED	4	ไมโครลิตร
6. เทน้ำที่ปิดหน้าเจลออก แล้วซับให้แห้ง จากนั้นดูดสารละลาย stacking gel ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้ว เสียบ comb เพื่อให้เกิดช่อง (well)
7. ทิ้งไว้จนกว่าเจลจะแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที แล้วเอา comb ออกระวังอย่าให้เจลขาด

การเตรียมตัวอย่างและทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

1. ผสมโปรตีนตัวอย่างกับ loading dye แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
2. เติม running buffer ลงใน chamber แล้วหยอดสารตัวอย่างลงในแต่ละช่อง
3. ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน และเสียบปลั๊กต่อกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
4. ตั้งกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 60 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 110 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อ tracking dye ลงมาถึงขอบเจลด้านล่างสุด
5. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber แล้วใช้ spatula จัดแผ่นแก้วเบา ๆ เจลจะติดอยู่กับแผ่นแก้วข้างใดข้างหนึ่ง ค่อย ๆ เทเจลใส่ถาด

การถ่ายโปรตีนลงบน PVDF member โดยวิธี semi-dry transfer

1. ตัด PVDF member และกระดาษ whatman 3M ให้ได้ขนาดเท่ากับแผ่นเจล
2. จุ่ม PVDF membrane ใน methanol ประมาณ 10 วินาที แล้วแช่ต่อน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำมาแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 10 นาที
3. pre-wet กระดาษ whatman 3M ด้วย transfer buffer แล้วประกบแผ่นเจลเรียงลำดับ เพื่อเตรียมการถ่ายโปรตีน (ภาพที่ 7)
4. ใช้ปิเปตได้ฟองอากาศออกแต่ระหว่างชั้นออกให้หมด
5. ตั้งกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 10 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 20 นาที



ภาพที่ 7 แสดงการถ่ายโปรตีนลงบน PVDF member โดยวิธี semi-dry transfer จากภาพโปรตีนเคลื่อนที่จากประจุลบไปหาประจุบวก

การทำ Western blot

เมื่อทำการถ่ายโปรตีนลงบน PVDF membrane เรียบร้อยแล้ว ให้ทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ membrane มาล้างด้วย TBS buffer จำนวน 1 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
2. บ่ม membrane ด้วย blocking buffer (5% non-fat dry milk ใน TBS-Tween) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
3. ล้าง membrane ด้วย TBS-Tween/Triton buffer จำนวน 3 รอบ ๆ ละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. บ่ม membrane ด้วย primary antibody (serum ของผู้ป่วยมาลาเรีย) ด้วยอัตราส่วน 1:200 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
5. ล้าง membrane ด้วย TBS-Tween/Triton buffer จำนวน 3 รอบ ๆ ละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. บ่ม membrane ด้วย secondary antibody (Anti-human IgG antibody HRP-conjugate) ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
7. ล้าง membrane ด้วย TBS-Tween/Triton buffer จำนวน 4 รอบ ๆ ละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
8. บ่ม membrane ด้วยสาร chemiluminescence เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและแอนติบอดี

การย้อมสีโปรตีนด้วย coomassie brilliant blue solution

Protein staining solution คือ สารละลายที่ใช้ย้อมโปรตีนใน polyacrylamide gel โดยสารที่ทำหน้าที่ย้อมติดสีโปรตีนคือสารสีน้ำเงินของ coomassie brilliant blue R ซึ่งประจุของ coomassie brilliant blue R ที่อยู่ในสารละลายที่มีความเป็นกรดจะอยู่ในรูปของประจุลบ โดยประจุลบนี้จะไปจับกับหมู่อะมิโนของโปรตีน ($-NH_3^+$) ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อน ซึ่ง coomassie brilliant blue R มีความไวสูง สามารถย้อมติดโปรตีนในเจลที่มีปริมาณน้อยถึง $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

การย้อมสีโปรตีนทำได้โดยการแช่เจลข้ามคืนใน coomassie brilliant blue R-250 solution ด้วยอัตราส่วน 0.25% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol และ 10% glacial acetic acid จากนั้นทำการล้างสีส่วนเกินออกจากเจล โดยใช้ 18% methanol และ 7% glacial acetic acid เปลี่ยนสารละลาย 3 ถึง 4 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพได้แก่ เพศ เชื้อชาติ แหล่งที่อยู่ ประวัติการเจ็บป่วยและอาการแสดงที่สำคัญของโรคมาลาเรีย สำหรับข้อมูลที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ ได้แก่อายุ อุณหภูมิร่างกาย วิเคราะห์ข้อมูลในรูปของความถี่ ร้อยละ ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุดและค่าเฉลี่ย
2. คำนวณหาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเชื้อ *P. falciparum* กับปริมาณแอนติบอดีจากการทดสอบที่ให้ผลบวก โดยใช้การทดสอบไคสแควร์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ตัวอย่างซีรัมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 111 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* จำนวน 54 ตัวอย่าง ทำการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2549 ที่ อ.ท่าสองยาง จ.ตาก จำนวน 23 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง TSY1681, TSY1689, TSY1690, TSY1699, TSY1706, TSY1707, TSY1720, TSY1734, TSY1741, TSY1742, TSY1745, TSY1746, TSY1748, TSY1749, TSY1750, TSY1753, TSY1757, TSY1775, TSY1788, TSY1789, TSY1794, TSY1811 และ TSY1813 และทำการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2552 ที่ อ.อุ้มผาง จ.ตาก จำนวน 31 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง AP380, AP383, AP385, AP386, AP387, AP389, AP397, AP399, AP400, AP401, AP414, AP415, AP418, AP419, AP426, AP430, AP432, AP433, AP441, AP445, AP821, AP822, AP823, AP836, AP856, AP858, AP868, AP876, AP878, AP881 และ AP882 ซึ่งข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยแสดงในตารางที่ 5 จากกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ทั้งหมดจำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเพศชายร้อยละ 59.3 เพศหญิงร้อยละ 40.7 อายุเฉลี่ย 25 ปี โดยผู้ป่วยมีอายุสูงสุด 60 ปี และอายุต่ำสุดคือ 4 ปี ซึ่งช่วงอายุต่ำกว่า 15 ปีเป็นช่วงที่พบมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 31.5 ช่วงอายุ 16 – 25 ปี คิดเป็นร้อยละ 24.1 ช่วงอายุ 26 – 35 ปี คิดเป็นร้อยละ 20.4 ส่วนช่วงอายุ 36 – 45 ปี เป็นช่วงที่พบน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 11.1 และช่วงอายุที่มากกว่า 45 ปี คิดเป็นร้อยละ 12.9 โดยมีอุณหภูมิร่างกายเฉลี่ย 37.5 องศาเซลเซียส

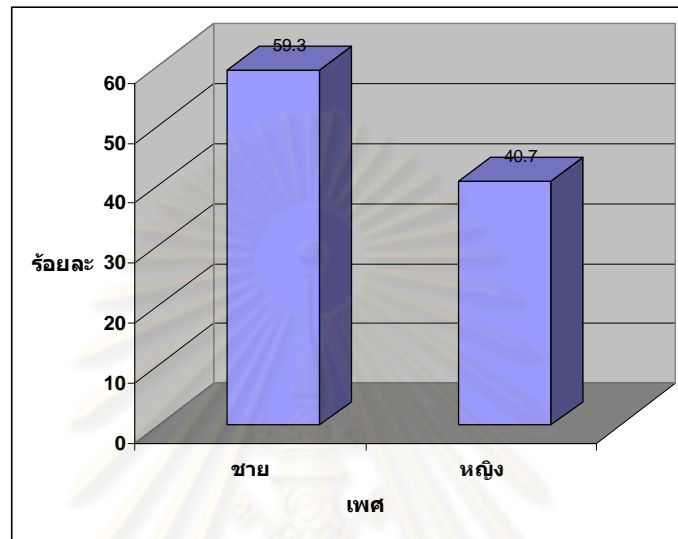
กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. vivax* จำนวน 20 ตัวอย่าง ทำการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2549 จำนวน 15 ตัวอย่าง และเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2552 จำนวน 5 ตัวอย่าง สำหรับกลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างซีรัมของกลุ่มเสี่ยง กล่าวคือเป็นผู้ที่อาศัยอยู่ร่วมกับผู้ป่วยมาลาเรียหรือผู้ที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียและไม่มีอาการไข้ ซึ่งทำการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2552 จำนวน 27 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่ 4 เป็นตัวอย่างซีรัมของผู้ที่ไม่ได้อาศัยหรือมีภูมิลำเนาอยู่ในพื้นที่ที่ระบาดของโรคมาลาเรีย ทำการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2552 จากอาสาสมัครในเขตพื้นที่ จ.กรุงเทพมหานคร จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างซีรัมสำหรับการศึกษานี้จำนวน 111 ตัวอย่าง จากการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2552

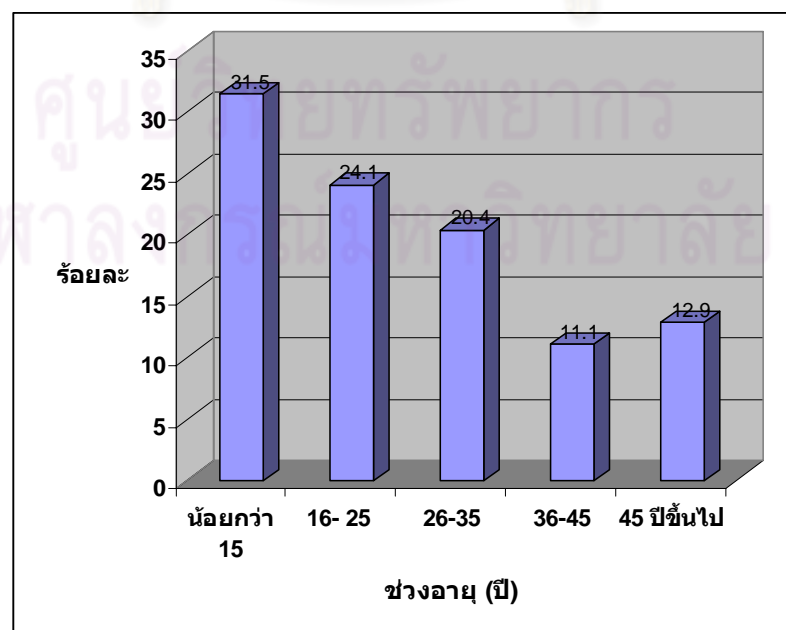
กลุ่ม	ตัวอย่างซีรัม	ปีที่เก็บตัวอย่าง (พ.ศ.)	แหล่งที่มา	รหัส	จำนวน
1	ผู้ป่วยมาลาเรีย	2549	อ.ท่าสองยาง จ.ตาก	TSY	23
	ชนิด <i>P. falciparum</i>	2552	อ.อุ้มผาง จ.ตาก	AP	31
2	ผู้ป่วยมาลาเรีย	2552	อ.อุ้มผาง จ.ตาก	AP	20
	ชนิด <i>P. vivax</i>				
3	กลุ่มเสี่ยง	2552	อ.อุ้มผาง จ.ตาก	AP	27
4	คนปกติ	2552	กรุงเทพมหานคร	N	10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

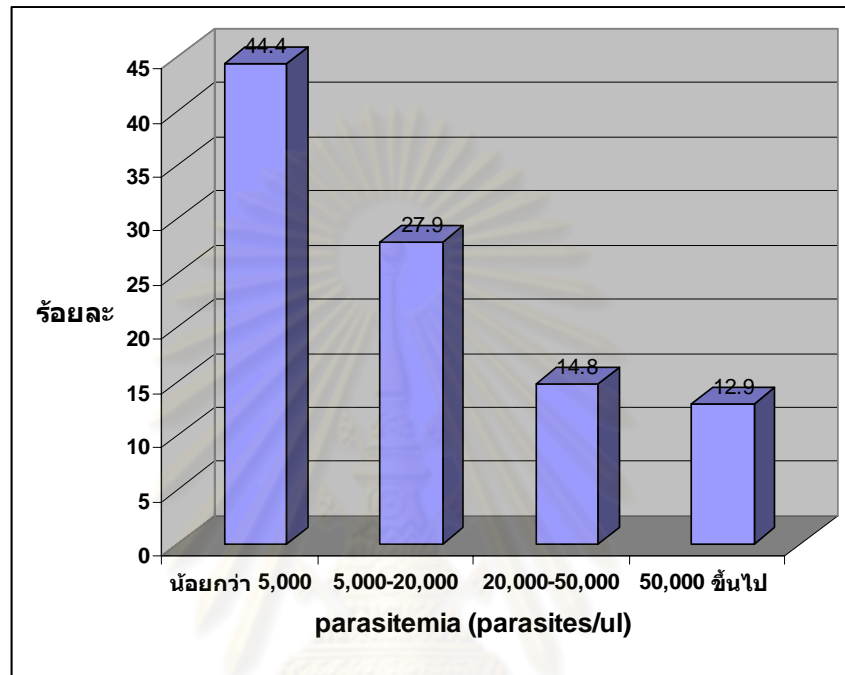
แผนภูมิที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มเพศชายและเพศหญิงของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*



แผนภูมิที่ 2 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มอายุของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*



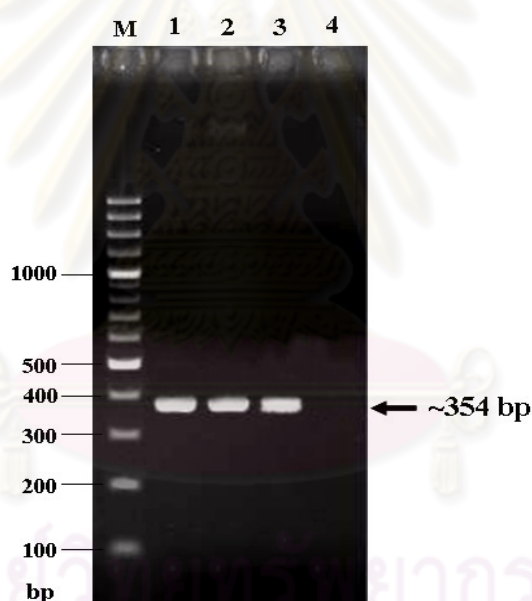
แผนภูมิที่ 3 แสดงข้อมูลทั่วไปของความหนาแน่นของเชื้อ *P. falciparum* (parasitemia : parasites/ μ l) ของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum*



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ 3'non-repeat ของยีน STARP โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน STARP 3'non-repeat อาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากการใช้ primer STARP-CTF และ STARP-CTR จากการวิเคราะห์ผลผลิตด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดคือ 100 bp DNA ladder plus พบว่าผลผลิตที่นำมาวิเคราะห์มีขนาดประมาณ 354 bp ซึ่งเป็นขนาดที่อยู่ในช่วงที่ต้องการศึกษา



ภาพที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เรียงตามหมายเลข 1, 2, 3 และ 4 คือ ตัวอย่าง T9/94, K1, TM9 และ negative control ตามลำดับ และตัวอักษร M คือดีเอ็นเอบอกขนาด

ผลการผลิตโปรตีนจากบริเวณ 3'non-repeat ของยีน STARP

ผลผลิต PCR จากบริเวณ 3'non-repeat ของยีน STARP สามารถเชื่อมเข้าสู่ pQE-30Xa vector ด้วยตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วยืนยันการเข้าสู่ frame ที่ถูกต้องโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสตั้งแต่ start codon ถึง stop codon

**ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTGGCTCTGGATCTGGTATCGAG
GGAAGGCCTTATAATGGAAGCTGGATCCACAAACCAATATGTCCTTTGCTAACAAATTAT
AATGAAACAACCTTCTGATGATGAACTAAATAAAGATTCTGTGATTATTCAGAAGAA
AAAGAAAATATAAAATCAATGATTAACGCTTATTTAGACAAGTTAGATTTAGAAACT
GTTCGTAAAATACATTCAGATATAAGTACATGTATTGAAAAAAAAATAATCCTAGG
AATCAATAACACATTTAAACAATTTAAAAAATATGTATAATATAATTAATTTATA
GTGGTTATATATATTGCTTTTAATTGGAGTGAAGTAATATATAAATATGTAGGAAAA
TTAATTTTAGCTTTTGCTTTATATATGTTAATTAATTAA**

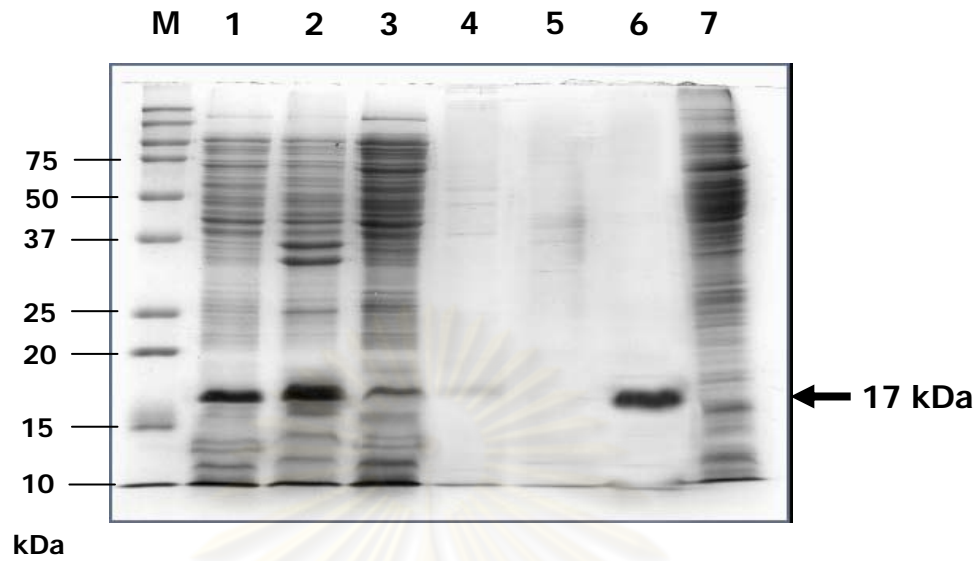
เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนจะได้กรดอะมิโนทั้งหมด 146 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 17 kDa

MRGSHHHHHHSGSGSGSIEGRPYNGTGSTNQYVFNANNYNETTSDDELNKDSCDYSEE
KENIKSMINAYLDKLDLETVRKIHSDISTCIEKKNPRNQITHLNNLKNMYNIIKFI
VVIYIAFNWSEVIYKYVVKLLILAFALYMLIN*

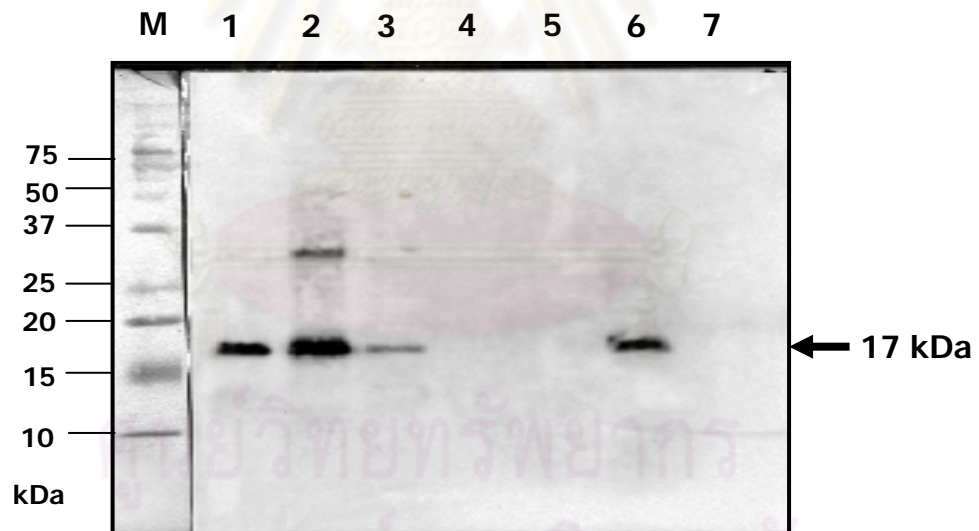
จากนั้น 6x His-tag fusion protein จะถูกผลิตใน *E. coli* สายพันธุ์ M15 โดยมี IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA spin column kit ซึ่งโปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 17 kDa ดังแสดงในภาพที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A.



B.



ภาพที่ 9 แสดงโปรตีนของ STARP 3'non-repeat มีขนาด 17 kDa ซึ่งจากภาพ M คือ protein standard marker, 1 คือ cell lysate, 2 คือ pellet, 3 คือ flow-through, 4 คือ first wash, 5 คือ second wash, 6 คือ eluate และ 7 คือ *E. coli* M15 ที่ไม่มีพลาสมิด โดยที่ A คือการย้อมสีโปรตีนด้วย coomassie brilliant blue R-250 และ B คือการทำ western blot ติดตามด้วย RGS-His HRP conjugate antibody

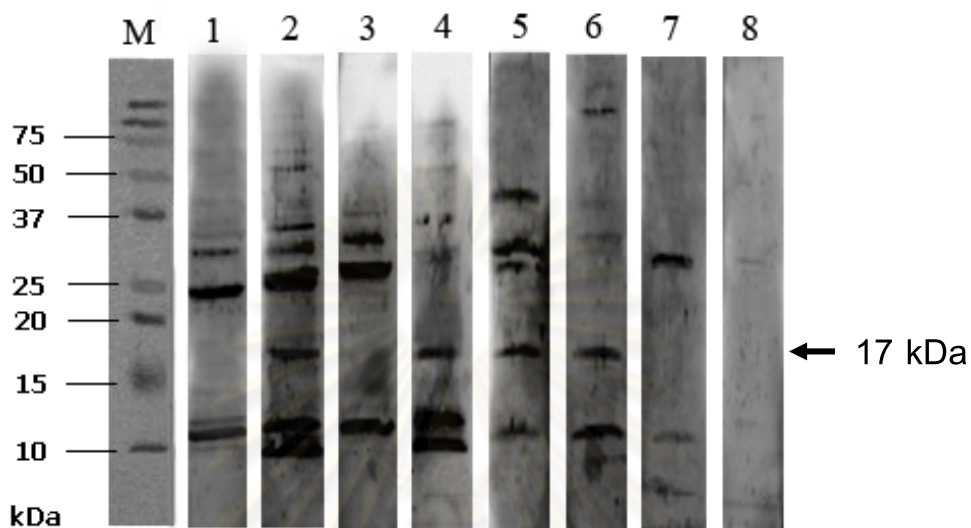
ผลการทดสอบ 6x His-tag fusion protein กับตัวอย่างซีรัม

6x His-tag fusion protein มีขนาดประมาณ 17 kDa เมื่อทดสอบความสามารถในการเป็นแอนติเจนกับซีรัมทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่าง พบว่าในซีรัมของผู้ป่วยมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ตรวจพบ anti-STARP 3'non-repeat antibodies จำนวน 23 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 54 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.6 (ตารางที่ 3) ส่วนซีรัมในกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ ทั้ง *P. vivax* กลุ่มเสี่ยง และคนปกติ ไม่พบ anti-STARP 3'non-repeat antibody

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการเป็นแอนติเจนของ 6x His-tag fusion protein กับตัวอย่างซีรัมทั้ง 4 กลุ่ม

Serum samples	anti-STARP 3' non-repeat antibody
<i>P. falciparum</i>	23 / 54 (42.6)
<i>P. vivax</i>	0 / 20
กลุ่มเสี่ยง	0 / 27
คนปกติ	0 / 10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 แสดง 6X his-tag fusion protein ทำปฏิกิริยากับซีรัมของกลุ่มตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกแสดงขนาดของโปรตีน 17 กิโลดาลตัน ซึ่ง M คือ M protein standard marker, 1 คือ TSY 1681, 2 คือ TSY1690, 3 คือ TSY 1699, 4 คือ TSY 1706, 5 คือ AP 882, 6 คือ AP 380, 7 คือ AP 840 (ตัวอย่าง *P. vivax*) และ 8 คือ N1 (ตัวอย่างคนปกติ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเชื้อมาลาเรีย (parasitemia) กับ anti-STARP 3' non repeat antibody

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่า parasitemia กับ anti-STARP 3'non-repeat antibody พบว่าตัวอย่างที่มีค่า parasitemia มากกว่าหรือเท่ากับ 5,000 parasites/ul ทำการทดสอบพบ (positive) และไม่พบ (negative) anti-STARP 3'non-repeat antibody จำนวน 15 ตัวอย่างเท่ากัน ส่วนตัวอย่างที่มีค่า parasitemia น้อยกว่า 5,000 parasites/ul ทดสอบพบ anti-STARP 3'non-repeat antibody จำนวน 8 ตัวอย่าง และไม่พบจำนวน 16 ตัวอย่าง ทำการทดสอบไคสแควร์หาความสัมพันธ์โดยใช้ตารางขนาด 2x2 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ตารางขนาด 2x2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า parasitemia กับจำนวนตัวอย่างที่พบหรือไม่พบ anti-STRAP 3'non-repeat antibody เพื่อทดสอบไคสแควร์

Result	parasitemia		total
	≥ 5,000 P/ul	< 5,000 P/ul	
Positive	15 (a)	8 (b)	23 (e)
Negative	15 (c)	16 (d)	31 (f)
total	30 (g)	24 (h)	54 (n)

สมมติฐาน: H_0 : parasitemia ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนติบอดีจากการทดสอบที่ให้

ผลบวก

H_1 : parasitemia มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนติบอดีจากการทดสอบที่ให้

ผลบวก

$$\text{สูตร } \chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 n}{e.f.g.h}$$

$$\chi^2 = \frac{[(15)(16) - (8)(15)]^2 (54)}{(23)(31)(30)(24)}$$

$$\chi^2 = 1.515$$

กำหนดระดับนัยสำคัญของการทดสอบ (α) = 0.05

ค่า d.f = จำนวนกลุ่ม - 1 = 2-1 = 1 ดังนั้นค่า χ^2 จากตารางมีค่าเท่ากับ 3.841

สรุป ค่า χ^2 จากการคำนวณได้เท่ากับ 1.515 มีค่าน้อยกว่าค่า χ^2 จากตารางคือ 3.841 จึงต้องยอมรับสมมติฐาน H_0 แสดงว่าค่า parasitemia ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอนติบอดีจากการทดสอบที่ให้ผลบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

แม้ว่าในปัจจุบันจะมีมาตรการการป้องกันและควบคุมโรคมาลาเรียอย่างมีประสิทธิภาพในหลายภูมิภาคของโลก แต่ในทุก ๆ ปี องค์การอนามัยโลกยังคงมีรายงานถึงอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากโรคมาลาเรียของประชากรโลกมากกว่าล้านคนต่อปี ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการดื้อยาหลายชนิดของเชื้อมาลาเรีย ความสามารถทนทานต่อยาฆ่าแมลงที่มากขึ้นหรือพฤติกรรม การหากินที่เปลี่ยนแปลงจากเดิมของยุงก้นปล่อง การเปลี่ยนแปลงสภาวะของโลกที่เอื้อต่อการแพร่กระจายของโรคมาลาเรีย ตลอดจนการขาดเสถียรภาพและความไม่สงบทางการเมืองในหลาย ท้องที่โดยเฉพาะในแอฟริกา ดังนั้นมาตรการที่สำคัญสำหรับควบคุมโรคมาลาเรียที่ได้รับความ สนใจในหลายทศวรรษคือการผลิตวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย แต่ในปัจจุบันวัคซีนที่ป้องกันโรค มาลาเรียที่มีประสิทธิภาพดีและเหมาะสมกับการใช้ในประชากรในเขตปრაการูโรคยังไม่ประสบ ผลสำเร็จ นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามค้นหาแอนติเจนที่สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ เกิดการตอบสนองได้อย่างสมบูรณ์ เพื่อนำมาเป็นองค์ประกอบร่วมของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย นำไปสู่การลดความรุนแรงและเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย

เนื่องจากจำนวนของสปอริโซซอิต์ในการติดเชื้อแต่ละครั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี จำนวนน้อยและสปอริโซซอิต์ก็อยู่เป็นอิสระในระบบไหลเวียนเลือดเป็นเวลาสั้น ๆ เท่านั้น ซึ่งโดยทั่วไปเชื่อกันว่าสปอริโซซอิต์จะไม่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและไม่สามารถกระตุ้นระบบ ภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อได้ แต่แนวคิดนี้ก็ได้ออกไป เมื่อมีการแสดงถึง ผลของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียในหนู ลิง และคนอย่างประสบความสำเร็จ โดยการให้ สปอริโซซอิต์ที่ผ่านการฉายรังสี (irradiated sporozoite) ส่งผลให้ในซีรัมของผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ใน พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียมีแอนติบอดีต่อสปอริโซซอิต์ ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวสามารถ ยับยั้งการลุกลามของสปอริโซซอิต์เข้าสู่เซลล์ตับหรือทำลายเชื้อมาลาเรียในเซลล์ตับได้ เมื่อ พิจารณาถึงข้อมูลและหลักฐานต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลองและในคน รวมทั้งการ ศึกษาในห้องปฏิบัติการและจากภาคสนามก็บ่งชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย สามารถเป็นไปได้

เมื่อมนุษย์เกิดการติดเชื้อมาลาเรีย ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะถูกกระตุ้นและ เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทั้งแบบพึ่งพาแอนติบอดี (humoral immunity) และแบบพึ่งพาเซลล์ (cell-mediated immunity) กระบวนการดังกล่าวนี้จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และสามารถลดความ รุนแรงของโรคมาลาเรีย ส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนหรือความเสียหายต่อชีวิต

ลดลง เมื่อยุงก้นปล่องเพศเมียกัดคนแล้วปล่อยสปอร์โรซอยต์เข้าสู่ร่างกาย ปฏิกิริยาแรกเมื่อร่างกายเกิดการรับรู้จะเกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยอาศัย B lymphocyte ซึ่งแอนติเจนไม่จำเป็นต้องถูกนำเสนอโดยเซลล์อื่น (antigen presenting cells) โปรตีนหรือแอนติเจนที่แสดงออกบนผิวของสปอร์โรซอยต์จะเป็นตัวเลือกจับกับ surface Immunoglobulin (slg) ของ B lymphocyte ซึ่งเป็นตัวรับ (receptors) ที่จำเพาะกับมัน ทำให้เกิดสัญญาณกระตุ้นให้ B lymphocyte แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นและต่อมาเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell สามารถสร้างและหลั่งแอนติบอดีจำนวนมากที่จำเพาะกับแอนติเจนออกมาในเลือดและสิ่งคัดหลั่ง แอนติบอดีที่หลั่งออกมาจะทำหน้าที่เป็นตัวออกฤทธิ์โดยอาศัยกลไก Neutralization และ Opsonization เพื่อต่อสู้และทำลายสปอร์โรซอยต์ ซึ่งแตกต่างจาก T lymphocyte ที่ T cell receptors บนผิวสามารถรับรู้และตอบสนองต่อแอนติเจนก็ต่อเมื่อแอนติเจนนั้นถูกนำเสนอด้วยเซลล์อื่นก่อน

ระบบภูมิคุ้มกันจะถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองต่อ pre-erythrocytic stage เมื่อสปอร์โรซอยต์ปรากฏอยู่ในระบบไหลเวียนเลือด โปรตีนที่แสดงออกบนผิวของสปอร์โรซอยต์ได้ถูกนำมาพิจารณาเป็นองค์ประกอบร่วมของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ซึ่งนอกเหนือจาก CSP และ TRAP ที่เป็นโปรตีนสำคัญที่มีศักยภาพในการเป็นองค์ประกอบของวัคซีนแล้ว STARP ยังเป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่แสดงออกบนผิวของสปอร์โรซอยต์ ซึ่ง synthetic peptide จากส่วนของโปรตีน STARP สามารถกระตุ้นให้เกิด STARP-specific antibody ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการลุกลามของสปอร์โรซอยต์เข้าสู่เซลล์ตับ แม้จะใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็ตาม (Pasquetto et al., 1997) ถึงแม้ว่าจากหลาย ๆ การศึกษาจะคาดว่าบริเวณ Rp10 ของยีน STARP เป็นบริเวณที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี แต่จากการศึกษาโดยใช้ synthetic peptide จากบริเวณ Rp10 ทำการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลิง *Aotus* และ chimpanzee พบว่าเกิดการตอบสนองของ B lymphocyte เท่านั้น แต่ไม่เกิดการตอบสนองของ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) (BenMohamad et al., 2004) นอกจากนี้การศึกษาคความหลากหลายของยีน STARP จากตัวอย่างในประเทศไทยยังพบการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Rp45 และ Rp10 แบบ point mutation จำนวน 4 ตำแหน่ง แต่บริเวณอื่น ๆ ของยีนไม่มีการเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นทำให้การสังเคราะห์โปรตีนของบริเวณ Rp45 และ Rp10 เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนทั้งแบบเพิ่มขึ้น (insertion) และขาดหายไป (deletion) (Jongwutiwes et al., 2008) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วโปรตีนส่วนที่มีกรดอะมิโนซ้ำ ๆ กันเป็นชุด สามารถกระตุ้น B lymphocyte ได้โดยไม่ต้องอาศัย T lymphocyte (T independent B cell response) คล้ายกับบริเวณ tetrapeptide repeats ของ CSP แต่ประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นอาจมีประสิทธิผลต่ำเพราะแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นจะจับกับแอนติเจนได้ไม่ดีพอ (low

affinity) และมักจะไม้จดจำแอนติเจนในภายหลัง (poor memory formation) ทำให้การทำลายเชื้อ มาลาเรียไม่มีศักยภาพอย่างเต็มที่ (Shofield L., 1991) อาจส่งผลต่อการกระตุ้นการตอบสนองต่อ ภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีเพื่อทำลายและยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ซึ่งอาจ เป็นกลไกอย่างหนึ่งที่ทำให้เชื้อมาลาเรียหลบหลีกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ด้วยเหตุนี้ในบริเวณ Rp45 และ Rp10 ที่มีกรดอะมิโนเรียงซ้ำกันของยีน STARP น่าจะเกิดกลไก เช่นเดียวกับบริเวณที่กล่าวไปในยีน CSP ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาคั้งแรก เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการเป็นแอนติเจนโดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยมาลาเรียจากการติดเชื้อโดย ธรรมชาติจากตัวอย่างในประเทศไทย จึงเลือกศึกษาโปรตีนในบริเวณ 3' non-repeat ของยีน STARP เพราะเป็นบริเวณที่ไม่เกิดการซ้ำกันของกรดอะมิโน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในทุก isolates จากการศึกษตัวอย่างในประเทศไทยและมีการคงรูปแบบของยีน (Jongwutiwes et al., 2008) อีกทั้ง synthetic peptide จากบริเวณ 3' non-repeat ของยีน STARP (HABP 20570-KSMINAYLDKLDLETVRKIH) เมื่อทำการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลิง *Aotus* แล้วศึกษาด้วยวิธี IFA พบแอนติบอดีในปริมาณสูงที่สามารถต่อต้านสปอร์โรซอยต์และบริเวณ MINAYLDKL ยังเป็น epitope ที่สามารถกระตุ้น cytotoxic T-lymphocyte ให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้

การศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตโปรตีนลูกผสม โดยโปรตีนที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 146 ตัว ละลายออกมาอยู่ในรูปของสารละลาย ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น กลาง กรดและเบส คิดเป็นร้อยละ 61.9, 23.3 และ 15.8 ตามลำดับและเมื่อนำ 6x His-tag fusion protein มาทดสอบความสามารถในการเป็นแอนติเจนกับตัวอย่างซีรัมทั้ง 4 กลุ่ม รวมทั้งหมด 111 ตัวอย่าง พบว่าซีรัมของผู้ป่วยมาลาเรีย *P. falciparum* มี anti-STARP 3'non-repeat antibody จำนวน 23 ตัวอย่างจากทั้งหมด 54 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.6 โดยเพศชายให้ผลบวกมากกว่า เพศหญิง คิดเป็นร้อยละ 52.2 และ 47.8 ตามลำดับ ส่วนใหญ่มีอายุต่ำกว่า 15 ปีถึง 25 ปี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากบริเวณ 3'non-repeat ของยีน STARP มีบริเวณหรือ epitope ที่สามารถ กระตุ้น B lymphocyte ให้ผลิตแอนติบอดีออกมาต่อต้านสปอร์โรซอยต์จากการติดเชื้อตาม ธรรมชาติได้ แต่เมื่อทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยมาลาเรีย *P. vivax* ไม่พบ anti-STARP 3' non-repeat antibody หรือไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเช่นเดียวกับการทดสอบในกลุ่มเสี่ยงและกลุ่มคน ปกติ แสดงว่า anti-STARP 3'non-repeat antibody จะถูกผลิตขึ้นเมื่อมีการปรากฏของเชื้อ มาลาเรีย *P. falciparum* ในร่างกายเท่านั้น ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวนี้ การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค มาลาเรียอาจเหมาะสมที่จะนำมาป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* เท่านั้น อาจจะไม่ สามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ในธรรมชาติ ซึ่งจำเป็นต้องใช้เป็นองค์ประกอบ ร่วมกับแอนติเจนจากสายพันธุ์อื่นและหลายระยะจากวงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรีย

สำหรับปริมาณการติดเชื้อมาลาเรียได้ทำการประเมินเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย (parasitemia) จากแผ่นฟิล์มเลือดหนา จำนวนเชื้อมาลาเรียที่ตรวจพบได้คือตั้งแต่ 40 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ถึง 98,840 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร หรือเฉลี่ย 17,316 ตัวต่อเลือด 1 ไมโครลิตร

ระยะเวลาเจริญที่ตรวจพบประกอบด้วยระยะวงแหวนเป็นส่วนใหญ่และระยะแกมีโตไซต์

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้พิจารณาค่า parasitemia กับความสัมพันธ์ของปริมาณแอนติบอดีจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยในการติดเชื้อมาลาเรีย ไม่ว่าจะค่า parasitemia จะมีค่า $\geq 5,000$ P/ul หรือ $< 5,000$ P/ul ทั้ง 2 กรณีก็สามารถตรวจพบ anti-STARP 3'non-repeat antibody แสดงให้เห็นว่าค่า parasitemia จะมากหรือน้อยก็ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอนติบอดีจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยในการติดเชื้อมาลาเรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) คาดว่าปริมาณของแอนติบอดีจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยอาจขึ้นอยู่กับ การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล หรือขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียและชาติพันธุ์ของคน

สำหรับองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียที่มีศักยภาพที่ดี ควรสามารถทำลายเชื้อได้หลายระยะและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ทั้ง B และ T lymphocyte อีกทั้งแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบไม่ควรมีความหลากหลายสูง จึงจะสามารถทำลายและยับยั้งเชื้อมาลาเรียได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้เมื่อผู้ที่ได้รับวัคซีนติดเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ การติดเชื้อดังกล่าวต้องสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองได้อย่างมีประสิทธิภาพและคงอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน ยีน STARP มีการคงรูปแบบของยีนสูงและมีบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับเซลล์ตับ อีกทั้งมีการศึกษาการใช้ CSP และ TRAP ร่วมกันสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันดีกว่าการเลือกใช้โปรตีนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง (Khusmith et al., 1991) ด้วยข้อสนับสนุนนี้จึงไม่น่าจะเป็นอุปสรรคของการนำโปรตีน STARP 3'non-repeat มาเป็นองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรีย ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการเป็นแอนติเจนของโปรตีน STARP 3'non-repeat ต่อการติดเชื้อตามธรรมชาติจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาองค์ประกอบของวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียจาก STARP ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาโดยใช้จำนวนตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยมาลาเรียมากขึ้นหรือจากหลาย ๆ พื้นที่ จะทำให้เห็นภาพรวมของการติดเชื้อประชากร
2. การศึกษาโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองโดยใช้โปรตีนจากส่วนของ STARP เพื่อผลิต monoclonal antibody จะทำให้เข้าใจกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและทราบความสามารถในการเป็นแอนติเจนของ STARP มากขึ้น
3. การใช้โปรตีนสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยบริเวณต่าง ๆ ของโปรตีน STARP ร่วมกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ จะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคมาลาเรียต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Aikawa, M., Miller, L.H., and Rabbege, J. 1975. Caveola-vesicles complexes in the plasmalemma of erythrocytes infected by *Plasmodium vivax* and *P. cynomolgi*. Unique structures related to Schuffner's dots. **Am J Pathol** 79: 285-300.
- Akarawa, T., Komesu, A., Otsuki, H., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R., Matsumoto, Y., et al. 2005. Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. **Infect Immun** 73(11): 7375-7380.
- Amante, F.H., Crewther, P.E., Anders, R.F., and Good, M.F. 1997. A cryptic T cell epitope on the apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi adami* can prime for an anamnestic antibody response: implication for malaria vaccine design. **J Immunol** 159: 5535-5544.
- Baldacci, P., and Menard, R. 2004. The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. **Mol Microbiol** 54: 298-306.
- Ballou, W.R., Hoffman, S.L., Sherwood, J.A., et al. 1987. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. **Lancet** 1: 1277-1281.
- Banister, L., and Mitchell, G. 2003. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends Parasitol** 19: 209-213.
- Barr, P.J., Green, K.M., Gibson, H.L., Bathurst, I.C., Quakyi, I.A., and Kaslow, D.C. 1991. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. **J Exp Med** 174: 1203-1208.
- Beier, J.C., Onyango, F.K., Koros, J.K., et al. 1991. Quantitation of malaria sporozoites transmitted in vitro during salivation by wild Afrotropical *Anopheles*. **Med Vet Entomol** 5: 71-79.
- BenMohamed, L., Thomas, A., and Druilhe, P. 2004. Long-term multiepitopic cytotoxic-T-lymphocyte responses induced in chimpanzees by combinations of *Plasmodium falciparum* liver-stage peptides and lipopeptides. **Infect Immun** 72: 4376-4384.

- Bergman, L.W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T.M., Fox, S., Matuschewski, Nussenzweig, V., and Kappe, S.H. 2003. Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. **J Cell Sci** 116: 39-46.
- Blackman, M.J., Heidrich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S., and Holder, A.A., 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J Exp Med** 172: 379-382.
- Bojang, K.A. 2006. RTS,S/AS02A for malaria. **Expert Rev Vaccines** 5: 611-615.
- Bottius, E., BenMohamed, L., Brahimi, K., et al. 1996. A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes. **J Immunol** 156: 2874-2884.
- Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Sabchareon, A., Chongsuphajaisiddhi, T., and Druilhe, P. 1990. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stage do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. **J Exp Med** 172: 1633-1641.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J., and DeRisi, J.L. 2003. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. **PLOS Biol** 1: E5.
- Breman, J.G., Alilio, M.S., and Mills, A. 2004. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. **Am J Trop Med Hyg** 71(Suppl): 1-15.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D. Müller, M., Ibrahim, I. Häuptle, M.T., and Dobberstein, B. 1987. A T5 promoter based transcription-translation system for the analysis of proteins in vivo and in vitro. **Methods Enzymol** 155: 416-433.
- Burn, J.M., Majarian, W.R., Young, J.F., Daly, T.M., and Long, C.A. 1989. A protective monoclonal antibody recognizes an epitope in the carboxyl-terminal cysteine-rich domain in the precursor of the merozoite surface antigen of the rodent malarial parasite, *Plasmodium yoelii*, **J Immunol** 143: 2670-2676.

- Buscaglia, C.A., Coppens, L., Hol, W.G., and Nussenzweig, V. 2003. Site of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*. **Mol Biol Cell** 14: 4947-4957.
- Bzik, D.J., Li, W., Horii, T., and Inselburg, G. 1992. Amino acid sequence of the serine-repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA. **Mol Biochem** 30: 279-288.
- Camus, D., and Hadly, T.J. 1985. A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. **Science** 230: 553-556.
- Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigarito, A.M., Silva, S., Leiriao, P., Carapau, D., Armas-Portela, R., Comoglio, P., Rodriguez, A., and Mota, M.M. 2003. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. **Nat Med** 9: 1363-1369.
- Chang, S.P., Case, S.E., Gosnell, W.L., et al. 1996. A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria. **Infect Immun** 64:253-261.
- Charoenvit, Y., Collins, W.E., Jones, T.R., et al. 1991. Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence. **Science** 251: 668-671.
- Clyde, D.F. 1975. Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. **Am J Trop Med Hyg** 24: 397-401.
- Clyde, D.F., McCarthy, V.C., Miller, R.M., and Hornick, R.B. 1973. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced *falciparum* malaria. **Am J Med Sci** 266: 398-403.
- Coatney, G.R., Elder, H.A., Contacos, P.G., et al. 1961. Transmission of the M strain of *Plasmodium cynomolgi* to man. **Am J Trop Med Hyg** 10: 673-678.
- Collins, W.E., Ander, R.F., Pappaioanou, M., Campbell, G.H., Brown, G.V., Kemp, D.J., Coppel, R.L., Skinner, J.C., Andrysiak, P.M., Favaloro, J.M., Corcoran, L.M., Broderick, J.R., Mitchell, G.F., and Campbell, C.C. 1986. Immunization of *Aotus* monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. **Nature (London)** 323: 259-262.

- Coppel, R.L., Cowman, A.F., Anders, R.F., Bianco, A.E., Saint, R.B., Lingelbach, K.R., Kemp, D.J., and Brown, G.V. 1984. Immune sera recognize on erythrocytes a *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequences. **Nature (London)** 310: 789-792.
- Crawley, J., English, M., Waruiru, C., Mwangi, I., and Marsh, K. 1998. Abnormal respiratory patterns in childhood cerebral malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 92(3): 305-308.
- Daly, T.M., and Long, C.A. 1993. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. **Infect Immun** 61: 2462-2467.
- Deane, L.M., Deane, M.P., and Ferreira Neto, J. 1966. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bull WHO** 35: 805-808.
- Doolan, D.L., and Hoffman, S.L. 2000. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. **J Immunol** 165: 1453-1462.
- Druhe, P., and Branwell John, W. 2007. Pre-erythrocytic stage vaccines: time for a change in path. **Current opinion in Microbiology** 10: 371-378.
- Esposito, F., Lombardi, S., Modiano, D., et al. 1998. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 82: 827-832.
- Etlinger, H.M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H.-J., Stueber, D., and Takacs, B. 1991. Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*. **Infect Immun** 59:3498-3503.
- Etting, M.B., Thinasarn, K., Krachaiklin, S., and Bualombai, P. 1989. Malaria clinics in Mae Sot, Thailand: factors affecting clinic attendance. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 20(3): 331-340.
- Ferreira, M.U., Ribeiro, W.L., Tonon, A.P., Kawamoto, F., Rich, S.M. 2003. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. **Gene** 304: 65-75.

- Fidock, D.A., Bottius, E., Brahimi, K., et al. 1994a. Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP. **Mol Biochem Parasitol** 64: 219-232.
- Fidock, D.A., Sallenbave-Sales, S., Sherwood, J.A., et al. 1994b. Conservation of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein gene, STARP, in field isolates and distinct species of *Plasmodium*. **Mol Biochem Parasitol** 27: 255-267.
- Fischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Tniberge, S., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S.L., and Menard, R. 2004. Imaging moment of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. **Cell Microbiol** 6: 687-694.
- Gillbert, S.C., Plebanski, M., Harris, S.J., et al. 1997. A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes. **Nat Biotechnol** 15: 1280-1284.
- Garcia, L.S. 2007. **Diagnostic Medical Parasitology**. 5th ed. New York: 159-161.
- Ghosh, A., Ribolla, P.E., and Jacobs-Lorena, M. 2001. Targeting Plasmodium ligand on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. **Proc Natt Acad Sci USA** 98: 13278-13281.
- GlexoSmithKline Biologicals (GSK Bio) and The PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI), 2004. Belgium and USA.
- Good, M.F., Maloy, W.L., Lunde, M.N., et al. 1987. Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. **Science** 235: 1059-1062.
- Graves, P., Gelband, H. 2006. Vaccines for preventing malaria (SPf66). **Cochrane Database Syst Rev** CD005966.
- Greenwood, B. 2005. Malaria vaccines: Evaluation and implementation. **Acta Trop** 95: 298-304.
- Guerin-Marchand, C., Druihe, P., Galey, B., et al. 1987. A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. **Nature** 329: 164-167.
- Heintzelman, M.B. 2003. Gliding motility: the molecules behind the motion. **Curr Biol** 13: R57-R59.

- Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, T., Rowe, A., Bennett, D., McMichael, A.J., and Greenwood, B.M. 1991. Common West Africans HLA antigens are associated with protection from severe malaria. **Nature (London)** 352: 595-600.
- Hill, A.V.S., Elvin, A., Willis, A.C., Aidoo, M., Allsopp, C.E.M., Gotch, F.M., Gao, X.M., Takiguchi, M., Greenwood, B.M., Townsend, A.R.M., McMichael, A.J., and Whittle, H.C. 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. **Nature (London)** 360: 434-439.
- Hoffman, S.L., Cannon, L.T. Sr., Berzofsky, J.A., et al. 1987. *Plasmodium falciparum*: sporozoite boosting of immunity due to a T-cell epitope on a sporozoite vaccine. **Exp Parasitol** 64: 64-70.
- Holder, A.A., and Freeman, R.R. 1982. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and monoclonal antibody. **J Exp Med** 156: 1528-1538.
- Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L., and Nussenzweig, R.S. 1984. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. **J Immunol** 132: 909-913.
- Hughes, A.L. 1991. Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (*Plasmodium falciparum* spp.): evidence for positive selection on immunogenic regions. **Genetics**: 345-353.
- Hughes, A.L. 2004. The evolution of amino acid repeat arrays in *Plasmodium* and other organisms. **J Mol Evol** 59: 528-535.
- Imbert, P., Sartelet, I., Rogier, C., Ka, S., Baujat, G., and Candito, D. 1997. Severe malaria among children in a low seasonal transmission malaria, Dakar, Senegal: influence of age on clinical presentation. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 91(1): 22-24.
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Kriangkrai, K., Seethamchai, S., Hongsrimumang, T., and Kanbara, H. 2008. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein: Analysis of isolates mainly from low endemic areas. **Gene** 410: 139-146.

- Jongwutiwes, S., Tanabe, K., Hughes, M.K., Kanbara, H., Hughes, A.L. 1994. Allelic variation in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* from Thai field isolates. **Am J Trop Med Hyg** 51: 659-668.
- Kappe, S.H., Bruderer, T., Gantt, S., Fujjioka, H., Nussenzweig, V., and Menard, R. 1999. Conservation of a gliding mobility and cell invasion machinery in apicomplexan parasites. **J Cell Biol** 147: 937-934.
- Kappe, S.H., Buscaglia, C.A., and Nussenzweig, V. 2004. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. **Annu Rev Cell Dev Biol** 20: 29-59.
- Kappe, S.H., Kaiser, K., and Matuschewski, K. 2003. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. **Trends Parasitol** 19: 135-143.
- Kaslow, D.C., Isaacs, S.N., Quakyi, I.A., Gwadz, R.W., Moss, B., and Keister, D.B. 1991. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. **Science** 252: 1310-1313.
- Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R.L., and Hoffman, S.L. 1991. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. **Science** 252: 715-718.
- Knapp, B., Hundt, E., Enders, B., and Kupper, H.A. 1992. Protection of *Aotus* monkeys from malaria infection by immunization with recombinant hybrid proteins. **Infect Immun** 60: 2397-2401.
- Knapp, B., Hundt, E., Nau, U., and Kupper, H.A. 1989. Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by a serine stretch. **Mol Biochem Parasitol** 32: 73-84.
- Knowles, R., and Das Gupta, B.M. 1932. A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man. **Ind Med Gaz** 67: 301-320.
- Krotoski, W.A., Collin, W.E., Garnham, P.C., Cogswell, F.B., Gwadz, R.W., Killick-Kendrick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L.C., and Stanfill, P.S. 1982. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. **Am J Trop Med Hyg** 31(6): 1291-1293.

- Krotoski, W.A., Krotoski, D.M., Garnham, P.C., Bray, R.S., Killick-Kendrick, R., Draper, C.C., Targett, G.A., and Guy, M.W. 1980. Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. **Br Med J** 280(6208): 153-154.
- Lalvani, A., and Hill, A.V. 1998. Cytotoxic T-lymphocytes against malaria and tuberculosis: from natural immunity to vaccine design. **Clin Sci** 95: 531-538.
- Lockyer, M.J., Marsh, K., and Newbold, C.I. 1989. Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. **Mol Biochem Parasitol** 37: 275-280.
- Lopez, R., Garcia, J., Puentes, A., et al. 2003. Identification of specific Hep G2 cell binding regions in *Plasmodium falciparum* sporozoite-threonine-asparagine-rich protein (STARP). **Vaccine** 21: 2404-2411.
- Marsh, K., and Howard, R.J. 1986. Antigens induced on erythrocytes by *Plasmodium falciparum*: expression of diverse and conserved determinant. **Science** 231: 150-153.
- Marsh, C., English, M., Crawley, J., and Peshu, N. 1996. The pathogenesis of severe malaria in African children. **Ann Trop Med Parasitol** 90(4): 395-402.
- Miller, L.H., Howard, R.J., Carter, R., et al. 1986. Research towards malaria vaccines. **Science** 234: 1349-1356.
- Morrisettes, N.S., and Sibley, L.D. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiol Mol boil Rev** 24: 149-156.
- Mota, M.M., and Rodriguez, A. 2002a. Invasion of mammalian host cell by *Plasmodium* sporozoites. **BioEssays** 24: 141-156.
- Mota, M.M., Hafalla, J.C., and Rodriguez, A. 2002b. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoite for infection. **Nat Med** 8: 1318-1322.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. 2001. Migration of *Plasmodium* sporozoite through cells before infection. **Science** 291: 141-144.
- Mulligan, H.W., Russell, P.F., and Mohan, B.N. 1941. Active immunization of fowls against *Plasmodium gallinaceum* by infections of killed homologous sporozoites. **J Malaria Inst India** 4: 25-34.

- Myung, J.M., Marshall, P., and Sinnis, P. 2004. The Plasmodium circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites. **Mol Biochem Parasitol** 133: 53-59.
- Nardin, E.H., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., et al. 1982. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Exp Med** 156: 20-30.
- Nardin, E., Zavala, F., Nussenzweig, V., et al. 1999. Pre-erythrocytic malaria vaccine: mechanisms of protective immunity and human vaccine trials. **Parasitologia** 41: 397-402.
- Narum, D.L., and Thomas, A.W. 1994. Differential localization of full-length and processed forms of a PF83/AMA-1 apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Mol Biochem Parasitol** 67: 59-68.
- Ngo, H.M., Yang, M., and Joiner, K.A. 2004. Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? **Mol Microbiol** 52: 1531-1541.
- Nussenzweig, R., Vanderberg, J., and Most, H. 1969. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. IV. Dose response, specificity and humoral immunity. **Mill Med** 134: 1176-1182.
- Owusu-Agyei, S., Koram, K.A., Baird, J.K., et al. 2001. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. **Am J Trop Med Hyg** 65: 197-203.
- Pasquetto, V., Fidock, D.A., Gras, H., et al. 1997. *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. **Eur J Immunol** 27: 2502-2513.
- Perlaza, B.L., Arevalo-Herrera, M., Brahimi, K., et al. 1998. Immunogenicity of four *Plasmodium falciparum* preerythrocytic antigens in *Aotus lemurinus* monkeys. **Infect Immun** 66: 3423-3428.
- Perlmann, H., Berzins, K., Wahlgren, M., Carlsson, J., Bjorkman, A., Patarroyo, M.E., and Perlmann, E. 1984. Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. **J Exp Med** 159: 1686-1704.

- Perrin, L.H., Loche, M., Dedet, J.-P., Roussilhon, C., and Fandeur, T. 1984. Immunization against *Plasmodium falciparum* asexual blood stages using soluble antigens. **Clin Exp Immunol** 56: 67-72.
- Phillips, R.S., Trigg, P.I., Scott-Finnigan, T.J., Bartholomew, R.K. 1972. Culture of *Plasmodium falciparum* in vitro: a sub-culture technique used for demonstrating antiplasmodial activity in serum from some Gambians, resident in an endemic malarious area. **Parasitology** 65: 525-535.
- Pimento, P.F., Touray, M., and Miller, L. 1994. The journey of malaria sporozoite in the mosquito salivary gland. **J Eukaryot Microbiol** 41: 608-624.
- Plebanski, M., Lee, E.A.M., Hannan, C.M., et al. 1999. Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. **Nat Med** 5: 565-571.
- Polley, S.D., Mwangi, T., Kocken, C.H., et al. 2004. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their association with protection from malaria. **Vaccine** 23: 718-728.
- Potocnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R.S., and Nussenzweig, V. 1980. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. **J Exp Med** 151: 1504-1513.
- Pye, D., Edwards, S.J., Anders, R.F., O'Brien, C.M., Franchina, P., Corcoran, L.N., Monger, C., Peterson, M.G., Vandenberg, K.L., Smythe, J.A., Westley, S.R., Coppel, R.L., Webster, T.L., Kemp, D.J., Hampson, A.W., and Langford, C.J. 1991. Failure of recombinant vaccinia viruses expressing *Plasmodium falciparum* antigens to protect Saimiri monkeys against malaria. **Infect Immun** 59: 2403-2411.
- Ramasamy, R. 1987. Studies on glycoproteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Identification of a myristylated 45 kDa merozoite membrane glycoprotein. **Immunol Cell Biol** 65: 419-424.
- Rogers WO, Malik A, Mellouk S, et al. 1992. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 9176-9180

- Roggero, M.A., Filippi, B., Church, P., Hoffman, S.L., Blum-Tirouvanziam, U., Lopez, J.A., et al. 1995. Synthesis and immunological characterization of 104-mer and 102-mer peptide corresponding to the N- and C-terminal regions of the *Plasmodium falciparum* CS protein. *Mol Immunol* 32(17/18): 1301-1309.
- Rosenberg, R. and Rungsiwongse, J. 1991. The number of sporozoites produced by individual malaria oocyst. *Am J Trop Med Hyg* 45: 574-577.
- Rosenberg, R., Wirtz, R.A., Lanar, D.E., et al. 1989. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* 245: 973-976.
- Russel, P.F. 1955. Man's mastery of malaria. London. **Oxford University Press**.
- Russell, P., and Mohan, B.N. 1942. The immunization of flow against mosquitos-borne *Plasmodium gallinaceum* by injection of serum and of inactivated homologous sporozoites. *J Exp Med* 76: 477-492.
- Scheller, L.F., and Azad, A.F. 1995. Maintenance of protective immunity against malaria by persistant hepatic parasites derived from irradiated sporozoites. *Proc NaH Acad Sci USA* 92: 4066-4068.
- Schwenk, R., Asher L.V., Chalom I., et al. Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-based vaccine. *Parasite Immunol* 25: 17-25.
- Shofield L. 1991. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasite. *Parasitol today* 7: 99-105.
- Sibley, L.D., Hakansson, S., and Carruthers, V.B. 1998. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol* 8: R12-R14.
- Siddiqui, W.A., Tam, L.Q., Kramer, K.J., Hui, G.S.N., Case, S.E., Yamaga, K.M., Chang, S.P., Chan, E.B.T., and Kan, S.-C. 1987. Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3014-3018.
- Sidjanski, S.P., Vanderberg, J.P., and Sinnis, P. 1997. Anopheles stephensi salivary glands bear receptors for region I of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 90: 33-41.

- Sigler, C., Leland, P., and Hollingdale, M. 1984. In vitro infectivity of irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoite to cultured hepatoma cells. **Am J Trop Med Hyg** 33: 544- 547.
- Silvie, O., Franetich, J.F., Renia, L., and Mazier, D. 2004. Malaria sporozoite: migrating for a living. **Trends Mol Med** 10: 97-100.
- Sim, B.K.L., Orlandi, P.A., Haynes, J.D., Klotz, F.W., Carter, J.M., Camus, D., Zegans, M.E., and Chulay, J.D. 1990. Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. **J. Cell Biol** 111: 1877-1884.
- Sinnis, P., Clavijo, P., Fenyo, D., Chait, B.T., Cerami, C., and Nussenzweig, V. 1994. Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. **J Exp Med** 180: 297-306.
- Smith, D.C., and Sanford, L.B. 1985. Laveran's germ: the reception and use of a medical discovery. **Am J Trop Med Hyg** 34; 2-20.
- Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., et al. 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotype of infected erythrocytes. **Cell** 82: 101-110.
- Smythe, J.A., Coppel, R.L., Brown, G.V., Ramasamy, R., Kemp, D.J., and Anders, R.F. 1988. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci USA** 85: 5195-5199.
- Smythe, J.A., Peterson, M.G., Coppel, R.L., Saul, A.J., Kemp, D.J., and Anders, R.F. 1990. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol** 39: 227-234.
- Sokhna, C.S., Rogier, C., Dieye, A., et al. 2000. Host factors affecting the delay of reappearance of *Plasmodium falciparum* after radical treatment among a semi-immune population exposed to intense perennial transmission. **Am J Trop Med Hyg** 62: 266-270.
- Spencer, H.C. 1986. Epidemiology of malaria. **Clin Trop Med Com His** 1:1-28.

- Stüber, D., Matile, H., and Garotta, G. 1990. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In: Immunological Methods, Lefkovits, I. and Pernis, B., eds., vol. IV, **Academic Press**, New York, pp. 121–152.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, R.S., and Menard, R. 1997. TRAP is necessary for gliding motility and invasion of host cell. *Int Microbiol* 2: 155-160.
- Tanabe, K., Mackey, M., Goman, M., and Scafie, J.G. 1987 Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 195: 273-287.
- Thimasarn, K., Jatapadma, S., Vijaykadga, S., Sirichaisinthop, J., et al. 1995. Epidemiology of malaria in Thailand. *J Travel Med* 2: 59-65.
- Tongren, J.E., Zavala, F., Roos, D.S., and Riley, E.M. 2004. Malaria vaccines: if at first you don't succeed... *Trends Parasitol* 20: 604-610.
- Vanderberg, J., Nussenzweig, R., and Most, H. 1969. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V. In vitro effects of immune serum on sporozoites. *Mil Med* 134: 1183-1190.
- Vermeulen, A.N., Ponnudurai, T., Beckers, P.J.A., Verhave, J.P., Smits, M.A., and Meuwissen, J.H.E.T. 1985. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med* 162: 1460-1476.
- Wahlin, B., Wahlgren, M., Perlmann, H., Berzins, K., Bjorkman, A., Patarroyo, M.E., and Perlmann, P. 1984. Human antibodies to a M_r 155,000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7912-7916.
- Warrell, D.A., Molyneux, M.E., and Beale, P.F. 1990. Severe and complicated malaria. *Tran Roy Soc Trop Med Hyg* 84: 1-65.
- Wernsdorfer, W.H. 1991. The development and spread of drug resistant malaria. *Parasitol Today* 7: 297-303.

World Health Organization and IVR. 2007. State of the art of new vaccine. **Research and development.**

World Health Organization and UNICEF. World malaria report, 2005.

Worrall, E., Rietveld, A., and Delacollette, C. 2004. The burden of malaria epidemics and cost-effectiveness of intervention in epidemic situations in Arica. **AM J Trop Med Hyg** 71(2): 136-140.

Yuda, M., and Ishino, T. 2004. Liver invasion by malarial parasites; how do malarial parasites break through the host barrier? **Cell Microbiol** 6: 1119-1125.

Zhang, D., Pan, W. 2005. Evaluation of three *Pichia pastoris*-expressed *Plasmodium falciparum* merozoite proteins as a combination vaccine against infection with blood-stage parasites. **Infect Immun** 73(10): 6530-6536.





ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และตัวอย่างที่ทดสอบพบ anti-STARP 3'non-repeat antibody

ตัวอย่าง	เพศ	อายุ	อุณหภูมิร่างกาย	Parasitemia	anti-STARP
				Parasites/ μ l	3'non-repeat antibody
TSY1681	ญ	32	36.8	760	-
TSY1689	ช	36	37.6	800	-
TSY1690	ญ	6	38.3	7,120	+
TSY1699	ช	45	36.9	120	-
TSY1706	ญ	49	36.7	760	+
TSY1707	ญ	4	37.2	12,240	+
TSY1720	ญ	25	36.4	1,240	-
TSY1734	ช	39	36.7	160	-
TSY1741	ญ	19	36.7	2,400	+
TSY1742	ญ	20	37.3	4,640	-
TSY1745	ญ	10	37	2,320	-
TSY1746	ญ	4	37.2	120	+
TSY1748	ช	7	39	640	+
TSY1749	ช	10	37.3	400	-
TSY1750	ญ	60	36.8	640	-
TSY1753	ญ	4	38.5	56,480	+
TSY1757	ช	40	36.5	160	-
TSY1775	ญ	48	37	400	+
TSY1788	ช	48	36.5	40	-
TSY1789	ญ	48	36.5	2,240	+
TSY1794	ญ	36	36.6	40	-
TSY1811	ช	8	40	34,560	+
TSY1813	ช	33	36.6	880	-

หมายเหตุ: ช (ชาย), ญ (หญิง), + (positive), - (negative)

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และตัวอย่างที่ทดสอบพบ anti-STARP 3'non-repeat antibody

ตัวอย่าง	เพศ	อายุ	อุณหภูมิร่างกาย	Parasitemia	anti-STARP
				parasites/ μ l	3'non-repeat antibody
AP 380	ช	24	36.8	15,840	+
AP 383	ช	27	37.6	5,920	-
AP 385	ช	36	38.1	8,640	-
AP 386	ญ	31	38.4	19,840	-
AP 387	ช	16	36.5	64,000	-
AP 389	ช	26	39.5	2,880	+
AP 397	ช	31	38.1	69,440	+
AP 399	ช	25	37.3	1,280	-
AP 400	ช	26	40.4	34,020	+
AP 401	ญ	12	36.9	3,520	-
AP 414	ช	18	36.3	2,720	-
AP 415	ช	20	36.3	41,280	+
AP 418	ญ	5	38.5	26,240	+
AP 419	ญ	18	36.1	12,800	+
AP 426	ช	33	37.4	77,440	-
AP 430	ช	47	35.8	33,520	+
AP 432	ช	7	38	98,840	+
AP 433	ญ	8	38	16,960	-
AP 441	ญ	15	37.2	5,760	-
AP 445	ช	16	39.5	32,960	+
AP821	ช	14	38.2	53,440	-
AP822	ช	34	37.6	5,440	-
AP823	ช	27	37.8	8,000	-
AP836	ช	20	36.5	76,160	-
AP856	ช	12	36.7	24,320	-
AP858	ญ	56	40	11,200	-
AP868	ช	31	37.8	22,720	-
AP876	ช	22	38.3	12,160	+
AP878	ช	15	36.9	7,040	+
AP881	ญ	6	36.5	2,240	-
AP882	ช	21	38.6	9,280	+

หมายเหตุ: ช (ชาย), ญ (หญิง), + (positive), - (negative)

ภาคผนวก ข

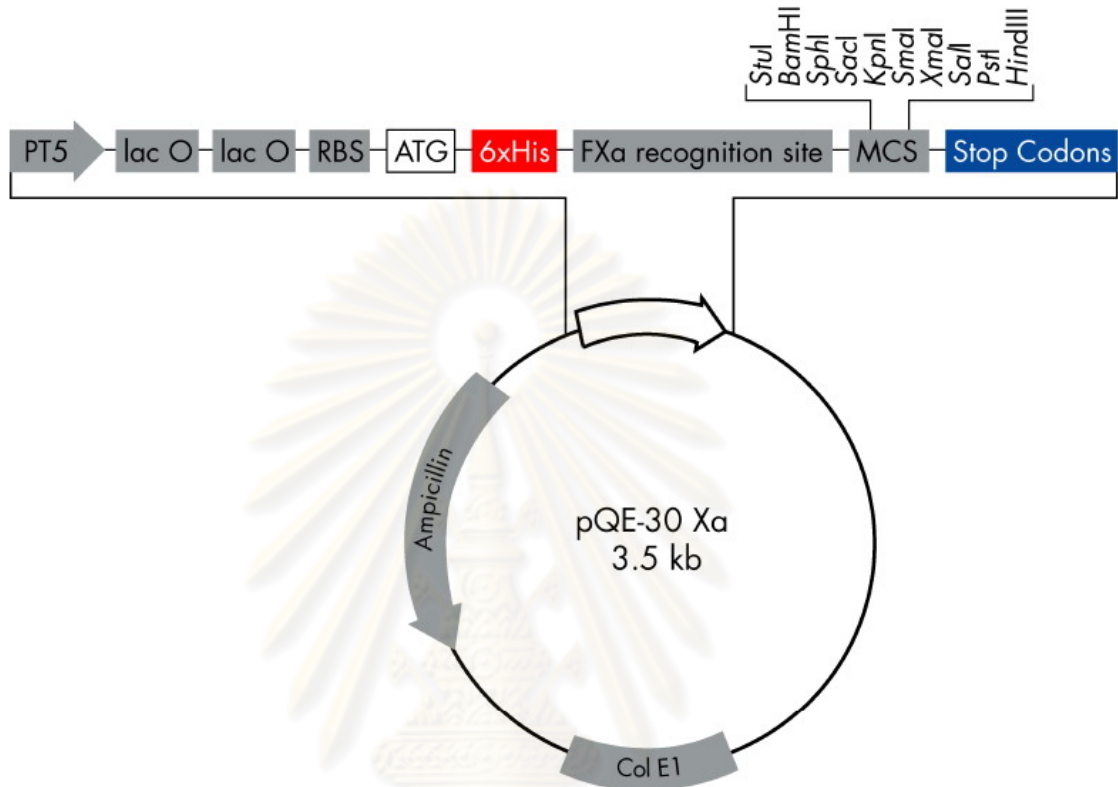
ดีเอ็นเอพาหะและดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. ดีเอ็นเอพาหะ pQE-30 Xa

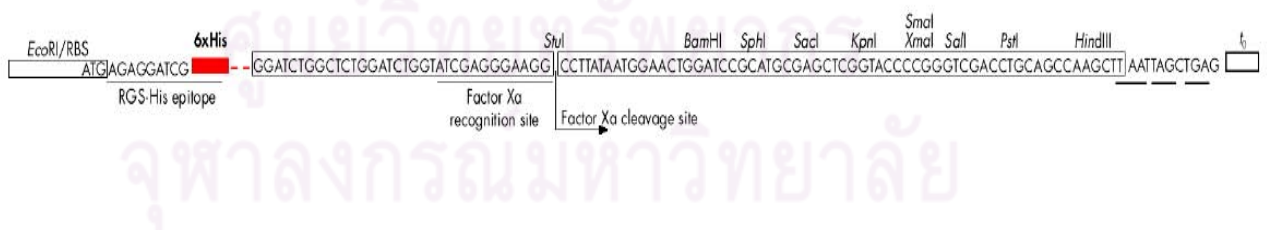
ดีเอ็นเอพาหะ pQE-30 Xa เป็นดีเอ็นเอพาหะสังเคราะห์ที่ใช้ระบบของ T5 promoter transcription-translation system ซึ่งดีเอ็นเอพาหะ pQE เป็นพลาสมิดที่อยู่ใน pDS family (Bujard et al., 1987) ที่ได้รับการปรับปรุงจากพลาสมิด pDS56/RBSII และ pDS781/RBSII-DHFRS (Stuber et al., 1990) โดย pQE-30 Xa มีขนาด 3,500 bp และประกอบด้วย

1.1 Start of numbering at <i>Xho</i> I (CTCGAG)	1-6
1.2 T5 promoter/lac operator element	7-87
1.3 T5 transcription start	61
1.4 6xHis tag coding sequence	127-144
1.5 Factor Xa Protease recognition site	166-177
1.6 Multiple cloning site (MCS)	175-240
1.7 Lambda <i>t0</i> transcriptional termination region	256-350
1.8 <i>rrnB</i> T1 transcriptional termination region	1112-1210
1.9 ColE1 origin of replication	1686
1.10 β -lactamase coding sequence	3304-2444
1.11 Ampicillin resistance	

A.



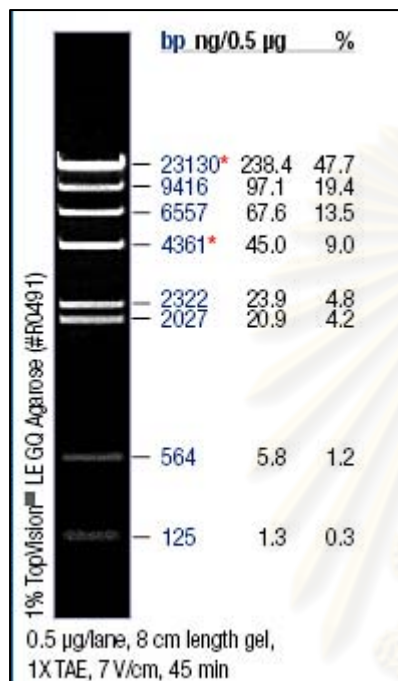
B.



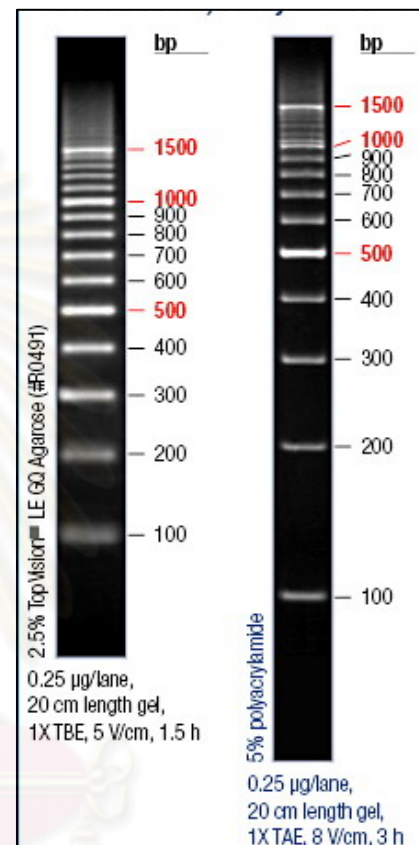
ภาพที่ 11 A) แสดงแผนที่ยีนของดีเอ็นเอพลาสมิด pQE-30Xa ขนาด 3.5 kb และ B) แสดงบริเวณของ RGS-His epitope และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (QIAGEN)

2. ดีเอ็นเอมาตรฐาน

A) ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ *Hind*III



B) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder plus



ภาพที่ 12 แสดงแผนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐาน A) ดีเอ็นเอของ λ -DNA ถูกตัดสมบูรณ์ด้วย เอนไซม์ *Hind*III ได้ขึ้นดีเอ็นเอ 8 ชิ้น มีขนาด 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 kb ตามลำดับ โดยมี reference band ที่ 4.361 และ 23.130 kb B) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder plus ประกอบด้วยขึ้นดีเอ็นเอ 15 ชิ้น มีขนาด 1500, 1400, 1300, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp ตามลำดับ โดยมี reference band ที่ 500, 1000 และ 1500 bp (Fermentas Life Science)

ภาคผนวก ค

เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4)

1. เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4)

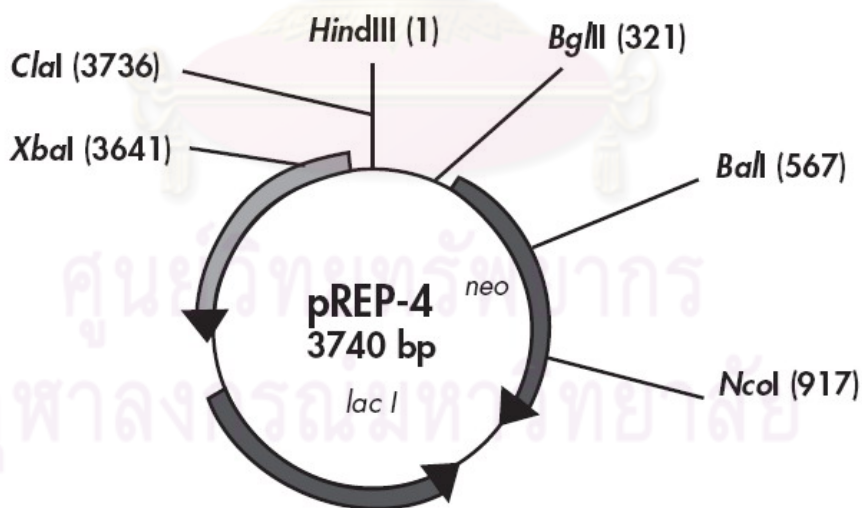
1.1 *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 จะมี repressor plasmid (pREP4) อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งจะช่วยให้การแสดงออกของโปรตีนให้มีปริมาณสูง

1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 ได้รับการดัดแปลงจากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ K12

1.3 *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 สามารถแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ดังนี้ Nal^{r} , Str^{r} , Rif^{r} , Thi^{-} , Lac^{-} , Ara^{+} , Gal^{+} , Mtl^{-} , F^{-} , RecA^{+} , Uvr^{+} และ Lon^{+}

1.4 *Escherichia coli* สายพันธุ์ M15 ตี้อย่า kanamycin

2. pREP4 plasmid



Restriction map of pREP4

ภาพที่ 13 แสดงแผนที่ยีนของ pREP-4 ขนาด 3,740 bp ซึ่งเป็นพลาสมิดที่อยู่ภายในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ M15

ภาคผนวก ง

แสดงรหัสพันธุกรรม (genetics code)

Second Position

	U	C	A	G	
U	UUU UUC Phe UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA* Stop UAG* Stop	UGU Cys UGC UGA* Stop UGG Trp	U C A G
C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU CAC His CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	U C A G
A	AUU AUC Ile AUA AUG ⁺	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU AAC Asn AAA Lys AAG	AGU AGC Ser AGA Arg AGG	U C A G
G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU GAC Asp GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U C A G

* chain termination, or "nonsense," codon

⁺ the initiator codon

ภาคผนวก จ

แสดงรหัสและตัวย่อสำหรับกรดอะมิโน

Amino acid	Three-letter abbreviation	One-letter symbol
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	val	V

ภาคผนวก จ

วิธีการเตรียมสารเคมี

การเตรียม 1M Dithiothreitol (DTT)

DTT	3.09	g
0.01M sodium acetate (pH 5.2)	20	ml

sterile โดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm แล้วเก็บรักษาที่ -20°C

การเตรียม 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1	g
d.H ₂ O	800	ml

นำส่วนผสมทั้ง 2 อย่างนี้มาควนด้วย magnetic stirrer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้มีค่า pH = 8 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อ

การเตรียม gel-loading buffers

bromophenol blue	0.25	g
xylene cyanol FF	0.25	g
glycerol in water	30	g

ละลายในน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

การเตรียมสี Giemsa (stock)

สี Giemsa (ผง)	25	g
Absolute Methanol	1650	ml
Glycerine	1650	ml

บดผงสีก่อน โดยค่อยๆเติม glycerine ไปทีละน้อยๆ จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส พร้อมกับเท glycerine ที่เหลือผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม absolute methanol ลงไปเขย่าให้เข้ากัน และนำเอา stock solution นี้เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลประมาณ 1-3 เดือน ก่อนนำมาใช้จะทำให้การย้อมสีดีกว่าใช้ในขณะที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ

การเตรียม buffer ย้อมสี (stock buffer)

buffer I	Na ₂ H ₂ PO ₄ .H ₂ O	9.2 g
	น้ำกลั่น	1000 ml
Buffer II	Na ₂ HPO ₄	9.5 g
	น้ำกลั่น	1000 ml

การเตรียม 0.8M IPTG stock solution (20%w/v)

IPTG	2	g
d.H ₂ O	8	ml

ผสมให้เข้ากันจนกว่า IPTG จะละลายจนหมด แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml จากนั้น sterile โดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 µm แล้วเก็บรักษาที่ -20 °C

การเตรียม marker

DNA marker	20	µl
Gel loading buffer	80	µl
TE buffer	360	µl

การเตรียม 10% SDS

SDS	100	g
d.H ₂ O	900	ml

ผสมให้เข้ากันโดยให้ความร้อนประมาณ 68 °C ทำการปรับ pH ที่ 7.2 โดยใช้ HCl เข้มข้น แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

การเตรียม 2x SDS gel loading dye

100mM Tris.HCl (pH 6.8)
200mM DTT
4% SDS
0.2% bromophenol blue
20% glycerol

การเตรียม TBE buffer (10x)

Tris base	108 g
Boric acid	55 g
EDTA	7.4 g

ปรับค่า pH และปริมาตรให้เท่ากับ 8.3 และ 1 ลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อเช่นเดียวกัน*

การเตรียม TE buffer (10x)

1 M Tris	800 ml
0.5 M EDTA	200 ml

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งปลอดเชื้อก่อนที่จะใช้*

การเตรียม Tris-glycine electrophoresis buffer (running buffer)

25 mM Tris-base
250 mM glycine (pH 8.3)
0.1% SDS

การเตรียม Transfer buffer

39 mM glycine
48 mM Tris-base
0.037% SDS
20% methanol

การเตรียม TBS buffer

10 mM Tris.HCl, pH 7.5
150 mM NaCl

การเตรียม TBS-Tween buffer

20 mM Tris.HCl, pH 7.5
500 mM NaCl
0.05% (v/v) Tween 20

การเตรียม TBS-Tween/Triton buffer

20 mM Tris.HCl, pH 7.5

500 mM NaCl

0.05% (v/v) Tween 20

0.2% (v/v) Triton X-100

การเตรียม 1 M Tris (pH 7.8)

Tris base 121.1 g

น้ำกลั่น 800 ml

นำส่วนผสมทั้ง 2 มาละลายให้เป็นเนื้อเดียวด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น และนำไปนึ่งด้วย หม้อปลอดเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – สกุล นายจิตรกุล สุวรรณเจริญ
 วันเดือนปีเกิด วันที่ 20 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2525
 ภูมิลำเนา จังหวัดสกลนคร

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2549 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต
 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
 คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
- พ.ศ. 2550 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทบัณฑิต
 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยาทางการแพทย์
 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย